

상황버섯 및 카레를 첨가한 잡곡밥 추출물의 LLC-PK1 세포에서의 산화적 스트레스 보호 효과

이정숙^{1,2} · 송가락^{2,3} · 길정하^{2,3} · 정병진⁴ · 정종성⁴ · 허태곤⁴ · 박건영^{2,3}

¹부산대학교병원 영양팀, ²부산대학교 식품영양학과
³부산대학교 김치연구소, ⁴두보식품

Protective Effects of *Phellinus linteus* and Curry-Added Cooked Mixed Grain Rice Extracts on Oxidative Stress-Induced LLC-PK1 Cell Damage

Jung-Sook Lee^{1,2}, Jia-Le Song^{2,3}, Jeung-Ha-Kil^{2,3}, Byung-Jin Jeong⁴, Jong-Sung Jeong⁴,
Tae-Gon Huh⁴, and Kun-Young Park^{2,3}

¹Department of Nutrition, Pusan National University Hospital

²Department of Food Science and Nutrition and ³Kimchi Research Institute, Pusan National University

⁴Doobo Food Co. Ltd.

ABSTRACT The aim of this study was to investigate the protective effects of methanolic extracts of cooked mixed grain rice samples, including grain rice (sorghum, black bean, proso millet, and Job's tears) mixed with fermented brown rice (GR), GR added with 0.5% water extract of Sanghwang mushroom (GRS) or 0.1% curry (GRK), and traditional five grain mixed rice (TMR, Ohgokbap), on H₂O₂-induced oxidative injury in LLC-PK1 pig renal epithelial cells. White rice (WR) was used as a positive control. Cells were first exposed to H₂O₂ (250 μM) for 4 hr, followed by treatment with 100 μg/mL of different GR extracts for 24 hr. H₂O₂ significantly induced cell damage ($P < 0.05$). Cellular levels of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and antioxidant enzymes, including catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-px), were measured. In addition, mRNA levels of antioxidant enzymes were determined by RT-PCR assay. Mixed grain rice, particularly GRS and GRK, were able to reduce cellular levels of ROS, decrease lipid peroxidation, and also increase mRNA expression of antioxidant enzymes compared to other samples. These results suggest that mixed grain rice, specifically GRS and GRK, have strong protective effects against H₂O₂-induced oxidative injury in LLC-PK1 cells through inhibition of lipid peroxidation, reduction of ROS levels, and elevation of antioxidant enzyme activities.

Key words: mixed grain rice, LLC-PK1 cell, oxidative damage, antioxidant enzymes

서 론

활성산소(reactive oxygen species, ROS)에 의한 산화적 스트레스는 세포 손상과 지질과산화를 유발하므로 여러 가지 병리학적 현상에서 매우 중요하다(1,2). 산화적 스트레스는 다양한 기전을 통하여 암, 염증, 심장질환, 당뇨병, 비만 및 노화 등의 질병의 발생과 진행에 관여하며(3), 특히 산화적 스트레스에 의해 파괴된 세포는 파킨슨병, 알츠하이머병, 제2형 당뇨병의 원인이 된다(4). 항산화제를 복용하면 인체가 갖고 있는 산화적 스트레스에 대항하는 방어 기전을 향상시킬 수 있다. 몇 가지 합성 항산화제(synthetic anti-

oxidants)가 질병의 예방과 치료를 위해 제안되었으나 이들의 다양한 부작용과 독성은 문제가 되고 있다(1). 이에 반해 천연 항산화제, 특히 식품 성분은 일반적으로 안전하다고 받아들여지므로 합성 항산화제보다 이로운 점이 있다(1,5).

우리나라 식단에서 밥은 주식으로 총 섭취 열량의 50% 이상을 차지한다. 밥의 종류는 보리밥, 잡곡밥, 오크밥 등 다양하지만 그중에서 쌀밥의 선호도가 가장 높다(6). 전통적으로 우리나라는 쌀에 여러 곡류와 두류를 혼합하여 혼식함으로써 영양적으로 바람직한 식생활을 해 왔으며, 특히 대보름날에는 절식으로 찹쌀, 팥, 조, 검은콩, 수수를 섞어 만든 오크밥을 즐겼다. 최근 당뇨, 암 등 만성질환의 증가로 건강에 대한 관심이 증가하면서 선호도가 높은 쌀밥 위주에서 여러 잡곡을 혼합한 잡곡밥의 섭취량이 늘고 있는 추세이다(6). 잡곡밥은 영양가가 우수하여 질병 예방 및 치료의 기본이 되는 음식이다. 잡곡은 식량작물 중 백미와 찹쌀을 제외한 현미, 수수, 기장, 율무, 콩 등을 말하며, 비타민, 무기질

Received 1 July 2014; Accepted 5 August 2014

Corresponding author: Kun-Young Park, Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

E-mail: kunypark@pusan.ac.kr, Phone: +82-51-510-2839

및 식이섬유가 백미의 2~3배이고 기타 다양한 생리활성물질을 함유하고 있어 압, 심혈관 질환, 당뇨병 등 만성질환의 위험을 감소시키는 역할을 한다(7,8). Kweon(9)의 곡류를 이용한 암 예방 식이 연구에서도 현미, 수수, 울무, 검정콩 등의 향돌연변이 및 항암 효과를 보고하였다.

한편 인체에 유용한 물질을 쌀에 입혀서 영양을 높인 기능성 쌀이 있다. 본 실험실의 연구에 의하면(10) 상황버섯은 여러 식용 및 약용버섯을 비교하여 실험한 결과에서 항산화 효과 및 암세포 성장 억제 효과가 가장 높은 것으로 나타났다. 카레는 강황의 커큐민 등을 함유하기 때문에 항산화, 심장질환 예방 및 대장암 억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다(11). 따라서 첨가하는 물질에 따라 다양한 기능을 가진 쌀을 만들 수 있는데 본 연구에서는 항산화 활성을 높이기 위해 상황버섯 추출물 및 커큐민을 함유한 카레 분말을 잡곡밥에 첨가하였다.

이처럼 잡곡의 종류별 항산화 효과 및 향돌연변이 효과에 대한 연구는 많이 진행되었으나 잡곡을 우리가 매일 섭취하는 밥으로 만들어 활성을 비교한 연구는 거의 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 발효현미, 찹쌀현미, 수수, 기장, 서리태, 울무로 기호성이 높은 혼합비율을 조성하고, 건강기능성을 더 증진시키기 위해 상황버섯과 카레가루를 첨가한 잡곡밥을 만들어 LLC-PK1 세포에서 과산화수소(H₂O₂)로 유발된 산화적 스트레스의 보호 효과를 측정하였다. LLC-PK1 세포는 폐지 신장으로부터 얻은 세포주로서, ROS에 의해 유도되는 신장 손상을 연구하기 위한 세포 모델로 널리 사용된다(12). 세포 내에 ROS의 수준, 지질과산화물질인 MDA의 생성량, 항산화 효소(SOD, CAT 및 GSH-px)의 활성, 항산화 효소들의 mRNA 수준을 측정하여 항산화 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 추출

본 실험에 사용된 백미, 발효현미, 찹쌀현미, 수수, 서리태, 기장, 울무, 오곡은 2012년에 생산된 ㈜두보식품(서울, 한국) 제품을 사용하였다. Table 1과 같이 WR은 백미 100%, GR은 발효현미 40%, 찹쌀현미 30%, 수수 10%, 서리태 8%, 기장 10%, 울무 2%를 혼합했으며, GRS는 GR에 상황버섯 추출물을, GRK는 GR에 카레가루(발효강황카레, ㈜오뚜기, 서울, 한국)를 첨가하고, TMR은 찹쌀 60%, 수수 10%, 서리태 10%, 조 10%, 팥 10%로 구성하였다. 각각의 시료를 깨끗이 씻은 후 전기압력밥솥을 이용하여 밥을 짓고 동결건조기를 이용하여 동결 건조 후 마쇄하여 분말로 제조하였다. 분말 시료 10 g에 메탄올 200 mL를 가하여 24시간 동안 교반하고, 이를 3회 반복한 후 filter paper(NO. 2 Whatman, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과한 후, 감압농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 45°C에서 감압 농축하여 메탄올 추출물

Table 1. The ingredient ratio of grain rice

Ingredient	Ratio (%)				
	WR ¹⁾	GR	GRS	GRK	TMR
Fermentation brown rice					
Glutinous brown rice		40.0	40.0	40.0	
Sorghum		30.0	30.0	30.0	
Black bean (<i>Seoritae</i>)		10.0	10.0	10.0	10.0
Proso millet		8.0	8.0	8.0	10.0
Job's tears		10.0	10.0	10.0	
Sanghwang extract (<i>Phellinus linteus</i>)		2.0	2.0	2.0	
Curry powder				0.5	
White rice	100.0				
Glutinous rice					60.0
Foxtail millet					10.0
Red bean (<i>Phaseolus angularis</i>)					10.0

¹⁾WR: white rice, GR: grain rice, GRS: grain rice (added to Sanghwang extract), GRK: grain rice (added to curry powder), TMR: traditional mixed grain rice.

을 얻었다(13). 농축된 시료인 메탄올 추출물을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 희석하여 사용하였다.

세포 배양

실험에 사용된 세포주는 LLC-PK1 세포로 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Gibco BRL, Paisley, UK)에 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL)과 항생제를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂의 배양기(Model 3154, Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA)에서 배양하였다. 세포는 T75 세포 배양용 flask(Nunc, Rochester, NY, USA)의 80% 정도 자랐을 때 세포의 탈착을 위하여 PBS로 가볍게 세척한 다음, 0.05% trypsin-0.02% EDTA(Gibco BRL)를 처리하여 37°C에서 5분간 방치한 후 세포를 채집하였다. 계대 배양은 2~3일에 한 번씩 시행하였다.

산화적 스트레스에 의한 세포 보호 효과 측정

잡곡밥 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 측정하기 위해 MTT법을 변형하여 측정하였다(12). 먼저 LLC-PK1 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cell/mL 분주한 후 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 24시간 동안 방치하여 세포를 부착시켰다. 세포가 부착된 후 시료 추출물을 처리하고 배양기에서 24시간 동안 방치하였다. 24시간 배양이 끝난 후 산화적 스트레스를 유발하기 위해 세포 생존율을 감소시키는 것으로 알려져 있는 250 μM의 과산화수소(H₂O₂)를 처리하고 배양기에서 4시간 동안 방치하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan 결정에 DMSO를 첨가하여 녹인 후 Microplate Reader(Model 680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

지질과산화(lipid peroxidation) 측정

지질과산화물 생성 정도는 세포에 시료 추출물을 처리한 후 24시간 배양시킨 다음 250 μM 의 H_2O_2 를 처리하여 4시간 방치하고, 세포 배양액에 25% TCA(trichloroacetic acid) 1 mL와 0.67% TBA(thiobarbituric acid) 1 mL를 첨가하여 95°C에서 30분간 가열하였다. 그 후 n-butanol 4 mL를 첨가하여 섞은 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하고, 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화물은 malondialdehyde(MDA)의 양으로 환산하여 계산하였다(14).

세포 내 reactive oxygen species(ROS) 수준 측정

세포가 confluence 상태가 되면 96 well tissue culture plate에 5×10^4 cells/well로 seeding 하여 2~4시간 37°C에서 배양한 후 세포가 잘 부착되면, 산화적 스트레스를 유발하기 위해서 250 μM 의 H_2O_2 를 처리하여 4시간 배양하였다. 산화적 스트레스 유발 후 시료를 종류별로 처리하여 24시간 배양한 뒤 80 μM 의 DCFH-DA 용액을 각 well에 주입하여 37°C에서 30분 동안 재배양한 후 FLUOstar OPTIMA Fluorescence Plate Reader(BMG Labtech, Ortenberg, Germany)를 이용하여 485 nm/535 nm에서 형광을 정량하였다.

항산화 효소 측정

세포 내에 항산화 효소는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT) 및 glutathione peroxidase(GSH-px)의 활성을 측정하였다. 세포는 시료 추출물을 처리한 후 24시간 배양시킨 다음 250 μM 의 H_2O_2 를 처리하여 4시간 방치하고, 세포 배양액을 제거한 후 0.1 M의 PBS(pH 7.4)로 3번 세척하여 세포를 모았다. 모든 세포를 sonication 한 다음에 4°C, 10,000 rpm에서 약 15분간 원심분리 하였다. Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 540 nm에서 세포 내 단백질의 함량을 측정하여, 세포 상등액을 이용하여 항산화 효소 활성을 측정하였다.

SOD는 pyrogallol의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund와 Marklund(15)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM PBS(pH 8.2) 8.7 mL에 세포 상등액을 넣은 후 0.3 mL의 3 mM pyrogallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer(UV-2401PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 325 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성의 1 unit은 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 계산하였다. CAT 활성도의 측정은 과산화수소를 기질로 사용하여 spectrophotometer로 240 nm 파장에서 과산화수소가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성을 측정하는 Nelson과 Kiesow(16)의 방법에 의하여 측정하였다. 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 과산화수소를 nmol로 나타내었다. GSH-px 활성도는 Lawrence와 Burk(17)의 방법에 따라 340 nm에서

NADPH의 산화로 인한 흡광도 감소율을 측정하였다. GSH-px 활성 1 unit은 1분당 1 unit의 NADPH가 산화되는 효소의 양으로 나타내었다.

항산화 효소 유전자 발현 측정

동일한 조건에서 준비된 LLC-PK1 세포를 대상으로 Trizol reagent(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 μg 의 RNA에서 ss cDNA를 합성한 후 SOD, CAT와 GSH-px의 primer로 반응시켰으며 house keeping으로 GAPDH를 동시에 실시한 다음 증폭된 mRNA를 2% agarose gel에 전기영동 하여 얻어진 밴드로 판정하였다(18).

통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 모든 통계 분석은 Statistical Analysis System(v9.1 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

산화적 스트레스에 의한 세포 손상 보호 효과 측정(cell viability)

H_2O_2 는 ROS 중 하나로 다양한 세포들(심근, 연골, 피부 섬유아세포 등)의 세포자살을 유도한다(19). LLC-PK1 세포의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시료 추출물을 처리하고 2시간 배양한 후에 MTT assay 방법으로 세포의 생존율을 측정하였다. 모든 실험군은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 90% 이상의 LLC-PK1 세포의 생존율을 유지하였다(결과 미제출). H_2O_2 에 의한 세포독성이 잠곡밥 추출물 처리에 의해 감소되는지 확인하기 위하여 MTT assay 방법으로 정상군과 H_2O_2 처리군 그리고 H_2O_2 처리와 함께 시료 추출물을 처리한 군을 비교하였다. 시료 추출물을 24시간 동안 LLC-PK1 세포에 처리한 후 250 μM 의 H_2O_2 를 4시간 동안 처리하였다. LLC-PK1 세포에 H_2O_2 (250 μM)를 처리한 군에서는 세포 생존율이 50.0%로 정상군에 비해 세포 손상이 유발되었음을 확인할 수 있었다($P < 0.05$). 그러나 시료 추출물을 세포에 처리하였을 경우 WR(54.0%), TMR(62.2%), GR(66.7%) 순으로 H_2O_2 처리군에 비해 세포 생존율이 증가하였다($P < 0.05$). 특히 GRS와 GRK에서 각각 79.1, 78.6%로 가장 높은 세포 생존율을 나타내어 H_2O_2 에 의한 산화적 스트레스로 유발된 세포 손상에 대한 잠곡밥 추출물의 보호 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 1). Qi 등(10)의 연구에서 상 황버섯은 HaCaT 인체피부세포에서 높은 세포 생존율을 나타내었고, Cohly 등(20)의 연구에서 커큐민은 H_2O_2 로 유도

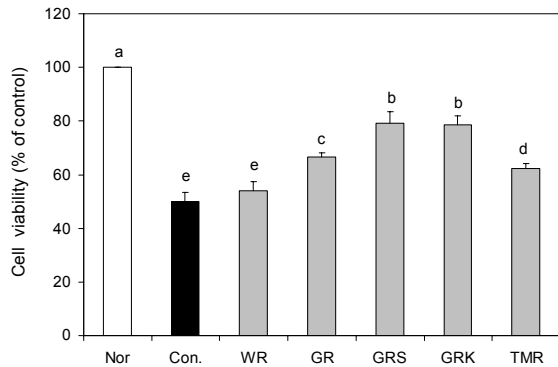


Fig. 1. Protective effects of extracts from cooked mixed grain rice samples (100 µg/mL) against oxidative stress induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) in LLC-PK1 cells. Mean values with different letters (a-e) above the bars are significantly different (*P*<0.05) according to Duncan's multiple range test. The present data were expressed means±SD. Legend as shown in Table 1.

된 LLC-PK1 세포의 산화적 스트레스에 대한 보호 효과가 높다는 연구 결과를 볼 때 GRS와 GRK의 효과가 다른 잡곡밥 추출물에 비해 더 증가된 것으로 보인다.

세포 내 지질과산화물(MDA)의 함량

지질과산화물은 세포의 산화적 스트레스로 인한 손상의 증거로 지질과산화의 반응생성물인 malonadehyde(MDA)를 triobarbituric acid reactive substance(TBARS)법으로 측정하여 잡곡밥 추출물의 산화적 스트레스로 유발된 지질과산화 억제 효과를 확인하였다. LLC-PK1 세포에 시료 추출물을 전처리한 후 H₂O₂(250 µM)로 산화스트레스를 유도한 다음 지질과산화 정도를 측정함으로써 잡곡밥 추출물의 지질과산화 억제 효과를 검토하였다. 정상군의 MDA 생성량은 0.23±0.01 nM/mg protein인데 비하여 H₂O₂ 처리군은 1.25±0.11 nM/mg protein으로 나타나 정상군에 비해 5배 이상 높았다. 불포화지방산, 특히 세포막 내에 많이 함유되어 있는 인지질은 free radical의 공격에 의하여 과산화되고 세포막이 파괴되면서 과산화물질이 증가된다(21). 불포화지방산이 과산화되면 hydroperoxide가 많이 생성된다. MDA는 hydroperoxide의 중요한 분해산물로서 MDA의 측정이 lipid peroxidation의 중요한 biomarker로 알려져 있다. 본 연구에서 LLC-PK1 세포에 시료 추출물을 전처리한 후 H₂O₂를 처리하였을 때 WR(1.02±0.17 nM/mg protein), TMR(0.89±0.05 nM/mg protein), GR(0.85±0.03 nM/mg protein), GRK(0.74±0.09 nM/mg protein), GRS(0.74±0.13 nM/mg protein) 순으로 H₂O₂ 처리군에 비해 유의적(*P*<0.05)으로 감소하여 세포 손상에 의한 지질과산화물 생성이 잡곡밥 추출물 처리에 의해 억제되었음을 알 수 있었다(Fig. 2). 곡류의 tocopherol 성분은 생체막에서 다중불포화지방산의 과산화를 억제하는 기능으로 인해 세포 내의 항산화 활성이 큰 것으로 알려져 있고(22), 카레속의 커큐민은 지질과산화(MDA) 생성 억제 능력이 매우 뛰

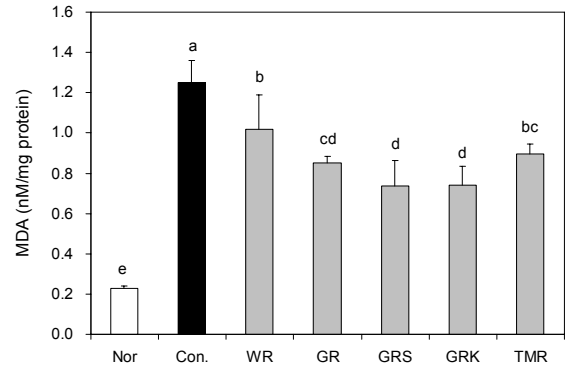


Fig. 2. Effects of extracts from cooked mixed grain rice sample (100 µg/mL) on lipid peroxidation in LLC-PK1 cells exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂). Mean values with different letters (a-d) above the bars are significantly different (*P*<0.05) according to Duncan's multiple range test. The present data were expressed means±SD. MDA: malonadehyde. Legend as shown in Table 1.

어난 것으로 알려져 있다(20). Kwak 등(23)의 연구에서는 수수, 기장, 울무에 flavonoid와 polyphenol 성분이 많이 함유되어 있어 지질과산화 억제 효과가 있는 것으로 보고하였다. 따라서 잡곡밥은 항산화 효과를 나타내므로 산화와 관련된 여러 가지 만성 퇴행성 질환의 예방에 도움을 줄 것으로 사료된다.

세포 내 ROS 소거 활성

활성산소의 증가는 여러 가지 만성질환과 관련이 있으며, 그중에서 O₂⁻, H₂O₂, ·OH는 세포 손상과 많은 관련이 있다(2,24). 따라서 ROS 생성량을 줄이면 세포를 보호할 수 있다(24). LLC-PK1 세포에 시료 추출물을 전처리한 후 H₂O₂(250 µM)로 산화스트레스를 유도한 다음 ROS 수준을 측정함으로써 잡곡밥 추출물의 활성산소종 소거 활성 효과를 검토하였다. 본 연구에서 LLC-PK1 세포에 시료 추출물을 전처리한 후 H₂O₂를 처리하였을 때, WR(230.3%), TMR(204.8%), GR(193.2%), GRK(178.3%), GRS(176.6%) 순으로 H₂O₂ 처리군에 비해 유의적(*P*<0.05)으로 감소하여 세포 손상에 의한 ROS 생성이 잡곡밥 추출물 처리에 의해 억제되었음을 알 수 있었다(Fig. 3). Kwak 등(23)의 연구에 의하면 수수, 기장, 울무에는 flavonoid와 polyphenol 성분을 많이 함유하고 있고 우수한 free radical 소거능이 있는 것으로 보고하였으며, Kim 등(25)의 연구에서는 상항버섯 추출물의 활성산소 소거 활성은 비교물질인 L-ascorbic acid보다 매우 큰 항산화능을 나타내는 것으로 보고하였다. 따라서 잡곡밥은 ROS로 유발된 세포 손상을 억제하고 만성질환을 예방하는 것으로 생각된다.

세포 내 항산화 효소 활성

250 µM의 H₂O₂로 처리한 LLC-PK1 세포에서 잡곡밥 추출물이 항산화 효소인 SOD, CAT 및 GSH-px의 활성에 미

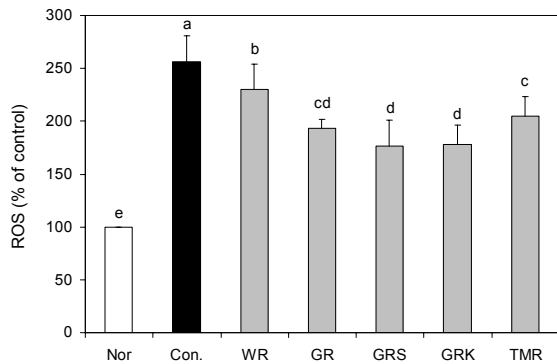


Fig. 3. Effects of extracts from cooked mixed grain rice samples (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on cellular ROS levels in LLC-PK1 cells exposed to hydrogen peroxide (H_2O_2). Mean values with different letters (a-e) above the bars are significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple range test. The present data were expressed means \pm SD. ROS: reactive oxygen species. Legend as shown in Table 1.

치는 영향을 Table 2에 나타내었다. LLC-PK1 세포에 H_2O_2 를 처리하였을 때 SOD, CAT와 GSH-px의 활성이 현저히 감소되었다. SOD는 항산화 방어 체계의 첫 번째 단계에서 독성이 강한 O_2^- 를 H_2O_2 로 전환시키는 과정을 촉매하는 효소이며(26), 정상군의 SOD 활성은 4.92 ± 0.21 unit/mg protein, H_2O_2 처리군은 1.45 ± 0.31 unit/mg protein으로 나타났다. 그러나 시료 추출물을 처리한 결과, WR(1.76 ± 0.19 unit/mg protein), TMR(1.88 ± 0.07 unit/mg protein), GR(1.93 ± 0.11 unit/mg protein), GRS(2.14 ± 0.10 unit/mg protein), GRK(2.24 ± 0.13 unit/mg protein) 순으로 H_2O_2 처리군에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 증가하였다. CAT는 SOD로 인해 생성된 H_2O_2 를 물과 산소로 전환하는 작용을 촉매하는데(26), 정상군의 CAT 활성은 1.32 ± 0.35 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}/\text{min}$ 이었으며, H_2O_2 처리군은 0.49 ± 0.15 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}/\text{min}$ 으로 나타났다. 시료 추출물을 처리한 결과, WR(0.52 ± 0.16 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}/\text{min}$), TMR(0.68 ± 0.03 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}/\text{min}$), GR(0.75 ± 0.09 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}/\text{min}$), GRS(0.88 ± 0.12 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}/\text{min}$), GRK(0.92 ± 0.13 $\mu\text{mole}/\text{mg protein}/\text{min}$) 순으로 H_2O_2 처리군에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 증가하였다. GSH-px는 H_2O_2 와 환원형 glutathione으로부터 산화형 glutathione과

물을 생성하는 반응을 촉매시켜 생물체 내의 과산화적 손상을 방지하는데(21), 정상군의 GSH-px 활성은 1.82 ± 0.14 unit/mg protein, H_2O_2 처리군은 0.68 ± 0.11 unit/mg protein으로 나타났다. 시료 추출물을 처리한 결과, WR(0.88 ± 0.20 unit/mg protein), TMR(1.17 ± 0.08 unit/mg protein), GR(1.23 ± 0.06 unit/mg protein), GRS(1.40 ± 0.13 unit/mg protein), GRK(1.49 ± 0.05 unit/mg protein) 순으로 H_2O_2 처리군에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 증가하였다. 따라서 본 연구에서는 LLC-PK1 세포에 H_2O_2 를 처리하였을 때 SOD, CAT 및 GSH-px 등 항산화 효소들의 활성이 떨어졌으나, 현미가 70% 포함된 GR군은 백미 100%로 구성된 WR군뿐만 아니라 찰쌀이 60% 포함된 TMR군보다 효과가 더 좋았다. Kim 등(27)이 총 항산화능 측정 분석에서 호화 후 백미는 총 항산화능 수준이 낮아진 반면 현미의 총 항산화능 수준은 높아지는 것을 보고한 바 있다. 특히 상황버섯 추출물을 0.5% 첨가한 GRS와 카레 분말을 0.1% 첨가한 GRK군에서는 모든 항산화 효소의 활성이 회복되어 산화적 스트레스가 유발된 세포의 손상이 완화된 것으로 보인다.

항산화 효소 유전자 발현 측정

여러 가지 잡곡밥 샘플의 효과를 알아보기 위하여 H_2O_2 를 처리한 LLC-PK1 세포의 SOD, CAT, GSH-px mRNA 발현을 RT-PCR을 이용하여 측정하였다. Fig. 4에 나타난 것과 같이 정상군에 비하여 H_2O_2 처리군의 SOD(81.1%), CAT(74.4%), GSH-px(65.6%)의 mRNA 발현이 현저하게 감소하였다. GRS군과 GRK군의 SOD mRNA 발현은 H_2O_2 처리군에 비하여 각각 16.8, 8.9배 증가하였고, CAT mRNA 발현은 각각 3.5, 3.6배 증가하였으며, GSH-px mRNA 발현은 각각 2.0, 3.4배 증가하였다. Abdel-Wahab 등(28)의 연구에서는 곡류에 포함된 *p*-coumaric acid가 마우스 심장 조직의 doxorubicin으로 유도된 산화스트레스에 대하여 SOD와 CAT를 증가시킬 수 있는 것으로 보고하였고, Ceyhan 등(29)은 β -glucan이 마우스 피부조직에 electro-magnetic radiation으로 유도된 산화스트레스에 대해 SOD, CAT, GSH-px를 증가시킬 수 있는 것으로 보고하였다. 이상의 결과 잡곡밥 추출물이 H_2O_2 로 손상된 LLC-PK1 세포 내에서 SOD, CAT, GSH-px의 mRNA 발현 수준을 증가시

Table 2. Effects of extracts from cooked mixed grain rice samples on antioxidant enzyme activities in peroxide hydrogen (H_2O_2) treated LLC-PK1 cells

	Normal	H_2O_2 (250 μM) + Extracts from cooked mixed grain rice ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
		Con	WR ²⁾	GR	GRS	GRK	TMR
SOD ¹⁾ (unit/mg protein)	$4.92 \pm 0.21^{a3)4)}$	1.45 ± 0.31^e	1.76 ± 0.19^d	1.93 ± 0.11^{cd}	2.14 ± 0.10^{bc}	2.24 ± 0.13^b	1.88 ± 0.07^d
CAT ($\mu\text{mole}/\text{mg protein}/\text{min}$)	1.32 ± 0.35^a	0.49 ± 0.15^d	0.52 ± 0.16^{cd}	0.75 ± 0.09^{bc}	0.88 ± 0.12^b	0.92 ± 0.13^b	0.68 ± 0.03^{bcd}
GSH-px (unit/mg protein)	1.82 ± 0.14^a	0.68 ± 0.11^e	0.88 ± 0.20^d	1.23 ± 0.06^c	1.40 ± 0.13^b	1.49 ± 0.05^b	1.17 ± 0.08^c

¹⁾SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, GSH-px: glutathione peroxidase.

²⁾Legend as shown in Table 1.

³⁾All data were expressed means \pm SD.

⁴⁾Mean values with different letters (a-e) in the same row are significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple range test.

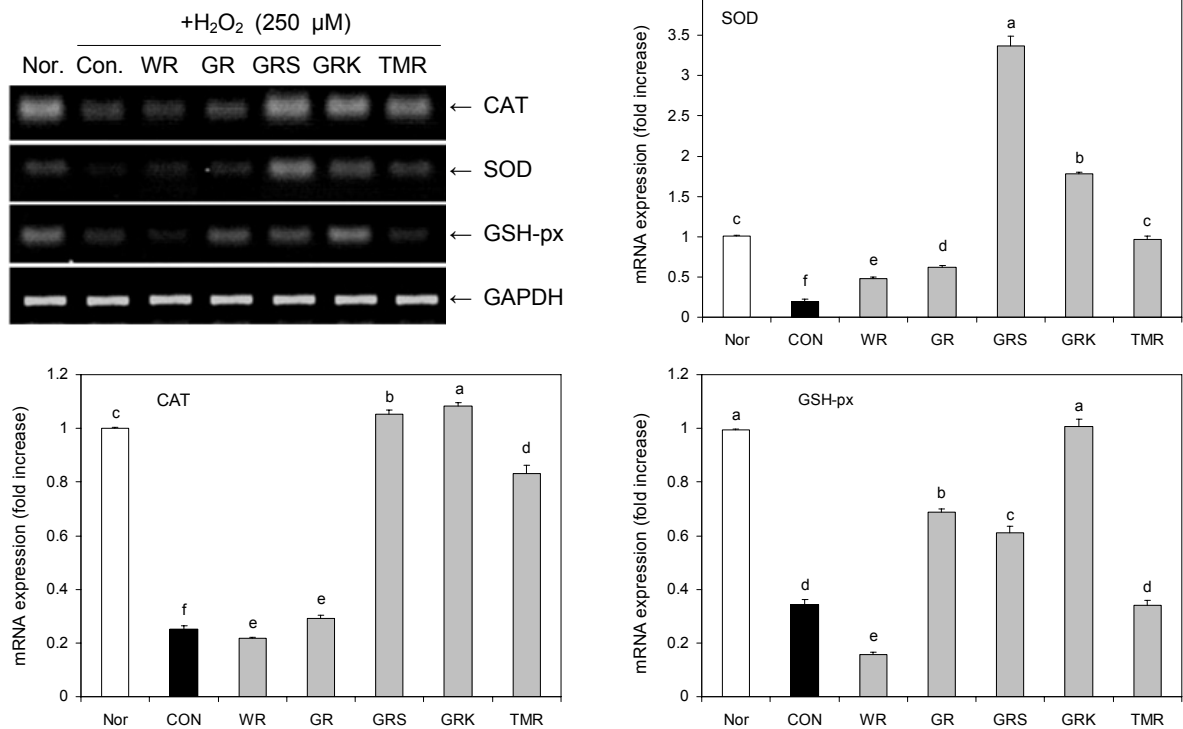


Fig. 4. Effects of extracts from cooked mixed grain rice (100 µg/mL) on mRNA levels of CAT, SOD, and GSH-px in LLC-PK1 cells exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂). Data from three independent experiments are presented as the mean±SD. Mean values with different letters (a-f) above the bars are significantly different (P<0.05) according to Duncan's multiple range test. Legend as shown in Table 1.

키고 산화적 스트레스에 대한 보호 효과를 확인하였다. 우리나라 사람들의 식품섭취 실태를 살펴보면 총 식품섭취량의 절반 이상을 백미를 비롯한 곡류로 섭취하고 있다(30). 따라서 본 연구에서 제조된 항산화 효과가 높은 잡곡밥을 먹는다 면 여러 만성질환 예방에 도움이 되리라 사료된다. 또한 각 질환별 맞춤형 밥을 만드는 것과 같이 밥에 대한 다양한 새로운 연구가 필요하리라 사료된다.

요 약

잡곡밥 메탄올 추출물이 가지는 산화적 스트레스 개선 효과를 확인하기 위하여 H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스에 대한 LLC-PK1 세포의 보호 효과를 조사하였다. 250 µM의 H₂O₂에 의한 산화적 스트레스가 유발된 LLC-PK1 세포에 시료 추출물을 처리한 결과, WR, TMR, GR 순으로 H₂O₂ 처리군에 비해 세포 생존율이 증가하였다(P<0.05). 특히 GRS와 GRK에서 정상군에 가까운 세포 생존율을 나타내어 H₂O₂에 의한 산화적 스트레스로 유발된 세포 손상에 대한 잡곡밥 추출물의 보호 효과를 확인할 수 있었다. 세포 내 활성산소(ROS)의 수준과 세포 내 지질과산화물질(MDA)의 생성 억제 효과 역시 WR, TMR, GR, GRK, GRS 순으로 증가하는 것을 관찰하였다. H₂O₂로 인하여 세포 내 항산화 효소인 SOD, CAT와 GSH-px 등의 활성이 감소된 LLC-PK1 세포

에 잡곡밥 추출물을 처리했을 때 이들 효소의 활성이 증가했으며 특히 GRK, GRS군에서 현저하게 증가되었다. LLC-PK1 세포에서 H₂O₂에 의해 발생하는 산화적 스트레스에 대한 보호 효과를 측정된 결과 잡곡밥 추출물은 세포 손상을 억제하고 세포 내 활성산소(ROS)의 수준과 지질과산화물질(MDA)의 생성을 억제하며, 세포 내 항산화 효소의 활성을 증가시키는 효과를 가지는 것으로 보인다. 또한 항산화 효소 유전자 발현에서도 위와 비슷한 효과를 나타내었다. 이상의 결과로 잡곡밥 메탄올 추출물, 특히 기능성 물질인 카레가루와 상항버섯 추출물이 첨가된 잡곡밥은 LLC-PK1 세포에 대한 보호 작용과 *in vitro*에서의 항산화 효과가 높은 것으로 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 국가지정 소화기질환 의료제품 유효성평가 서비스센터(NCEED)에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

1. Hwang JY, Lee HS, Han JS. 2011. Protective effect of *Sasa borealis* leaf extract on AAPH-induced oxidative stress in LLC-PK1 cells. *J Food Sci Nutr* 16: 12-17.
2. Li SC, Chou TC, Shih CK. 2011. Effects of brown rice,

- rice bran, and polished rice on colon carcinogenesis in rats. *Food Res Int* 44: 209-216.
3. Ji N, Song JL, Kil JH, Park KY. 2013. Protective effects of *Perilla frutescens* Britt var. *japonica* extracts from oxidative stress in human HaCaT keratinocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 161-167.
 4. Hong CO, Hong ST, Koo YC, Yang SY, Lee JY, Lee Y, Ha YM, Lee KW. 2011. protective effect of *Plantago asiatica* L. extract against ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) induced renal oxidative stress in wistar rats. *J Fd Hyg Safety* 26: 107-113.
 5. Warnholtz A, Münzel T. 2000. Why do antioxidants fail to provide clinical benefit? *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 1: 38-40.
 6. Kim YS, Lee GC. 2006. A survey on the consumption and satisfaction degree of the cooked rice mixed with multi-grain in Seoul·Kyeonggi and Kangwon area. *Korean J Food Culture* 21: 661-669.
 7. Jang HL, Im HJ, Lee Y, Kim KW, Yoon KY. 2012. A survey on the consumption and satisfaction degree of the cooked rice mixed with multi-grain in Seoul. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 853-860.
 8. Ko JY, Song SB, Lee JS, Kang JR, Seo MC, Oh BG, Kwak DY, Nam MH, Jeong HS, Woo KS. 2011. Changes in chemical components of foxtail millet, proso millet, and sorghum with germination. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1128-1135.
 9. Kweon YM. 1998. Studies on the cancer preventive diets using mainly the cereals. *PhD Dissertation*. Pusan National University, Busan, Korea.
 10. Qi YC, Zhao X, Lim YL, Park KY. 2013. Antioxidant and anticancer effects of edible and medicinal mushrooms. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 655-662.
 11. Park SY, Lee SH, Park OJ, Kim YM. 2011. Apoptotic effects of curcumin and EGCG via Akt-p53 signaling pathway in HCT116 colon cancer cells. *J Life Sci* 21: 89-95.
 12. Song JL, Choi JH, Seo JH, Kil JH, Park KY. 2014. Antioxidative effects of fermented sesame sauce against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in LLC-PK1 porcine renal tubule cells. *Nutr Res Pract* 8: 138-145.
 13. Lee KI, Rhee SH, Kim JO, Chung HY, Park KY. 1993. Antimutagenic and antioxidative effects of perilla leaf extracts. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 175-180.
 14. Fraga CG, Leibovitz BE, Tappel AL. 1988. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substance in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic Biol Med* 4: 155-161.
 15. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
 16. Nelson DP, Kiesow LA. 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem* 49: 474-478.
 17. Lawrence RA, Burk RF. 2012. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 952-958.
 18. Choi EJ, Kim SH, Shim SH, Chung HJ, Bang WS. 2012. Antioxidative activity of the *n*-hexane fractions from *Spatholobus suberectus* (SS), *Scutellaria barbata* (SB), *Psoralea corylifolia* (PC), *Curcuma zedoaria* (CZ), *Schisandra chinensis* (SC), and *Corydalis turtschaninovii* (CT). *Korean J Food Sci Technol* 44: 493-497.
 19. Yuan J, Murrell GA, Trickett A, Wang MX. 2003. Involvement of cytochrome *c* release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1641: 35-41.
 20. Cohly HH, Taylor A, Angel MF, Salahudeen AK. 1998. Effect of turmeric, turmerin and curcumin on H₂O₂-induced renal epithelial (LLC-PK1) cell injury. *Free Radic Biol Med* 24: 49-54.
 21. Park MJ, Han JS. 2008. Fucoidan protects LLC-PK1 cells against AAPH-induced damage. *J Food Sci Nutr* 13: 259-265.
 22. Choi Y, Jeong HS, Lee J. 2007. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chem* 103: 130-138.
 23. Kwak CS, Lim SJ, Kim SA, Park SC, Lee MS. 2004. Antioxidative and antimutagenic effects of Korean buckwheat, sorghum, millet and Job's tears. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 921-929.
 24. Yi N, Seo KC, Choi JM, Cho EJ, Song YO, Han JS. 2008. Protective effects of Chungkookjang extract on high glucose induced oxidative stress in LLC-PK1 cells. *J Food Sci Nutr* 13: 84-89.
 25. Kim AR, Kim JE, Park SN. 2011. Antioxidative activity and component analysis of *Phellinus linteus* extracts. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 37: 309-318.
 26. Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16: 33-50.
 27. Kim SY, Seo BY, Park E. 2013. The impact of cooking on the antioxidative and antigenotoxic effects of rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1370-1377.
 28. Abdel-Wahab MH, El-Mahdy MA, Abd-Allah MF, Helal GK, Khalifa F, Hamada FM. 2003. Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacol Res* 48: 461-465.
 29. Ceyhan AM, Akkaya VB, Güleçol ŞC, Ceyhan BM, Özgüner F, Chen W. 2012. Protective effects of β-glucan against oxidative injury induced by 2.45-GHz electromagnetic radiation in the skin tissue of rats. *Arch Dermatol Res* 304: 521-527.
 30. Lim SY. 2008. Inhibitory effect of methanol extracts from Korean *Oryza sativa* and *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* on mutagenicity and growth of human cancer cells. *J Life Sci* 18: 1415-1419.