

산화 스트레스에 대한 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙의 보호효과

이두진 · 이진하 · 이옥환 · 김보경¹ · 박진영¹ · 김종대*

강원대학교 식품생명공학과, ¹부산대학교 식품영양학과

Protective Effect of *Angelica keiskei* Juice and *Oenanthe javanica* DC Juice on Oxidative Stress

Doo-Jin Lee, Jin-Ha Lee, Ok-Hwan Lee, Boh-Kyung Kim¹, Kun-Young Park¹, and Jong-Dai Kim*

Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

¹Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University

Abstract The objectives of the present study were to investigate the protective effects of *Angelica keiskei* juice and *Oenanthe javanica* juice against oxidative damage in LLC-PK₁ renal epithelial cells and to evaluate their free radical-scavenging activities. Both *A. keiskei* juice and *O. javanica* juice showed a strong *in vitro* antioxidant activities such as α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH), nitric oxide (NO), O₂⁻, and ·OH radical-scavenging activities. The LLC-PK₁ cells showed significant lipid peroxidation and cell death due to oxidative stress when it was induced by 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), sodium nitroprusside (SNP), pyrogallol, and 3-morpholinopyridone (SIN-1). Treatment with both *A. keiskei* juice and *O. javanica* juice significantly increased cell viability and inhibited lipid peroxidation. These results suggest that *A. keiskei* juice and *O. javanica* juice are potential natural antioxidants.

Keywords: *Angelica keiskei* juice, *Oenanthe javanica* DC juice, oxidative stress, vegetable juice, antioxidant

서 론

체내 산화적 손상을 야기하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에는 초과산화물음이온(superoxide anion, O₂⁻), 하이드록실라디칼(hydroxyl radical, ·OH), 일중항산소(singlet oxygen, ¹O₂), 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂) 등이 있으며 과도하게 생성된 활성산소종은 세포의 돌연변이, 노화, 암 등의 질환에 주요 원인으로 여겨지고 있다(1-3). 산화 손상에 대한 보호효과를 갖는 천연 산화방지식품은 생리학적 산화·환원 항상성 조절 및 지질과산화물을 억제하여 예방의학적 차원에서의 산화방지제로서 각광을 받고 있다(4).

녹즙(채소즙)이란 생채소를 마쇄하여 인체가 영양소를 흡수하기 쉬운 상태로 제조된 착즙액 형태의 식품으로 생채소의 영양을 가장 많이 섭취할 수 있는 방식을 구현한 단순 가공방법이라 할 수 있다(5,6). 채소류에는 β -carotene (베타카로틴), 바이타민 C 및 바이타민 E 등의 산화방지성 바이타민류와 다양한 폴리페놀 화합물이 함유되어 있어 체내 산화방지시스템의 항상성 유지에 도움을 주며 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다(7-9). 많은 연구자들에 의해 합성산화방지제의 부작용이 보고되어, 베

타카로틴, 바이타민 C 및 바이타민 E 등과 같은 산화방지 성분이 풍부하게 함유된 천연 산화방지 식품에 대한 관심 및 수요가 증가하고 있다(10). 바이타민 C와 같은 일부 산화방지 성분들을 열을 가하는 가공과정 중에 일부 손실되기 때문에 이들 산화방지 성분의 손실을 최소화 한 제품으로 녹즙의 제품군도 시판되고 있다(11-13). 시판되는 녹즙의 주요 재료로 산화방지 성분이 함유된 과채류가 이용되고 있으며, 케일, 신선초, 당근, 미나리, 셀러리, 양배추 등의 녹황색 채소가 주를 이루고 있다(14).

돌미나리(*Oenanthe stolonifera* DC. 혹은 *O. javanica* DC.)는 미나리과에 속하는 다년생 초본으로 물기가 있는 곳이나 냇가에서 주로 자라는 호습성으로 미나리와 비교하여 길이가 짧고 줄기 아래가 약간 붉은 색을 띠는 야생미나리를 말하여 주로 나물로 이용되고 있다. 식용뿐만 아니라 민간요법에서는 류머티즘, 토사관란 등에도 달여 마시며 갈증을 없애고 피를 맑게 하고 숙취 제거, 이노작용과 변비에 효과가 있으며 고혈압 및 신경통 등에 치료효과가 있다고 알려져 있다. 또한 장염, 황달, 대하, 식욕 촉진, 해열, 수종, 양혈, 고혈압 및 신경통 등에 많은 약리 작용을 가지고 있어서 건강식품으로 손꼽히고 있다(15-17). 신선초(*Angelica keiskei* Koidz)는 아열대지방에서 자생하는 미나리과에 속하는 다년생 초본으로 바이타민, 무기질, 식품섬유질이 풍부할 뿐 아니라 생리활성 물질인 각종 flavonoid, coumarin, saponin 등이 함유되어 있어 자연 건강식품으로 주목 받고 있는 채소류이다(18). 신선초에 관한 연구로 Park과 Kim(19)은 온도별 저장의 차이와 착즙 직후 24, 48, 72시간 후의 신선초 생즙의 베타카로틴과 바이타민 C의 함량 및 산화방지능을 평가하여 착즙 후 시간의 경과에 따른 산화방지 바이타민의 파괴율이 증가됨을 보고한 바 있으며, 녹즙의 섭취가 혈청 지질양상에 미치는 영향에 대하여 보

*Corresponding author: Jong-Dai Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwon 24341, Korea
Tel: 82-33-250-6456
Fax: 82-33-259-5565
E-mail: jongdai@kangwon.ac.kr
Received May 8, 2015; revised July 5, 2015;
accepted July 7, 2015

고 한 바 있다(20). 신선초 및 돌미나리는 식품소재는 여러 연구자들에 의하여 추출물 형태로서 다양한 모델에서의 산화방지활성이 보고된 바 있지만, 녹즙 형태로서의 산화방지활성 비교 연구는 아직 많은 연구결과가 축적되어 있지 않은 실정이다. 또한, 최근 산화방지 성분을 포함하는 천연 건강식품의 효능에 대하여 소비자들의 관심이 증가함에 따라 녹즙의 주원료로 사용가능한 신선초와 돌미나리의 일반농과 유기농에 따른 산화방지 활성 및 세포보호 효과에 대해서는 아직 초기 단계에 머물러 있다.

따라서 본 연구에서는 일반농과 유기농으로 재배된 신선초와 돌미나리를 각각 녹즙기로 착즙한 후, 이들 녹즙에 대한 free radical 소거능, LLC-PK₁ 신경세포에 대한 산화적 스트레스 저감 효과를 평가하여 신선초 녹즙 및 돌미나리 녹즙에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 녹즙 원료는 강원도 영서지역(신선초) 및 경상북도 상주지역(돌미나리) 대형마트에서 약 1 kg씩 구입하였으며, 각각 일반농 및 유기농을 표시된 원료로 구입하여 실험에 사용하였다. 각각의 신선초 및 돌미나리는 흐르는 물에서 3회 세척하여 이물을 제거 한 후, 녹즙기(NJE-2004R, NUC Co., Daegu, Korea)를 이용하여 착즙액을 제조하였고 착즙된 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙은 각각 9,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 얻은 후, 4°C에서 보관하면서 산화방지 활성 평가에 사용하였다.

LLC-PK₁ (porcine renal epithelial cell)은 ATCC (Solon, OH, USA)에서 분양 받았으며, 실험에서 사용된 시약인 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS), phosphate buffer saline (PBS), 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)은 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 나이트로블루 테트라졸륨(nitro blue tetrazolium, NBT), 2,2'-azobis (2-amino-propane) dihydrochloride (AAPH), sodium nitroprusside (SNP), α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH), 파이로갈롤(pyrogallol), 디보틴(D-biotin), 3-morpholinolonyl nonimine hydrochloride (SIN-1), thiobarbituric acid (TBA), Griess reagent, 다이메틸 설펡사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO), 트라이클로로아세트산(trichloroacetic acid, TCA), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), FeSO₄·7H₂O, EDTA, 잔틴산화효소(xanthine oxidase) 등은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구매하여 사용하였다.

DPPH 라디칼(radical) 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 에탄올에 용해시킨 60 μ M DPPH 용액 100 μ L과 녹즙 100 μ L을 vortex를 이용하여 5초간 진탕한 뒤 암소에서 10분간 방치 후 판독기(microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 녹즙 대신 증류수를 100 μ L 가하여 동일하게 시행하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다(21).

DPPH 라디칼소거활성(radical scavenging activity) (%)

$$= \{1 - (A_{\text{experiments}} / A_{\text{control}})\} \times 100$$

산화질소(NO) (nitric oxide, NO) 소거능 측정

아질산염의 소거능은 1 mM 아질산소듐(NaNO₂) 용액 1 mL에

적정농도 시료 1 mL를 가하고 0.1 N 염산(HCl)으로 반응용액의 pH를 1.2로 보정한 다음 반응용액의 최종부피를 증류수를 가하여 10 mL로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 반응용액 1 mL씩 취하여 2% 아세트산(acetic acid) 3 mL, Griess 시약(A:B=1:1, A: 1% 설파닐산(sulfanilic acid) in 30% 아세트산, B: 1% naphthylamine in 30% 아세트산) 0.4 mL를 차례로 가하고 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염을 측정하였다. 아질산염 소거능은 시료 무첨가시의 흡광도에 대한 시료 첨가시의 흡광도 비를 나타내었다(22).

초과산화물음이온(O₂⁻) 소거능 측정

초과산화물음이온 라디칼 소거능은 NBT 환원방법에 의하여 측정하였다. 시료 0.1 mL에 0.1 mM PBS (pH 7.4) 0.6 mL를 넣어 잘 혼합하였다. 여기에 0.4 mM xanthine 용액과 0.24 mM NBT 용액을 1:1로 혼합한 용액 1 mL을 첨가하고 0.049 unit/mL 잔틴화효소 1 mL을 가하여 혼합하였다. 이를 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 1 N 염산 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 초과산화물음이온 라디칼 소거능은 시료용액 첨가군과 무첨가군의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다(23).

하이드록실라디칼(-OH) 소거능 측정

하이드록실라디칼 소거능 측정은 Fenton 반응에 의해 생성된 하이드록실라디칼은 2-데옥시리보스(2-deoxyribose)를 산화시켜 말론디알데하이드(malondialdehyde, MDA)로 분해된다. 즉, 시험관에 농도별 녹즙 0.2 mL에 10 mM FeSO₄·7H₂O-EDTA 용액 2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 0.1 M 완산완충용액(phosphate buffer) (pH 7.4) 1 mL를 잘 혼합한 후, 10 mM H₂O₂ 0.2 mL를 첨가하여 잘 섞은 후, 37°C에서 4시간 반응시킨 후 이 혼합액에 2.8% TCA 용액 1 mL과 1.0% TBA 용액 1 mL을 각각 첨가하여 10분간 끓인 다음, 반응액이 완전히 식으면 532 nm에서 흡광도를 측정하였다(24).

LLC-PK₁ 신경세포의 산화적 손상에 대한 보호효과

LLC-PK₁ cell은 100 units/mL의 페니실린-스트렙토마이신과 5%의 FBS가 함유된 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기(incubator, SANYO Co., Ltd., Osaka, Japan)에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 2-3회 배지를 바꾸어주면서 배양한 후, 6-7일 경 PBS로 1차 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리해서 집적된 세포를 배지에 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6-7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양 시 각각의 passage number를 기록하여 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 세포를 배양하여 실험하였다(25).

LLC-PK₁ 세포생존율(cell viability)과 TBA-reactive substances (TBARS) 측정

세포가 confluence 상태가 되면 96-well plate에 well당 1×10⁴ cells/mL로 seeding하여 2시간 배양한 후 peroxy 라디칼(LOO⁻), ONOO⁻, NO, O₂⁻의 generator인 1.0 mM AAPH, 1.0 mM SIN-1, 1.2 mM SNP 및 1.2 mM 파이로갈롤을 처리하고 24시간 배양하여 산화적 스트레스를 유발하였다. 그 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 뒤 1 mg/mL의 MTT 용액(solution)을 각 well에 주입하여 37°C에서 4시간 동안 재배양한 후 생성된 포마잔

(formazan) 결정을 100 μ L DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(25). 세포의 산화적 스트레스로 인한 세포 지질의 과산화 최종생성물인 TBARS 생성정도는 기질과 시료를 반응시켜, 37°C에서 산화시켰다. 시간대별로 기질과 시료 반응물에 25% TCA 1 mL과 TBA 1 mL을 첨가하여 95°C 수욕 상에서 20분간 가열하였다. 4000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화물(TBARS)은 MDA의 양으로 환산하여 계산하였다(26).

통계 분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 $p < 0.05$ 수준에서 던컨시험(Duncan's multiple range test)를 실시하였으며, 그 결과는 평균

\pm 표준편차로 표시하였다. 모든 통계 분석은 통계분석시스템(Statistic Analysis System, v8.2 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 통계 프로그램을 이용하였다.

결과 및 고찰

신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙의 라디칼 소거능

신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙의 수소공여능을 DPPH 라디칼 소거능 방법(27)으로 평가한 결과, 100 μ L/mL에서 신선초 녹즙의 DPPH 라디칼 소거능은 각각 62.1% (일반농), 64.8% (유기농)로 나타났다(Table 1). 그러나 저농도(50 μ L/mL)에서는 두 그룹간의 DPPH 라디칼 소거능의 큰 차이가 없었다. 돌미나리 녹즙의 DPPH 라디칼 소거 효과는 100 μ L/mL에서 60.8%(유기농)로 일반농 돌

Table 1. Antioxidant activity of common and organic *Angelica keiskei* and *Oenanthe javanica* DC juices determined by the different methods

Samples	Conc. (μ L/mL)	DPPH scavenging activity (%)	NO scavenging activity (%)	O ₂ ⁻ scavenging activity (%)	·OH scavenging activity (%)
Common <i>A. keiskei</i>	50	48.8 \pm 2.1 ⁽¹⁾	47.1 \pm 1.1 ^c	53.8 \pm 2.8 ^b	43.2 \pm 0.7 ^c
Organic <i>A. keiskei</i>	50	47.1 \pm 1.8 ^c	50.8 \pm 0.4 ^b	51.4 \pm 2.4 ^b	45.1 \pm 0.8 ^c
Common <i>A. keiskei</i>	100	62.1 \pm 2.0 ^b	70.8 \pm 1.9 ^a	75.1 \pm 1.4 ^a	66.8 \pm 1.2 ^b
Organic <i>A. keiskei</i>	100	64.8 \pm 0.9 ^a	69.3 \pm 0.7 ^a	77.2 \pm 0.6 ^a	69.9 \pm 1.6 ^a
Common <i>O. javanica</i>	50	38.2 \pm 0.7 ^d	21.8 \pm 0.4 ^d	46.8 \pm 1.1 ^d	48.0 \pm 0.4 ^c
Organic <i>O. javanica</i>	50	42.8 \pm 0.9 ^c	34.6 \pm 0.6 ^c	52.1 \pm 0.8 ^c	48.4 \pm 0.4 ^c
Common <i>O. javanica</i>	100	51.2 \pm 1.2 ^b	59.5 \pm 1.2 ^b	65.8 \pm 1.2 ^b	68.5 \pm 1.6 ^b
Organic <i>O. javanica</i>	100	60.8 \pm 0.8 ^a	64.1 \pm 0.5 ^a	71.9 \pm 0.6 ^a	72.1 \pm 1.6 ^a

¹⁾Values are mean \pm SD (n=3). ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

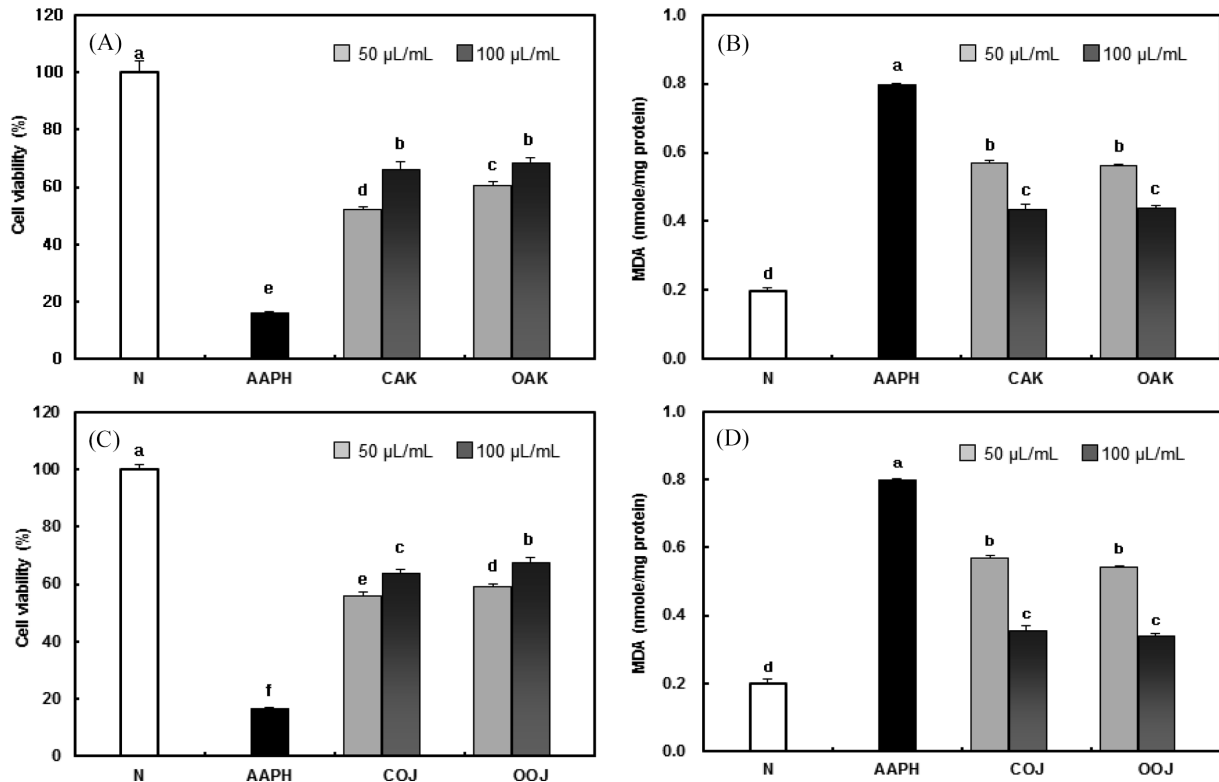


Fig. 1. Protective effect of *Angelica keiskei* (A, B) and *Oenanthe javanica* DC (C, D) juices on cell viability and TBARS generation of LLC-PK₁ cells treated with AAPH. N, untreated control; AAPH, AAPH-treated control; CAK, AAPH+ common *A. keiskei*; OAK, AAPH+organic *A. keiskei*; COJ, AAPH + common *O. javanica*; OOJ, AAPH+organic *O. javanica*. Values are mean \pm SD of 3 samples. ^{a-f}Means with the different letter on the bars are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

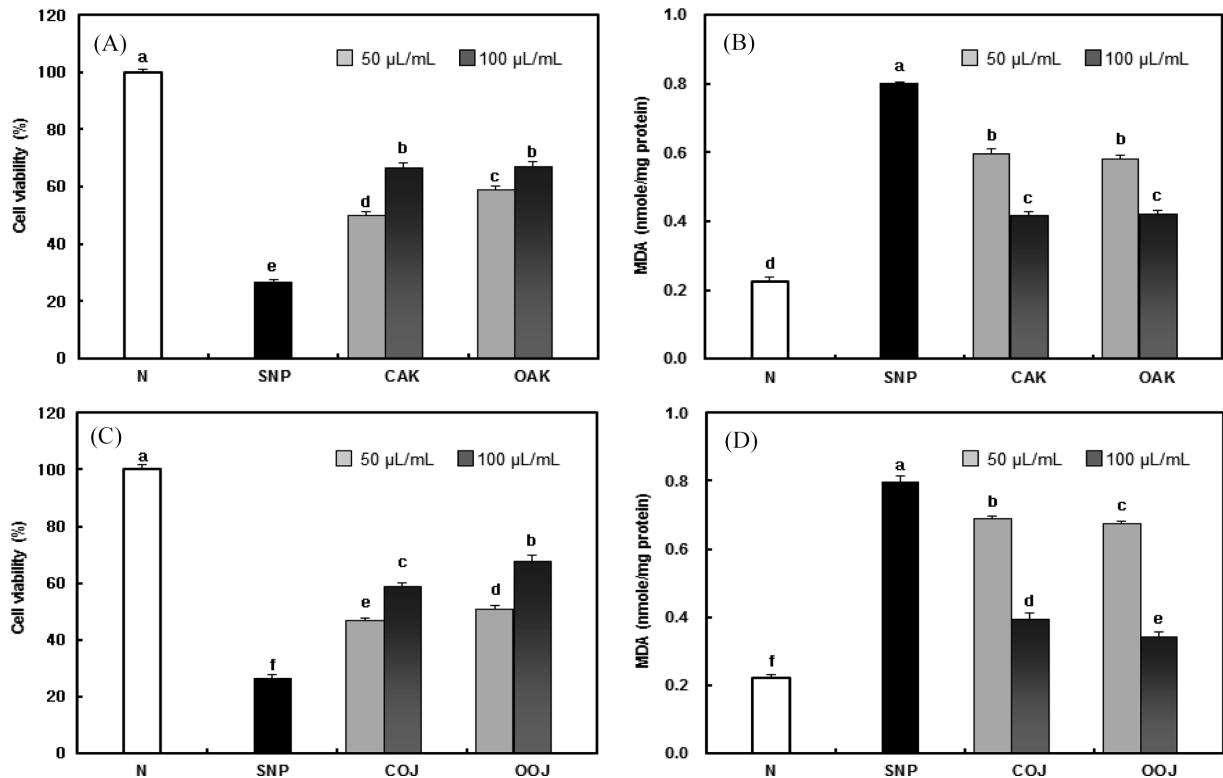


Fig. 2. Protective effect of *Angelica keiskei* (A, B) and *Oenanthe javanica* DC (C, D) juices on cell viability and TBARS generation of LLC-PK₁ cells treated with SNP. N, untreated control; SNP, SNP-treated control; CAK, SNP+common *A. keiskei*; OAK, SNP+organic *A. keiskei*; COJ, SNP+common *O. javanica*; OOJ, SNP+organic *O. javanica*. Values are mean±SD of 3 samples. ^{a-f}Means with the different letter on the bars are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

미나리 51.2%보다 높게 나타났다(Table 1). NO는 산소 라디칼과 매우 급속히 반응하는데, 특히 O₂⁻와 결합하여 생성되는 ONOO⁻는 여러 가지 세포 독성효과를 일으키며 지방질과산화(lipid peroxidation)를 유도하는 원인이 될 수 있는데, 과잉으로 생성된 NO소거 효과를 살펴봄에 따라 NO에 의한 독성으로부터 보호 효과를 기대할 수 있다(28). 신선초 녹즙의 NO 소거능을 살펴본 결과, 100 µL/mL의 농도에서 유기농 신선초 녹즙은 69.3%, 일반농 신선초 녹즙은 70.8%로서 유사한 경향을 보였다(Table 1). 돌미나리 녹즙의 NO 소거능을 살펴본 결과, 유기농 녹즙과 일반농 녹즙에서 모두 농도 의존적인 소거 효과를 보였으며, 특히 100 µL/mL의 농도에서 유기농 돌미나리 녹즙은 64.1%로 일반농 돌미나리 녹즙은 59.5%로 나타났다. 초과산화물음이온(O₂⁻)은 superoxide dismutase (SOD)에 의해 쉽게 H₂O₂로 변환되어 반응성이 강한 ·OH를 생성하거나 NO와 반응하여 반응성이 강한 ONOO를 생성하기 때문에 세포나 조직의 산화적 스트레스를 야기한다(29). Table 1은 신선초 녹즙의 O₂⁻ 소거능으로 100 µL/mL의 농도에서 유기농 신선초 녹즙은 77.2%, 일반농 신선초 녹즙은 75.1%로 나타났다, 유기농 돌미나리 녹즙은 71.9%, 일반농 돌미나리 녹즙은 65.8%로 나타났다. 하이드록실라디칼(·OH)에 대한 소거 효과는 100 µL/mL의 농도에서 유기농 신선초 녹즙은 69.9%, 일반농 신선초 녹즙은 66.8%의 소거능을 보였고, 유기농 돌미나리 녹즙은 72.1%, 일반농 돌미나리 녹즙은 68.5%의 소거능을 보였다. 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙에 모두 농도 의존적인 ·OH에 대한 소거 효과를 나타내었다(Table 1). 이상의 결과로 볼 때, 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙액은 DPPH 라디칼, NO, O₂⁻ 소거능 등의 산화방지 활성을 보여, Kim 등(30)의 연구에서와 같이 유기농 채

소류 착즙액의 섭취는 체내 산화방지 체계의 항상성 유지에 도움을 주는 것으로 사료되었다. 한편, Kim 등(31)에 의하면 녹색 및 자색 콜라비 착즙액은 다양한 산화방지 모델에서 높은 산화방지 활성을 보였으며 이들 착즙액에는 산화방지 성분들이 함유되어 있어서 건강지향식품의 원료로서의 활용도가 높다고 보고하여 본 연구에서의 신선초 및 돌미나리에 대한 건강지향식품으로서의 향후 이용 증대가 기대된다.

AAPH에 의한 산화적 스트레스 개선 효과

AAPH는 수용성 질소 화합물로서 과산화 지방질과 산화방지 물질에 관련된 연구에서 free radical initiator로 사용된다. 이렇게 변형된 AAPH는 두 탄소라디칼(carbon radical)과 다시 결합하여 안정적인 구조를 취하기도 하지만 대부분은 산소와 반응하여 peroxy 라디칼을 생성하게 되며, 이 peroxy 라디칼은 세포 손상을 유발하고, 생체내 단백질, 지질 등에 산화적 스트레스를 주는 요인으로 작용하게 된다(32). 따라서, AAPH 유도에 의한 세포 손상 모델은 산화방지 억제 물질의 활성을 평가하는 활성 측정 시스템으로 유용하다고 할 수 있다(33). AAPH를 처리한 LLC-PK₁ cell에 대한 신선초 녹즙의 산화적 스트레스 개선 효과를 세포 생존율로 살펴본 결과(Fig. 1A, C), AAPH만을 처리한 control의 세포 생존율은 16%였으나, 유기농 및 일반농 신선초 녹즙을 각각 농도별로 처리한 후 세포 생존율이 농도 의존적으로 상승했으며, 유기농 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙을 처리한 군에서는 100 µL/mL에서 68.7, 67.7%의 세포 생존율을 보여 AAPH 단독처리군과 비교할 때 약 4배 증가하였음을 알 수 있었다. AAPH를 처리한 LLC-PK₁ 세포에서 산화적 스트레스로 유발된 지질 과산화에 대

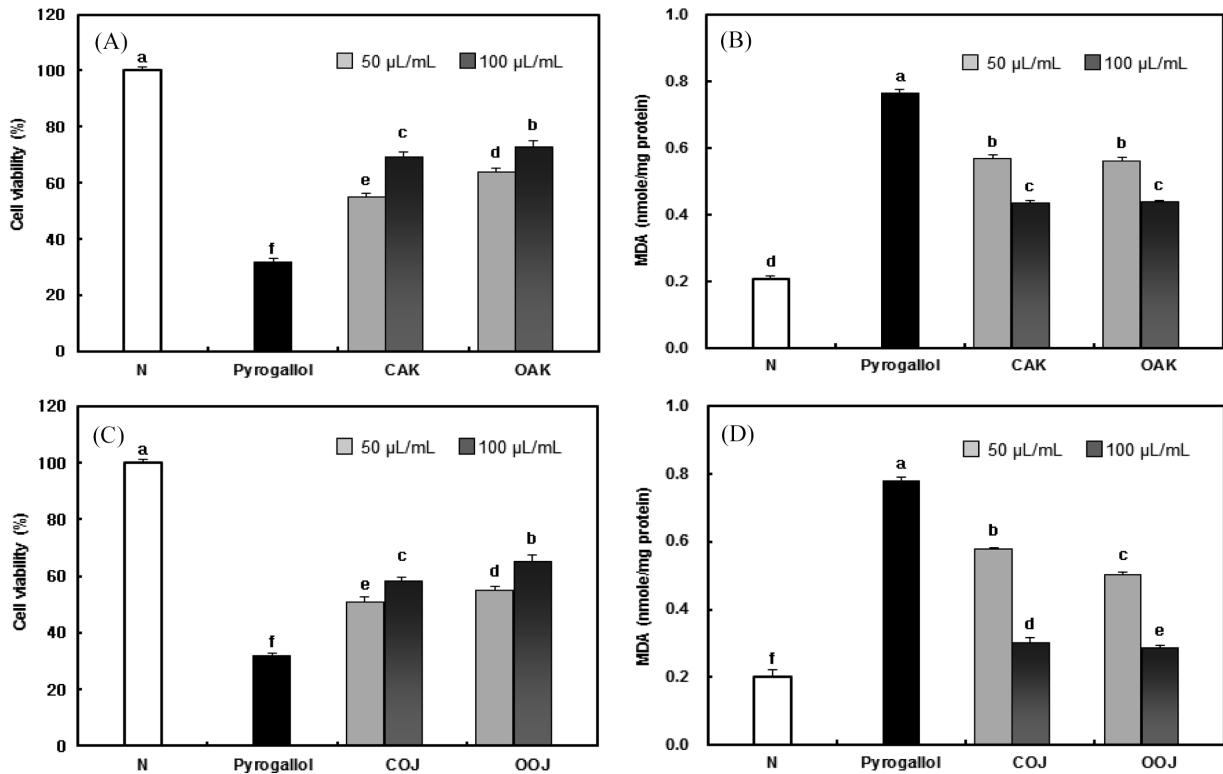


Fig. 3. Protective effect of *Angelica keiskei* (A, B) and *Oenanthe javanica* DC (C, D) juices on cell viability and TBARS generation of LLC-PK₁ cells treated with pyrogallol. N, untreated control; Pyrogallol, pyrogallol-treated control; CAK, pyrogallol+common *A. keiskei*; OAK, pyrogallol+organic *A. keiskei*; COJ, pyrogallol+common *O. javanica*; OOJ, pyrogallol+organic *O. javanica*. Values are mean±SD of 3 samples. ^{a-f}Means with the different letter on the bars are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

한 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙의 개선 효과를 MDA로 살펴본 결과(Fig. 1B, D), AAPH를 처리하지 않은 대조군(N)은 MDA 수치가 0.196-0.201 nmole/mg protein로 나타나 AAPH 단독처리군이 AAPH 무처리군에 비해 4배 정도 높은 MDA 수치를 보였다. 그러나 유기농 및 일반농 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙을 각각 농도별로 처리한 군에서는 MDA 수치가 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였으며, 신선초 녹즙의 경우 100 µL/mL에서 각각 0.440, 0.436 nmole/mg protein으로 나타났으며, 돌미나리 녹즙의 경우 100 µL/mL에서 각각 0.339, 0.356 nmole/mg protein으로 나타나 AAPH 단독 처리군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

SNP에 의한 산화적 스트레스 개선 효과

SNP는 NO 생성 화합물로서 nitrosodium ion을 함유하는데 이로 인해 SNP 용액이 가시광선에 노출될 때 NO가 생성된다(34). 본 연구에서는 활성 질소에 의한 산화적 스트레스 개선 효과를 살펴보기 위하여 LLC-PK₁ 세포에 SNP를 처리하여 NO를 유발 시켜서 산화적 스트레스를 가한 후 이에 대한 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙의 보호 효과를 세포생존율로 확인하였다. SNP 단독 처리군은 세포 생존율이 26%로 감소하여 산화적 스트레스에 의한 세포의 손상을 확인할 수 있었고, 반면 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙을 농도별로 처리한 군에서는 세포 생존율이 농도 의존적으로 상승하였으며, 100 µL/mL에서 일반농 및 유기농 신선초 녹즙이 각각 66.8, 67.2%의 생존율을 보였고, 일반농과 유기농 돌미나리 녹즙이 각각 66.8, 67.2%의 생존율을 보여 NO의 소거를 통한 산화적 스트레스 개선 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 2A, C). SNP를 처리한 LLC-PK₁ 세포에 산화적 스트레스로

유발된 지질 과산화물에 대한 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙의 개선 효과를 살펴본 결과(Fig. 2B, D), MDA 수치에서 SNP 무처리군은 0.226 nmole/mg protein인 반면 SNP처리로 산화적 스트레스를 유발시킨 SNP 단독처리군은 0.800 nmole/mg protein으로 유의적으로 증가하였다. 일반농과 유기농 신선초 녹즙의 경우 100 µL/mL에서 각각 0.418, 0.424 nmole/mg protein으로 나타났고, 일반농 및 유기농 돌미나리 녹즙의 경우 100 µL/mL에서 각각 0.397, 0.345 nmole/mg protein으로 나타났다. 이를 통해 유기농 및 일반농 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙의 처리가 NO에 의한 LLC-PK₁ 세포의 지질 과산화를 효과적으로 억제함을 알 수 있었다.

파이로갈롤에 의한 산화적 스트레스 개선 효과

파이로갈롤은 수용액에서 자동산화가 빠르게 일어나는데 O₂⁻의 생성제이며 H₂O₂의 전구체이다(35). 파이로갈롤을 처리한 LLC-PK₁ 세포에 대한 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙의 보호 효과를 살펴본 결과, 파이로갈롤 단독처리군의 경우 31.8%의 생존율을 보인 반면 유기농 및 일반농 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙을 각각 농도별로 처리한 결과 세포 생존율이 농도 의존적으로 증가하였고, 일반농 및 유기농 신선초 녹즙의 경우 100 µL/mL 처리시 69.5, 73.1%의 생존율을 보였으며, 일반농 및 유기농 돌미나리 녹즙의 경우 100 µL/mL 처리시 58.7, 68.5%의 생존율을 보여 파이로갈롤에 의한 LLC-PK₁ 세포의 산화적 스트레스 개선 효과가 나타났다(Fig. 3). 또한 파이로갈롤에 의한 LLC-PK₁ 세포의 지질 과산화물 생성에 대한 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙의 개선 효과를 살펴본 결과(Fig. 3), 파이로갈롤 단독처리군은 MDA 수치가 0.765-0.778 nmole/mg protein로 파이로갈롤 무처리군에 비

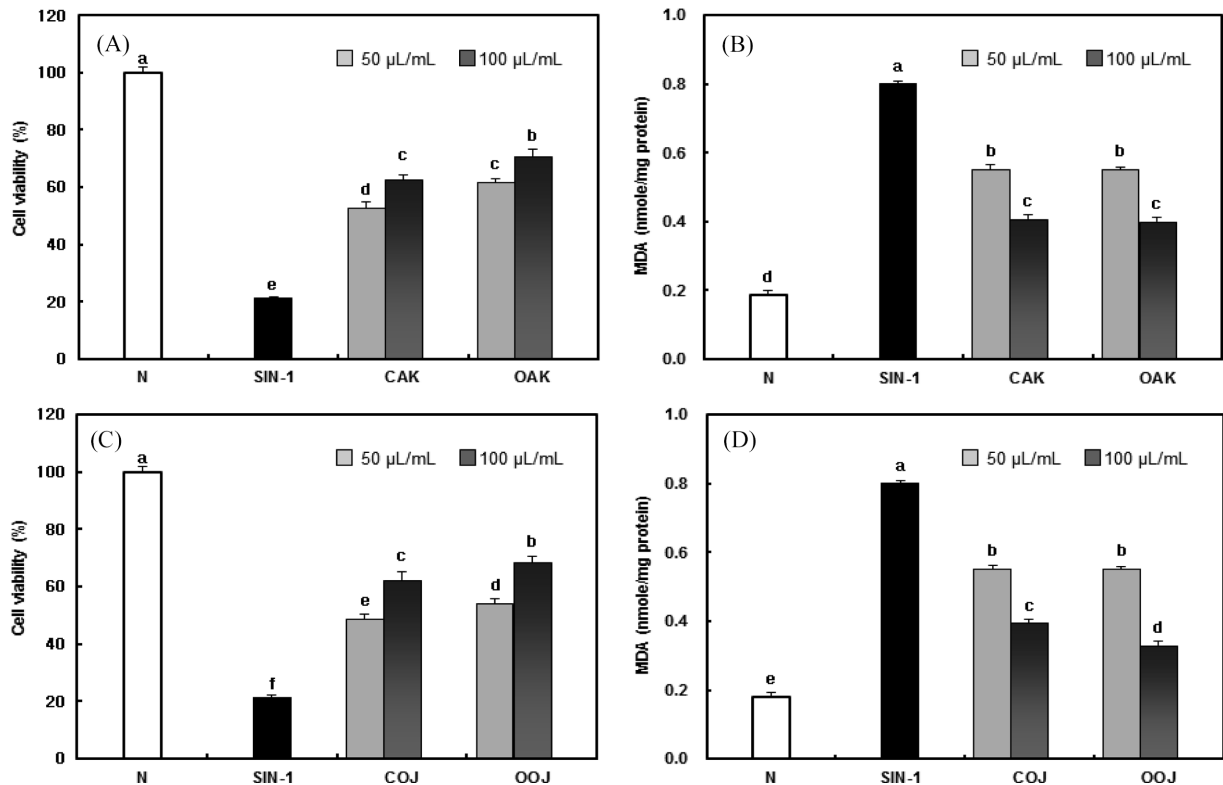


Fig. 4. Protective effect of *Angelica keiskei* (A, B) and *Oenanthe javanica* DC (C, D) juices on cell viability and TBARS generation of LLC-PK1 cells treated with SIN-1. N, untreated control; SIN-1, SIN-1-treated control; CAK, SIN-1+ common *A. keiskei*; OAK, SIN-1+organic *A. keiskei*; COJ, SIN-1+ common *O. javanica*; OOJ, SIN-1+organic *O. javanica*. Values are mean±SD of 3 samples. ^{a-f}Means with the different letter on the bars are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

해 4배 정도 증가하였다. 그러나 일반농 및 유기농 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙을 각각 농도별로 처리한 군에서는 MDA 수치가 파이로갈를 단독처리군에 비해 유의적으로 감소하여 일반농 및 유기농 신선초 녹즙 100 µL/mL에서 각각 0.436, 0.440 nmole/mg protein로 나타났으며, 일반농 및 유기농 돌미나리 녹즙 100 µL/mL에서 각각 0.302, 0.285 nmole/mg protein로 나타나 신선초 녹즙과 돌미나리녹즙에 의한 지질 과산화 억제 효과를 보여 주었다.

SIN-1에 의한 산화적 스트레스 개선 효과

SIN-1은 NO와 O₂를 생성하고 이들은 급속히 반응하여 ONOO⁻를 형성하며, ONOO⁻는 강력한 세포독성산화제(cytotoxic oxidants)로 분해되기 때문에 독성 효과를 나타내게 되어 병원성세포손상(pathogenic cellular damage)과 장기기능장애(organ dysfunction)의 중요한 주요인으로 알려져 있다(36). LLC-PK₁ 세포에 SIN-1을 처리하여 ONOO⁻에 의한 산화적 스트레스를 유발시킨 후 이에 대한 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙의 보호 효과를 세포생존율을 통해 살펴보았다(Fig. 4A, C). SIN-1 단독처리군은 산화적 스트레스에 의한 세포 손상으로 생존율이 21%로 감소한 반면 일반농 및 유기농 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙을 각각 농도별로 처리한 후 생존율이 농도 의존적으로 증가하여, 일반농 및 유기농 신선초 녹즙 100 µL/mL 처리시 각각 62.9, 70.8%로 나타났으며, 일반농 및 유기농 돌미나리 녹즙 100 µL/mL 처리시 각각 62.4, 68.5%로 나타났다. 이는 녹즙이 ONOO⁻에 대한 직접적인 소거능을 통해 산화적 스트레스 개선 효과를 보이는 것으로 사료된다. SIN-1에 의한 LLC-PK₁ 세포의 지질 과산화물 생성에 대한 신선초 녹즙

과 돌미나리 녹즙의 개선효과를 살펴보면, SIN-1 단독처리군은 MDA 수치가 0.800-0.802 nmole/mg protein로 SIN-1 무처리군에 비해 4배 이상 증가하였다. 그러나 유기농 및 일반농 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙을 각각 농도별로 처리한 군에서 MDA 수치가 SIN-1 단독처리군에 비해 유의적으로 감소하여 유기농 및 일반농 신선초 녹즙 100 µL/mL에서 각각 0.401, 0.408 nmole/mg protein으로 나타났으며, 유기농 및 일반농 돌미나리 녹즙 100 µL/mL에서 각각 0.330, 0.396 nmole/mg protein으로 나타나 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙의 SIN-1에 의한 산화적 스트레스 개선을 통해 지질 과산화가 억제되었음을 알 수 있었다(Fig. 4B, D).

최근 여러 가지 채소류의 착즙액에 대한 연구에서 돌미나리는 우수한 생리활성작용으로 그 효과를 인정받고 있으며, Lee 등(37)은 여러 가지 채소류의 채소즙 중 돌미나리가 항돌연변이 효과 및 암세포 증식억제 효과 등의 생리활성 작용이 우수하다고 하였다. 또한 돌미나리는 3T3L-1 지방전구세포의 지방세포분화 관련 단백질의 발현을 억제하여 지방세포의 분화를 억제하는 항비만 효능을 갖는 천연 소재임이 확인된 바 있다(38). 또한 다른 미나리와 산채 식물에 비하여 돌미나리는 조단백질 함량과 총 페놀함량이 높으며 육가공품에 대해서 산화방지 효과를 지니는 것으로 보고되었다(39). 본 연구에서 유기농 돌미나리 녹즙과 일반농 돌미나리 녹즙은 DPPH 라디칼, NO, O₂⁻, ·OH 라디칼의 소거 효과를 비롯하여 LLC-PK₁ 세포를 이용한 산화적 스트레스 개선 효과 및 지질과산화물 생성 억제효과도 나타내었다. 유기농 녹즙과 일반농 녹즙간의 산화방지효능은 미미한 차이를 보였을 뿐, 일반농과 유기농에 따른 큰 차이는 보이지 않았다.

요 약

본 연구에서는 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙을 다양한 실험을 통하여 산화방지 활성을 측정하였다. DPPH 라디칼, NO, O₂⁻, ·OH 라디칼 소거능 실험을 이용하여 유기농 및 일반농 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙의 산화방지 활성을 측정해 본 결과, 모든 시료군에서 높은 라디칼 소거 활성이 나타났다. 또한, 산화적 스트레스에 민감한 LLC-PK₁ 세포를 이용하여 유기농 및 일반농 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙의 산화적 스트레스 개선 효과를 살펴본 결과, 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙은 AAPH, SNP, 파이로갈롤과 SIN-1에 의해 유발된 산화적 스트레스(NO, O₂⁻와 ONOO⁻)에 대한 세포 생존율을 증가시키고, 지질과산화물을 억제시켜 라디칼에 의한 산화적 스트레스에 대한 개선 효과가 뛰어난 것으로 사료된다. 이상의 결과로부터 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙은 우수한 산화방지 활성과 지질과산화 개선 효과를 나타내어 신선초 녹즙과 돌미나리 녹즙으로부터 산화방지 영양소를 충분히 섭취하는 것이 산화적 손상과 관련된 질병을 예방하는 좋은 방법이 될 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 강원대학교 학술연구조성비(C1009745-01-01)로 수행한 연구로 이에 감사드립니다.

References

1. Yu BP, Yang R. Critical evaluation of the free radical theory of aging. A proposal for the oxidative stress hypothesis. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 786: 1-11 (1996)
2. Lüthje S, Möller B, Perrineau FC, Wöltje K. Plasma membrane electron pathways and oxidative stress. *Antioxid. Redox Sign.* 18: 2163-2183 (2013)
3. Puca AA, Carrizzo A, Villa F, Ferrario A, Casaburo M, Maciag A, Vecchione C. Vascular ageing: The role of oxidative stress. *Int. J. Biochem. Cell B.* 45: 556-559 (2013)
4. Burton GW, Traber MG. Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.* 10: 357-382 (1990)
5. Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: What they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci.* 35: 7-20 (1995)
6. Bhardwaj RL, Pandey S. Juice blends-A way of utilization of under-utilized fruits, vegetables, and spices: A review. *Crit. Rev. Food Sci.* 51: 563-570 (2011)
7. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073S-2085S (2000)
8. Riccioni G, D'Orazio N, Salvatore C, Franceschelli S, Pesce M, Speranza L. Carotenoids and vitamins C and E in the prevention of cardiovascular disease. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 82: 15-26 (2012)
9. Zhang J, Hou X, Ahmad H, Zhang H, Zhang L, Wang T. Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. *Food Chem.* 145: 57-65 (2014)
10. Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, Hartman AM, Palmgren J, Freedman LS, Haapakoski J, Barrett MJ, Pietinen P, Malila N, Tala E, Liippo K, Salomaa ER, Tangrea JA, Teppo L, Askin FB, Taskinen E, Erozan Y, Greenwald P, Huttunen JK. α -tocopherol and β -carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: Effects of base-line characteristics and study compliance. *J. Natl. Cancer I.* 88: 1560-1570 (1996)
11. Arroqui C, Rumsey TR, Lopez A, Virseda P. Effect of different soluble solids in the water on the ascorbic acid losses during water blanching of potato tissue. *J. Food Eng.* 47: 123-126 (2001)
12. Howard LA, Wong AD, Perry AK, Klein BP. β -Carotene and ascorbic acid retention in fresh and processed vegetables. *J. Food Sci.* 64: 929-936 (1999)
13. Roy MK, Juneja LR, Isobe S, Tsushida T. Steam processed broccoli (*Brassica oleracea*) has higher antioxidant activity in chemical and cellular assay systems. *Food Chem.* 114: 263-269 (2009)
14. Cheigh CI, Lee JH, Chung MS. Quality characteristics of vegetables by different steam treatments. *Korean J. Food Nutr.* 24: 464-470 (2011)
15. Hayatsu H, Arimoto S, Negishi T. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res-Fund. Mol. M.* 202: 429-446 (1988)
16. Ryu HS, Kim JH, Kim HS. Effects of plant water extract mixture (*Ixeris sonchifolia* Hance, *Oenanthe javanica*, *Fagopyrum esculentum* Moench, *Hizikia fusiforme*, *Zingiber officinale* Roscoe) on mouse immune cell activation *ex vivo*. *J. Nutr. Health* 20: 74-78 (2007)
17. Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B. Inhibitors of endogenous nitrosation. mechanisms and implications in human cancer prevention. *Mutat. Res-Fund. Mol. M.* 202: 307-324 (1988)
18. Kim SJ, Cho JY, Wee JH, Jang MY, Rim YS, Kim C, Shin SC, Moon JH, Park KH. Isolation and identification of two psoralen derivatives as antioxidative compounds from the aerial parts of *Angelica keiskei*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 656-659 (2005)
19. Park WB, Kim DS. Changes of contents of β -carotene and vitamin C and antioxidative activities of juice of *Angelica keiskei* Koidz stored at different conditions. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 375-379 (1995)
20. Kim JS, Kim HY, Park YK, Kim TS, Kang MH. The effects of green vegetable juice (*Angelica keiskei*) supplementation on plasma lipids and antioxidant status in smokers. *Korean J. Nutr. Health* 36: 933-941 (2003)
21. Koleva II, van Beek TA, Linszen JPH, de Groot A, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochem. Analysis* 13: 8-17 (2002)
22. Rockett KA, Auburn MM, Cowden WB, Clark IA. Killing of *Plasmodium falciparum in vitro* by nitric oxide derivatives. *Infect. Immun.* 59: 3280-3283 (1991)
23. Niwa Y, Miyachi Y. Antioxidant action of natural health products and Chinese herbs. *Inflammation* 10: 79-91 (1986)
24. Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28: 1057-1060 (1989)
25. Kim BK, Choi MJ, Park KY, Cho EJ. Protective effects of Korean mistletoe lectin on radical-induced oxidative stress. *Biol. Pharm. Bull.* 33: 1152-1158 (2010)
26. Fraga CG, Leibovitz BE, Tappel AL. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: Characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radical Bio. Med.* 4: 155-161 (1988)
27. Chen Z, Bertin R, Frolidi G. EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH \cdot assay using several statistical programs. *Food Chem.* 138: 414-420 (2013)
28. Bittencourt LS, Machado DC, Machado MM, Dos Santos GFF, Algarve TD, Marinovic DR, Ribeiro EE, Soares FAA, Barbisan F, Athayde ML, Cruz IBM. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food Chem. Toxicol.* 53: 119-125 (2013)
29. Horáková K, Sovčíková A, Seemannová Z, Syrová D, Busányová K, Drobná Z, Ferencík M. Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 650-664 (2001)
30. Kim HY, Lee KB, Lim HY. Contents of minerals and vitamins in organic vegetables. *Korean J. Food Preserv.* 11: 424-429 (2004)
31. Kim DB, Oh JW, Lee JS, Park IJ, Cho JH, Lee OH. Antioxidant activities of green and purple kohlrabi juices. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 601-608 (2014)
31. Yokozawa T, Cho EJ, Hara Y, Kitani K. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2'-azobis (2-amidinopro-

- pane) dihydrochloride. *J. Agr. Food Chem.* 48: 5068-5073 (2000)
32. Kang KS, Kim HY, Yoo HH, Piao XL, Ham J, Yang HO, Park JH. Protective effect of ginseng saponins against 2,2'-azobis (1-aminopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced LLC-PK₁ cell damage. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22: 634-637 (2012)
33. Park SY, Jeong YJ, Kim SH, Jung JY, Kim WJ. Epigallocatechin gallate protects against nitric oxide-induced apoptosis via scavenging ROS and modulating the Bcl-2 family in human dental pulp cells. *J. Toxicol. Sci.* 38: 371-378 (2013)
34. Koo BS, Lee WC, Chung KH, Ko JH, Kim CH. A water extract of *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) rescues PC12 cell death caused by pyrogallol or hypoxia/reoxygenation and attenuates hydrogen peroxide induced injury in PC12 cells. *Life Sci.* 75: 2363-2375 (2004)
35. Song JL, Zhao X, Wang Q, Zhang T. Protective effects of *Lagerstroemia speciosa* on 3-morpholinosydnonimine (SIN-1)-induced oxidative stress in HIT-T15 pancreatic β cells. *Mol. Med. Rep.* 7: 1607-1612 (2013)
36. Lee KI, Rhee SH, Park KY. Antimutagenic and antioxidative effects of water dropwort and small water dropwort. *Korean J. Community Living Sci.* 15: 49-55 (2004)
37. Ji HH, Jeong HY, Jin SJ, Kwon HJ, Kim BW. Inhibition of adipocyte differentiation by methanol extracts of *Oenanthe javanica* seed in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Life Sci.* 22: 1688-1696 (2012)
38. Edenharder R, John K, Ivo-Boor H. Antimutagenic activity of vegetable and fruit extracts against in-vitro benzo(α)pyrene. *Z. Gesamte. Hyg.* 36: 144-147 (1990)