

과산화수소(H₂O₂)로 유도된 산화 스트레스에 대한 뉴그린 추출물의 신경세포 보호효과 및 생리활성물질 분석

하정수 · 박선경 · 박창현 · 승태완 · 귀텐자오 · 강진용 · 이두상 · 김종민 · 이 옥¹ · 허호진*
경상대학교 응용생명과학부(BK21 plus), 농업생명과학연구원, 산림과학원 특용자원연구과

Neuronal Cell Protective Effect of New Green Extract against H₂O₂-induced Oxidative Stress and Analysis of Bioactive Compounds

Jeong Su Ha, Seon Kyeong Park, Chang Hyeon Park, Tae Wan Seung, Tian Jiao Guo,
Jin Young Kang, Du Sang Lee, Jong Min Kim, Uk Lee¹, and Ho Jin Heo*

Division of Applied Life Science (BK21 plus), Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University
¹Department of Special Purpose Trees, Korea Forest Research Institute

Abstract *In vitro* antioxidant activities and neuronal cell protective effects of the ethyl acetate fraction of a new green extract (*Brassica oleracea* var. *botytis* aut *italiana*) against H₂O₂-induced oxidative stress were investigated, and its industrial feasibility was evaluated. The extract showed the highest contents of total phenolic compounds among other extracts as well as a 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging activity and malondialdehyde (MDA) inhibitory effect. This extract not only decreased the intracellular reactive oxygen (ROS) level but also protected the neuronal cells against H₂O₂-induced oxidative stress. On analysis using gas chromatograph-mass spectrometry, the following phenolic compounds were identified: quinic acid, ferulic acid, and caffeic acid. Collectively, these results suggest that this new green extract could contain functional substances that would help prevent the risk of neurodegenerative disease.

Keywords: *Brassica oleracea*, neuroprotection, new green extract, neurodegenerative disease, phenolic compounds

서 론

인체 내 대사과정에서 부산물로서 생성되는 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂), 초과산화음이온(superoxide anion, O₂⁻), 하이드록실라디칼(hydroxyl radical, OH)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 흡연, 음주, 자외선, 그리고 과도한 스트레스와 같은 외적 요인에 의해서도 생성될 수 있으며(1), 생성된 과량의 활성산소는 동맹경화, 당뇨병, 암, 치매와 같은 각종 질병의 원인으로 알려져 있다(2).

활성산소는 카탈라아제(catalase, CAT), 글루타싸이온과산화효소(glutathione peroxidase, GSH-Px), 초과산화물제거효소(superoxide dismutase, SOD)와 같은 체내 내인성 산화방지제에 의해 유리가 제거되어 산화-산화방지의 균형을 유지함으로써 DNA 손상, 단백질 변형 및 지방질과산화물을 예방한다(2,3). 하지만 활성산소가 과잉 생성되면 체내 산화 균형이 무너지는 산화 스트레스(oxidative stress)를 유도하며, 이는 세포의 생존에 필수적인 에너지(ATP)를 생성하는 미토콘드리아를 손상시켜 세포의 기능장애

와 세포사멸을 일으킨다. 특히, 신경세포는 지방질 성분이 많은 구조적 특성상 산화 스트레스에 특히 취약하여 신경세포의 산화 스트레스와 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease, AD)와 같은 신경퇴행성질환과의 밀접한 연관성을 나타낸다(4,5). 이러한 산화 스트레스는 외인성 산화방지제를 섭취함으로써 감소될 수 있으며, 산화방지제 중에서도 합성 산화방지제들이 우수한 활성을 나타내어 많이 이용되었지만 다양한 부작용이 보고됨에 따라 이를 대체할 수 있는 천연 산화방지제들이 요구되고 있다(6).

식물성 천연식품 자원 등에 함유된 다양한 페놀(phenolic) 화합물들은 식물의 2차 대사산물로서 하이드록실기(hydroxyl group, -OH)이 한 개 이상 치환된 방향족성 물질로(7), 산화방지 활성을 나타내기 때문에 활성산소로 유발된 산화 스트레스로부터 신경세포를 보호할 수 있으며 신경퇴행성질환을 예방하는 데에도 기여한다고 보고된다(8). 이러한 페놀 화합물이 우수한 생리활성 효과를 나타내면서 부작용이 보고된 바 없기에 식물성 천연산화방지제에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

뉴그린(*Brassica oleracea* var. *botytis* aut *italiana*)은 십자화과 채소로서, 추위와 습기 및 병해를 견디는 성질이 강하며 잎이 자라는 속도가 빨라 수확량이 많은 작물로서 주로 쌈이나 샐러드용으로 소비되고 있다(9). 브로콜리, 양배추 및 콜리플라워와 같은 십자화과 채소는 글루코시놀레이트(glucosinolate)류, 페놀류 및 바이타민(vitamin) 등과 같은 생리활성물질을 함유하고 있으며, 이러한 물질들의 경우 뛰어난 산화방지효과들을 나타냄으로써 우수한 천연산화방지 식품으로 보고되고 있다(10). 특히, 산화방지 식품으로 잘 알려진 브로콜리의 경우 산화방지 및 항염증과 같

*Corresponding author: Ho Jin Heo, Division of Applied Life Science (BK21 plus), Institute of Agriculture & Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea
Tel: +82 55 772 1907
Fax: +82 55 772 1909
E-mail: hjher@gnu.ac.kr
Received August 4, 2015; revised September 25, 2015;
accepted September 25, 2015

은 다양한 생리활성효과에 관한 연구가 이루어져 있으나(6,8), 뉴그린은 일반 성분 분석을 제외한 분야로는 연구가 미흡한 실정이다(9). 따라서 본 연구에서는 신경퇴행성질환을 예방할 수 있는 천연물 유래의 기능성 식품소재로서의 활용 가능성을 확인하기 위해 뉴그린의 *in vitro* 산화방지 효과 및 과산화수소로 유발된 산화 스트레스에 대한 신경세포 보호 효과를 확인하고, 최종적으로 가스크로마토그래프질량분석기(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)를 이용하여 주요 페놀류를 분석하고자 한다.

재료 및 방법

재료

사용된 시약으로 폴린시오칼토페놀시약(Folin & Ciocalteu's phenol reagent), 갈산(gallic acid), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 과산화수소, 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate (DCF-DA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay kit, 락트산수소효소(lactate dehydrogenase) release assay kit, methoxyamine hydrochloride, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)+trimethylchlorosilane (TMCS)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였다.

추출물의 제조

본 실험에 사용된 뉴그린(*Brassica oleracea* var. *botytis* aut *italiana*)은 광주광역시 북구 각화동에 위치하고 있는 광주 원예농협에서 2014년 9월에 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 추출물은 30°C dry 오븐(oven)에서 건조시킨 뉴그린 20 g을 80% 에탄올(ethanol) 1 L에 첨가하여 2시간 동안 환류냉각 추출하였으며, 이 추출물은 No. 2 여과지(Whatman Inc, Kent, UK)로 여과하여 농축하였다. 그 후, 3차 증류수 300 mL에 다시 녹인 농축물을 동등한 비율의 노말헥세인(*n*-hexane)을 이용하여 극성차이로 분획하였고, 남은 3차 증류수 층은 클로로폼(chloroform), 아세트산에틸(ethylacetate, EtOAc) 용매를 각각 사용하여 분획하였다(Fig. 1). 각 분획물은 농축하여 냉동건조 한 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

총 페놀 함량

뉴그린의 총 페놀 함량은 폴린시오칼토페놀(Folin-Ciocalteu's) 방법으로 측정하였다(1). 각각의 시료 용액 1 mL에 3차 증류수 9 mL 과 폴린시오칼토페놀시약 1 mL을 첨가하여 실온에서 5분간 반응시킨 후, 7% Na₂CO₃용액 10 mL을 혼합한 다음 3차 증류수로 25 mL까지 정용하였다. 이 혼합 용액을 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, 분광광도계(UV-spectrophotometer) (Libra S32PC, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였고, 측정된 흡광도는 갈산으로 작성된 보정선으로 총 페놀 함량을 계산하였다.

ABTS 라디칼 소거활성 및 지방질과산화 억제 활성

ABTS 용액은 2.5 mM ABTS와 1.0 mM AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) HCl)을 100 mM 인산 완충액(pH 7.4)에 혼합하여 68°C 물중탕(water bath)에서 30분 동안 가열하고 실온에서 10분 동안 식힌 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.700 ± 0.02가 되도록 조정하였다. 시료 용액 20 µL와 흡광도를 조정한 ABTS 용액 980 µL를 혼합하여 10분간 반응시키고, 734 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거활성을 계산하였다(1).

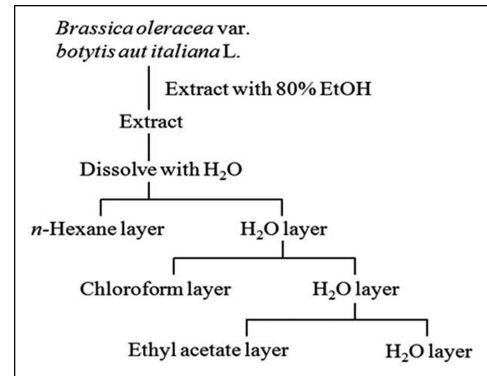


Fig. 1. Fractionation of 80% ethanol extract from new green (*Brassica oleracea* var. *botytis* aut *italiana*).

뇌 조직을 이용한 지방질과산화 억제활성은 Chang 등(11)의 방법을 변형하여 측정하였다. 마우스 뇌 조직 무게의 10배에 해당하는 20 mM 트리스-염산완충용액(Tris-HCl buffer, pH 7.4)를 첨가하여 균질화 시킨 후, 4°C에서 15분간 12,000×g 로 분리하였다. 상층액 0.1 mL에 10 µM 황산철(II) (FeSO₄) 0.1 mL, 0.1 mM 아스코브산(ascorbic acid) 0.1 mL 및 시료 용액을 0.2 mL 첨가하여 37°C에서 1시간동안 배양하였다. 그 후, 30% 트라이클로로아세트산(trichloroacetic acid) 0.1 mL을 첨가하여 반응을 종결시키고, 1% 싸이오바비투르산(thiobabituric acid) 0.3 mL 첨가하여 80°C에서 20분간 가열하고 원심 분리하여 얻은 상층액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

신경세포 배양 및 세포내 산화 스트레스 측정

신경세포의 특성을 나타내는 PC12 세포(KCLB 21721, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)은 25 mM HEPES, 25 mM 탄산수소소듐(sodium bicarbonate), 10% 소태아혈청(fetal bovine serum), 50 units/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신이 포함된 RPMI1640 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다.

PC12 세포 내 산화 스트레스 생성량은 DCF-DA 측정방법으로 수행하였다(4). 비형광 화합물인 DCF-DA가 세포 내로 들어갈 때 탈 에스터화되어 세포 내 존재하는 활성산소에 의해 산화되면 DCF로 전환되어 형광을 띄게 되므로, 이 형광물질을 측정하여 세포 내에 형성된 활성산소를 측정하였다. 양성 대조군으로 사용된 바이타민 C 및 시료 용액을 농도별로 PC12 세포(10⁴ cells/well on 96-well plate)에 처리하여 48시간 동안 선 반응 시켰다(12). 그 후, 200 µM 과산화수소를 대조군을 제외한 처리군에 2시간 동안 처리하였고, 250 µM DCF-DA를 넣어 50분간 추가 배양하여 fluorescence microplate reader (Infinite 200, Tecan Co., San Jose, CA, USA)를 사용하여 485 nm (determination wave)와 535 nm (reference wave)에서 형광강도를 측정하였다.

신경세포 보호효과 측정

과산화수소에 의해 유도된 PC12 세포에 대한 세포 생존율은 MTT reduction 측정방법으로 수행하였다(4). 바이타민 C 및 시료 용액을 농도별로 PC12 세포(10⁴ cells/well on 96-well plate)에 처리하여 48시간 동안 선 반응 시켰다(12). 그 후, 200 µM 과산화수소를 대조군을 제외한 처리군에 3시간 동안 처리한 후, MTT stock 용액 10 µL를 처리하여 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 마지막으로 DMSO 100 µL를 첨가하여 반응을 종결시켰고, 흡광도는 microplate reader (model 680, Bio-rad, Tokyo, Japan)로

Table 1. GC-MS conditions for the determination of phenolics

Parameter	Conditions
Carrier gas	Helium
Mass range	50-1000 <i>m/z</i>
Flow rate	1.46 mL/min
Split ratio	5:1
Ionization mode	Electron impact (EI), Electron energy 70 eV
Inlet temp	200°C
Temperature program	Initial value of 80°C (hold for 2 min), then ramped at 6°C/min up to 320°C and kept for 10 min (total analysis time: 52 min)

570 nm (determination wave)와 690 nm (reference wave)에서 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 % unit으로 나타내었다.

세포막 손상 억제효과는 PC12 세포에 시료를 농도별로 처리하여 48시간 동안 선 반응 시킨 후, 200 µM 과산화수소를 3시간 동안 처리하였다(12). 그 후, 4 분간 250×g로 분리한 상층액 100 µL를 새로운 well에 옮긴 뒤 락트산수소페기효소 assay kit (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하여 측정하였다(4).

주요 생리활성물질 분석

아세트산에틸 분획물에 존재하는 생리활성물질을 분석하기 위하여, 가스크로마토그래프질량분석기 (Shimadzu GCMS-TQ 8030, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였으며, DB-5MS capillary column (30 m×0.25 mm i.d.×0.25 µm film thickness, Restek Co., Bellefonte, PA, USA)을 사용하였고 분석 조건은 Table 1과 같다. 뉴그린 아세트산에틸 분획물 1 mg은 50 µL methoxyamine hydrochloride에 녹여 37°C에서 90분 동안 반응시킨 후, BSTFA+TMCS (99:1) 유도체화 시약을 100 µL를 첨가한 후, 70°C에서 30분간 유도체화 시킨 용액을 가스크로마토그래프질량분석기에 1 µL 주입하여 분석하였다.

생리활성물질의 함량에 대한 분석은 photodiode array UV-Vis detector system과 연결된 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), C₁₈ column (250×4.6 mm, 5.0 µm, ProtoSIL, BISCOFF Chromatography, Leonberg, Germany)을 사용하였다. 이동상으로는 아세토나이트릴(acetonitrile)과 10 mM KH₂PO₄ (10:90, v/v)을 등용매 용리 조건으로 설정하였고 유속을 1.0 mL/min으로 하여 205 nm에서 30분 동안 분석하였다.

통계 처리

모든 실험은 3회 반복 실시하여 mean±SD로 나타내었으며, 각 평균값에 대한 검정은 SAS software (version 9.1, SAS institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석(analysis of variance, ANOVA)를 실시하였으며, Duncan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)으로 각 시료간의 유의차를 5% 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

총 페놀 함량 분석

식물의 2차 대사산물인 플라보노이드(flavonoid)류, 페놀산(phenolic acid)류 및 식물에스트로겐(phytoestrogen)류를 포함하는 페놀류는 분자 내 하이드록실기를 2개 이상 지니며, 이들이 자유기 반응하여 수소 원자를 환원시킴으로써 산화방지 활성 및 항노화 등과 같은 생리적 효과를 나타낸다(13). 각각의 추출용매에 따른 뉴그린의 총 페놀 함량은 80% 에탄올 추출물에서 44.91 mg GAE/g of dried new green으로 나타났으며, 노말헥세인, 클로로폼, 아세트산에틸 및 3차 증류수 분획물에서는 각각 22.33, 67.16, 178.83, 46.50 mg GAE/g of dried new green으로 아세트산에틸 분획물이 가장 높은 함량을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 2).

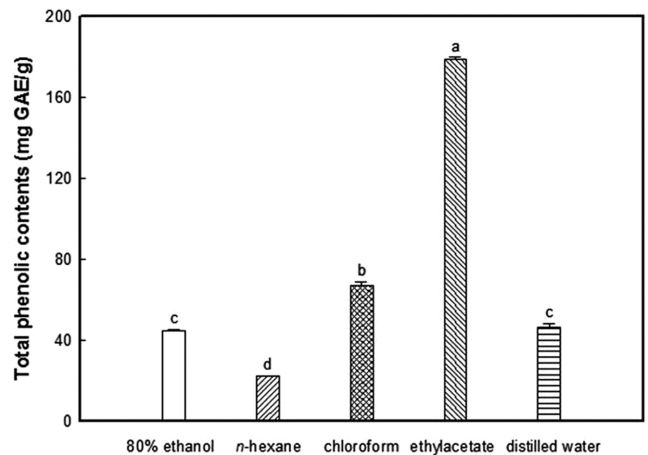


Fig. 2. Total phenolic contents of n-hexane, chloroform, ethyl acetate and distilled water fraction from new green (*Brassica oleracea* var. *botytis aut italiana*). Results are shown as mean±SD (n=3). Data were statistically considered at p<0.05, and different letters (a-d) in graph represent statistical difference.

페놀류는 단백질 및 기타 거대분자와 결합하는 성질을 가지며, ABTS 및 DPPH 라디칼과 같은 라디칼 소거활성에 중요한 인자로서 작용한다고 보고된다(14). 이에 따라, 총 페놀 함량이 가장 높게 나타난 아세트산에틸 분획물을 이용하여 *in vitro* 산화방지 활성 및 신경세포 보호효과 실험을 진행하였다.

페놀류는 단백질 및 기타 거대분자와 결합하는 성질을 가지며, ABTS 및 DPPH 라디칼과 같은 라디칼 소거활성에 중요한 인자로서 작용한다고 보고된다(14). 이에 따라, 총 페놀 함량이 가장 높게 나타난 아세트산에틸 분획물을 이용하여 *in vitro* 산화방지 활성 및 신경세포 보호효과 실험을 진행하였다.

ABTS 라디칼 소거활성 및 지방질과산화 억제 활성

ABTS 라디칼 용액은 고유한 청록색을 나타내지만, 산화방지 물질에 의해 탈색되는 점을 이용하여 산화방지 활성을 측정하였으며, 이는 hydrogen-donating 산화방지제와 chain-breaking 산화방지제 뿐만 아니라 aqueous phase와 organic phase 모두에 적용이 가능하다는 장점을 가진다(15). 뉴그린 아세트산에틸 분획물이 나타내는 ABTS 라디칼 소거활성은 Fig. 3(A)와 같다. 뉴그린 아세트산에틸 분획물은 500 µg/mL에서 64.02%의 라디칼 소거활성을 나타내었고, 이는 양성 대조군인 바이타민 C 가 나타낸 활성 값(99%) 보다는 유의적으로 낮지만 농도가 증가함에 따라 소거활성이 증가하는 경향을 나타내었다.

말론다이알데하이드(malondialdehyde)는 자유 라디칼과 같은 활성산소에 의해 손상된 조직에서 생성된 지방질과산화물로서 산화 스트레스의 지표로 제시된다(16). 특히 뇌 조직은 다른 조직들에 비해 불포화 지방산이 풍부하여 산화 스트레스에 취약한 구조를 나타내며, 이러한 지방질과산화물 생성 억제는 신경퇴행성 질환 예방에 기여한다(17). 뉴그린 아세트산에틸 분획물이 나타내는 말론다이알데하이드 생성 억제활성은 Fig. 3(B)와 같다. 뉴그린 아세트산에틸 분획물의 농도가 증가함에 따라 말론다이알데하이드 생성 억제활성이 크게 증가하는 경향을 나타내었으며,

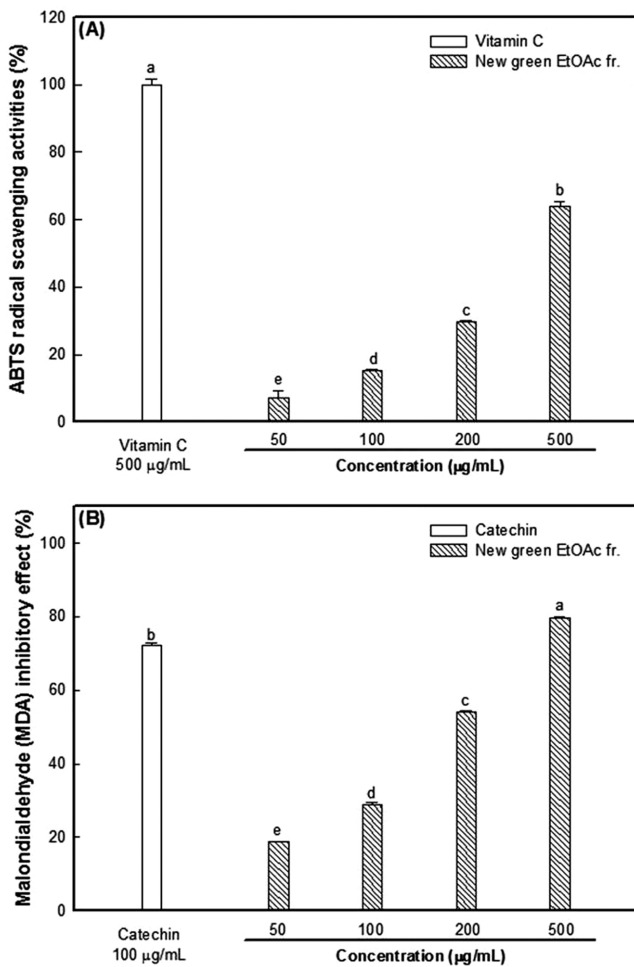


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity (A) and malondialdehyde (MDA) inhibitory effect (B) of ethyl acetate fraction from new green (*Brassica oleracea* var. *botytis aut italiana*). Results are shown as mean±SD ($n=3$). Data were statistically considered at $p<0.05$, and different letters (^{a-c}) in graph represent statistical difference.

500 µg/mL의 농도에서는 79.63%의 억제효과를 보임으로써 양성 대조군으로 사용된 카테킨(catechin) 100 µg/mL (72.27%) 보다 높은 말론다이알데하이드 생성 억제효과를 보였다.

십자화과 식물 중 대표적인 브로콜리 에탄올 추출물의 경우, 뛰어난 말론다이알데하이드 생성 억제활성을 보고하였고, 이는 브로콜리 에탄올 추출물에 존재하는 주요 성분들의 하이드록실기가 지방질층의 이중 결합으로부터 수소 원자의 방출을 억제한 결과라고 보고하였다(18). 십자화과의 브로콜리 종류인 뉴그린 또한 우수한 총 페놀 함량을 나타내면서 더불어 일정 수준에서의 ABTS 라디칼 소거활성을 나타낸 것으로 보아, 뉴그린의 주요 페놀 화합물들에 존재하는 하이드록실기의 영향으로 산화 스트레스로부터 지방질과산화물을 억제하는 것으로 판단된다.

세포내 산화 스트레스의 측정

인체 내 산화방지 균형이 무너지게 되면 지방질 및 단백질이 산화되고 DNA가 손상됨으로써 다양한 질병을 유발 할 수 있다. 과산화수소와 같은 활성산소로 인해 발생하는 산화 스트레스로 인한 신경세포의 손상은 퇴행성 뇌신경 질환의 유발과 연관될 수 있기 때문에 뉴그린 아세트산에틸 분획물이 나타내는 세포 수준

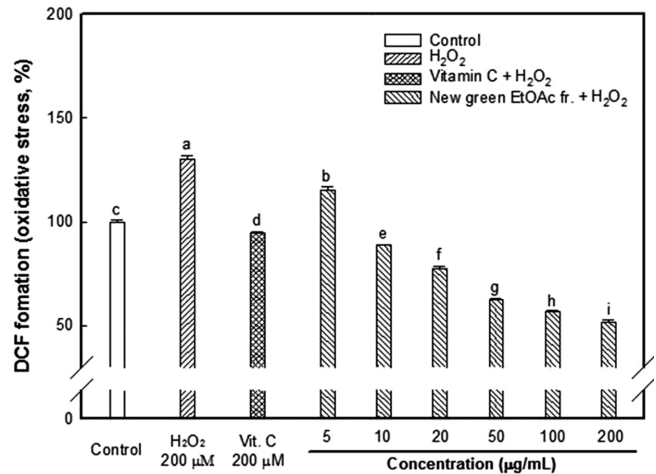


Fig. 4. Protective effect of ethyl acetate fraction from new green (*Brassica oleracea* var. *botytis aut italiana*) on ROS production by the H₂O₂-induced cellular oxidative stress in PC12 cells. Results are shown as mean±SD ($n=3$). Data were statistically considered at $p<0.05$, and different letters (^{a-i}) in graph represent statistical difference.

의 산화 스트레스 억제 효과를 DCF-DA 측정방법으로 확인하였다(19).

과산화수소 처리군(130.16%)은 양성 대조군(100%)과 비교하여 활성산소가 약 30% 증가를 보인 반면, 바이타민 C 처리군(94.90%)은 과산화수소로 인한 활성산소가 대조군보다 유의적으로 더 낮은 수준으로 감소하였다(Fig. 4). 뉴그린 아세트산에틸 분획물 처리군 또한 대부분의 처리 농도에서 과산화수소 처리군보다 활성산소 형성 수준이 낮았으며, 특히 200 µg/mL 농도에서는 약 51%로, 과산화수소 처리군에 비해 약 79% 정도의 활성산소 감소를 나타내었다.

신경세포 생존율 및 세포막 손상 보호효과

신경세포의 미토콘드리아 투과성 전이공(mitochondrial permeability transition pore)이 활성화 되면 활성산소가 세포질 내로 방출돼 세포가 손상되기 때문에(20), 미토콘드리아의 손상 정도는 신경세포의 생존력과 연관된다. 과산화수소로 유발된 신경독성으로부터 뉴그린 아세트산에틸 분획물이 나타내는 세포 생존율은 Fig. 5(A)와 같다. 과산화수소 처리군은 대조군(100%)에 비해 75.46%의 세포 생존율을 나타내었고, 이에 반해 바이타민 C 처리군은 95%로서 약 20% 정도의 세포 생존율이 증가하였다. 뉴그린 아세트산에틸 분획물 처리군은 5 µg/mL 농도에서 바이타민 C 처리군과 유의적으로 동일한 세포 생존율을 나타내었고, 특히 농도가 증가함에 따라 세포 생존율 역시 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 200 µg/mL 최고 농도에서는 과산화수소 처리군보다 높은 130% 이상의 세포 생존율을 나타내었다.

지방질 성분이 상대적으로 다량 존재하는 신경세포는 산화 스트레스에 취약한 구조이기 때문에 이로 인한 세포막 보전(integrity)이나 유동성에 변화를 일으킬 수 있는 다양한 활성산소에 의해 락트산수소페기효소(lactate dehydrogenase)가 배지로 방출되므로(4), 이와 같은 락트산수소페기효소는 신경퇴행성질환의 지표로서 제시된다. 과산화수소로 유발된 세포막 손상에 대한 뉴그린 아세트산에틸 분획물의 보호효과는 Fig. 5(B)에 나타내었다. 과산화수소 처리군(91.19%)은 대조군(62.46%)에 비해 약 29% 정도 락트산수소페기효소 방출량이 증가하였으며, 바이타민 C 처리군(66.28%)

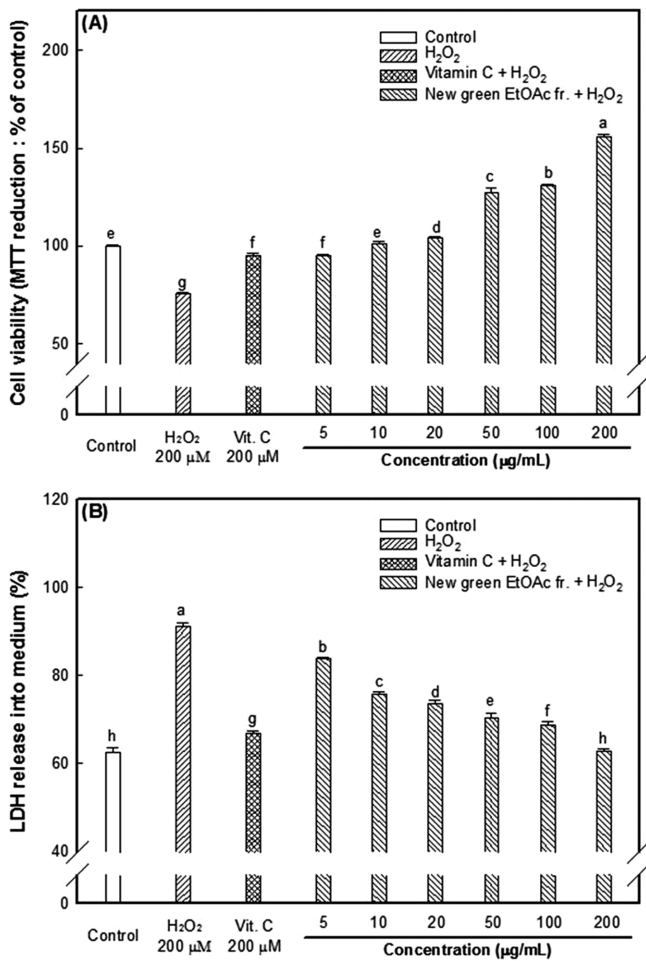


Fig. 5. Neuronal cell viability of ethyl acetate fraction from new green (*Brassica oleracea* var. *botytis* aut *italiana*) on H₂O₂-induced cytotoxicity (A), LDH release inhibitory effect on H₂O₂-induced membrane damage (B) in PC12 cells. Results are shown as mean±SD (n=3). Data were statistically considered at p<0.05, and different letters (a-h) in graph represent statistical difference.

은 락트산수소효소 방출량이 과산화수소 처리군보다 약 25% 감소하였다. 뉴그린 아세트산에틸 분획물 처리군은 모든 농도에서 과산화수소 처리군보다 락트산수소효소 방출량이 낮을 뿐만 아니라 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 특히 200 µg/mL에서는 62.76%로 바이타민 C군과 유사한 신경세포막 보호효과를 나타내었다.

전기적 신호전달의 기능을 위해 뇌의 신경세포들은 리놀레산 (linoleic acid)나 아라키돈산(arachidonic acid)와 같은 불포화 지방산이 많고 이로 인하여 다른 조직들에 비해 활성산소 공격에 취약하며(21), 알츠하이머성 치매 환자들의 뇌에서 아크로레인 (acrolein)과 같은 지방질과산화물의 생성이 증가된다는 것이 보

고되었다(17). 활성산소로 인한 지방질과산화물 생성이 억제된다면 미토콘드리아에 세포독성을 나타내는 아크로레인 같은 생리적 독성 물질로부터 신경세포를 보호할 수 있을 것이다. 따라서, 뉴그린 아세트산에틸 분획물이 신경세포 내 활성산소를 효과적으로 감소시켜 산화 스트레스로 인한 손상으로부터 신경세포를 보호한 것으로 판단된다.

뉴그린의 페놀 확인

우수한 산화방지 활성과 신경세포 보호 능력을 나타낸 뉴그린 아세트산에틸 분획물에 존재하는 주요 페놀을 확인하기 위해 가스크로마토그래프질량분석을 실시하였으며, 구성된 화합물의 fragment 이온들 및 머무름지표(retention index, RI) 값을 Wiley 및 NIST spectral libraries를 이용하여 확인하였다. Trimethylsilyl(TMS)로 유도체화된 퀴산(quinic acid)는 22.065의 머무름시간 (retention time, RT)에서 1852의 머무름지표 값을 가지며(Table 2), 552의 모 분자량과 345, 255, 239, 217, 191, 147 및 73 등의 m/z 값을 가지는 fragment 이온들이 나타났고(Fig. 6(A)), 페룰산 (ferulic acid)는 26.059의 머무름시간에서 2086의 머무름지표 값을 가지며 338의 모 분자량과 323, 308, 293, 279, 249, 219 및 73 등의 m/z 값을 포함하는 fragment 이온들이 나타났다(Fig. 6(B)). 또한 카페산(caffeic acid)은 26.776의 머무름시간에서 2132의 머무름지표 값 및 396의 모 분자량과 381, 219, 191 및 73 등의 m/z 값을 포함하는 fragment 이온들이 나타났다(Fig. 6(C)). Fragment 이온들 중에서 공통적으로 나타나는 m/z 73 이온은 유도체화할 때 -OH기에 결합하는 TMS가 하나일 때 나타나는 이온이다.

페룰산은 식품의 세포벽에 풍부하게 존재하는 성분으로 세포벽을 구성하는 리그닌의 전구체로서 초과산화물이온(superoxide ion), 하이드록실라디칼과 같은 활성산소를 소거하는 산화방지 효과와 AAPH로 유발된 산화 스트레스에 대한 신경세포 보호능력을 나타낼 뿐만 아니라(22), *in vivo* tests (Y-maze, passive avoidance 및 Morris water maze)를 통해 Aβ₁₋₄₂로 유발된 산화 스트레스에 대한 쥐의 해마 조직 손상에 대한 보호효과 역시 보고되었다(23). 커피 열매에 많이 존재하는 카페산 또한 우수한 라디칼 소거활성을 나타내면서 Aβ₂₅₋₃₅로 유발된 세포독성으로부터 신경세포인 PC12 세포를 농도 의존적으로 보호하는 효과가 보고되었다(24). 퀴산은 식물계에서 흔히 발견되는 무색의 결정산(crystalline acid)로서 하이드록실기를 포함하기 때문에 자체적으로 산화방지 효과를 나타내기도 하며, 카페산과 에스터 결합을 통해 산화방지제로 잘 알려진 클로로겐산(chlorogenic acid)을 생성할 수 있다(25). 가스크로마토그래프질량분석을 통해 확인된 뉴그린의 페놀류 중 주요 화합물인 퀴산의 함량은 20.60 µg/mg of dried new green으로 나타났다.

이러한 결과로 보아 뉴그린에 존재하는 주요 페놀류(퀴산, 페룰산 및 카페산)로 인해 *in vitro* 산화방지 활성과 과산화수소로 유발된 산화 스트레스에 대하여 신경세포를 보호하는 효과를 나타낸 것으로 판단되며, 나아가 퇴행성 뇌신경질환의 예방에도 도움이 될 수 있는 식품 소재로 사료된다.

Table 2. Retention times (RT), Retention index (RI), and main identified ions presented in the mass spectra of silylated phenolic acids by GC-MS

Phenolic acids	Retention time (RT)	Retention index (RI)	Fragment ions (m/z)
Quinic acid	22.065	1852	552, 345, 255, 239, 217, 191, 147, 73
Ferulic acid	26.059	2086	338, 323, 308, 293, 279, 249, 219, 73
Caffeic acid	26.776	2132	396, 381, 219, 191, 73

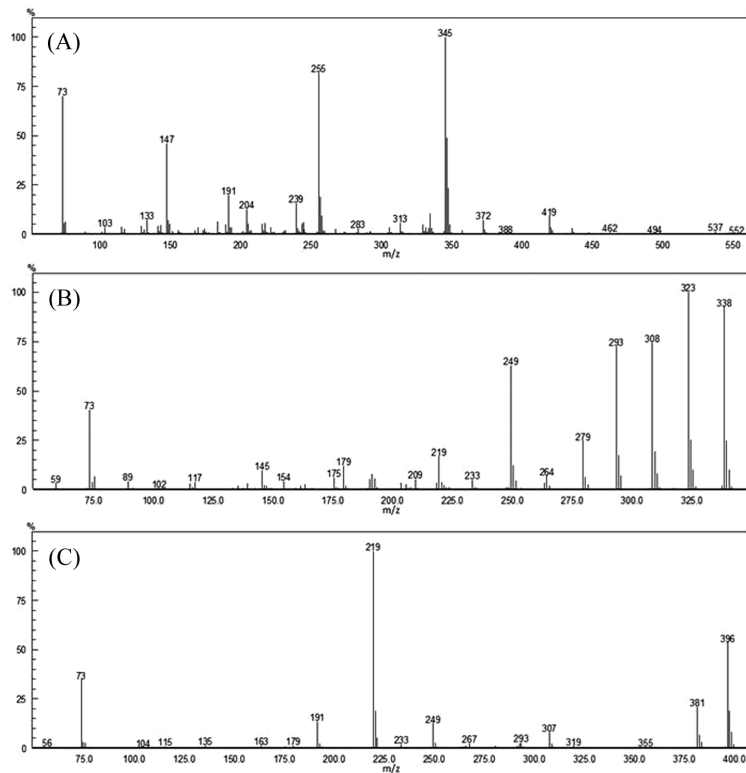


Fig. 6. GC-MS spectra for quinic acid (A), ferulic acid (B), and caffeic acid (C).

요 약

본 연구에서는 뉴그린(*Brassica oleracea* var. *botytis* aut *italiana*)의 산화방지 효과와 신경세포 보호효과 및 주요 생리활성물질을 분석하였다. 뉴그린 아세트산에틸 분획물은 다른 분획물보다 총 페놀 함량(178.83 mg GAE/g of dried new green)이 높게 나타났으며, 이에 따라 아세트산에틸 분획물로 *in vitro* 산화방지 실험을 한 결과 상대적으로 우수한 ABTS 라디칼 소거활성과 말론다이알데하이드 생성 억제효과를 나타내었다. 신경세포에 과산화수소로 유발시킨 산화 스트레스에 대한 뉴그린 아세트산에틸 분획물은 산화 스트레스의 생성을 억제하고 세포 생존율을 향상시킬 뿐만 아니라 신경 세포막 손상을 보호하는 것으로 나타났다. 이러한 효과를 나타내는 뉴그린 아세트산에틸 분획물의 주요 생리활성 물질을 확인하기 위해 가스크로마토그래프질량분석을 실시한 결과 퀘산, 페룰산 및 카페산이 존재하는 것으로 확인되었다. 본 연구 결과를 바탕으로, 뉴그린 아세트산에틸 분획물은 우수한 산화방지 효과와 신경세포 보호효과를 나타냄에 따라, 퇴행성 신경질환과 같은 질병을 예방할 수 있는 천연물 유래의 기능성 소재로서의 활용가치가 있다고 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2015R1D1A3A01015931) 및 농촌진흥청 지역특화작목기술개발과제(PJ011345)의 지원을 받아 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

References

- Jeong CH, Choi GN, Kim JH, Kwak JH, Kim DO, Kim YJ, Heo HJ. Antioxidant activities from the aerial parts of *Platycodon grandiflorum*. Food Chem. 118: 278-282 (2010)
- Comporti M. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants. J. Siena Acad. Sci. 2: 13-26 (2010)
- Kim AK, Kim JH. Alterations of antioxidant enzymes in response to oxidative stress and antioxidants. Biomol. Ther. 9: 249-257 (2001)
- Heo HJ, Cho HY, Hong BS, Kim HK, Kim EK, Kim BG, Shin DH. Protective effect of 4',5-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against β -induced oxidative stress in PC12 cells. Amyloid 8: 194-201 (2001)
- Kirkinezos IG, Moraes CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. Semin. Cell Dev. Biol. 12: 449-457 (2001)
- Piao XL, Kim HY, Yokozawa T, Lee YA, Piao XS, Cho EJ. Protective effects of broccoli (*Brassica oleracea*) and its active components against radical-induced oxidative damage. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 51: 142-147 (2005)
- Proestos C, Sereli D, Komaitis M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. Food Chem. 95: 44 - 52 (2006)
- 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)
- Kim DJ, Kim JM, Hong SS. The composition of dietary fiber on Brassica vegetables. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 700-704 (2004)
- Kapusta-Duch J, KopeA, Pitkowska E, Borczak B, Leszczyska T. The beneficial effects of *Brassica* vegetables on human health. Roczn. Panstw. Zakl. Hig. 63: 389-395 (2012)
- Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS, Shyur LF.

- Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. J. Agr. Food Chem. 49: 3420-3424 (2001)
12. Kwak JH, Jo YN, Jeong JH, Kim HJ, Jin SI, Choi SG, Heo HJ. Protective effects of black soybean seed coat extracts against oxidative stress-induced neurotoxicity. Korean J. Food Sci. Technol. 45: 257-261 (2013)
 13. Kim HY, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Jeong HS. Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 177-170 (2008)
 14. Jeong CH, Choi SG, Heo HJ. Analysis of nutritional components and evaluation of functional activities of *Sasa borealis* leaf tea. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 586-592 (2008)
 15. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Bio. Med. 26: 1231-1237 (1999)
 16. Kaur S, Chhabra R, Nehru B. *Ginkgo biloba* extract attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction resulting from trimethyltin in mice. Phytomedicine 20: 178-186 (2013)
 17. Lovell MA, Xie C, Markesbery WR. Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. Neurobiol. Aging 22: 187-194 (2001)
 18. Bidchol AM, Wilfred A, Abhijna P, Harish R. Free radical scavenging activity of aqueous and ethanolic extract of *Brassica oleracea* L. var. *italica*. Food Bioprocess Tech. 4: 1137-1143 (2011)
 19. Crundman M, Delaney P. Antioxidant strategies for Alzheimer's disease. P. Nutr. Soc. 61: 191-202 (2002)
 20. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. P. Natl. Acad. Sci. Usa 99: 1259-1263 (2001)
 21. Arlt S, Beisiegel U, Kontush A. Lipid peroxidation in neurodegeneration: New insights into Alzheimer's disease. Curr. Opin. Lipidol. 13: 289-294 (2002)
 22. Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, Allan Butterfield D. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: Structure-activity studies. J. Nutr. Biochem. 13: 273-281 (2002)
 23. Yan JJ, Cho JY, Kim HS, Kim KL, Jung JS, Huh SO, Suh HW, Kim YH, Song DK. Protection against β -amyloid peptide toxicity *in vivo* with long-term administration of ferulic acid. Brit. J. Pharmacol. 133: 89-96 (2001)
 24. Sul D, Kim HS, Lee DH, Joo SS, Hwang KW, Park SY. Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation. Life Sci. 84: 257-262 (2009)
 25. Pavlica S, Gebhardt R. Protective effects of ellagic and chlorogenic acids against oxidative stress in PC12 cells. Free Radical Res. 39: 1377-1390 (2005)