

## 백년초의 PC-12 신경세포 보호 및 콜린가수분해효소(cholinesterase) 저해 효과

황정승<sup>1,2</sup> · 임성빈<sup>1,2</sup> · 이인일<sup>1,2</sup> · 김태락<sup>3</sup> · 김대옥<sup>1,2,\*</sup>  
<sup>1</sup>경희대학교 식품생명공학과, <sup>2</sup>경희대학교 피부생명공학센터, <sup>3</sup>(주)셀비온

### Effects of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Ripe Fruits on Protection of Neuronal PC-12 Cells and Cholinesterase Inhibition

Jeong-Seung Hwang<sup>1,2</sup>, Sungbin Im<sup>1,2</sup>, Inil Lee<sup>1,2</sup>, Tae-Rahk Kim<sup>3</sup>, and Dae-Ok Kim<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University

<sup>2</sup>Skin Biotechnology Center, Kyung Hee University

<sup>3</sup>R&D Center, Cellbion Co., Ltd.

**Abstract** Oxidative stress caused by reactive oxygen species is ascribed to many neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease. Phenolic antioxidants can reduce the oxidative stress. In this study, ripe fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* (OFS) were extracted using 80% (v/v) aqueous ethanol. Total phenolic and flavonoid contents of the OFS fruits (100 g) were 409.9 mg gallic acid equivalents and 72.2 mg catechin equivalents, respectively. The OFS fruits had antioxidant capacity at 381.2, 298.2, and 3,219.9 mg vitamin C equivalents/100 g in ABTS, DPPH, and ORAC assays, respectively. The OFS fruits showed protective effects on PC-12 cells against oxidative stress in a dose-dependent manner, partly due to decrease of intracellular oxidative stress. Furthermore, the OFS fruits inhibited both acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Consequently, these results suggest that the OFS fruits might be served as a source of functional materials to reduce oxidative stress in neuronal cells and to inhibit cholinesterases.

**Keywords:** acetylcholinesterase, *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*, oxidative stress, total phenolic compound, vitamin C equivalent

## 서 론

초과산화물(superoxide), 과산화수소, 일중항산소, 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical) 등과 같은 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 살아있는 세포의 정상적인 신진대사를 통해 생성된다(1). 활성산소에 의한 지속적인 산화 스트레스(oxidative stress)는 퇴행성 신경질환(2-5), 천식(6), 만성 폐쇄성 폐질환(7) 같은 많은 병리학적 조건에 관여하는 것으로 알려져 있다. 산화 스트레스를 유발하는 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 천연의 기능성 생리활성물질을 이용하여 암, 치매 등과 같은 생활습관병을 예방할 필요가 있다.

식물체 2차 대사산물(secondary metabolites)의 하나인 페놀화합물(phenolic compounds)은 다양한 구조와 분자량을 가진다. 타닌(tannin)과 같은 페놀화합물은 아밀라아제(amylose) 등의 단백질과 결합하고, 철, 아연 등의 무기질을 킬레이팅하는 항영양소(antinutrients)로도 작용을 하지만, 하이드록실기(-OH)를 갖는 페놀화합물의 구조적 특성 때문에 산화방지능 등의 다양한 생리활성을 갖는다(8). 식물의 꽃, 열매, 씨, 잎, 줄기에 고루 분포하는 플라보

노이드(flavonoid)는 병원균 억제, 자외선 차단 등에 대한 효과를 갖는다. 기본적으로 C6-C3-C6 구조를 갖는 플라보노이드의 C3으로 이루어진 가운데 C 고리(C ring)의 산화상태(oxidation state) 차이에 따라 플라바놀(flavanol), 플라바논(flavanone), 플라본(flavone), 플라보놀(flavonol), 이소플라본(isoflavone), 안토시아닌idin (anthocyanidin) 등의 하위 그룹으로 구분된다.

순바다 선인장이라고 불리기도 하는 백년초(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)는 선인장과에 속한다. 백년초는 내건성(drought resistant) 다년생 초본으로 식용 과일을 생산한다. 우리나라에서는 제주도, 신안군 등 남해안 지방에 자생하고 있으며, 현재 제주도를 중심으로 백년초의 재배가 증가하고 있다. 백년초는 콜레스테롤 저하, 혈당저하능, 항당뇨, 항균활성, 상처치유, 항염증 등의 효능이 알려져 있다(9-11). 또한, 백년초의 다양한 추출물의 산화방지능 연구(10,12), 사과 갈변억제 연구(13), 소세지 제조시 백년초 분말의 아질산염 대체에 의한 품질특성에 관한 연구(14) 등이 보고되었다. 세계적으로도 선인장을 통한 기능성 가공식품의 개발 및 시장규모도 계속 증가하고 있으며, 일본, 남미 등에서 다양한 선인장 가공식품이 판매되는 것과 달리 국내에서는 초콜릿, 차 등의 단순 가공식품만이 생산되고 있다. 일반적으로 합성 산화방지제는 우수한 산화방지능과 경제성으로 널리 사용되어 왔지만, 장기간 섭취 시 신장, 위장, 간, 폐, 순환계 등에 독성을 유발할 가능성이 있는 것으로 알려져 그 사용량이 규제되고 있어 천연으로부터 안전한 식이성 산화방지제의 개발이 필요하다.

그러나, 아직까지 천연 산화방지제로서의 백년초에 관한 연구와 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 산화방지능 등 기능성 성분에 대한 정량적 연구가 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 제주

\*Corresponding author: Dae-Ok Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 17104, Republic of Korea  
Tel: +82-31-201-3796  
Fax: +82-31-204-8116  
E-mail: DOKIM05@khu.ac.kr  
Received January 9, 2016; revised February 20, 2016;  
accepted February 21, 2016

도에서 자생한 백년초 열매의 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 산화방지능을 정량적으로 분석하고, 백년초의 *in vitro* PC-12 신경세포 보호 효과, 그리고 아세틸콜린가수분해효소(acetylcholinesterase, AChE) 및 부틸콜린가수분해효소(butyrylcholinesterase, BChE) 저해 활성능을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

비타민 C, 과산화수소, 갈산(gallic acid), 카테킨(catechin), 폴린-시오칼토페놀 시약(Folin & Ciocalteu's phenol reagent), ABTS, DPPH, MTT, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide)dihydrochloride (AAPH), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2,7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA), 플루오레세인소듐(flourescein sodium salt), 아세틸콜린가수분해효소, 부틸콜린가수분해효소, acetylcholine iodide (ATCI), butyrylthiocholine chloride (BTCC), 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride hydrate (tacrine), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)는 Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지, 우태아 혈청(fatal bovine serum, FBS), 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin)은 Welgene (Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

### 추출

본 실험에서 사용된 백년초는 제주도 제주시 한림읍에서 2011년 겨울에 수확한 것을 사용하였다. 추출은 80% (v/v) 물-에탄올 혼합용매를 사용하였다. 세척한 백년초 열매를 추출용매 100 mL와 혼합 후 2분간 균질기(Polytron PT 2100; Kinematica AG Littau/Lucerne, Switzerland)로 15,000 rpm에서 균질화(homogenization)한 뒤 15분간 초음파 처리하였다. 추출물을 여과 후 남은 여과막(filter cake)에 다시 추출 용매 100 mL를 혼합하여 동일 추출조건에서 재추출하였다. 추출물은 감압회전농축기(Eyela, Tokyo, Japan)로 농축시킨 후 최종 부피를 100 mL로 만들었다. 최종 추출물은 질소가스(N<sub>2</sub>)를 충전하여 -18°C에 보관하며 사용하였다. 백년초를 독립적으로 3회 반복 추출하였다.

### 총페놀 함량 측정

총페놀 함량은 폴린-시오칼토페놀 시약을 이용한 발색법(15)으로 측정하였다. 시료 200 µL에 증류수 2.6 mL와 폴린-시오칼토페놀 시약 200 µL를 첨가하고 6분 후에 7% (w/v) 탄산소듐(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 용액을 2 mL를 첨가하고, 이후 84분 더 정치시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 백년초의 총페놀 함량은 표준물질로 갈산을 사용하여 표준곡선(standard curve)을 작성한 후 정량 측정하였으며, mg 갈산 당량(gallic acid equivalents, GAE)/100 g fresh weight (FW)로 나타내었다.

### 총플라보노이드 함량 측정

총플라보노이드 함량은 Kim 등(16)의 방법을 사용하여 측정하였다. 총플라보노이드 함량은 백년초 추출물 0.5 mL, 증류수 3.2 mL, 5% (w/v) 아질산소듐(NaNO<sub>2</sub>) 150 µL를 혼합하여 5분간 반응시킨 뒤 10% (w/v) AlCl<sub>3</sub> 용액을 첨가하여 1분간 더 반응시키고, 1 M 수산화소듐(NaOH)을 넣고 혼합하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 백년초의 총플라보노이드 함량은 표준물질로 카테킨을 이용하여 표준곡선을 작성한 후 정량 측정하였으며, mg 카테킨 당량(catechin equivalents, CE)/100 g FW로 나타내었다.

### 산화방지능 측정

산화방지능 측정은 ABTS, DPPH, ORAC법을 이용하였다. ABTS법을 이용한 산화방지능은 Kim 등의 방법(17)에 따라 다음과 같이 측정하였다. 1.0 mM AAPH에 2.5 mM ABTS와 PBS 100 mL를 섞어서 70°C 항온수조에서 ABTS 용액을 만들었다. PBS 용액을 이용하여 734 nm에서 0.650±0.020의 흡광도로 희석한 ABTS 용액 980 µL와 백년초 추출물 20 µL를 혼합하고, 37°C에서 10분간 반응 후, 734 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 산화방지능은 비타민 C의 표준곡선을 이용하여 정량하였고, mg 비타민 C 당량(vitamin C equivalents, VCE)/100 g FW로 나타내었다.

DPPH 라디칼을 이용한 산화방지능은 Brand-Williams 등(18)의 방법을 변형하여 측정하였다. 80% (v/v) 메탄올-물 혼합용액을 사용하여 100 µM의 DPPH 용액을 제조한 후, 517 nm에서 0.650±0.020의 흡광도로 희석하였다. 백년초 추출물 50 µL에 DPPH 라디칼 용액 2.95 mL를 첨가하여 23°C에서 30분간 반응시킨 후, 흡광도를 측정하였다. 산화방지능은 mg VCE/100 g FW로 나타내었다.

ORAC법을 이용한 산화방지능은 Huang 등(19)의 방법을 이용하였다. 시료 25 µL에 81.6 nM 플루오레세인소듐 150 µL를 넣어준 후 37°C에서 10분간 교반하였다. AAPH (153 mM) 25 µL를 추가로 넣은 후 형광측정 마이크로플레이트 판독기(microplate fluorescence reader, Infinite M200, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)를 이용하여 들뜸(excitation)은 485 nm, 방출(emission)은 520 nm에서 형광도를 90분 동안 매 1분 간격으로 측정하였다. 시간 경과에 따라 백년초 추출물의 산화방지작용에 의한 형광의 감소를 이용하여 곡선아래면적(area under curve)을 계산하고, 산화방지능은 mg VCE/100 g FW로 나타내었다.

### 세포 배양

본 실험에 사용한 PC-12 신경세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)의 것을 사용하였다. 세포배양을 위해 사용한 배지는 RPMI 1640 배지에 10% 열불활성 FBS, 100 unit/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신을 첨가하여 사용하였고, 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>를 유지하는 배양기(AutoFlow NU-4750 Water Jacket CO<sub>2</sub> Incubator; Nuair, Plymouth, MN, USA)에서 배양하여 사용하였다.

### 신경세포 보호능

신경세포주인 PC-12 세포에 대한 백년초 추출물의 무해한 농도의 결정 및 신경세포 보호능 평가를 위해서 MTT법을 이용하였다. 세포독성 평가를 위해서 96-well plate에 PC-12 세포를 2.0×10<sup>4</sup> cell/well로 분주하여 24시간 배양하였다. 백년초 추출물을 100, 250, 500, 750, 1,000 µg/mL의 농도로 24시간 동안 더 배양을 하였다. 이후 MTT 시약을 첨가하고 4시간이 지난 다음 DMSO를 이용하여 포마잔(formazan)을 용해시켜 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 무독성은 백년초 추출물 무처리군인 대조군(control)의 세포생존율 대비 90% 이상의 생존율을 보인 농도로 설정을 하였다.

백년초 추출물의 세포보호 효과는 위에 기술한 세포 독성 실험과 같은 방법으로 세포를 배양하였다. 백년초 추출물을 세포 독성이 없는 최대 농도까지 처리한 후, 산화 스트레스를 유도하기 위해 100 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1시간 동안 처리하였다. 이후 MTT 시약을 첨가하고 4시간이 지난 다음 570 nm에서 흡광도를 측정하

였다. 세포 생존율은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다. 세포 생존율 측정은 독립적으로 3반복을 실시하였다.

### 세포 내 산화 스트레스 측정

세포 내 산화 스트레스는 배지에 투여한 DCFH-DA가 세포 내로 유입되어 에스테라아제(esterase)의 반응을 통해 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH)의 형태로 전환된 후, 세포 내 산화제(oxidants)와 반응하여 형광 물질인 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)의 생성을 측정하였다. PC-12 세포를 96-well plate에  $2 \times 10^4$  cell/well로 분주 후 24시간 동안 배양하였다. 이후 농도 별 시료를 24시간 동안 처리 후 50  $\mu$ M DCFH-DA를 세포에 가하여 30분간 처리하였다. 이어 과산화수소 300  $\mu$ M에 1시간 동안 노출시킨 후 들뜸 480 nm, 방출 530 nm에서 형광도를 형광측정 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 측정하였다. 세포 내 산화 스트레스는 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었고, 독립적으로 3반복을 실시하여 측정하였다.

### AChE 및 BChE 저해 활성

AChE 저해 활성은 96-well plate를 이용한 AChE 저해법과 BChE 저해법을 통해 실험하였다. ATCI와 BTCC가 각각 AChE와 BChE의 기질로, DTNB가 발색 시약으로 사용되었다. AChE 저해법에서는 백년초 추출물 20  $\mu$ L와 AChE (0.2 U/mL) 20  $\mu$ L를 150  $\mu$ L의 PBS에 첨가하고 37°C에서 5분간 방치하였다. 이후 DTNB (10 mM) 30  $\mu$ L와 ATCI (15 mM) 20  $\mu$ L를 첨가하였다. BChE 저해법 또한 AChE와 ATCI 대신 0.2 U/mL BChE와 10 mM BTCC 기질을 사용한 것 외에는 AChE 저해법과 동일한 방식으로 실험을 진행하였다. DTNB와 ATCI 또는 BTCC를 첨가한 뒤 37°C 배양기에서 30분간 정지시킨 후, 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. AChE 및 BChE 저해 활성은 nM 타크린 당량(nM tacrine equivalents)으로 나타내었고, 3반복 실험 뒤 통계처리하였다.

### 통계분석

모든 추출 및 정량 분석은 3회 반복하였으며, 통계분석은 SAS 통계프로그램(SAS version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하였다. 평균값의 차이를 검증하기 위하여 분산(ANOVA) 분석을 실시하였고,  $p < 0.05$  유의수준에서 던컨시험(Duncan's multiple range test)으로 유의차를 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 총페놀 함량

백년초의 총페놀 함량은 409.9 mg GAE/100 g FW을 나타내었다(Table 1). 멕시코에서 자생하는 다양한 *Opuntia* spp로 만든 주스의 총페놀 함량은 2.2-22.6 mg GAE/100 g의 범위에 존재했으며,

이중 *O. ficus-indica*로 만든 주스는 17.2 mg GAE/100 g 총페놀 함량을 보였다(20). 제주도에서 재배한 *O. ficus-indica*의 줄기(stem)의 총페놀 함량은 180.3 mg GAE/g freeze-dried sample(21), 잎줄기(cladode)의 총페놀 함량은 158.9 mg GAE/100 g이었다(22). *O. ficus-indica* 열매의 약 45%를 차지하는 부산물(by-products)은 높은 총페놀 함량을 보였으며, Alfajayucan(green tuna) 품종이 Pelon Rojo(red tuna) 품종보다 유의적으로 높은 총페놀 함량을 보였다(23). 이들 연구 결과는 본 연구의 백년초 열매의 총페놀 함량보다 낮은 총페놀 함량을 보였다. 총페놀 함량이 서로 상이한 것은 백년초 부위별, 산지별 차이에서 발생하기 때문으로 여겨진다.

### 총플라보노이드 함량

백년초의 총플라보노이드 함량은 72.2 mg CE/100 g FW이었다(Table 1). 다양한 *Opuntia* spp로 만든 주스의 총플라보노이드 함량은 9.6-37.4 mg 케세틴 당량(quercetin equivalents)/100 g의 범위를 보였다(20). *O. ficus-indica* (green-skinned cactus pear)의 주요한 플라보노이드인 케세틴, 캠페롤(kaempferol), 이소람네티닌(isorhamnetin)의 함은 6.95 mg/100 g FW을 보였고(24), 본 연구 결과와 달리 플라보노이드 함량이 낮은 이유는 HPLC를 이용하여 *O. ficus-indica*의 주요한 플라보노이드 만을 정량 분석했기 때문으로 판단된다.

### 산화방지능

ABTS, DPPH, ORAC법을 이용한 백년초의 산화방지능 측정 결과는 Table 1과 같다. 백년초의 ABTS를 이용한 산화방지능은 381.2 mg VCE/100 g FW이었다(Table 1). 흰색, 노란색, 빨간색의 과육을 보이는 여러 품종의 *O. ficus indica*의 ABTS 라디칼 소거 산화방지능은 4.20-5.31  $\mu$ mol 트로록스 당량(Trolox equivalents, TE)/g이었다(25). 멕시코의 *O. ficus-indica* 품종인 Alfajayucan과 Pelon Rojo의 과육 부산물의 ABTS법을 이용한 산화방지능은 각각 66.3과 65.8  $\mu$ mol TE/g dry weight을 보였다(23). ABTS법에서 트로록스의 산화방지능은 바이타민 C 산화방지능의 대략 50-80%를 가졌다고 보고 되었다(17,26).

DPPH 라디칼을 이용한 산화방지능 측정에서는 298.2 mg VCE/100 g FW이었다(Table 1). DPPH법에 의한 산화방지능의 측정값이 ABTS법에 비해 낮게 나타난 것은 DPPH 산화방지능 측정 파장인 517 nm에서 백년초 추출물의 자주색 또는 붉은색을 띠는 베타시아닌(beta-cyanin)과 베타잔틴(beta-xanthin)으로 이루어진 베타레인(betalain)이 색 간섭으로 인하여 영향을 끼쳤기 때문인 것으로 생각된다(25).

ORAC법을 통한 산화방지능 측정에서는 3,219.9 mg VCE/100 g FW을 나타내었다. ORAC법을 통해 측정된 *O. ficus-indica* Pelón 품종으로 만든 주스의 산화방지능은 21.0 mmol TE/L juice 이었고(20), *O. ficus-indica* (green-skinned cactus pear)는 2.63 mmol TE/100 g FW의 산화방지능을 보였다(24).

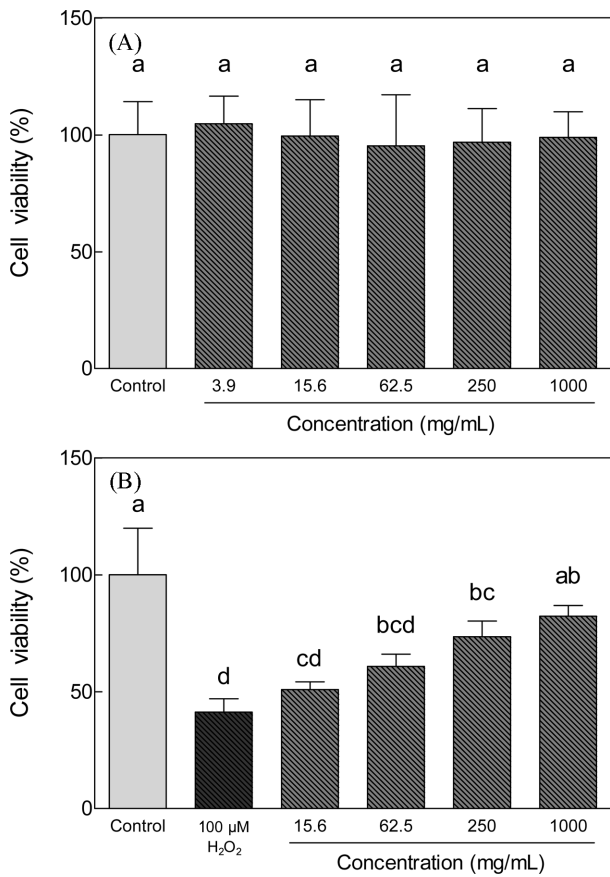
**Table 1. Total phenolic and flavonoid contents, and antioxidant capacity of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* ripe fruit**

Total phenolic content (mg gallic acid equivalents/ 100 g fresh)	Total flavonoid content (mg catechin equivalents/ 100 g fresh)	Antioxidant capacity (mg vitamin C equivalents/100 g fresh)		
		ABTS <sup>1)</sup>	DPPH <sup>2)</sup>	ORAC <sup>3)</sup>
409.9±30.1	72.2±3.2	381.2±53.6	298.2±22.5	3,219.9±346.5

<sup>1)</sup>2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging assay

<sup>2)</sup>2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay

<sup>3)</sup>Oxygen radical absorbance capacity assay



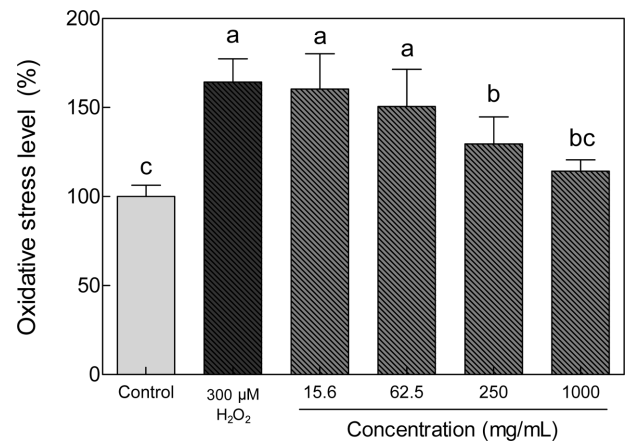
**Fig. 1.** Cytotoxicity (A) and protective effect (B) of 80% (v/v) aqueous ethanol extract of the *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* ripe fruits on neuronal PC-12 cells against oxidative stress induced with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using the MTT assay.

**신경세포 보호 효과**

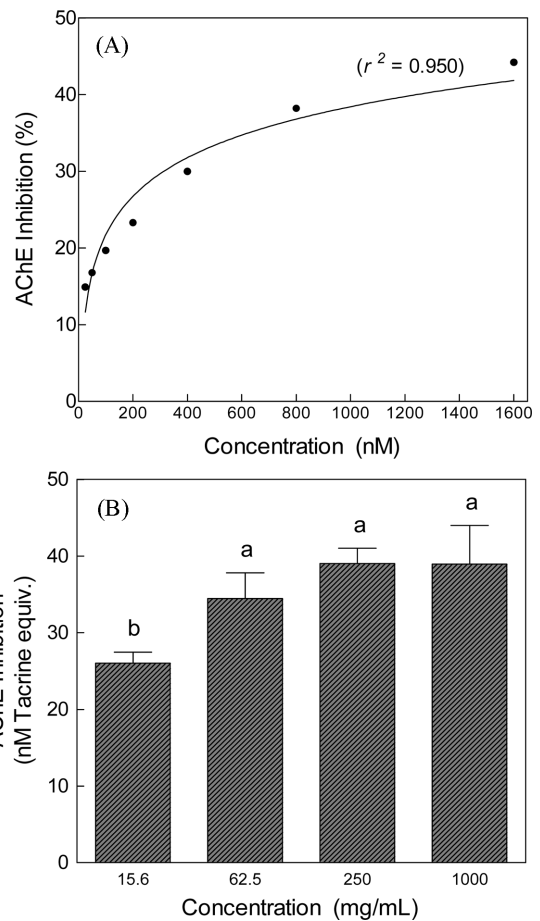
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산화 스트레스 하에서, 세포독성을 보이지 않는 백년초 추출물의 신경세포 PC-12 보호 효과를 MTT법을 이용하여 평가하였다(Fig. 1). 백년초 추출물은 1,000 mg/mL까지 세포독성을 보이지 않았다(Fig. 1A). 백년초 추출물을 처리하지 않고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 만을 처리한 산화 스트레스군의 PC-12 세포는 산화 스트레스를 주지 않은 대조군(control)에 비해 50% 이하의 생존율을 보였다(Fig. 1B). 백년초 추출물은 PC-12 신경세포의 생존율을 농도 의존적으로 증가시켰다(Fig. 1B). 산화방지능을 가진 체리 추출물에 의해 신경세포의 보호 효과가 보고(27)되었고, 제주산 백년초의 산화방지능이 높은 에틸아세테이트 분획물이 PC-12 신경세포 보호능을 보였다(28). 쥐의 수동회피시험(passive avoidance test)을 통해 실시한 실험에서는 *O. ficus-indica* 추출물이 손상된 기억력 회복에 효과적이었다고 보고 되었다(29). 이를 통해 백년초 내에는 페놀화합물 등의 생리활성물질이 산화방지제로 역할을 하기 때문에 신경세포를 보호할 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서 백년초 추출물의 세포 내 산화 스트레스에 대한 평가를 수행하였다.

**세포 내 산화 스트레스 완화**

백년초 추출물의 세포 내 산화 스트레스는 DCFH-DA법을 이용하여 세포 내 산화 스트레스의 완화를 평가한 결과는 Fig. 2와 같다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리시간 및 처리농도는 대조군과 비교하여 50%

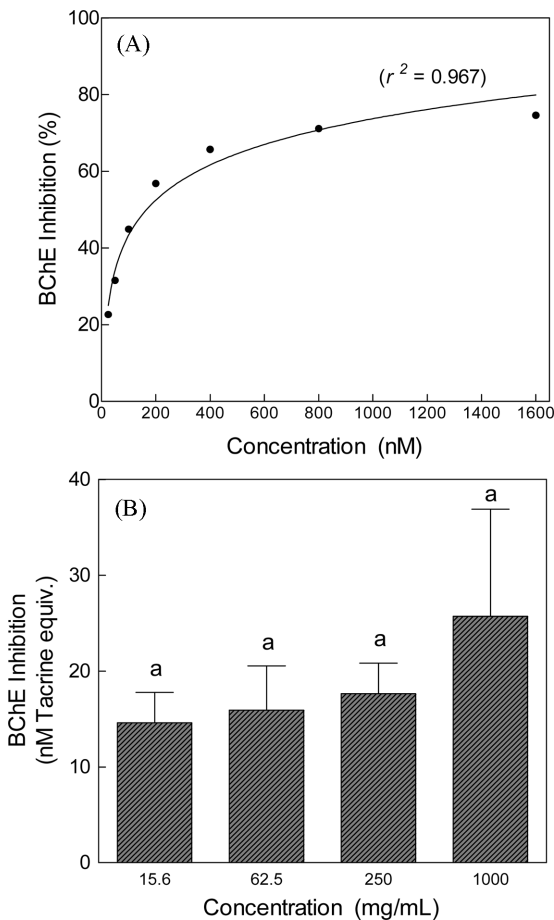


**Fig. 2.** Effect of 80% (v/v) aqueous ethanol extract of the *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* ripe fruits on intracellular oxidative stress in neuronal PC-12 cells using the DCFH-DA assay.



**Fig. 3.** Acetylcholinesterase inhibitory effects of tacrine (A) and 80% (v/v) aqueous ethanol extract of the *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* ripe fruits (B).

이내의 생존율을 보이는 농도와 시간으로 설정하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 통해 산화 스트레스를 가한 PC-12 세포군은 아무 처리를 하지 않은 대조군 대비 유의적으로 높은 약 160%의 산화 스트레스를 유발하였다. 하지만 농도 별로 백년초 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 세포 내 산화 스트레스를 감소시켰다. 1,000 mg/L 농도의 백년초 추출물 처리군에서는 대조군과 유의적 차이



**Fig. 4.** Butyrylcholinesterase inhibitory effects of tacrine (A) and 80% (v/v) aqueous ethanol extract of the *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* ripe fruits (B).

가 없는 세포 생존율을 보였다. 본 연구와 유사하게 PC-12 신경 세포 내 산화 스트레스가 제주산 백년초의 에틸아세테이트 분획 물에 의해서 농도 의존적으로 감소하였다(28). 백년초 과육에 존재하는 퀘세틴, 캄페롤 같은 생리활성물질(24,28)이 세포 안에서 산화방지제로 작용하여  $H_2O_2$ 에서 유래한 산화 스트레스로부터 PC-12 신경세포를 보호에 기여하는 것으로 여겨진다.

#### AChE 및 BChE 저해 활성

AChE는 뇌에 존재하는 주된 콜린가수분해 효소(cholinesterase)로서, 아세틸콜린을 콜린(choline)과 아세테이트(acetate)로 분해한다. 이로 인해 콜린 동작성 시냅스에서의 신경전달을 종결하는 역할을 한다. 이 때문에 알츠하이머형 치매 환자의 콜린성 신경 전달 결손을 막기 위한 AChE 억제제의 개발이 이루어지고 있다(30). AChE 기작에 문제를 일으키는 것으로 알려져 있는 살충제의 일종인 클로르피리포스(chlorpyrifos)와 백년초 추출물을 쥐에게 처리하여 백년초 추출물의 살충제에 대한 간 보호능을 알아본 연구(31) 등이 보고되었으나, 백년초 추출물의 AChE 저해능에 대한 연구는 미비한 실정이다.

AChE에 대한 타크린의 저해능 표준곡선은 Fig. 3A와 같으며  $r^2$  값은 0.950이었다(Fig. 3A). 백년초 추출물 처리 농도인 15.6, 62.5, 250, 1,000 mg/mL에서 Fig. 3A를 이용해 얻은 AChE 저해능은 각각 26.1, 34.5, 39.0, 39.3 nM 타크린 당량이었으며(Fig. 3B), 이는 백년초가 AChE 활성을 저해한다는 것을 의미한다.

AChE의 활성 증가와 마찬가지로 BChE 활성의 증가는 알츠하이머형 치매(Alzheimer's disease)의 주요한 특징 중의 하나이다(32). 백년초 추출물의 AChE 저해능 평가와 더불어 BChE 활성 저해를 평가하였다. 타크린의 BChE 저해능은 Fig. 4A와 같으며, 타크린 표준곡선은  $r^2=0.967$ 을 가졌다. 15.6, 62.5, 250, 1,000 mg/mL의 백년초 추출물 농도에서 BChE 저해능은 각각 14.6, 15.9, 17.6, 25.7 nM 타크린 당량에 해당하였다(Fig. 4B). 백년초 추출물이 AChE 활성을 저해하는 것과 마찬가지로 BChE를 저해하는 것으로 나타났다. 이는 백년초를 활용하여 신경전달물질인 아세틸콜린과 같은 콜린기반 에스테르(choline-based esters)를 분해하는 효소인 BChE와 AChE의 활성을 저해하는 억제제(inhibitor) 개발에 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

## 요 약

백년초를 80% (v/v) 에탄올-물 혼합용액으로 추출하여 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 산화방지능, 신경세포 보호효과, AChE 및 BChE 활성저해능을 평가하였다. 백년초 100 g FW당 총페놀 함량은 409.9 mg GAE, 총플라보노이드 함량은 72.2 mg CE이었다. 백년초(100 g FW)의 산화방지능은 ABTS, DPPH, ORAC법에서 각각 381.2, 298.2, 3,219.9 mg VCE였다. 백년초 추출물은  $H_2O_2$ 의 산화 스트레스로부터 세포 내 산화 스트레스를 감소시켜 신경세포 PC-12의 생존율을 농도의존적으로 증가시켰다. 또한, 백년초 추출물은 AChE 및 BChE 활성을 저해하였다. 본 연구 결과로부터 백년초의 세포 내 산화 스트레스 감소에 의한 신경 세포 보호능과 AChE 및 BChE 저해능이 확인 되었으며, 이러한 결과를 통해 향후 백년초를 이용한 기능성 제품 및 여러 가공품 개발에 활용이 가능할 것으로 기대한다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농생명산업기술개발사업(과제번호: 114076-3)에 의해 이루어진 것입니다.

## References

- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 5: 9-19 (2012)
- Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53(Suppl 3): S26-S38 (2003)
- Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 68: 2061-2069 (1997)
- Sayre LM, Smith MA, Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med. Chem.* 8: 721-738 (2001)
- Toshniwal PK, Zarling EJ. Evidence for increased lipid peroxidation in multiple sclerosis. *Neurochem. Res.* 17: 205-207 (1992)
- Andreadis AA, Hazen SL, Comhair SA, Erzurum SC. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic. Biol. Med.* 35: 213-225 (2003)
- Van Eeden SF, Sin DD. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: A lung and systemic process. *Can. Respir. J.* 20: 27-29 (2013)
- Halliwell B, Aeschbach R, Löiger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* 33: 601-617 (1995)
- El-Mostafa K, El Kharrassi Y, Badreddine A, Andreoletti P, Vamecq J, El Kebaj MS, Latruffe N, Lizard G, Nasser B, Cherkaoui-Malki M. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a

- source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules* 19: 14879-14901 (2014)
10. Cho IK, Seo KS, Kim YD. Antimicrobial activities, antioxidant effects, and total polyphenol contents of extracts of prickly pear, *Opuntia ficus indica*. *Korean J. Food Preserv.* 16: 953-958 (2009)
  11. Park EH, Chun MJ. Wound healing activity of *Opuntia ficus-indica*. *Fitoterapia* 72: 165-167 (2001)
  12. Seo KI, Yang KH, Shim KH. Antimicrobial and antioxidative activities of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* extracts. *Korean J. Food Preserv.* 6: 345-349 (1999)
  13. Seo YH. Dual effectiveness of *Opuntia ficus indica* extracts for enzymatic browning inhibition and microbial inactivation on fresh-cut apples. *J. Fd Hyg. Safety* 27: 401-405 (2012)
  14. Jin SK, Shin D, Hur IC. Effect of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* powder addition on quality characteristics of sausage. *J. Agr. Life Sci.* 45: 125-134 (2011)
  15. Singleton VL, Rossi JA, Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158 (1965)
  16. Kim D-O, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81: 321-326 (2003)
  17. Kim D-O, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agr. Food Chem.* 50: 3713-3717 (2002)
  18. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28: 25-30 (1995)
  19. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agr. Food Chem.* 50: 4437-4444 (2002)
  20. Chavez-Santoscoy RA, Gutierrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO. Phenolic composition, antioxidant capacity and *in vitro* cancer cell cytotoxicity of nine prickly pear (*Opuntia* spp.) juices. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64: 146-152 (2009)
  21. Lee JC, Kim HR, Kim J, Jang YS. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *J. Agr. Food Chem.* 50: 6490-6496 (2002)
  22. Jaramillo-Flores ME, González-Cruz L, Cornejo-Mazón M, Dorantes Álvarez L, Gutiérrez López GF, Hernández Sánchez H. Effect of thermal treatment on the antioxidant activity and content of carotenoids and phenolic compounds of cactus pear cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Food Sci. Technol. Int.* 9: 271-278 (2003)
  23. Bensadón S, Hervert-Hernández D, Sáyago-Ayerdi SG, Goñi I. By-products of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65: 210-216 (2010)
  24. Kuti JO. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chem.* 85: 527-533 (2004)
  25. Butera D, Tesoriere L, Di Gaudio F, Bongiorno A, Allegra M, Pintaudi AM, Kohen R, Livrea MA. Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. *J. Agr. Food Chem.* 50: 6895-6901 (2002)
  26. van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 66: 511-517 (1999)
  27. Kim D-O, Heo HJ, Kim YJ, Yang HS, Lee CY. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *J. Agr. Food Chem.* 53: 9921-9927 (2005)
  28. Son JE, Lee BH, Nam TG, Im S, Chung DK, Lee JM, Chun OK, Kim DO. Flavonols from the ripe fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* protect neuronal PC-12 cells against oxidative stress. *J. Food Biochem.* 38: 518-526 (2014)
  29. Kim JM, Kim DH, Park SJ, Park DH, Jung SY, Kim HJ, Lee YS, Jin C, Ryu JH. The *n*-butanolic extract of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* enhances long-term memory in the passive avoidance task in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34: 1011-1017 (2010)
  30. Mount C, Downton C. Alzheimer disease: Progress or profit? *Nat. Med.* 12: 780-784 (2006)
  31. Ncibi S, Othman MB, Akacha A, Krifi MN, Zourgui L. *Opuntia ficus indica* extract protects against chlorpyrifos-induced damage on mice liver. *Food Chem. Toxicol.* 46: 797-802 (2008)
  32. Szwajgier D, Borowiec K. Phenolic acids from malt are efficient acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *J. Inst. Brew.* 118: 40-48 (2012)