

녹차씨껍질 에탄올 추출물의 항산화 활성 및 신경세포 보호 효과

성낙윤^{1*} · 송하연^{1,4*} · 안동현² · 유영춘³ · 변의백⁴ · 장범수⁴ · 박철환⁵ · 박원종¹ · 변의홍¹

¹공주대학교 식품공학과, ²부경대학교 식품공학과/식품연구소
³건양대학교 의과대학 미생물학교실, ⁴한국원자력연구원
⁵광운대학교 화학공학과

Antioxidant and Neuroprotective Effects of Green Tea Seed Shell Ethanol Extracts

Nak-Yun Sung^{1*}, Hayeon Song^{1,4*}, Dong-Hyun Ahn², Yung-Choon Yoo³, Eui-Baek Byun⁴,
Beom-Su Jang⁴, Chulhwan Park⁵, Won-Jong Park¹, and Eui-Hong Byun¹

¹Department of Food Science and Technology, Kongju National University

²Department of Food Science and Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University

³Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University

⁴Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute

⁵Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University

ABSTRACT The objective of this study was to evaluate the antioxidant activity of green tea seed shell as an industrial byproduct. Green tea seed shell extract (GTSSE) was obtained by ethanol extraction, and the yield was 1.4±0.22%. The radical scavenging activities [1,1-diphenyl-picrylhydrazyl and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], xanthine oxidase inhibition activity, and reducing power of GTSSE dose-dependently increased. To estimate the neuroprotective effect of GTSSE, viability was tested in HT22 mouse hippocampal cells. GTSSE treatment induced cytotoxicity at a concentration higher than 100 µg/mL but not at a concentration lower than 50 µg/mL. Using this optimal concentration range, GTSSE treatment significantly increased cell viability in H₂O₂-treated HT22 cells. Further, GTSSE treatment increased superoxide dismutase activity and decreased the malonaldehyde level, a product of lipid peroxidation, in HT22 cells. Therefore, these results indicate that green tea seed shell extract may be useful for the development of antioxidant materials and have potential activity to prevent and treat neuro-degenerative diseases such as Alzheimer's disease.

Key words: anti-oxidant activity, green tea seed shell, HT22 hippocampal neuronal cells, cell viability, neuroprotective effect

서 론

생체 내에서 다양한 경로로 생성되는 superoxide radical (O²⁻), hydroxyl radical(HO·), hydrogen peroxide(H₂O₂), 일중항산소(¹O₂)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 생체에 치명적인 독성을 일으키며(1), 세포 구성성분인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대해 비선택적, 비가역적으로 손상을 초래하므로 암을 비롯한 뇌신경질환, 심장질환, 동맥경화, 염증, 류마티스, 자가면역질환 등의 각종 질병과 노화의 주원인으로 알려져 있다(2,3). 따라서 생체

내 활성산소 발생 억제를 위해 항산화 물질의 개발에 관한 연구들이 급격히 증가하고 있으며, 강력한 항산화 능력을 갖춘 butylated hydroxytoluene(BHT) 같은 합성 항산화제가 개발되었지만, 간 독성 등 다양한 부작용을 유발하여 이를 대체할 수 있는 식품 유래 천연 항산화제 개발이 절실히 요구되고 있는 추세이다(4).

녹차는 전 세계적으로 널리 이용되며, 주로 잎을 가공하여 기능성 식품과 음료, 화장품 등의 다양한 제품을 제조한다. 녹차의 폴리페놀 성분인 catechin에는 (-)-epicatechin(EC), (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epicatechin-3-gallate(EGCg), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 등이 있고 이 폴리페놀들은 항염증, 항암, 미백 등의 다양한 효과가 밝혀졌으며(5-7), 특히 이러한 녹차 catechin류는 blood-brain barrier를 통과하여 중추신경계의 대사 조절에도 관여한다고 밝혀졌다(8). 녹차 폴리페놀의 다양한 기능이 밝혀지면서 녹차는 단순한 기호식품이 아닌 건강 기능

Received 9 March 2016; Accepted 12 May 2016

Corresponding author: Eui-Hong Byun, Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan, Chungnam 32439, Korea

E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr, Phone: +82-41-330-1481

*These authors contributed equally to this work.

적인 면에서 우수성을 인정하는 기호음료로 소비형태가 전환되었고, 이에 따라 녹차에 대한 수요는 현재 꾸준히 증가하는 추세다. 하지만 녹차의 경우 나무에서 생산하는 어린잎의 경우에만 사람들이 주로 마시는 차의 형태로 가공되어 널리 이용되고 있으며, 녹차나무의 줄기 및 뿌리, 씨는 부산물로서 전량 폐기되는 것으로 알려져 있다. 녹차씨의 경우는 외피를 제거하고 오일을 추출하는 데 일부가 사용되는 것으로 알고 있으나, 현재까지 대량생산을 위한 산업적인 적용이 많이 이루어지지 않는 추세이다. 따라서 산업적인 부산물로서 이러한 외피 부분을 재활용한다면 그 경제적인 가치가 매우 클 것으로 생각하여(9) 본 연구에서는 녹차씨 외피 추출물의 생리활성에 관하여 알아보았다.

녹차 부산물의 부가가치를 높이기 위해 일부 연구가 진행되고 있다. 녹차는 잎 외에 녹차나무 뿌리와 씨에서도 다량의 폴리페놀이 있다고 보고되었으며(10), 녹차씨에서 추출한 오일은 모발손상 방지 효과가 있고(11), 녹차씨 외피 추출물은 미백 효과가 있으며 항염증 효과가 뛰어나다고 보고되었다(9,12). 하지만 녹차씨껍질 추출물의 항산화 활성 및 신경세포 보호 효과에 관한 연구는 전무후무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 녹차 재배 시 산업 부산물로 발생하는 녹차씨껍질의 이용성을 증대시키기 위하여 녹차씨껍질에 탄올 추출물의 항산화 활성 및 신경세포 보호 효과에 관하여 평가하였다.

재료 및 방법

녹차씨껍질 에탄올 추출물의 제조

본 실험에 사용된 녹차씨는 전라남도 보성군에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 녹차씨껍질은 녹차씨를 둘러싼 가장 바깥 부분의 껍질을 사용하였다. 분리된 녹차씨껍질을 증류수로 깨끗하게 세척한 후 25°C 상온에서 24시간 건조한 다음 실험용 분쇄기(NSG-100 2SS, Hanil, Seoul, Korea)를 이용하여 분쇄하였다. 녹차씨껍질 분말 100 g에 95% 에탄올 1 L를 넣고 상온에서 24시간 동안 교반하면서 추출하였다. 상등액을 Filter paper No. 4(Whatman®, Kent, UK)를 사용하여 감압 여과한 후 rotary evaporator(Heidolph Instruments, Schwabach, Germany)를 이용하여 농축한 다음 동결 건조하여 본 실험에 사용하였다. 추출물에 대한 추출 수율은 추출 전의 시료 무게에 대한 감압 농축 후 추출물 무게를 측정하여 나타내었다.

총폴리페놀 함량 분석

녹차씨껍질 추출물의 총폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법(13)을 일부 수정하여 분석하였다. 10 mg/mL 농도의 추출물 20 µL에 증류수 400 µL를 가한 다음, 2 N Folin-Ciocalteu phenol reagent(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 40 µL를 넣은 후 교반하였다. 이 용액에 20% Na₂CO₃ 400 µL를 가한 후 37°C에서 30분 동안 반응시킨

다음 microplate reader를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총폴리페놀 정량은 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 산출하였다.

총플라보노이드 함량 분석

녹차씨껍질 추출물의 총플라보노이드의 함량은 Davis 방법(14)을 일부 변형하여 분석하였다. 2 mg/mL 농도의 추출물 500 µL에 diethylene glycol(Sigma-Aldrich Co.) 5 mL와 1 N NaOH 500 µL를 혼합하여 37°C 항온수조에서 1시간 동안 반응시켰다. 흡광도의 변화는 microplate reader를 이용하여 420 nm에서 측정하였으며, 총플라보노이드 정량은 naringin(Sigma-Aldrich Co.)을 표준물질로 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 산출하였다.

DPPH 라디칼 소거능

녹차씨껍질 추출물의 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich Co.) 라디칼 소거능은 Blois 등(15)의 방법을 일부 수정하여 분석하였다. 메탄올에 용해된 0.1 mM의 DPPH 용액 100 µL에 농도별 녹차씨껍질 추출물(7.8, 15.6, 31.25, 62.5 및 125 µg/mL)을 첨가한 후 암실에서 30분간 반응시킨 다음 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank1}}}{A_{\text{blind}} - A_{\text{blank2}}}\right) \times 100$$

여기서 A_{sample}은 sample과 DPPH 반응용액의 흡광도를 의미하며, A_{blank1}은 sample의 단독 흡광도를 나타내고, A_{blind}는 DPPH 용액의 단독 흡광도를 나타내며, A_{blank2}는 공시료를 나타낸다.

ABTS 라디칼 소거능

녹차씨껍질 추출물의 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS, Sigma-Aldrich Co.) 라디칼 소거능은 Re 등(16)의 방법을 이용해서 측정하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate(Sigma-Aldrich Co.)을 24시간 동안 암소 방지하여 ABTS 라디칼을 형성시킨 후, 이 용액을 760 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL에 농도별로 제조한 시료(62.5, 125, 250, 500 및 1,000 µg/mL) 20 µL를 처리한 후 microplate reader를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{blind}}}\right) \times 100$$

여기서 A_{sample}은 sample과 ABTS 반응용액의 흡광도를 의미하며, A_{blind}는 ABTS 용액의 단독 흡광도를 나타낸다.

Xanthine oxidase 저해능 측정

Xanthine oxidase 저해능은 Stripe와 Della Corte(17)의 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 mL에 농도별(0.25, 0.5, 1 및 2 mg/mL) 녹차씨껍질 추출물 0.1 mL를 가하고, 1 mM xanthine(Sigma-Aldrich Co.)을 녹인 기질용액 0.2 mL를 첨가한다. 여기에 0.2 unit/mL의 xanthine oxidase 0.1 mL를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 1 N HCl 0.2 mL를 가하여 반응을 정지시킨 다음, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 단백질을 제거 후 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하였다.

$$\text{Xanthine oxidase inhibition activity (\%)} = \left(1 - \frac{A-B}{C}\right) \times 100$$

A: 시료와 효소 흡광도, B: 시료와 완충액 흡광도,
C: 공시료와 효소 반응액

환원력 측정

환원력은 Oyaizu(18)의 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 농도별(0.25, 0.5, 1 및 2 mg/mL) 녹차씨껍질 추출물 100 µL에 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.6) 100 µL 및 1% potassium ferricyanide(Sigma-Aldrich Co.) 100 µL를 각각 첨가하여 50°C 항온수조에서 20분 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid(Sigma-Aldrich Co.) 100 µL를 가하고 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 그 후 0.1% ferric chloride(Sigma-Aldrich Co.)를 20 µL 가하여 37°C 항온수조에서 20분 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 환원력을 측정하였다.

HT22 mouse hippocampal 세포배양

생쥐 해마 유래 HT22 cell line은 전북대학교 수의과대학에서 분양받아 사용하였으며, 10% fetal bovine serum과 penicillin, streptomycin(100 IU/mL, 100 µg/mL)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

HT22 세포생존율 평가

HT22 cell을 5×10⁴ cells/well씩 96 well plate(SPL, Pocheon, Korea)에 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시킨 후 농도별(6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL) 녹차씨껍질 추출물과 H₂O₂를 동시 처리하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건으로 12시간 동안 배양한 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.) 분석을 통해 세포독성을 산출하였다. MTT assay는 MTT 용액(5 mg/mL)을 30 µL씩 각각 well에 첨가하고 2시간 동안 배양한 후 배양 상등액을 제거하고 생성된 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich Co.)

에 녹여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 내 superoxide dismutase(SOD) activity 측정

녹차씨껍질 추출물이 미치는 SOD 활성은 SOD assay kit (Dojindo, Kyushu, Japan)을 이용하여 측정하였다. 6 well plate에 HT22 cell을 1×10⁶ cells/well로 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 6시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시킨 후 농도별(12.5, 25, 50 µg/mL) 녹차씨껍질 추출물과 H₂O₂를 동시 처리하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건으로 12시간 동안 배양한 후 cell lysis buffer(Cell Signaling, Danvers, MN, USA)를 첨가하여 ice에서 5분 반응시키고, sonication 시킨 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 cell lysate를 분리하였다. 분리된 cell lysate는 BCA protein detection kit(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)을 사용하여 1 mg/mL의 농도로 단백질을 정량하여 기질로 사용하였으며, 측정 과정은 제조자가 제시한 지침에 따라 진행하였다.

세포 내 malonaldehyde(MDA) level 측정

녹차씨껍질 추출물이 H₂O₂ 유도 독성으로부터 생성되는 HT22 세포에서의 MDA level을 평가하기 위해 MDA 586 kit(Oxis Research, Portland, OR, USA)을 이용하였다. 위의 1 mg/mL로 정량한 cell lysate를 이용하여 제조자가 제시한 지침에 따라 MDA level을 측정하였다.

통계처리

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences(SPSS, 10.0, IBM, Chicago, IL, USA)를 이용하여 one-way ANOVA test로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 *P*<0.05 수준에서 비교하였고, Student's *t*-test로 **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

추출 수율, 총플라보노이드 및 총폴리페놀 함량

녹차씨껍질의 항산화 활성에 관하여 알아보기 이전에 녹차씨껍질 에탄올 추출물 추출 수율에 관하여 평가해 보았다. 녹차씨로부터 껍질 부분을 분리하여 녹차씨껍질 100 g을 에탄올을 이용하여 24시간 동안 추출한 후, 회전식 감압 농축기로 농축하여 동결 건조한 다음 수율에 관하여 평가해 보았다(Table 1).

Table 1. Yield and total polyphenols and total flavonoids contents of green tea seed shell extract (GTSSE)

Measurement	GTSSE
Yield (g/g, %)	1.4±0.22
Total polyphenols (gallic acid, mg/g)	286.7±0.16
Total flavonoids (naringin, mg/g)	4.4±0.03

녹차에 일반적으로 널리 분포하는 대표적인 항산화 물질은 EGCG, EGC, ECG 등이 있으며, 그중 총폴리페놀 함량은 식품의 항산화력을 결정짓는 데 중요한 인자로 작용한다. 그중 green tea seed shell extract(GTSSE)에 함유된 폴리페놀양을 gallic acid equivalents/g으로 환산하여 표시한 결과 녹차씨껍질 추출물에 286.7±0.16 mg/g으로 관찰되었으며, 플라보노이드양을 naringin equivalents/g으로 환산하여 표시한 결과 4.4±0.03 mg/g으로 관찰되었다. Lim 등(19)의 연구에 의하면 녹차씨 메탄올 추출물의 catechin류 함량을 high pressure liquid chromatography(HPLC)로 분석한 결과, (-)-epicatechin gallate(ECG) 821±95 µg/g, gallate 112±72 µg/g, caffeine 155±42 µg/g, (-)-epigallocatechin(ECG) 116±72 µg/g, (-)-epigallocatechin gallate(EGCG) 108±32 µg/g, (-)-epicatechin(EC) 37±44 µg/g 등의 다양한 catechin이 검출되었다고 보고하고 있으며, 이와 유사하게 Noh 등(12)의 연구에서 녹차씨껍질 에틸아세테이트(EtOAC) 층에서도 녹차에서 발견되는 모든 종류의 catechin이 검출되었다고 보고하고 있다. 따라서 본 연구에서도 녹차씨껍질 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위하여 추출한 녹차씨껍질 에탄올 추출물도 이와 같은 다양한 녹차 catechin을 포함할 것으로 생각한다.

자유라디칼 소거 활성

DPPH는 생체 내에 존재하는 라디칼은 아니지만 그 자체가 홀수 전자를 갖고 있어 보라색을 나타내고 517 nm에서 강한 흡광도를 보이며, 항산화제와 반응하면 전자를 내어주거나 가져오면서 안정한 형태로 돌아가 색을 잃고 흡광도 값이 감소하게 된다. 이러한 라디칼의 성질을 이용하여 다양한 종류의 물질들에 대하여 항산화 활성을 평가할 수 있다. 본 연구에서도 녹차씨껍질로부터 추출한 GTSSE의 DPPH 라디칼 소거능에 관하여 알아본 결과, GTSSE의 농도(7.8, 15.6, 31.25, 62.5 및 125 µg/mL)가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거능이 유의적으로($P<0.05$) 증가하는 것으로 관찰되었다(Fig. 1A). 양성대조군인 ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거능 IC_{50} 은 4.30 µg/mL로 관찰되었으며, GTSSE의 IC_{50} 은 25.03 µg/mL로 관찰되었다(data not shown).

ABTS assay 또한 식품의 항산화 활성을 측정하는 데 널리 사용되는 방법으로, ABTS와 과황산칼륨을 혼합하여 암소에 두면 ABTS 양이온이 생성되는데 항산화 물질과 반응하여 특유의 청록색이 탈색되며 이의 흡광도를 측정하여 항산화 활성을 평가하는 방법으로, 시료 용해성에 상관없이 적용할 수 있는 장점이 있다(20). 본 실험에서 농도별로 제조한 GTSSE(62.5, 125, 250, 500 및 1,000 µg/mL)의 ABTS 라디칼 소거능에 대해 조사한 결과, 시료의 ABTS 라디칼 소거 활성이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 관찰되었다(Fig. 1B). 양성대조군인 ascorbic acid의 ABTS 라디칼 소거능 IC_{50} 은 2.36 µg/mL로 관찰되었으며, GTSSE의 IC_{50} 은 157.27 µg/mL로 관찰되었다. 녹차에 함유된 대표적인 생리

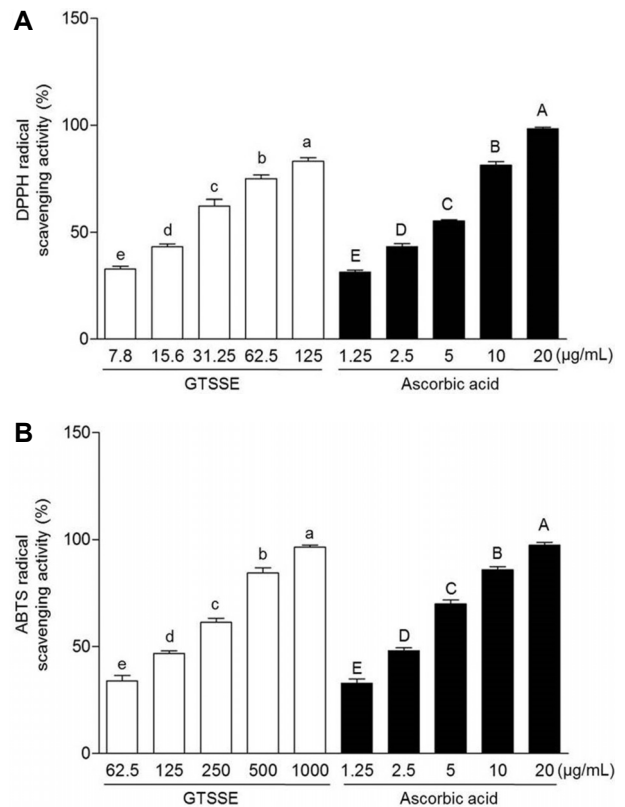


Fig. 1. DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activities of green tea seed shell extract (GTSSE). Results were expressed the radical scavenging activities as inhibition percent. The data represent the mean±SD (n=3). Values with different letters (a-e, A-E) are significantly different ($P<0.05$).

활성 물질인 catechin류는 녹차 전체의 총폴리페놀 화합물의 75% 이상을 차지하며, 주요 catechin류로는 EC, ECG, EGC, EGCG, gallocatechin(GC) 등이 있고 그밖에 caffeine 성분도 다수 포함한다고 보고되었다(21). 극성 용매에 의해 추출된 녹차의 catechin 성분은 강력한 항산화 능력을 갖는 것으로 밝혀지고 있는데, 특히 녹차의 다양한 catechin류 중에서 EGCG의 다양한 약리적 효능이 밝혀졌으며 항산화 효과 또한 높은 것으로 보고되었다(22,23). 따라서 본 연구에서 녹차씨껍질 에탄올 추출물의 라디칼 소거능이 증가한 것은 녹차씨껍질 추출물 내의 다양한 유효성분의 영향에 따른 것이라 생각한다.

Xanthine oxidase 저해능

Xanthine oxidase는 hypoxanthine을 산화시켜 xanthine으로 만들고, 이를 다시 산화시켜 superoxide와 uric acid를 생성시킨다. 따라서 xanthine oxidase를 억제한다면 요산과 초과산화물 등의 생성으로 인한 통풍과 고요산혈증 같은 질환 치료에 유용하게 사용될 수 있으므로 xanthine oxidase 저해능이 큰 물질일수록 그 이용가치가 크다고 할 수 있다(24). 본 실험에서 농도별로 제조한 GTSSE(0.25, 0.5, 1 및 2 mg/mL)의 xanthine oxidase 저해능에 대해 조사

한 결과, 시료의 xanthine oxidase 저해능이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 관찰되었다(Fig. 2A). Xanthine oxidase 저해작용을 가지는 대표적인 물질로는 flavonoid류가 있으며, 이들 중 녹차에 다량 함유된 EC, EGC, ECG 등의 물질들이 기전의 연구에서 xanthine oxidase 저해 활성이 높게 유지되는 것으로 보고되고 있다(25). 따라서 본 연구에서 녹차씨껍질 에탄올 추출물의 xanthine oxidase 저해능은 녹차씨껍질 추출물 내의 catechin 성분인 EC, EGC, ECG 등의 물질이 다량 함유되었기 때문으로 생각한다(12).

환원력 측정

환원력의 측정은 시료가 Fe^{+3} 이온을 Fe^{+2} 로 환원시키는 능력이 강할수록 진한 녹색에 가깝게 발색되어 높은 흡광도 값을 나타내는 비색법의 원리를 응용하여 측정하였다(26). 환원력이 클수록 과산화 지질 및 활성산소를 제거하여 성인병을 예방하는 효과가 있으므로 환원력을 유지하는 능력이 큰 물질일수록 그 이용가치가 크다(27). 본 실험에서 농도별로 제조한 GTSSE(0.25, 0.5, 1 및 2 mg/mL)의 환원력을 조사한 결과, GTSSE는 농도 의존적으로 환원력을 증가시키는 것으로 관찰되었으며(Fig. 2B), 이는 녹차씨껍질 추출물에 다량 함유된 유용한 성분인 폴리페놀과 플라보노이드 성분과 관계가 있다고 생각한다. 기존 연구에 의하면 폴리페

놀 및 플라보노이드 함량은 다양한 항산화 실험 중 DPPH 라디칼 소거 활성, ABTS 라디칼 소거 활성 및 환원력과 밀접한 관계를 갖고 있다고 보고하였다(28).

GTSSE의 세포 보호 효과

GTSSE가 생쥐 유래 해마세포의 세포독성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 HT22 cell에 농도별 GTSSE를 처리하여 GTSSE에 대한 세포생존율을 MTT 방법을 통하여 평가하였다(Fig. 3A). GTSSE를 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때 100 μ g/mL의 농도에서는 세포독성이 나타났으며, 그 이하의 농도에서는 농도 의존적으로 세포생존율이 증가하는 것으로 관찰되었다. 따라서 GTSSE가 6.25~50 μ g/mL의 농도에서 H_2O_2 로 유도된 산화 독성으로부터 세포를 보호하는지 평가하였다(Fig. 3B). 그 결과 GTSSE의 처리는 농도 의존적으로 H_2O_2 가 유도하는 산화 독성으로부터 세포를 보호하는 효과가 관찰되었다. 신경세포에서의 ROS의 과발현은 DNA 파괴, 변형과 같은 세포 손상을 유발해 세포자살을 일으키며, 결과적으로 알츠하이머, 파킨슨병과 같은 질환을 초래하게 된다(29). 따라서 최근 산화적 스트레스에 의한 세포자살로부터 세포를 보호하는 식물 유래의 천연 물질을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고

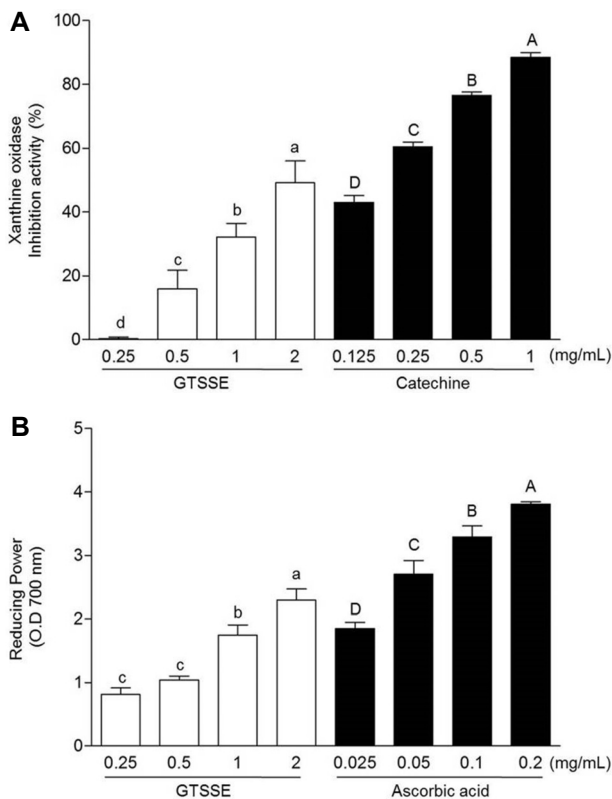


Fig. 2. Xanthine oxidase inhibition activities (A) and reducing power (B) of green tea seed shell extract (GTSSE). Results were expressed the radical scavenging activities as inhibition percent. The data represent the mean \pm SD (n=3). Values with different letters (a-d, A-D) are significantly different ($P<0.05$).

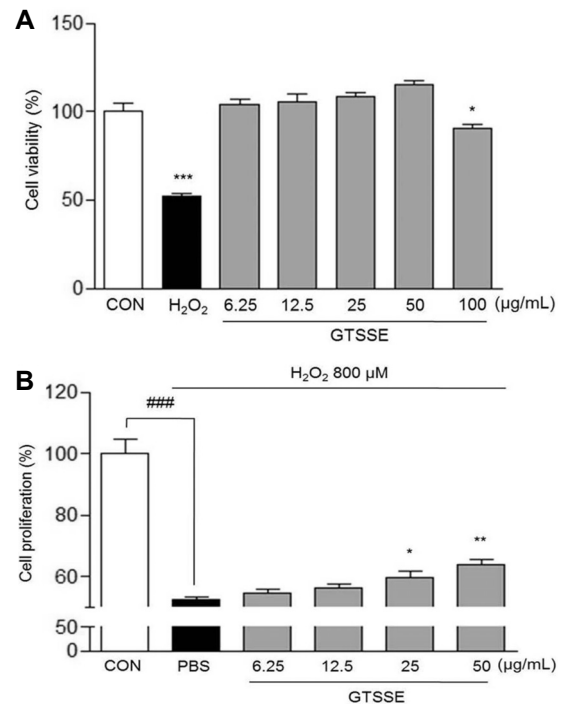


Fig. 3. Effect of green tea seed shell extract (GTSSE) on proliferation of HT22 mouse hippocampal cells. Cell viability was measured in indicated doses (A). The data represent the mean \pm SD (n=3). Statistical analysis was performed by unpaired Student's t -test within $^*P<0.05$, $^{***}P<0.001$ when compared to the control group (CON). Inhibitory effects of GTSSE (6.25~50 μ g/mL) in H_2O_2 (800 μ M)-induced cell death was analyzed by MTT assay. The data represent the mean \pm SD (n=3). Statistical analysis was performed by unpaired Student's t -test within $^{###}P<0.001$ vs control group and $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs PBS group.

있다. 녹차의 카테킨 성분은 ROS로 유도된 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호한다고 밝혀졌으며(30), 본 연구에서 녹차씨껍질 추출물의 신경세포 보호 효과는 녹차잎뿐만 아니라 녹차씨껍질 추출물에도 풍부하게 함유된 카테킨 성분에 의한 것으로 생각한다.

세포 내 SOD 활성

항산화 효소인 SOD는 체내에서 세포 내 과잉으로 생성되는 자유라디칼을 제거하는 데 기여하며, NADPH oxidase에 의해 생성된 산소 음이온을 H₂O₂로 전환하고 이는 catalase 활성에 의해 H₂O로 분해된다. 따라서 신경세포에서 SOD 활성 저하는 세포독성으로 이어지고, 이는 알츠하이머, 파킨슨병과 같은 뇌질환을 일으킨다(31). 본 실험에서 GTSSE가 과산화수소 유도 독성으로부터 세포를 보호하는 것이 세포 내 SOD 활성 증가에 따른 것인지 평가하였다(Fig. 4A). GTSSE를 12.5, 25, 50 µg/mL의 농도로 처리한 후 바로 H₂O₂를 처리하여 세포독성을 유도한 다음 세포 내 SOD 활성을 측정해 본 결과, 농도 의존적으로 세포 내 SOD 활성을 증가시켰다(Fig. 4A). 기존 연구에 따르면 녹차 폴리페놀이 신경세포에서 항산화 효소 활성을 증가시켜 파킨슨병이나 알츠하이머 같은 뇌질환을 예방한다고 보고하였다(32). 따라서 GTSSE의 신경세포 보호 효과는 GTSSE에 함

유된 녹차 폴리페놀에 의해 세포 내 항산화 효소 활성의 증가에 의한 것으로 생각한다.

세포 내 MDA level 측정

뇌를 구성하는 신경세포는 불포화지방산을 다량 함유하고 있으므로 자유라디칼과 ROS에 의한 지질과산화 반응은 신경세포막 손상에 치명적이다(33). 세포막을 구성하는 지질의 산화는 세포막의 경도를 증가시키며, 세포막 결합효소와 세포막 수용체의 손상을 일으키고 변형시켜 투과성 및 활성을 저하한다(34). 따라서 지질과산화 생성물인 MDA는 알츠하이머나 파킨슨병을 포함한 뇌질환 연구에서 신경세포의 지질과산화의 정도를 측정하는 지표로 널리 사용된다(35). 본 실험에서 GTSSE가 과산화수소로 유도되는 MDA를 억제하는지 평가하였다(Fig. 4B). GTSSE를 12.5, 25, 50 µg/mL의 농도로 처리한 후 바로 H₂O₂를 처리하여 세포독성을 유도한 다음 MDA level을 측정해 본 결과, 농도 의존적으로 MDA level을 감소시켰다. 이전 연구에 의하면 MDA의 생성은 세포 내 SOD나 catalase 등과 같은 항산화 효소에 의해 억제되며(36), 녹차 폴리페놀이 생쥐 해마세포의 산화적 스트레스로부터 MDA 생성을 억제해 신경세포 보호 효과가 있다고 보고되었다(37). 따라서 GTSSE의 세포 내 MDA level 감소 효과는 GTSSE가 함유한 녹차 폴리페놀에 의해 항산화 효소 활성의 증가에 의한 것으로 생각한다.

요 약

본 연구는 산업 부산물의 이용성 증진을 위하여 폐자원인 녹차씨껍질 추출물의 항산화 활성 및 신경세포 보호 효과에 관하여 평가하였다. 녹차씨껍질로부터 유용성 성분을 얻기 위하여 에탄올 추출을 한 결과 약 1.44%의 추출물의 수율을 얻을 수 있었고, 항산화 활성에 관하여 평가하기 위하여 라디칼 소거능 및 xanthine oxidase 저해능, 환원력을 평가한 결과, 녹차씨껍질 추출물의 농도가 증가할수록 항산화 활성이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 이러한 녹차씨껍질 추출물의 뇌신경세포 보호 효과에 관하여 알아보기 위하여 생쥐의 해마 유래 뇌신경세포에 녹차씨껍질 추출물을 처리한 후 H₂O₂로 산화적인 스트레스를 유도하여 세포독성에 관하여 알아본 결과, 녹차씨껍질 추출물의 처리는 농도 의존적으로 뇌신경 세포의 생존율을 증가시켰으며, 이에 따라 항산화 효소인 SOD 활성이 증가하고 지질과산화 생성물인 MDA level이 감소한 것을 알 수 있었다. 이상의 결과들로 녹차씨껍질 추출물의 항산화 활성 및 뇌신경세포 보호 효과에 관하여 확인할 수 있었으며, 추후 어떤 메커니즘으로 신경세포를 보호하는지 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다. 또한, 이러한 결과를 활용하여 녹차씨껍질을 기능성 소재로 활용한다면 폐자원인 녹차씨껍질을 재활용하는 차원에서 그 경제적 가치가 매우 클 것으로 생각한다.

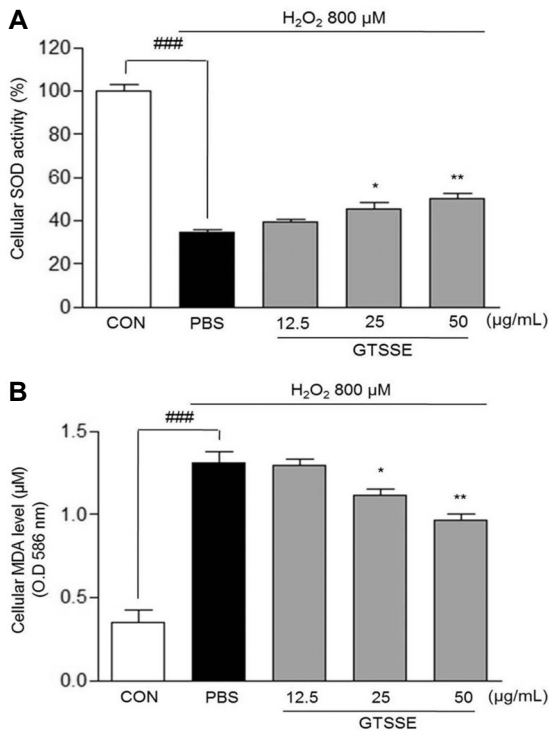


Fig. 4. Effect of green tea seed shell extract (GTSSE) of cellular SOD activity (A) and cellular MDA level (B) on HT22 mouse hippocampal cells. The cellular SOD activity and cellular MDA level were measured in indicated doses. The data represent the mean±SD (n=3). Statistical analysis was performed by unpaired Student's *t*-test within ^{###}*P*<0.001 vs control group and **P*<0.05, ***P*<0.01 when compared to the PBS group.

감사의 글

본 연구는 미래창조과학부에서 시행하는 방사선기술개발사업(NRF-2012M2A2A6011335)의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12: 913-922.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
- McBride TJ, Preston BD, Loeb LA. 1991. Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry* 30: 207-213.
- Joo HY, Lim KT. 2009. Protective effect of glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* on liver in CCl₄-treated A/J mice. *Korean J Food Sci Technol* 41: 93-99.
- Lin YL, Lin JK. 1997. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B. *Mol Pharmacol* 52: 465-472.
- An BJ, Kwak JH, Son JH, Park JM, Lee JY, Park TS, Kim SY, Kim YS, Jo C, Byun MW. 2005. Physiological activity of irradiated green tea polyphenol on the human skin. *Am J Chin Med* 33: 535-546.
- Hibasami H, Komiya T, Achiwa Y, Ohnishi K, Kojima T, Nakanishi K, Akashi K, Hara Y. 1998. Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. *Oncol Rep* 5: 527-529.
- Faria A, Pestana D, Teixeira D, Couraud PO, Romero I, Weksler B, de Freitas V, Mateus N, Calhau C. 2011. Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier. *Food Funct* 2: 39-44.
- Song HY, Sung NY, Jung PM, Kang MS, Park WJ, Byun EH. 2015. Whitening effect of green tea seed shell ethanol extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1470-1475.
- Cha WS, Cho MJ, Ding JL, Shin HJ. 2008. Nutritional component analysis of green tea tree's root and seed. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 387-391.
- Min MJ, Choi MH, Kim GC, Shin HJ. 2013. Damage prevention effect of green tea seed oil on colored and decolorated hair. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 28: 287-294.
- Noh KH, Jang JH, Min KH, Chinzorig R, Lee MO, Song YS. 2011. Suppressive effect of green tea seed coat ethyl acetate fraction on inflammation and its mechanism in RAW 264.7 macrophage cell. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 625-634.
- Appel HM, Govenor HL, D'Ascenzo M, Siska E, Schultz JC. 2001. Limitations of Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. *J Chem Ecol* 27: 761-778.
- Davis WB. 1947. Determination of flavanones in citrus fruits. *Anal Chem* 19: 476-478.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
- Stirpe F, Della Corte E. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem* 244: 3855-3863.
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44: 307-315.
- Lim HA, Jang CH, Kim JH, Kim JR, Ha YR, Song YS, Kim YK, Kim JS. 2006. Anti proliferative and anticarcinogenic enzyme-inducing activities of green tea seed extract in hepatoma cells. *Food Sci Biotechnol* 15: 914-919.
- Yoo KM, Kim DO, Lee CY. 2007. Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci Biotechnol* 16: 177-182.
- Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. 1997. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 89: 1881-1886.
- Choi OJ, Choi KH. 2003. The physicochemical properties of Korean wild teas (green tea, semi-fermented tea, and black tea) according to degree of fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 356-362.
- Kinlen LJ, Willows AN, Goldblatt P, Yudkin J. 1988. Tea consumption and cancer. *Br J Cancer* 58: 397-401.
- Chiang HC, Chen YY. 1993. Xanthine oxidase inhibitors from the roots of eggplant (*Solanum melongena* L.). *J Enzyme Inhib* 7: 225-235.
- Aucamp J, Gaspar A, Hara Y, Apostolides Z. 1997. Inhibition of xanthine oxidase by catechins from tea (*Camellia sinensis*). *Anticancer Res* 17: 4381-4385.
- Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeon BT. 2011. Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Helianthus tuberosus* L. leaves on *t*-BHP induced oxidative stress in Chang cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1525-1531.
- Choi Y, Jeong HS, Lee J. 2007. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chem* 103: 130-138.
- Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. 2000. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* 28: 1387-1404.
- Rao KS. 2009. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian J Biochem Biophys* 46: 9-15.
- Mandel SA, Avramovich-Tirosh Y, Reznichenko L, Zheng H, Weinreb O, Amit T, Youdim MBH. 2005. Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. *Neurosignals* 14: 46-60.
- Zemlan FP, Thienhaus OJ, Bosmann HB. 1989. Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical filament formation. *Brain Res* 476: 160-162.
- Weinreb O, Amit T, Mandel S, Youdim MBH. 2009. Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neurotogenic properties. *Genes Nutr* 4: 283-296.
- Morrow JD, Awad JA, Kato T, Takahashi K, Badr KF, Roberts LJ 2nd, Burk RF. 1992. Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. *J Clin Invest* 90: 2502-2507.
- Anzai K, Ogawa K, Goto Y, Senzaki Y, Ozawa T, Yamamoto H. 1999. Oxidation-dependent changes in the stability and permeability of lipid bilayers. *Antioxid Redox Signal* 1: 339-347.
- Bermejo P, Gómez-Serranillos P, Santos J, Pastor E, Gil P,

- Martín-Aragón S. 1997. Determination of malonaldehyde in Alzheimer's disease: a comparative study of high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid test. *Gerontology* 43: 218-222.
36. İnal ME, Kanbak G, Sunal E. 2001. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta* 305: 75-80.
37. Choi YT, Jung CH, Lee SR, Bae JH, Baek WK, Suh MH, Park J, Park CW, Suh SI. 2001. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates β -amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life Sci* 70: 603-614.