

금 나노입자를 처리한 홍삼의 산화스트레스 완화 및 PC-12 신경세포 보호

김지원^{1,2} · 조치홍^{1,2} · 황운구³ · 박우정⁴ · 강 희⁵ · 김대옥^{1,2,*}

¹경희대학교 식품생명공학과, ²경희대학교 피부생명공학센터, ³(주)에스엠나노바이오,
⁴강릉원주대학교 해양식품공학과, ⁵경희대학교 동서의학대학원

Protective effects of red ginseng treated with gold nanoparticles against H₂O₂-induced oxidative stress in neuronal PC-12 cells

Ji Won Kim^{1,2}, Chi Heung Cho^{1,2}, Yun-Gu Hwang³, Woo Jung Park⁴, Hee Kang⁵, and Dae-Ok Kim^{1,2,*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University

²Skin Biotechnology Center, Kyung Hee University

³SMNANO BIO Co., Ltd.

⁴Department of Marine Food Science and Technology, Gangneung-Wonju National University

⁵Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

Abstract Red ginseng prepared from fresh 6-year-old ginseng treated with colloidal gold nanoparticles was extracted using hot water to evaluate its total phenolic and flavonoid contents, antioxidant capacity, and neuroprotective effects. Water extract of red ginseng treated with gold nanoparticles (WERGGN) had total phenolic and total flavonoid contents of 212.2 mg gallic acid equivalents/^oBx and 3.5 mg catechin equivalents/^oBx, respectively. The antioxidant capacities of WERGGN measured using ABTS, DPPH, and ORAC assays were 272.3, 141.2, and 868.4 mg vitamin C equivalents/^oBx, respectively. The WERGGN showed protective effects on the viability of neuron-like PC-12 cells against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in a dose-dependent manner, partly because of a reduction in intracellular oxidative stress. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, which degrade the neurotransmitter acetylcholine to terminate neurotransmission, were inhibited by treatment with WERGGN. These results suggest that WERGGN is useful as a functional material to decrease oxidative stress and neuronal damage.

Keywords: acetylcholinesterase, antioxidant capacity, butyrylcholinesterase, colloidal gold nanoparticles, red ginseng

서 론

치매(dementia)는 인지기능의 장애와 더불어 수반되는 기억력, 언어능력, 판단력, 수행능력 등의 기능 저하로 일상 생활을 스스로 유지하지 못하는 상태이다. 2010년도에 세계적으로 치매를 앓고 있는 사람은 약 35.6백만명으로 추산되고 있다(1). 전세계 치매환자의 숫자는 꾸준히 증가하는 추세이며, 2050년에는 치매환자가 1억 명 이상으로 늘어날 것으로 예측된다(1). 알츠하이머형 치매(Alzheimer's disease)는 전체 치매질환의 약 50-70%를 차지하며, 신경세포 사멸로 인지기능과 기억력 저하를 동반한다. 퇴행성 신경질환인 알츠하이머형 치매는 연령이 증가할수록 발병률이 더 높아지는 것으로 알려져 있다(2). 기억과 학습에 있어 중요한 신경전달물질(neurotransmitter)인 아세틸콜린(acetylcholine)은 연접(synapse)에서 콜린가수분해효소(cholinesterase)에 의해 콜린

(choline)과 아세테이트(acetate)로 가수분해된 후 신경 신호 전달은 종결된다. 알츠하이머형 치매의 경우 연접 내에서 콜린가수분해효소의 활성을 억제하고 아세틸콜린의 분해를 저하시켜, 신경전달물질로서의 작용을 지속시킬 필요가 있다. 알츠하이머형 치매로 유발되는 인지기능저하, 우울정서, 수행능력저하 등을 개선하고자, 식물체와 같은 천연소재로부터 콜린가수분해효소의 활성을 억제하는 억제제(inhibitor)의 발굴 및 개발하는 연구들이 진행되어 왔다(2,3).

홍삼(red ginseng)은 수삼(fresh ginseng)을 증기로 찌서 건조시켜 제조하며 장기 보관이 가능한 가열처리 가공제품이다. 수삼을 증숙 및 건조하는 열처리 과정에서 인삼의 주요한 생리활성성분인 진세노사이드(ginsenoside)의 함량 변화와 새로운 진세노사이드가 형성되는 것으로 알려졌다(4,5). 진세노사이드 이외에 인삼에는 페놀산(phenolic acids), 플라보노이드(flavonoids) 등의 산화방지능을 보이는 생리활성물질이 존재한다(6,7). 인삼의 생리활성성분인 진세노사이드와 페놀화합물(phenolics)은 산화방지능, 항염증, 심혈관계 위험인자 개선, 신경세포보호 등의 건강증진 효능을 보인다(8-11). 성인 남성이 홍삼을 8주간 섭취시, 산화방지 효소 활성 증가와 더불어 산화된 저밀도지방질단백질(oxidized low-density lipoprotein) 및 말론다이알데하이드(malondialdehyde)의 농도가 대조군 대비 감소한다고 보고되었다(12). 진세노사이드 Rb1과 Rg1을 쥐 복강에 투여시, 해마(hippocampus) 내에서 시냅토파

*Corresponding author: Dae-Ok Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 17104, Korea
Tel: +82-31-201-3796
Fax: +82-31-204-8116
E-mail: DOKIM05@khu.ac.kr
Received November 11, 2016; revised February 1, 2017;
accepted February 3, 2017

이신(synaptophysin)을 증가시켜 공간학습 능력을 향상시킨다고 보고되고 있다(13).

금재(gold ash)는 8세기부터 인도에서 기억력 감퇴, 시력손상, 불임, 조기노화, 무기력증과 같은 증상에 사용한 것으로 알려졌다(14). 본 연구에 사용한 금 나노입자 콜로이드(colloidal gold nanoparticles, 이하 금 나노입자)를 장세포에 24시간 노출과 2주간 경구투여시 Sprague Dawley 쥐에서 독성을 나타내지 않았다(15). 그러나, 금 나노입자는 세포 및 동물 실험에서 유전적 변이, 산화방지능 효소 변이, 조직 이상 등의 독성이 보고되고 있다(16,17). 금이 주성분인 금재를 투여한 동물 실험에서 산화방지에 관여하는 초과산화물 제거효소(superoxide dismutase)와 카탈라아제(catalase) 활성이 증가하였다(14). 백금 나노입자는 자유라디칼을 소거하고 지방산화를 억제하였고(18), 사포닌-백금 나노결합체는 RAW 264.7 세포에서 활성산소 소거하는 산화방지제로 작용하는 것으로 보고된다(19).

현재까지 홍삼과 금재를 이용한 다양한 생리활성에 관한 연구는 활발히 이루어지고 있음에도 불구하고, 금 나노입자 용액을 인삼에 시비하여 재배한 응용 연구는 전무하다. 따라서, 본 연구에서는 금 나노입자 용액을 시비하여 재배한 6년근 인삼을 홍삼으로 제조하여, 황금홍삼 열수 추출물의 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량 및 산화방지능을 정량적으로 분석하였다. 또한 PC-12 신경세포를 이용하여 황금홍삼 추출물이 산화스트레스(oxidative stress)로부터 신경세포 보호능을 평가하고, 신경전달물질인 아세틸콜린의 가수분해에 관여하는 아세틸콜린가수분해효소(acetylcholinesterase, AChE) 및 부틸콜린가수분해효소(butyrylcholinesterase, BChE)의 활성 억제능을 측정함으로써 황금홍삼 추출물의 인지기능 개선 소재로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

폴린-시오칼토페놀 시약(Folin & Ciocalteu's phenol reagent), ABTS, DPPH, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), 비타민 C, 과산화수소, 갈산(gallic acid), 카테킨(catechin), 다이메틸 설펝사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), MTT, 플루오레세인소듐염(fluorescein sodium salt), 아세틸콜린가수분해효소, 부틸콜린가수분해효소, 아이오딘화 아세틸콜린(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), 구연산나트륨(sodium citrate), 구연산 일수화물(citric acid monohydrate), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone; 분자량 29,000 g/mol)은 Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지, 우테아 혈청(fatal bovine serum, FBS), Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin)은 Welgene Inc. (Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

금 나노입자(gold nanoparticle) 콜로이드 제조

금 나노입자 콜로이드는 (주)에스엠나노바이오(Daejeon, Korea)에서 다음과 같이 전기분해법(electrolysis method)을 이용하여 제조하였다(9). 20 mm 간격이 떨어진 두 개의 순금판(5 cm×10 cm×2 cm)을 전극으로 사용하고, 전해질(electrolyte)은 증류수에 20 mM 구연산나트륨, 10 mM 구연산 일수화물, 0.01% 폴리비닐피

롤리돈을 녹여 만들었다. pH 6.5-7.5, 전해질 온도 80-90°C, 전류 20-30 A에서 30분간 반응시킨 후에 5-15 nm의 범위의 금 나노입자 콜로이드 용액을 얻었다.

홍삼 농축액 제조

금 나노입자 용액을 성장하고 있는 6년근 인삼에 2014년 8월부터 10월까지 2주 간격으로 3차례 직접 시비해서 금 나노입자가 전이된 인삼(이하 황금인삼)을 홍삼 농축액 제조를 위해서 사용하였다. 충청남도 공주시에서 수확한 인삼을 물 분사 방법으로 수세 및 세척하고, 95°C에서 3시간 증숙 후, 열풍순환건조기(HB-502M, Hanbaek, Co., Ltd., Bucheon, Korea)로 60°C에서 1주 동안 1차 건조하고, 40°C에서 2주 동안 2차 건조를 실시하였다. 홍삼 추출은 추출기(HD-RG 20000N, Habdong Machinery Co., Anyang, Korea)에 건조 홍삼뿌리 500 g과 증류수(distilled water) 10 L를 넣고 96°C에서 24시간 동안 추출하였다.

총페놀 함량 측정

황금홍삼 추출물의 총페놀 함량은 폴린-시오칼토페놀 시약을 이용한 발색법(20)으로 측정하였다. 시료 200 µL에 증류수 2.6 mL와 폴린-시오칼토페놀 시약 200 µL를 첨가하고 6분 후에 7% (w/v) 탄산소듐(Na₂CO₃)용액을 2 mL를 첨가하고, 이후 84분 더 정치시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 황금홍삼 추출물(1°Bx)의 총페놀 함량은 표준물질로 갈산을 사용하여 표준곡선(standard curve)을 작성한 후 정량 측정하였으며, mg 갈산 당량(gallic acid equivalents, GAE)/°Bx로 나타내었다.

총플라보노이드 함량 측정

총플라보노이드 함량은 Kim 등(21)의 방법을 사용하여 측정하였다. 총플라보노이드 함량은 황금홍삼 추출물 0.5 mL, 증류수 3.2 mL, 5% (w/v) 아질산소듐(NaNO₂) 150 µL를 혼합하여 5분간 반응시킨 뒤 10% (w/v) 염화알루미늄(AlCl₃) 용액을 첨가하여 1분간 더 반응시키고, 1 M 수산화소듐(NaOH)을 넣고 혼합하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 황금홍삼 추출물(1°Bx)의 총플라보노이드 함량은 표준물질로 카테킨을 이용하여 표준곡선을 작성한 후 정량 측정하였으며, mg 카테킨 당량(catechin equivalents, CE)/°Bx로 나타내었다.

산화방지능 측정

산화방지능은 ABTS, DPPH 및 ORAC 법을 이용하여 측정하였다. DPPH 라디칼을 이용한 산화방지능은 Brand-Williams 등(22)의 방법을 변형하여 측정하였다. 80% (v/v) 메탄올-물 혼합용액을 사용하여 100 µM의 DPPH 라디칼 용액을 제조한 후, 517 nm에서 0.650±0.020의 흡광도로 희석하여 분석에 사용하였다. 황금홍삼 추출물 50 µL에 DPPH 라디칼 용액 2.95 mL를 첨가하여 30분간 반응시킨 후, 흡광도를 측정하였다. 황금홍삼 추출물(1°Bx)의 산화방지능은 비타민 C의 표준곡선을 이용하여 정량하였고, mg 비타민 C 당량(vitamin C equivalents, VCE)/°Bx로 나타내었다.

ABTS 법을 이용한 산화방지능은 Kim 등(23)의 방법에 따라 측정하였다. 1.0 mM AAPH에 2.5 mM ABTS와 PBS 100 mL를 섞어 70°C 항온수조에서 ABTS 라디칼 용액을 만들었다. PBS 용액으로 734 nm에서 ABTS 라디칼 용액을 0.650±0.020의 흡광도 범위에 맞추었다. ABTS 라디칼 용액 980 µL와 황금홍삼 추출물 20 µL를 혼합하여 37°C에서 10분간 반응 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 황금홍삼 추출물(1°Bx)의 산화방지능은 mg VCE/°Bx로 나타내었다.

ORAC 법을 이용한 산화방지능은 Huang 등(24)의 방법을 이용하였다. 시료 25 μ L에 81.6 nM 플루오로세린소듐 150 μ L를 넣어 준 후 37°C에서 10분간 교반하였다. 153 mM AAPH 25 μ L를 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 1분 간격으로 총 90분 동안 측정하였다. 황금홍삼 추출물(1°Bx)의 시간 경과에 따라 산화방지작용에 의한 형광의 감소를 이용하여 곡선아래면적(area under curve)을 계산하고, 산화방지능은 mg VCE°Bx로 나타내었다.

신경세포 배양 및 보호 효과

실험에 사용한 PC-12 신경세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)의 것을 사용하였다. 세포 배양을 위해 사용한 배지는 RPMI 1640 배지에 10% 열불활성 FBS, 100 unit/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신을 첨가하여 사용하였고, 37°C에서 5% CO₂를 유지하는 배양기(AutoFlow NU-4750 Water Jacket CO₂ Incubator, Nuair, Plymouth, MN, USA)에서 배양하여 사용하였다.

PC-12 세포에 대한 황금홍삼 추출물의 세포 독성 및 세포 보호능 평가를 위해서 MTT 법을 이용하였다(25). 무해한 농도 결정을 위한 세포독성 평가는 96-well plate에 PC-12 세포를 2.0 \times 10⁴ cell/well로 분주하여 4시간 배양하였다. 양성대조군은 비타민 C를 사용하고, 황금홍삼 추출물은 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05°Bx의 농도로 세포에 처리 후, 3시간 더 배양을 하였다. 이후 MTT 시약을 첨가하고 3시간 후 DMSO를 이용하여 포마잔(formazan)을 용해시켜 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 무독성은 황금홍삼 추출물을 처리하지 않은 대조군의 세포생존율 대비 80% 이상의 생존율을 보인 농도로 설정하였다.

황금홍삼 추출물의 신경세포 보호 효과는 위에 기술한 세포 독성 실험과 같은 방법으로 세포를 배양하였다. 황금홍삼 추출물을 세포 독성이 없는 최대 농도까지 처리한 후, 산화스트레스를 유도하기 위해 100 μ M의 과산화수소를 1시간 동안 처리하였다. 이후 MTT 시약을 첨가하고 3시간이 지난 다음 570 nm에서 흡광도를 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 측정하였다. 세포 생존율은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다. 세포독성 및 세포 생존율 측정은 독립적으로 3반복을 실시하였다.

세포 내 산화스트레스 측정

세포 내 산화스트레스는 DCFH-DA를 이용한 형광분석법으로 측정하였다(20). PC-12 세포를 96-well plate에 2 \times 10⁴ cell/well로 분주 후 24시간 동안 배양하였다. 농도별 황금홍삼 추출물을 1시간 동안 처리 후, PBS에 녹인 50 μ M DCFH-DA를 세포에 가하여 30분간 반응시켰다. 이어 과산화수소 300 μ M을 2시간 동안 노출시키고 나서, 들뜸 480 nm, 방출 530 nm에서 형광도를 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)에서 측정하였다. 세포 내 산

화스트레스는 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었고, 독립적으로 3반복을 실시하여 측정하였다.

AChE 및 BChE 억제 활성

황금홍삼 추출액의 AChE와 BChE의 억제 활성은 각각의 기질로 ATCI와 BTCC를 사용하였고, 발색 시약으로는 DTNB를 이용하여 Hwang 등(20)의 방법을 변형하여 측정하였다. AChE 억제 활성은 다양한 농도의 황금홍삼 추출물 20 μ L, DPBS 150 μ L, DTNB (10 mM) 30 μ L, ATCI (15 mM) 20 μ L를 첨가하고 37°C에서 10분간 방치하였다. 한편, BChE 억제 활성 측정을 위해서는 다양한 농도의 황금홍삼 추출물 20 μ L, DPBS 150 μ L, DTNB (10 mM) 30 μ L, BTCC (10 mM) 20 μ L를 첨가하고 37°C에서 10분간 방치하였다. 그 후 AChE (0.2 U/mL) 또는 BChE (0.06 U/mL) 20 μ L를 첨가한 뒤 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 황금홍삼 추출물의 AChE 및 BChE 억제 활성은 3반복 실험 후, nM 타크린 당량(tacrine equivalents, TE)을 사용하여 정량적으로 제시하였다.

통계분석

모든 추출 및 정량 분석은 3회 반복하였으며, 통계분석은 SAS 통계프로그램(SAS version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하였다. 평균값의 차이는 analysis of variance를 이용하여 확인하였고, $p < 0.05$ 유의수준에서 던컨의 다중검정(Duncan's multiple range test)으로 유의차를 검증하였다.

결과 및 고찰

총페놀 및 총플라보노이드 함량

식물체의 2차 대사산물의 하나인 페놀화합물은 과일, 채소, 차, 커피, 홍삼 등에 널리 분포되어 있고, 벤젠고리에 수산기(-OH)를 가지고 있어 산화방지제로서 기능을 할 뿐만 아니라, 항암, 고혈압 억제, 항염증 등의 다양한 생리활성을 가진다(11,26).

본 연구에 사용한 1°Bx의 황금홍삼 추출물은 약 1.2 g 고형물(solids)을 함유하고 있다(data not shown). 열수 추출한 황금홍삼의 총페놀 함량은 212.2 mg GAE°Bx를 보였고(Table 1), 이는 대략 176.8 mg GAE/g 고형물에 해당한다. 인삼 주근(main root)의 총페놀 함량은 12.1 mg GAE/100 g dry matter로 보고 되었다(27). 본 연구의 황금홍삼이 인삼 주근에 비해 더 높은 총페놀 함량을 보이는 것은 추출방법, 농축 등 제조방법의 차이에 기인한 것으로 여겨진다. 홍삼을 제조하는 구증구포 과정에서 총페놀 함량은 4년근 일반 인삼(수삼)에 비해 약 3배 증가하였다고 보고 되었다(28). Kim 등(6)에 따르면 5년 수삼을 이용한 홍삼 제조 공정에서 9회 증숙 후 총페놀 함량은 약 7배 증가됨이 보고되었고, Lee 등(29)에 의해서 에탄올 농도가 증가할 수록, 홍삼의 총페놀 함량이 감소하는 경향을 확인하였다. 이는 추출 온도와 방법에 따라 홍삼의 총페놀 함량이 변화한다는 것을 의미한다.

Table 1. Total phenolic and flavonoid contents as well as antioxidant capacity of 6-year-old red ginseng treated with gold nanoparticle

	Total phenolics (mg gallic acid equiv.°Bx)	Total flavonoids (mg catechin equiv.°Bx)	Antioxidant capacity (mg vitamin C equiv.°Bx)		
			ABTS ¹⁾	DPPH ²⁾	ORAC ³⁾
Red ginseng extract	212.2 \pm 3.5	3.5 \pm 0.4	272.3 \pm 5.5	141.2 \pm 2.9	868.4 \pm 29.6

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

²⁾2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay

³⁾Oxygen radical absorbance capacity assay

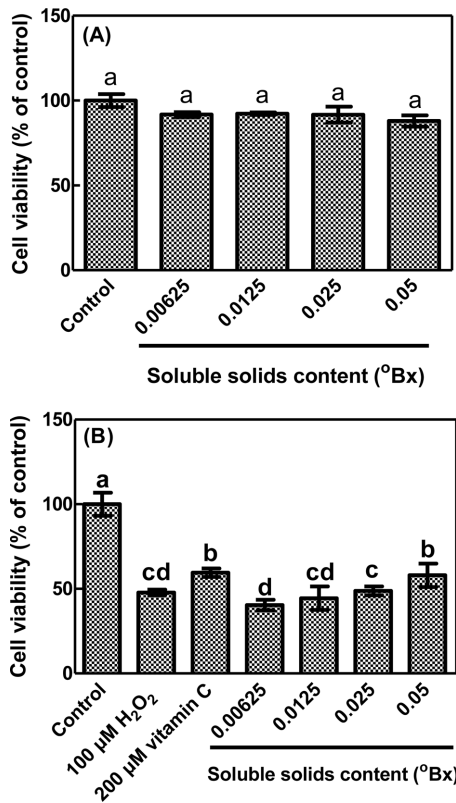


Fig. 1. Cytotoxic (A) and protective (B) effects of water extract of red ginseng treated with gold nanoparticles on neuronal PC-12 cells against oxidative stress induced by H₂O₂, based on the MTT assay.

황금홍삼 추출물의 총플라보노이드 함량은 3.5 mg CE/°Bx이고 (Table 1), 이는 약 2.9 mg CE/g 고형물에 해당한다. Yang 등(30)은 4년근 수삼을 고온고압에서 처리하였을 때 총플라보노이드 함량은 열처리 시간과 온도가 증가할 수록 대체적으로 증가하는 경향성을 보인다고 보고하였다.

산화방지능

ABTS, DPPH 및 ORAC 법을 이용한 황금홍삼 추출물의 산화방지능을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 황금홍삼 추출물의 DPPH 라디칼을 이용한 산화방지능은 141.2 mg VCE/°Bx이고(Table 1), 이는 약 117.7 mg VCE/g 고형물에 해당한다. DPPH 라디칼 소거능은 4년근 일반 인삼인 수삼에 비해 홍삼에서 구중구포 공정에 의해서 산화방지능이 증가한다고 보고되었다(28). 5년 수삼으로 9회 증숙 후 얻어진 홍삼은 DPPH 라디칼 소거능이 수삼에 비해 약 5배 증가된다고 보고되었다(6). 또한, 6년근 인삼을 이용하여 만든 백삼(white ginseng)에 비해 홍삼에서 DPPH 라디칼 소거능이 약 2배 상승한다고 보고되었다(26). 본 연구에서 사용한 황금홍삼 역시, 홍삼 제조 과정에서 산화방지제가 새롭게 형성되거나, 세포벽에 결합된 페놀화합물이 용출이 되었기 때문에 산화방지능이 증가하였을 것으로 여겨진다.

ABTS 법을 이용한 산화방지능은 272.3 mg VCE/°Bx로서 226.9 mg VCE/g 고형물에 해당하였다(Table 1). 5년 수삼으로 홍삼 제조시 증숙 횟수가 많을수록 ABTS 라디칼 소거능은 증가하였고, 9회 증숙 후 수삼에 비해 홍삼에서 ABTS 라디칼 소거능은 약 5.6배 증가한 것으로 보고되었다(6). 한편, ORAC 법으로 측정된 황금홍삼 추출물의 산화방지능은 868.4 mg VCE/°Bx로(Table 1),

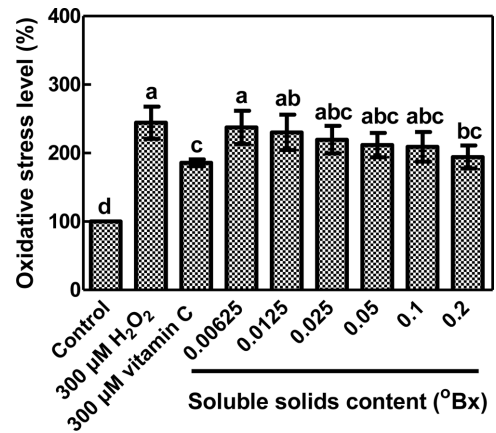


Fig. 2. Effect of water extract of red ginseng treated with gold nanoparticle on intracellular oxidative stress in neuronal PC-12 cells, based on the DCFH-DA assay.

이는 약 723.7 mg VCE/g 고형물에 해당한다.

신경세포 보호 효과

MTT법을 이용하여 황금홍삼 추출물을 3시간 처리한 후의 PC-12 신경세포 보호 효과를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 무처리 군인 대조군의 세포생존율(100%) 대비, 황금홍삼 추출물은 0.05°Bx 까지 PC-12 세포 생존율이 약 88-92%를 보여, 신경세포에 대한 독성을 보이지 않았다(Fig. 1A). 황금홍삼 추출물을 처리하지 않고 100 μM의 과산화수소를 1시간 동안 처리한 PC-12 세포는 대조군(100%)에 비해 약 48%의 생존율을 보였다(Fig. 1B). 반면, 황금홍삼 추출물을 미리 처리한 실험군은 신경세포의 생존율을 농도 의존적으로 증가시켰다(Fig. 1B). 0.05°Bx 황금홍삼 추출물 처리시 세포 생존율(58%)은 양성 대조군인 비타민 C의 세포 생존율(60%)과 유의적 차이가 없었다(Fig. 1B).

세포 내 산화스트레스 완화

황금홍삼 추출물에 대한 세포 내 산화스트레스 완화를 평가한 결과는 Fig. 2와 같다. 음성대조군인 300 μM의 과산화수소를 1시간 처리한 실험군은 무처리 대조군(100%)과 비교하여 유의적으로 높은 약 244%의 산화스트레스를 유발하였다. 양성대조군인 300 μM의 비타민 C 처리시, 산화스트레스는 185%로 감소하였다. 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2°Bx의 황금홍삼 추출물을 처리한 실험군에서는 각각 238, 230, 220, 212, 209, 194%로 농도 의존적으로 세포 내 산화스트레스를 감소시켰다(Fig. 2).

고온고압 열처리 인삼에 카페익산(caffeic acid), 페룰릭산(ferulic acid), 젠티식산(gentisic acid), 시린직산(syringic acid) 등이 존재한다고 알려졌다(6). 페놀산으로서 페룰릭산과 메타-쿠마릭산(m-coumaric acid)이, 플라보노이드로서는 카테킨이 인삼 주근의 주요한 페놀화합물로 밝혀졌다(27). 산화방지제로 작용하는 이들 페놀화합물이(31), 세포 내에서 산화스트레스를 완화시켜 신경세포 보호, 신경세포 기능 향상 등에 영향을 주었을 것으로 여겨진다(32,33). 금 나노입자를 처리하여 재배한 6년근 홍삼에는 Rg1, Rb1, Re 등의 다양한 진세노사이드가 존재한다(9). 인삼 사포닌 추출물 및 진세노사이드 Rg1, Rb1은 과산화수소가 유발한 산화스트레스로부터 신경세포를 보호하였다(10). 이는 페놀화합물과 더불어 황금홍삼 추출물에 존재하는 Rg1, Rb1 등의 진세노사이드도 활성산소에 의한 산화스트레스로부터 신경세포 사멸을 어느 정도 방지할 수 있었다는 것을 의미한다.

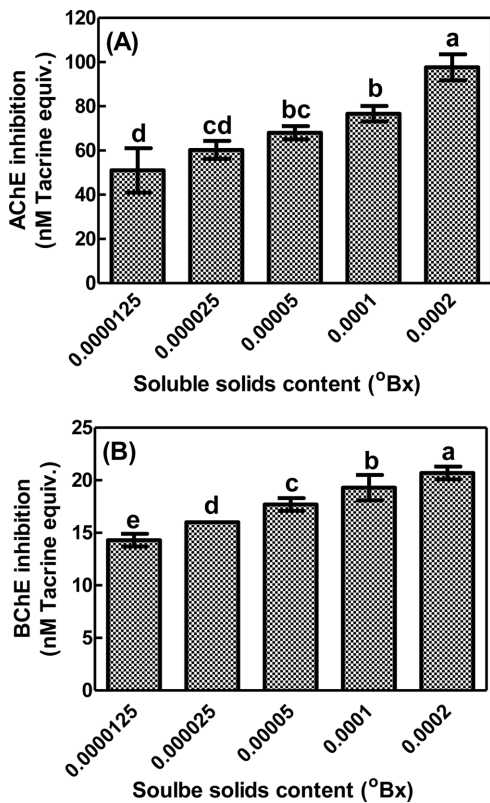


Fig. 3. Inhibitory effects of water extract of red ginseng treated with gold nanoparticles on acetylcholinesterase (A) and butyrylcholinesterase (B).

AChE 및 BChE 억제

황금홍삼 추출물의 AChE 억제능 평가와 더불어 BChE 억제능을 평가하였다. 여러 농도의 황금홍삼 추출물을 처리시, AChE와 BChE 억제능은 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3). 황금홍삼 추출물을 0.0000125, 0.000025, 0.00005, 0.0001, 0.0002°Bx로 처리시, AChE 억제능은 각각 약 51.0, 60.3, 68.0, 76.7, 97.7 nM TE에 해당하였고(Fig. 3A), BChE 억제능은 각각 14.3, 16.0, 17.7, 19.3, 20.7 nM TE였다(Fig. 3B). 황금홍삼 추출물이 BChE보다는 AChE를 더 억제하는 효과를 보였다. BChE 활성은 알츠하이머형 치매에서 점진적으로 증가하는 것으로 알려졌다(34). 위 결과는 폐놀화합물 및 진세노사이드가 함유된 황금홍삼 추출물을 활용하여 연접부위에서 콜린가수분해효소를 억제하여 아세틸콜린의 작용을 지연시켜 신경전달을 강화하는 소재로 개발 가능성을 보여준다.

요 약

본 연구에서는 금 나노입자 용액을 생장하는 6년근 인삼에 직접 시비해서 금 나노입자가 전이된 황금인삼을 열수 추출하여 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 산화방지능 및 신경세포 보호능을 평가하였다. 1°Bx의 황금홍삼 추출물은 총페놀과 총플라보노이드 함량이 각각 212.2 mg GAE와 3.5 mg CE였다. ABTS, DPPH 및 ORAC 법으로 측정시, 황금홍삼 추출물의 산화방지능은 각각 272.3, 141.2, 868.4 mg VCE/°Bx였다. 황금홍삼 추출물은 과산화수소로부터 유래한 세포 내 산화스트레스를 감소시켜 PC-12 신경세포의 생존율을 농도 의존적으로 증가시켰다. 또한, 황금홍삼 추출물은 신경전달물질인 아세틸콜린을 가수분해하는

AChE 및 BChE 활성을 억제하였다. 이러한 결과는 금 나노입자를 처리한 홍삼을 이용한 산화방지 및 신경손상억제 소재로 활용 가능성을 제시하였다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 연구개발특구진흥재단의 “특구육성사업(연구소기업 전략육성사업)” 지원을 받아 경희대학교에서 수행된 연구임(No. A2014DD106).

References

- Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alz. Dementia* 9: 63-75 (2013)
- Mount C, Downton C. Alzheimer disease: Progress or profit? *Nat. Med.* 12: 780-784 (2006)
- Szwajgier D. Acetylcholinesterase activity of phenolic acids and their derivatives. *Z. Naturforsch.* 68c: 125-132 (2013)
- Lee SM, Bae BS, Park HW, Ahn NG, Cho BG, Cho YL, Kwak YS. Characterization of Korean red ginseng (*Panax ginseng* Meyer): History, preparation method, and chemical composition. *J. Ginseng Res.* 39: 384-391 (2015)
- Hwang CR, Lee SH, Jang GY, Hwang IG, Kim HY, Woo KS, Lee J, Jeong HS. Changes in ginsenoside compositions and antioxidant activities of hydroponic-cultured ginseng roots and leaves with heating temperature. *J. Ginseng Res.* 38: 180-186 (2014)
- Kim YC, Hong HD, Rho J, Cho CW, Rhee YK, Yim JH. Changes of phenolic acid contents and radical scavenging activities of ginseng according to steaming times. *J. Ginseng Res.* 31: 230-236 (2007)
- Chung IM, Lim JJ, Ahn MS, Jeong HN, An TJ, Kim SH. Comparative phenolic compound profiles and antioxidative activity of the fruit, leaves, and roots of Korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer) according to cultivation years. *J. Ginseng Res.* 40: 68-75 (2016)
- Lee CH, Kim JH. A review on the medicinal potentials of ginseng and ginsenosides on cardiovascular diseases. *J. Ginseng Res.* 38: 161-166 (2014)
- Kang H, Hwang YG, Lee TG, Jin CR, Cho CH, Jeong HY, Kim D-O. Use of gold nanoparticle fertilizer enhances the ginsenoside contents and anti-inflammatory effects of red ginseng. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 1668-1674 (2016)
- Liao B, Newmark H, Zhou R. Neuroprotective effects of ginseng total saponin and ginsenosides Rb1 and Rg1 on spinal cord neurons *in vitro*. *Exp. Neurol.* 173: 224-234 (2002)
- Saxena M, Saxena J, Pradhan A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 16: 130-134 (2012)
- Kim JY, Kim OY, Lee JH. The effect of Korean Panax red ginseng supplementation on antioxidant enzymes activities and lipid peroxides in Korean men. *Korean J. Lipidol.* 21: 94-103 (2011)
- Mook-Jung IH, Hong H-S, Boo JH, Lee KH, Yun SH, Cheong MY, Joo I, Huh K, Jung MW. Ginsenoside Rb1 and Rg1 improve spatial learning and increase hippocampal synaptophysin level in mice. *J. Neurosci. Res.* 63: 509-515 (2001)
- Mitra A, Chakraborty S, Auddy B, Tripathi P, Sen S, Saha A, Mukherjee B. Evaluation of chemical constituents and free-radical scavenging activity of *Swarnabhasma* (gold ash), an ayurvedic drug. *J. Ethnopharmacol.* 80: 147-153 (2002)
- Jo MR, Bae SH, Go MR, Kim HJ, Hwang YG, Choi SJ. Toxicity and biokinetics of colloidal gold nanoparticles. *Nanomaterials* 5: 835-850 (2015)
- Zhang XD, Wu HY, Wu D, Wang YY, Chang JH, Zhai ZB, Meng AM, Liu PX, Zhang LA, Fan FY. Toxicologic effects of gold nanoparticles *in vivo* by different administration routes. *Int. J. Nanomed.* 5: 771-787 (2010)
- Girgis E, Khalil WKB, Emam AN, Mohamed MB, Rao KV.

- Nanotoxicity of gold and gold-cobalt nanoalloy. *Chem. Res. Toxicol.* 25: 1086-1098 (2012)
18. Watanabe A, Kajita M, Kim J, Kanayama A, Takahashi K, Mashino T, Miyamoto Y. *In vitro* free radical scavenging activity of platinum nanoparticles. *Nanotechnology* 20: 455105 (2009)
 19. Kim YJ, Kim DB, Lee SY, Choi SY, Park JS, Lee SY, Park JW, Kwon HJ. Effects of nanoparticulate saponin-platinum conjugates on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced macrophage inflammatory protein-2 gene expression via reactive oxygen species production in RAW 264.7 cells. *BMB Rep.* 42: 304-309 (2009)
 20. Hwang JS, Im S, Lee I, Kim TR, Kim D-O. Effects of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* ripe fruits on protection of neuronal PC-12 cells and cholinesterase inhibition. *Korean J. Food Sci. Technol.* 48: 86-91 (2016)
 21. Kim D-O, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81: 321-326 (2003)
 22. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28: 25-30 (1995)
 23. 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)
 24. 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)
 25. Heo H-J, Cho H-Y, Hong B, Kim H-K, Kim E-K, Kim B-G, Shin D-H. Protective effect of 4',5-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against A β -induced oxidative stress in PC12 cells. *Amyloid-J. Protein Fold. Disord.* 8: 194-201 (2001)
 26. Lee D, Ghafoor K, Moon S, Kim SH, Kim S, Chun H, Park J. Phenolic compounds and antioxidant properties of high hydrostatic pressure and conventionally treated ginseng (*Panax ginseng*) products. *Qual. Assur. Saf. Crop. Food.* 7: 493-500 (2015)
 27. Kim J-S. Investigation of phenolic, flavonoid, and vitamin contents in different parts of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Prev. Nutr. Food Sci.* 21: 263-270 (2016)
 28. Jin Y, Kim Y-J, Jeon J-N, Wang C, Min J-W, Jung S-Y, Yang D-C. Changes of ginsenosides and physiochemical properties in ginseng by new 9 repetitive steaming and drying process. *Korean J. Plant Res.* 25: 473-481 (2012)
 29. Lee JW, Mo EJ, Choi JE, Jo YH, Jang H, Jeong JY, Jin Q, Chung HN, Hwang BY, Lee MK. Effect of Korean red ginseng extraction conditions on antioxidant activity, extraction yield, and ginsenoside Rg1 and phenolic content: Optimization using response surface methodology. *J. Ginseng Res.* 40: 229-236 (2016)
 30. Yang SJ, Woo KS, Yoo JS, Kang TS, Noh YH, Lee J, Jeong HS. Change of Korean ginseng components with high temperature and pressure treatment. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38: 521-525 (2006)
 31. Kim D-O, Lee CY. Comprehensive study of vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44: 253-273 (2004)
 32. Spencer JPE. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *Br. J. Nutr.* 104: S40-S47 (2010)
 33. Im SE, Yoon H, Nam TG, Heo HJ, Lee CY, Kim DO. Antineurodegenerative effect of phenolic extracts and caffeic acid derivatives in romaine lettuce on neuron-like PC-12 cells. *J. Med. Food* 13: 779-784 (2010)
 34. Greig NH, Lahiri DK, Sambamurti K. Butyrylcholinesterase: An important new target in Alzheimer's disease therapy. *Int. Psychiatr.* 14 (Suppl 1): 77-91 (2002)