

비자 열수 추출물의 항산화 활성 및 뇌신경세포 보호효과 연구

이승인^{1#}, 최찬현¹, 김정상¹, 임성수², 정현우^{1*}

1 : 동신대학교 한의과대학, 2 : 금와영농조합법인

The Antioxidant Activities and Neuroprotective Effects of Hot Water Extracts from *Torreyae Semen*

Soong-In Lee^{1#}, Chan-Hun Choi¹, Jeong-Sang Kim¹, Seong-Soo Lim², Hyun-Woo Jung^{1*}

1 : College of Oriental Medicine, Dongshin University, 2 : Geum-wa Farming Association Corporation

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to estimate the antioxidative and neuroprotective effects of *Torreyae Semen* hot water extracts (TS).

Methods : *Torreyae Semen* was extracted by hot water for 2 hours with a temperature of 105 degrees. Polyphenols and total flavonoid were measured and LC-MS/MS was used to certificate anticipated antioxidative compounds. The antioxidant activities of TS were measured as scavenging effects of 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and Nitrite Oxides (NO). Cell viability and proliferation rate was measured MTT assay. The toxicities to thymocytes and splenocytes were evaluated by the proliferation rate of primary cultured cells of 7 weeks, male Balb/c mice. The antioxidant activities of TS on C6 mouse glioma cells were measured by the analysis of total glutathione contents variation. The neuroprotective effects against oxidative stresses were measured by MTT assay.

Results : Polyphenols of TS was $92.00 \pm 1.24 \mu\text{g}/\text{mg}$, and total flavonoids was $0.36 \pm 0.14 \mu\text{g}/\text{mg}$. TS includes gallicocatechin, epigallocatechin, gallicocatechin gallate and epigallocatechin gallate. TS included gallicocatechin, epigallocatechin, gallicocatechin gallate, epigallocatechin gallate. TS showed DPPH and NO scavenging effects as dose-dependent manner at the concentrations of 0 - 10 mg/ml. In MTT assay, TS shows no significant toxicity to C6 cells, primary cultured thymocytes and splenocytes of Balb/c mice. TS increased the level of total glutathiones. TS increased cell viabilities of C6 cells against oxidative stresses such as H₂O₂, sodium nitroprusside (SNP), Rotenone at the concentrations of 0 - 0.063 mg/ml.

Conclusions : TS shows the antioxidant and neuroprotective effects in these experiments.

Key words : *Torreyae Semen*, Antioxidant, Neuroprotective, Hot Water Extract.

I. 서 론

비자(*Torreyae Semen*)은 비자나무(*Torreyea nucifera* Siebold et Zuccarini, 혹은 *Torreyea grandis* Fort.)의 종자¹⁾이다. 비자나무는 높이가 25 m, 지름 2 m 정도이며, 가지가 사방으로 퍼지고, 수피는 회색빛을 띤 갈색으로, 종자는 타원형이고, 길이 23 mm, 지름 12 mm로 다갈색이며, 껍질이 딱딱

한데, 이를 藥用으로 사용한다. 비자의性は平하고,味는甘하며,肺·胃·大腸에歸經한다.驅蟲消積·潤燥通便의效能이 있어,鉤蟲·蛔蟲·條蟲病,蟲積腹痛,小兒疳積,大便秘結 등을 치료하는데 사용되어 왔다²⁾.

최근 전³⁾의 연구에 따르면 비자에는 palmitic acid, oleic acid, stearic acid 등의 지방유와 tannin, 정유, 다당류 등이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 또한 비자는 비자나무의

*Corresponding author : Hyun-Woo Jeong, College of Korean Medicine, Dongshin University, Naju, Jeonnam 520-714, Republic of Korea.

· Tel : +82-61-330-3524 · E-mail : hwdolsan@dsu.ac.kr

#First Author : Soong-In Lee, College of Korean Medicine, Dongshin University, Naju, Jeonnam 520-714, Republic of Korea.

· Tel : +82-61-330-3529 · E-mail : barunhani@hanmail.net

· Received : 30 August 2017 · Revised : 29 October 2017 · Accepted : 15 November 2017

줄기나 잎에 비하여 탄수화물, 조지방, 수용성 단백질, 환원당, 유리당의 함량이 높아 식용유지자원으로서 이용가치가 높으며, 특히 종자 내피에 함유된 폴리페놀 함량이 높다. 비자의 열수 추출물에는 flavonoids, polyphenol 성분이 함유되어 있어, tyrosinase 저해, 아질산염 소거능, SOD 유사활성, 전자공여능, Xanthine oxidase 저해효능을 확인할 수 있었으며, 따라서 물을 용매로 하여 추출하는 것이 다른 용매를 이용한 추출방식에 비하여 다양한 항산화 활성에 기여하는 것으로 확인⁴⁾된 바 있다.

한편 최근 뇌신경 퇴행성 질환은 초고령화 시대 진입과 더불어 사회의 주요 이슈로 부각되고 있는데, 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성측색경화증 등이 이 범주에 해당하는 대표적 질환들이다. 이에 대하여 뇌신경 세포 내의 유전적 변이가 주요 역할을 수행하는 것으로 보고 많은 연구가 진행되고 있으며, 여기에서 유전자에 대한 환경의 영향이 중요하며, 특히 다양한 원인에 의한 뇌 세포에 대한 산화적 스트레스가 뇌신경 퇴행성 변화의 주요한 요소로서 지목⁵⁾되고 있다. 특히 산화적스트레스는 뇌신경 세포 내에서 미토콘드리아 기능부전으로 인한 신경퇴행과 DNA 손상의 주요 원인인 것으로 언급⁶⁾되고 있다.

그동안 비자는 추출물 자체에 대한 항산화 기능에 대한 연구가 진행되나 있으나, 알츠하이머, 치매 등 현대인의 고령화에 따른 뇌신경변성질환에 대한 활용가능성을 검토하기 위해서는 뇌신경세포에 대한 항산화 활성에 대한 연구가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 비자의 항산화 기능성 소재로서 연구개발 가능성을 탐색하기 위하여, 항산화 활성 성분들의 함량을 분석하고, 비자 열수추출물(Torreyae Semen hot water extracts, TS)의 항산화 활성을 확인하고, 세포 단위에서 안전성을 확인한 농도에서 산화적 스트레스에 대한 세포보호 효능을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 비자(Torreyae Semen)는 전남 나주시 다도면 덕용산 일대에서 자생하고 있는 朱木科에 속한 상록목인 비자나무 *Torreyea nucifera* Siebold et Zuccarini 의 성숙한 열매²⁾ 중 과육과 비자종자피 등을 음건한 상태로 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

비자열매 100g을 증류수 1,200 ml로 105℃에서 2시간 동안 煎湯한 다음 추출액을 3,000 rpm하에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하고, 이를 -84℃ deep freezer에서 24시간 동안 방치 한 후 freeze dryer로 동결건조한 결과 4.8 g의 건조분말(수득율 4.8%)을 획득하였다.

2) 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법⁷⁾을 응용하였다. Methanol에 1 mg/ml 농도로 용해시킨 시료액 80 μ l와 Folin-Denis reagent 80 μ l를 혼합하여 3분간 반응시킨 후, 10% Na₂CO₃ 80 μ l를 혼합하여 1시간 동안 암실에서 반응시킨 후, 상등액 120 μ l를 취하여 96 well plate에 옮겨 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 chlorogenic acid를 0~500 μ g/ml의 농도로 제조하여 표준 검량선을 작성하고 총 polyphenol 함량을 mg/g로 나타내었다.

3) 총 플라보노이드 함량 분석

총 플라보노이드 함량은 다음과 같이 Moreno 등의 방법⁸⁾을 변형하여 측정하였다. Methanol에 용해시킨 시료액 100 μ l와 10% aluminium nitrate 20 μ l, 1M potassium acetate 20 μ l, methanol 860 μ l를 차례로 혼합하여 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 quercetin을 0~500 μ g/ml의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 표준 검량선을 작성하고 총 flavonoid 함량을 mg/g으로 나타내었다.

4) 항산화활성 성분 분석

추출물 중에 존재하는 항산화 활성 성분의 screening 분석을 위해 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS/MS)를 활용한 분석을 실시하였다. LC-MS/MS를 활용한 screening 분석은 1200 series LC와 연동된 6410A MS(Aglient, USA) 기기를 이용하였다. 분석용 column은 Phenomenex C18 (150 × 4.6 mm, 3 μ m)을 사용하였으며, column oven의 온도는 35℃로 설정하였다. 이동상 A로서 0.1% formic acid와 5 mM ammonium acetate를 포함하는 증류수를, 이동상 B로서 0.1% formic acid와 5 mM ammonium acetate를 포함하는 methanol을 사용하였다. LC-MS/MS에서 성분별 MRM 조건은 Table 1과 같이 설정하였으며, 공통적으로 negative ESI mode에서 분석을 실시하였다.

Table 1. Multiple reaction monitoring conditions of Bio-Active Compounds in TS

Compounds	MRM transition (m/z)
chlorogenic acid	353.0 → 191.3
gallic acid	169.1 → 125.1
galocatechin	305.0 → 125.0
caffeic acid	179.0 → 135.0
epigallocatechin	305.0 → 125.0
catechin	289.0 → 109.0
galocatechin gallate epigallocatechin gallate	457.0 → 169.0
epicatechin	289.0 → 109.0
rutin	609.2 → 301.2
quercetin	301.0 → 150.9
benzoic acid	121.0 → 77.0

5) DPPH 라디칼 소거 활성 관찰

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)은 자체가 매우 안정한 유리기로서 517 nm에서 특징적인 흡광도를 나타내는 보라색 화합물로서, 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며 항산화기작 중 양자라디칼의 안정화에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다. 전자공여능은 Bios의 방법⁹⁾을 변형하여 DPPH 200 μm을 methanol에 녹인 다음 이 용액을 900 μl와 시료 100 μl를 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 유리기 소거활성(% inhibition)은 아래와 같이 계산을 하고, 양성대조군으로 높은 항산화활성을 갖는 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\% \text{Inhibition} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

6) 아질산염 소거작용 효과 관찰

아질산염 (Nitrite) 소거작용 측정은 Kato 등과 김 등의 방법¹⁰⁾에 따라 1 mM NaNO₂ 1 ml에 각 시료 1 ml를 가하고 0.1N HCl를 이용하여 pH 2.5로 보정하고 0.2 M구연산 완충액을 가하여 총 부피를 10 ml로 하였다. 37°C에서 1 시간 반응시킨 후 각 반응액 1 ml를 취하여 2% 초산용액 3 ml와 30% 초산용액으로 용해한 Griess 시약(1% sulfanilic acid: 1% naphthylamine = 1:1) 0.4 ml를 차례로 가한 후 진탕 혼합하여 실온에서 15분간 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 Griess 시약 대신 증류수를 가하여 측정하였다.

$$\% \text{아연질산염소거능} = 100 - \left(\frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \times 100 \right)$$

7) 뇌신경세포주 배양

흰쥐의 뇌세포에서 유래한 교세포주인 C6 glioma cell은 한국 세포주은행 (서울, 한국)에서 동결 상태로 구입하여 사용하였다. 교세포주를 RPMI 배지에 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)과 항생제 (Antibiotic antimycotic)를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하였다. 세포는 T-75 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 세포의 탈착을 위하여 인산완충액 (Phosphate buffered saline, PBS)으로 가볍게 세척한 다음, Trypsin-EDTA (Sigma, USA)를 처리한 후 37°C에서 5분간 방치하였다가 세포를 채집하였으며, 계대 배양은 2~3일에 1회씩 시행하였다.

8) 세포독성 확인

Ez-cytox assay 방법을 이용하여 시료가 C6 뇌교세포주의 증식율에 미치는 영향을 확인하였다. C6 뇌교세포주를 96 well plate에 7 × 10³ cell/well의 농도로 분주하고 배양기에서 37°C, 5% CO₂를 유지하면서 24시간 pre-incubation 시킨 후 시료를 농도별(15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 μg/ml)로 처리한 다음 24시간 배양하였다. 그리고 Ez-cytox 를 처리하여 2시간 배양한 후 Microplate Reader (Biorad, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) *in vitro* 면역세포의 증식율에 미치는 효과

고농도에서 나타나는 세포독성이 동물의 흉선세포와 비장 세포에서도 나타나는지 확인하기 위하여 실험동물윤리위원회 (승인번호:2016-10-03)의 승인을 받고 7주령 수컷, Balb/c 마우스를 1주일간 실험실에 적응 시킨 다음 흉선과 비장의 적출을 진행하였다.

① Thymocytes 증식율 측정

정상 생쥐의 흉선 세포 분리는 Wysocki¹¹⁾ 및 Mizel¹²⁾ 등의 방법에 의하여 실시하였다. 분리된 흉선 세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에 5.0 × 10⁵ cells/well 농도로 접종한 다음 흉선 세포에 Con A 10 μg/ml와 시료를 농도별(15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 μg/ml)로 첨가한 후 37°C의 CO₂ 배양기에서 48 시간 배양한 다음 Ez-cytox 15 μl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 2시간 정도 배양한 이후, 각 well의 흡광도를 Microplate Reader로 450 nm에서 측정하였다.

② Splenocytes 증식율 측정

정상 생쥐의 비장 세포 분리는 Wysocki 및 Mizel 등의 방법에 의하여 실시하였다. 생쥐의 비장을 적출한 뒤 분리된 비장 세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에 5.0 × 10⁵ cells/well 농도로 접종한 다음 비장 세포에 LPS 10 μg/ml와 시료를 농도별(15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 μg/ml)로 첨가한 후 37°C의 CO₂ 배양기에서 48 시간 배양한 다음 Ez-cytox 15 μl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 2시간 정도 배양한 후, 각 well의 흡광도를 Microplate Reader로 450 nm에서 측정하였다.

10) Total glutathione 함량 측정

Total glutathione 함량 측정은 Total glutathione Quantification kit (Dojindo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 100 mm dish에 각각 1 × 10⁶개의 세포를 분주하고 37°C, 5% CO₂를 유지하면서 24시간 pre-incubation시킨 후 시료를 처리한 다음 다시 24시간 배양하였다. 24시간 배양이 끝나고, 세포를 수집한 다음 -20°C에서 20분간 냉동 후 항온 수조를 이용하여 37°C에서 10분간 방치하기를 2회 반복하여 세포를 파쇄한 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 기질로 사용하여, glutathione 함량을 측정하였다. 측정 과정은 제조사가 제시한 지침에 따라 ELIZA reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

11) 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 보호 효과 측정

산화적 스트레스에 의한 세포의 사멸 보호효과는 Ez-cytox 법을 변형하여 측정하였다. 세포주를 96 well plate에 well 당 5 × 10³ cells/well개씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂가 유지되는 환경에 24시간 방치한 다음 부착을 시행하였다. 세포가 부착한 후 최적의 증식율을 나타낸 시료를 처리하고 동일한 환경에서 24시간 방치하였다. 24시간 배양이 끝난 후 sodium nitroprusside (SNP), 과산화수소 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 그리고 rotenone를 각각 처리하고 37°C, 5% CO₂가 유지되는 환경에 3시간 배양 후 배양액을 제거하고 각 well에

새로운 배지를 넣고 21시간 배양하였다. 그리고 세포에 Ez-cytox를 10 μ l씩 넣어 2시간 후 Microplate Reader 를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계처리

본 연구의 통계학적 분석은 SigmaPlot 11을 사용하였고, 각 군의 실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었다. 모든 대조군과 실험군의 통계적 유의성 검증은 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)으로 분석하여, 사후검정은 Tukey's multiple range test를 실시하고, 분석 시 p 값이 0.05 미만일 때 유의하다고 판단하였다.

III. 결 과

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

Table 2. Extract yields, total polyphenol and flavonoid contents of TS

Yield (%)	Total polyphenol content (mg/g)	Total flavonoid content (mg/g)
4.8%	92.00 \pm 1.24	0.36 \pm 0.14

The values are expressed as means \pm SD. of triplicate measurements.

비자 열수추출물의 수율은 4.8%였으며, 총 플라보노이드 함량은 총 폴리페놀함량은 92.00 \pm 1.24 mg/g이었으며, 총 폴리페놀 함량은 0.36 \pm 0.14 mg/g 으로 나타났다.

Phenolic compound와 flavonoid는 항산화, 항암, 항균 등 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있어서 생약재를 포함한 각종 식물 대상 연구에서 그 함량이 중요하게 다루지고 있다¹³⁻¹⁵⁾. 일반적으로 열수 추출물에서는 플라보노이드 함량보다 폴리페놀의 함량이 높게 나오는 경향을 나타내는데, 비자 열수추출물의 경우에도 동일한 양상을 나타내었다.

2. 항산화 활성성분 분석

한약재와 같은 천연물의 성분을 분석할 때 가장 일반적으로 활용되는 분석장비는 액체크로마토그래피(Liquid chromatography; LC 또는 HPLC)이다. 본 연구에서는 비자 열수추출물의 활성성분을 분석하기 위해 자외선검출기를 장착한 HPLC를 활용하였으나, 분석 결과에서 많은 성분들의 중복 등으로 인해 표준품과 머무름 시간의 일치성을 판별하기 어려웠다(Data not shown).

따라서 본 연구에서는 일반적으로 알려져 있는 비자 및 유사 식물에서 확인된 활성성분 중 항산화 활성이 있는 성분들의 질량분석 조건을 선택적으로 추적하기 위하여, multiple reaction monitoring(MRM)이 가능한 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS/MS)를 활용하여 활성성분의 screening 분석을 시도하였다.

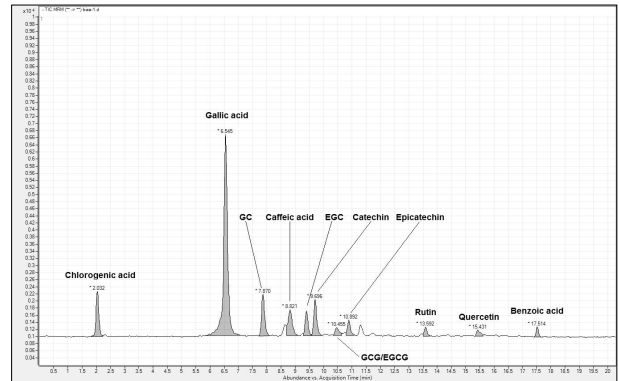


Figure 1. LC-MS/MS MRM mode TIC chromatogram of hot-water extracts from TS. GC; gallic catechin, EGC; epigallocatechin, GCG; gallic catechin gallate, EGCG; epigallocatechin gallate.

Table 1에서 제시한 활성성분들의 MRM 조건을 추적하여 분석한 결과 Figure 1과 같은 크로마토그램을 얻을 수 있었으며, Table 3에 각 성분별 피크의 면적 총합을 기준으로 30% 이상을 차지하는 성분(+++), 10% 이상을 차지하는 성분(++), 10% 미만을 차지하는 성분(+) 등으로 구분하여 주요 항산화 활성 성분에 대한 screening 결과를 도출하였다.

본 연구에서 분석한 성분들 중에서 비자 열수추출물에 존재하는 항산화활성 성분 중 가장 많은 함량을 가지는 것으로 추정되는 성분은 gallic acid였으며, 다음으로는 chlorogenic acid로 나타났으며, caffeic acid와 일부 catechin 류 등이 확인되었다. 이는 Table 2의 총 폴리페놀 함량과 연관지어볼 때 대표적인 phenolic acid류로서 총 폴리페놀에 포함되는 성분인 gallic acid나 chlorogenic acid 등이 상당량 함유되어 있는 분석 결과가 총 폴리페놀 함량에도 기여한 것으로 판단할 수 있었다.

Table 3. Bio-Active Compounds of TS

Retention time	Compounds	Content levels
2,053	chlorogenic acid	++
6,557	gallic acid	+++
7,878	gallic catechin	++
8,833	caffeic acid	++
9,409	epigallocatechin	+
9,705	catechin	++
10,459	gallic catechin gallate / epigallocatechin gallate	+
10,901	epicatechin	+
13,592	rutin	+
15,440	quercetin	+
17,527	benzoic acid	+

+++; more than 30% of TIC peak sum, ++; 10~30% of TIC peak sum, +; less than 10% of TIC peak sum.

3. DPPH 라디칼 및 아질산염 소거 활성

비자 열수추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 0.2 mg/ml 농도에서 14.5 \pm 1.3 %, 1.0 mg/ml 농도에서 45.8 \pm 0.5 %, 5.0 mg/ml 농도에서 78.5 \pm 1.2 %로 나타났다.

10.0 mg/ml 농도에서 96.0 ± 0.0 %의 소거 활성을 나타내었다. 그래서 비자 열수추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 농도의존적으로 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. 대조구로 사용한 Ascorbic acid는 0.2 mg/ml 농도에서 74.1 ± 0.5 %, 1.0 mg/ml 농도에서 96.5 ± 0.0 %, 10.0 mg/ml 농도에서 96.5 ± 0.0 %의 소거 활성을 나타내었다. 비자열수추출물은 0.2 mg/ml 농도와 1.0 mg/ml 농도에서는 Ascorbic acid에 비해서 낮은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타냈으나, 10.0 mg/ml 농도에서는 유사한 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타냈다. (Fig. 1A)

비자 열수추출물의 아질산염 소거활성은 0.2 mg/ml 농도에서 2.1 ± 2.7 %, 1.0 mg/ml 농도에서 34.0 ± 0.7 %, 10.0 mg/ml 농도에서 34.6 ± 1.9 %의 소거 활성을 나타내었다. 비자 열수추출물의 아질산염 소거활성은 농도의존적으로 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. 대조구로 사용한 Ascorbic acid는 0.2 mg/ml 농도에서 18.3 ± 3.0 %, 1.0 mg/ml 농도에서 60.4 ± 0.3 %, 10.0 mg/ml 농도에서 95.3 ± 0.1 %의 소거 활성을 나타내었다. 비자열수추출물은 전체 농도에서 Ascorbic acid에 비해서 낮은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타냈다. (Fig. 1B)

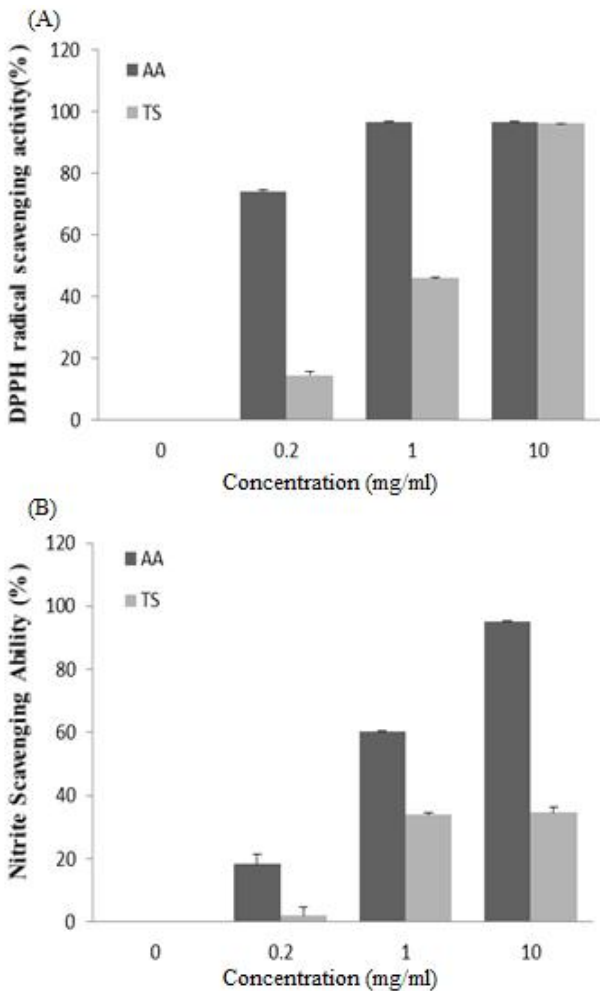


Figure 2. Anti-oxidant activities of TS (A) DPPH radical scavenging activities (B) Nitrite scavenging abilities. AA : ascorbic acid. The values are expressed as mean \pm SD deviation of triplicate tests.

4. *in vitro*, *in vivo* 독성 확인

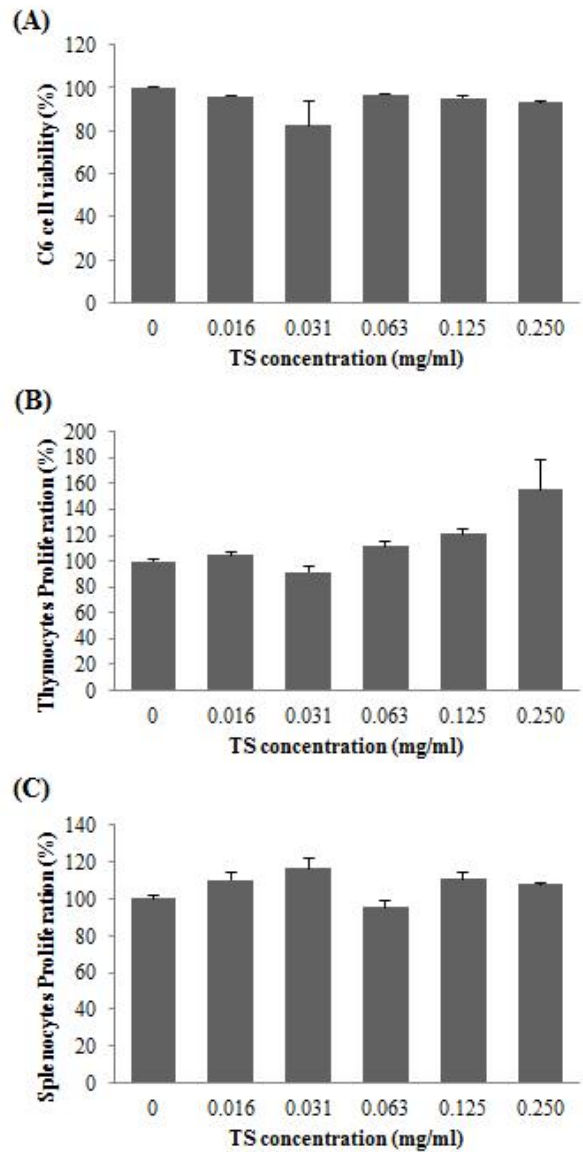


Figure 3. Toxicities of TS (A) C6 cell viabilities by hot-water extracts from TS (B) Cell proliferation rates of primary cultured thymocytes removed from mouse. (C) Cell proliferation rates of primary cultured splenocytes removed from mouse. The values are expressed as mean \pm SD deviation of triplicate tests.

비자열수추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 뇌신경아교종세포주인 C6 세포에 농도별로 처리하여 24시간 배양한 결과 0 mg/ml 농도의 생존율을 100%로 환산할 때, 0.016 mg/ml 농도에서는 96.2 ± 0.4 %, 0.031 mg/ml 농도에서는 82.5 ± 11.6 %, 0.063 mg/ml 농도에서는 96.7 ± 0.4 %, 0.125 mg/ml 농도에서는 95.4 ± 0.5 %, 0.250 mg/ml 농도에서는 93.1 ± 0.7 %로 나타났다. 따라서 비자열수추출물이 농도에 의하여 특별히 독성을 갖는 것으로 확인되지는 않았다(Fig 3A.).

그 결과 생쥐에서 적출한 흉선세포에 대해서 비자 추출물 0 mg/ml 농도를 처리한 증식율을 100 ± 2.2 %라 하였을 때, 0.016 mg/ml 농도에서는 104.6 ± 2.8 %, 0.031 mg/ml 농도에서는 91.9 ± 4.0 %로 감소하는 듯 하였으나 투여농도가

증가할수록 0.063 mg/ml 농도에서는 $111.3 \pm 3.7 \%$, 0.125 mg/ml 농도에서는 $121.1 \pm 3.4 \%$, 0.250 mg/ml 농도에서는 $155.4 \pm 22.8 \%$ 로 나타나서 농도의존적으로 증식을 촉진시키는 것으로 확인되었다(Fig 3B).

생쥐에서 적출한 비장세포에 대해서 0 mg/ml 농도에서 증식을 $100 \pm 2.0 \%$ 에 비하여, 0.016 mg/ml 농도에서는 $110.6 \pm 3.8 \%$, 0.031 mg/ml 농도에서는 $116.6 \pm 5.4 \%$, 0.063 mg/ml 농도에서는 $95.4 \pm 3.8 \%$, 0.125 mg/ml 농도에서는 $110.6 \pm 3.7 \%$, 0.250 mg/ml 농도에서는 $107.6 \pm 0.8 \%$ 로 나타나서 전체적으로 증식을 촉진시키는 경향이 있는 것으로 확인되었다.

5. 뇌신경세포에 대한 항산화활성 확인

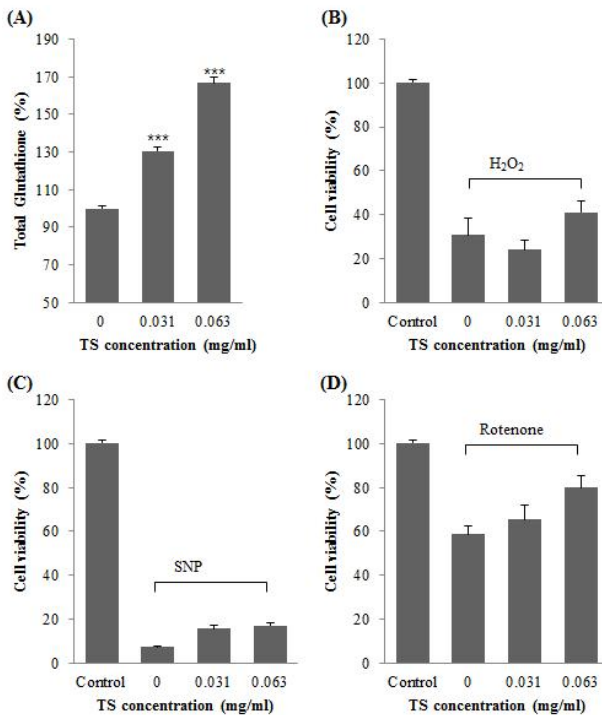


Figure 4. Anti-oxidative activities of TS (A) Total glutathione contents rate (B) Protective effects against 0.5 mM H₂O₂ induced C6 glioma cell death (C) Protective effects against 0.8 mM sodium nitroprusside (SNP) induced C6 glioma cell death (D) Protective effects against 0.8 mM Rotenone induced C6 glioma cell death. The values are expressed as mean \pm SD deviation of triplicate tests.

뇌신경 세포의 항산화 성분 함량을 확인하기 위하여 C6 세포주에 농도별로 비자열수추출물을 처리하고 총 glutathione 함량을 분석하였다. 그 결과 비자열수추출물을 처리하지 않은 군에서 $100.0 \pm 1.4 \%$ 에 비하여 0.031 mg/ml 농도에서 $130.6 \pm 2.2 \%$, 0.063 mg/ml 농도에서 $166.9 \pm 2.7 \%$ 로 확인되어 비자열수추출물의 농도에 의존적으로 총 glutathione 함량이 상승하는 것으로 확인(Fig 4A)되었다.

이러한 결과를 바탕으로 같은 농도에서 다양한 산화적 스트레스에 의한 뇌신경세포 손상에 대한 보호효과를 확인하였다. 먼저 아무것도 처리하지 않은 C6 세포주 생존율에 비하여, H₂O₂를 처리한 결과 $30.7 \pm 7.5 \%$ 의 생존율이 확인되었으나,

비자열수추출물을 0.031 mg/ml 농도로 함께 처리한 결과 $24.0 \pm 4.5 \%$, 0.063 mg/ml 농도로 처리한 결과 $41.0 \pm 5.5 \%$ 로 확인되어 0.031 mg/ml 농도에서는 보호효과가 확인되지 않았으나, 0.063 mg/ml 농도에서는 H₂O₂로 유발한 산화적 손상에 대한 보호효과를 확인할 수 있었다(Fig 4B).

또한 대조군의 C6 세포주 생존율에 비하여, SNP를 처리한 결과 $7.3 \pm 0.6 \%$ 의 생존율이 확인되었으나, 비자열수추출물을 0.031 mg/ml 농도로 함께 처리한 결과 $15.6 \pm 1.7 \%$, 0.063 mg/ml 농도로 처리한 결과 $17.3 \pm 1.4 \%$ 로 확인되어 산화적 손상에 대한 보호효과를 확인할 수 있었다(Fig 4C).

또한 대조군의 C6 세포주 생존율에 비하여, Rotenone을 처리한 결과 $58.8 \pm 3.6 \%$ 의 생존율이 확인되었으나, 비자열수추출물을 0.031 mg/ml 농도로 함께 처리한 결과 $65.5 \pm 6.4 \%$, 0.063 mg/ml 농도로 처리한 결과 $80.0 \pm 5.5 \%$ 로 확인되어 산화적 손상에 대한 보호효과를 확인할 수 있었다(Fig 4D).

IV. 고찰

비자나무는 제주도, 해남, 내장산 등에 분포하고 있는 것으로 알려져 있으며²⁾, 心材에는 방충, 방습 등의 효과가 있어 고급 바둑판 제작에 활용하고 있다. 비자는 비자나무의 과실로서 한의학에서 驅蟲消積·潤燥通便의 效能이 있어, 鉤蟲·蛔蟲·條蟲病, 蟲積腹痛, 小兒疳積, 大便秘結 등을 치료하는데 사용해왔고, 이와 같은 맥락에서 민간에서도 각종 기생충, 치질, 번비 등 치료에 사용해왔다.

폴리페놀은 활성산소를 제거하고 지질과산화에 의한 생체의 순환기능 장애와 노화 등을 억제하는 항산화 기능을 갖고 있어 각종 질환의 예방과 치료에 사용될 수 있다. 그 중에서 플라보노이드는 식물이 자외선으로부터 자신을 보호하기 위해 만들어내는 천연물질로서 대표적인 항산화 물질 중의 하나¹⁶⁾이다. 본 연구에서 확인된 비자 열수추출물의 폴리페놀 함량은 92.00 mg/g 내외로 확인(Table 1)되었고, 플라보노이드 함량은 0.36 mg/g으로 확인되었다.

이는 전의 연구³⁾에서 확인된 109 mg/g의 함량과는 근소한 차이가 있는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 사용한 비자는 전남 나주시 덕용산에서 자생하는 비자를 채취하여 사용하였고, 전의 연구에서 사용한 비자는 대구광역시 약령시장에서 한방 생약재로 판매하는 비자를 사용하였다는 점에서 원재료 상의 차이가 있다. 그리고, 추출방식으로서 열수 환류 추출을 사용한 점은 같으나, 본 연구에서는 105℃에서 2시간 동안 추출하였으나, 전의 연구에서는 80℃에서 3시간 동안 추출하였다는 차이가 있다. 그러나 폴리페놀 성분에 있어서 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.

또한 본 연구에서 사용한 LC-MS/MS 기기를 활용하여 분석한 결과 비자 열수추출물에는 gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, gallic acid, gallic acid, catechin 등이 함유되어 있는 것으로 확인되었다(Fig 1, Table 3). 활성성분 screening 분석에서 확인된 성분들은 대부분 폴리페놀이나 플라보노이드로 분류할 수 있는 성분들이었으며, 특히 항산화활성을 포함하는 다양한 생리활성에 기여도가 높은 것으로 보고되고 있는 성분

들이었다.

따라서 비자열수추출물이 함유하는 폴리페놀, 플라보노이드 성분함량을 분석함으로써 항산화 효능을 가질 것으로 추측할 수 있었다.

이와 같은 결과를 통해 본 연구에서는 비자 열수추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 분석(Figure 2A)한 결과 0.2 mg/ml 농도, 1.0 mg/ml 농도, 10.0 mg/ml 농도에서 농도가 높을수록 라디칼 소거 활성이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 단일 성분인 ascorbic acid와 효능을 비교하면, 0.2 mg/ml 농도에서 19.5 %, 1.0 mg/ml 농도에서는 47.4 % 정도로 낮았으나 10.0 mg/ml 농도에서는 99.4 %로 대등한 효능을 갖는 것으로 확인되었다. 한편, 아질산염 소거능을 분석(Figure 2B)한 결과 0.2 mg/ml 농도, 1.0 mg/ml 농도, 10.0 mg/ml 농도에서 농도가 높을수록 아질산염 소거 활성이 높아지는 것을 확인(Figure 2B)할 수 있었다. 단일 성분인 ascorbic acid와 효능을 비교하면, 0.2 mg/ml 농도에서 11.4 %, 1.0 mg/ml 농도에서는 56.2 %, 10.0 mg/ml 농도에서는 36.3 %로 전체 농도에 걸쳐 비교적 약한 효능을 갖는 것으로 확인되었다. 이와 같이, 비자 열수추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성과 아질산염 소거능을 분석한 결과, 농도에 따라 효능이 높아지는 것을 확인할 수 있었으나, 단일성분인 ascorbic acid에 비하면 낮은 효능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

위 항산화 효능을 토대로 하여 뇌신경 세포 수준의 항산화 효능을 확인하고자 먼저 뇌신경세포 증식율에 미치는 영향을 분석하여 보았다. 그 결과 쥐의 뇌신경아교종세포주인 C6 세포의 생존율에 대하여 0 mg/ml 농도부터 0.250 mg/ml 농도에 이르기까지 독성은 확인되지 않았다(Figure 3A). 여기에 추가적으로 쥐에서 적출한 흥선과 비장세포의 증식율에 대한 영향을 분석한 결과 C6 세포주에 처리한 비자 열수추출물과 같은 농도에서 흥선세포는 증식을 촉진하는 경향이 확인(Figure 3B)되었고, 비장세포는 별다른 경향성이 확인되지 않았다(Figure 3C). 따라서 본 연구에서 사용한 비자 열수추출물은 뇌신경 아교종 세포주에는 독성을 나타내지 않았지만 오히려 생체에서 적출한 흥선세포와 비장 세포에 대해서는 증식율이 증가되어 안전성을 확인한 바 본 연구를 통해 비자 과육과 종자피를 이용해 다양한 제품으로의 활용이 가능하리라 판단하였다.

세포에 대한 안전성이 확인된 농도에서 항산화 효능이 있는지를 확인하기 위하여 free radical과 hydrogen peroxide 등으로부터 세포를 보호하는 항산화제인 glutathione¹⁷⁾의 함량을 측정하였다. 쥐의 뇌신경아교종세포주인 C6 세포에 비자 열수 추출물을 0 mg/ml, 0.031 mg/ml, 0.063 mg/ml 농도로 처리한 결과 Total glutathione 함량이 각각 130.6 %, 166.9 %로 농도의존적으로 증가하는 것을 확인(Figure 4A)할 수 있어 비자 추출물은 DPPH 라디칼 소거 활성과 아질산염 소거능 등과 함께 분석한 결과 항산화 효능이 있는 것으로 생각된다

쥐의 뇌신경아교종세포주인 C6 세포의 산화적 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하기 위하여 산화적 스트레스를 일으켜 신경세포에 손상을 주는 sodium nitroprusside (SNP)와 hydrogen peroxide¹⁸⁾, 살충제 용도로 사용되어 생체의 각종 세포에 산화적 영향을 주는 rotenone¹⁹⁾ 등을 처리하여 산화적

스트레스에 의한 세포손상을 유발한 다음 비자열수추출물이 0 mg/ml, 0.031 mg/ml, 0.063 mg/ml 농도에서의 보호효과가 있는지에 대하여 확인하였다. 그 결과 H₂O₂ 유발 산화적 손상시 세포생존율 30.7 %에 대하여 0.031 mg/ml 처리시는 24.0 %로 보호효과가 없었으나, 0.063 mg/ml 처리시 41.0 %로 보호효과를 확인(Figure 4B)할 수 있었다. SNP 유발 산화적 손상시 세포생존율 7.3 %에 대하여 0.031 mg/ml 처리시는 15.6 %, 0.063 mg/ml 처리시 17.3 %로 농도가 상승함에 따라 보호효과도 상승하는 것을 확인(Figure 4C)할 수 있었다. 그리고 Rotenone 유발 산화적 손상시 세포생존율 58.8 %에 대하여 0.031 mg/ml 처리시는 65.5 %, 0.063 mg/ml 처리시 80.0 %로 농도의존적인 세포보호효과를 확인(Figure 4D)할 수 있었다.

이와 같이 비자의 성분분석, 열수추출물의 항산화 효능, 세포 수준에서 안전성을 확인한 농도에서 뇌신경세포에 대한 항산화 효능 및 세포보호효과를 확인하여, 향후 뇌신경 퇴행성 질환에 대한 활용가능성을 확인할 수 있었다. 다만 비자의 독성에 대한 문헌연구²⁰⁾를 볼 때 과량복용시 腸腸하게 하여 泄瀉를 유발할 수 있고, 肺胃의 實熱로 인한 해수 증상을 악화시킬 수 있으며, 墮胎의 가능성이 있으므로 이와 같은 환자의 경우에는 내복시 신중해야할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 비자의 열수 추출물에 대한 항산화 활성 및 뇌신경세포에 대한 산화적 손상에 대한 보호효과를 확인하여 천연 소재로서의 활용가능성을 높일 수 있는 결론을 얻었다.

1. 비자열수추출물의 총 플라보노이드 함량은 0.36 ± 0.14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 였으며, 총 폴리페놀 함량은 0.36 ± 0.14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 확인되었으며, gallic acid, gallic acid, gallic acid, catechin, caffeic acid, chlorogenic acid 등이 함유되어 있는 것으로 확인 되었다.
2. 비자열수추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성과 아질산염 소거능은 농도 의존적인 것으로 확인 되었다.
3. 비자열수추출물은 0-0.250 mg/ml 농도에서 C6 뇌아교종세포주와 쥐에서 적출한 흥선 및 비장 세포에 대하여 안전한 것으로 확인되었다.
4. 비자열수추출물은 0.031 mg/ml, 0.063 mg/ml 농도에서 유의성 있게 Total glutathione 함량이 증가하는 것으로 확인되었다.
5. 비자열수추출물은 H₂O₂, SNP, Rotenone이 유발하는 산화적 스트레스에 의한 세포손상에 대하여 0.031 mg/ml, 0.063 mg/ml 농도에서 보호효과가 있는 것으로 확인되었다.

결론적으로 비자열수추출물은 항산화 활성 효과가 있다고

보여 지며, 산화적 스트레스에 의한 뇌세포보호효과를 갖는 천연소재로서 활용가능성을 확인할 수 있었다.

References

1. Korea Food and Drug Administration, The Korean Herbal Pharmacopoeia IV, Korea Food and Drug Administration, 2012 : 165.
2. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine Schools, Herbology, Seoul : Younglimsa, 2011 : 381-2, 423-4.
3. Jeon HS, The Components and Physiological activities of the *Torreya nucifera*, Graduate School Daegu Haany University Master's thesis, 2008 ; 1-87.
4. Jeon HS, Lee YS, Kim NW, The Antioxidative Activities of *Torreya nucifera* Seed Extracts, J Korean Soc Food Sci Nutr, 2009 : 38(1) : 1-8.
5. Calogero EC, Giovanni M, Rosario V, Venerando R, Salvatore SS, Margherita F, Mario Z, Alessandra N, Metals and neurodegenerative diseases. A systematic review, Environmental Research, 2017 ; 159 : 82-94.
6. Vijay KR, Andrew JS, Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders, Am J Neurodegener Dis, 2013 ; 2(3) : 148-149.
7. Folin O, Denis W, A colorimetric method for determination of phenols(phenol cerivatives) in urine, J Biol Chem, 1915 ; 22 : 305-8.
8. Moreno MIN, Isla MIN, Sampietro AR, Vattuone MA, Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several region of Argentina, J Enthropharmacology, 2000 ; 71: 109-14.
9. Blois MS, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 1958 ; 181 : 1199-200.
10. Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F, Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins, Agric Biol Chem, 1987 ; 51 : 1333-8.
11. Wysocki LJ, Sato VL, Planning for lymphocytes; A method for cell selection, Proc Natl Acad Sci, 1978 ; 75(6) : 2844-8.
12. Mizel SB, Rosenstreich DL, Regulation of lymphocyte-activating factor (LAF) production and secretion in P388D1 cells ; identification of high molecular weight precursors of LAF, J Immunol Methods, 1979 ; 122(6) : 2173-9.
13. Liu RH, Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention : mechanism of action, J, Nutr, 2004 : 3479-85.
14. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans, Am J Clin Nutr, 2005 ; 81 : 230-42.
15. Dewick PM, Medicinal natural products, Chichester : Wiley & Sons, 2002 ; 149-51.
16. Lee YJ, Isolation and analysis of dietary polyphenols from various plant sources, Graduate School Chosun University Master's thesis, 2015 : 4-5.
17. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, DeTata V, Casini AF, The changing faces of glutathione, a cellular protagonist, Biochem Pharmacol, 2003 ; 66(8) : 1499-503.
18. Thais P, Maria BM, Alcir LD, Marcelo F, Joao BTR, Cristina WN, Gilson Z, Jovino SF, Rodrigo BL, Jeferson LF, Antioxidant effects of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membrains ; An in vitro evaluation, Chemicobiological Interactions, 2006 ; 164 : 126-35.
19. Molina-Jiménez MF, Sánchez-Reus MI, Andres D, Cascales M, Benedi J, Neuroprotective effect of fraxetin and myricetin against rotenone-induced apoptosis in neuroblastoma cells, Brain Res, 2004 ; 1009(1-2) : 9-16.
20. Roh SS, Seo BI, Kim JJ, Park JH, A philological study on poisoning of *Torreyae Semen*, JAOM, 2013 ; 13(1) : 21-4.