한국식생활문화학회지 35(6): 605-612, 2020
J. Korean Soc. Food Cult. 35(6): 605-612, 2020
본 논문의 저작권은 한국식생활문화학회에 있음.
Copyright © The Korean Society of Food Culture

ISSN 1225-7060(Print)
ISSN 2288-7148(Online)
https://doi.org/10.7318/KJFC/2020.35.6.605

방글라데시 식물 추출물의 항산화 및 항염 효과 연구

유소현[1] · 김건희[1,2,*]
[1]덕성여자대학교 바이오헬스융합학과, [2]덕성여자대학교 식품영양학과

Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Plant Extracts from Bangladesh

SoHyeon You[1], Gun-Hee Kim[1,2,*]
[1]*Bio-Health Convergence Major, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea*
[2]*Department of Food and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea*

Abstract

In this study, 11 plant extracts from Bangladesh were used to evaluate the total phenolic and flavonoid content, *in vitro* antioxidant activities using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS), and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. Also, the inhibitory effect of nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 macrophage cell line and the neuroprotective effect on H_2O_2-induced PC12 cells were tested. Our results revealed that *Piper betle L*. showed the highest total phenolic content (162.2 mg GAE/g extract) among the 11 plants from Bangladesh. Most plants showed strong radical scavenging effects and ferric reducing antioxidant power. Besides, *Piper betle L*. protected PC12 neuronal cells against H_2O_2 related oxidative stress in LPS-induced PC12 cells. Regarding the anti-inflammatory effect, *Piper betle L*. significantly inhibited NO accumulation in LPS-induced RAW 264.7 cells. Our results provide evidence that *Piper betle L*. could be useful for the development of functional health foods.

Key Words : Bangladesh plants, polyphenol, antioxidative activity, neuroprotection, anti-inflammation

I. 서 론

산소는 신체 내부에서는 에너지를 만들고, 정상적인 대사활동을 하는데 반드시 필요한 물질이지만, 반응성이 큰 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS)로 전환되면 생체에 손상을 입히는 양면성을 가지고 있다(Nho et al. 2018). 활성산소는 superoxide anion radical, hydroxy radical singlet oxygen 및 H_2O_2 등이 있으며, 이들의 강한 산화력으로 생체에 산화적 스트레스를 야기하여 세포, 조직의 손상, 단백질 및 DNA의 변형을 일으킬 뿐 아니라 세포 내 염증 유발 인자를 활성화 시켜 체내 염증을 일으킨다(Park et al. 2011; Nho et al. 2018). 인체는 산화촉진과 산화억제가 균형을 이루어 체내 항상성을 유지하고 있는데, 외부의 여러 요인들에 의하여 균형상태가 깨지게 되면 산화 스트레스가 일어나게 되어 암, 동맥경화, 당뇨병, 퇴행성 질환 등 수많은 질병이 일어나게 된다(Kim et al. 2012).

면역반응은 외부 자극으로부터 물리적 및 화학적 손상을 입을 경우 조직을 방어하기 위한 작용으로, 과도한 방어작용이 일어날 경우, 정상 조직까지도 손상을 입힐 수 있다(Park et al. 2011). 대식세포(macrophage)는 이러한 면역반응을 담당하는데, 염증을 촉진하는 cytokine이나 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 자극에 의하여 활성화된다(Lee et al. 2017). 활성화된 대식세포는 염증성 cytokine을 분비하게 되는데, cyclooxygenase-2 (COX)의 발현을 유도하여 염증반응을 매개 및 가속화시킨다(Yang et al. 2019). 또한, NO는 반응성이 높아 단백질 및 지질의 과산화를 일으켜 세포 독성을 유도하는데, ROS와 결합하게되면 보다 반응성이 강한 형태로 전환되며, 단 시간에 신경세포에 손상을 일으킨다고 보고되었다(Kim et al. 2007). 따라서 질병의 발병 및 가속화를 억제하기 위하여 항산화제의 역할이 중요하다고 할 수 있다.

현재까지 항산화제에 대한 연구는 오랫동안 이루어져 왔으며, 효과와 경제적인 이유로 주로 사용되고 있는 것으로는 BHA (butylated hydroxy anisole), BHT (butylated hydroxy toluene) 등과 같은 합성항산화제가 있다. 그러나, 최근 인체 독성과 부작용에 대한 인체 안전성이 제기됨에 따라 소비가 감소하고 있는 추세이다(Rim et al. 2000; Song et al. 2000). 반면, 천연 식물은 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있으며, 합성 항산화제에 비하여 부작용이 적어 최근 합성항

*Corresponding author: Gun-Hee Kim, Department of Food and Nutrition, Duksung Women's University, 33 Samyang-ro 144-gil, Dobong-gu, Seoul, Korea
Tel: 82-2-901-8496 Fax: 82-2-901-8661 E-mail: ghkim@duksung.ac.kr

산화제를 대체 할 소재로 관심을 받고 있는 추세이며, 이에 따른 천연 유래의 기능성 소재 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Eo et al. 2020).

방글라데시는 아열대 기후에 속하는 서아시아 국가 중의 하나로, 세계 생물다양성 중심지로 알려진 만큼 풍부한 약용 식물과 이를 이용한 다양한 민간요법들이 보고되었다 (Chowdhury et al. 2010). *Sarcochlamys pulcherrima* Gaudich. 은 열을 내리며 가려움을 완화하는데 사용이 되었고, *Macrosolen cohinchinensis* Tiegh는 황달을 치료하고(Rahman et al. 2007), *Saraca thaipingensis* Cantley 는 거담제로(Prachayasittikul et al. 2012), *Albizia odoratissima* Benth. 껍질 부분은 피부 질환에 사용되는 등(Kumar et al. 2011), 현재까지도 현대의 화학 치료약이 아닌 자생식물을 이용한 전통 치료약을 이용하고 있다. 한편, 천연 식물자원을 이용한 다양한 민간요법들이 보고되었음에도, 이들의 구체적인 기능적 효과 및 매커니즘에 대한 연구는 미비한 실정이다(Rahman et al. 2008; Rahmatullah et al. 2009). 따라서 본 연구에서는 방글라데시 자생 식물의 기능적 효과에 대한 데이터베이스 구축을 목적으로 방글라데시 식물 11종의 페놀 및 플라보노이드 함량에 따른 항산화 및 항염 활성을 평가하여 식물이 함유하고 있는 생리활성을 탐구하였으며, 추후 기능성 식품으로의 개발을 위한 가능성을 확인하였다.

II. 연구내용 및 방법

1. 식물 추출물

본 실험에 사용된 11종의 방글라데시 식물추출물은 해외생물소재센터(IBMRC; International Biological Material Research Center, Daejeon, Korea)로부터 분양받아 사용하였으며, <Table 1>에 제시하였다. 제공받은 11종의 식물 추출물들은 200 mg/mL의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 stock한 뒤, −70°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

2. 시약 및 재료

Folin-ciocalteau reagent, 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), potassium persulfate, ferric chloride ($FeCl_3$), 4, 6-tripyridyltriazine 및 griess reagent, 등은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포 배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), RPMI 1640, phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), 0.25% trypsin-EDTA 및 penicillin/streptomycin은 WellGENE (Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

3. 총 페놀 함량 측정

본 연구의 총 페놀 함량은 각 추출물에 2 N Folin-Ciocalteu 용액과 2% Na_2CO_3 용액을 1:1:1로 혼합하여 1시간 실온에서 반응시킨 뒤, UV-Vis spectrophotometer (SpectraMax M2, Molecular Decives, USA)로 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 표준물질인 gallic acid (Sigma-Aldrich Co.)로 작성한 표준검량곡선으로부터 산출하였다.

<Table 1> The list of plants from Bangladesh used in this study

No.	Scientific name	Part
1	*Piper betle* L.	leaf
2	*Getonia floribunda* Roxb.	leaf
3	*Sarcochlamys pulcherrima* Gaudich.	leaf
4	*Macaranga denticulata* Mull. Arg.	leaf and stem
5	*Saraca thaipingensis* Cantley ex King	bark
6	*Bruguiera sexangula* Poir.	bark
7	*Macrosolen cohinchinensis* Tiegh.	leaf and stem
8	*Albizia odoratissima* Benth.	bark
9	*Saraca declinata* Miq.	bark
10	*Dipterocarpus turbinatus* Gaertn.	bark
11	*Rotala rotundifolia* Koehne	leaf and stem

4. 총 플라보노이드 함량 측정

본 연구의 총 플라보노이드 함량은 각 추출물에 diethylenglycol과 1 N NaOH를 1:10:1로 혼합하여 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 뒤, UV-Vis spectrophotometer로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 표준물질인 naringin (Sigma-Aldrich Co.)로 작성한 표준검량곡선으로부터 산출하였다.

5. DPPH 라디칼 소거능 측정

각 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 Ramos et al. (2003)의 방법을 본 시료에 맞게 변형하여 측정하였다. 각 추출물과 0.2 mM DPPH 용액을 30분 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 ascorbic acid를 사용하였으며, DPPH 라디칼 소거 활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거능(%)=(A−B)/A×100

A: Absorbance of the control
B: Absorbance of the sample

6. ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거 활성은 Re et al. (1999)의 방법을 본 시료에 맞게 변형하여 측정하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate을 혼합하여 24시간 동안 암소에 방치하여 stock solution을 제조하였다. 이후 PBS (pH 7.4)로 희석하여 ABTS reagent에 추출물을 가하여 5분간 방치

한 후, 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 ascorbic acid를 사용하였으며, ABTS 라디칼 소거 활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

ABTS 라디칼 소거능(%)=(A−B)/A×100

A: Absorbance of the control
B: Absorbance of the sample

7. 환원력 측정

환원력은 Benzie & Strain (1996)의 FRAP법을 본 시료에 맞게 변형하여 측정하였다. FRAP reagent를 제조하기 위하여 300 mM acetate buffer (pH 3.6)를 37에서 가온한 뒤, 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ)과 20 mM ferric sulfate ($FeSO_4$)을 가하여 제조하였다. 제조한 FRAP reagent에 각 건조된 추출물을 가하여 37ºC에서 10분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원력은 표준물질인 $FeSO_4$로 작성한 표준곡선에 대입하여 나타내었다.

8. 세포 배양

실험에 사용한 대식세포주인 RAW 264.7 세포와 신경세포주인 PC12 세포는 한국세포주은행(KCLB; Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. RAW 264.7 세포 배양을 위해 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 사용하였으며, 37ºC, 5% CO_2 incubator (MCO-15AC, SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였다. PC12는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 함유된 RPMI을 이용하여 37ºC, 5% CO_2에서 confluent 상태가 되도록 배양하였으며, 세포는 2일마다 계대 배양하였다.

9. 세포독성 측정

11종의 식물 추출물의 세포 독성 실험은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. MTT solution은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide을 5 mg/mL의 농도로 PBS에 녹여 사용하였다. RAW 264.7 세포와 PC12 세포를 각각 1.0×10^5 cells/well 및 1.0×10^4 cells/well 농도로 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 배양한 한 후, 추출물을 처리 하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, MTT 용액을 첨가한 후 5% CO_2 incubator에서 4시간 배양시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 추출물 첨가군과 무첨가군의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

10. NO 생성 저해 능력 측정

RAW 264.7 세포로부터 생성된 Nitric oxide (NO)의 양은 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. RAW64.7 세포를 1×10^5 cell/well의 농도로 96 well plate에 분주하여 37ºC, 5% CO_2 incubator에서 24 hr 배양하였다. 배양한 세포에 추출물을 처리하여 4시간 동안 배양한 뒤, LPS를 1 μg/mL 첨가하여 20시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100 μL를 회수한 뒤, 동량의 Griess 시약을 혼합하여 상온에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성량은 무첨가군 대비 추출물 첨가물을 백분율로 나타내었다.

11. 산화스트레스에 대한 신경세포 보호효과

산화스트레스에 대한 신경세포 보호효과는 MTT법을 이용하여 측정하였다. PC12 세포를 1×10^4 cells/well 농도로 96well plates에 분주하고 24시간 배양하였으며, 각 추출물을 처리하여 24시간 동안 추가 배양시켰다. 배양 후, 350 μM H_2O_2를 3시간 동안 처리하여 산화스트레스를 유도하였다. 그 후, 각 well에 MTT 용액을 첨가해 4시간 동안 배양하였으며, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다

12. 통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며 mean±SD로 나타내었다. 통계처리는 SPSS 통계프로그램(ver. 18.0, SPSS Inc., USA)을 사용하였으며, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시한 후, Duncan's multiple test를 통해 $p<0.05$ 수준에서 사후검증을 실시하였다.

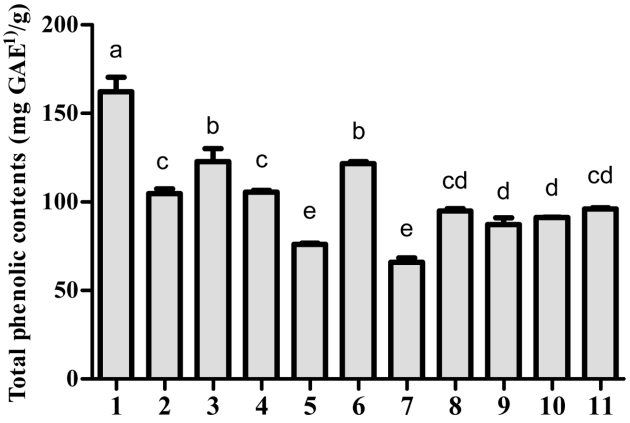
III. 결과 및 고찰

1. 총 페놀 및 플라보노이드 함량

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가진다(Kang et al. 2002). 페놀성 화합물은 Benzene 고리 구조에 hydroxyl기가 치환되어 붙어있는 구조를 가지고 있는데, 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하는 특징이 있으며, hydroxyl기의 갯수 및 위치에 따라 각기 항산화, 항염 및 항암 효과 등의 다양한 생리활성을 나타낸다(Byun et al. 2018; Kim et al. 2018).

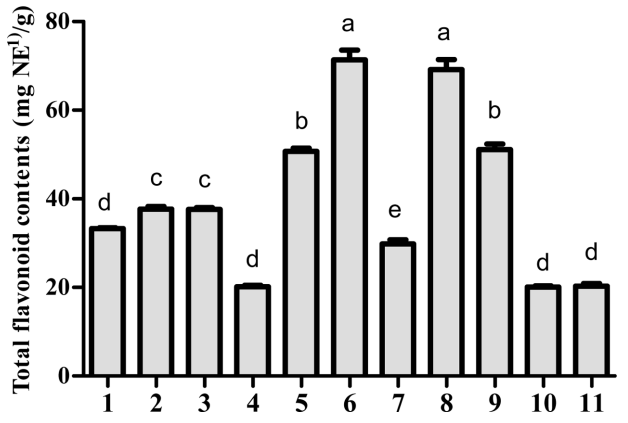
11종의 방글라데시 식물 추출물의 총 페놀 함량은 <Figure 1>과 같다. 총 페놀 함량은 44.1-162.2 mg GAE/g의 범위로 전체 평균 102.6 mg GAE/g extract을 나타내었다. 그중 *Piper betle* L. (162.2 mg/g extract), *Sarcochlamys pulcherrima* Gaudich. (122.6 mg/g extract) 그리고 *Bruguiera sexangula* Poir. (121.6 mg/g extract) 순으로 평균 이상의 페놀 함유량을 나타내었다. Kim et al. (2018)의 부위별 해당화의 페놀 함량을 확인한 연구에서 100 mg/g 이상의 페놀 함량을 나타낸 잎과 꽃에서 뛰어난 항산화 활성을 나타내었는데, 본 연구에 사용된 식물 추출물들이 대체적으로 100 mg/g와 비슷하거나 더 높은 페놀 함량을 나타낸 것으로 보아 우수한 생리활성을 나타낼 것으로 생각된다.

플라보노이드는 C6-C3-C6을 기본 골격으로 하는 페놀계 화합물의 총칭으로, 식물의 모든 부위에 함유되어 있으며 당



<Figure 1> Total phenolic contents.

All values are expressed as the means±SD of tiplicate analyses. Different superscript letters on the bars show significant differences among groups ($p<0.05$). [1)]GAE: gallic acid equivalent.



<Figure 2> Total flavonoid contents.

All values are expressed as the means±SD of tiplicate analyses. Different superscript letters on the bars show significant differences among groups ($p<0.05$). [1)]NE: naringin equivalent.

과 결합한 배당체 형태로 자연계에 널리 분포되어있다(Kim et al. 2012). 플라보노이드는 친수성과 지용성 성질을 모두 포함할 수 있으며 유리기의 산화 연쇄반응을 막는 강한 라디칼 소거 활성을 가지고 있다고 보고되었다(Kim et al. 2014; Kim et al. 2018). 실험 결과, <Figure 2>에 제시한 바와 같이 총 플라보노이드 함량은 20.1-71.3 mg NE/g extract의 범위로 전체 평균 40.1 mg NE/g extract을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 *Bruguiera sexangula* Poir. (71.3 mg NE/g extract)과 *Albizia odoratissima* Benth. (69.2 mg NE/g extract) 순으로 높게 나타내어 페놀 함량과 다른 경향을 나타내었다. 이러한 결과로 유추해 보았을 때, 본 실험에 사용된 식물 추출물들이 함유하고 있는 페놀성 물질들 중 플라보노이드가 소량 함유되어 있으며, 플라보노이드 외에 다른 생리활성 물질들이 다량 함유되어 있을 것으로 생각된다. 이러한 결과는 Jeong et al. (2007a)의 양치식물을 이용한 실험과, Jeon et al. (2012)의 용매별 참취 분획 추출물을 이용하여 페놀 및 플라보노이드 함량을 분석한 실험에서도 확인할 수 있으며, 이러한 결과에 대하여 Jeon et al. (2012)은 식물의 페놀 함량이 높을 수록 플라보노이드 함량 또한 높은 것은 아니라고 보고하였다.

2. DPPH 라디칼 소거능

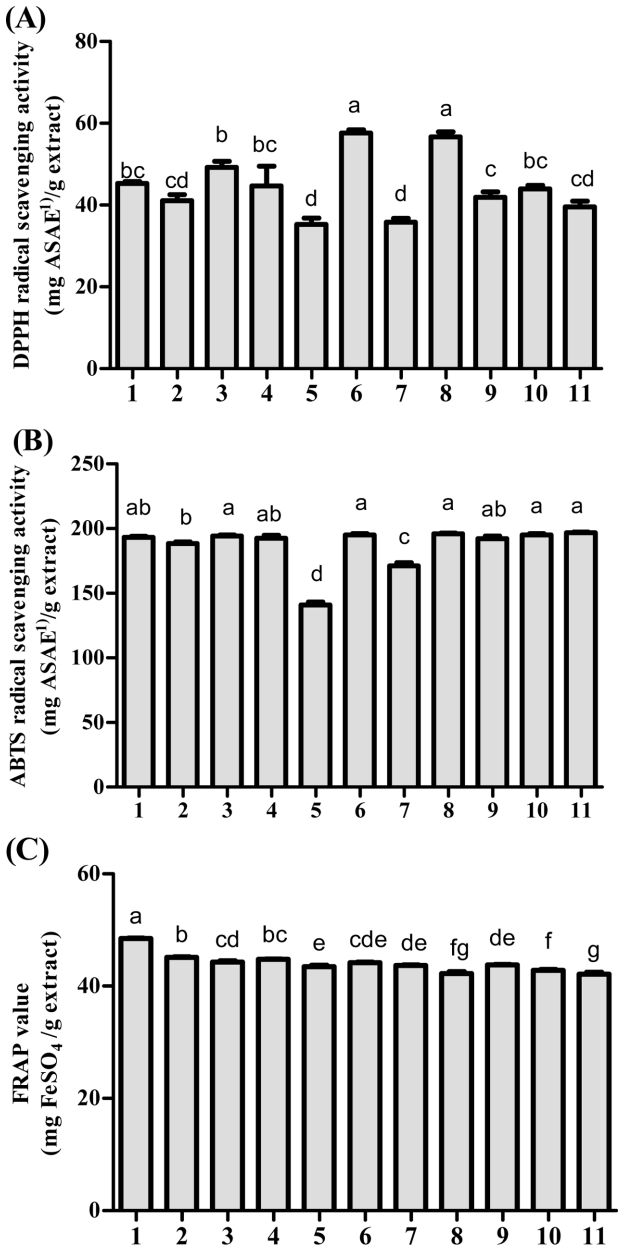
DPPH는 짙은 보라색을 띄는 비교적 안정한 free radical로, 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 전자를 얻거나 환원되는 전자 공여능에 의하여 황색으로 탈색되는데, 천연물질의 항산화 활성을 확인하는데 많이 이용이 되고 있다(Kang et al. 2002).

11종의 방글라데시 식물 추출물은 100 μg/mL의 농도로 희석하여 측정하였으며, 실험 결과는 <Figure 3(A)>에 나타내었다. 11종 식물 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 35.2-57.6 mg ascorbic acid equivalent (ASCE)/g extract의 범위였으며, 평균 44.6 mg ASCE/g extract로 확인되었다. 그 중, *Bruguiera sexangula* Poir., *Albizia odoratissima* Benth. 및 *Sarcochlamys pulcherrima* Gaudich.가 평균값 이상의 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 보였다. 반면, *Saraca thaipingensis* Cantley ex King와 *Macrosolen cochinchinensis* Tiegh.은 35.2 및 35.8 mg ASCE/g extract의 낮은 DPPH 소거활성을 보였다. 기존 여러 연구들에서 페놀 및 플라보노이드 함량과 라디칼 소거능이 밀접한 관계가 있다고 보고되었으며(Lee et al. 2005; Byun et al. 2018), 이러한 경향은 식물이 함유하고 있는 페놀성 물질이 라디칼 소거에 주된 기여를 한 것으로 사료된다. 한편 Kim et al. (2012)은 자생식물과 생약식물을 대상으로 페놀 및 플라보노이드 함량과 항산화 분석을 확인하였으며, 일부 식물들에서만 페놀 함량과 DPPH 소거능이 유사한 경향을 보이는 시료들이 있었으며, 다수의 식물들이 일관되지 않은 경향을 보였다. 이러한 결과에 대하여 Kim et al. (2012)은 식물에 함유된 여러 페놀 화합물 중 특정 성분이 뚜렷하게 생리활성을 나타내기 때문이라 보고하였다.

3. ABTS 라디칼 소거능

ABTS는 potassium persulfate와 반응하여 청록색의 라디칼을 생성하며, 항산화 물질에 의해 탈색이 되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하는 방법이다(You & Kim 2018).

11종의 방글라데시 식물 추출물은 100 μg/mL의 농도로 희석하여 측정하였으며, 실험 결과는 <Figure 3(B)>에 나타내었다. 11종 식물 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성은 140.8-196.8 mg ascorbic acid equivalent ASCE/g extract의 범위였으며, 평균 186.6 mg ASCE/g로 확인되었다. 대부분 평균값 이상의 높은 ABTS 라디칼 소거활성을 나타내어 DPPH 라디칼 소거활성보다 월등히 높은 결과를 보였는데, 이러한 결과에 대하여 Lee et al. (2005)은 친수성 및 소수성 항산



<Figure 3> Antioxidant activities of 11 plants from Bangladesh.
(A) DPPH radical scavenging activity (B) ABTS radical scavenging activity (C) Ferric reducing antioxidant power. All values are expressed as the means±SD of tiplicate analyses. Different superscript letters on the bars show significant differences among groups ($p<0.05$). [1)]ASAE: ascorbic acid equivalent.

화 물질과 반응하는 ABTS 시약의 특성때문이라고 보고하였다. 한편, *Saraca thaipingensis* Cantley ex King과 *Macrosolen cochinchinensis* Tiegh.의 ABTS 라디칼 소거능은 각각 140.8 그리고 171.2 mg ASCE/g extract로 다른 추출물들에 비하여 낮은 활성을 보였다. 이러한 경향은 앞선 DPPH 라디칼 소거능의 결과와도 유사하였는데, Ku et al. (2009)은 품종별 고춧잎의 항산화 활성을 분석한 연구에서 DPPH 및 ABTS 항산화 평가 실험이 유의적인 양의 상관관계를 갖고 있다고 보고하여 본 연구결과와 일치하였다.

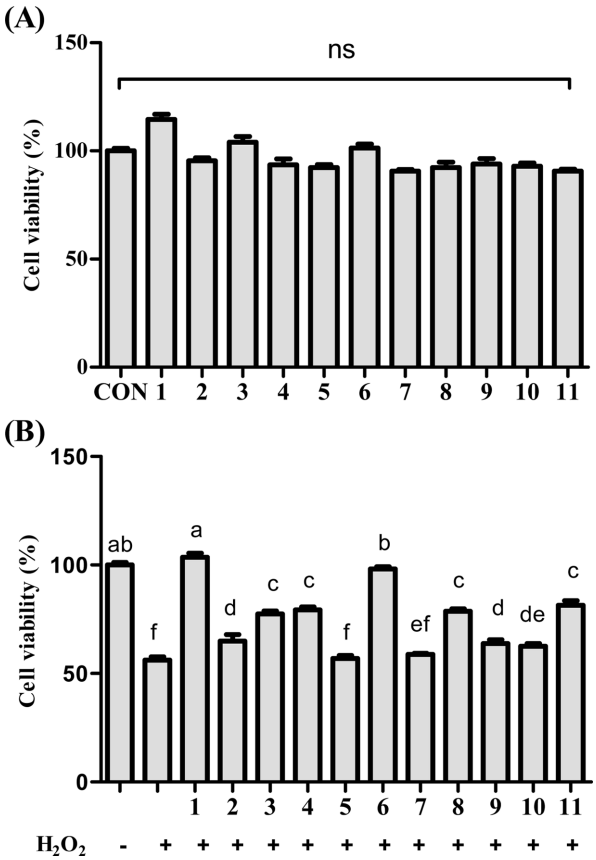
4. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

FRAP법은 철 이온의 환원력을 측정하는 방법으로 항산화제와 반응한 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) 복합체가 ferrous tripytidyl triazine (Fe^{2+}-TPTZ)으로 환원이 되어 푸른색으로 발색되는 원리를 이용한 방법으로 푸른색의 발색 정도에 따라 환원력을 확인할 수 있다(You & Kim 2018). 11종의 방글라데시 식물 추출물은 100 μg/mL의 농도로 희석하여 측정하였으며, 실험 결과는 <Figure 3(C)>에 나타내었다. 11종 식물 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성은 42.1-48.4 mg $FeSO_4$/g extract의 범위였으며, 평균 44.0 mg $FeSO_4$/g extract로 확인되었다. 그 중, *Piper betle* L.이 48.4 mg $FeSO_4$/g extract으로 가장 높은 환원력을 나타내었다. Kim et al. (2019)의 브라질산 커피원두를 이용하여 항산화 활성을 비교한 연구에서 40 mg $FeSO_4$/g 이상의 환원능을 나타낸 에스프레소 커피에서 모두 높은 라디칼 소거능과 항산화 활성을 나타내었다. 본 연구에서는 실험에 사용된 모든 식물 추출물들이 40 mg $FeSO_4$/g extract 이상의 높은 환원력을 나타내었는데, Kim et al. (2019)의 실험결과와 비교하였을 때, 본 연구의 식물 추출물들이 우수한 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 생각된다.

5. 항산화 활성을 통한 신경세포 보호효과

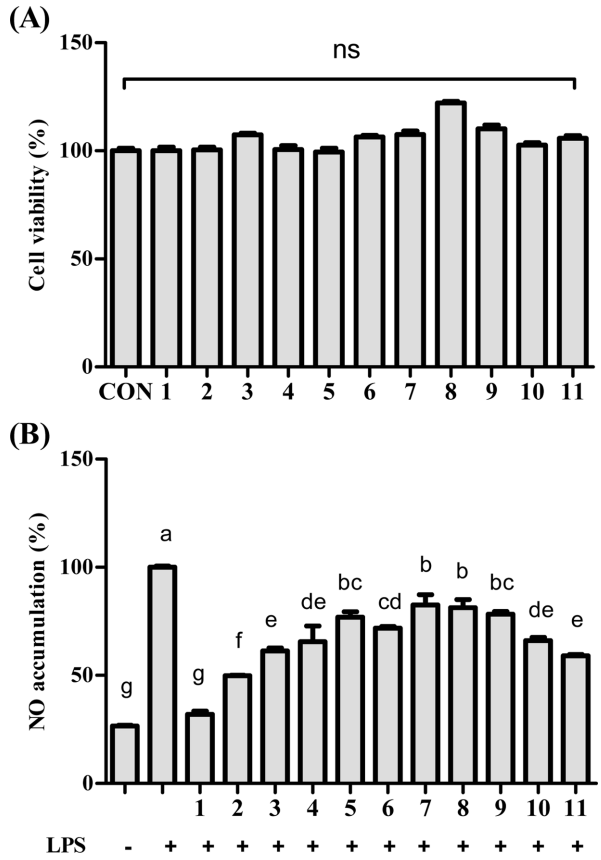
11종 식물 추출물이 신경세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각 추출물을 100 μg/mL 농도로 PC12 세포에 24시간 처리하였으며, MTT assay를 통하여 세포 생존율을 확인하였다. 실험 결과<Figure 4(A)>, 11종의 식물 추출물을 처리한 군에서 모두 90% 이상의 세포 생존율을 보여 PC12 세포에 대한 독성은 확인되지 않았다. 11종 식물 추출물의 세포 내 항산화 효과를 확인하기 위하여 PC12 신경세포에 각 추출물을 24시간 동안 처리한 뒤, 350 μM H_2O_2로 3시간 동안 산화스트레스를 유도하여 신경보호효과를 확인하였다. 실험 결과<Figure 4(B)>, H_2O_2로 산화스트레스를 유도한 군에서는 무처리군(100%) 대비 56.2%의 세포 생존율을 보였다. 11종의 방글라데시 식물 추출물을 처리한 결과, *Piper betle* L. 과 *Bruguiera sexangula* Poir.가 각각 약 114.6% 그리고 101.4%의 우수한 세포 생존율을 보여 산화 스트레스에 대한 신경세포 보호 효과를 확인할 수 있었다. 한편, 11종의 식물 추출물들 중에서 비교적 낮은 페놀 함량과 항산화 활성을 보였던 *Saraca thaipingensis* Cantley ex King 및 *Macrosolen cochinchinensis* Tiegh. 은 산화 스트레스에 대한 신경보호효과 역시 낮은 수치를 나타내었다.

뇌 조직은 대사를 위한 산소의 이용이 불가피하며, 활성산소에 대한 항산화효소가 다른 조직에 비하여 적어 ROS에 취약한 조직이다. 따라서 항산화제의 섭취는 신경세포의 손상 및 사멸을 억제하기 위해 중요하다(Byun et al. 2020). 기존



<Figure 4> Neuroprotection of 11 plants from Bangladesh in H_2O_2-induced PC12 cells.

(A) Viability of PC12 cells treated with 11 plants from Bangladesh. (B) Neuroprotection of 11 plants from Bangladesh in H_2O_2-induced PC12 cells. All values are expressed as the means±SD of tiplicate analyses. Different superscript letters on the bars show significant differences among groups ($p<0.05$). ns: not significant



<Figure 5> NO inhibition of 11 plants from Bangladesh in LPS-induced RAW 264.7 cells.

(A) Viability of RAW 264.7 cells treated with 11 plants from Bangladesh. (B) NO inhibition of 11 plants from Bangladesh in LPS-induced RAW 264.7 cells. All values are expressed as the means±SD of tiplicate analyses. Different superscript letters on the bars show significant differences among groups ($p<0.05$). ns: not significant

에 페놀성 화합물과 같은 천연 항산화제의 산화적 독성에 대한 뛰어난 신경세포 보호효과가 보고됨에 따라(Jang & Kim 2016), 본 연구의 방글라데시 식물 추출물들의 산화스트레스에 대한 신경세포 보호 효과는 식물이 함유하고 있는 페놀성 화합물의 항산화 효과에 기인한 것으로 사료된다.

6. NO 생성 억제효과

ROS는 조직 및 세포 손상을 일으키며 세포 내 염증 상태를 유도한다고 보고되었다(Lee et al. 2017). Nitric oxide (NO)는 L-arginine로부터 생성되는 높은 반응성을 가진 자유라디칼로, 적절한 수준에서는 신경전달, 혈관이완 및 세포 면역반응 같은 생체의 정상적인 기능에 중요한 역할을 한다. 그러나, 대식세포에 NO가 과도하게 축적되면 산화 스트레스를 유발하며 염증반응 및 세포 손상을 유발하고, 혈류의 흐름에 영향을 미치게 되면 심혈관계 및 뇌 질환을 유발할 수 있다(Jeong et al. 2007b; Lee et al. 2018; Eo et al. 2020). 이러한 산화적 스트레스를 제거하기 위해서는 항산화 효과뿐 아니라 항염 효과 또한 중요하다.

본 연구에서는 11종의 방글라데시 식물의 항염 효과를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 각 식물 추출물을 선처리한 후, 세균 내독소인 LPS로 염증을 유도한 뒤, NO 생성량을 확인하였다. 먼저, 식물 추출물의 RAW 264.7세포에 대한 독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였으며, 실험결과<Figure 5(A)>, 모두 90% 이상의 세포 생존율을 보여 추출물로 인한 세포 독성은 확인되지 않았다. RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하였을 때, 무처리군은 LPS 처리군(100%)에 비하여 약 26.6%의 NO 생성량을 나타내었다. 한편, 11종의 방글라데시 식물 추출물을 100 μg/mL의 농도로 선처리한 뒤, LPS로 NO 생성을 유도하여 각 식물 추출물의 NO 생성억제능을 확인한 결과<Figure 5(B)>, *Piper betle* L. 추출물의 NO 생성량이 LPS 처리군(100%) 대비 37%로, 무처리 군과 유사한 수치만큼 NO 생성을 억제하였다.

Piper betle L. 은 인도 및 서아시아에 자생하는 후추과의 덩굴식물로, 예로부터 기침을 완화하고, 소화를 촉진하며, 염

증으로 인한 붓기를 완화하는데 이용되었다고 보고되었다 (Dwivedi & Tripathi 2014). Cavicol, Chavibetol, Hydroxychavicol 및 Allylpyrocatechol 등의 다량의 생리활성 물질을 함유하고 있어 항박테리아, 항산화 및 항당뇨 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Rekha et al. 2014). 본 연구의 항산화, 항염 및 신경세포 보호효과는 *Piper betle* L. 가 함유하고 있는 페놀성 화합물의 뛰어난 생리활성 효과 때문인 것으로 사료되며, 차후, 생리활성물질에 대한 구조적 분석과 기능성에 대한 기전 연구가 요구된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 11종의 방글라데시 식물 추출물의 페놀 및 플라보노이드 함량, 항산화 활성(DPPH, ABTS 및 FRAP), 신경세포 보호 및 NO 생성 억제효과를 확인하였다. 실험 결과, 11종의 방글라데시 식물 추출물은 평균 102.6 mg GAE/g의 페놀 함량과 40.1 mg NE/g의 플라보노이드 함량을 나타내었으며, 우수한 라디칼 소거능과 환원능을 나타내었다. 또한, H_2O_2 산화 스트레스에 대하여 신경세포를 보호하였으며, LPS로 염증을 유도한 대식세포에서 효과적으로 NO를 억제하였다. 11종의 방글라데시 식물 추출물 중 가장 높은 페놀 함량과 뛰어난 생리활성을 나타낸 식물은 *Piper betle* L.로 확인되었다. 상기 실험 결과는 신규 해외 식물 소재의 생리활성에 대한 데이터를 구축할 수 있으며, 향후 각 식물들이 함유하고 있는 기능성 성분 분석 및 기능성 식품으로의 활용에 도움이 될 것으로 판단된다.

Author biography

SoHyeon You (Affiliation: Bio-Health Convergence Major, Duksung Women's University, Ph.D student, 0000-0001-9928-7379)

Gun-Hee Kim (Affiliation: Department of Food and Nutrition, Duksung Women's University, Professor, 0000-0001-8196-7149)

감사의 글

본 연구는 2020년도 덕성여자대학교 교내연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal. Biochem., 239(1):70-76

Byun EB, Kim MJ, Kim SJ, Oh NS, Park SH, Kim WS, Song HY, Han JM, Kim KW, Byun EH. 2020. Antioxidant activity and neuroprotective effects of ethanol extracts from the core of *Diospyros kaki*. Korean J. Food Sci. Technol., 52(1):60-66

Byun EH, Kim KW, Kim, YE, Cho, EJ, Min, HS, Lee, JH, Cho GS, Woon WJ, Kim BH, Ahn, DH, Park WJ. 2018. Comparison study of antioxidant activity and neuroprotective effects of barley sprout leaf, root, and stem ethanol extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 47(10):973-980

Chowdhury AR, Jahan FI, Seraj S, Khatun Z, Jamal F, Ahsan S. 2010. A survey of medicinal plants used by Kavirajes of Barisal town in Barisal district, Bangladesh. Am-Eurasian J. Sustain. Agric., 237-247

Dwivedi V, Tripathi S. 2014. Review study on potential activity of *Piper betle*. J. Pharmacogn. Phytochem., *3*(4):93-98

Eo HJ, Kim DS, Kang Y, Kim K, Park Y, Park GH. 2020. Antioxidant and immunoregulatory effects of Korean Rhamnaceae. J. Plant Biotechnol., 47(3):254-259

Jang MR, Kim GH. 2016. *Cirsium japonicum* extracts show antioxidant activity and PC12 cell protection against oxidative stress. Korean J. Food Sci. Technol., 48(2): 172-177

Jeon SM, Lee JY, Kim HW, Lee YM, Jang HH, Hwang KA, Kim HR, Park DS. 2012. Antioxidant activity of extracts and fractions from *Aster scaber*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 41(9):1197-1204

Jeong JA, Kwon SH, Lee CH. 2007a. Screening for antioxidative activities of extracts from aerial and underground parts of some edible and medicinal ferns. Korean J. Plant Res., 20(2):185-192

Jeong MY, Park HJ, Jeong JH, Kim JY, Kang JM, Lee NK, Lim S. 2007b. Inhibitory effect of *Angelica gigas* Nakai extract on nitric oxide production in RAW 264.7 cells. J. Korean Oriental Med., 28(2):155-165

Kang MH, Choi CS, Kim ZS, Chung HK, Min KS, Park CG, Park HW. 2002. Antioxidative activities of ethanol extract prepared from leaves, seed, branch and aerial part of *Crotalaria sessiflora* L. Korean J. Food Sci. Technol., 34(6):1098-1102

Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol., 44(3):337-342

Kim EK, Song KY, Kim YS, Kim IY, Kim SH, Kim, Kim KY, Jeong YH. 2019. Antioxidant activities of Brazilian *Coffea arabica* cv. Catuai coffee extracts with different roasting conditions. J. Korean Soc. Food Sci. Nutri., 48(8), 839-846

Kim JW, Um M, Lee JW. 2018. Antioxidant activities of hot water extracts from different parts of Rugosa rose (*Rosa rugosa* Thunb.). J. Korean Wood Sci. Technol., 46(1):38-47

Kim JY, Kim JS, Jung CS, Jin CB, Ryu JH. 2007. Inhibitory activity of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenging activity of extracts of *Perilla frutescens*. Kor. J. Pharmacogn., 38(2):170-175

Kim SM, Kim DY, Park HR, Seo JH, Yeom BM, Jin YJ, Pyo YH. 2014. Screening the antioxidant components and antioxidant activitiy of extracts derived from five varieties of edible spring flowers. Korean J. Food Sci. Technol., 46(1):13-18

Ku KM, Kim HS, Kim BS, Kang YH. 2009. Antioxidant activities and antioxidant constituents of pepper leaves from various cultivars and correlation between antioxidant activities and antioxidant constituents. J. Appl. Biol. Chem., 52(2):70-76

Kumar D, Kumar S, Kohli S, Arya R, Gupta J. 2011. Antidiabetic activity of methanolic bark extract of *Albizia odoratissima* Benth. in alloxan induced diabetic albino mice. Asian Pac. J. Trop. Med., 4(11):900-903

Lee MK, Ryu SI, Lee MH. 2018. Improvement of anti-oxidant and anti-inflammatory activities of aleurone layer extracts of black rice (*Oryza sativa* L.) by enzyme treatment. Korean J. Food Sci. Technol., 50(5):528-534

Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. Korean J. Food Sci. Technol., 37(2):233-240

Lee YM, Kim IS, Ghosh M, Hong SM, Lee TH, Lee DH, Lim BO. 2017. Antioxidant activity and NO inhibitory effect of bioconverted medicinal material using germinated green rice and *Hericium erinaceus* mycelium. Korean J. Medicinal Crop Sci., 25(5):305-314

Nho JH, Jung DE, Jung HK, Lee MJ, Jang JH, Sim MO, Jung JK, Cho HW. 2018. Inhibitory effect of an ethanol extract of Inulae flos on nitric oxide production, oxidative stress and human colorectal cancer cell lines. Korean J. Medicinal Crop Sci., 26(1):19-25

Park GH, Lee JY, Kim DH, Cho YJ, An BJ. 2011. Anti-oxidant and antiinflammatory effects of *Rosa multiflora* root. J. Life Sci., 21(8):1120-1126

Prachayasittikul S, Worachartcheewan A, Yainoy S, Lomchoey N, Kittiphatcharin P, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of *Saraca thaipingensis* Cantley ex Prain. Asian Pac. J. Trop. Biomed., 2(2):S796-S799

Rahman, MA, Uddin, SB, Wilcock CC. 2007. Medicinal plants used by Chakma tribe in Hill Tracts districts of Bangladesh. Indian J. Tradit. Knowl., 6(3):508-517

Rahman MS, Begum B, Chowdhury R, Rahman KM, Rashid MA. 2008. Preliminary cytotoxicity screening of some medicinal plants of Bangladesh. Dhaka Unive. J. Pharm. Sci., 7(1):47-52

Rahmatullah M, Noman A, Hossan MS, Rashid M, Rahman T, Chowdhury MH, Jahan R. 2009. A survey of medicinal plants in two areas of Dinajpur district, Bangladesh including plants which can be used as functional foods. Am Eurasian J. Sustain. Agric., 3(4):862-876

Ramos A, Visozo A, Piloto J, Garcýa A, Rodrýguez CA, Rivero R. 2003. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. J. Ethnopharmacol., 87(2-3):241-246

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(9-10):1231-1237

Rekha V, Kollipara M, Gupta B, Bharath Y, Pulicherla KK. 2014. A review on *Piper betle L.*: nature's promising medicinal reservoir. Am. J. Ethnomed., 1(5):276-289

Rim YS, Park YM, Park MS, Kim KY, Kim MJ, Choi YH. 2000. Screening of antioxidants and antimicrobial activity in native plants. Korean J. Med. Crop Sci., 8(4):342-350

Song JC, Park NK, Hur HS, Bang MH, Baek NI. 2000. Examination and isolation of natural antioxidants from Korean medicinal plants. Korean J. Med. Crop Sci., 8(2):94-101

Yang EJ, Kim MS, Kim SY, Hyun CG. 2019. Anti-inflammatory activity of *Euphorbia jolkini* extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J., 34(2):120-125

You SH, Kim GH. 2018. Phenolic compounds from antioxidant plant materials and their protective effect on PC12 cells. J. Korean Soc. Food Cult., 33(1):86-94

Received December 15, 2020; revised December 22, 2020; accepted December 22, 2020