

보리 품종별 주정 추출물의 항산화 활성 및 간 보호 효과

양지영 · 함현미* · 이현진** · 김현영* · 우소연 · 서우덕*** · †이미자***

농촌진흥청 국립식량과학원 작물기초기반과 박사후전문의연구원, *농촌진흥청 국립식량과학원 작물기초기반과 농업연수사,
농촌진흥청 국립식량과학원 작물기초기반과 연구원, *농촌진흥청 국립식량과학원 작물기초기반과 농업연구관

Antioxidative and Hepatoprotective Effects of Ethanol Extracts from Different Barley Cultivars

Ji Yeong Yang, Hyeonmi Ham*, Hyun-Jin Lee**, Hyun Young Kim*,
So-Yeun Woo, Woo Duck Seo*** and †Mi Ja Lee***

Postdoctoral Associate, Division of Crop Foundation, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

*Associate Researcher, Division of Crop Foundation, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

**Senior Researcher, Division of Crop Foundation, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

***Research Officer, Division of Crop Foundation, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

Abstract

Barley's nutritional value as a health food is increasing due to its excellent nutritional functionality. In this study, the levels of β -glucan, total polyphenols, and total flavonoids were analyzed in the ethanol extracts of different barley cultivars (Hinchalssal, Heuksoojeongchal, Betaone, Ganghochung, and Saechalssal). Also, the free radical scavenging abilities of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) and 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) were measured to determine their antioxidant activity. The results confirmed that Betaone extract contained highly active functional components and exhibited antioxidant activity. Next, we evaluated the hepatoprotective and inhibitory effects of reactive oxygen species (ROS) generated by barley ethanol extracts after inducing oxidative stress with *tert*-butyl hydroperoxide (tBHP) in HepG2 cells. Hinchalssal and Saechalssal extracts showed the most significant cytoprotective effect and also reduced ROS production significantly. These results suggest that Hinchalssal, Saechalssal, and Betaone represent potential natural antioxidant and hepatoprotective agents.

Key words: antioxidative, barley, hepatoprotective, ROS, tBHP

서론

간은 에너지 대사와 내인성 및 외인성 물질에 대한 해독 과정을 담당하는 기관으로, 간질환은 많은 질환 중 사망 원인의 전체 8위에 해당한다. 간질환 발병 시 간세포의 괴사, 세포 사멸에 의한 담즙분비 억제 및 단백질 합성 수준이 낮아지면서 비타민 흡수 저해, 지방 축적에 의한 식욕부진, 전신 권태감, 독성물질 배설 기능 저하 등의 증상이 나타나게 된다(Lee 등 2021). 알코올, 약물의 오남용, 바이러스 감염 등 다양한 간질환의 원인 중 산화 스트레스에 의해 생성되

는 과도한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 간 질환의 발병과 진행에 중요한 인자로 작용한다고 알려져 있다(Paracha 등 2013).

활성산소종(ROS)은 산소(O₂)가 4개의 전자를 받으면서 독성이 없는 H₂O를 만드는 도중에 생겨나는 부산물로, 반응성이 매우 강하여 주위의 화합물과 쉽게 반응하여 높은 반응성을 갖는다(Halliwell 등 1987). 세포 내에서의 ROS는 생성과 소멸의 균형에 의하여 일정 소량의 ROS가 존재하게 된다. 일시적으로 생성되는 낮은 농도의 ROS는 세포의 증식 및 생존 등의 다양한 세포 내 기능을 조절하는 신호 전달

† Corresponding author: Mi Ja Lee, Research Officer, Division of Crop Foundation, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea. Tel: +82-63-238-5332, Fax: +82-63-238-5305, E-mail: esilvia@korea.kr

물질로 중요한 역할을 한다(Cai 등 2014). 하지만 적정 수준 이상의 ROS는 일시적 또는 영구적인 세포 주기 정지를 유도할 뿐만 아니라 과도한 ROS의 생성은 DNA 등 세포 구성 요소에 대한 산화 스트레스를 초래하고, 이러한 산화 스트레스가 지속되면 동맥경화, 뇌졸중, 당뇨병, 종양과 같은 심각한 건강 문제를 초래한다고 알려져 있다(Kumari 등 2018). 따라서 과잉 생성된 ROS를 제거하여 산화 스트레스에 의한 여러 가지 질병을 예방하기 위해 천연 식품에서 항산화 물질을 찾으려는 노력이 끊임없이 이어지고 있다.

보리는 식품학적인 측면에서 쌀에 버금가는 우수한 전분질 식품으로 예로부터 우리의 식생활에서 중요한 위치를 차지해 왔다. 또한 보리는 밀가루의 5배, 쌀의 16배에 해당하는 많은 양의 식이섬유를 함유하고 있으며, 특히, 콜레스테롤 함량을 낮추는 것으로 알려진 수용성 식이섬유를 다른 식품보다 많이 함유하고 있어 웰빙식품으로 각광을 받고 있다. 특히, 보리의 대표적인 식이섬유인 (1→3)(1→4)-β-D-glucan이 체내 혈중 콜레스테롤을 저하시킨다고 알려져 있는 등(Newman 등 1989; Lee YT 1996; Lee 등 1997; Lee YT 2001) 영양학적 기능성이 매우 우수한 건강식품 소재로서의 식품학적 가치가 한층 높아지고 있다. 따라서 본 연구에서는 보리 품종에 따른 기능성분을 분석하고, HepG2 세포에 *tert-butyl hydroperoxide*(tBHP)로 산화 스트레스를 유발한 뒤 품종별 보리 주정 추출물의 간세포 독성 보호 효과 및 ROS 생성 억제 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 보리는 농촌진흥청에서 육성한 쌀보리 4품종(흰찰쌀보리, 새찰쌀보리, 베타원, 강호청)과 겉보리 1품종(흑수정찰)으로 국립식량과학원 시험포장에서 표준 재배법에 준하여 재배하였으며, 2019년 중순에 파종하여 2020년 6월에 수확하였고 14°C 저장고에 저장하였다. 추출물 제조에 사용한 보리는 0.2 mm체가 장착된 Retsch centrifugal mill(Zm 100, Retsch GmbH & Co., Haan, Germany)을 이용하여 분쇄한 분말을 사용하였다.

베타글루칸 분석에 사용한 Megazyme β-glucan assay kit는 Megazyme Co. International Ireland Ltd.(Bray Business Park, Bray, Co., Wicklow, Ireland)에서 구입하였다. 세포 배양에 사용된 fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 등은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO), 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil(DPPH), 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid

(ABTS), Trolox, *tert-butyl hydroperoxide*(tBHP), 3-(4,5-dimethyl thiazol 2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium(MTT), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA) 등은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 모든 시약은 1급 이상 시약을 사용하였다.

2. 주정 추출물의 제조

보리의 간세포 보호활성 검정을 위한 100% 주정 추출물은 각 보리 분말과 주정을 1:10 비율로 상온에서 24시간 동안 3회 진탕 추출한 다음 여과하고 진공회전농축기(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 동결건조를 한 다음 DMSO에 재용해해서 실험에 사용하였다. 이 때 추출 수율은 약 3.7~4.2%였다.

3. 이화학적 특성 분석

보리 주정추출물의 β-glucan 분석은 McCleary 방법(McCleary & Codd 1991; McCleary & Mugford 1992)을 이용한 Megazyme kit를 이용하여 510 nm에서 흡광도로 분석하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 Folin-Denis 방법(Official methods of analysis of the Association of official Analytical Chemists)으로 분석하였다(Seo 등 2002). 분쇄한 시료 1 g을 20 mL 80% MeOH로 24시간 추출한 후 10분간 200 rpm으로 원심분리 상등액을 분석에 이용하였다. 상등액 500 μL와 증류수 1 mL, Folin 시약(10%) 2.5 mL를 3분간 반응시킨 후 Na₂CO₃ 1 mL를 첨가하여 1시간 반응시켜 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 시료 250 μL에 증류수 1 mL와 5% NaNO₃ 75 μL를 가한 후 5분간 방치한 후, 10% AlCl₃ 6H₃O을 150 μL 첨가한 후 6분간 방치한다. 그 다음 1 M NaOH을 500 μL 첨가한 후 11분간 방치하고 510 nm에서 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도는 catechin hydrate를 이용하여 작성된 검량선으로부터 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

4. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성 측정

추출물에 대한 항산화활성은 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil(DPPH) 및 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid(ABTS) 유리라디칼 소거활성을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 96 well plate를 활용하여 측정하였으며, 99.9% 에탄올을 이용하여 0.2 mM DPPH 용액을 제조한 후, 라디칼 용액 200 μL에 시료 10 μL를 첨가하고 25°C에서 30분간 암반응 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

ABTS radical 소거활성은 ABTS 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 증류수에 녹여 24시간 동안 암소에

방치하여 ABTS 양이온을 형성시켰다. 그 후 이 용액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.4~1.5가 되도록 물 흡광계수($\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 이용하여 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 200 μL 에 추출액 10 μL 를 가하여 암반응 하였으며, 흡광도의 변화를 정확히 30분 후에 측정하였다. 이때 표준물질로 Trolox를 사용하였다.

5. 세포 배양 및 세포 생존율 측정

본 연구에 사용된 HepG2 세포는 Korean collection for type culture(KCTC, Daejeon, Korea)에서 구입하였으며, 10% FBS 및 100 units/mL penicillin/streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂로 조절된 배양기에서 배양하였다.

보리 주정 추출물의 세포 독성 및 산화 스트레스에 대한 보호효과를 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. HepG2 세포를 96 well plate에 $1 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ 농도로 각 well에 분주하였다. 24시간 후 배지를 버리고, 같은 양의 배지와 품종별 보리 주정 추출물을 20, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였다. 20시간 후 세포는 0.5 mM tBHP를 2시간 처리하여 산화 스트레스를 유도하였다. 배양이 끝난 후 각 well에 10 μL 의 MTT 용액을 넣고 4시간 반응 시킨 후 배양액을 제거하고, DMSO에 재용해하여 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였으며, 3회 반복 실험하였다.

6. ROS 생성 억제 효과

세포 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성능은 형광물질인 DCF-DA(D6883)를 이용하여 확인하였다. HepG2 세포를 96 well black plate에 $1 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ 농도로 각 well에 분주하고 24시간 배양하였다. 이 후 품종별 보리 주정 추출물(50 $\mu\text{g/mL}$) 또는 퀘르세틴(20 μM)이 포함된 배지로 교체하였다. 20시간 후 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척한 뒤, DCF-DA(25 μM)를 처리하여 37°C

에서 1시간 처리하였다. 다시 PBS로 2회 세척하여 남아있는 DCF-DA를 제거하고, 0.5 mM의 tBHP를 PBS에 혼합하여 분주하였다. 세포간 상응하는 ROS는 fluorescence spectrophotometer로 120분 동안 여기파장(excitation wavelength) 485 nm와 방출파장(emission wavelength)을 530 nm에서 형광의 세기를 측정하였다.

7. 통계분석

실험 결과에 대한 통계분석은 SAS Enterprise Guide 7.1 (Statistical analysis system, Cray, NC, USA)로 분석하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 시료간의 유의적인 차이는 one-way ANOVA(analysis of variance)로 분석한 뒤 신뢰구간 $p < 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test로 유의성을 검정하였으며, 다변량분석 기법을 활용하여 요인들간의 상관관계를 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 보리 품종별 주정 추출물의 베타글루칸, 총폴리페놀, 총플라보노이드

보리는 대표적인 식이섬유 성분인 베타글루칸(β -glucan)을 함유하고 있어 다이어트, 당뇨, 대장암 예방 및 심혈관질환 등 비만과 성인병 예방에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 보리 품종별 주정추출물의 베타글루칸, 총 폴리페놀, 총 플라보노이드를 분석하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다. 보리 품종별 주정추출물의 베타글루칸 함량은 0.38~0.88%였다. 일반적으로 보리의 베타글루칸 함량은 2.64~8.05%로 보고되어 있으나(Panfili 등 2008), 본 연구의 보리 품종에 따른 주정추출물의 베타글루칸 함량은 종실의 베타글루칸 함량보다 약 10배 적게 추출되었다. Lee 등(2011)은 찰성보리가 메성보리보다 베타글루칸 함량이 높은 것으로 보고한 바 있으며, 추출물에서도 찰성보리 품종인 새찰쌀, 흰찰쌀, 흑수정찰, 베타원의 베타글루칸 함량이 메성보리인

Table 1. β -Glucan, total phenol and total flavonoid content of ethanol extracts of barley cultivar

	β -Glucan (%)	Total phenol (%)	Total flavonoid (mg/g)
Hinchalssal	0.64±0.01 ^c	0.66±0.00 ^c	7.48±1.11 ^a
Heuksoojeongchal	0.57±0.01 ^d	0.61±0.03 ^d	5.29±0.02 ^b
Betaone	0.88±0.01 ^a	0.82±0.01 ^a	8.27±0.18 ^a
Ganghochung	0.38±0.00 ^e	0.51±0.00 ^e	5.56±0.09 ^b
Saechalssal	0.78±0.02 ^b	0.72±0.01 ^b	6.47±0.10 ^b

Values are mean±S.D. of three replicates.

Different small letters (^{a-d}) in the same items indicate a significant difference ($p < 0.05$) among different cultivar.

강호청보다 높았다. 현재까지 개발된 국내 보리품종들 중 베타글루칸 함량은 2015년에 개발된 베타원이 11.4%로 가장 높은 것으로 보고되었으며, 본 연구의 추출물에서도 베타원 품종 추출물이 가장 높은 베타글루칸 함량을 보였고, 다음으로 새찰쌀, 흰찰쌀, 흑수정찰, 강호청 순으로 품종별로 유의적인 차이를 나타내었다.

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법에 따라 표준물질 gallic acid를 기준으로 분석하였으며, 보리 품종별 추출물의 총 폴리페놀 함량은 0.51~0.82%였다. 베타원이 다른 품종의 추출물보다 1.1~1.6배 정도 높았고, 다음으로 새찰쌀과 흰찰쌀 품종순으로 시험 품종들간에는 유의적인 차이가 있었다.

플라보노이드는 파이토케미컬의 일종으로 C6-C3-C6 구조로 이루어져 있으며, 세계적으로 약 4,500여종 이상 알려져 있다. 담황색 또는 노란색을 띠는 색소화합물인 플라보노이드는 항산화 작용, 항염증, 항알레르기, 항바이러스 등 매우 다양한 효과들이 알려져 있으며, 보리 종실에 포함된 플라보노이드 함량은 62.0~300.8 µg/g으로 보고되었다 (Idehen 등 2017). 본 연구에서의 보리 품종별 추출물의 총 플라보노이드 함량은 5.29~8.27 mg/g으로 높았으며, 베타원과 흰찰쌀 품종이 높았고 새찰쌀과 강호청, 흑수정찰 품종순으로 낮았다.

2. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성

보리 품종별 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위하여 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다(Table 2). DPPH 라디칼 소거능을 분석한 결과 베타원과 흰찰쌀 품종이 다른 품종에 비해 높은 활성을 보였다. ABTS 라디칼 소거능의 경우에는 흑수정찰과 베타원 품종이 다른 품종에 비해 높은 활성을 보였으며 강호청이 가장 낮은 활성을 나타냈다. 실험방법에 따라 항산화 활성이 높은 품종은 약간의

Table 2. Radical scavenging activity of ethanol extracts of barley cultivar

	DPPH (%)	ABTS (µmol/g)
Hinchalssal	47.44±5.10 ^b	0.81±0.04 ^d
Heuksoojeongchal	50.56±0.96 ^b	1.66±0.06 ^a
Betaone	62.05±0.42 ^a	1.28±0.02 ^b
Ganghochung	39.26±0.86 ^c	0.64±0.01 ^e
Saechalssal	58.07±3.03 ^a	1.09±0.02 ^c

Values are mean±S.D. of three replicates.

Different small letters (^{a-e}) in the same items indicate a significant difference ($p<0.05$) among different cultivar.

차이를 보였으나 베타원 품종이 기능성분 함량과 항산화 활성에서 높은 경향을 보였다. 항산화 활성은 페놀류나 플라보노이드 물질에 기인하는 것으로 알려져 있는데(Kang 등 1996), 본 연구결과 역시 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 베타원이 다른 품종에 비해 높은 함량을 보여 이의 내용을 뒷받침하였다.

3. HepG2 세포 생존율 및 세포 독성 보호 효과

세포 생존율 및 세포 손상 보호 효과는 MTT assay를 통한 세포 생존율을 측정하였다. 먼저 품종별 보리 추출물이 HepG2 세포의 증식에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 HepG2 세포에 각 추출물을 각각 25, 50 및 100 µg/mL 농도로 처리하였다. 24시간 후 세포 생존율을 측정된 결과 25 µg/mL 농도에서 95.88~98.61%, 50 µg/mL 농도에서 95.28~103.25% 그리고 100 µg/mL 농도에서 90.76~96.51%로 측정됨에 따라 흰찰쌀, 흑수정찰, 베타원, 강호청 및 새찰쌀 100 µg/mL 농도까지는 HepG2 세포에 대한 세포 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 1).

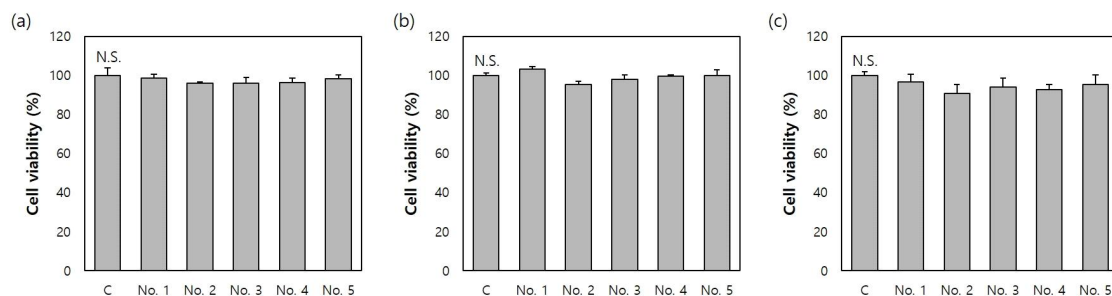


Fig. 1. Effect of barley ethanol extracts on viability of HepG2 cells. HepG2 cells were treated with barely ethanol extracts at (a) 20 µg/mL, (b) 50 µg/mL and (c) 100 µg/mL concentrations for 24 hours and the relative cell viability was assessed by EZ-Cytox cell viability assay. Data are presented as the mean±S.D. of three independent experiments. N.S. means no significant difference between all treatment group. Abbreviations: C, vehicle only; No. 1, Hinchalssal; No. 2, Heuksoojeongchal; No. 3, Betaone; No. 4, Ganghochung; No. 5, Saechalssal.

5가지 품종의 보리 추출물이 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것이 확인됨에 따라 세포에 tBHP로 산화 스트레스를 유도했을 때 세포 독성에 대한 추출물의 보호 효과를 알아보았다. HepG2 세포에 각 추출물을 25, 50 및 100 µg/mL 농도로 20시간 전처리한 후, 0.5 mM tBHP를 2시간 동안 세포에 노출시켰다. 그 결과 tBHP 처리군(25.11%, 29.91%, 24.02%)에 비하여 25, 50 및 100 µg/mL의 흰찰쌀 주정 추출물을 처리하였을 때 각각 32.32±3.25%, 103.86±7.26% 및 58.68±1.88%로 증가하였다. 또한 흑수정찰의 경우 26.54±1.73%, 71.62±3.94% 및 47.93±9.23%로, 베타원의 경우 37.38±4.78%, 97.39±2.93% 및 58.19±7.22%로, 강호정의 경우 35.64±3.02%, 88.34±6.37% 및 50.99±3.67%로 그리고 새찰쌀의 경우 42.31±4.85%, 109.03±1.93% 및 74.47±4.69%로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

5가지의 모든 품종의 보리 추출물에서 25, 100 그리고 50 µg/mL 농도 순으로 산화적 스트레스에 의한 세포 손상 보호 효과가 더 높음을 확인할 수 있었으며, 가장 보호 효과가 높은 50 µg/mL 농도 기준으로 볼 때 새찰쌀, 흰찰쌀, 베타원, 강호정 그리고 흑수정찰 품종 순으로 tBHP에 의해 유도된 산화적 스트레스를 효과적으로 제거하는 효과가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 비록 기능 성분 함량 및 항산화 활성에서 가장 높은 경향을 보였던 베타원 품종의 보호 효과가 새찰쌀 및 흰찰쌀 품종만큼 나타나지는 않지만, 그 차이가 근소하며 산화적 스트레스를 유발하지 않은 대조군(100%)만큼 세포 보호 효과를 나타내었다.

4. 보리 추출물의 기능 성분, 항산화 활성과 간세포 보호 효과의 상관관계

보리 주정추출물의 기능성분인 베타글루칸 총 페놀, 총 플라보노이드 함량 및 DPPH, ABTS 항산화 활성 등과 간세포 보호 효과와의 상관관계를 알아보았다(Table 3). 보리 품종 5종의 베타글루칸 함량은 총 페놀함량($r=0.991, p<0.001$) 및 DPPH 항산화활성($r=0.925, p<0.001$)과 높은 정(+)상관을 보였으며, 총 플라보노이드 함량과도 정상관($r=0.727, p<0.01$)을 보였다. 총 페놀 함량은 총 플라보노이드 함량과 높은 정상관($r=0.761, p<0.001$)을 보였고, DPPH 항산화 활성과도 높은 정상관($r=0.909, p<0.001$)을 보였다. 보리의 주요 기능 성분과 간세포 보호 활성과의 상관관계를 검토한 결과 간세포 보호 활성은 총 플라보노이드 함량과 정상관($r=0.596, p<0.1$)을 보였고, ABTS 항산화 활성과는 부(-)상관($r=-0.549, p<0.1$)을 보였으나 높은 상관관계를 보이지는 않았다.

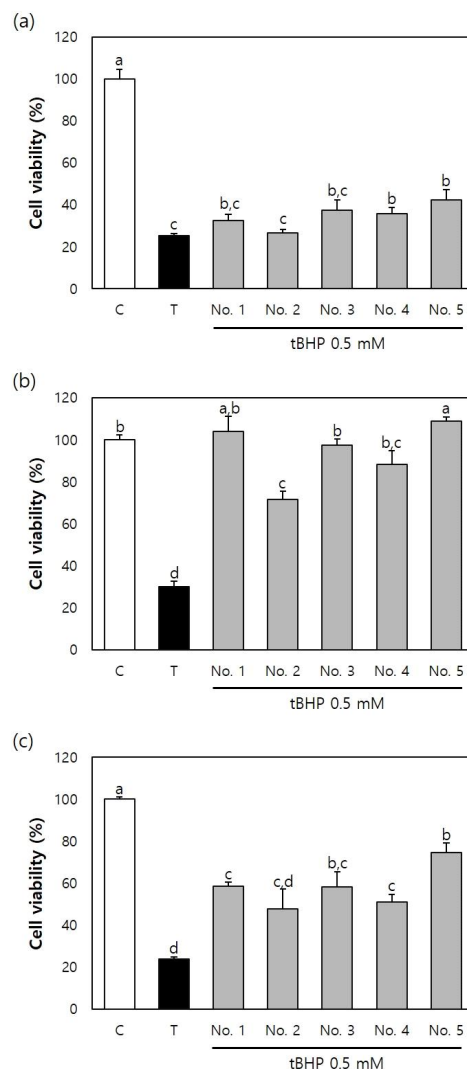


Fig. 2. Protective effect of barely ethanol extracts on against tBHP-induced cytotoxicity in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 0.5 mM tBHP for 2 hours after pre-treatment with barely ethanol extracts at (a) 20 µg/mL, (b) 50 µg/mL and (c) 100 µg/mL concentrations for 20 hours. Data are presented as the mean±S.D. of three independent experiments. Different small letters in the same items indicate a significant difference ($p<0.05$) compared to control. Abbreviations: C, vehicle only; T, vehicle + tBHP only; No. 1, Hinchalssal; No. 2, Heuksoojeongchal; No. 3, Betaone; No. 4, Ganghochung; No. 5, Saechalssal.

5. 활성산소종(ROS) 생성 억제 효과

tBHP에 의해 산화적 스트레스를 받은 HepG2 세포의 ROS 생성능은 DCF-DA 형광 염색법을 이용하였으며, 형광 물질의 발생 강도는 ELISA reader를 이용하여 측정하였다.

Table 3. Correlation coefficients between chemical composition, radical scavenging activity and protective effect of barely ethanol extracts on against tBHP-induced cytotoxicity in HepG2 cells

	β -Glucan	Total phenol	DPPH	ABTS	Total flavonoid	Protective effect
β -Glucan	1.000					
Total phenol	0.991***	1.000				
DPPH	0.925***	0.909***	1.000			
ABTS	0.384	0.385	0.536*	1.000		
Total flavonoid	0.727**	0.761***	0.614*	-0.103	1.000	
Protective effect	0.442	0.400	0.311	-0.549*	0.596*	1.000

* $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

양성 대조군으로는 플라보노이드계 물질 중 하나로 강력한 항산화 효능 및 간보호 효과를 가지고 있다고 알려져 있는 퀘르세틴을 사용하였다(Xu 등 2019). 5가지의 보리 품종 중 가장 유의적으로 세포 독성 보호 효과를 나타낸 흰찰쌀 및 새찰쌀 주정 추출물 50 μ g/mL와 퀘르세틴 20 μ M을 HepG2 세포에 각각 전처리한 후 tBHP(0.5 mM)에 의해 생성되는 ROS 억제 효과를 Fig. 3에 나타내었다. HepG2 세포에 tBHP 0.5 mM을 처리한 결과, ROS는 100 \pm 6.32%에서 170.95 \pm 16.77%로 증가하였다. 흰찰쌀 및 새찰쌀 주정 추출

물과 퀘르세틴에서 생성된 ROS는 각각 104.91 \pm 5.06%, 91.85 \pm 4.25%, 76.15 \pm 5.01%로 tBHP 무처리군 수준으로 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 흰찰쌀 및 새찰쌀 주정 추출물은 tBHP에 의한 세포 산화에 대한 세포 보호 효과와 활성산소종의 생성을 억제하거나 제거함으로써 간세포 사멸에 대한 보호 효과를 가지는 것으로 생각된다.

생체 내에서는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 및 glutathione reductase 등의 항산화 효소들이 존재하여 산화 스트레스로부터 세포를 방어하는 기능을 하고 있다. 하지만 노화의 진행, 서구화된 식습관 등에 따라 이러한 항산화 효소의 생성량이 감소되어 항산화 영양소의 섭취 및 보충의 필요성이 커지고 있는 실정이다(Kim 등 2019). 현재 과도하게 생성된 ROS를 제거하기 위해 다양한 인공합성 항산화제가 쓰이고 있으나, 안전성 논란이 있어 오래 전부터 먹어왔던 식품으로부터 인체에 무해하면서 우수한 항산화 효과가 있는 물질을 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(Youn 등 2015). 본 연구의 결과로 미루어 보아 보리 품종 중 특히 흰찰쌀과 새찰쌀 품종이 천연 항산화 소재로서 산화적 스트레스로 유도되는 다양한 질환의 예방 및 치료에 활용 가능성이 높을 것으로 생각된다.

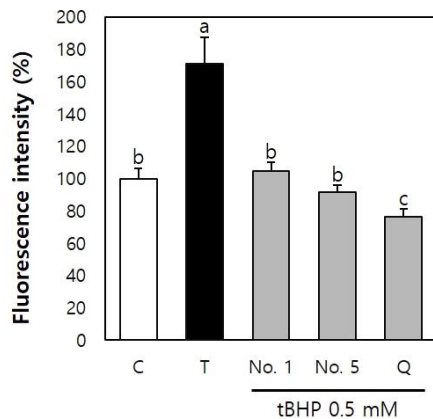


Fig. 3. Effect of Hinchalssal and Saechalssal on the generation of intracellular ROS levels in tBHP-treated HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 0.5 mM tBHP for 3 hours after pre-treatment with or without 50 μ g/mL extracts for 20 hours. After staining with DCF-DA fluorescent dye, DCF fluorescence intensity was measured using a fluorescence microplate reader. Data are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. Different small letters in the same items indicate a significant difference ($p < 0.05$) compared to control. Abbreviations: C, vehicle only; T, vehicle + tBHP only; No. 1, Hinchalssal; No. 5, Saechalssal; Q, quercetin 20 μ M.

요약 및 결론

본 연구에서는 국내산 보리의 간세포 보호 식품 소재로서의 이용 가능성을 알아보기 위한 기초자료를 확보하고자 보리 품종에 따른 기능성분을 분석하고, 보리를 주정 추출한 후 간세포 보호 활성을 비교하였다. 쌀보리 4품종(흰찰쌀보리, 새찰쌀보리, 베타원, 강호청) 및 겉보리 1 품종(흑수정찰) 주정 추출물 중 베타원 추출물이 다른 품종의 추출물보다 높은 베타클루칸 및 총 폴리페놀 함량을 보였고, 총 플라보노이드 함량은 베타원과 흰찰쌀 품종이 높았다. 또한 이러한 항산화 성분이 다량 분포하는 베타원이 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능 역시 다른 추출물보다 우수한 항산화

활성을 가지는 것으로 나타났다. 하지만 흰찰쌀과 새찰쌀 보리 주정 추출물이 베타원 품종보다 HepG2 세포에 tBHP 로 산화 스트레스를 유도한 뒤 나타나는 세포 독성에 대해 가장 유의하게 세포 보호 효과를 보였다. ROS 생성 또한 흰찰쌀과 새찰쌀 주정 추출물에 의해 효과적으로 억제되었다. 이러한 결과로 미루어 보아 유의성 있게 항산화 효과를 나타내는 흰찰쌀, 새찰쌀 그리고 베타원 품종이 질병과 노화의 예방뿐만 아니라 간 기능 개선을 위한 다양한 형태의 소재로 활용 될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 AGENDA 연구사업(ATIS 과제번호: PJ0135242021) 및 농촌진흥청 국립식량과학원 전문연구원 과정 지원 사업에 의해 이루어진 것임.

References

- Cai H, Xie Z, Liu G, Sun X, Peng G, Lin B, Liao Q. 2014. Isolation, identification and activities of natural antioxidants from *Callicarpa kwangtungensis* Chun. *PLoS ONE* 9:e93000
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. 1987. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 165:215-219
- Idehen E, Tang Y, Sang S. 2017. Bioactive phytochemicals in barley. *J Food Drug Anal* 25:148-161
- Kang YH, Park YK, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol* 28:232-239
- Kim HY, Seo HY, Seo WD, Lee MJ, Ham H. 2019. Evaluation of biological activities of wheat sprouts with different extraction solvents. *Korean J Food Nutr* 32: 636-642
- Kumari S, Badana AK, G MM, G S, Malla R. 2018. Reactive oxygen species: A key constituent in cancer survival. *Biomark Insights* 13:1177271918755391
- Lee MJ, Yoo JS, Kim YK, Park JC, Kim TS, Choi JS, Kim KJ, Kim HS. 2011. Varietal and annual variations of β -glucan contents in Korean barley (*Hordeum vulgare* L.) and oat (*Avena sativa* L.) cultivars. *Korean J Crop Sci* 56:284-291
- Lee SH, Shin MR, Lee JH, Roh SS. 2021. Effects of water extract of *Paeoniae Radix Alba* on a thioacetamide induced acute liver injury rat model. *J Nutr Health* 54:224-237
- Lee YT. 1996. Physicochemical characteristics and physiological functions of β -glucans in barley and oats. *Korean J Crop Sci* 41:10-24
- Lee YT, Seog HM, Cho MK. 1997. β -Glucan enrichment from pearled barley and milled barley fractions. *Korean J Food Sci Technol* 29:888-894
- Lee YT. 2001. Dietary fiber composition and viscosity of extracts from domestic barley, wheat, oat, and rye. *Korean J Food Nutr* 14:233-238
- McCleary BV, Codd R. 1991. Measurement of (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucan in barley and oats: A streamlined enzymic procedure. *J Sci Food Agric* 55:303-312
- McCleary BV, Mugford DC. 1992. Interlaboratory evaluation of β -glucan analysis methods. In the changing role of oats in human and animal nutrition. *Proceedings of the Fourth International Oat Conference Adelaide*
- Newman RK, Newman CW, Graham H. 1989. The hypocholesterolemic function of barley beta-glucans. *Cereal Foods World* 34:883-886
- Panfili G, Fratianni A, Criscio TD, Marconi E. 2008. Tocol and β -glucan levels in barley varieties and in pearling by-products. *Food Chem* 107:84-91
- Paracha UZ, Fatima K, Alqahtani M, Chaudhary A, Abuzenadah A, Damanhoury G, Qadri I. 2013. Oxidative stress and hepatitis C virus. *Virol J* 10:251
- Seo YW, Bu SY, Jeon WB, Kim DS, Heo HY. 2002. Antioxidant activity and total phenolic compounds in grain extracts of wheat, barley, and oat. *Korean J Crop Sci* 47:102-107
- Xu D, Hu MJ, Wang YQ, Cui YL. 2019. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules* 24:1123
- Youn Y, Kim HY, Park HM, Lee SH, Park JR, Hong SG, Kim YG. 2015. Protective effects of mulberry (*Morus alba*) sugar extracts on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cell. *Korean J Food Preserv* 22:751-757

Received 22 July, 2021
Revised 10 August, 2021
Accepted 06 September, 2021