

## 꾸지뽕 열매 조다당류 분획물의 산화방지 활성 및 신경세포 보호 효과

김이은<sup>1</sup> · 조은지<sup>1</sup> · 변의홍<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>공주대학교 식품공학과, <sup>2</sup>공주대학교 식품과학연구소

### Antioxidant and neuroprotective effects of crude polysaccharide fractions from *Cudrania tricuspidata* fruits

Yi-Eun Kim<sup>1</sup>, Eun-Ji Cho<sup>1</sup>, and Eui-Hong Byun<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Kongju National University

<sup>2</sup>Food Science Research Institute, Kongju National University

**Abstract** The current study examined antioxidant and neuronal cell protective effects of the crude polysaccharide fraction in *Cudrania tricuspidata* fruits (CTP). The radical scavenging activities of (1,1-diphenyl-picrylhydrazyl and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) and reducing power and FRAP of CTP were increased dose-dependently. In addition, the expression of neuroprotective effect of CTP was tested in HT22 mouse hippocampal cells. CTP treatment exhibited non cytotoxicity at dose levels below 500 µg/mL. Within this optimal concentration range, CTP treatment significantly increased cell viability in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated HT22 cells. Furthermore, CTP treatment increased superoxide dismutase (SOD) activity and decreased malonaldehyde (MDA) levels in HT22 cells. Therefore, these results indicate that the crude polysaccharide fraction from *Cudrania tricuspidata* fruits (CTP) possesses antioxidant activities and displays therapeutic potential as a useful source material in the development of brain disorder treatments targeting oxidative stress in neuronal cells.

**Keywords:** *Cudrania tricuspidata* fruits, polysaccharide, neuroprotective effects, antioxidant, neuronal cell

## 서 론

현대사회의 발달에 따른 생활수준이 향상되고 인간의 수명 연장이 증가함에 따라 노화 및 노화에 관련된 각종 질병인 퇴행성 신경질환에 대한 관심이 높아지고 있다. 퇴행성 신경질환은 정상적인 노화과정과는 달리 비정상적인 신경세포의 사멸에 의하여 뇌나 척수에 이상이 생겨 인지, 보행 및 운동능력 등이 감퇴하게 되는 질환이다.

생체조직의 노화를 비롯한 퇴행성 신경질환을 유도하는 주된 원인으로는 활성산소에 의한 산화적 스트레스가 기인되는 것으로 알려져 있다(Cho와 Sheen, 2009). 활성산소는 체내에 적정량이 존재할 때에는 생체방어 과정 중 하나로 미생물과 같은 병원체에 대한 살균작용을 통해 인체를 보호하는 작용을 하지만 과다하게 발생할 경우 생명현상의 둔화 및 신경세포의 사멸을 일으킬 수 있다(Kandaswami와 Middleton, 1994; Packer, 1994). 활성산소는 불안정하고 산화력이 높아 생체물질과 쉽게 반응하여 산화적 스트레스를 유발하여, 세포막을 손상시키고 단백질, 지방질, 탄수화물 및 DNA 등을 손상시켜 여러 조직의 세포를 노화

및 변형을 유도하여 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병, 암, 신경장애 등 다양한 질병이 발생하는 것으로 알려져 있다(Ames 등, 1993). 퇴행성 신경질환을 치료하기 위해 산화방지제 복용, 세포 이식 및 외과적 수술 등 다양한 치료법이 제시되고 있지만 대부분 뇌조직의 손상 등과 같은 부작용을 초래함으로써 산화방지성을 기반으로 한 신경세포를 보호할 수 있는 식품 유래 자연 소재의 개발이 요구되고 있는 추세이다(Yoon 등, 2007).

최근 식물유래 조다당류에서 높은 면역증진 활성이 보고되고 있으며, 이들은 비교적 낮은 독성과 넓은 범위의 치료 특성으로 의약품 및 건강유지 목적의 기능성식품의 소재로서 주목받고 있다(Schepetkin과 Quinn, 2006; Sim 등, 2003). 식물성 다당류들은 큰포식세포의 Fc receptor 발현을 촉진시켜 면역증진을 시킨다고 보고되며(Kim 등, 2002), 항염, 항보체, 항암, 항응고제 및 섬유소 형성 활성 등을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 이러한 다당류는 sulfate 함량과 분자량, 당골격의 sulfate 위치, 당성분에 의존적으로 각 세포의 수용기를 촉진시켜 산화방지제 및 세포 재생 효과 등의 기능성 및 생리활성물질로서의 연구가 널리 진행되고 있다(Wang 등, 2010). 최근 동물, 식물 및 미생물에 널리 분포되어있는 자연 다당류는 살아있는 유기체의 산화적 손상을 예방하는데 있어 자유 라디칼 제거제로서 중요한 역할을 하는 것으로 나타났으며 새로운 가능성 있는 산화방지제로서 탐구될 수 있다(Yu 등, 2009; Matkowski 등, 2008; Yuan 등, 2008).

꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*)은 뽕나무과에 속하며 낙엽성 교목으로 갯가시나무라고도 하며, 한국을 비롯한 일본, 중국 및 러시아 동부지역 등에서 많이 자생한다(Lee, 2006). 예로부터 나뭇잎, 줄기 및 뿌리는 습진, 폐결핵, 만성 통증, 타박상, 급성관절

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

Tel.: +82-41-330-1481

Fax: +82-41-330-1489

E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr

Received July 30, 2018; revised August 28, 2018;

accepted August 29, 2018

염 등의 한방치료에 사용되었으며, 동의보감에서는 열매가 강장, 자양, 숙취해소, 간 및 신장보호효과 등이 있는 것으로 알려져 있다(Choi 등, 2013; Heo, 1999). 꾸지뽕에 함유된 생리활성성분은 주로 폴리페놀 계통의 플라보노이드로서 플라보넨, 플라콘을, 플라본을 글리코사이드, 플라보논 글리코사이드, 잔톤 등이 많다고 알려져 있으며(Kim 등, 1993; Park 등, 1992; Zheng 등, 2013), 항균, 산화방지성, 항당뇨, 간보호, 항바이러스, 항비만, 항염증, 항알레르기, 미백효과 및 주름개선 등의 활성에 대한 연구가 보고되어 있다(Kim 등, 2008; Kim 등, 2012; Kwon 등, 2003; Lee 등, 2004; Lee 등, 2009; Lee 등, 2012). 하지만 기존의 연구된 결과들은 에탄올 및 메탄올과 같은 유기용매를 사용하여 추출한 분획물에 관한 연구들이며, 꾸지뽕 열매의 조다당류 분획물에 관한 연구는 포도당, 갈락토스, 아라비노스, 자일로스로 구성되어있는 구조분석에 관한 연구로, 활성에 관한 연구는 미비한 실정이다(Kim 등, 2014).

본 연구는 꾸지뽕 열매에서 분리된 조다당류 분획물의 항산화 활성 및 신경세포 보호 효과에 관하여 알아보기 위하여 항산화 활성 및 마우스 뇌신경세포에 꾸지뽕 열매의 조다당류 분획물을 처리하여 세포생존율, 세포내 산화방지성 효소 superoxide dismutase (SOD) 및 지방질과산화 생성물 malondialdehyde (MDA)의 분비능을 관찰해 보았다.

## 재료 및 방법

### 꾸지뽕 열매 조다당류(CTP)의 제조

충청남도 예산군에서 구매한 건조된 꾸지뽕 열매를 실험실용 분쇄기(NSG-1002SS, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄하여, 꾸지뽕 분말 50 g에 400 mL의 증류수(DW)를 가하여 100°C에서 2시간 동안 열수 추출하였다. 추출물을 거름종이(No. 4, Whatman, Kent, UK)로 여과 후 여과액에 70% 에탄올을 가하여 4°C에서 12시간 동안 방치한 후 원심분리(3,200 rpm, 20 min)하여 침지된 조다당류(CTP)를 분리하였다. 추출물을 거름종이(No. 42, Whatman, Kent, UK)로 여과 후 원심분리(3,200 rpm, 20 min)하여 상층액을 취하였고 동일한 방법으로 2회 반복하였다. 반복 추출하여 얻은 추출 상층액을 동결 건조하여 -70°C에서 보관하여 본 실험에 사용하였다.

### DPPH 라디칼 제거능

꾸지뽕 열매 조다당류 분획물(CTP)의 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 라디칼 제거능은 Blois(1958)의 방법을 일부 수정하여 분석하였다. 메탄올에 용해된 0.1 mM의 DPPH 용액 100 µL에 농도별 꾸지뽕 열매 조다당류 분획물(CTP)(0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL)을 첨가한 후 암실에서 30분간 반응시킨 다음 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

여기서  $A_{\text{sample}}$ 은 sample과 DPPH 반응용액의 흡광도를 의미하며,  $A_{\text{blank1}}$ 은 sample의 단독 흡광도를 나타내고,  $A_{\text{blind}}$ 는 DPPH 용액의 단독 흡광도를 나타내며,  $A_{\text{blank2}}$ 는 바탕 시료를 나타낸다.

### ABTS 라디칼 제거능

꾸지뽕 열매 조다당류 분획물(CTP)의 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma-Aldrich) 라디칼 제거

능은 Re 등(1999)의 방법을 이용해서 측정하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM 과황산포타슘(Sigma-Aldrich)을 24시간 동안 암소 방치하여 ABTS 라디칼을 형성시킨 후 이 용액을 760 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL에 농도별로 제조한 시료(0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL) 20 µL를 처리한 후 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

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

### FRAP 측정

FRAP은 Biglari(1958)의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.3 M 아세트산소듐 완충용액(pH 3.6), 10 mM TPTZ (Sigma-Aldrich) 및 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 제조하여 실험 직전에 10:1:1의 비율로 혼합하여 FRAP 용액을 제조하였다. FRAP 용액 750 µL와 농도별(0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL) 시료를 30 µL씩 첨가한 후 37°C 항온수조에서 15분간 반응 후 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 환원력(reducing power)

환원력은 Oyaizu(1986)방법을 일부 변형하여 분석하였다. 농도별(0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL) 꾸지뽕 열매 조다당류 분획물(CTP)의 100 µL에 0.2 M 인산소듐 완충용액(pH 6.6) 100 µL 및 1% 페리시아안화 포타슘(Sigma-Aldrich) 100 µL를 각각 첨가하여 50°C 항온수조에서 20분 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich) 100 µL를 가하고 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 그 후 0.1% 염화철(III)(Sigma-Aldrich)를 20 µL 가하여 37°C 항온수조에서 20분 반응 후 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 700 nm에서 환원력을 측정하였다.

### HT22 mouse hippocampal 세포배양

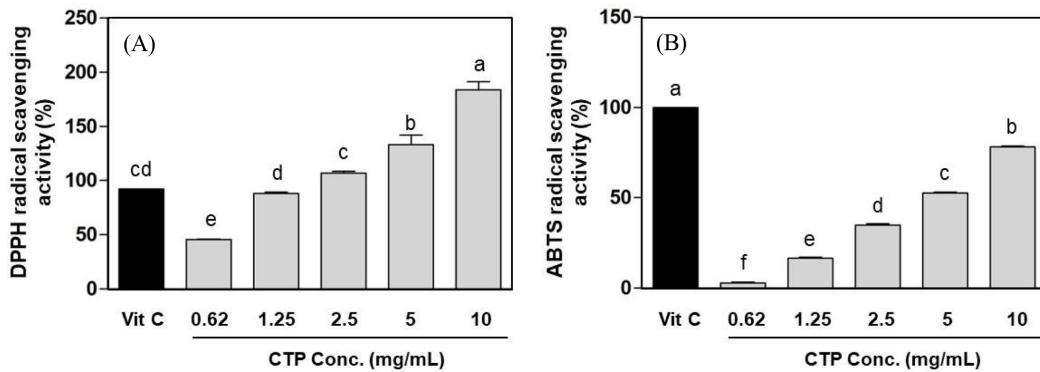
생쥐 해마 유래 HT22 cell line은 전북대학교 수의과대학에서 분양받아 사용하였으며, 10% 소태아혈청과 페니실린, 스트렙토마이신(100 IU/mL, 100 µg/mL)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technology, Carlsbed, CA, USA) 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### HT22 세포생존율 평가

HT22 cell을 3×10<sup>4</sup> cells/well씩 96 well plate (SPL, Pocheon, Korea)에 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시킨 후 농도별(31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL) 꾸지뽕 열매 조다당류 분획물(CTP)과 과산화수소를 동시 처리하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 5시간 동안 배양한 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) 분석을 통해 세포독성을 산출하였다. MTT assay는 MTT 용액(5 mg/mL)을 30 µL씩 각각 well에 첨가하고 2시간 동안 배양한 후 배양 상층액을 제거하고 생성된 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich)에 녹여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포 내 초과산화물 제거효소 (SOD) 활성 측정

꾸지뽕 열매 조다당류 분획물(CTP)이 미치는 SOD 활성은 SOD



**Fig. 1.** DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activities of crude polysaccharide fraction from *Cudrania tricuspidata* fruits (CTP). Results (mean±SD) were expressed as inhibition percent. <sup>a,b,c,d,e,f</sup> Values with different letters were significantly different ( $p < 0.05$ ).

분석 키트(Dojindo, Kyushu, Japan)를 이용하여 측정하였다. 6 well plate에 HT22 cell을  $5 \times 10^5$  cells/well로 분주하고, 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 6시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시킨 후 농도별(250, 500 µg/mL) CTP과 과산화수소를 동시 처리하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 5시간 동안 배양한 후 cell lysis buffer (Cell Signaling, Danvers, MN, USA)를 첨가하여 ice에서 5분 반응시키고, sonication 시킨 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 cell lysate를 분리하였다. 분리된 cell lysate는 BCA 단백질 검출 키트(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)을 사용하여 1 mg/mL의 농도로 단백질 정량하여 기질로 사용하였으며, 측정 과정은 제조사가 제시한 지침에 따라 진행하였다.

**세포 내 malonaldehyde (MDA) level 측정**

꾸지뽕 열매 조다당류(CTP)이 과산화수소 유도 독성으로부터 생성되는 HT22 세포에서의 MDA level을 평가하기 위해 MDA 586 kit (Oxis Research, Portland, OR, USA)을 이용하였다. 위의 1 mg/mL로 정량한 cell lysate를 이용하여 제조사가 제시한 지침에 따라 MDA level을 측정하였다.

**통계 분석**

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) software를 이용하여 일원배치 분산분석으로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 던컨 시험으로  $p < 0.05$  수준에서 비교하였다.

**결과 및 고찰**

**CTP의 자유라디칼 제거 활성**

DPPH 라디칼 제거능은 산화방지성 물질의 전자공여능으로 인해 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 자색이 탈색되는 정도를 나타내는 정도를 지표로 하여 다양한 종류의 물질들에 대한 산화방지능을 측정하는 방법이다(Kang 등, 2002). 꾸지뽕 열매의 조다당류 분획물(CTP)에 대한 DPPH 라디칼 제거능에 관하여 알아본 결과, CTP를 0.62, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL의 농도로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 제거 활성(45.69±0.73, 88.29±1.26, 106.94±2.46, 133.22±15.54 및 183.79±12.62%)이 증가하는 경향이 나타났다(Fig. 1A). DPPH 라디칼 제거능이 높으면 자유라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 높아 산화방지 활성 및 활성산소와 같은 자유라디칼의 제거 작용

증진으로 인체 내 노화를 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Aoshima 등, 2004; Kim 등, 1995).

ABTS 라디칼 제거능은 DPPH 라디칼 제거능과 유사한 방법의 산화방지성 측정 실험 방법으로 ABTS와 과황산포타슘을 혼합하여 암소에 두면 ABTS 양이온이 생성되는데 항산화 물질과 반응하여 특유의 청록색이 탈색되며 이의 흡광도 변화로 측정되는 방법이다. ABTS는 DPPH와 비교하여 반응이 빠르며 DPPH와 같이 시료의 색소에 의한 흡광도 측정에 대한 문제점이 없다는 장점이 있다고 보고되었다(Yoo 등, 2007). 꾸지뽕 열매의 조다당류 분획물(CTP)에 대한 ABTS 라디칼 제거능에 관하여 알아본 결과, CTP를 0.62, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL의 농도로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 ABTS 라디칼 제거 활성(2.98±0.60, 16.62±0.68, 34.91±0.86, 52.62±0.68, 78.10±0.70%)이 증가하는 경향이 나타났다(Fig. 1B). 따라서 본 연구에서 꾸지뽕 열매의 조다당류 분획물의 자유라디칼 제거능이 증가한 것은 꾸지뽕 열매의 조다당류 분획물의 다양한 유효성분의 영향에 따른 것이라 생각한다.

**CTP의 환원력**

환원력은 항산화 작용의 여러 메커니즘 중 활성 산소종 및 유리기에 전자를 공여하는 능력을 말하며, 금속인자에 대한 킬레이트 활성이 높을수록 산화 반응에서 촉매작용을 감소시켜 Fe<sup>3+</sup>를 Fe<sup>2+</sup>로 환원시킬 때 발생하는 청색 파장을 측정하여 환원력을 계산하는 방법으로 시료의 환원력이 강할수록 진한 녹색에 가깝게 발색되어 높은 흡광도 값을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Benzie와 Strain, 1996; Kim 등, 2011). Sung 등(2016)에 따르면 DPPH 및 ABTS 라디칼 제거능과 환원력 측정시 산화방지 활성은 유사하게 나타나는 것으로 보고되어진다. 위의 결과에서 DPPH 및 ABTS 라디칼 제거능 측정시 라디칼 제거 활성이 증가하였으므로, 환원력이 증가할 것으로 추측된다. 꾸지뽕 열매의 조다당류 분획물(CTP)에 대한 FRAP 및 환원력 방법으로 환원력을 조사한 결과, CTP를 0.62, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL의 농도로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 환원력을 증가시키는 것으로 관찰되었다(Fig. 2). 따라서 본 연구에서 꾸지뽕 열매의 조다당류 분획물의 위의 자유 라디칼 제거 활성능과 동일하게 환원력이 증가한 것으로 보아 꾸지뽕 열매의 조다당류 분획물의 다양한 유효성분의 영향에 따른 것이라 생각한다.

**CTP의 세포 보호 효과**

꾸지뽕 열매의 조다당류 분획물(CTP)이 생쥐 유래 헤마세포의

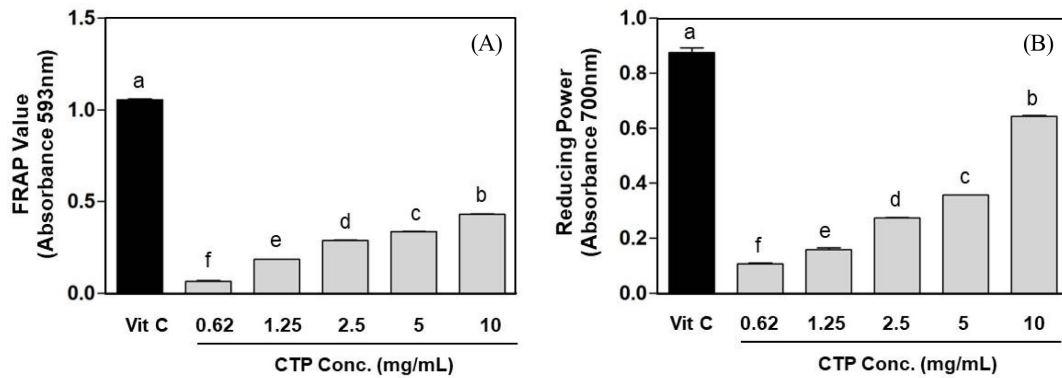


Fig. 2. FRAP (A) and reducing power (B) of crude polysaccharide fraction from *Cudrania tricuspidata* fruits (CTP). Results (mean±SD) were expressed as inhibition percent. <sup>abc,cd,e,f</sup>Values with different letters were significantly different ( $p < 0.05$ ).

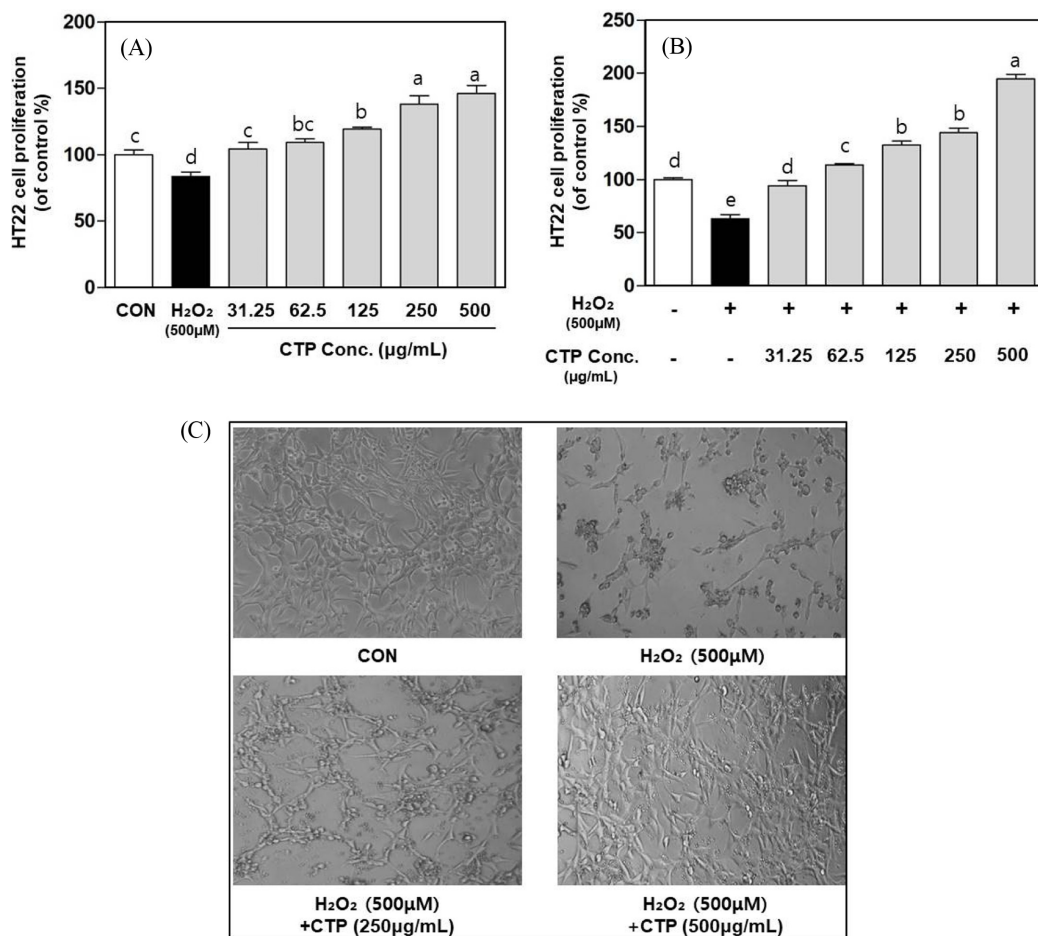
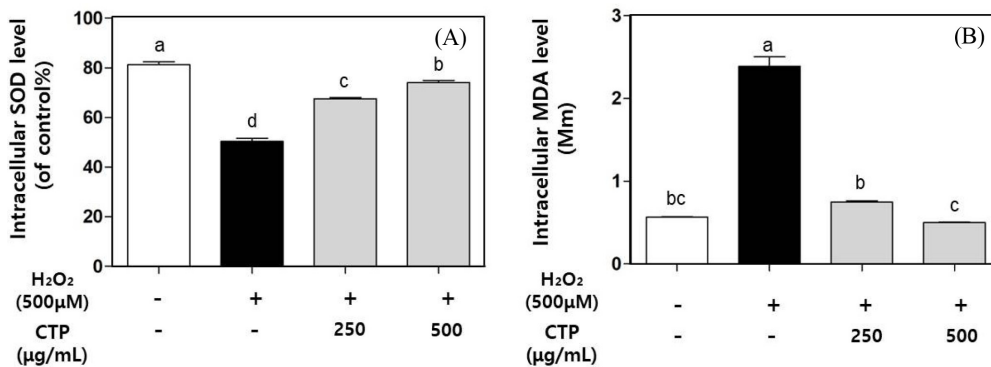


Fig. 3. Protective effect of crude polysaccharide fraction from *Cudrania tricuspidata* fruits (CTP) against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated neuronal death. Cell viability of HT22 cells pretreated CTP was analyzed by a MTT assay (A). The result was demonstrated that CTP treatment increased cell viability in HT22 cells (B). CTP pretreatment protected HT22 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neuronal death (C). Protective effect of CTP was assessed by microscope. The CTP pretreatment inhibited the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced morphologic changes in HT22 cells. Results were expressed as the mean±SD ( $n=3$ ). <sup>abc,cd,e</sup>Values with different letters were significantly different ( $p < 0.05$ ).

세포독성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 HT22 cell에 농도별 CTP를 처리하여 CTP에 대한 세포생존율을 MTT 방법을 통하여 평가 하였다(Fig. 3A). CTP를 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 모든 농도에서 독성이 나타나지 않았으며, 125 µg/mL의 농도에서부터 농도 의존적으로 유의하게 세포생존율이 증가하는 것으로 관찰되었다. 따라서 CTP가 독성이

없는 농도인 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL에서 과산화수소로 유도된 산화 독성으로부터 세포를 보호하는지 평가하였다(Fig. 3B). 그 결과 과산화수소를 처리한 처리구에서는 대조구 대비 63.28%의 생존율을 나타냈으며, 과산화수소와 CTP를 동시에 처리한 처리구에서는 농도 의존적으로 과산화수소가 유도하는 산화 독성으로부터 세포를 보호하는 효과(94.18, 113.58, 132.55,



**Fig. 4. Effect of crude polysaccharide fraction from *Cudrania tricuspidata* fruits (CTP) of cellular SOD activity (A) and cellular MDA level (B) on HT22 mouse hippocampal cells.** The cellular SOD activity and cellular MDA level were measured in indicated doses. Results were expressed as the mean±SD (*n*=3). <sup>a,b,c,d</sup>Values with different letters were significantly different (*p*<0.05).

144.08 및 194.74%)가 관찰되었다. 뇌 신경세포막은 불포화지방산을 많이 함유하고 있으며, 뇌 신경세포막에서의 지방 산화는 다른 조직에 비해 산화적 손상이 비정상적으로 매우 민감하므로 세포사멸을 일으키는 원인으로 알려져 있다(Zhao 등, 2009). 뇌 신경세포에서의 활성산소의 과발현은 세포막 손상, DNA 파괴 및 변형과 세포의 변형을 유발해 세포자살을 일으키며, 결과적으로 알츠하이머 병, 파킨슨병과 같은 신경계 질환을 초래하게 된다(Rao, 2009). 따라서 최근 산화방지 활성을 갖는 성분들은 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하여 세포 생존율을 높여주는 식물 유래의 자연 물질을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서도 꾸지뽕 열매 조다당류 분획물(CTP)이 과산화수소로부터 유도되는 손상으로부터 뇌 신경세포를 보호하여 세포생존율을 높여 주는 것으로 사료된다.

**세포 내 CTP의 SOD 활성**

초과산화물 제거효소(SOD)는 생체 내에서 중요한 산화방지 효소 중 하나이며, 항산화 방어체계의 첫 번째 단계에서 NADPH 산화효소에 의해 생성된 독성이 강한 O<sup>2</sup>를 과산화수소로 전환시키는 과정을 촉매한다. O<sup>2</sup>는 생체 노화와 관련되어 대사과정 중 생성되며, 전자 환원에 의한 반응성이 매우 높아 세포 및 조직에 독성을 일으켜 암을 유발할 수 있다. 따라서 신경세포에서 SOD 활성 저하는 세포독성으로 이어지고, 이는 AD, 파킨슨병과 같은 신경계 질환을 일으킨다(Zemlan 등, 1989). 본 실험에서 CTP가 과산화수소 처리에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대한 세포 보호기전을 확인하기 위하여 세포내 중요한 산화방지 효소인 SOD 활성 측정하였다(Fig. 4A). CTP를 250 및 500 μg/mL의 농도로 전처리한 후 과산화수소를 처리하여 세포독성을 유도한 다음 세포내 SOD 활성을 측정해 본 결과, 과산화수소를 처리한 처리구에서는 51.37%로 나타났으나, 과산화수소와 CTP를 동시에 처리한 처리구에서는 농도 의존적으로 69.26 및 71.94%로 세포 내 SOD 활성을 증가시켰다. 따라서 HT22 뇌 신경세포 보호 효과는 CTP에 의해 과산화수소로 유도된 산화적 손상을 세포내 SOD 활성의 증가에 의한 것으로 판단된다.

**세포 내 CTP의 MDA level 측정**

말론알데하이드(MDA)는 가장 널리 쓰이는 지방질 과산화 손상 지표로 MDA의 함량이 증가되어 세포의 산화적 손상이 생리적 기능을 저하시켜, 노화 및 여러 질병을 유도한다. 뇌를 구성하는 신경세포막은 불포화지방산을 많이 함유하고 있어 지방 산

화는 다른 조직에 비해 비정상적으로 매우 민감하다(Morrow 등, 1992). 막의 고도 불포화 지방산은 자유 라디칼 매개 반응에 의해 과산화되며, 이 과정은 염증, 암, 생체 이물질의 독성 및 노화, 신경세포막 손상에 치명적이다(Inal 등, 2001). 따라서 지방질과산화 생성물인 MDA는 AD나 파킨슨병을 포함한 뇌신경질환 연구에서 신경세포의 손상 정도를 측정하는 지표로 널리 사용된다(Anzai 등, 1999; Benmejo 등, 1997). 본 실험에서 CTP가 과산화수소로 유도된 MDA를 억제하는지 평가하였다(Fig. 4B). CTP를 250 및 500 μg/mL의 농도로 처리한 후 과산화수소를 처리하여 세포 독성을 유도한 다음 MDA level을 측정해 본 결과, 과산화수소 단독 처리구 대비 농도 의존적으로 68.69 및 79.09%로 MDA level을 감소시켰다. 기존 연구에 의하면 셀레늄 다당류(selenium polysaccharide)가 과산화수소로 인한 산화스트레스를 억제함으로써 세포사멸을 막고, 세포내 SOD 활성을 증가시키고 MDA를 감소시킨다고 보고되었다(Liu 등, 2005). 따라서 HT22 cell에서의 뇌 신경세포 보호 효과는 CTP가 과산화수소로 유도된 산화적 손상으로 인한 세포내 MDA 활성을 감소시키는 것으로 판단된다.

**요 약**

본 연구는 꾸지뽕 열매 조다당류 분획물(CTP)의 산화방지 활성 및 신경세포 보호 효과에 관하여 알아보기 위하여, 항산화 활성인 라디칼 제거능 및 환원력을 평가한 결과, 꾸지뽕 열매 조다당류의 농도가 증가할수록 산화방지 활성이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 이러한 꾸지뽕 열매 조다당류의 뇌신경세포 보호 효과에 관하여 알아보기 위하여 생쥐의 해마 유래 뇌신경세포에 꾸지뽕 열매 조다당류를 처리한 후 과산화수소로 산화적인 스트레스를 유도하여 세포 독성에 관하여 알아본 결과, 꾸지뽕 열매 조다당류의 처리는 농도 의존적으로 뇌신경 세포의 생존율을 증가시켰으며, 이에 따라 산화방지 효소인 SOD 활성이 증가하고 지방질 과산화 생성물인 MDA level이 감소한 것을 알 수 있었다. 이상의 결과들로 꾸지뽕 열매 조다당류의 산화방지 활성 및 뇌신경세포 보호 효과에 관하여 확인할 수 있었으며, 추후 어떤 메커니즘으로 신경세포를 보호하는지 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다. 꾸지뽕 열매 조다당류 분획물은 산화방지 및 산화적 스트레스로부터 신경세포 보호효과를 나타내어 퇴행성 신경질환 예방에 유용한 건강기능성 식품 소재가 될 것으로 사료된다.

## References

- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidant, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 7915-7922 (1993)
- Anzai K, Ogawa K, Goto Y, Senzaki Y, Ozawa T, Yamamoto H. Oxidation-dependent changes in the stability and permeability of lipid bilayers. *Antioxid Redox Signal.* 1: 339-347 (1999)
- Aoshima H, Tsunoue H, Koda H, Kiso Y. Aging of whisky increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. *J. Agr. Food Chem.* 52: 5240-5244 (2004)
- Bermejo P, Gómez-Serranillos P, Santos J, Pastor E, Gil P, Martín-Aragón S. Determination of malonaldehyde in Alzheimer's disease: a comparative study of high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid test. *Gerontology* 43: 218-222 (1997)
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70-76 (1996)
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 181: 1199-1200 (1958)
- Cho IY, Sheen YY. Effect of dioxin on the change of mitochondrial inner membrane potential and the induction of ROS. *J. Environ. Toxicol.* 24: 33-41 (2009)
- Choi HJ, Kim CT, Do MY, Rang MJ. Physiological activities of *Cudrania tricuspidata* extracts (Part I). *J. Korea Acad. Industr. Coop. Soc.* 14: 3907-3915 (2013)
- Heo J. Translation Dongui Bogam. Bub In Culture Co. Seoul, Korea. pp. 1539-1615 (1999)
- Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin. Chim. Acta.* 305: 75-80 (2001)
- Kandaswami C, Middleton E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. pp. 351-376. In: *Free Radicals in Diagnostic Medicine.* Armstrong D (ed). Springer Publishing, Manhattan, NY, USA (1994)
- Kang MJ, Shin SR, Kim KS. Antioxidative and free radical scavenging activity of water extract from dandelion (*Taraxacum officinale*). *Korean J. Food Preser.* 9: 253-259 (2002)
- Kim OK, Ho JH, Nam DE, Jun WJ, Hwang KT, Kang JE, Chae OS, Lee JM. Hepatoprotective effect of *Cudrania tricuspidata* extracts against oxidative damage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 7-13 (2012)
- Kim YC, Hur JDH, Sohn DH, Kim, HS. Antibacterial compounds of the root Barks of *Cudrania tricuspidata*. *Kor. J. Pharmacogn.* 39: 246-248 (2008)
- Kim SH, Kim NJ, Choi JS, Park JC. Determination of flavonoid by HPLC and biological activities from the leaves of *Cudrania tricuspidata* Bureau. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 22: 68-72 (1993)
- Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 80-85 (1995)
- Kim SJ, Lee KT, Youe WJ, Lee SS, Kim YS. Structure Analysis of Water-soluble Polysaccharides Extracted from The unripe fruit of *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Wood Sci. Technol.* 42: 740-746 (2014)
- Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeon BT. Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Helianthus tuberosus* L. leaves on t-BHP induced oxidative stress in Chang cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 1525-1531 (2011)
- Kim YS, Park KM, Shin HJ, Song KS, Nam KY, Park JD. Anticancer activities of red ginseng acidic polysaccharide by activation of macrophages and natural killer cells. *Yakhak. Hoeji.* 46: 113-119 (2002)
- Kwon DH, Kim MB, Yoon DY, Lee YH, Kim JW, Lee HG, Cha IS, Lim JS, Choe YK. Screening of plant resources of anti-viral activity. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 11: 24-30 (2003)
- Lee YN. New Flora of Korea, I. Kyo-Hak Publishing Co. Ltd. 246-247 (2006)
- Lee BW, Kang NS, Park KH. Isolation of antibacterial prenylated flavonoids from *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47: 270-273 (2004)
- Lee KB, Song KS, Moon EH, Lee JL, Yoo YC. Adjuvant activity of *Cudrania tricuspidata* water extracts to enhance antigen specific humoral and cellular immune. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 52: 234-240 (2009)
- Lee KW, Sung KS, Kim SS, Lee OH, Lee BH, Han CK. Effects of *Cucurbita moschata*, adlay seed and *Cudrania tricuspidata* leaf mixed-powder diet supplements on the visceral fat, fecal amount and serum lipid levels of the rats on a high-fat diet. *Korean J. Food Nutr.* 25: 990-998 (2012)
- Liu LN1, Mei QB, Liu L, Zhang F, Liu ZG, Wang ZP, Wang RT. Wang. Protective effects of *Rheum tanguticum* polysaccharide against hydrogen peroxide-induced intestinal epithelial cell injury. *World J. Gastroenterol.* 11: 1503-1507 (2005)
- Matkowski A, Tasarz P, Szypula E. Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *J. Med. Plants Res.* 11: 321-330 (2008)
- Morrow JD, Awad JA, Kato T, Takahashi K, Badr KF, Roberts LJ, Burk RF. Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanooids (F2-isoprostanones) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. *J. Clin. Invest.* 90: 2502-2507 (1992)
- Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44: 307-315 (1986)
- Packer, L. Oxygen radicals in biological systems. Part C. Vol. 233, pp. 15-35. In: *Methods in Enzymology.* Academic press, San Diego, CA, USA (1994)
- Park JC, Young HS, Choi JS. Constituents of *Cudrania tricuspidata* in Korea. *Yakhak. Hoeji* 36: 40-45 (1992)
- Rao KS. Free radical induced oxidative damage to DNA: Relation to brain aging and neurological disorders. *Indian J. Biochem. Biophys.* 46: 9-15 (2009)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.* 6: 317-333 (2006)
- Sim SM, Im GH, Kim JW, Lee UY, Kim HW, Lee MU, Lee TS. The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Daedaleopsis tricolor*. *Kor. J. Mycol.* 31: 161-167 (2003)
- Sung NY, Song HY, Ahn DH, Yoo YC, Byun EB, Jang BS, Park CW, Park WJ, Byun EH. Antioxidant and neuroprotective effects of green tea seed shell ethanol extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 45: 958-965 (2016)
- Wang X, Wang J, Zhang J, Zhao B, Yao J, Wang Y. Structure-antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. *Int. J. Biol. Macromol.* 46: 59-66 (2010)
- Yoo KM, Kim DO, Lee CY. Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 177-182 (2007)
- Yoon MY, Lee BB, Kim JY, Kim YS, Park EJ, Lee SC, park HR. Antioxidant activity and neuroprotective effect of *Psoralea corylifolia* linne extract. *Korean J. Pharmacogn.* 38: 84-89 (2007)
- Yu G, Yufeng D, Guozhen F, Yan Z, Shuo W. Polysaccharides from fruit calyx of *Physalis alkekengi* var. *francheti*: Isolation, purification, structural features and antioxidant activities. *Carbohydr. Polym.* 77: 188-193 (2009)
- Yuan JF, Zhang ZQ, Fan ZC, Yang JX. Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from *Ligusticum chuani-xiong* Hort. *Carbohydr. Polym.* 74: 822-827 (2008)
- Zemlan FP, Thienhaus OJ, Bosmann HB. Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical filament formation. *Brain Res.* 476: 160-162 (1989)
- Zhao B. Natural antioxidants protect neurons in alzheimer's disease and parkinson's disease. *Neurochem. Res.* 24: 630-638 (2009)
- Zheng ZP, Tan HY, Chen J, Wang MF. Characterization of tyrosinase inhibitors in the twigs of *Cudrania tricuspidata* and their structure-activity relationship study. *Fitoterapia.* 84: 242-247 (2013)