

미강 함유 Tocotrienol의 항산화 효과

우기민* · 이영상** · 김용호**†

*순천향대학교 의과대학, **순천향대학교 생명과학부

Antioxidant Effects of Tocotrienol in Rice Bran

Ki-Min Woo*, Young-Sang Lee**, and Yong-Ho Kim**†

*College of Medicine, Soonchunhyang Univ., Asan 336-745, Korea

**Dept. of Life Sciences, Soonchunhyang Univ., Asan 336-745, Korea

ABSTRACT : The pharmaceutical function of tocotrienol in rice bran was evaluated. Distinctive antioxidative effects by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) could be observed. Also, Superoxide Dismutase(SOD) and Glutathione Peroxidase(GPX) activities of the cultured cells such as human fibroblast and hepatocyte, were increased up to 2 fold by the treatment of tocotrienol. The effects on GPX activity were more evident than SOD activity, and the stimulation was up to 2 fold. The changes of gene expression patterns were examined by applying the cell extracts of fibroblast treated with the increasing concentrations of tocotrienol on two-dimensional gel electrophoresis(2-D gel electrophoresis). As the concentrations increasing, many proteins began to appear with the increasing amounts, while several proteins diminished or disappeared. From these results, tocotrienol was clearly shown to have abilities on protecting any oxidizing damages and stimulating anti-oxidizing activities of the organisms.

Keywords : tocotrienol, antioxidant effect, SOD, GPX, 2-D gel electrophoresis

미강 내에는 일반적인 영양요소 외에도 다양한 기능성 물질이 함유되어 있는데 특히 비타민 E인 tocopherol과 tocotrienol이 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Gould & Haag, 1991; Kamel & Appelqvist, 1996; Sugano & Tsuji, 1997; Park *et al.*, 2003). Tocotrienol은 tocopherol과 같은 비타민 E 계열의 비타머(vitamer)로서 영양적 가치가 없는 것으로 간주되어 왔으나, 최근 1990년대 중반 이후 항산화, 항암, 고지혈증 개선, 혈당 저하, 동맥경화 완화 등 다양한 생리활성 효과면에서 tocopherol 보다 40~60 배 이상 월등한 것으로 밝혀진 이래 집중적으로 의약품 및 건강보조식품의 소재로 개발되고 있다(Qureshi *et al.*, 2001; Guthrie *et al.*,

1999; Serbinova & Packer, 1994; Tomeo *et al.*, 1995). 그러나 tocopherol은 대부분의 곡물에 함유되어 있음에 반해 tocotrienol은 벼의 미강과 팜 오일(palm oil), 그리고 보리의 배아 등 일부 식물에서만 함유되어 있는 것으로 보고되어 있는데(Babu *et al.*, 1992; Kamat & Sarma, 1997; Yu & Menchaca, 1999), 국내에서는 Park 등(2004)이 몇 가지 작물의 종실을 분석한 결과 차조기, 옥수수 등에서 tocotrienol이 함유되어 있음을 보고하였다. 또한 Kim 등(2004)은 근적외분광분석기를 이용하여 미강의 tocotrienol 함량을 신속하게 분석할 수 있는 방법도 보고한 바 있다.

본 연구에서는 미강에 함유된 tocotrienol의 생리활성을 알아보기 위하여 몇 가지 항산화 관련 실험을 수행하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

Tocotrienol 추출

본 연구 수행을 위한 시료는 (주)세립현미로부터 hexane으로 추출된 crude oil을 제공받아 pilot 규모에서 농축시킨 후 사용하였다. 먼저 hexane 추출 crude oil 1.5 kg을 EtOH 18 L, ascorbic acid 200 g, KOH (44%) 900 mL를 첨가한 후, 비누화 반응을 80°C에서 18분간 실시하였다. 냉각된 반응물은 hexane 18L로 2회 분획하고, 다시 1회 물 세척한 후 hexane을 감압농축하여 제거하였다. 얻어진 hexane 수집액은 -20°C에서 24시간 저온 처리후 원심분리하여 상징액을 얻고, 다시 감압농축하여 hexane을 제거하였다. 이후 EtOH을 첨가하고 재차 저온 처리 및 원심분리한 후 EtOH을 감압농축, 제거하여 최종생산물을 얻었다.

Cell culture

인간 skin fibroblast(Dempsey)와 hepatocarcinoma(SNU-182)를 각각 10%의 bovine fetal serum, 1 mM glutamine, 100

†Corresponding author: (Phone) +82-41-530-1281 (E-mail) yohokim@sch.ac.kr

unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배양액에서 5% CO₂를 유지하며 37°C에서 단일층(monolayer)으로 배양하였다. 배양하는 동안 confluency를 막기 위하여 지름 10cm culture plate 당 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 세포수를 유지하며 매 46시간 배양액을 교환하였다. 특히 fibroblast는 배양도중 생길 수 있는 세포의 변화를 막기 위하여 5×10^5 의 농도를 넘지 않는 조건에서 실험을 수행하였다. Subculture를 위하여 충분히 자란 세포의 배양액을 제거하고 0.25% trypsin, 0.02% EDTA 용액을 37°C에서 3~5분 정도 처리하여 세포를 부유시킨 뒤 배양액을 넣어 원심분리를 통하여 세포를 침전시켰다. 침전된 세포는 다시 배양액을 적당량 넣고 culture dish에 분주하였다. 이후 약 5×10^5 세포수의 culture plate에 tocotrienol의 농도를 변화시키며 처리하여 일정 시간 배양하고 여러 가지 방법을 통하여 tocotrienol의 활성과 기능을 분석하였다.

항산화 활성측정

Tocotrienol의 항산화 효과는 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 기질로 이용한 radical scavenging 활성을 측정함으로써 판단하였다. Methanol로 정용된 tocotrienol을 여러 농도로 희석하고 1.5×10^{-4} M의 DPPH와 동일 비율로 섞은 다음 밀봉하여 약 3초간 강하게 혼합시켰다. 혼합액은 25°C에서 20분간 반응시키고 520 nm의 파장에서 흡광치를 측정하였으며, Radical scavenging 활성은 흡광수치의 감소로 나타내었는데, 아래의 수식으로 표시하였다.

Radical scavenging activity (%)

$$= \{(OD_{control} - OD_{sample}) / OD_{control}\} \times 100$$

항산화 효소활성 측정

배양된 세포에 여러 농도의 tocotrienol을 처리하고 60분간 반응시킨 후 trypsin처리를 통하여 세포를 수확하고 phosphate-buffered saline(PBS)로 씻어 준 후 lysis buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 0.2 M sucrose)속에서 sonication으로 파괴하였다. 그 이후 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 단백질 추출물을 얻고 항산화 관련 효소활성을 측정하였다.

가. Superoxide dismutase(SOD) assay

SOD 활성은 nitroblue tetrazolium(NBT) 방법을 이용하였다. NBT는 산소 존재 시 푸른색으로 환원되어 560 nm에서 흡광을 띄는데 SOD는 이 반응을 억제한다. 효소 반응 buffer(50 mM sodium phosphate(pH 7.8), 3 mM xanthine, 0.75 mM NBT, 3 mM EDTA)에 50 µL의 세포추출물을 첨가하고 0.1 mg/mL의 xanthine oxidase를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 다음으로 6 mM CuCl₂를 넣어 반응을

중결시킨 후 원심분리하여 상층액을 560 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

나. Glutathione peroxidase(GPX) assay

효소 반응 buffer(100 mM phosphate, pH 7.0, 1 mM EDTA, 10 mM glutathione, 1 mM NaN₃, 1 unit glutathione reductase, 1.5 mM NADPH)에 0.1 mL의 세포 추출물을 넣고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 1 mM H₂O₂를 첨가하여 340 nm에서 흡광도를 읽고 NADPH oxidation을 측정하였다.

Two dimensional gel electrophoresis (2-D 전기영동)

Tocotrienol 처리에 의한 세포내의 단백질 발현 양상을 조사하기 위하여 2-D 전기영동을 실시하였다. 지름 10 mm의 culture dish에 인간 fibroblast cell을 배양하면서 여러 농도의 tocotrienol을 처리하여 일정 시간 배양하고, trypsin 처리를 통하여 세포를 수확하였다. 원심분리로 침전된 세포를 PBS로 씻어주고 250 µL의 Rehydration buffer(8 M urea, 0.5% CHAPS, 10 mM DTT, 0.2% bio-lyte pH 3-10, 0.001% bromophenol blue)에 녹여서 sonication으로 세포를 파괴하고 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이것을 11 cm의 IPG strip을 이용하여 8,000V의 전압으로 5시간동안 PROTEAN IEF Cell(Bio-Rad)에서 isoelectric focusing을 실시한 후, second dimension(SDS-PAGE)를 위하여 isoelectric focusing한 strip을 equilibration buffer(6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris, pH 8.8, 20% glycerol, 130 mM iodoacetamide)로 15분간 반응시키고 12.5% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다. 전기영동한 gel은 보다 미량의 단백질 발현양상을 분석하기 위하여 silver staining으로 염색하였다.

결과 및 고찰

Tocotrienol의 항산화 활성

DPPH를 이용한 tocotrienol의 항산화 활성은 Fig. 1과 같다. 미강에서 고농도로 정제된 tocotrienol을 methanol로 정용하여 methanol로 희석하여 DPPH와 강력하게 혼합하고, DPPH의 산화현상을 Shimazu spectrophotometer로 520 nm 흡광도로 측정하였다. 이 때 DPPH의 산화현상은 첨가된 DPPH의 농도에 따라 의존적으로 감소하였으며, 낮은 농도에서도 매우 높은 항산화력을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 tocotrienol은 항산화력이 높음을 알 수 있었다.

Superoxide dismutase (SOD) assay

SOD 활성은 첨가된 tocotrienol의 양에 의존적으로 증가하지만 높은 농도의 tocotrienol의 첨가는 배양되는 세포에 이차적인 변화를 유발시키므로 본 실험에서는 형태적 변화가 가장 미미한 농도에서의 영향을 조사하였다. Tocotrienol을 처리하

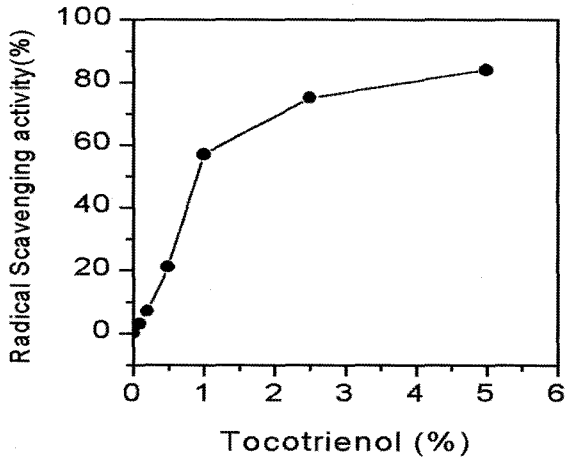


Fig. 1. Radical scavenging activity of final products containing tocotrienol.

였을 때 SOD의 활성은 fibroblast와 hepatocyte 모두에서 10~25% 가량 증가하는 것으로 나타났으나(Fig. 2A) 그 효과는 크지 않은 것으로 사료되었다.

Glutathione peroxidase(GPX) assay

SOD 활성 측정과 유사한 방법으로 tocotrienol에 의한 GPX의 활성변화를 측정한 결과(Fig. 2B) fibroblast와 hepatocyte 모두 GPX의 활성이 tocotrienol에 의하여 증가하였으며, 특히 hepatocyte의 경우 최대 2배까지 활성이 증가하였다. Tocotrienol을 처리하지 않은 fibroblast의 GPX 활성은 12 ± 1.6 U/mg 이었으며 tocotrienol을 처리하였을 때는 17 ± 2.1 U/mg으로 증가하였다. 또한 tocotrienol을 처리하지 않은 hepatocyte는 9.0 ± 2.0 U/mg이었으나 처리하였을 때는 22 ± 2.8 U/mg으로 증가하였다. 따라서 본 결과에 의하면 tocotrienol은 정상세포 및 암세포의 항산화 활성을 증가시키며 이러한 활성은 SOD 보다는 GPX의 활성에 영향을 더 크게 받는 것으로 판단되었다.

Two-dimensional gel electrophoresis(2-D 전기영동) 분석

Tocotrienol은 세포내 여러 유전자 발현의 변화를 유발한다는 보고가 있으므로 본 연구에서는 배양된 fibroblast에 tocotrienol을 처리하여 반응시킨 후, 세포 추출물을 획득하여 2-D 전기영동을 실시함으로써 발현된 단백질의 양상을 비교하였다(Fig. 3).

세포 추출물을 pH 3~10으로 isoelectric focusing을 하고 12.5%의 SDS-PAGE(polyacrylamide electrophoresis)를 수행한 결과, tocotrienol의 처리 농도가 증가할수록 몇몇 단백질들의 발현이 증가되는 것을 볼 수 있었다. 그러나 보다 정밀한 분석을 위하여 추후 발현의 변화를 보이는 단백질들을 선별하여 추출하고, N-terminal sequencing이나 MALDI-TOF 등을 통하여 이들을 규명하여야 할 것으로 판단된다.

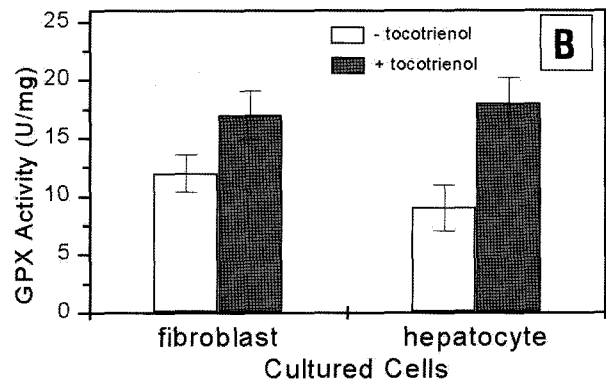
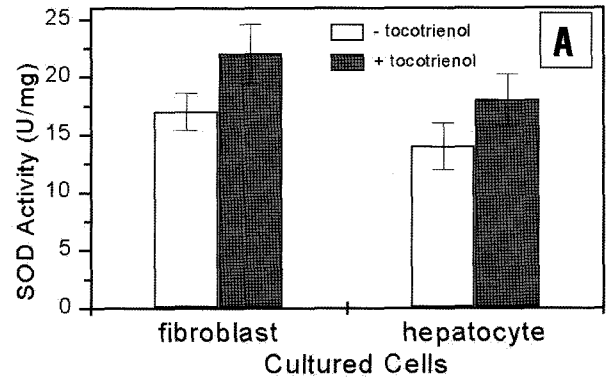


Fig. 2. SOD (A) and GPX (B) activity as affected by final products containing tocotrienol.

2-D patterns of fibroblasts

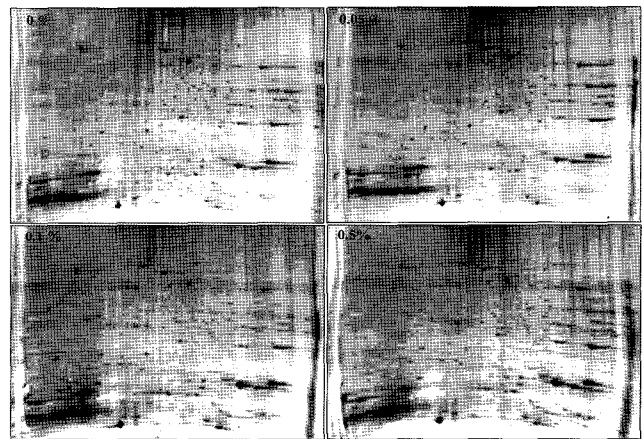


Fig. 3. Protein expression of fibroblast treated by final products.

적 요

미강으로부터 정제된 tocotrienol은 DPPH를 기질로 확인한 결과 매우 뛰어난 항산화력을 가지는 것으로 판명되었다. 또한 정상세포와 암세포를 배양하면서 tocotrienol을 처리하고 세포내의 항산화에 가장 큰 역할을 하는 superoxide dismutase

와 glutathione peroxidase 활성을 측정된 결과 두 효소 모두 tocotrienol에 의하여 활성이 증가되는 것을 볼 수 있었으며, 전체적으로 암세포에서 GPX가 SOD보다 더 민감하게 증가함을 알 수 있었다.

인용문헌

- Babu U. S. and M. Y. Jenkins. 1992. Effect of short-term feeding of barley oil extract containing naturally occurring tocotrienols on the immune response of rats. *Ann. NY Acad. Sci.* 669: 317-319.
- Gould, M. N. and J. D. Haag. 1991. A comparison of tocopherol and tocotrienol for the chemoprevention of chemically induced rat mammary tumors. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 1068S-1070S.
- Guthrie, N., K. K. Carroll, and T. Vandenberg. 1999. Effect of palm oil tocotrienol & carotenoids on human breast cancer cells injected into unde mice. Annual meeting of the professional research scientists on experimental biology 99. April 17~21.
- Kamal, E. A. and L. A. Appelqvist. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671-701.
- Kamat, J. P. and H. D. Sarma. 1997. Tocotrienols from palm oil as effective inhibitors of protein oxidation and lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Mol. Cell Biochem.* 170: 131-137.
- Kim, Y. H., C. S. Kang, and Y. S. Lee. 2004. Quantification of Tocopherol and Tocotrienol Contents in Rice Bran by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Korean J. Crop Sci.* 49(3): 211-215.
- Park, K. Y., C. S. Kang, Y. S. Lee, Y. H. Lee, and Y. S. Lee. 2004. Tocotrienol and tocopherol content in various plant seeds. *Korean J. Crop Sci.* 49(3): 207-210.
- Park, K. Y., C. S. Kang, Y. C. Cho, Y. S. Lee, and Y. S. Lee. 2003. Genotypic difference in tocopherol and tocotrienol contents of rice bran. *Korean J. Crop Sci.* 48(6): 469-472.
- Qureshi, A. A., W. A. Salser, R. Parmar, and E. E. Emeson. 2001. Novel tocotrienols of rice bran inhibit atherosclerotic lesions in C57BL/6 ApoE-deficient mice. *J. of Nutrition* 131(10): 2606-2618.
- Serbinova E. A. and L. Packer. 1994. Antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Methods Enzymol.* 234: 354-366.
- Sugano, M. and E. Tsuji. 1997. Rice bran oil and cholesterol metabolism. *J. Nutr.* 127: 521S-524S.
- Tomeo, A. C., M. Geller, T. R. Watkins, A. Gapor, and M. L. Bierenbaum. 1995. Antioxidant Effects of Tocotrienols in Patients with Hyperlipidemia and Carotid Stenosis. *Lipids* 30: 1179-1183.
- Yu, W. and M. S. Menchaca. 1999. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by tocopherols and tocotrienols. *Nutr. Cancer* 33: 26-32.