

자광찰벼 추출물의 H4IIE 세포에서의 항산화 효과

지희연* · 이창호** · 김정태* · 김선림* · 김광호*** · 정일민***†

*작물과학원, **한양대학교 의과대학, ***건국대학교 생명환경과학대학

Antioxidant Activity of Jakwangchalbyeo Extracts in H4IIE Cells

Hee-Youn Chi*, Chang-Ho Lee**, Jung-Tae Kim*, Sun-Lim Kim*, Kwang-Ho Kim***, and Il-Min Chung***†

*National Institution of Crop Science, RDA, Suwon 441-857, Korea

**College of Medicine, Hanyang Univ., Seoul 133-791, Korea

***College of Life & Environment Science, Konkuk Univ., Seoul 143-701, Korea

ABSTRACT : Experiments were performed to investigate the effects of ethanol fraction of three different rice (*Oryza sativa* L. var. *japonica*) grain (Jakwangchalbyeo, red-pericarp glutinous rice; Hwasunchalbyeo, white-pericarp glutinous rice; Ipumbyeo, white-pericarp non-glutinous rice) extracts on the protection of oxidative stress. Antioxidant activities of ethanol fraction of rice grain extracts were made with MTT cell viability assay in H4IIE cell that is challenged with hydrogen peroxide. Hwasunchalbyeo extract and Ipumbyeo extract did not show any significant protective effects on the H₂O₂-induced oxidative stress in H4IIE cells, and Jakwangchalbyeo extract improved the cell viability up to 82% and 74% at concentration of 100 µg/mL for 5 h and 24 h treatment, respectively. In conclusion, red-pericarp Jakwangchalbyeo extract as compared with other rice extracts exerted significant inhibitory effects on the hydrogen peroxide-induced oxidative stress in the H4IIE cells.

Keywords: Jakwangchalbyeo, antioxidant activity, H4IIE cell, MTT

최근 쌀 소비량이 점차로 감소되고 있으며 사람들은 점차로 고급화 된 식품이나 건강식품 등을 선호하고 있는 실정이다. 특히 현대인은 각종 만성스트레스, 환경오염, 인스턴트식품 소비의 증가로 인하여 암을 비롯한 고혈압, 신장병 등의 발생이 날로 증가하고 있다. 각종 질병의 원인이 되는 대사과정 중 생성되는 활성 산소는 산화적 스트레스에 의한 것으로 보고되어 있다(Ames et al., 1993; McCord, 1993). 따라서 각종 질환의 예방 목적과 또한 최근 well-being을 추구하고 있는 상황 속에서 생리활성 물질을 다량 함유한 식품에 대한 관심이 증가되고 있다.

쌀에서 항산화 활성이 있는 특정 성분들에 대한 연구가 많

이 시도되었으며(Chung et al., 2000a, b, 2001; Kwak et al., 1999; Nam et al., 2003), 쌀의 기능성 물질로 플라보노이드, 피틴산, 오리자놀, 페롤라산, 토코페놀, 페놀화합물 등이 있다고 알려져 있으며 이러한 성분들은 항산화성을 비롯한 각종 생리활성 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Cho et al., 1996; Choi et al., 1994; Choi et al., 1996; Choi and Oh, 1996; Osawa et al., 1985; Ramarathnam et al., 1986, 1989; Wu et al., 1994). 특히 쌀 현미의 호분층에는 기능성 성분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있고, 유색미의 항산화 효과가 우수한 것으로 보고되고 있으나(Tsuda et al., 1994; Rhamarathnam et al., 1989), 쌀 추출물의 세포내에서의 항산화성에 대한 연구는 그다지 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 H4IIE 세포내에서 과산화수소(H₂O₂)에 의한 산화스트레스에 대해 자광도와 진부찰의 교배로 만들어진 자광찰벼의 현미 에탄올 추출물의 항산화 효과를 구명하기 위해서 수행하였으며, 대조구로 화선찰벼와 일품벼의 현미 에탄올 추출물을 사용하였다.

재료 및 방법

재료의 추출 분획

2002년도에 건국대학교 실험실습포에서 재배, 수확된 자광찰벼(자광도와 진부찰 교배품종), 화선찰벼, 일품벼를 현미상태로 만든 후 시료로 사용하였다. 각각 1 kg을 벤젠을 이용하여 탈지 시킨 후, 탈지 된 쌀을 80% 에탄올 3 L로 냉장고에서 2~3일 보관하면서 추출한 후 여과하여 여액을 감압 농축한 뒤 동결건조 시킨 것을 시료로 사용하였다.

세포 배양

세포는 H4IIE cell line을 서울대학교 약학대학에서 분양 받아 이용하였으며, 세포배양액으로는 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL의 penicillin/streptomycin이 첨가되어 있는

†Corresponding author: (Phone) +83-2-450-3730 (E-mail) imcim@konkuk.ac.kr

Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) 배지를 사용하였다. 37°C로 유지되는 5% CO₂ 인큐베이터에서 세포가 약 80% 자라라는 3-4 일 간격으로 계대배양하면서 이용하였다 (Kang *et al.*, 2002).

실험 물질의 처리 및 세포생존율 측정

세포에서의 항산화 효과를 측정하기 위해서 과산화수소를 처리하여 산화 스트레스를 시간별로 주는 것으로 Lee(2001)와 Park *et al.* (2003) 등의 방법을 응용하였다. 96 well plate에 4×10⁴ cells/well 농도로 세포를 분주 한 후, 24시간 동안 배양하였다. 그리고 0.01, 0.1, 1, 10 mM의 농도로 과산화수소를 10, 20, 40, 60분간 노출 시킨 뒤 산화스트레스를 받는 적절한 농도와 시간을 결정하였다. 실험 추출물을 농도별(10, 25, 50, 100 µg/mL)로 1, 3, 5, 24시간동안 배양한 후 세포에 1 mM의 과산화수소를 한시간 노출 시켜 산화 스트레스를 준 뒤 세포 생존율을 조사하였다. 다른 방법으로는 세포에 1 mM의 과산화수소를 한시간 노출 시켜 먼저 산화 스트레스를 준 뒤 실험 추출물을 농도별(10, 25, 50, 100 µg/mL)로 24시간 동안 배양하여 세포 생존율을 조사하였다. 실험 방법을 요약하면 세포에 MTT를 0.2 mg/mL 처리한 후 4시간 동안 CO₂ 인큐베이터에서 배양한 뒤, media를 제거하여 형성된 formazan을 100 µL의 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여서 540 nm의 ELISA microplate reader (Multiskan EX, Thermo Labsystems)에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 아무것도 처리를 하지 않은 대조군에 대한 상대값으로 제시하였다(Denizot and Lang, 1986; Mosmann, 1983).

결과 및 고찰

과산화수소에 의한 산화스트레스의 적당한 농도 및 시간을 조사하기 위하여 H2IIE 세포에 과산화수소를 농도별, 시간별 처리한 결과는 Fig. 1과 같다. 0.01 mM의 과산화 농도에서는 시간이 경과함에 따라(10, 20, 40, 60분) 세포 생존율(98.2, 97.7, 102.7, 97.6%)에는 변동이 거의 없었다. 0.1 mM의 농도에서는 시간이 경과함에 따라 약간의 변화(101.8, 85.4, 92.8, 87.2%)가 있었으나 원하는 만큼의 수준은 아니었다. 1 mM의 농도에서는 10, 20, 40, 60분에 따라 세포생존율이 각각 82.9, 75.6, 69.3, 57.8% 였다. 가장 높은 농도인 10 mM의 농도에서는 시간이 경과함에 따라 73.7, 64.9, 65.7, 45.4% 의 세포 생존율을 보였다. 따라서 가장 적당한 산화스트레스를 받는 기준을 1 mM의 과산화수소를 1시간 처리한 것으로 결정하였다.

얻어진 결과를 기초로, 각각의 실험 추출물 농도 및 시간별로 처리 후 과산화수소로 기인된 산화스트레스의 결과를 검토하였다. 자광찰비의 추출물을 농도별(10, 25, 50, 100 µg/mL)로 1, 3, 5, 24시간 동안 배양한 세포에 1 mM의 과산화수소를 1시간 동안 노출시켜 산화스트레스를 준 결과는 Fig. 2와

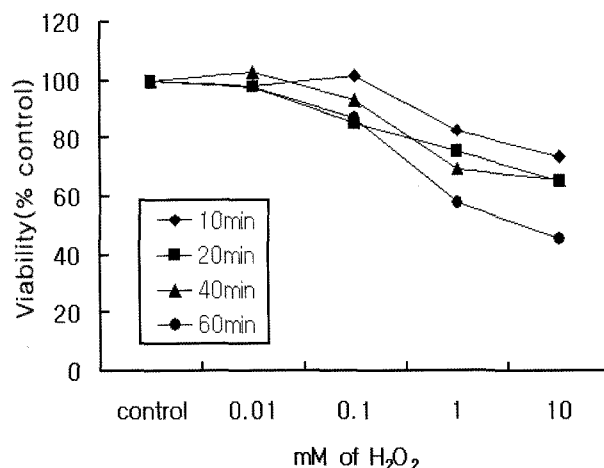


Fig. 1. Concentration- and time-dependent effect of hydrogen peroxide (H₂O₂) on H4IIE cell viability.

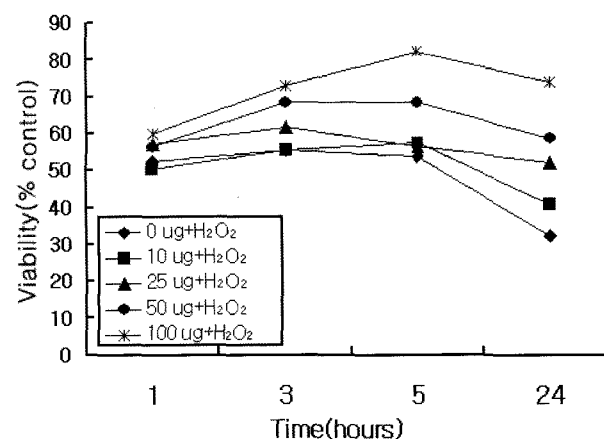


Fig. 2. Protective effects of Jakwangchalbyeo extract on the 1 mM H₂O₂-induced oxidative stress cell death in H4IIE cells.

같다. 화선찰비의 결과는 Fig. 3에 일품비의 결과는 Fig. 4에 나타냈다. 자광찰비 추출물은 10, 25, 50 µg/mL에서는 그다지 큰 변화는 아니었으나 농도가 높을수록, 그리고 시간이 경과할수록 세포 생존율이 높아진 것을 확인할 수 있었다. 100 µg/mL의 농도에서는 1시간 후에 60.1%, 3시간 뒤에 73.3%, 5시간 뒤에 82.3%, 24시간 뒤에는 74.1%의 회복율을 보였다. 화선찰비와 일품비 추출물에서는 세포회복율을 거의 나타내지 않았다.

Fig. 5는 각각의 실험 추출물을 처리한 후 24시간이 경과한 후에 1시간동안 과산화수소를 노출시켜서 산화스트레스를 준 결과를 나타낸 것이다. 자광찰비 추출물이 화선찰비와 일품비 추출물에 비해 확연하게 세포생존율을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 6은 각각의 실험 추출물을 처리하기 전에 세포에 1시간동안 1 mM의 과산화수소로 산화스트레스를 먼저 주어서 세포의 성장을 억제시킨 후에 실험 추출물을 처리하

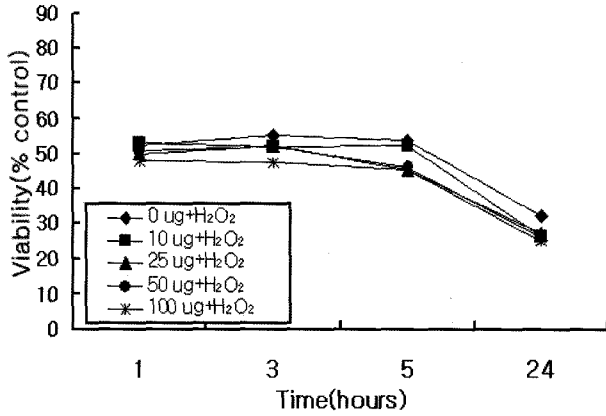


Fig. 3. Protective effects of Hwasunchalbyeo extract on the 1 mM H₂O₂-induced oxidative stress cell death in H4IIE cells.

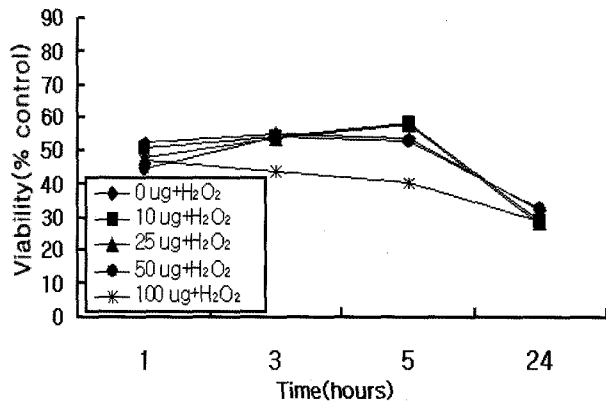


Fig. 4. Protective effects of Ilpumbyeo extract on the 1 mM H₂O₂-induced oxidative stress cell death in H4IIE cells.

여 24시간 뒤의 결과를 나타낸 것이다. Fig. 6에서 보여지는바와 같이 과산화수소를 처리한 후 24시간이 경과하자 세포의 생존율은 28.8%로 낮았다. 일품벼를 농도별로 처리한 세포에서는 세포생존율을 회복시키지 못했는데, 화선찰벼를 농도별로 처리한 것은 34.6, 34.1, 32.1, 31.5%의 수준으로 미미한 생존율을 보였다. 그러나 자광찰벼에서는 농도가 10, 25, 50, 100 µg/mL로 증가함에 따라 세포생존율도 각각 31.7, 35.1, 42.2, 57.4%로 회복된 것으로 나타났다.

자광찰벼를 처리한 후에 산화스트레스를 주어도 세포생존율이 높아지는 것과, 산화스트레스를 준 후 자광찰벼 추출물로 처리로 인해 세포생존율이 회복되는 것으로 미루어 보아 자광찰벼 추출물이 화선찰벼와 일품벼에 비해 현저하게 산화스트레스에 대한 저항성이 있음을 알 수 있었다.

Choi *et al.*(2002)의 연구결과에 의하면 과산화수소 처리로 인해 산화스트레스를 받은 세포에 녹차 성분 중에 하나인 (-) epigallocatechin gallate 성분을 24시간 처리한 결과 세포생존율을 20% 정도 증가시켰다고 하였는데, 자광찰벼는 순수단일 물질이 아닌데도 불구하고 세포생존율을 거의 20% 증가시킨

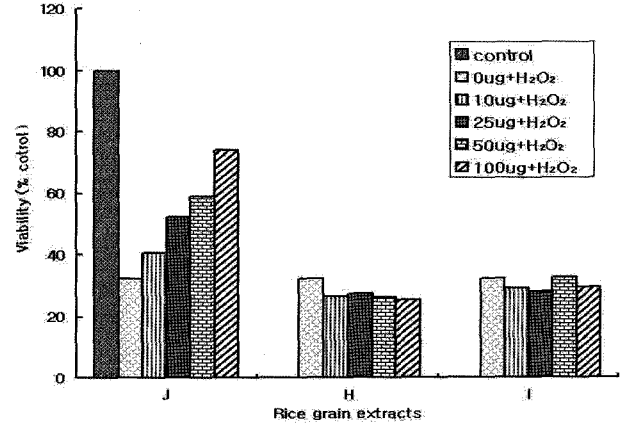


Fig. 5. Comparison of protective effects on three rice grain extracts on the 1 mM H₂O₂-induced oxidative cell death in H4IIE cells for 24 h. J; Jwangchalbyeo, H; Hwasunchalbyeo, I; Ilpumbyeo extract.

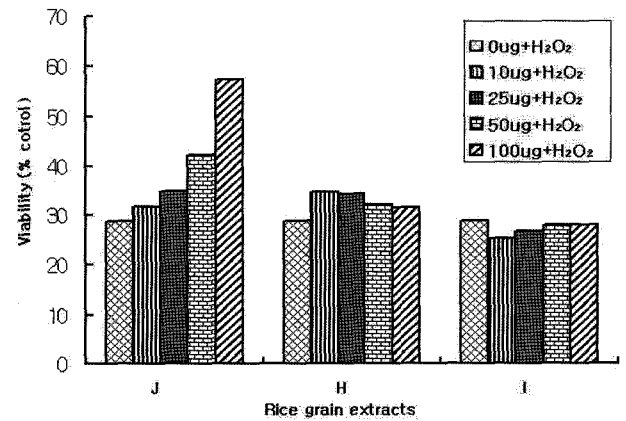


Fig. 6. Comparison of protective effects on three rice grain extracts for 24 h after treating 1 mM H₂O₂-induced oxidative cell death in H4IIE cells. J; Jakwangchalbyeo, H; Hwasunchalbyeo, I; Ilpumbyeo extract.

것으로 보아 강력한 항산화 효과가 있을 것으로 판단되었다. Lee (2001)도 뼈세포에 과산화수소로 free radicals를 투여한 후, genistein의 투여로 인해 세포중식이 촉진되었다고 하였는데 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 자광찰벼 추출물의 항산화 효과가 있음을 시사한다고 할 수 있다.

따라서 자광찰벼 시료의 유효성분 분석 및 동정 등을 통하여 보다 집중적인 연구가 수행된다면 자광찰벼 함유 유효성분들의 생리활성에 대한 보다 명확한 효과가 구명될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

자광찰벼, 화선찰벼, 및 일품벼 에탄올 분획의 H4IIE 세포에 대한 산화적 스트레스 보호효과를 검증하기 위해서 수행

하였다. 과산화수소에 의하여 생성된 자유라디칼은 H4IIE 세포에 산화적 손상을 초래하며 이러한 손상에 기인된 세포사멸에 대하여 화선찰벼와 일품벼 추출물은 방어효과가 없었으나, 적색을 띤 자광찰벼 추출물의 에탄올 분획은 과산화수소에 의하여 유도된 산화적 스트레스에 가장 현저한 효과를 나타내었다. 금후, 보다 광범위하고 집중적인 연구를 수행한다면 쌀 함유 유효성분들의 생리활성에 관한 보다 명확한 효과가 구명될 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

- Cho, M.H., H.H. Yoon, and T.R. Hahn. 1996. Thermal stability of the major color compound, cyanidin-3-glucoside, from a Korean pigment rice variety in aqueous solution. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 39 : 245-248.
- Choi, H.C. and S.K. Oh. 1996. Diversity and function of pigment in colored rice. *Korean Journal of Crop Science*. 41 : 1-9.
- Choi, S.W., S.H. Nam, and H.C. Choi. 1996. Antioxidative activity of ethanolic extracts of rice brans. *Food Science and Biotechnology*. 5 : 305-309.
- Choi, S.W., W.W. Kang, T. Osawa, and S. Kawakishi. 1994. Antioxidative activity of crysanthem in black rice hulls. *Food Science and Biotechnology*. 3 : 233-237.
- Chung, I.M., K.H. Kim, J.K. Ahn, S.K. Lee, and J.O. Lee. 2001. Antioxidative activity of rice grain using FI-CL and ESR methods. *Korean Journal of Crop Science*. 46 : 411-415.
- Chung, I.M., K.H. Kim, J.K. Ahn, and J.O. Lee. 2000 a. Varietal variation in antioxidative activity of rice grain by DPPH and TBA methods. *Korean Journal of Crop Science*. 45 : 261-266.
- Chung, I.M., K.H. Kim, J.K. Ahn, and J.O. Lee. 2000 b. Comparison of superoxide dismutase and peroxidase activities in rice varieties. *Korean Journal of Crop Science*. 45 : 277-281.
- Choi, Y.J., J.S. Choi, S.H. Lee, Y.J. Lee, J.S. Kang, and Y.H. Kang. 2002. Inhibitory effects of Epigallocatechin Gallate on apoptosis in human vascular endothelial cells. *Journal of Food Science and Nutrition*. 31 : 672-678.
- Denizot, F. and R. Lang. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*. 89 : 271-277.
- Kang, K.W., R.F. Novak, C.H. Lee, and S.G. Kim. 2002. Induction of microsomal epoxide hydrolase by sulfur amino acid deprivation via the pathway of C-Jun N-terminal kinase and its extracellular exposure during cell death. *Free Radical Biology & Medicine*. 32 : 1017-1032.
- Kwak, T.S., H.J. Park, W.T. Jung, and J.W. Choi. 1999. Antioxidative and hepatoprotective activity of coloured-, scented and Korean native rice varieties based on different layers. *Journal of Food Science and Nutrition*. 28 : 191-198.
- Lee, Y.S. 2001. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Korea Soybean Digest*. 18 : 35-42.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65 : 55-63.
- Nam, S.H., S.M. Chang, and M.Y. Kang. 2003. Varietal difference in antioxidative activity of ethanolic extracts from colored rice bran. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 46 : 16-22.
- Osawa, T., N. Ramarathnam, K. Shunro, N. Mitsuo, and T. Toru. 1985. Antioxidative defense system in rice hull against damage caused by oxygen radicals. *Agricultural and Biological Chemistry*. 49 : 3085-3087.
- Park, D.J., G.Y. Na, S.J. Lee, D.W. Kim, and S.L. Chung. 2003. Increased sensitivity of keratinocytes to oxidative stress in vitiligo. *Korean Journal of Dermatology*. 41 : 592-596.
- Ramarathnam, N., T. Osawa, M. Namiki, and T. Tashiro. 1986. Studies on the relationship between antioxidative activity of rice hull and germination ability of rice seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 37 : 719-726.
- Ramarathnam, N., T. Osawa, M. Namiki, and T. Tashiro. 1989. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 2. Identification of isovitexin, a C-glycosyl flavonoid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37 : 316-319.
- Tsuda, T., M. Watanabe, K. Ohshima, S. Norinobu, S.W. Choi, S. Kawakishi, and T. Osawa. 1994. Antioxidative activity of the antocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D-glucoside and cyanidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42 : 2407-2410.
- Wu, K., W. Zhang, P.B. Addis, R.J. Epley, A.M. Salih, and J. Lehrfeld. 1994. Antioxidant properties of wild rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42 : 34-37.