

Drumstick-tree (*Moringa oleifera* Lam.)의 주요 영양성분 및 추출물의 신경세포 보호 효과

진수일 · 김현주 · 정지희 · 진동은 · 최성길 · 허호진*

경상대학교 응용생명과학부, 농업생명과학연구원

Nutritional Composition and Cytoprotective Effect of *Moringa oleifera* Lam.

Su Il Jin, Hyeon Ju Kim, Ji Hee Jeong, Dong Eun Jin, Sung-Gil Choi, and Ho Jin Heo*

Division of Applied Life Science, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University

Abstract The cytoprotective effect of *Moringa oleifera* Lam. (drumstick tree) on neuronal cells was investigated to confirm the physiological benefits associated with this natural food resource. First, the drumstick tree extract was chemically analyzed to determine inherent nutritional constituents. Calcium and potassium were identified as the major mineral constituents, and palmitic acid (C16:0, 16.33%) and gadoleic acid (C20:01, 66.34%) were detected as the major fatty acids. Moreover, drumstick tree extract contained 94.78 mg/100 g vitamin E and 112.61 mg/100 g niacin. PC12 cells were used to study the cytoprotective effects of drumstick tree extract. Intracellular accumulation of reactive oxygen species was significantly reduced when H₂O₂ treated-neuronal cells were cultured in a medium containing the methanolic extract of drumstick tree, compared to cells treated with only H₂O₂. Cell viability assay using MTT showed that the extract protected cells against H₂O₂-induced neurotoxicity and inhibited LDH leakage from the cell membrane. Caspase assay showed that the extract exerted cytoprotective effect against apoptosis. Consequently, these data suggest that drumstick tree is a useful natural resource with positive effects on human health.

Keywords: *Moringa oleifera* Lam, drumstick tree, PC12 cell

서 론

현대의학의 발달에 따른 인간 수명의 연장은 노령인구의 증가를 초래하게 되었고, 고령화에 접어들면서 우리나라의 65세 이상 노년층의 인구가 전체 인구의 11%에 이르고 있으며, 2050년에는 38.2%로 증가될 것으로 예측하고 있다(1). 현대사회의 발달과 더불어 생체조직의 노화를 비롯한 퇴행성 신경질환은 사회적 문제로까지 크게 대두되고 있다. 퇴행성 신경질환은 정상적인 노화의 과정과는 달리 비정상적인 신경세포의 사멸에 의하여 뇌나 척수에 이상이 생겨 인지능력, 보행능력, 운동능력 등이 감소하게 되는 질환이다. 이런 퇴행성 질환의 주된 원인은 활성산소(free radical, oxygen radical)를 포함한 생체 내 oxidative stress에 기인되는 것으로 보고되고 있다(2). 활성산소가 체내에 적정량 존재할 때에는 생체방어 과정 중 하나로 병원체나 이물질에 대한 살균작용을 통해 병원체로부터 인체를 보호하는 작용을 하지만 과다하게 발생할 경우 생명현상을 둔화시키거나 신경세포를 사멸시킬 수 있다(3). 활성산소들은 대개 불안정하고 산화력이 높아 생체물질과 쉽게 반응하기 때문에 인체 내에서 대사적으로 제거되지 못하면

oxidative stress(4,5)를 유발하게 되며 이러한 산화적 스트레스는 지질과산화물을 유도하고 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 세포의 노화와 변형을 유도함으로써 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병 등 다양한 퇴행성 신경질환을 유발하게 된다(6). 퇴행성 신경 질환을 치료하기 위해서 항산화제복용, 세포 이식, 외과적 수술 등 다양한 치료법이 제시되고 있지만 대부분이 위험요소와 부작용을 나타내고 있으며 뇌 조직의 경우 일단 손상이 되면 기능 회복이 어렵기 때문에 퇴행성 신경질환에 있어서 신경세포를 보호할 수 있는 천연 소재의 개발이 요구되고 있다(7).

Drumstick-tree (*Moringa oleifera* Lam.)은 일반적으로 하와이에서 'Malunggay'로 불리는 식물로서 생장이 빠른 관상용 또는 식의약용 나무로 열대지역에 널리 분포되어 있다(8). 또한 drumstick-tree은 아시아, 아프리카, 아라비아 등에서 재배되며 단백질과 비타민이 풍부해 영양가가 높고, 의약적으로 과혈당증의 완화와 항염증, 항산화, 항암 등 다양한 생리적 조절작용을 가지고 있다(9,10). Drumstick-tree의 다양한 부위들 중 식품 소재로 주로 이용되는 잎은 β-카로틴, 단백질, 비타민 E, 칼슘 등이 풍부해 항산화제로 이용되며, drumstick-tree의 씨 추출물은 flavonoid와 isothiocyanates, glucosinolates, thiocarbamates와 같은 생리활성 물질을 포함하고 있다(11). 더불어 씨 추출물이 간 기능 보호에 효과가 있는 것으로 확인되었으며(12), 암세포의 apoptosis와 anti-proliferation 효과가 있다는 것이 밝혀진 바 있다(13). 반면 Drumstick-tree 추출물이 oxidative stress에 대한 신경세포 보호효과와 같은 퇴행성 신경질환에 관한 연구는 상대적으로 미비한 실정이므로, 본 연구에서는 drumstick-tree 추출물이 oxidative stress로서 hydrogen peroxide에 의해 유도되는 신경세포의 사멸을 보호할 수

*Corresponding author: Ho Jin Heo, Division of Applied Life Science, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea
Tel: 82-55-772-1907
Fax: 82-55-772-1909
E-mail: hjher@gnu.ac.kr
Received March 18, 2014; revised June 27, 2014;
accepted July 17, 2014

있는지에 대한 *in vitro* 효과와 더불어 고부가가치 식품자원으로서의 주요 영양성분을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 추출물의 제조

Drumstick-tree (*Moringa Oleifera* Lam.)은 2013년 6월 부산광역시 소재 유기농 허브 전문 매장에서 필리핀산 잎 분말을 구입하여 수분함량 10% 이하인 것을 확인한 후 사용하였다. 실험을 위한 추출물은 시료 100 g을 80% methanol 200 mL을 첨가하여 80°C에서 2시간 환류냉각 추출 후 얻어진 추출물을 회전진공농축기를 사용하여 50 mL 이하로 농축시켰다. Open-column에 C₁₈을 충전시킨 후 methanol과 3차 증류수를 차례로 통과시켜 활성시킨 후 상기 추출물을 흡착시켰다. 이후 3차 증류수로 세척을 한 다음 메탄올로 용출시킨 추출물을 1차 감압 건조, 2차 동결 건조하여 본 실험에 사용하였다. 세포주 배양을 위해 필요한 RPMI 1640 medium과 fetal bovine serum은 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, penicillin, streptomycin, sodium bicarbonate와 HEPES 및 각종 assay kit은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)제품을 구입하여 사용하였다. Caspase Glo 3/7 assay kit (Promega, Madison, WI, USA)은 신경세포 보호효과 실험을 위해 활용되었고, 그 외 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

지방산 조성 분석

조직지방 추출은 분쇄된 시료 2 g을 원통여지(Whatman No. 2, Whatman plc., Maidstone, Kent, UK)에 넣고 ethyl ether를 가하여 soxhlet 추출법으로 약 16시간 추출한 다음 감압 농축시켜 함량을 측정하였다. 지방산 분석은 지방 성분 분석에서 추출한 시료 약 200 mg을 취하여 Metcalf 등(14)의 방법에 준하여 즉, 지방 추출물에 0.5 N NaOH/MeOH을 각각 첨가한 후 85°C에서 10분간 methyl ester화시킨 다음 n-heptane을 가하여 4-5분간 방치하고, NaCl 포화용액 2 mL와 ether 20 mL를 첨가한 후 ether 층을 감압·농축하여 GC (5890, Hewlett-Packard Co., Avondale, PA, USA)로 분석하였다. 분석조건으로서 column은 Supelco wax 10을 사용하였고, injector 온도는 250°C, column oven 온도는 260°C, detector 온도는 280°C, carrier gas는 N₂로 하고, split ratio는 30:1로 하여 분석하였다.

무기성분 분석

무기성분 분석은 각 시료 1 g에 분해용액(HClO₄:H₂SO₄:H₂O₂=9:2:5) 25 mL를 가하여 hot plate에서 무색으로 변할 때까지 분해한 후 100 mL로 정용하여 여과 한 것을 활용하여 inductively coupled plasma (OPTIMA 4300DV/5300DV, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)로 분석하였다. 분석조건 중 RF power는 1,300 W이며, analysis pump flow rate는 1.5 mL/min으로 하였고, gas flows는 plasma: 15, auxiliary: 0.2, nebulizer: 0.8 L/min으로 하여 분석하였다(15).

β-carotene 분석

시료 0.5 g을 cap vial에 넣은 후 10 mL의 1N KOH가 함유되어 있는 무수에탄올과 0.02 g의 BHT를 첨가하였다. Cap vial을 heating block에 넣고 100°C에서 30분 동안 반응시킨 후 cap vial을 실온에서 방치하였다. 식힌 시료를 250 mL 갈색 분액깔때기로 옮겨 20 mL 포화 식염용액과 40 mL 석유에테르를 첨가하여

섞어주었다. 석유에테르 층을 모아 40°C 이하에서 농축한 후 여과하여 HPLC (U3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)로 분석하였다. Column은 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (4.6×250 mm)을 사용하였고, 이동상은 0.22 mM BHT를 함유시킨 ethylacetate:acetonitrile:acetic acid (30:68:2, v/v/v)를 사용하였다. 유속은 0.8 mL/min, 주입량은 20 μL, 검출기는 photodiode array를 사용하였고 파장은 450 nm에서 분석하였다(16).

Vitamin B₁, B₆ 및 niacin 분석

균질화한 시료(1-10 g)를 50 mL 갈색 플라스크에 넣고, 5 mM sodium 1-hexanesulfonate 용액을 가해 30분간 초음파추출기로 추출한 후, 50 mL로 정용하였다. 추출물은 0.45 syringe filter로 여과하여 HPLC (1200 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다. Column은 Sunrise C₁₈ (3.0×250 mm)을 사용하였고, 이동상은 A: acetic acid 7.5 mL와 triethylamine 0.2 mL를 함유한 5 mM sodium 1-hexane-sulfonate solution 1 L, B: methanol을 gradient condition으로 분석하였다. HPLC 분석 시 gradient elution 조건은 0 min, A 100% B 0%; 6 min, A 100% B 0%; 13 min, A 80% B 20%; 15 min, A 80% B 20%; 17 min, A 20% B 80%; 20 min, A 0% B 100%로 하였으며, 유속은 0.8 mL/min, 온도는 30°C, 주입량은 20 μL, 검출기는 diode array detector (DAD)를 사용하였고, 파장은 270 nm에서 분석하였다(17).

Vitamin E 분석

시료 약 0.2-2 g을 취하여 10% 피로갈에탄올용액 1 mL와 에탄올 50 mL를 잘 섞은 후 수산화칼륨용액 5 mL를 가해 환류냉각기에 부착하여 비등수욕에서 30분간 비누화시킨다. 그 후 냉각시키고 물 30 mL를 넣고 분액깔때기에 옮긴 후 석유에테르 50 mL로 3회 추출 후 석유에테르를 증류수 30 mL로 2회씩 씻는다. 물을 충분히 분리한 석유 에테르 층을 무수황산나트륨으로 탈수하고 황산나트륨을 석유에테르 10 mL씩으로 2회 씻고, 씻은 액을 플라스크에 옮긴 후 감압·농축한 다음 HPLC (1100 series, Agilent Technologies)로 분석하였다. Column은 XBridge C₁₈ (4.6×150)를 사용하였고, 용매와 유속은 vitamin E는 methanol, 1.0 mL/min, detector는 DAD를 사용하였고, 파장은 298 nm에서, 컬럼 온도와 주입량은 30°C, 20 μL로 하였다(18).

세포 및 배양방법

본 실험에서 사용한 PC12 세포(KCLB 21721, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)는 신경세포의 특성을 나타내는 세포로 쥐의 pheochromocytoma로부터 유도된 것을 사용하였다. PC12 세포를 25 mM HEPES, 25 mM sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, 50 units/mL penicillin 및 100 μg/mL streptomycin이 포함된 RPMI 1640 배지에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

세포 내 ROS 측정

PC12 세포의 산화적 손상에 대한 신경세포 보호효과를 측정하기 위하여 세포 내 ROS 생성 정도를 측정하고자 DCF-DA assay를 실시하였다. 먼저 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 추출물을 PC12 cell에 처리하여 48시간 동안 pre-incubation 시킨 후, 200 μM H₂O₂를 각각 3시간 동안 처리하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음, phosphate buffered saline (PBS) buffer로 희석된 10 μM DCF-DA를 가하고, 45분간 배양하였다. PBS buffer로 2회

washing한 다음 200 μM H_2O_2 를 가하고, 3시간 뒤에 fluorescence microplate reader를 사용하여, excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서 형광강도를 측정하였다(19).

신경세포 보호효과 측정

세포 생존을 측정은 H_2O_2 에 의해 유도된 PC12 세포에 대하여 drumstick-tree 추출물의 보호효과는 MTT reduction assay로 측정하였다(19). 추출물을 PC12 cell에 처리하여 48시간동안 pre-incubation 시킨 후, 200 μM H_2O_2 를 각각 3시간 동안 처리하였다. 이 상태의 PC12 cell에 MTT stock solution을 처리하여 37°C에서 3시간 incubation 시킨 후, MTT solubilization solution 150 μL 를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 마지막으로 흡광도는 microplate reader(680, Bio-Rad, Tokyo, Japan)에서 570 nm와 690 nm에서 측정하였다. Positive control은 vitamin C 200 μM 을 사용하였고, cell viability는 control group에 대한 % concentration으로 나타났다.

세포막 손상 억제효과는 추출물을 48시간 동안 pre-incubation 시킨 후, 200 μM H_2O_2 를 처리하여 3시간 배양한 후, 5분간 원심분리(250 \times g)하여 100 μL 의 상등액을 새로운 well로 옮긴 후 LDH assay kit으로 세포막 손상효과를 측정하였다(19).

PC12 cell의 apoptosis에 대한 추출물의 보호효과를 확인하기 위해 caspase assay를 측정하였다. 추출물을 PC12 cell에 48시간 동안 pre-incubation 시킨 후, 200 μM H_2O_2 를 각각 3시간 동안 처리하였다. 이 상태의 PC12 cell에 Caspase Glo 3/7 assay kit 50 μL /well을 처리하여 실온에서 2시간 incubation 시킨 후 GloMax-Multi Instrument Luminometer (Promega, Sunnyvale, CA, USA)를 활용하여 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하여 mean \pm SD로 나타내었다. 실험군 간 차이의 통계적 유의성은 SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 ANOVA 분산분석과 Duncan's multiple range test를 사용하여 유의성 검정을 시행하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

무기성분 함량

Drumstick-tree의 무기성분 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 무기성분은 총 8종이 분리·동정되었으며, 가장 많이 함유되어 있는 무기성분은 칼슘으로 2658.67 mg/100 g이 함유되어 있었고, 다음으로 칼륨(1520.02 mg/100 g), 마그네슘(569.55 mg/100 g) 및 인(530.65 mg/100 g) 순으로 함유되어 있었으며, 철, 망간, 아연, 구리도 소량(<10 mg/100 g)함유되어 있었다. 쌀 등 곡류를 주식으로 하는 우리나라 식생활 특성상 칼슘, vitamin B₂ 등의 영양소가 가장 부족하기 쉽다. 실제로 우리나라 2007년 국민 건강 영양조사에 따르면 우리나라 국민 1인 1일 당 평균 칼슘 섭취량이 461.8 mg (남자 519.7 mg, 여자 403.5 mg)으로 권장량의 63.4%에 그친 것으로 나타났다(20). 특히 성장기 8-13세의 칼슘 섭취량이 573.5-563.9 mg으로 이 역시 권장량에 미치지 못하고 있고, 현재까지도 크게 개선되지 못하여 최근 한국인 영양섭취기준에서 이 인구 집단에 제시한 권장섭취량 700-800 mg의 70.4%만을 섭취하고 있었다. 칼슘 섭취는 골격의 성장과 유지뿐만 아니라, 골다공증, 순환기 질환의 원인이 되는 고지혈증, 고혈압 등과 관련이 있고 당뇨와 대장암 등의 발생 위험을 줄이기도 한다는 연구(21)가 있는 만큼 전 생애를 통한 충분한 섭취가 매우 중요하다. 또한 성장기 청소년의 칼슘 급식원은 대부분 우유 및 그 가

Table 1. Minerals content of drumstick-tree Unit: mg/100 g

Minerals	Content
Ca	2658.67 \pm 7.81
Mg	569.55 \pm 4.35
P	530.65 \pm 3.71
K	1520.02 \pm 5.42
Cu	0.48 \pm 0.04
Fe	8.58 \pm 1.57
Mn	4.59 \pm 1.05
Zn	2.04 \pm 0.63

Table 2. Fatty acids composition of drumstick-tree Unit: %

Fatty acids	Content
Caprylic acid (C8:00)	0.13 \pm 0.01
Lauric acid (C12:00)	1.00 \pm 0.12
Tridecanoic acid (C13:00)	0.58 \pm 0.01
Myristic acid (C14:00)	1.09 \pm 0.14
Palmitic acid (C16:00)	16.33 \pm 2.31
Palmitoleic acid (C16:01)	0.45 \pm 0.26
Stearic acid (C18:00)	2.17 \pm 0.35
Oleic acid (C18:01)	3.36 \pm 0.27
Linoleic acid (C18:02)	5.83 \pm 0.48
Arachidic acid (C20:00)	0.42 \pm 0.15
Gadoleic acid (C20:01)	66.34 \pm 3.76
Begenic acid (C22:00)	0.52 \pm 0.02
Ecosapentanoic acid (C20:5)	1.35 \pm 0.24
Docosaheptaenoic acid (C22:6)	0.41 \pm 0.03

공품에서 기인되고 있으나 낮은 기호도로 인해 그 섭취량이 권장 섭취량의 약 30% 수준(<400 mg)에 머무르고 있는 것으로 나타나고 있다(21). 결국 drumstick-tree에 함유된 고농도의 칼슘은 천연 칼슘 급원으로 가공 적성 연구를 통한 다양한 식품 자원으로의 산업적 활용 가능성이 기대되고 이를 통한 국민 보건 증진에도 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

지방산 조성 및 비타민류 함량

Drumstick-tree에 함유되어 있는 지방산을 gas chromatography를 이용하여 분석한 결과는 Table 2와 같다. 지방산은 모두 14종이 확인되었으며, 주요 지방산으로는 불포화 지방산으로서 gadoleic acid (cis-9-eicosenoic acid: 66.34%)와 포화 지방산으로서 palmitic acid (16.33%)가 검출되었다. 그 외에도 포화 지방산으로는 stearic acid, myristic acid 등, 그리고 불포화 지방산으로는 linoleic acid, oleic acid 등이 소량 함유되어 있었다.

지용성 및 수용성 주요 vitamins로서 β -carotene, vitamin B₁, niacin, vitamin B₆ 및 vitamin E 분석에 대한 결과는 Table 3과 같다. 비타민 A의 전구체로 천연 carotenoid의 한 종류로 항산화제, 유리라디칼 제거제 등의 가치가 있다고 알려진 β -carotene은 23.84 mg/100 g이 함유되어 있었고, 수용성 비타민으로서 vitamin B₁, vitamin B₆는 각각 13.25 mg/100 g, 30.04 mg/100 g이 함유되어 있었다. Niacin의 함량은 112.61 mg/100 g으로 분석한 vitamins 중 가장 많은 함량을 나타내었다. Vitamin C와 함께 천연 항산화제로 알려진 vitamin E는 94.78 mg/100 g으로 상대적으로 많은 함량이 함유되어 있는 것을 역시 확인할 수 있었다.

포화 지방산에 비하여 불포화 지방산은 혈중 중성지방, 총 콜

Table 3. Vitamin content of drumstick-tree

Vitamins	Content
β -carotene	23.84 \pm 2.61 μ g/100 g
Vitamin B ₁	13.25 \pm 1.73 mg/100 g
Vitamin B ₆	30.04 \pm 3.59 mg/100 g
Niacin	112.61 \pm 6.76 mg/100 g
Vitamin E	94.78 \pm 4.82 mg/100 g

레스테롤 LDL-콜레스테롤 등 지질 대사산물을 낮추는 것으로 알려져 있다. 이 외에도 prostaglandin, leukotriene 및 thromboxane으로 전환되어 염증반응 조절에도 관여하고 있다. 특히 어유 등에 다량 함유된 ω -3 지방산인 docosahexaenoic acid (DHA)는 혈중 중성지질 억제 및 혈관이완 효과가 보고되었다(22). 그러나 산화되기 쉬운 불포화 지방산을 지나치게 과잉 섭취하면 오히려 생리적 지질 과산화를 초래할 수 있다고 최근 연구는 보고하고 있다. 이는 다중 불포화 지방산의 불안정한 cis형 이중결합과 지방산 자체의 불포화도로 인해 자유라디칼 및 지질 과산화물이 더욱 많이 생성할 가능성이 높은 것에 기인되며, 이로 인한 세포막 파괴, 노화 및 다양한 퇴행성 질환은 인체에 치명적인 영향을 미칠 수 있다(22). 생체 세포막의 주요 구성성분인 다중 불포화 지방산 등은 인체에서 발생하는 활성산소종과 같은 산화적 스트레스로 인해 malondialdehyde와 같은 지질과산화물로 전환되며, 이와 같이 생성되는 지질과산화물을 비롯한 체내 과산화물은 다양한 세포에 대한 산화적 손상을 초래해 각종 기능 장애를 야기한다. 특히, 뇌 조직은 그 생리적 특성 상 높은 산소 요구와 함께 높은 수준의 불포화지방산의 함유량 그리고 상대적으로 미흡한 항산화 방어 기전으로 인하여 산화적 스트레스에 상대적으로 매우 민감한 조직이므로 섭취되는 과량의 지방산에 의한 산화 스트레스를 최소화하기 위해서는 천연 항산화제의 적절한 섭취가 반드시 필요하다(23). 인체에는 산화적 스트레스를 제거하여 세포 파괴를 억제하거나 항산화 효소를 재생하여 항산화 능력을 강화시키는 항산화효소 시스템이 있고 더불어 비 효소계 항산화 시스템으로서 vitamin C 그리고 vitamin E 등이 있다. 특히 콩, 옥수수 그리고 해바라기씨 등의 식물성 기름과 씨눈에 많이 함유된 vitamin E는 토코페롤(α -, β -, γ -, δ -tocopherol)과 토코트리엔올(α -, β -, γ -, δ -tocotrienol)이 있다. α -토코페롤은 가장 큰 생물학적 활성을 갖고 있으며 세포막에 존재하는 비타민 E는 산소를 함유하는 활성물질로부터 산화되기 쉬운 다중 불포화 지방산을 대신하여 먼저 산화됨으로써 생체막을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 과다한 불포화 지방산 섭취를 통해 산화적 스트레스를 유도한 rat brain의 손상이 vitamin E의 8주간 섭취로 인해 *in vivo* 항산화 효과가 최근 연구를 통해 확인된 바 있다(23). 그러므로 drumstick-tree에 함유된 불포화 지방산 및 β -carotene, vitamin E 등은 인체 내에서 상호 대사 균형 유지에 도움을 줄 수 있을 것으로 유추되며 이로 인한 생리적 활성을 함께 기대할 수 있을 것이다.

Hannan 등(24)은 drumstick-tree 에탄올 추출물(30 μ g/mL)이 rat embryonic hippocampal neuron 세포의 생존과 신경세포의 신호전달 기능에서 중요한 neurite의 성장을 촉진하는 것으로 보고하였다. 이들 신경세포의 생존과 neurite의 성장 촉진은 drumstick-tree 추출물이 neurotrophic 인자와 유사한 물질을 함유하고 있기 때문으로 여겨지고 있고, 이와 관련된 유효 생리활성 물질은 flavonoids를 포함한 phenolics, 그리고 carotenoids 등이며 이들 물질에 의해 유발되는 세포 내 항산화시스템의 강화가 신경세포 보호효과

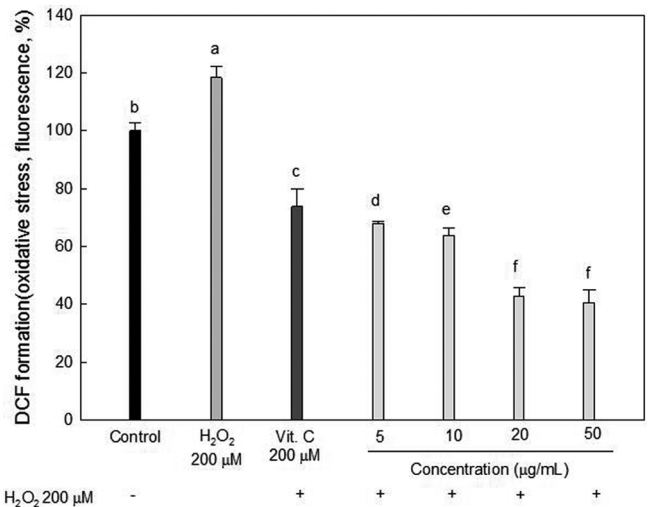


Fig. 1. Effect of 80% methanolic extracts from drumstick-tree on free radical production determined in the presence and absence of H₂O₂ in PC12 cell. Statistical analysis indicated that the influence of the 80% methanolic extracts used had significant effect on the H₂O₂-induced oxidative stress. Result shown are means \pm SD (n =3), and different small letters represent statistical differences.

및 성장 촉진에 기여하는 것으로 알려지고 있다. 특히 drumstick-tree 잎에는 β -carotene과 같은 천연 항산화 물질이 다량 함유되어 있는 것으로 나타나고 있고(25), 이들 β -carotene은 drumstick-tree 잎 추출물의 주요 성분으로서 neurite 성장을 촉진하는 효과를 갖는 것으로 알려지고 있다(24). 결국 drumstick-tree에 함유된 β -carotene에 의한 신경세포 생성 및 활성화 그리고 vitamin E 등에 의한 효과적인 항산화 활성으로 인해 drumstick-tree 추출물은 뇌 신경세포를 포함한 인체 내 조직 세포의 보호에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

세포 내 ROS 생성의 측정

Drumstick-tree 추출물이 H₂O₂에 의해 유도된 PC12 세포 내 ROS 생성 저해 활성을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. DCF formation은 H₂O₂를 처리한 처리구에서는 control group 100.00% 대비 118.34%의 DCF formation을 나타냈고 H₂O₂와 vitamin C를 동시에 처리한 처리구에서는 73.87%로 약 44.47% 정도의 산화적 스트레스 감소 효과를 보였다. 최근 연구에 의하면, drumstick-tree 잎을 활용한 에탄올 추출물이 HEK 293 cell (human embryonic kidney cell) 즉 신장 세포에서의 항산화 효과가 있음을 DCF-DA assay를 통해 나타냈고, drumstick-tree 잎 추출물이 control group 대비 H₂O₂-induced ROS의 생성을 매우 효과적으로 저해할 수 있음을 나타냈다. 또한 이들 *in vitro* antioxidant activity는 drumstick-tree 잎 추출물에 함유된 gallic acid, catechin, cryptochlorogenic acid, 그리고 isoquercetin과 같은 phenolics에 의한 것으로 확인되었다(26). 결국 본 연구에서의 *in vitro* antioxidant activity 역시 연구에 활용된 cell line은 다르지만 drumstick-tree 잎 추출물에 함유된 다양한 phenolics에 의한 것으로 추정된다.

신경세포 보호효과

MTT tetrazolium assay는 활용 세포의 생리적 상태나 종류에 따라 mitochondrial dehydrogenase 활성의 차이가 나타날 수 있으며 suspension cell에 적용하기 어려운 단점도 있지만, 비교적 간

편하면서도 정확하게 세포 성장 및 사멸 정도를 평가할 수 있을 뿐만 아니라 대량의 sample을 동시에 측정할 수 있기 때문에 *in vitro* cell viability를 검증하는데 보편적으로 사용되고 있다(27). Drumstick-tree 추출물의 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에서 PC12 신경세포에 대한 보호 효과를 측정된 MTT tetrazolium assay 결과는 Fig. 2(A)와 같다. Neuronal cell viability는 H₂O₂를 처리한 처리구에서 control group (100.00%) 대비 64.19%의 생존율을 나타냈고, H₂O₂와 vitamin C (positive control)를 동시에 처리한 처리구에서는 91.18%의 생존율로 H₂O₂ 대비 약 26.99% 정도의 신경세포 보호효과를 보였다.

뇌 조직은 다른 생체 조직에 비해서 산화적 손상에 대해 비정상적으로 매우 민감하고, 상대적으로 불포화 지방산의 구성도가 높은 뇌 신경세포막에서의 과산화에 대한 많은 신경 세포 손상 연구들은 이를 뒷받침해준다(23). 따라서 뇌 조직은 산화적 스트레스에 매우 취약한 구조적 특성을 가지고 있으므로 신경세포 보호효과와 더불어 신경세포막 손상과의 관계를 알아보고자 LDH release assay를 진행하여 세포막 손상 보호효과를 알아보았으며, 그 결과는 Fig. 2(B)와 같다. Control group의 방출량은 23.60% 정도인데 비해 H₂O₂ 처리한 구에서는 45.08%의 방출량을 보여 H₂O₂로 인해 LDH 방출량이 21.48%정도 증가하였다. Vitamin C 200 µM 처리군은 30.42%의 방출량을 보였고, 농도별 처리구에서는 추출물의 농도가 증가하면서 감소하는 경향을 보였다. 특히 처리 농도 20 µg/mL에서는 LDH leakage가 positive control인 vitamin C보다도 상대적으로 우수한 저해효과를 나타냈다. 다만 50 µg/mL 처리구에서는 PC12 cell에 대한 보호 효과가 5 µg/mL 처리구 수준으로 감소하는 경향을 보이고 있는데, 그 원인이 *in vitro* cytotoxicity를 판단하는 각 실험에서의 기작 차이에 의한 것인지 아니면 정제 형태가 아닌 추출물이 갖는 특성에 의한 것인지 는 향후 지속되는 연구를 통해 확인할 필요가 있다.

한편 대표적인 세포 내 apoptosis 유발 단백질 분해효소인 caspase family에 속하는 단백질들은 세포 내에서 nucleus와 mitochondria 외막에 불활성 상태인 pro-enzyme 형태로 존재하다가 Bcl-2 family 등의 유전자 발현 변화와 관련되어 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 단백질 분해효소로 전환되어 직·간접적으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여하는 것으로 보고되고 있어, caspase의 활성화 자체가 세포 내 apoptosis 유발의 또 다른 증거가 될 수 있다(28). PC12 cell에서 발생하는 oxidative stress-induced apoptosis에 대한 추출물의 신경세포 보호효과를 확인하기 위해 caspase 3/7 assay 결과를 Fig. 2(C)에 나타내었다. Control group의 activity 대비 H₂O₂ 처리한 구에서는 130.87%의 caspase activity를 보여 H₂O₂로 인해 cellular caspase activity가 증가함을 알 수 있었고, positive control로서 vitamin C 처리구는 118.25%로 H₂O₂-induced cytotoxicity를 약 10% 내외에서 경감시키는 것을 보였다. 반면 drumstick-tree 추출물 50 µg/mL 농도에서 H₂O₂-induced cytotoxicity가 60.05% 수준으로 감소하였으며 추출물의 농도가 증가함에 따라 caspase activity가 감소하는 경향을 나타냈다. Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 중요한 인자들은 apoptosis 유발 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려져 있는데, 그 중 Bcl-2나 Bcl-xL은 anti-apoptotic 인자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax나 Bad 등은 pro-apoptotic 분자로 이들의 발현 증가는 apoptosis의 유발과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려졌다. 이들 두 유전자는 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 cysteine-related protease인 caspase 및 DNA cleavage와 관련된 endonuclease 등의 활성을 조절하며 서로 dimer의 형태로 존재하

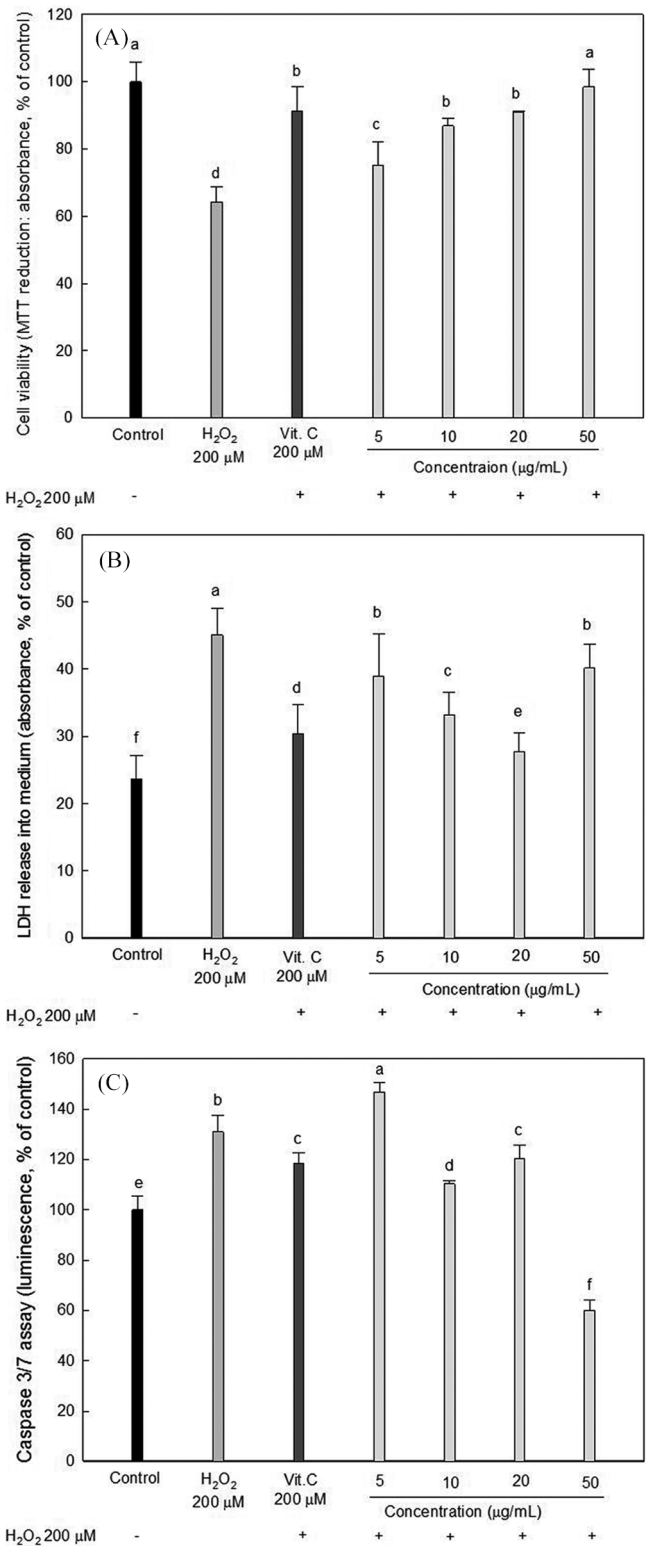


Fig. 2. Protective effect of 80% methanolic extracts from drumstick-tree against H₂O₂-induced cell death in PC12 cell system. PC12 cells were pre-treated for 48 h with various concentrations. The cells were then treated with 200 µM H₂O₂ for 3 h. (A) Levels of cell viability were measured by a MTT assay. (B) Inhibitory effect of LDH release on H₂O₂-induced membrane damage was measured with a colorimetric LDH assay. (C) Caspase 3/7 activity on H₂O₂-induced cellular apoptosis was measured with a caspase assay. Results shown are means±SD (n=3), and different small letters represent statistical differences.

지만 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다(29). 따라서 drumstick-tree 잎 추출물은 다양한 생리활성 물질 존재에 의한 항산화 특성 및 Bcl-2 family 발현 등의 변화를 일부 유도함으로써 neuron-like PC12 cell에서의 caspase activity를 조절하는 것으로 추정된다.

신경퇴행성 질환에서 신경 간 network는 신경세포 neurites의 붕괴로 말미암아 파괴되고, 외부에서 제공 되어지는 neurotrophic 인자는 신경 간 network 형성에 도움을 준다. 이는 퇴화되는 뇌 조직에서의 dendritic remodeling과 axon 형성을 통해, 붕괴된 network를 부분적으로 회복시켜주는 것과 함께 신경의 발생과정에서 axon과 dendrite의 형성에 도움을 주기 때문이다(24). Drumstick-tree 추출물을 rat hippocampal cell에 처리하였을 때 embryonic cell에서 axon과 dendrite의 형성과 성장 촉진은 신경세포 간 network 형성에 크게 도움을 주는 것으로 나타났다. 이로 말미암아 drumstick-tree 추출물은 신경세포 간 synaptic connection을 보다 견고하게 해주어 신경세포의 기능 유지 및 회복에 크게 기여하는 것으로 증명되었다(27). 결국 본 연구에서 활용된 drumstick-tree 잎 추출물은 신경퇴행성 질환에서 신경세포의 구조적 결함을 개선시킴으로서 관련 질환의 예방 및 개선에 효과적일 것으로 추정된다.

요 약

국내에 충분히 보고되지 못한 소재로서 drumstick-tree (*Moringa Oleifera* Lam.)를 고부가가치 식품 자원으로서 그 활용가능성을 알아보기 위해 주요 영양성분 분석 및 *in vitro* 신경세포 보호효과에 대해서 연구하였다. Drumstick-tree의 주요 무기성분으로는 칼슘으로 2658.67 mg/100 g이 함유되어 있었고, 다음으로 칼륨, 마그네슘 및 인 등이 함유되어 있었다. 주요 지방산으로서 포화 지방산으로는 palmitic acid (16.33%)와 불포화 지방산으로서 gadoleic acid (66.34%)가 상대적으로 많이 함유되어 있었고, 지용성 비타민인 vitamin E가 94.78 mg/100 g 그리고 niacin이 112.61 mg/100 g 함유되어 있는 것을 알 수 있었다. 80% methanol에 추출한 drumstick-tree 추출물을 활용하여 H₂O₂ 처리한 PC12 cell 내의 활성산소 생성억제효과를 DCF-DA assay를 통해 측정된 결과 drumstick-tree 추출물은 농도의존적인 활성산소 생성 억제효과를 보였다. MTT assay를 이용하여 H₂O₂로 유도된 PC12 신경세포에 대한 보호효과를 측정된 결과 vitamin C group 대비 효과적인 신경세포 보호효과를 확인하였고, LDH release assay를 통해 일정 수준의 세포막 보호효과를 역시 확인하였다. 또한 PC12 cell의 oxidative stress-induced apoptosis에 대한 세포 보호효과를 측정하기 위한 caspase assay 실험 결과, 세포 내 caspase activity가 추출물의 의해 효과적으로 감소됨을 알 수 있었다. 결국 본 연구결과를 종합해 볼 때, 우수한 영양 구성 성분과 함께 신경세포 내 oxidative stress의 저감화 등을 통한 drumstick-tree 추출물의 신경세포 보호 효과는 고부가가치 천연 소재로서의 다양한 산업적 활용 가능성을 암시하는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단에 의해 지원된 연구(KRF-2011-0021664) 및 2013년 산림청 산림과학기술개발사업(2013-자유10)의 지원을 받아 수행된 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

References

- Um MY, Ha TY, Seong KS, Kim YS. *In vitro* screening of the acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity, and neuronal cell protective effect of medicinal plant extracts. Korean J. Food Preserv. 20: 840-845 (2013)
- Yoon MY, Kim JY, Hwang JH, Cha MR, Jo KJ, Park HR. Protective effect of methanolic extracts from *Dendrobium nobile* Lindl. on H₂O₂-induced neurotoxicity in PC12 cells. J. Korean Soc. Appl. Chem. 50: 63-67 (2007)
- 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)
- Jeong EJ, Sung SH, Kim J, Kim SH, Kim YC. Rhus verniciflua stokes attenuates glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical cells. Nat. Prod. Sci. 14: 156-160 (2008)
- Parfenova H, Basuroy S, Bhattacharya S, Tcheranova D, Qu Y, Regan RF, Leffler CW. Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 290: 1399-1410 (2006)
- Ha JS, Park SS. Glutamate-induced oxidative stress, but not cell death, is largely dependent upon extracellular calcium in mouse neuronal HT22 cells. Neurosci. Lett. 393: 165-169 (2006)
- Yoon MY, Lee HJ, Lee BB, Lee SM., Kim JY, Kim Y, Park E, Park HR. Protective effect of *Schizonepeta tenuifolia* Briquet extracts on oxidative DNA damage in human leucocytes and on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells. Food Sci. Biotechnol. 16: 858-862 (2007)
- Staples G, Herbst DR. A tropical garden flora: plants cultivated in the Hawaiian Islands and other tropical places. Bishop Museum Press. Honolulu, HI, USA. p. 908 (2005)
- Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. Phytother. Res. 21: 17-25 (2007)
- Bharali R, Tabassum J, Azad MR. Chemomodulatory effect of *Moringa oleifera*, Lam, on hepatic carcinogen metabolising enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice. Asian Pac. J. Cancer Prev. 4: 131-139 (2003)
- Siddhuraju, P, Becker, K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick-tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. J. Agr. Food Chem. 51: 2144-2155 (2003)
- Hamza AA. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. Food Chem. Toxicol. 48: 345-355 (2010)
- Sreelatha S, Jeyachitra A, Padma PR. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. Food Chem. Toxicol. 6: 1270-1275 (2011)
- Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR. Rapid preparation of fatty acid esters form lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem. 38: 514-515 (1966)
- Jeong CH, Bae YI, Lee HJ, Shim KH. Chemical components of propolis and its ethanolic extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 501-505 (2003)
- Ha JH, Shim YS, Seo HY, Nam HJ, Masahito I, Hiroaki N. Rapid method for determination of β -carotene in foods using ultra high performance liquid chromatography. Food Sci. Biotechnol. 19: 1199-1204 (2010)
- Kim HS, Jang DK, Woo DK, Woo KL. Comparison of preparation methods for water soluble vitamin analysis in foods by reversed-phase high performance liquid chromatography. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 141-150 (2002)
- Kwak BM, Lee KW, Ahn JH, Kong UY. Simultaneous determination of vitamin A and E in infant formula by rapid extraction and HPLC with photodiode array detection. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 189-195 (2004)
- Heo HJ, Cho HY, Hong BS, Kim HK, Kim EK, Kim BK, Shin, DH. Protective effect of 4',5-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone

- from *Artemisia asiatica* against A β -induced oxidative stress in PC12 cells. *Amyloid*. 8: 194-201 (2001)
20. Kwon SH, Kim KN, Shim JS, Kim YH. Statistics, KNHANESIV. pp. 79-297. In: The Forth Korean National Health and Nutrition Survey 2007-First Year Report. Korean Health Industry Development Institute/Ministry of Health and Welfare. Cheongju, Korea (2009)
 21. Chang SO, Bae SK. Development of high calcium dishes for elementary school lunch and perception on calcium supply by school dietitian. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 1373-1380 (2009)
 22. Staprans I, Rapp JH, Pan XM, Feingold K. The effect of oxidized lipids in the diet on serum lipoprotein peroxides in control and diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 92: 638-643 (1993)
 23. Choi MJ, Kim HK, Lee MS. Vitamin E *in vivo* studies on the activity of antioxidant enzymes and CYP2E1 expression in high PUFA-treated brains. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 1106-1111 (2012)
 24. Hannan MA, Kang JY, Mohibullah M, Hong YK, Lee HS, Choi JS, Choi IS, Moon IS. *Moringa oleifera* with promising neuronal survival and neurite outgrowth promoting potentials. *J. Ethnopharmacol.* 152: 142-150 (2014)
 25. Sengev AI, Abu JO, Gernah DI. Effect of *Moringa oleifera* leaf powder supplementation on some quality characteristics of wheat bread. *Food Nutr. Sci.* 4:270-275 (2013)
 26. Vongsak B, Sithisarn P, Mangmool S, Thongpraditchote S, Wongkrajang Y, Gritsanapan W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Ind. Crop. Prod.* 44: 566-571 (2013)
 27. Edmondson JM, Armstrong LS, Martinez AO. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *J. Tissue Cult. Method.* 11: 15-17 (1988)
 28. Vegran F, Boidot R, Oudin C, Riedinger JM, Lizard-Nacol S. Implication of alternative splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance. *Bull. Cancer* 92: 219-226 (2005)
 29. Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 1644: 133-147 (2004)