

넓은잎 딱총나무에서 유도된 잎 유래 캘러스(Callus)의 형태학적 특성과 효능

강효석¹, 서효현¹, 민지애¹, 모지홍¹, 이정훈¹,
이준철², 박중원³, 조석형⁴, 김영준⁵, 모상현^{1*}

¹(주)바이오에프디엔씨 향노화연구소

²한국생산기술연구원

³농림수산검역검사본부

⁴해전대학 소방안전관리과

⁵청운대학교 화장품과학과

*e-mail:shmoh@biofdnc.com

Effects and Morphologic Features in Callus Derived from Leaf Tissue of *Sambucus latipinna* Nakai.

Hyo Seok Kang¹, Hyo Hyun Seo¹, Ji Aee Min¹, Ji Hong Moh¹,
Jeong Hun Lee¹, Joon Chul Lee², Jung Won Park³, Suk Hyung Cho⁴,
Young Jun Kim⁵, Sang Hyun Moh^{1*}

¹Anti-aging Research Institute of BIO-FD&C Co.,Ltd.

²Korea Institute of Industrial Technology

³Animal Plant & Fisheries Quarantine & Inspection Agency

⁴Dept of Fire Safety Management, Hyejeon College

⁵Dept of Cosmetic Science, Chungwoon University

요 약

본 연구는 넓은잎 딱총나무 잎으로부터 유도된 캘러스의 형태학적 특성과 효능에 관한 것이다. 딱총나무에서 유도된 캘러스 내의 세포들을 촬영한 표면주사현미경 사진에서 분열능이 높은 세포의 특성을 보여주었다. 유도된 넓은잎 딱총나무 캘러스를 생물반응기 내에서 배양시켜 얻은 딱총나무 식물세포 배양 추출물은 DPPH 제거 및 PPAR α 활성 실험결과에서 자유라디칼 제거능 및 항염증 효능이 높게 나타났다. 이러한 딱총나무 캘러스 세포 배양 추출물은 화장품의 향노화 신소재로서 응용될 수 있다.

1. 서론

넓은잎 딱총나무(*Sambucus latipinna* Nakai)는 꼭두서니목(Rubiales), 인동과(Caprifoliaceae), 딱총나무속(*Sambucus L.*)에 속하는 낙엽활엽관목이다. 넓은잎 딱총나무는 1,600m 이하 산야의 계곡에서 서식하며 높이가 5m에 달하고 줄기 내부는 갈색이며 가지에 털이 없는 형태학적 특성을 지니고 있다[1].

현재 알려진 딱총나무의 성분으로는 gallate, cerylalcohol, betulin, oleanolic acid, betulic acid, ursolic acid, α -amyrin, vanillin, acetovanillone, coniferyl alcohol, syringaldehyde, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, protocatechuic acid, sambucunol A, sambucunol B, buddlenol G, (-)-pinoselinol, 3-propanediol, (-)-laricresinol, stigmasterol, sitosterol-3-glucoside, campesterol 등이 있다[2].

넓은잎 딱총나무 잎으로부터 유도된 캘러스는 미분화상태(undifferentiated phase)지만, 식물생장조절자(plant growth regulator)들의 비율 조절을 통한 캘러스 세포의 배양 환경을 제어하면 분화(differentiation) 되고 기관화(organization)될 수 있는 능력이 있다. 적당한 환경 조건하에서 미분화 세포는 식물전체를 재생할 수 있는 전형성능(totipotency)를 가진다. 세포의 분화 및 재생능력 정도에 따라 multipotency, pluripotency, totipotency로 구분할 수 있으며, 동물의 배아줄기세포(embryonic stem cell)은 전혀 다른 기관의 세포로 분화될 수 있는 pluripotency 능력을 갖고 있으며, 이미 성인이 된 몸속의 성체줄기세포는 조직 내에서 다른 세포로 분화될 수 있는 multipotency를 가지고 있다. 한편, 식물세포도 동물세포처럼 다른 세포로 분화될 수 있는 능력을 지니

고 있다. 식물세포는 동물세포와 달리 그 근원적인 생태 환경적 특성 때문에 생명력이 훨씬 높다. 이미 성숙한 식물체의 세포, 조직 혹은 기관의 일부분을 이용하여 또 다른 유전적으로 동일한 개체를 만들 수 있는 totipotency를 가지고 있기 때문이다. 이러한 분화 능력 측면에서 식물 캘러스(plant callus)는 식물줄기세포(plant stem cell)라 불리기도 한다. 뿌리나 줄기 생장과 연관 있는 정단 분열조직(apical meristem)이나 형성층(cambium)같이 부피생장에 관여하는 측생분열조직(lateral meristem), 그리고 씨앗에 영양분을 공급하는 식물태좌(phytoplacent) 등 다양한 식물 미분화세포인 캘러스(callus)를 유도할 수 있다[3]. 잘라낸 식물 절편체(explant)에 세포분열을 촉진시키는 영양소와 식물생장조절자를 처리하면 캘러스가 형성될 수 있으며, 본 연구에서는 넓은 잎 딱총나무 잎으로부터 유도된 캘러스를 이용하였다. 딱총나무 추출물을 가지고 항산화 효과를 검토한 연구가 있었으며[4], 딱총나무에서 분리된 phenol, lignan 화합물에 대하여 쥐의 조골세포에 대한 증식과 조골세포에 대한 alkaline phosphatase의 활성 실험이 보고되었다[5]. 본 연구진은 딱총나무 줄기와 식물세포 덩어리인 캘러스를 가지고 항산화 효과를 측정하였으며, MTT assay를 통해 세포 독성 실험을 수행하고, PPAR α 활성화 실험을 하였다. 또한 딱총나무 캘러스의 형태학적 변화를 관찰하여 탈분화된 세포들의 특성을 조사하고 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 식물재료

탈분화 캘러스는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에서 분양받은 넓은잎 딱총나무(*Sambucus latipinna* Nakai) 잎 유래 세포를 사용하였다. 그리고 넓은잎 딱총나무의 마른 줄기를 비교 실험군으로 하여 분석하였다.

2.2 고체 배양

배양배지는 MS(Murashige and Skoog,1962)배지에 3% sucrose, 0.3% phytagel, 0.01% myoinositol (Duchfa, Prod.NO:10609.1000) 및 1-Naphtalene acetic acid(Duchefa, Prod.No:N0903.0025) 3mg/L를 첨가하고 pH를 5.8로 조절한 후, 121°C에서 15분간 고압으로 증기멸균한 뒤 직경 55mm 펠트리디쉬에 분주하여 사용하였다. 캘러스는 3주 간격으로 계대

배양하여 유지시켰다.

2.3 액체 배양

공기부양 생물반응기(air-lift bioreactor)로 *Sam-bucus latipinna* callus를 배양하였다. 여기서 사용한 액체 배지는 고체플레이트 배양과 마찬가지로, MS (Murashige and Skoog, 1962)배지에 3% sucrose, 0.01% myoinositol(Duchefa, Prod.No: 10609.1000)및 1-Naphtalene acetic acid(Duchefa, Prod.No:N0903.0025) 3mg/L를 첨가하고 pH를 5.8로 조절한 후, 121°C에서 15분간 고압으로 증기 멸균하여 사용하였다.

2.4 캘러스 및 모본 식물체 추출

캘러스와 줄기를 동결 건조시키고 50ml의 증류수와 70%에탄올에 동결 건조된 각 샘플 10g씩을 녹여 121°C에서 15분간 고압증기멸균한다. 그 다음, 상층액을 분리하고 다시 동결건조하여 얻은 건조물을 phosphate-buffered saline(1X, pH7.4 \pm 0.1) (welgene, LB004-02)에 30mg/ml비율로 녹이고 조건에 맞게 희석하여 각 시료를 준비한다.

2.5 DPPH assay

사용시약은 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl(Sigma Chemicals Co.,St. Louis,Mo,USA)이며 준비된 농도별 추출물은 Brand-Williams의 DPPH method에 의하여 DPPH 자유 라디칼 소거활성을 측정한다.

DPPH 자유 라디칼 소거활성은 다음과 같이 계산한다: DPPH 자유 라디칼 소거활성(%)=[(A₀-A₁)/A₀] x 100, A₀는 대조구의 흡광도이며, A₁은 테스트한 실험구의 흡광도이다.

2.6 MTT assay

Human Keratinocyte의 세포주인 HaCaT cells는 24-well plate에 각 well당 1 \times 10⁴cell의 밀도로 배양한다. 배지는 10% fetal bovine serum(GIBCO), 100 IU/ml penicillin(GIBCO) and 100 μ g/ml, streptomycin를 포함하는 DMEM medium(GIBCO, Cat#11995)를 사용한다. 1일간 5% CO₂ 습도, 37°C에서 배양한 뒤, 배지를 제거하고 sample 100 μ l과 DMEM medium 900 μ l를 각 well에 넣어 1일간 배양한다. MTT시약(Sigma, Co.) 50 μ g을 각 well에 넣고 37°C에서 4시간 배양한다. 각 well의 DMEM배지를 제거하고 각 well에 DMSO(dimethylsulfoxide)를 100 μ l씩 추가하여 용해시킨다. Enzyme-Linked Immuno-

sorbent Assay (ELISA) 방법으로 분광기(spectrophotometer)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정한다.

2.7 Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha(PPARα) 활성화 실험

Human keratinocyte HaCaT cells을 24-well plate 에 37°C, 5% CO₂에서 10% fetal bovine serum(GIBCO), 100IU/ml penicillin (GIBCO), 100µg streptomycin를 포함하는 DMEM 배지(GIBCO,Cat; 11995) 2.5×10⁵cell/500µl로 24시간 배양한 다음, 세 종류의 재조합된 플라스미드 벡터들(PPRE-luc; 리간드 결합형의 PPAR α가 결합하여 활성화되는 PPRE (PPARs Response Element)를 프로모터로 가지고 뒤에 리포터로서 역할을 하는 반딧불이 루시페라제(luciferase) 유전자를 지닌 것, PPAR-exp ;일반적인 배양 조건에서도 발현되는 universal promoter 뒤에 PPARα 유전자를 지닌 것, pRL-tk; reference로 사용될 universal promoter에 Renilla luciferase 유전자가 결합된 플라스미드)을 주입하여 형질전환(transfection)시켰다. 24시간 배양 후, DMEM(GIBCO,Cat#11995)로 세척하고, 딱총나무 켈러스와 마른 줄기 추출물 3mg/ml , Clofibrate(Cayman chemical, Cat#10005745) 200µM를 처리한다. DMEM배지로 세척, 1X로 준비된 Passive Lysis Buffer(promega, Part#E194A)100µl로 세포를 깬 후, 듀얼-루시페라아제 수용체 분석 시스템 키트(Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System kit, Promega, USA)를 사용하여 사용자 지시서에 따라 샘플과 reference의 루시페라아제 활성(luciferase activity)을 측정하였다.

2.8 SEM 관찰

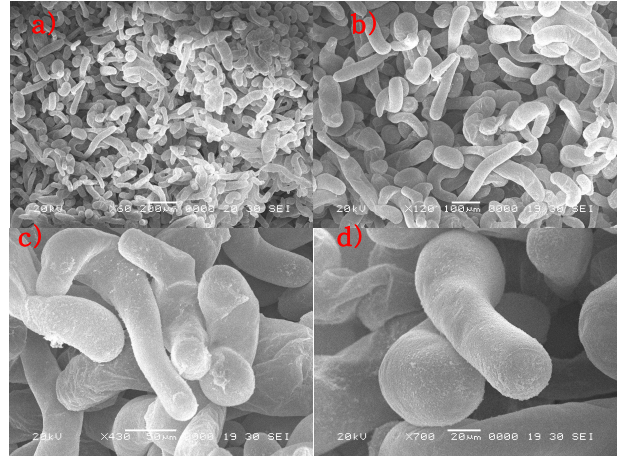
켈러스의 일부를 0.25M 인산 완충용액에 세척하고 인산 완충용액에 2% 글루타알데히드를 처리하여 고정(fixation)한다. 고정 후, Particle sputter를 이용하여 금입자 코팅 후, SEM장비로 관찰했다(Hitachi, S-530).

3. 결론 및 고찰



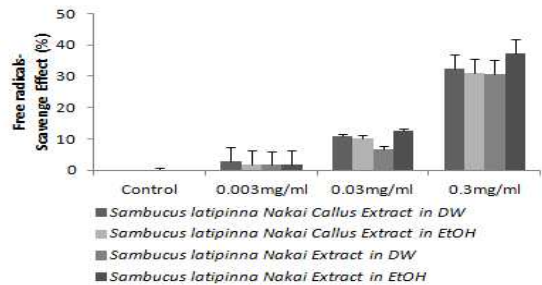
[그림 1] Sambucus latipinna 켈러스 관찰; 3주간 배양.

켈러스는 세포 분열이 계속 진행되고 있어서 3주 배양 후면, 고체상 배지상태에서 지름이 0.5~1cm정도의 클러스터를 이룬다[그림1].



[그림 2] 3주 배양 후 Sambucus latipinna 켈러스 SEM 관찰; a) Bar= 200µm. b) Bar= 100µm. c) Bar= 50µm. d) Bar= 20µm.

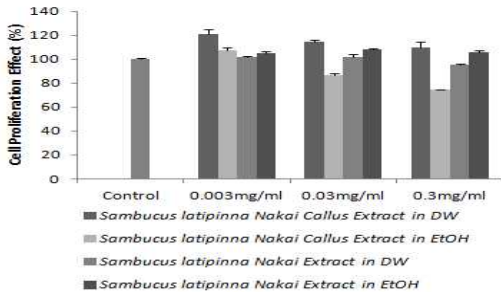
shoot bud의 분화를 나타내는 켈러스는 콜로니 내부에 응집현상을 나타낸다. shoot 원시세포는 균일하지 않은 세포들로 구성된 표피로 덮여 있으며 세포벽은 완벽하지 않은 막층과 원섬유 구조로 둘러싸여 있다고 볼 수 있다. 켈러스 표면에는 두 가지 타입의 세포 형태가 있다; 잠재적인 형태형성을 보이는 타입과 비형태형성 타입. 형태 형성 켈러스는 서로 다른 크기로 둥글게 형성된 세포 콜로니 형태인데 이것은 일반적으로 조밀하고 매끄러우며 shoot나 root를 만드는 능력이 있다. 반면에 비형태형성 켈러스는 잘 분리되고 길게 늘어지는 세포덩어리를 형성한다.SEM 연구를 통해 넓은잎 딱총나무 켈러스는 분열능이 높은 세포이며, 비형태 형성 켈러스 상태를 확인했다[그림2].



[그림 3] 넓은잎 딱총나무 켈러스, 모본 식물체 줄기의 자유 라디칼 소거활성 측정, control은 무처리구.

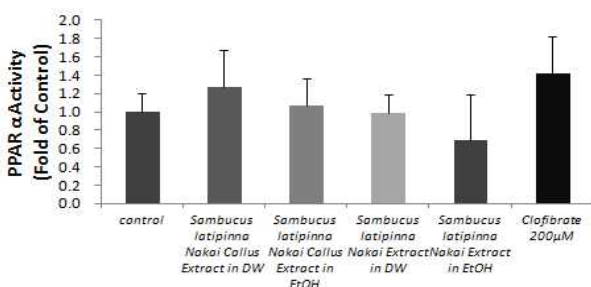
DPPH assay에 의한 항산화능 측정결과, 딱총나무 켈러스 열수 추출물은 0.003mg/ml, 0.03mg/ml, 0.3mg/ml 농도에서 3.0%, 10.7%, 32.3%이며, 딱총나무 켈러스 70% 에탄올 추출물의 경우는 0.03mg/ml, 0.3mg/ml농도에서 10.1%, 30.9%이다. 반면 식물체

줄기 열수 추출물의 경우 0.03mg/ml, 0.3mg/ml의 농도에서 6.8%, 30.6%로 측정되었으며 식물체 줄기 70% 에탄올 추출물 0.03mg/ml, 0.3mg/ml 농도에서 12.4%, 37.1% 라디칼 소거능을 보였다[그림3].



[그림 4] Human Keratinocyte HaCaT Cells에 대해 켈러스와 모본 식물체 줄기 추출물의 세포 독성 측정, control은 무처리구.

Human keratinocyte HaCaT 세포주에 대해 넓은 잎 딱총나무 켈러스와 줄기 추출물의 세포독성검사 결과를 나타내었다[그림4]. 켈러스 열수 추출물은 0.003mg/ml, 0.03mg/ml, 0.3mg/ml의 시료 농도에서 120.7%, 114.8%, 109.5%의 세포 생존율을 보여주며, 식물체 줄기 열수 추출물보다 우수하다. 딱총나무 켈러스 70%에탄올 추출의 경우, 0.003mg/mL, 0.03mg/ml, 0.3mg/ml의 농도에서 102.1%, 101.7%, 95.3% 세포증식율을 보였다. 또한 식물체 줄기 70% 에탄올 추출물 0.003mg/mL, 0.03mg/mL, 0.3mg/mL의 시료 농도에서 104.61%, 108.1%, 105.4% 의 세포 증식율을 보여주고 있다.



[그림 5] PPAR α 활성화 실험; control: 무처리구, clofibrate: 200uM/L처리, 딱총나무 켈러스 및 줄기 열수추출물, 딱총나무 켈러스 및 줄기 70% 에탄올 추출물(모든 시료 농도 3mg/ml).

3mg/ml 농도의 딱총나무 켈러스 열수추출물의 경우 1.27배, 켈러스 70%에탄올 추출물의 경우 1.06배, 식물체 줄기 열수추출물의 경우 0.99배, 줄기 70%에탄올 추출물의 경우 0.68배의 PPAR α활성이 측정되었다[그림5]. 여기서 우리는 켈러스 열수추출물이 높은 지질생합성과 항염 효과가 있다고 말할 수 있다. 딱총나무 켈러스 fresh weight 45g을 2L 생물반응기에 접종하고 1.5L까지 액체 배지를 채워주었다. 또한 2주 간격으로 계대 배양하여 세포 주를 유지시

켰다. 위와 같은 중량/용적 백분율로 배양하여 2L, 3L, 5L, 10L, 20L 생물반응기까지 세포를 증식시켰으며, 위의 사진은 5L, 10L, 20L 생물반응기이다[그림6].



[그림 6] 5L, 10L, 20L 공기부양 생물반응기에서의 딱총나무 켈러스 배양.

본 연구에서는 조직배양을 통해 넓은 잎 딱총나무의 분열하는 세포의 형태학적 특성을 관찰하였고, 항산화력 측정, 세포독성 검사, PPAR α 활성화 실험을 수행하여 생리활성을 검증하였다. 그 결과 넓은 잎 딱총나무의 세포를 이용하여 물질생산을 한다면 화장품의 향료화 소재로써 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

참고문헌

- [1] 이창복, “대한식물도감”, 향문사:서울, 1980, p.702.
- [2] 배기환. “원색도감, 한국의 자연시리즈13 한국의 약용식물”, 교학사:서울, 2000, pp.472
- [3] Lee EJ, Moh SH, Paek KY. “Influence of inoculum density and aeration volume on biomass and bioactive compound production in bulb-type bubble bioreactor cultures of Eleutherococcus koreanum Nakai.” Bioresour Technol. Vol 102, No14, pp. 7165-7170. Apr, 2011
- [4] G.T. Choi , “A study on antioxidative effect of sambucus williamsii, flower of ginseng and maackia amurensis”, master’s thesis, Korea University,pp.2-38, 2002.
- [5] Yang Xu-Juan, Wong Man-Sau, Wang Nai-Li Chan Sun-Chi, Yao Xin-Sheng, “Lignans from the stems of Sambucus williamsii and their effects on osteoblast UMR106 cells”, Journal of Asian Natural Products Research, Vol 9, Num 7, pp.583-591, Oct, 2007.