

## 뽕나무 오디추출물의 抗炎症 · 抗酸化 作用에 대한 生理活性 檢索

金善礪\* · 朴光駿\* · 李杭周\*

### Antiinflammatory and Antioxidative Effects of *Morus* spp. Fruit Extract

Sun Yeou Kim\*, Kwang Jun Park\* and Won Chu Lee\*

**ABSTRACT** : Antiinflammatory and antioxidative effects of mulberry fruit were investigated by using bioassay screening system. The extract of mulberry fruits showed inhibitory effect in phospholipase A<sub>2</sub> activity and cyclooxygenase II activity. Among nine varieties of mulberry tree, the antiinflammatory activities of the Shingwangppong, Ficus, Cheongilppong and Keomseolppong were higher than that of the other varieties. Also, antioxidative activity of mulberry fruit was examined by DPPH free radical scavenging method. The radical scavenging activity of the mulberry fruit decreased as following order : Shingwangppong > Keomseolppong > tetraploid Ficus > diploid Ficus.

**Key words** : Antiinflammatory, Antioxidative effects, Mulberry fruit.

### 緒 言

雌花穗 內에 여러개의 씨방이 발달한 과실의 집합체 (複果)인 오디는 漢方에서는 상삼자로 불리며 強壯劑나 鎮靜劑로 사용된 예가 있다. 최근 뽕나무 부산물 중 뽕잎, 누에 및 상백피 등의 生理活性에 대한 연구가 비교적 활발하게 진행된 반면 오디에 대한 체계적인 연구는 거의 전무한 상태이다.

오디는 浮腫억제, 宿醉제거, 消渴症제거, 대머리 豫防 및 治療 등에 사용된 것으로 古醫書에 기록되어 있으나 (全國韓醫科大學, 1991) 현대의학에서는 오디의 혈당강하작용에 대한 보고가 있을 뿐이다 (Kim et al., 1996). 오디는 다량의 포도당과 과당과 함께 미량의 탄닌산, 능금산, 비타민류 및 carotene을 함유하고 있으며, 오디의 씨에는 리놀산, 스테아린산, 올레인산이 함유되어 있다. 특히

오디는 다량의 精油성분을 함유하고 있는데 cineol이 69%, geraniol은 17%를 차지하며, linalool, camphor,  $\alpha$ -pinene, limonene과 terpene류 등이 존재한다. 또한 지방산중에서는 linoleic acid가 68%, oleic acid가 13%, palmitic acid가 12% 존재하고 cyanidin과 이의 배당체 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, chrysanthemine이 분리보고되었다 (Kim et al., 1980). 본 연구에서는 오디가 浮腫을 억제한다는 민간기록을 토대로 하여 오디에 대한 抗酸化 및 抗炎症작용을 검색하고자 하였다.

염증은 혈관계의 매개체, 여러종류의 세포들 및 cytokine들의 복합작용으로 일어난다. 또한 그 결과에 따라 급성염증, granuloma 염증 및 류마치스 성 관절염으로 대표되는 만성염증이 있는데, 慢性炎症의 경우 면역계에까지 관여함으로써 다양한 증상으로 나타난다. 따라서 이들 염증을 관한 치료제를 찾기 위해서는 각각의 작용점을 차단하는 여

\* 농업과학기술원 (National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441 - 707, Korea)

< '98. 7. 10 접수 >

러 종류의 *in vitro* 검색법이 개발되어 있는데, 현재는 주로 효소활성도를 측정함으로써 염증치료제 개발에 관한 연구를 수행한다. 이러한 효소활성은 과거에는 cyclooxygenase I (COX-I) 과 cyclooxygenase II (COX-II)에 대한 선택성을 고려하지 않고 연구되었다. 그러나 최근 소염제의 COX-I 또는 COX-II에 대한 선택적인 길항작용에 대한 연구와 더불어, 이를 기초로 하여 COX-II에 대한 선택적인 길항제를 개발하려는 움직임이 있다. 이는 일반적으로 사용되고 있는 비스테로이드성 소염제가 가지는 부작용을 최소화하려는 시도의 일환이다. 이와 관련하여 본 연구에서는 우선적으로 9품종의 뽕나무로부터 채취한 각각의 오디에 대하여 COX-II의 활성에 미치는 영향을 평가하였다.

또한 IL-1, IL-6, TNF, LPS 등 염증인자를 자극하면 phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)의 mRNA의 전사 및 PLA<sub>2</sub>의 활성화가 유도된다고 보고된 바 있다 (Nakano et al., 1990). Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)를 쥐의 관절에 주사하면 關節炎이 유발되는 등 PLA<sub>2</sub>가 염증반응에 직·간접적으로 관여한다 (Oyanagi, 1976). 이러한 점을 고려하여 본 연구에서는 PLA<sub>2</sub>를 표적으로 하여 오디의 항염증 작용을 검색하였다.

최근 산소라디칼 생성시스템을 실험동물의 폐, 무릎관절이나 발에 투여하면 活性酸素와 관련된 자유기들에 의하여 혈관투과성, 세포침윤과 조직상해를 증가시키는 등 急性炎症에 중요한 역할을 한다는 보고가 있다. 이를 근거로하여, 본 연구에서는 항염증 작용을 나타내는 오디의 抗酸化作用與否를 검색하기 위하여 DPPH radical 소거법을 이용하여 9종의 오디에 대하여 항산화작용을 검색하였다 (Ward, 1991).

## 材料 및 方法

### 1. 冷凍乾燥 오디의 抽出物 製造

본 연구에 공시한 오디는 蠶絲昆蟲研究所 內에 위치한 시험포장의 盤泉微砂質壤土의 뽕나무 9품종에서 1996년 6월 11일부터 22일 사이에 완숙된 오디만을 선별하여 각각 1.5kg씩 채취하여 자연성분 함유율을 유지하기 위하여 冷凍乾燥방법으로 건조하였다. 供試 뽕나무 품종은 검설뽕 (I),

국상20호 (II), 대도상 (III), 복산2호 (IV), 신광뽕 (V), 청운뽕 (VI), 청일뽕 (VII), 휘카스 (VIII) 및 4배성 휘카스 (IX)이다. 각각의 건조물 300g을 85%메탄올을 이용하여 超音波抽出한 후 여과하고 減壓濃縮하여 抽出物을 얻었다.

### 2. 활성검색용 실험재료 및 시약의 조제

실험동물은 Sprague-Dawley계 쥐 (체중 160-180g)를 이용하였고, 세포배양용 배지와 serum은 Gibco사, 배양용 용기는 Nunclon제품을 사용하였으며 그 이외의 시약은 Sigma사에서 구입하였고, 기타연구에 사용한 시약들은 특급용시약만을 사용하였다.

### 3. Cyclooxygenase II의 억제작용 검색

Rat (Sprague-Dawley)을 airborne bacteria에 대한 노출을 최소화 한 후 Alveolar macrophages는 Chandler & Fulmer의 제법 (Chandler & Fulmer, 1987)으로 bronchoalveolar lavage를 포집하였다. 세포생존도를 trypanblue dye exclusion법에 의해 측정하여 90% 이상 생존한 세포를 RPMI 1640 (Gibco) 배지에 희석시킨 후 microtiter plate에 부착시켰다 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 2시간). Cyclooxygenase II의 억제작용을 검색하기 위하여 배양배지에 500μM의 aspirin, LPS (10μg/ml, Difco) 및 fetal calf serum을 첨가한 후 세포를 16시간 배양하였다. 배지를 제거하고 arachidonic acid (30μM, Sigma)를 포함한 새로운 배지에서 10분간 배양시킨 후 각 well의 배지를 전량 취하여 -20°C에 보관한 다음 생성된 TXB<sub>2</sub>를 측정하기 위한 RIA용 시료로 사용했다. 또한 단백질량은 BSA를 표준물질로 하여 결정하였다. TXB<sub>2</sub>를 측정하기 위하여 항혈청을 가해 시료중의 TXB<sub>2</sub>와 가해준 [<sup>3</sup>H]-TXB<sub>2</sub>가 항혈청에 대해 경쟁적으로 결합하도록 한 후, Charcoal dextran을 가하여 유리형의 TXB<sub>2</sub>를 침전시켜 제거하고 [<sup>3</sup>H]-TXB<sub>2</sub>와 항혈청과의 결합형에 scintillation cocktail을 가하여 방사능을 측정하였다. 표준검량곡선을 이용하여 각 시료에 함유된 TXB<sub>2</sub>량을 구하고 단백질 mg당 TXB<sub>2</sub>의 생성량으로 환산하여 cyclooxygenase II의 활성을 측정하였다 (Fu et al., 1990)

#### 4. Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)의 억제작용 검색

오디의 PLA<sub>2</sub>에 대한 억제작용을 검색하기 위하여 PLA<sub>2</sub>의 활성을 측정하였다. 100mM Tris-HCl (pH 7.4), 6mM CaCl<sub>2</sub>, 기질 20nM, 효소 및 오디 추출물(100µg/ml)을 함유한 반응액을 37℃에서 30분간 반응시켰다. 이후 생성된 유리지방산을 Dole 등의 방법에 따라 추출하여 liquid scintillation counter로 측정하였고, 이를 PLA<sub>2</sub>의 활성으로 환산하였다 (Dole & Meinertz, 1960). 기질로는 1-stearoyl-2-[1-<sup>14</sup>C] arachidonyl phosphatidyl - choline를 사용하였고 효소는 porcine pancrease PLA<sub>2</sub> (30 ng)를 사용하였다.

#### 5. DPPH radical 소거에 의한 항산화작용 검색

DPPH (1.5x10<sup>-4</sup>M) 메탄올용액에 검액을 각각 稀釋하여 넣은 후 격렬하게 흔들었다. 공기중에 30분 동안 방치한 후 남아있는 DPPH를 정량하기 위하여 520nm에서 optical density (O. D.)를 측정하였다. 항산화 효과를 알아보기 위하여 대조군에 대하여 50% 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 농도를 구한 후 항산화도를 백분율 (%)로 표시하였다 (Yoshida et al., 1989).

#### 6. 통계처리

통계적 유의성을 검토하기 위하여 대조치로부터의 변동을 ANOVA test에 의해 판정하였다. P값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

### 結果 및 考察

供試 뽕나무품종에 있어서, 휘카스(Ficus), 대도상, 국상20호는 魯桑型 (*Morus lhou* Koidz), 신광뽕과 검설뽕은 山桑型 (*Morus bombycis* Koidz), 청운뽕과 청일뽕은 白桑型 (*Morus alba* L.)이며, 복산 2호는 노령산뽕 남쪽에 위치한 무등산에서 수집한 毛桑 (*Morus tiliaefolia* Makino)에서 선발한 야생종이다. 그리고 倍數性에 있어서는, 2배성 품종은 휘카스 (2X), 대도상, 국상 20호, 검설뽕, 청일뽕이며, 3배성 품종은 신광뽕과 청운뽕이고, 4배성 휘카스 품종은 휘카스 (2X)

의 동질 4배체이며 복산2호는 6배성이다.

이들은 형태학적 차이를 포함한 물리적인 차이가 있을 뿐만아니라 오디의 화학적 성분에 있어서도 큰 차이를 보임을 Park & Lee (1996) 등이 이미 보고하였다. 즉 9종의 오디중 高糖性 품종은 복산 2호이고, 국상20호는 비교적 당도가 높다. 또한 산도도 차이가 있는데 검설뽕 다음으로 복산2호가 산맛을 나타내며, 품종 공통적으로 당도가 증가함에 따라 산도는 낮아진다. 오디크기에 있어서 복산 2호와 검설뽕은 小果形, 청일뽕, 대도상, 휘카스 및 신광뽕은 中果形이며, 4배성 휘카스는 당도는 낮으나 特大果 豐滿型이므로 채취가 용이하다. 반면 활성이 낮은 품종인 복산2호와 대도상의 완숙오디는 酸度가 비교적 높은 품종이다 (Park & Lee, 1996) 지금까지 밝혀진 오디의 主色素는 anthocyanin인데 신광뽕과 4배성 휘카스는 이들의 함량이 높다.

일반적으로 항염증제 개발단계에서 對象物質의 활성을 평가하는 방법의 하나로 arachidonic acid의 대사경로에 대한 조절활성을 많이 활용하고 있다. 이러한 조절의 대표적인 예가 비스테로이드성 소염제 개발이다. 최근 arachidonic acid로부터 prostaglandin과 thromboxane합성에 대한 속도조절단계 효소는 cyclooxygenase의 isozyme (COX-II)이 이용되고 있다. COX-II는 LPS 및 cytokines (IL-1, IL-2, TNF) 등에 의해 활성화된 세포에서 선택적으로 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다 (Lee et al., 1992). 9종의 오디에 대한 항염증작용을 검색하기 위하여 cyclooxygenase II의 활성을 측정하였다. COX-II의 발현이 각종 염증매개체에 의하여 증가되기 때문에 COX-II에 대한 선택적인 길항제를 탐색하고자 하였다. 이를 위하여 쥐의 alveolar macrophage를 LPS로 활성화시켜 COX-II의 발현을 선택적으로 증가시킨 후 thromboxane B2를 정량함으로써 COX-II의 활성에 미치는 영향을 평가했다 (Table 1).

그 결과, 대조약물을 nabumetone으로 선정하여 10ppm에서 처리하여 COX-II억제도를 1로 하였을 때, 오디의 COX-II에 대한 相對的인 억제효과는 신광뽕 > 4배성 휘카스 > 휘카스 > 검설뽕 > 청일뽕 등의 순이었다. 가장 높은 활성을 나타낸 신광뽕

Table 1. Inhibitory effects of extract from fruits of Morus plants on cyclooxygenase II activity.

Variety	Inhibition activity (%) at 10 ppm
Keomseolppong	<sup>1)</sup> 34±0.3
Kuksang 20	19±0.1
Daedosang	19±0.4
Buksan 2	5±0.9
Shingwangppong	55±2.3*
Cheongunppong	29±0.8
Cheongilppong	32±0.1
Ficus mulberry (2 x)	42±0.4
Ficus mulberry (4 x)	45±0.6
Nabumethone	100±0.1

<sup>1)</sup> Each value represents the mean ±SD (n=3).  
\* Significantly different from the control : p < 0.05\*.

오디의 경우는 대조약물과 비교시 55% 수준의 활성을 나타냈다. 또한 4배성 휘카스는 45%, 2배성 휘카스는 42%의 활성을 나타냈는데, 휘카스품종의 경우 배수성에 따라 약간의 활성차이를 보였으나 유의성은 없었다. 또한 복산2호는 COX-II활성에 대한 가장 낮은 억제작용을 나타냈다. 이러한 결과는 오디의 전체추출물과 단일물질인 nabumetone과의 역가를 비교한 것이므로 오디의 COX-II억제도는 수치 이상의 유의성이 있는 것으로 판단된다.

최근에 천연물로부터 항염증작용이 있는 물질을 탐색하기 위하여cyclooxygenase와 더불어 효소적인 방법으로 PLA<sub>2</sub>억제활성을 측정하고 있다. PLA<sub>2</sub>는 세균에서부터 고등동물에 이르기까지 광범위하게 세포막, 과립분비액 중에 존재하는 효소로서, glycerophospholipid의 2번 위치의 ester결합을 가수분해하여 유리지방산과 lysophospholipid를 생성한다. 다양한 질병과 관련된 eicosanoid의 전구물질인 arachidonic acid는 막인지질의 2번 위치에 결합하고 있으므로 PLA<sub>2</sub>활성화로 유리되어 염증반응을 매개하는 것으로 알려져 있다 (Samuëlsson, 1983). 기원을 달리하는 두 종류의 crotalus atrox PLA<sub>2</sub>와 porcine pancreatic PLA<sub>2</sub>가 있

는데 본 연구에서는 porcine pancreatic PLA<sub>2</sub>활성에 미치는 9품종의 오디추출물의 영향을 검토하였다 (Table 2). 대조약물로는 강력한 스테로이드성 항염증 약물인 glucocorticoid를 보통 사용하나 본 실험에서는 사용하지 못했다. 오디 추출물을 넣지 않은 군을 대조로 하여 상대적인 비교만을 하여 검색한 결과, 신광뽕 >검설뽕 >4배성 휘카스 >2배성 휘카스의 순으로 PLA<sub>2</sub>억제 활성을 나타냈다.

Table 2. Inhibitory effects of extract from fruits of Morus plants on phospholipase A<sub>2</sub> activity.

Variety	Inhibition activity (%) at 100 mg/ml
Keomseolppong	<sup>1)</sup> 50.4±2.1*
Kuksang 20	≤10
Daedosang	24.2±3.5
Buksan 2	38.7±4.2
Shingwangppong	65.1±0.7**
Cheongunppong	≤10
Cheongilppong	≤10
Ficus mulberry (2 x)	39.5±1.6
Ficus mulberry (4 x)	40.8±3.4

Each value represents the mean ± standard deviation (SD) (n=3).  
\*\* Significantly different from the control : p < 0.05\*, p < 0.01\*\*.

또한 9종의 오디에 대한 항산화작용을 부가적으로 검색하기 위하여 DPPH radical 소거작용법을 이용하고 BHA를 대조약물로 하여 검색하였다 (Table 3). 그 결과, 검색한 9종의 오디는 거의 모두 항산화작용을 나타냈다. 그 중 신광뽕이 가장 유의적으로 높은 항산화 작용을 나타냈고, 그 다음은 검설뽕 >4배성 휘카스 >2배성 휘카스 >청일뽕의 순이었다. 낮은 항산화효과를 나타낸 것은 복산2호, 대도상 품종의 오디였다. 최근 활성산소와 관련된 free radical이 염증을 비롯해 많은 질병의 病因임이 추측되고 있으므로 항산화물은 염증치료제로서의 가능성이 충분히 판단된다.

이러한 결과를 종합해보면 9종의 오디 중 항염증제로의 이용가능성이 높은 품종은 청일뽕, 휘카스, 검설뽕 및 신광뽕이었고 복산2호와 대도상의

Table 3. Scavenging effects of extract from fruits of Morus plants on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical.

Variety	Radical scavenging rate (%)
Keomseolppong	<sup>1)</sup> 52.0±0.3*
Kuksang 20	31.3±0.6
Daedosang	21.0±0.1
Buksan 2	19.4±0.1
Shingwangppong	70.4±0.6**
Cheongunppong	30.1±0.4
Cheongilppong	32.9±0.8
Ficus mulberry (2X)	38.4±0.0
Ficus mulberry (4X)	35.7±2.4
BHA	100.0±2.4

<sup>1)</sup> Each value represents the mean ±SD (n=3).  
 \*, \*\* Significantly different from the control :  
 p < 0.05\*, p < 0.01\*\*.

오디는 효과가 거의 없었다. 이러한 결과로부터 魯桑型, 山桑型, 白桑型과 같은 재배종이 한국자생종의 하나인 毛桑보다는 항염증에 대한 생리활성이 높고, 뽕나무의 倍數性은 항염증 및 항산화에 커다란 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 4배성 휘카스 품의 오디는 크기가 9종의 품종 중 가장 크고 완숙된 상태의 열매의 색깔이 진한 흑색으로 안토시아닌 색소 함유량도 매우 높다. 또한 신광뽕과 청일뽕의 오디는 크기가 비슷하고 역시 안토시아닌 색소도 유의적으로 높다. 糖도가 높고 糖酸比가 적당하면서 수량문제를 해결할 수 있는 오디 품종은 신광뽕, 휘카스 및 청일뽕으로 알려지고 있는데, 본 연구 결과에서도 이들 품종의 오디가 높은 항산화작용과 항염증 작용이 있음이 밝혀져 이들 품종에 대한 응용성이 기대된다. 앞으로 오디를 기능성 식품뿐만이 아니라 약용소재로 이용하고자 할 때에는 각각의 품종에 따른 오디를 선정하여 용도에 맞춰 이용해야 할 것이다. 더불어 한반도에 널리 분포·자생하는 산뽕나무 (*M. bombycis*)의 야생종에 대하여 생리활성 조사가 앞으로 진행되어야 할 것이다.

## 摘 要

오디의 機能性 식품개발을 위한 基礎研究의 일환으로 뽕나무 품종에 따라 9종의 오디를 採取하여 凍乾燥한 후 각각에 대하여 항염증 및 항산화효과를 검색하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 비스테로이드성 항염증 작용을 검색하기 위하여 cyclooxygenase II의 활성억제도를 측정하였다. 그 결과 신광뽕 > 검설뽕 > 4배성 휘카스 > 2배성 휘카스 > 검설뽕 등의 순으로 억제효과를 나타냈다. 현재 항염증제의 표준물질로 사용되고 있는 nabumetone 10ppm에서 活性抑制도를 1이라 했을 때, 가장 높은 억제활성을 나타낸 신광뽕 오디의 경우는 0.55의 활성도를 나타냈다.
2. 최근에 天然物로부터 항암작용과 더불어 소염작용을 갖는 물질을 탐색하기 위하여 phospholipase A<sub>2</sub>의 활성억제도법을 이용한다. 오디 9품종의 MeOH 추출물 100µg/ml의 농도에서 phospholipase A<sub>2</sub>에 대한 억제활성은 신광뽕 > 검설뽕 > 휘카스 > 복산2호의 순으로 억제작용을 나타냈다.
3. 항염증 작용과 항산화 작용은 연관성이 높기 때문에 DPPH법을 이용하여 radical scavenging rate를 측정했다. 그 결과 신광뽕 > 검설뽕 > 휘카스 > 청일뽕의 순으로 항산화작용을 나타냈다. 결론적으로 9종의 오디품종중 항염증제로의 이용가능성이 있는 것은 검설뽕, 휘카스 및 신광뽕이었고, 복산2호와 대도상의 항산화·항염증 효과는 전혀 없었다.

## LITERATURE CITED

- Chandler, D. B. and Fulmer, J. D. 1987. J. Immunol. 139 : 893-898
- Dole, V. P. and Meinertz, H. 1960. Microdetermination of long chain acids in plasma and tissues. J. Biol. Chem. 235 : 2595-2599.
- Fu, J. Y., Masferrer, J. L., Seibert, K., Raz, A. and Needleman, P. 1990. J. Biol. Chem. 265 : 16737-16740.

- Kim, M. H., Ko, K. C., Lim, S. H. and Yu, Y. S. 1980. Study on the usability of mulberry fruit(1) Fruit characteristics of mulberry. Coll. of Agri. Bull. SNU. 5(2) : 221-223.
- Kim, T. W., Kwan, Y. B., Lee, J. H., Yang, I. S., Youm, J. K., Lee, H. S. and Moon, J. Y. 1996. A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. Korean. J. Seric. Sci. 38(2) : 100-107.
- Lee, S. H., Soyoola, E., Sun W., Liou, S and Hwang, D. 1992. J. Biol. Chem. 267, 25934-25938.
- Nakano, T., Ohara, O., Teraoka, H. and Arita, H. 1990. FEBS Lett. 261 : 171-174.
- Oyanagi, Y. 1976. Participation of superoxide anions at the prostaglandin phase of carrageenin foot-edema. Biochem. Pharmacol. 25 : 1465-1472.
- Park, K. J. and Lee, Y. K. 1996. Difference in Morphological and quality characteristics of mulberry fruit by ploidy levels of mulberry tree. RDA J. Of Agricultural Science 38(1) : 307-317.
- Samuellsen, B. 1983. Mediators of immediate hypersensitivity reaction and inflammation. Science 220 : 568-575.
- Ward, P. A. 1991. Mechanism of endothelial cell injury. J. Lab. Clin. Med. 118 : 421-425.
- Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, Y., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. 1989. Studies on inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. V. Radical scavenging effects tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chem. Pharm. Bull 37(7) : 1919-1921.
- 全國韓醫科大學 本草學教授共編著. 1991. 本草學 第17章 補益藥：桑子. 永林社. 598p.