

옻나무 추출물의 생리활성 이용에 대한 연구: 옻나무 추출물의 생물학적 기능

임계택* · 이정채

전남대학교 생물공학연구소 생리활성물질부

Bioactive Utility of the Extracts from *Rhus verniciflua* Stokes (RVS): Biological Function of the Extracts from RVS

Kye-Taek Lim* and Jeong-Chae Lee

Department of Bioactive Substances, Institute of Biotechnology, Chonnam National University

Abstract

Antioxidative effects of the water or ethanol extracts from *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) were measured by protection against hydroxyl radicals in mouse brain tissue culture. In the water extracts from RVS, cell viabilities were estimated 60.0, 66.0, 72.0, 84.0 and 90.0% at addition of 1, 2, 4, 7 and 10 μ L respectively, compared with GO (20 mU/mL) alone. The cell viability in the ethanol extracts was similarly with water extracts. In the antitumor effects, the results showed that percentages of the HeLa cell death were approximately 24% for 12 hrs, 57% for 48 hrs at addition of 10%/well ethanol extracts respectively. To know inhibition of tumor growth, *in vivo*, mice (BALB/c) were inoculated with 0.25 mL CT-26 (1×10^6 cells/mL) subcutaneously. After the generation of tumor, the results of RVS extracts (ethanol, water) injection showed generally that the tumor size in BALB/c was reduced. For physicochemical characterization of the RVS extracts, purified substances of water or ethanol extracts were analyzed with SDS-PAGE and ICP spectrometer. In electrophoresis, gel showed 2 bands (210, 230 KDa). The results of ICP verified that RVS extracts contain Cu^{2+} in both samples. Conclusively, this substance might be a laccase which has a biological effective function, as a natural bioactive substance.

Key words: natural bioactive substance, *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) extracts, hydroxyl radical, antitumor effects

서 론

일반적으로 정상적인 대사과정에서 발생하는 radicals는 생체내에 존재하는 여러 항산화 효소에 의해 소멸되거나 제거되기 때문에 생명현상에 큰 문제가 되지 않는다^(1,3). 또한 일정수준의 radicals 생성은 생체내 불가피한 대사산물로 존재하지만, 최근 밝혀진바에 의하면 전자전달회로과정에서 발생하는 $\cdot\text{OH}$ radicals (hydroxyl radical)는 신호전달과 면역체계 등의 정상적인 생명현상에 꼭 필요한 산물이기도 하다^(4,5).

그러나 염증이나 암의 발생과 같은 만성적인 대사 이상이나 혹은 외부로부터의 심각한 물리, 화학적인

스트레스 자극은 과도한 radicals의 생성을 초래하여 생체내 산화-항산화의 불균형을 유발시킨다. 과잉 생성된 radical에 의하여 각 조직세포는 세포막 지방의 산화, 단백질의 산화 및 변성, DNA 변성 등의 유발로 인하여 정상적인 기능이 억제되고 결과적으로 세포는 사멸된다^(6,9). 특히 radicals에 의하여 원인이 되는 치매나 Alzheimer disease, 당뇨병과 같은 만성적인 질병은 그의 치료에 있어서 많은 문제점을 가지고 있는데⁽¹⁰⁾, 지금에와서는 치료보다는 예방적인 차원에서 항산화성 또는 항암성 물질의 이용이 많이 시도되고 있다.

한편 오래 전부터 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) 등과 같은 합성항산화제가 개발되어 이용되어 왔지만 일정수준 이상 섭취시 안정성과 유해성 여부 문제가 제기되고⁽¹¹⁾, 과용은 간, 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 심각한 독성작용을 일으키는 등 오히려 발암물질로서 역기능을 할 수

Corresponding author: Kye-Taek Lim, # 411, Department of Bioactive Substances, Institute of Biotechnology, Chonnam National University Kwangju City, 300 Youngbong-Dong, 500-757, Korea

있는 것으로 알려져 있다⁽¹²⁾. 따라서 많은 학자들에 의해 생체 부작용이 없고 항산화력이 강한 천연생리활성물질을 동, 식물로부터 찾으려는 연구들이 진행되고 있다⁽¹³⁻¹⁵⁾.

본 실험실에서도 천연 생리활성물질의 개발을 지속적으로 연구하였던 바 율나무 에탄올 추출물이 특이적으로 hydroxyl radicals에 원인하는 쥐의 뇌세포막 지방산의 산화를 억제한다는 결과를 얻었으며, 최근에는 율나무에서 물로 추출한 물질에서도 에탄올 추출물과 유사한 항산화력을 가진 것으로 보고했다⁽¹⁶⁾.

따라서 본 연구는 율나무에서 에탄올 및 물로 추출된 물질의 생리적인 기능과 이용성을 타진하기 위하여 배양된 생쥐 뇌세포와 암세포를 이용하여 천연 생리활성물질로서의 그 기능을 비교 분석하였고, 율나무 추출물질의 주요성분을 알기위해 물리화학적인 분석을 실시 하였다.

재료 및 방법

공시재료

율나무는 전남 화순군 이십곡리에서 자생한 것(8~10년생)의 줄기부분을 96년 11월에 채취하여 본 실험에 시료로 사용하였다. 시료의 추출, 분리, 정제 등은 Lim과 Shim⁽⁹⁾, Lee와 Lim⁽¹⁰⁾의 방법에 따라 제조하였고 이 때 사용된 용매는 극성이 큰 에탄올과 이온이 포함되지 않는 중류수를 사용했다. 공시동물로 사용된 생쥐의 품종은 ICR과 BALB/c (대한실험동물센터) 이었고, 사육조건은 Lee 등⁽¹⁷⁾의 방법에 따랐다. HeLa cell은 대덕연구단지내 중앙가축전염병연구소로부터, CT-26은 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양 받았다.

시약

Glucose, glucose oxidase (GO), ethanol, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheyltetrazolium bromide (MTT), laccase, minimum essential medium (MEM), serum, penicillin, streptomycin 등은 Sigma로부터 구입하였다. 그 외의 실험에 사용되었던 시약도 순도가 높은 것 (98%이상)을 구입하여 사용하였다.

쥐 뇌세포 배양

쥐 뇌세포 배양은 Michikawa 등⁽¹⁸⁾과 Lim 등⁽¹⁹⁾의 방법에 따라 수행했다. 확대현미경하에서 임신 13일째인 ICR 생쥐의 embryo에서 뇌를 절취한 후 인산완충용액 (phosphate buffered saline; PBS, pH 7.2)으로 씻고 현미경하에서 수술용 칼로써 잘게 세절했다. 세절

된 뇌세포 조직을 15 mL 시험관에 0.25% trypsin과 20 µg/mL DNase를 혼합하여 37°C에서 15분간 배양하고 원심분리(1,000×g)후 상층액을 제거했다. 남아있는 뇌세포 조직에 다시 인산완충용액(pH 7.2)을 넣어 pastuer pipet으로 재부유시킨 후 800×g로 원심분리하여 pellet을 새로운 tube에 옮기고 여기에 5% fetal bovine serum (FBS)을 함유한 MEM 배지를 넣어 96 multiwells에 100 µL (10⁵ cells/mL)씩 균일하게 분주한 후 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 배양 3일째부터는 FBS가 포함되어 있지 않은 MEM 배지를 첨가하여 10일정도 배양한 후 살아있는 세포수의 측정을 MTT assay에 의하여 수행하였다.

추출용매에 따른 항산화 효과 비교

생쥐 뇌세포를 7~10일간 배양한 후 세포배양액에 0.5% D-glucose, 20 mU/mL GO 및 MEM으로 혼합된 배지를 기존의 배지와 교환한 후 각각의 용매에 의한 율나무 추출물 (30 mg/mL)을 각 well 당 일정량(1~10 µL)을 첨가하여 37°C에서 4시간 배양했다. 이 때 각 추출물과 배지를 합한 각 well의 최종부피는 100 µL로 제한하였다. 그 후 각각의 well에 50 µL (5 mg/mL) 3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-dipheyltetrazolium bromide (MTT)를 첨가하여 다시 4시간 배양한 다음 기존의 배지를 버리고, 70 µL의 isopropanol을 첨가하여 micro-elisa reader (Molecular Devices Corp. Tmax)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포수를 대조군에 대하여 percentage (%)로 환산하였다.

암세포 배양

MEM 배지에 3% FBS, 0.5% Lactoalbumin, 2% of 7.5% NaHCO₂, 10 µg/mL Streptomycin 및 Penicillin, 0.5% of 50 mg/100 mL Fungizone을 첨가하여 HeLa cell을 1×10⁵~10⁶ cells/mL 정도로 96 multiwells에 100 µL/well씩 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 monolayer가 될 때까지 약 2~3일간 배양시켰다. 그 후 기존의 배지를 버리고 새로운 MEM 배지로 교환한 다음 각 wells에 율나무 물 및 에탄올 추출물 (30 mg/mL)을 1, 2, 4, 7, 10 µL씩 첨가하여 well당 총 량이 100 µL가 되게한 후 37°C에서 각각 6, 12, 24, 48시간 동안 배양시켜 MTT를 처리하고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

In Vivo Test

In vivo 실험으로서 CT-26 cell을 배양하여 율나무 물 및 에탄올 추출물의 암세포에 미치는 영향을 조사하였다. CT-26 cell의 배양은 DMEM 배지에 10%

FBS, 10 µg/mL streptomycin, 10 µg/mL penicillin을 첨가하여 약 1×10^5 cells/mL 정도로 96 mm 배양용기에 15 mL씩 분주하여 5% CO₂, 37°C에서 monolayer가 될 때까지 배양시킨 후 체중이 15 g (±3)인 BALB/c의 복강에 1×10^6 cells/mL의 CT-26 cell을 0.25 mL/마리 피하주사하였다. CT-26 cell 접종 10일 후 종양이 발생되는 것을 확인한 후, 종양부위에 물 추출물 및 에탄올 추출물(30 mg/mL)을 각각 마리당 2.5 µL에서 25 µL까지 주사하고 7일 후에 쥐를 도살하여 복강주위의 종양 크기를 측정하였다.

웃나무 추출물의 특성

웃나무에서 추출된 물질의 특성과 단백질 수준을 알아보기 위하여 각각 물과 에탄올로 추출하고 정제된 물질을 SDS-PAGE 및 ICP (Inductively Coupled Plasma) spectrometer [Jobin Yvon사 JY 38plus (Dual gratings)]를 이용하여 규명하였다. 먼저 SDS-PAGE는 Lee⁽¹⁷⁾ 등의 방법에 따라 수행했다. 전기영동은 0.1% SDS 및 polyacrylamide 15% gel을 이용하였고 전기영동 후 gel은 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다. ICP는 웃나무 물 및 에탄올 추출물의 각각 20 mg/mL을 ICP-Automatic Emission Spectrometer를 이용한 324.745 nm에서 Cu의 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

웃나무 추출물의 항산화 효과 비교

용매에 따른 각 추출물의 항산화 효과를 비교하기 위해 radicals에 아주 민감한 생쥐 뇌세포를 약 7-10일 동안 배양시킨 후 각 추출물을 30 mg/mL로 희석하여 배양된 뇌세포에 1 µL에서 10 µL까지(1-10%/total volume of each well) 첨가한 후 hydroxyl radical generation system (GO system)^(3,16)에 대한 항산화 효과를 MTT assay를 통하여 수행하였다. GO system에 의한 hydroxyl radical의 생성은 D-glucose와 glucose oxidase (GO)의 반응에 의해 H₂O₂가 생성되고 이것은 다시 Haber-Weiss reaction에 의해 ·OH가 생성된다. 이 때 GO의 농도가 20 mU이고 배양시간이 4시간일 때 살아있는 쥐 뇌세포 수는 약 50%로 보고되었다.

먼저 웃나무 에탄올 추출물의 항산화 효과에 있어서, 96 multiwells에서 배양된 생쥐 뇌세포에 GO 20 mU/mL 처리 후 에탄올 추출물 (30 mg/mL)을 각 well 당 총 세포배양액 100 µL에 대하여 각각 1 (1%), 2 (2%), 4 (4%), 7 (7%), 10 µL (10%)씩 첨가하여 대조군에 대한 뇌세포의 생존률을 GO 단독처리군과 비교

한 결과 55.0, 64.0, 70.0, 79.0, 91.0%로서 매우 높은 생존률을 보였다. 또한 물 추출물(30 mg/mL)의 항산화 효과에 있어서, 에탄올 추출물과 같이 처리한 결과 GO 단독처리군에 비해 각각 60.0, 66.0, 72.0, 85.0, 90.0% 정도의 생존률로서 7%까지 첨가시엔 오히려 에탄올 추출물보다 더 높은 항산화 효과를 나타냈다. 한편 GO 20 mU/mL 단독처리군에 있어서의 생존률은 52.0% 정도였으며, GO 처리 없이 각각의 순수한 에탄올 및 물 추출물만을 10 µL (10%) 씩 처리시엔 각 용매에 대하여 97.0%와 98.0%의 생존률로서 추출물 그 자체는 쥐 뇌세포의 생존률에 거의 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1). 아울러 웃나무 추출시 사용했던 순수 용매(70% 에탄올, 증류수)만을 10 µL씩 첨가시엔 생존률이 각각 96.0, 98.5% 로서 대조군과 거의 유사한 것으로 보아 에탄올 7% 수준까지는 뇌세포의 생존률에는 전혀 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다(결과생략). 한편 잘 알려진 항산화제와 웃나무 추출물간의 항산화력을 비교하기 위해 ascorbic acid를 GO 처리된 뇌세포에 50 µM과 100 µM을 첨가시 생존률은 약 87.0%와 90.0%로 나타났다. 이 결과는 웃나무 물 추출물 또는 에탄올 추출물

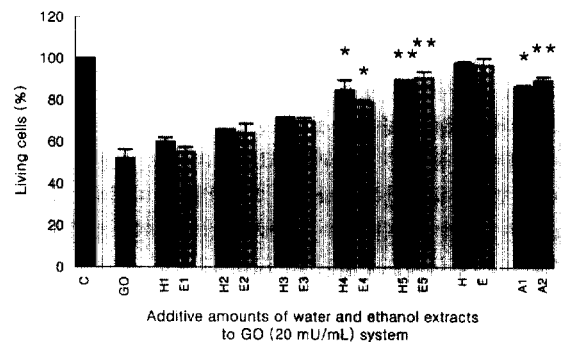


Fig. 1. Comparison to antioxidative effects among the several antioxidants. Mouse whole brain cells were exposed to hydroxyl radical generated by 20 mU/mL glucose oxidase for 4 hrs. Cell viability was determined by MIT assay. The total volume of each well was 100 µL. C; Control, GO; only 20 mU/mL glucose oxidase, H; 10 µL water extract, E; 10 µL ethanol extract, H₁; 1 µL ethanol extract+GO 20 mU/mL, E₁; 1 µL ethanol extract+GO 20 mU/mL, H₂; 2 µL water extract+GO 20 mU/mL, E₂; 2 µL ethanol extract+GO 20 mU/mL, H₃; 4 µL water extract+GO 20 mU/mL, E₃; 4 µL ethanol extract+GO 20 mU/mL, H₄; 7 µL water extract+GO 20 mU/mL, E₄; 7 µL ethanol extract+GO 20 mU/mL, H₅; 10 µL water extract+GO 20 mU/mL, E₅; 10 µL ethanol extract+GO 20 mU/mL, A1; 50 µM ascorbic acid+GO 20 mU/mL, A2; 100 µM ascorbic acid+GO 20 mU/mL. The results are mean ± SEM (n=5). *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, significantly differ from the cultures exposed to GO alone, single factor ANOVA analysis.

10 μ L는 ascorbic acid의 100 μ M과 상응하는 항산화 효과를 가지는 것을 보여준다(Fig. 1).

따라서, 이러한 결과는 옻나무로부터 극성이 큰 용매인 물과 에탄올에 의해 추출된 물질은 다른 추출물에 비해 그 항산화 효과가 매우 높다고 할 수 있으며, 그 기전은 극성이 큰 용매로 추출된 옻나무 추출물이 hydroxyl radicals에 대해 강력한 scavenger로서 작용하기 때문인 것으로 추정된다. 결과적으로 본 실험의 항산화에 대한 효과는 일반적으로 Lim과 Shim¹⁰⁾의 주장과 같이 극성이 큰 용매로 추출한 물질의 항산화 효과가 비극성인 용매로 추출한 것 보다 크다는 것에 기인하고 있다.

옻나무 추출물의 암세포에 미치는 영향

사람의 암세포주인 HeLa cell을 96 multiwell plates의 각 well에 100 μ L (1×10^6 cells/mL)씩 분주하여 5% CO₂, 37°C에서 monolayer가 될 때까지 2~3일간 배양시킨 후 옻나무 추출물을 첨가하여 추출물의 농도와 배양시간에 따른 암세포에 미치는 영향을 MTT assay (570 nm)을 통해 사멸된 암세포를 대조군에 대한 percentage (%)로 환산하였다. 먼저 옻나무 물 추출물(30 mg/mL) 및 에탄올 추출물(30 mg/mL)을 각각 1, 4, 7, 10 μ L씩 넣어 각 well당 추출물과 배지의 총량이 100 μ L가 되게하여 배양시켜 6, 12, 24, 48시간후에 각각 MTT assay를 실시하였다.

먼저 옻나무 에탄올 추출물의 암세포에 미치는 영향에 있어서, Fig. 2에서 보는바와 같이 옻나무 추출물을 1, 4 μ L 첨가 후 배양 6시간에는 4.2, 8.3% 사멸률로서 대조군과 차이가 크지 않았으나, 7 μ L와 10 μ L 첨가한 배양 6시간에는 12.9, 18.9%로서 다소 대조군에 비해 차이가 있었다. 그러나 에탄올 추출물을 각각 1, 4, 7 μ L 첨가 후 12시간에 있어선 죽어있는 세포수는 대조군에 비해 각각 14.4, 21.4, 31.5%로서 처리구간에 큰 차이를 보였으며, 특히 10 μ L 첨가시엔 38.2%로서 대조군에 비해 큰 사멸률을 보여주었다(Fig. 2). 또한 에탄올 추출물 첨가후 배양 24, 48시간째의 사멸률에 있어서 1 μ L와 4 μ L 첨가는 약 24.0%와 35.0%이었으며, 7, 10 μ L를 첨가한 경우 배양 24시간째에는 각각 39.2, 41.2% 였고 48시간에는 45.2%와 57.6%로서 측정되었다. 이것은 옻나무 에탄올 추출물을 배지에 대해 10% 첨가 후 12시간이 경과시 대조군에 비해 약 38%가, 24시간후에는 41%, 48시간후에는 약 58%의 HeLa cell이 사멸된다는 것을 보여준다(Fig. 3).

이러한 결과는 옻나무 물 추출물에 있어서도 유사한 경향으로써 1, 4, 7, 10 μ L씩 처리 후 12시간에서의

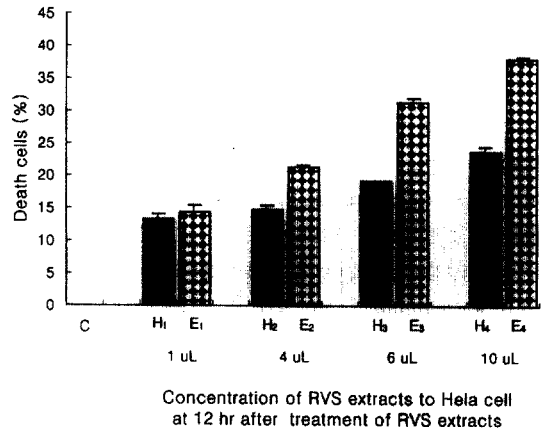


Fig. 2. Effects on inhibition of HeLa cell proliferation by the RVS extracts. The stock solution of water or ethanol extracts was 30 mg/mL separately. The RVS extracts was added to culture media and incubation time was for 12 hrs. After 12 hr incubation, cells were tested MTT assay. The total volume of each well was 100 μ L. C; control, H₁; 1 μ L water extract, E₁; 1 μ L ethanol extract, H₂; 4 μ L water extract, E₂; 4 μ L ethanol extract, H₃; 7 μ L water extract, E₃; 7 μ L ethanol extract, H₄; 10 μ L water extract, E₄; 10 μ L ethanol extract. Single factor ANOVA analysis.

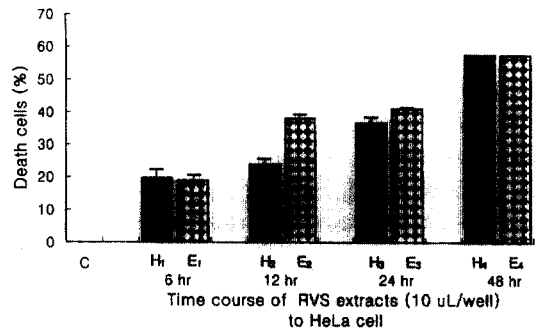


Fig. 3. Effects on inhibition of HeLa cell proliferation by the RVS extracts. The stock solution of water or ethanol extracts was 30 mg/mL separately. The RVS extracts was added to culture media and incubation times were 6, 12, 24, and 48hrs respectively. C; control, H₁; 10 μ L water extract and 6 hrs incubation, E₁; 10 μ L ethanol extract and 6 hrs incubation, H₂; 10 μ L water extract and 12 hrs incubation, E₂; 10 μ L ethanol extract and 12 hrs incubation, H₃; 10 μ L water extract and 24 hrs incubation, E₃; 10 μ L ethanol extract and 24 hrs incubation, H₄; 10 μ L water extract and 48 hrs incubation, E₄; 10 μ L ethanol extract and 48 hrs incubation. Single factor ANOVA analysis.

사멸률은 각각 13.3, 14.8, 19.3, 23.9% 였으며(Fig. 2), 옻나무 물 추출물 10 μ L를 첨가 후 HeLa cell의 사멸률은 6시간후에 19.7%, 12시간후에는 23.9%, 24시간후에 36.8%, 48시간 후에는 57.7% 로써 각각 측정되

었다(Fig. 3). 따라서 율 추출물 첨가 후 12시간이 HeLa cell이 크게 사멸되는 시간임을 알 수 있었으며, 이것은 율나무 추출 성분이 HeLa cell의 증식을 분자생물학적 수준에서 억제시키기 때문으로 추정할 수 있다. 이러한 추론의 근거로써, 특이적인 항산화제에 의하여 세포의 transcriptional factor인 AP-1이나 NF- κ B의 발현이 조절된다는 Packer⁷⁾ 등의 보고에 비추어 율나무 추출성분이 HeLa cell의 증식을 분자생물학적인 수준인 transcription factor 발현을 억제시키기 때문으로 추측할 수 있다. 다시말해 율나무 추출물은 천연항산화제로써의 큰 령가를 가지고 있기 때문에 세포질에 있어서 신호전달 체계를 거쳐 유전자 발현을 억제시킬 것으로 사료된다. 덧붙여 전사인자인 AP-1이나 NF- κ B는 여러 질병과 암의 발현과도 밀접한 관계를 가지는 것으로 알려져 있는데, 페놀계나 catechol계(1,2-dihydroxyl benzene)는 NF- κ B의 활성을 억제시킨다고 보고되었으며, AP-1의 전사활성을 억제하여 Jun-Fra heterodimers 형성을 방해하므로써 암의 확산을 억제하는 것으로 알려져 있다. 때문에 이에 대한 정확한 기작은 AP-1이나 NF- κ B와 같은 전사인자에 대한 분자적 수준의 연구가 이루어져야 설명될 수 있을 것으로 본다.

In vivo test

율나무 추출물의 암세포에 미치는 영향에 대한 *in vivo* test는 체중이 15 g (± 3)인 BALB/c에 CT-26 cell을 접종하여 종양을 발생시킨 후 발암부위에 직접적으로 율나무 물 추출물 및 에탄올 추출물 (30 mg/mL)을 각각 2.5~25 μ L씩 주사하여 수행했다.

먼저 접종 10일 후 쥐의 복부에 종양이 발생하는 것을 확인하고 종양이 발생된 부위에 율나무 물 및 에탄올 추출물을 CT-26 접종량 (0.25 mL; 1×10^6 cells/mL)에 대해 각각 1% (2.5 μ L), 2% (5 μ L), 5% (12.5 μ L), 10% (25 μ L)씩 접종하여 7일후에 쥐를 도살하여 종양 크기를 여러 처리군과 비교한 결과 율나무 물 또는 에탄올 추출물을 1~5% 주입시 종양의 크기에는 대조군에 비해 차이가 현저하지 않았으나 10% 처리군은 종양의 크기가 0.8 cm인 반면 대조군은 1.5 cm로서 큰 차이를 보여주었다 (Fig. 4 A, B).

이와같은 결과는 율나무 추출물의 일정량 주입은 생쥐의 생체실험에서도 암세포의 증식이 억제될 수 있다는 것을 보여준다. 이것은 율나무의 추출물이 생체내의 어떤 효소의 활성을 증가시키거나 혹은 항산화제로써의 세포의 신호전달에 관여하여 종양의 발생과 증식을 억제하는 유전자의 발현을 조절하므로써

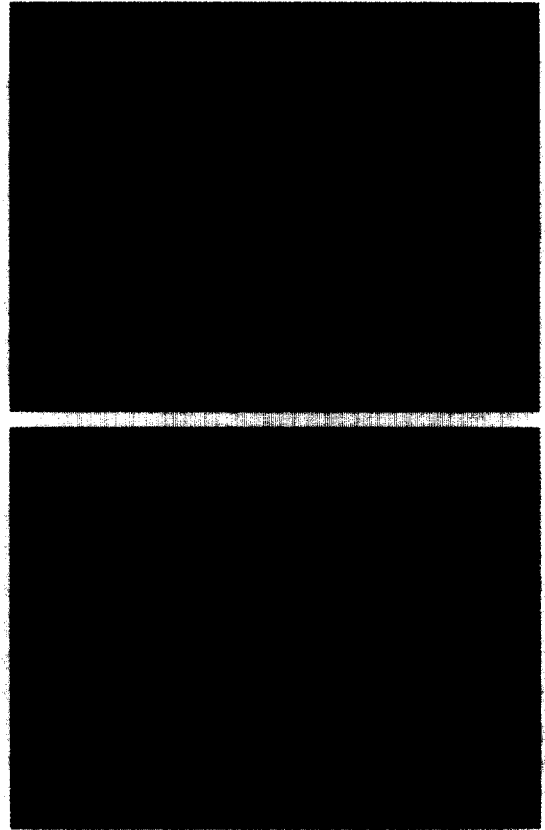


Fig. 4. Effect on tumor growth inhibition by RVS extracts injection *in vivo* (BALB/c). The CT-26 tumor cells (1×10^6 cells/mL) were inoculated with a dose of 0.25 mL/head subcutaneously. After inoculation for 10 days, the RVS extracts (30 mg/mL) were injected directly with 2.5-25 μ L/head in a tumor tissues respectively. The mice were killed after 7 day RVS treatment. A. (a) Inoculation, (b) Inoculation+5 μ L ethanol extract, (c) Inoculation+25 μ L ethanol extract; B. (a) Inoculation, (b) Inoculation+5 μ L water extract, (c) Inoculation+25 μ L water extract

이와 같은 효과를 나타내는 것으로 추측된다. 그러나 여기에 따른 보다 설득력있는 설명은 분자생물학적인 수준에서 항산화에 의해 관계하는 유전자의 조절을 연구하여야 가능할 것이다.

결과적으로 Lim과 Shim⁸⁾의 보고와 견주어 볼 때, 추출하는 용매로서 chloroform이나 n-hexane 보다는 극성이 큰 용매인 물이나 에탄올 추출물의 항산화 효과가 일반적으로 크게 나타났다. 아마도 추출 용매에 따른 항산화 효과의 차이는 극성에 따라 추출되는 성분이 다르기 때문으로 생각되어진다. 또한 GO 20 mU/mL 만을 처리한 구에서는 생쥐 뇌세포의 생존률이 52% 인데 반하여 10 μ L 물 및 에탄올 추출물 처

리구는 각각 90.1, 91.0%의 생존률로서 각 추출물 첨가량의 증가에 따라 점차적으로 hydroxyl radical의 scavenger로써 작용하여 생쥐 뇌세포의 손상이 보호되어 살아있는 세포수가 증가되는 것을 알 수 있었으며, 이는 옷나무 추출물이 항산화제로써의 기능을 가지고 있다는 것을 의미한다.

옷나무 추출물의 특성

지금까지의 알려진바에 의하면 *Rhus verniciflua*에 함유된 성분들은 대략 60~65%의 페놀계, 5~7%의 rubber-like materials, 3~5%의 질소 함유 화합물 그리고 20~30%의 물로 구성되어 있다. 또한 *Rhus verniciflua*의 총 구성성분 중 적은 량이지만 당단백질이 함유되어 있다²⁰⁾. 따라서 본 실험실에서 극성이 큰 용매로 추출한 옷나무 추출물은 극성이 큰 물질이 추출된다는 가정하에 SDS-PAGE 및 ICP로써 특성을 규명하였다.

물과 에탄올로 추출한 옷나무 추출물은 Lee와 Lim¹⁷⁾의 방법에 따라 0.1% SDS 및 polyacrylamide 15% gel에서 수행했다. 먼저 에탄올과 물로 추출된 후 진공건조된 추출물을 phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2)로 30 mg/mL씩 희석하여 0.1% SDS로 95°C에서 5분간 변성시켜 각각 10, 15, 20 µL씩 loading하고 동시에 상용적인 laccase (Sigma, L 2157) 3 mg/mL을 PBS (pH 7.2)로 loading한 결과는 Fig. 5에서와 같다.

Fig. 5에서 보여주는 것 같이 상용적인 laccase의 경우 두 band로서 140 KDa와 180 KDa를 보여주었고 옷나무에서 물과 에탄올로 추출한 추출물은 동일하게 210 KDa와 230 KDa에서 두 band를 볼 수 있었다. 그리고 두 sample간의 분자량의 차이는 순수도와 화학적 환경(pH, buffer 등)에서 쉽게 변화될 수 있는 화합물이기 때문이라 생각되며, 옷나무의 종류에 따라 다를 수 있지만 채취하는 시기, 채취하는 부위에 따라 서로 다를 수 있기 때문에 일반적으로 210 KDa과 230 KDa를 가진 laccase로써 추정된다. 이와같은 laccase는 구리를 함유하고 있는 효소로서 산소를 함유하고 있는 기질을 hydrogen peroxide의 생성단계 없이 바로 H₂O로 촉매작용을 하는 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. 또한 laccase는 *Rhus verniciflua* Stokes 뿐만아니라 *Agaricus bisporus*, *Coriolus hirsitus* 등에서도 생산되는 물질로써 강력한 항산화제로 알려져 있다²⁰⁾.

ICP를 이용한 Cu²⁺의 측정은 table에서 보여주는 것과 같이 옷나무 에탄올 추출물(20 mg/mL)의 경우 구리의 함량이 0.0238 ppm이고 옷나무 물 추출물(20 mg/mL)의 경우 0.01323 ppm으로 두가지 추출물에서



Fig. 5. SDS-PAGE analysis of extracts from RVS. Electrophoresis was carried out under conditions in 0.1% SDS, 15% polyacrylamide gel and then gel was stained with coomassie brilliant blue R-250. The concentration of laccase and RVS extracts were 3, 30 mg/mL respectively. ▶; indicate 210, 230 KDa laccase of water and ethanol extracts. MW; molecular weight, L; 10 µL laccase, lane 1; 10 µL water extract, lane 2; 15 µL water extract, lane 3; 20 µL water extract, lane 4; 10 µL ethanol extract, lane 5; 15 µL ethanol extract, lane 6; 20 µL ethanol extract.

Table 1. Cu²⁺ concentration to extracts from *Rhus Verniciflua* Stokes (RVS) by ICP-Atomic Emission Spectrometer* (324.745 nm)

Sample	Concentration
Water extract (20 mg/mL)	0.01323
Ethanol extract (20 mg/mL)	0.02380

*Jobin Yvon Inc. CO. Ltd., JY 38 Plus (Dual gratings: 4320 grs/mm, 1800 grs/mm)

구리를 확인할 수 있었다.

결과적으로, 이 실험에서 얻은 결과와 Lim과 Shim⁹⁾의 보고를 종합해볼 때 옷나무 추출물은 기능성 물질임을 알 수 있었고 또한 그 물질의 특성으로써 항산화에 대한 결과를 보여주었으며, 옷나무 추출물의 compound는 SDS-PAGE와 ICP를 통해 얻은 결과 큰 역가의 항산화제라는 점과 단백질을 포함하고 있는 물질로써 Cu²⁺를 함유하고 있다는데서 이 물질은 laccase로 추정된다. 이러한 추론은 단일물질로서의 정제과정이나 다른 물리화학적 방법을 이용한 보다 정확한 규명이 뒤따라야 하지만, 지금까지 잘 알려진 여러 종류의 laccase는 추출하는 출처에 따라 다르며 분자량도 화학적 환경에 따라 다르지만 일반적으로 알려진 laccase는 당단백질이며 보통 dimer로 되어 있고 2분자 내지는 4분자의 Cu²⁺를 포함하고 있다는 것이 공통된 점들이다. 또한 *Rhus verniciflua*는 적은 량이지만 당단백질을 함유하고 있고 그 분자량은 아

주 다양하다^(22,23).

결국 laccase의 기질 특이성 때문에 oxygen free radical에 대한 강력한 scavenger로써 작용하므로 여러 생리현상에서 발생하는 radical에 의해 손상되어 야기되는 여러 질병의 예방에 이용성이 크다는 것을 시사해 주었다.

요 약

웃나무에서 극성이 큰 물과 에탄올로 추출한 물질을 생쥐 뇌세포를 배양하여 glucose oxidase에 의해 생성되는 hydroxyl radical에 대한 항산화 효과와 암세포에 미치는 영향을 알아보았다.

먼저 항산화 효과에 있어서, 7~10일 정도 배양된 생쥐 뇌세포에 20 mU/mL GO system을 처리한 후 물 및 에탄올 추출물 (30 mg/mL)을 일정량 첨가하여 hydroxyl radical에 대한 웃나무 추출물의 항산화 효과를 측정하였다. 그 결과 GO 20 mU/mL만을 처리한 구에서는 생쥐 뇌세포의 생존률이 52.0%인데 반하여, 웃나무 물 추출물을 1, 2, 4, 7, 10 μ L 첨가시 각각 60.0, 66.0, 72.0, 84.0 및 90.1%로서 첨가량이 증가할수록 매우 높은 생존률을 보였다. 이러한 경향은 에탄올 추출물의 첨가시에도 유사하였는데, 1 μ L과 2 μ L 첨가시 생존률은 55.0%와 64.0%였고, 4, 7, 10 μ L에서는 각각 70.0, 79.0, 91.0%로서 나타났다. 항산화력을 비교하기 위하여 잘 알려진 항산화제인 ascorbic acid를 50, 100 μ M 첨가시 쥐의 뇌세포의 생존률은 대조군에 대해 각각 87.0%와 90.0% 이었는데 이 것은 각각의 웃나무 추출물 10% (10 μ L/well)첨가시 나타났던 항산화 효과와 비슷한 결과였다. 따라서 이러한 항산화 효과에 관여하는 주요 성분을 전기영동과 작용기 분석을 통해 알아본 결과 laccase라는 물질이 주 성분이라는 것과 그 것은 구리를 함유한 당단백질로서 크기는 약 210 KDa과 230 KDa으로서 dimer로 되어 있다는 것을 알 수 있었다. 한편 웃나무 추출물의 HeLa cell에 미치는 영향을 보기 위해 *in vitro* 방법으로 HeLa cell에 대해 물 및 에탄올 추출물(30 mg/mL)을 최고 10% 농도까지 첨가하여 시간별로 측정된 결과 10 μ L (10%) 첨가 후 12시간에는 40.0%가, 48시간에는 60.0% 정도의 HeLa cell이 사멸되는 것을 알 수 있었다. 암세포 성장 억제 효과에 대한 결과는 *in vivo* 방법에 있어서도 유사한 결과를 얻었다. 즉 BALB/c의 복강에 CT-26 (1×10^6 cells/mL)을 접종한 후 종양을 발생케 한 후 웃나무 추출물을 주입시 주입 7일 후 대조군에 비해 종양크기가 현저하게 작아지는 것을 볼

수 있었다.

감사의 글

본 연구는 1997년 학술진흥재단 지역개발연구과제 학술연구 조성비 지원으로 이루어진 결과로서 이에 감사드립니다.

문 헌

- Adams, Jr. J.D. and Odunze, I.N.: Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Rad. Biol. Med.*, **10**, 161-169 (1991)
- Barry, H. and Okezie, I.A.: DNA and free radicals. Ellis Horwood, p.1 (1993)
- Lim, K.T. and Shim, J.H.: Antioxidative effects of ethanol extracts from *Rhus Verniciflua* Stokes (RVS) on mouse whole brain cells (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**(6), 1248-1254 (1997)
- Burtor, R.H.: Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology & Medicine*, **18**, 775-794 (1995)
- Yuichiro, S., Henry J.F. and Sevanian, A.: Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine*, **22**, 269-285 (1997)
- Adelman, R., Saul, R.L. and Ames, B.N.: Oxidative stress to DNA : Relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2706-2708 (1988)
- Packer, L.: Oxidative stress, antioxidants, aging and disease. *Oxidants and Antioxidants*, p.1 (1995)
- Shacter, E., Beecham, E.J., Covey, J.M., Kohn, K.W. and Potter, M.: Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells. *Carcinogenesis*, **9**, 2297-2304 (1988)
- Spina, M.B. and Cohen, G.: Dopamine turnover and glutathione oxidation: Implication for parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1398-1440 (1989)
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M.: Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7915-7922 (1993)
- Braner, A.L.: Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *J. Amer. Oil Chem. SOC.*, **52**, 59-63 (1975)
- Choe, S.Y. and Yang, K.H.: Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA) (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **14**, 283-288 (1982)
- Park, W.B. and Kim, D.S.: Changes of contents of β -carotene and vitamin C and antioxidative activities of *Angelica keiskei* koidz stored at different conditions (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 375-288 (1995)
- Lee, H.O.: Antioxidant effect of tocopherols and tocotrienols and cis/trans-, trans/trans-hydroperoxide isomer from linoleic acid methylester (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **25**, 307-312 (1993)

15. Lee, Y.S., Shin, D.H., Chang, Y.S. and Kang, W.S.: Antioxidative effect of us *javanica* Linne extract by various solvents (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **25**, 677-682 (1993)
16. Lee, J.C. and Lim, K.T.: Effects of natural bioactive substances on hydroxyl radical in mouse forebrain cell culture. *J. Toxicol. Pub. Health*, **14**(2), 171-176 (1998)
17. Lee, J.C. and Lim, K.T.: Stress response by copper, selenium as environmental pollutant in mouse tissues. *Korean J. Environ. Biol.*, **14**, 177-187 (1996)
18. Michikawa, M., Lim, K.T., Mclarnon, J.G. and Kim, S. U.: Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J. Neuroscience Research*, **37**, 62-70 (1994)
19. Lim, K.T., Park, S.T., Chol, M.K. and Chung, Y.T.: Neuronal cytotoxicity of oxygen radical in newborn mouse forebrain culture. *Korean J. Toxicol.*, **11**, 187-192 (1995)
20. Yaropolov, A.I., Skorobogat'ko, S.S. Vartanov. and Varfolomeyer, S.D.: Laccase; property, catalytic mechanism and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **49**, 257-280 (1994)
21. Niku-Paavola, M.L. Raaska, L. and Itavaara, M.: Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. *Mycol. Res.*, **94**, 27-31 (1990)
22. Kensuke Okusa, Tetsuo Miyakoshi and Chen-Loung Chen.: Comparative studies on dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol by laccase and peroxidases. *Holzforschung*. **50**, 15-23 (1996)
23. Rodriguez, C.S., Santoro, R., Cameselle, C. and Sanroman, A.: Laccase production in semi-solid cultures of *phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Letters*. **19**, 995-998 (1997)

(1998년 8월 19일 접수)