

고본(藎本)내 정유성분의 생리활성 탐색

김민희 · 김영길 · 이진하 · 홍거표¹ · 홍정기¹ · 공영준¹ · 이현용*

강원대학교 농업생명과학대학 식품·생명공학부, ¹강원도 농업기술원 특화작물개발시험장

Screening of Biologically Active Essential Oils from *Ligusticum tenuissimum*. Kim, Min-Hae, Young-Gil Kim, Jin-Ha Lee, Keo-Pyo Hong, Jung-Ki Hong, Young-Joon Kong, and Hyeon-Yong Lee*. Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea, ¹Regional Crop Development Station, Kangwon Agricultural Research & Extension Services, Chunchon 200-150, Korea—The biological activities of the crude essential oils from *Ligusticum tenuissimum* and the control(phthalic anhydride) were compared. About 60% of the growth of MCF7, A549, and Hep3B cells were inhibited by adding 1.0 mg/ml of the crude essential oils and below 40% was observed by the control. Cytotoxicity on human normal lung cell(IMR90) was scored as 34.4% for the crude oil and 26.4% for control, respectively. It was found that the crude essential oils were more effective than the control in anti mutagenecity tested by both Rec-assay and CHO V79 cells. The growth of human T-cell(Jurkat) was enhanced up to 1.21 times by adding the crude essential oil compared with the control. 50% of α -glucosidase activity was inhibited by both the crude essential oil and the control. ACE activities were inhibited 80.1% and 65.3% by adding 1.0 mg/ml of the crude oil and the control, respectively. The higher enhancement of glutathione-S-transferase activity was observed in the crude oil than those in the control : 301% v.s 234% at 1.0 mg/ml of the treatment. Thrombolytic activity was measured as 42.9% and 28.6% for the crude oil and the standard, respectively. The effect of the oil on the nerve cells PC12, was observed as follows: the neurite of PC12 cells was lengthened up to 255 μ m longer than 205 μ m of control. The number of neurite-bearing cells were about two times higher than control. The survival ratio of the crude essential oil was also increased up to 56.4% which was about two fold higher than in control.

Key words: *Ligusticum tenuissimum*, the essential oil, phthalic anhydride, biological activities, PC12

정유(essential oil)는 방향성 식물체내에 출쳐 한 휘발성 성분으로 수증기 증류에 의해서 얻어지는 성분 군을 일컫는 것으로[17] 식품, 의약, 화장품, 향료 및 도료 등 여러 산업에서 주로 향 성분으로 첨가되는 물질이다. 각 공업 생산품에 필요한 향 성분의 종류에 따라서 추출 원료와 식물의 종류를 달리하고 있으며, 정유성분 특유의 향으로 상품의 가치를 높이는 이외의 인체의 건강에도 매우 유익한 성분임이 알려져 있다. 정유성분도 다양한 약리 작용이 있으며 주로 coumarin계 성분이 나타내는 약리 작용을 갖고 있으며 그 이외의 흥분제, 방부제, 진위제, 구충제 등의 약리 작용도 있음이 보고되어 있다[16]. 또한 식물체 중의 정유 성분은 박테리아를 살균하는 작용도 있음이 보고되었으며 [11], 이러한 연구는 계속 연구되어 지고 있다.

고본 (*Ligusticum tenuissimum*)은 미나리과에 속하는 약용식물로서 그 뿌리(根)는 주로 “부인병”에 사용하고, 일반적으로 산한해표(散寒解表), 거풍승습(祛風勝濕), 지통

(止痛), 두정통(頭頂通)에 사용하고 있다[7]. 우리나라에서는 고본의 기원식물을 *Angelica tenuissima*로 기재되어 있으나 중국약전, 고등식물도감, 중약학(中藥學), 아시아의 미나리과, 의역신농본초경에는 모두 고본의 기원을 *Ligusticum tenuissimum*으로 정립하여 기재하고 있으며, 국내 한약시장에서는 식고본으로 구별하고 있으나 그 기원 식물은 같다[4]. 따라서 한방에서 쓰이는 생약으로 고본의 약효작용을 규명하는데 정유성분을 지표로 삼을 수 있을 것이다.

하지만 지금까지의 이런 고본의 정유성분에 관한 연구는 육창수 등[20]이 보고한 고본 뿌리의 정유성분 분석이 대부분이며, 고본을 비롯한 다른 여러 식물체의 정유성분에 관한 연구들도 거의 대부분이 성분분석 내지는 항균활성이고, 그 구체적인 생리활성에 관한 연구는 아직 미흡한 편이다. 따라서 이러한 사실을 토대로 본 논문에서는 고본 뿌리의 정유성분의 생리활성의 활용도를 탐색하여 최근 그 관심도가 증가되고 있는 aroma-therapy의 적용도 탐색 및 기타 기능성 식품으로서의 가치와 성인병과 같은 질병에 대응하는 새로운 현대의 식품자원으로 개발 가능성을 밝히 고자 다음과 같은 실험을 수행하였다.

*Corresponding author
Tel. 0361-250-6455, Fax. 0361-256-4819
E-mail: hyeonl@cc.kangwon.ac.kr

재료 및 방법

시료의 조제

본 실험 재료인 고본은 1999년도 산을 경동 시장에서 구입하여 세절하여 사용하였다. 정유성분을 추출하기 위해 Likens-Nickerson 연속 수증기 증류 추출 장치의 개량형으로 Fig. 1에 나타낸 simultaneous steam distillation and extraction(SDE)장치를 이용하여 sample-flask에 고본 200 g 과 증류수 200 ml를 넣고, solvent-flask에는 diethyl ether 100 ml를 넣은 후에 약 4~5시간씩 2회 추출을 하였고, ether층만을 분리한 후 sodium sulfate anhydrous에 의해 24시간 동안 탈수 여과한 다음 진공농축기로 농축하여 순수한 정유성분만을 얻어서 각 실험 시료로 사용하였다. 고본 정유의 표준물질로는 고본에 가장 많이 들어 있는 phthalide계 성분인 phthalic anhydride(Aldrich Chemical, USA)를 사용하였다[20].

암세포의 성장저해 및 세포 독성 실험

본 실험에서 사용된 암세포주는 인간 유래의 유방암세포(MCF7), 폐암세포(A549), 간암세포(Hep3B)를 그리고 정상 세포로는 인간 폐세포(IMR90)를 사용하였다. 세포배양에 사용된 기본 배지는 A549의 경우는 RPMI 1640(GIBCO, USA)를 나머지 세포주는 DMEM(GIBCO, USA)이며 FBS(GIBCO, USA) 10%(v/v)을 첨가하여 유지하였다. 실험에 사용한 세포의 초기 농도는 4×10^4 cells/ml의 농도로 조절하여 96 well tissue culture microplate에 100 μ l/well씩 접종하여 사용하였다[3]. 암세포의 생육저해와 정상 세포의 세포독성은 sulforhodamine B(SRB)방법[2]과 3-(4,

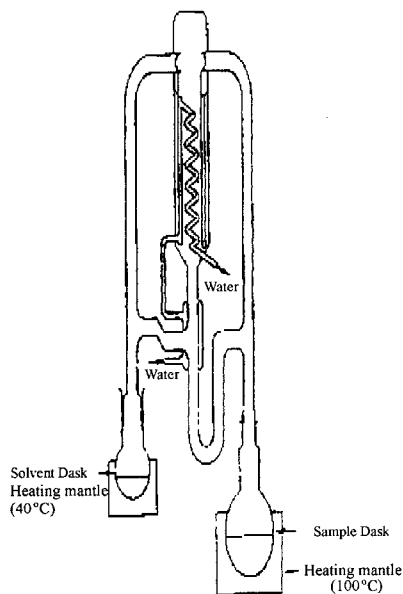


Fig. 1. A schematic diagram of simultaneous steam distillation extraction(SDE) apparatus.

5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazilium bromide (MTT)방법[10]을 이용하였다. Selectivity의 측정에는 각 암세포주의 생육억제 활성을 측정하고 후 각 농도에서 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 계산하였다.

면역 기능 증강 효과검증을 위해서는 인간 면역 세포인 T cell(Jurkat)을 이용하여 세포의 생육 촉진 정도를 측정하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 세포의 초기 농도를 4×10^4 cells/ml의 농도로 조절하여 96 well tissue culture microplate에 100 μ l/well씩 접종하여 24시간 전배양, 시료투여 48시간 후에 흡광도를 측정하는 MTT방법으로 세포의 생육촉진 정도를 측정하여 면역 기능 증강 효과를 확인했다.

돌연변이 유발 억제 효과 실험

본 실험에서 돌연변이 유발 억제 효과를 측정하기 위해 미생물 균주를 이용한 rec-assay와 chinese hamster V79(CHO V79) 세포주를 이용한 두 가지 실험을 실시했다. Rec-assay에서 사용된 균주는 *Bacillus subtilis* PB 1652 rec+(repair proficient)와 PB 1791 rec-(repair deficient)로써 spore agar plate를 만들어 돌연변이 물질인 MNNG (100 μ g/paper disk)와 각 시료(50, 100 μ g/paper disk)를 혼합 투여하였다. 형성된 inhibition zone을 비교하여 각 추출물이 돌연변이원 물질인 MNNG의 돌연변이원성을 얼마나 억제하는지를 측정하였고 대조구는 MNNG만 처리한 것으로 하였다[6]. V79 cell을 이용한 항돌연변이 실험은 6TG-resistant cell을 5×10^2 cells/ml의 농도로 24well plate에 접종하여 24시간 배양한 후 배지를 교체하여 주고, 시료와 4-nitroquinoiln-1-oxide(4NQO)를 농도별로 투여한 다음, 3시간 후 배지를 교체하여 48시간 더 배양한 뒤 MTT방법에 의하여 실험군의 항돌연변이원성을 측정하였다.

혈당강하 기능 검색 및 혈압조절 기능 실험

혈당강하실험은 생체 내에서 혈당 상승의 결정적인 역할을 하는 α -glucosidase(Sigma, USA)를 10mM PIPES buffer에 용해시킨 10 μ l 효소액, 20 mM maltose 40 μ l, 각 농도의 추출물 10 μ l를 혼합해서 37°C에서 20분간 반응시킨 후 1 ml DNS시약을 첨가하고 100°C에서 10분간 열처리한 후에 550 nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성 저해율을 계산하였다[18]. 한편, 생체 내에서 혈압 상승의 주요 기작은 renin angiotensin system이 주요역할을 하는데 angiotensin converting enzyme(ACE)은 renin에 의해 형성된 angiotensin I의 histidylleucine dipeptide를 분해하여 강력한 혈관 수축 작용을 일으키는 vasoconstrictor인 angiotensin II는 신체 내에서 aldosteron의 분비를 촉진함으로써 물과 sodium의 배설을 억제하며 혈관 이완 작용을 가진 bradykinin을 불활성화시킴으로 결과적으로 혈압을

상승시키는 역할을 한다[14]. 본 실험에서는 고혈압을 유도하는 ACE효소의 억제 활성정도를 측정하기 위해 ACE kit(Sigma, USA)를 이용하여 효소저해 정도를 측정하였다.

간 기능 회복 검색 및 혈전 용해능 측정 실험

Glutathione-S-transferase(GST)는 간의 해독작용에 작용하는 중요한 효소로서 강장작용의 유무를 판가름하는데 이용되고 있다[19]. 이 GST의 활성 측정은 추출물이 제외된 반응액을 대조구로 하였다. 각 추출물을 농도별로 첨가한 후 37°C에서 5분간 반응시킨 후 기질로 1-chloro-2,4-dinitrobenzene을 첨가해주고 다시 37°C에서 2분간 반응시키고 20% TCA를 가하여 반응을 종결시키고 원심분리 후 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 이용하여 GST의 specific activity와 활성을 계산하였다[1,5]. 또한, 혈전 용해능 측정 실험은 fibrinogen (Sigma, USA)이 thrombin (Sigma, USA)에 의해 fibrin이 형성되는 것을 이용한 fibrin plate method[8]을 이용하여 수행하였으며 fibrinogen은 phosphate buffer에 용해시켜 1.2% (w/v)로 조제하고 1% agar 용액은 autoclaving하여 water bath에 넣어서 50°C로 유지하였다. Thrombin은 PBS에 용해시켜 100NIH/ml로 조절하였고 혈전 용해효소인 plasmin은 PBS에 녹여 10.0units로 조절하였고 이것을 대조구로 하였다. Fibrinogen 1.2%(w/v) 용액 5 ml를 먼저 삼각 flask에 넣고 1% agar용액 5 ml를 가하고 최종적으로 thrombin 100NIH/ml 0.1 ml를 넣고 잘 혼합한다. 혼합된 용액을 10 ml씩 petri dish에 분주하고 상온에서 고화시켜 fibrin plate를 완성하였다. 완성된 fibrin plate에 punching을 하고 대조구 및 추출물을 5 µl씩 접종하고 37°C에서 18시간 반응시킨 후 생성된 lysis zone을 대조구와 비교하여 상대적인 비율로 나타내었다.

신경세포의 생육 및 신경돌기 생성촉진

신경세포의 생육 및 신경돌기 생성촉진을 측정하기 위해서 Pheochromocyoma 세포에서 유래한 신경세포주인 PC12 cell을 이용하였다[12]. 0.5×10^4 viable cells/well의 농도로 24 well plate에 접종하여 24시간 후에 배지 2 ml를 새 배지로 교체한 후 추출된 정유성분을 1.0 mg/ml의 농도로 조제한 후 0, 100 µl를 첨가하여 36.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이것을 바탕으로 정유성분에 관한 신경돌기의 연장길이를 측정하였다[13,15]. 또한, 세포 생육 활성 측정을 위해 24 well plate에 4×10^4 viable cells/well의 농도로 접종하여 10% 혈청배지를 이용하여 최종부피를 2 ml로 하여 정유성분을 1.0 mg/ml의 농도로 하여 100 µl를 첨가하였으며, 대조군으로서 PBS를 100 µl를 첨가하였다. 그 후 매일 매일 총 세포 수를 정하였으며 trypan blue dye exclusion 방법으로 생 세포 수를 측정하였으며[9], 세포의 생존활성은 세포들이 사멸기에 접어든 시료투여 8일 후 측정된 세포 생존율을 기초로 하였다. 그리고 신경돌기를 지니는 세포수의 측정을 위해 24 well plate에 0.5×10^4 viable cells/well의 농도로 접종한 후 정유성분 1.0 mg/ml을 0, 100 µl 첨가하여 매일 $\times 100$ 의 배율로 사진 촬영을 하였다. 이 현미경 사진을 이용하여 신경돌기의 길이가 가장 길게 연장된 세포를 기초로 하여 본 실험에 이용하였다. 신경돌기를 지니는 세포는 현미경상에서 측정하였다.

결과 및 고찰

고본의 정유성분 및 표준물질의 암세포에 대한 성장저해 효과를 검토하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이 전반적으로 표준물질 보다는 고본 정유성분의 저해 효과가 좋은 것은

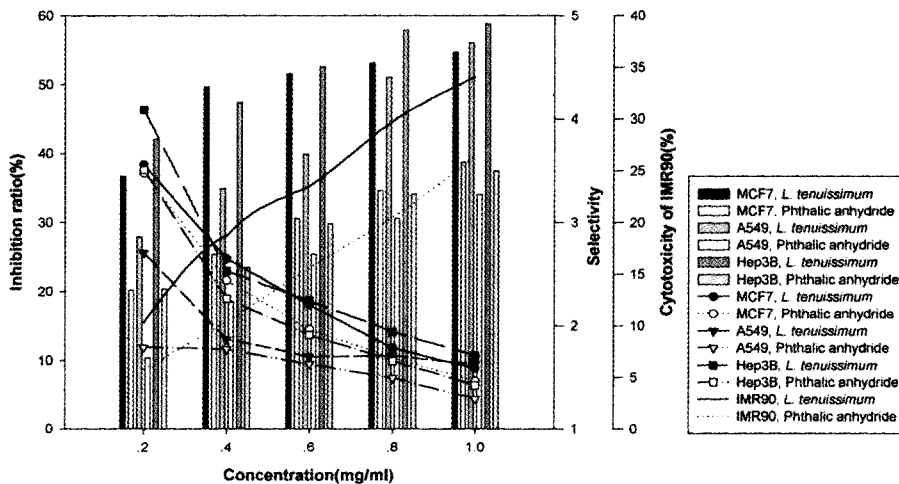


Fig. 2. Comparison of inhibiting the growth of several human cancer cell lines MCF7, A549, and Hep3B (bar chart, %), cytotoxicity (line plot) of IMR90 and selectivity (lime/scatter plot) in adding the crude essential oils from *Ligusticum tenuissimum*.

로 나타났고, 여러 암세포 중 간암 세포주(Hep3B)의 성장 저해율이 1.0 mg/ml의 농도에서 60%의 억제효과를 나타내었다. 고본의 정유성분은 실험에 사용된 모든 암세포주에서 1.0 mg/ml의 농도로 55%이상의 억제 활성을 나타내었으며, 표준물질의 경우에는 1.0 mg/ml의 농도에서 40% 이하의 상대적으로 낮은 억제 활성을 나타내었다. 정상 폐세포(IMR90)를 이용한 세포독성은 고본이 1.0 mg/ml의 농도에서 34.4%로 가장 높았고, 표준물질은 같은 농도에서 26.4%의 낮은 세포독성을 나타냈다. 암세포의 생육저해(%)에 대한 정상세포의 세포독성(%)을 나타내는 selectivity를 살펴본 결과 selectivity의 수치가 1.5이상일 때 암세포에 대한 선택성이 있어 생육을 억제한다고 볼 수 있다. 고본과 표준물질을 비교하였을 때는 고본의 정유성분이 그 선택도가 표준물질보다 높게 나타났으며, 고본과 표준물질 모두다 selectivity가 1.5이상으로 나타나 암세포에 대한 선택성이 있는 것으로 나타났다.

Table 1과 2는 고본과 표준물질의 돌연변이 유발 억제효과를 실험한 결과를 나타내었다. Table 1은 미생물을 이용해 측정한 rec-assay의 결과이며 고본과 표준물질 모두

Table 1. Anti-mutagenic effects of the crude essential oils from *Ligusticum tenuissimum**

| Sample | Amount tested(μ g) per disk +MNNG 10 μ l | Inhibition halo diameter(cm) | | Difference zone (cm) | Relative inhibition ratio (%) |
|-------------------------------|---|------------------------------|------|----------------------|-------------------------------|
| | | rec+ | rec- | | |
| <i>Ligusticum tenuissimum</i> | 50 | 1.1 | 2.95 | 1.85 | 9.8 |
| | 100 | 1.5 | 3.2 | 1.7 | 17.1 |
| Phthalic anhydride (control) | 50 | 1.25 | 3.15 | 1.9 | 7.3 |
| | 100 | 1.6 | 3.35 | 1.75 | 14.6 |
| MNNG | 20 | 1.4 | 3.45 | 2.05 | 0 |

*Assayed by *Bacillus rec*-assay.

Table 2. Anti-mutagenic effects of the crude essential oils from *Ligusticum tenuissimum**

| Sample | Dose (mg/ml) | Relative inhibition ratio(%) |
|-------------------------------|--------------|------------------------------|
| <i>Ligusticum tenuissimum</i> | 0.2 | 12.3 |
| | 0.4 | 16.8 |
| | 0.6 | 20.4 |
| | 0.8 | 28.9 |
| | 1.0 | 36.8 |
| Phthalic anhydride (control) | 0.2 | 6.5 |
| | 0.4 | 10.4 |
| | 0.6 | 14.3 |
| | 0.8 | 17.8 |
| | 1.0 | 21.7 |

*Assayed on Chinese hamster V-79 cells treated with a strong mutagen, 4-NQO(5×10^{-8} M).

돌연변이 억제효과를 나타내었는데 전체적으로 고본의 정유성분이 표준물질보다 좀더 높은 것으로 나타났다. 이는 고본의 정유성분이 MNNG와 균주의 DNA와 RNA와의 결합을 억제하는 물질을 더 많이 함유하고 있다고 추측할 수 있다. 한편, 이러한 항돌연변이원성은 항암과 높은 상관관계가 있기 때문에 앞서 언급된 항암 실험에서 고본의 효과가 있었다고 생각된다. 또한 Table 2는 동물세포(CHO V79)를 이용한 항돌연변이원성 실험의 결과인데, 역시 고본이 표준물질보다 높은 항돌연변이원성을 나타냈으며, 고본이 1.0 mg/ml의 농도에서 대조구에 비해 36.8%의 돌연변이 억제율을 나타내어 가장 높았다. Rec-assay와 CHO V79를 비교해 보았을 때, 동물세포의 돌연변이 억제 효과 2배정도 더 효과적임을 알 수 있었다. 이것은 동물세포라는 점에서 미생물보다는 보다 큰 의미를 가지고 있다.

인간 면역 체계에서 항체 생성의 중요한 역할을 하는 Human T 세포의 생육촉진 실험 결과는 Fig. 3에 나타났으며, 고본과 표준물질 모두 낮은 농도에서도 생육을 촉진하는 것으로 나타났으며, 특히 고본 1.0 mg/ml의 농도에서

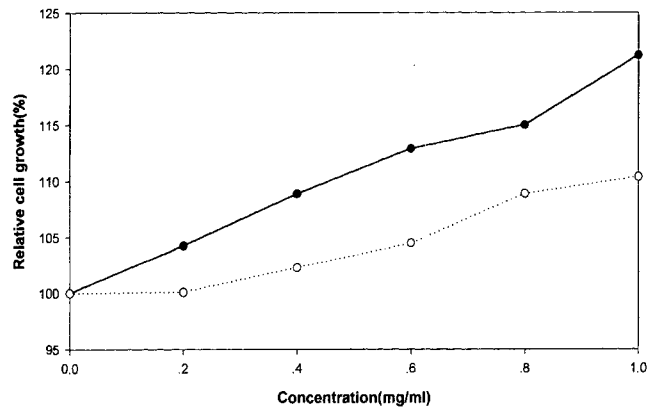


Fig. 3. The effect of the crude essential oils from *Ligusticum tenuissimum* on the growth of human T cell (Jurkat).

●—● *Ligusticum tenuissimum*, ...○... Phthalic anhydride(control)

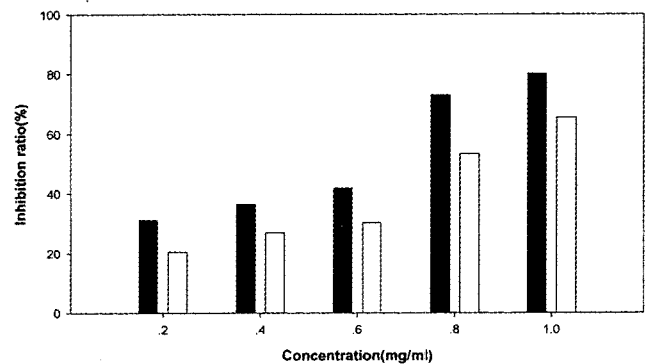


Fig. 4. Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme(ACE) activity in adding the crude essential oils from *Ligusticum tenuissimum*.

■ *Ligusticum tenuissimum*, □ Phthalic anhydride(control)

1.21배의 촉진 활성을 보였다. 또한 표준물질은 1.0 mg/ml의 농도에서 1.1배의 촉진 활성을 나타내어 고본이 인간의 면역에서도 효과적이라는 것을 알 수 있다.

정유의 특정 성인병에 대한 생리활성 검색 중에서 우선 Fig. 4에서는 고혈압이 발생하는 기작에서 혈압상승의 가장 중요한 요인인 angiotensin converting enzyme(ACE)효소에 대한 고본과 표준물질의 저해활성을 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 고본의 정유성분이 1.0 mg/ml의 농도에서 80.1%의 저해율을 나타내어 가장 높았으며, 저농도에서도 높은 활성을 나타내었다. 표준물질 또한 고본보다는 낮지만 비교적 높은 저해율을 나타내었으며, 1.0 mg/ml의 농도에서 65.3%의 저해율을 보였다. 이는 고본이 특히 고혈압에 대하여 상당히 높은 효과가 있음을 암시한다.

혈당강하 기능 검색을 위한 기질로서 maltose와 고본 정유성분 및 표준물질을 첨가하여 추출물에 의한 효소 활성 억제율을 검색한 결과(Fig. 5), 고본은 1.0 mg/ml의 농도에서 59.2%, 표준물질은 57.7%의 억제 효과를 나타내었다. 0.2 mg/ml의 농도에서는 그다지 억제 효과가 나타나지 않

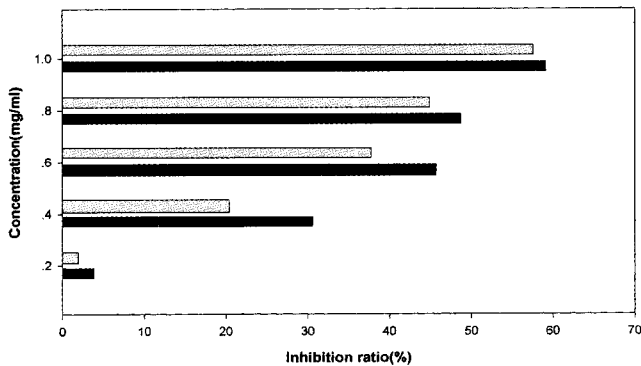


Fig. 5. Inhibition effect on α -glucosidase activity in adding the crude essential oils from *Ligusticum tenuissimum*.

■ *Ligusticum tenuissimum*, ▨ Phthalic anhydride(standard)

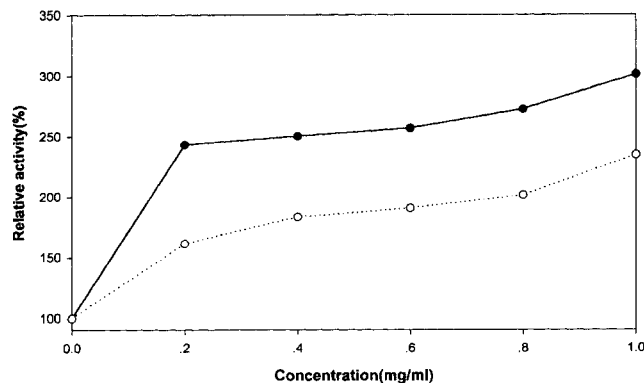


Fig. 6. The enhancement of glutathione-S-transferase(GST) activity in adding the crude essential oils from *Ligusticum tenuissimum*.

●—*Ligusticum tenuissimum*, ...○...Phthalic anhydride(control)

가 0.4 mg/ml의 농도에서부터 고본 정유성분과 표준물질이 각각 30.6%, 20.4%이상의 억제효과를 나타내었다. 그리고 전반적으로 고본과 표준물질 모두 높은 억제활성을 보여 주었다. 현대사회가 점차 고령화 사회가 되어가면서 갖가지 성인병이 나타나는데, 그중 고혈압과 당뇨병 등의 질환이 점차 증가하고 있는 추세에 있어서 고본의 ACE나 혈당의 저해활성은 좋은 결과라고 생각된다.

간 기능 회복 검색을 위해 Fig. 6은 간의 해독 작용에 관여하는 GST의 활성화 정도로 고본의 정유성분과 표준물질이 미치는 영향을 조사하였다. 고본 정유성분의 경우 1.0 mg/ml의 농도에서 대조구의 GST 활성화보다 약 3.01배, 표준물질은 2.34배 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한 비교적 낮은 농도인 0.2 mg/ml에서도 고본 정유성분과 표준물질은 각각 2.43배, 1.61배의 모두 높은 활성을 나타내어 적은 양으로도 효과를 볼 수 있다는 결과를 얻었다. 체내에서 혈전의 생성은 혈류 부전, 혈관 상해, 고혈압, 지질 침착 등의 원인으로 혈관 내에서 혈장 응고제, 혈소판, 혈관 내피 세포 및 허부 결체 조직, fibrin 용해계의 총괄적인 복잡한 대사 경로를 통해 일어나며 생성된 혈전은 정맥, 동맥에서 혈관의 순환을 방해하여 조직으로의 영양공급 및 산소공급을 차단하여 뇌출혈, 뇌혈전, 심부전, 심근경색, 동맥경화의 성인병을 일으킨다[8]. 따라서 본 실험을 통해 인위적으로 형성시킨 fibrin을 각 추출물이 용해시키는가의 여부를 확인한 결과는 Table 3에서 나타났다. 대조구인 혈전 용해 효소(plasmin, 10Units)와 비교하여 고본의 경우 1.0 mg/ml의 농도에서 42.9%로 높은 용해능을 나타내었으나, 표준물질의 경우에는 28.6%의 비교적 낮지만 어느 정도의 용해능을 나타내었다.

고본의 정유성분이 신경세포에 미치는 영향은 Fig. 7과 8에 나타내었으며, 일반적인 neurotrophic factor들이 지니는 보편적인 활성인 세포의 증식, 신경돌기의 연장, 신경돌기의 형성활성에 관한 결과들이다[13,15,9]. 세포의 증식면에서 배양 1일부터 약 2배의 세포수가 차이나 배양 6일째에

Table 3. The thrombolytic activities of the crude essential oils from *Ligusticum tenuissimum*

| Sample | Amount tested (mg/ml) | Halo diameter(cm) | Relative activity(%) |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|----------------------|
| <i>Ligusticum tenuissimum</i> | 0.2 | 0.2 | 28.6 |
| | 0.4 | 0.2 | 28.6 |
| | 0.6 | 0.2 | 28.6 |
| | 0.8 | 0.25 | 35.7 |
| | 1.0 | 0.3 | 42.9 |
| | Phthalic anhydride (standard) | 0.2 | 0.15 |
| 0.4 | | 0.15 | 21.4 |
| 0.6 | | 0.2 | 28.6 |
| 0.8 | | 0.2 | 28.6 |
| 1.0 | | 0.2 | 28.6 |
| Plasmin | | 10 unit | 0.7 |

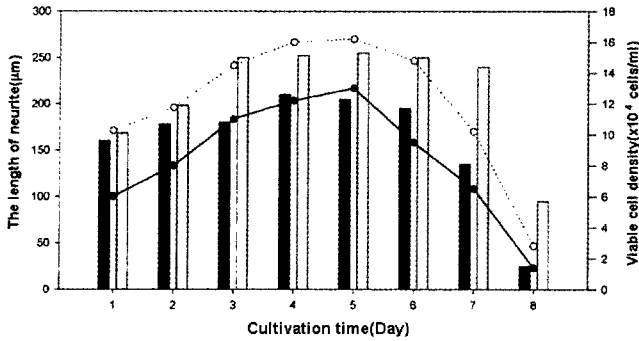


Fig. 7. The neurite outgrowth (barchart) and viable cell density(line/scatter plot) of PC12 nerve cells in no adding the crude essential oils from *Ligusticum tenuissimum* according to the cultivation time.
 ■ No addition, □ *L.tenuissimum*, —●— No addition, ---○--- *L.tenuissimum*

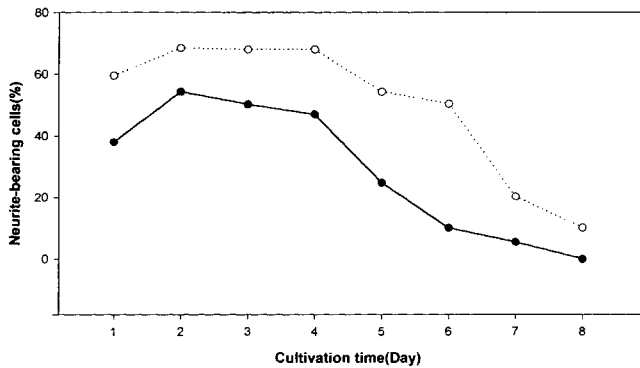


Fig. 8. Comparison of the number of neurite-bearing cells in no adding or adding the crude essential oils from *Ligusticum tenuissimum*.
 —●—No addition, ---○--- *L. tenuissimum*

는 14.8×10^4 viable cells/ml로 약 1.55배의 증식력을 증진시킴을 알 수 있었다. 그리고 신경돌기의 연장의 실험에서는 배양 1일째에는 그다지 차이를 보이지 않다가 배양 3일째부터 크게 차이 나기 시작하여 배양 6일째에는 250 μm 로 첨가하지 않은 것보다 1.28배 더 연장시킴을 알 수 있었으며 참고적으로 Fig. 9는 배양 4일째의 시료 무첨가와 고본이 첨가된 것의 신경돌기 연장활성의 차이를 나타낸 사진으로 고본첨가 시 약 50 μm 의 추가적인 신경돌기 연장을 보였다. 또한 신경돌기의 형성활성의 측정결과는 배양 1일째부터 조금씩 차이가 나서 배양 6일째에 무첨가한 것은 급격히 감소하나 첨가한 세포의 경우에는 일정하게 유지하여 전체 세포 중 신경돌기가 형성된 세포의 비율이 50.4%로 첨가하지 않은 것에 비하여 4.99배 증가하는 것으로 나타났다. Table 4는 고본의 정유성분과 그 표준물질의 여러 생리활성을 비교하여 나타낸 것으로, 대부분의 활성에서 순수한 표준물질 보다 crude oil의 활성 정도가

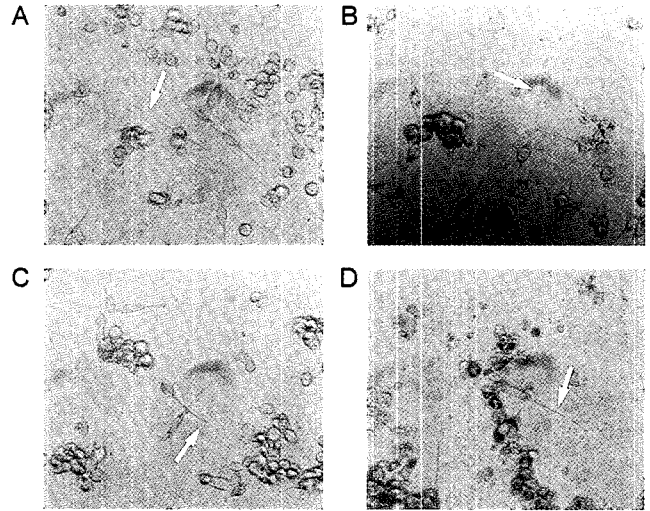


Fig. 9. Comparison of the morphological changes PC12 cells in no adding or adding the crude essential oil from *Ligusticum tenuissimum* according to cultivation time.
 A: no addition; after 24hr, B: 0.05 g/l of the crude essential oil; after 24hr, C: no addition; after 96hr, D: 0.05 g/l of the crude essential oil; after 96hr, Magnification: $\times 100$. The arrows are indicated neurites on PC12 cells.

더 우수하다는 것을 알 수 있었다. 특히 성인병을 야기시키는 여러 인자들인 혈당, 혈압, 혈전 등에 상당한 효과가 있음을 알 수가 있다. 따라서 식물기원의 신경 활성물질의 탐색이 유효할 것으로 사료되어 지고, 더 나아가 식품 중에 첨가 또는 직접 식품으로 이용한다면 신경기능의 향상 또는 신경 퇴행성 질환의 억제 등의 목적으로 하는 기능성 식품의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

요 약

고본에서 정유성분을 추출하여 표준물질과 함께 생리활성 실험을 하였으며, 전체적으로 고본에서 추출한 정유성분이 순수한 표준물질인 phthalic anhydride보다 생리활성능이 좋았다. 항암효과 및 돌연변이 유발 억제실험에서는 고본이 표준물질보다 약 60% 높은 억제 효과를 나타내었으며, 암세포 성장저해에서 고본의 정유성분은 1.0 mg/ml의 농도에서 50%이상의 억제율을 보였으나, 표준물질은 40%이하의 낮은 억제율을 나타내었고, 정상세포에 대한 세포독성을 측정한 결과 고본의 정유와 표준물질이 1.0 mg/ml의 농도에서 각각 34.4%, 26.4%의 낮은 세포독성을 나타내었다. 또한 항돌연변이원성 실험에 rec-assay와 CHO V79 cell에서 고본의 정유가 표준물질 보다 더 효과적이었다. 그리고 면역기능 효과 실험에서 고본의 정유성분은 표준물질보다 1.0 mg/ml의 농도에서 1.21배의 증강을 보였다. 또한 고본 정유성분의 혈당강하, 혈압조절(ACE활성 저해), GST활성, 혈전용해능 등도 활성율이 뛰어났으며, 각각 최고의 농도에

Table 4. Comparison of biological activities of the crude essential oils from *Ligusticum tenuissimum*

| Sample | Dose (mg/ml) | Inhibition ratio(%) of MCF7 | Cytotoxicity(%) on IMR90 | Increased cell growth ratio(%) of Jurkat | Relative activities (%) of GST | Inhibition ratio(%) of α -glucosidase | Relative activities(%) of thrombolytic activity | Inhibition ratio(%) of ACE |
|-------------------------------|--------------|-----------------------------|--------------------------|--|--------------------------------|--|---|----------------------------|
| <i>Ligusticum tenuissimum</i> | 0.2 | 36.7 | 10.3 | 104.3 | 243.1 | 3.8 | 28.6 | 31.1 |
| | 0.4 | 49.6 | 18.7 | 108.9 | 250.2 | 30.6 | 28.6 | 36.6 |
| | 0.6 | 51.6 | 23.5 | 112.9 | 256.7 | 45.7 | 28.6 | 41.7 |
| | 0.8 | 53.1 | 29.8 | 115.0 | 272.3 | 48.9 | 35.7 | 73.2 |
| | 1.0 | 54.7 | 34.4 | 121.2 | 301.2 | 59.2 | 42.9 | 80.1 |
| Phthalic anhydride (control) | 0.2 | 20.2 | 5.8 | 100.1 | 161.2 | 1.8 | 21.4 | 20.3 |
| | 0.4 | 25.4 | 10.4 | 102.3 | 183.4 | 20.4 | 21.4 | 26.4 |
| | 0.6 | 30.6 | 15.6 | 104.5 | 190.6 | 37.6 | 28.6 | 30.2 |
| | 0.8 | 34.6 | 20.5 | 108.9 | 201.4 | 44.5 | 28.6 | 53.2 |
| | 1.0 | 38.7 | 26.4 | 110.4 | 234.7 | 57.7 | 28.6 | 65.3 |

서(mg/ml) 59.2%, 80.1%, 301.2%, 42.9%의 우수한 생리 활성능을 보였고, 표준물질인 경우 57.7%, 65.3%, 234.7%, 28.6%로 높지만, 고본의 정유성분 보다 상대적으로 낮은 활성능을 보였다. 그리고 신경세포의 생육 및 신경돌기 생성 촉진 실험에서 신경돌기 길이는 무첨가 보다 약 50 μ m 촉진하였으며, 신경돌기를 지나는 세포수는 2배 더 증가하였고, 생세포수는 약 56.4% 증가함을 나타냈다. 따라서 고본의 정유성분의 생리 활성능과 신경세포에 대한 우수한 활성능은 식물기원의 신경 활성물질의 탐색이 유효할 것으로 사료되어 진다.

감사의 말

본 연구는 강원도 농업 기술원의 지원으로 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다.

REFERENCES

- Benson, A. M., Y. N. Cha, and P. Talalay. 1979. Elevation of extrahepatic GST and epoxide hydrase activities by hydroxy-anisole. *Cancer Res.* **39**: 2971-2977.
- Doll, R. and R. Peto. 1981. The causes of Cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of Cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**: 1192.
- Fisher, G. A. and A. G. Sartorelli. 1964. Development maintenance and assay of drug resistance. *Meth. in Med. Res.* **10**: 247-252.
- Kim, H. S. and H. J. Chi. 1989. Studies on essential oils plants of *Angelica Genus in Korea* (II). *Kor. J. Pharmacogn.* **20**: 13-20.
- Kim, S. H. and E. S. Park. 1994. The study of prepared GE-132 on the hepatic glutathione-S-transferase activity in rat. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **23**: 581-586.
- Maria, L. C., P. Giuseppe, P. Massimo and T. Marco. 1995. Studies on the insecticidal activities of some new N-benzol-N'-arylureas. *Pestic. Sci.* **45**: 227-236.
- Masaki A., M. Isumi, and R. Ki. 1992. Clinical research of chinese traditional medicine-Pharmacognosy. pp. 49. *Ishiyaku Pub. INC, Tokyo, Japan.*
- Masakico, S. and M. Masubi 1995. Enhancement of plasma fibrinolysis in vitro by Jararhagin. *Toxicon.* **33**: 1605-1617.
- Mercille, S. and B. Massie. 1994. Induction of apoptosis in nutrient- deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 1140-1154.
- Michael, C. A., A. S. Domnic, and M. Ahne. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**: 589-601.
- Nelson, R. R. S. 1997. In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**: 305-306.
- Robert, H., M. Macy, T. R. Chen, P. McClintock, and Y. Reid. 1988. Cell line and hybridomas, pp. 168. H. D. Hatt and M. J. Edwards (eds.). *American Type Culture Collection.* Rockville, Maryland.
- Rukenstein A., and L. A. Green. 1983. The quantitative bioassay of nerve growth factor. use of frozen 'primed' PC12 pheochromocytoma cells. *Brain Research.* **263**: 177-180.
- Seico, Y., S. Kazumaxa, and F. Gunki. 1996. Isolation from α -Zein of thermolysin peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 661-663.
- Shinichiro, T., A. Katsuhiko, Y. Mayumi, and M. Yuzuru. 1994. PS-990 a novel neurotrophic compound from *acremonium sp.* *J. Antibiot.* **47**: 1175-1181.
- Soine, O., R. K. M. Hay, and P. G. Waterman. 1993. Volatile oil crops, p. 1-4. *Longman Scientific and Technical.* England.
- Tyler, V. E., L. R. Brady, and J. E. Robbers. 1977. *Pharmacognosy.* 7th ed, pp. 134-173. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Wellington D., J. Tina, B. Mikael, S. Troels, and R. S. Michael. 1996. Evaluation of isofagomine and its derivatives as potent

- glycosidase inhibitors. *Biochemistry*. **35**: 2788-2795.
19. William H. H. and J. M. Pabst. An Enzyme assay for Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* **22**: 7130-7139.
20. Yook, C. S., C. K. Kang, M. K. Inn, K. O. Kim, and C. W. Kim. 1997. The essential oils of *Ligusticum tenuissimum* Roots. *Yakhak Hoeji*. **41**: 273-276.

(Received January 10, 2000)