

흰털오가피 부위별 물추출물의 항산화활성

유수연 · 김지영 · 노빛나 · 박원봉*

서울여자대학교 자연과학대학

(Received March 28, 2006; Revised May 26, 2006)

Antioxidative Activity of Water Extract of Different Parts of *Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus*

Su-Yun Lyu, Ji-Young Kim, Binna Noh and Won-Bong Park*

College of Natural Sciences, Seoul Women's University

Abstract - *Acanthopanax* species have traditionally been used as a tonic, a sedative as well as in the treatment of rheumatism, hypertension and diabetes. In the present study, oxidative stress was induced in Vero cells by incubating the cells with glucose and the cell viability was measured by MTT assay. The concentration of glucose which 50% of cell viability was 125 mM (IC₅₀) and the cell viability was increased to 87.6±8.8% by treatment of the extracts of *Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus*. The antioxidative activity of water extract of different parts of the *Acanthopanax* plant was investigated by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay, xynol orange assay, TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) assay and enzyme (superoxide anion and catalase) assay. Each extract (leaves, root, stem and fruits) of the plant showed free radical and H₂O₂ scavenging activity. The extract also inhibited lipid peroxidation and recovered enzyme (superoxide anion dismutase and catalase) activity in Vero cells treated with glucose.

Keywords □ *acanthopanax*, Vero cell, glucose, oxidative stress, antioxidative activity

대부분의 생물세포는 포도당을 여러 단계를 거쳐 분해하고, 나오는 에너지로 ATP를 합성하는데 산소가 이용된다. 따라서 산소는 다양한 생명체들의 생존에 필수적인 물질로, 정상적인 포도당 대사과정 중 전자전달계에서 electron sink로서 작용하며, 궁극적으로 물로 환원된다. 이 과정에서 산소가 불안정하게 환원되면 일중항산소인 superoxide anion(O₂⁻), hydroxyl radical (·OH)과 같은 짝짓지 않은 상태의 free radical과 과산화수소(H₂O₂)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species : ROS)으로 변하게 된다.¹⁻³⁾

이와 같이 정상적인 세포에서도 대사과정 중 어느 정도의 ROS가 생성되고 있으나 생체 내에는 이들에 대한 방어기구로서 superoxide dismutase(SOD), catalase, peroxidase 등의 항산화효소와 함께 vitamin E, vitamin C, glutathione 등과 같은 항산화물질이 존재하여 스스로를 보호하고 있다. 그러나 이와 같은 생체방어기구에 이상이 초래되거나 각종 요인들에 의하여 활성

산소의 생성이 생체방어계의 용량을 초과하게 될 경우 산화적 스트레스(oxidative stress)가 야기된다.^{4,6)} 활성산소들은 반응성이 매우 커 핵산, 지질, 단백질 등의 생체 내 화합물을 산화 손상시키며, 특히 활성산소종이 세포 생체막의 구성 성분인 불포화지방산을 공격하여 과산화반응을 일으켜 체내 과산화지질을 축적하여 노화, 암, 당뇨병, 관절염, 백내장, 동맥경화증 등의 각종 질병과 연관성이 있다고 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾

따라서 활성산소종을 소거할 수 있는 화합물(free radical scavengers) 또는 과산화물 생성 억제물질과 같은 항산화제들은 이들 산화물들에 기인하는 노화 및 각종 질환의 억제 또는 치료제로서 기대되고 있다.¹⁰⁾ 활성산소에 의한 산화적 손상을 방어하는 기구로서 radical 생성을 미리 방지하는 예방적 항산화제(preventive antioxidant)와 이미 생성된 radical을 빠르게 소거하는 연쇄절단형 항산화제(chain-breaking antioxidant)가 있다. 전자에는 SOD, catalase, peroxidase 등의 효소류와 xanthine oxidase 저해제, 금속 chelator 등이 있다. 일반적으로 항산화제라 함은 지질의 과산화를 방지하는 작용을 가진 연쇄절단형 항산화제를 일컬으며, 대표적인 것으로는 vitamin C, vitamin E, ubiquinone(CoQ), carotenoid 등이 알려져 있다. 이들은 지질막 내

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-970-5655 (팩스) 02-975-3159
(E-mail) wbpark@swu.ac.kr

에서 지질 peroxy radical을 소거함으로써 radical chain reaction을 정지시키는 작용을 한다. 생체 내에서는 양자가 상충적인 작용을 통해 radical 공격에 대처하는 것으로 여겨지고 있다.¹⁰⁻¹²⁾

항산화제 연구는 식품, 발효 및 의약산업, 농업 분야 등 다양한 분야의 분야에서 이용될 수 있기 때문에 산업적 측면에서 큰 과급 효과를 기대할 수 있다. 특히 지금까지 알려진 항산화제가 약한 활성, 독성 및 사용상의 한계로 인하여 의약활성물질로 사용하는 데 있어서 많은 문제점을 내포하고 있다. 따라서 천연물로부터 보다 안전하고 강한 활성을 지닌 신규 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있다. 천연항산화제 탐색을 위한 재료로는 미생물 대사산물을 비롯하여 버섯류, 조류 등의 해양생물, 식물, 동물, 식품 가수분해산물 등 매우 다양하며, 발견되는 항산화물질의 종류 또한 대상이 되는 천연물의 종류에 따라 다양하다.^{13,14)} 일반적으로 conjugated double bond, phenol 구조, -SH기를 갖는 화합물, alkaloids, 유기산 등은 항산화 활성을 갖는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾

오가피는 인삼과 같은 오가피(五加科)에 속해 있으며, 우리나라 전역과 중국 동북부 지방, 러시아의 시베리아, 일본의 북해도에 분포하고 있다. 오가피는 다년생 낙엽관목식물로서 가지가 여러 개 나는 것이 특징이다. 오가피는 주로 러시아의 시베리아와 중국 만주 등지에서 채취한 자연산이 사용되어 왔으며, 국내에서는 참오가피, 섬오가피, 흰털오가피, 가시오가피 등 10여종의 오가피나무가 자생 또는 재배되고 있다.^{18,19)}

천식, 관절염 등과 같은 만성질환에 효과가 있는 것으로 알려진 흰털오가피는 phenylpropanoid, lignan, terpenoid, chisanoside, acanthoic acid 등 각종 유효성분을 함유하고 있는 것으로 보고되고 있다.²⁰⁻²³⁾ 이들 물질들은 항산화, 면역활성, 방사선 보호효과, 항염, 항균효과 등이 있다고 보고되고 있다.^{24,25)} 김 등은 *Acanthopanax*속 식물 10여종의 잎과 근피 메탄올 엑기스의 과산화지질 억제작용을 검색한 결과 흰털오가피 잎추출물이 가장 활성이 높게 나타났다고 보고한 바 있다.²²⁾ 또한 흰털오가피에서 분리한 terpenoid 및 lignan 성분들의 과산화지질 억제작용을 보고한 바 있다.²³⁾ 그러나 현재 흰털오가피의 잎, 줄기, 뿌리, 열매 등 부위별 물추출물의 항산화활성에 대한 연구는 보고된 바 없다. 본 실험에서는 산화적 스트레스에 의해 일어나는 노화 및 각종 질환의 치료물질을 개발하기 위하여 포도당을 처리한 Vero 세포에서의 흰털오가피(*Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus*) 부위별 물추출물의 항산화활성을 측정하였다.

실험 방법

실험재료 및 시료

충남 천안시 소재 (주)수신오가피에서 재배하여 2005년 10월에 채취한 흰털오가피(*Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus*)

의 잎, 줄기, 뿌리, 열매를 선별하여 세척, 건조 후 열수로 추출한 분말을 제공받아 시료로 사용하였다. 오가피 분말을 멸균증류수에 용해시킨 용액을 pore size가 다른 membrane filter에 의해 순차적으로 여과하여(0.8, 0.45, 0.2 μ m) 실험에 사용하였다.

세포배양 및 세포액의 추출

한국세포주은행에서 분양받은 Vero 세포주는 10% FBS(fetal bovine serum, GibcoBRL, Grand Island, USA), 1% penicillin streptomycin(GibcoBRL, Grand Island, USA)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, GibcoBRL, Grand Island, USA) 배지에서 37°C(5% CO₂/60% 상대습도)의 항온, 항습 배양기로 배양하였다.

포도당 및 시료를 첨가한 세포를 수거하여 과산화수용액(20 mM HEPES, pH 7.0/1 mM EDTA, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) 300 μ l를 넣고, 초음파기로 파쇄 후, 4°C, 12,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 상등액을 수거하여 BCA(bichinoic acid) 방법에 의하여 단백질을 정량 후, 항산화활성 실험에 사용하였다.

MTT assay

세포의 산화적 손상정도는 Vero 세포에 포도당(Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) 용액을 처리 후, MTT assay에 의하여 세포의 생존률을 측정하여 확인하였다. 또한 시료의 산화적 손상 억제활성은 포도당과 오가피 추출물을 첨가한 세포를 2일간 배양 후, MTT assay에 의하여 Vero 세포의 생존률을 측정하여 확인하였다. 즉, 96-well plate에 세포를 1×10⁴ cells/well 씩 접종하여 24시간 배양한 후, 포도당과 오가피 추출물을 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 이 후, MTT 용액 50 μ l(5 mg/ml)씩 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 DMSO 100 μ l씩 첨가 후 595 nm에서 ELISA(Enzyme-linked immunosorbant assay) reader(Molecular Devices Co.)로 흡광도를 측정하였다.

DPPH assay

자유라디칼 소거작용의 측정은 Inkeda 등의 방법²⁶⁾에 의하여 다음과 같이 측정하였다. 각 시료를 조제한 후, 각 용액 100 μ l에 0.1 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Aldrich) 용액(99.5% ethanol에 용해) 1.9 ml를 가하고, Vortex mixer로 10초간 진탕 후, 37°C에서 30분 동안 배양시킨 후 515 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다.

각 시료의 유리기 소거작용은 시료를 가하지 않은 대조군의 흡광도를 50%로 감소시키는 데 필요한 시료의 농도(IC₅₀)로 나타내었으며, 양성대조군으로는 α -tocopherol을 사용하였다.

$$\text{EDA} (\%) = (\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}) / \text{Control O.D.} \times 100$$

Sample O.D=시료를 가한 시험액의 흡광도
Control O.D=시료대신 ethanol을 가한 시험액의 흡광도

세포 내 과산화수소(H₂O₂) 생성정도

과산화수소는 산성 조건에서 Fe²⁺ 이온을 Fe³⁺ 이온으로 산화시키는데, 이것은 Fe³⁺에 민감한 xylenol orange를 처리하여 560 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 내의 과산화수소의 생성정도를 알 수 있다. 세포추출물(단백질농도 2 mg/ml) 50 µl에 FOX 용액(0.1 mM xylenol orange, 0.25 mM ammonium ferrous sulfate, 100 mM sorbitol, 25 mM H₂SO₄) 950 µl를 첨가한 후, 상온에서 30분 동안 반응시키고, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때, 기준곡선은 과산화수소를 1~5 µM 범위에서 동일한 방법으로 측정하여 사용하였다.

지질과산화 정도

지질과산화 정도를 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)의 형성으로 평가하였다. 즉, 세포 추출물(단백질농도 5 mg/ml) 20 µl에 TBA-trichloroacetic acid-HCl 용액(0.375% TBA/15% TCA in 0.25 M HCl) 1 ml를 첨가하여 95°C 수욕상에서 30분간 가열하여 발색시킨 후 냉각시켰다. 냉각 후 10분간 원심분리(2,000 rpm)한 다음 상등액을 취하여 생성된 MDA의 양을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Superoxide dismutase 활성

Superoxide dismutase의 활성은 pyrogallol의 자기산화(auto-oxidation)를 저해하는 정도로 확인하였다.²⁷⁾ 1 mM EDTA를 함유한 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.2) 970 µl에 0.2 mM pyrogallol 용액 10 µl와 세포 추출액(단백질농도 5 mg/ml) 20 µl를 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후, 1 M HCl 용액을 가하여 반응을 종료시키고 440 nm에서 흡광도를 측정하여 활성도를 산정하였다. SOD 1 unit는 pyrogallol의 자기산화 속도를 50% 억제하는 효소단백질(SOD)의 양으로 나타내었다.¹⁹⁾

Catalase 활성

Catalase 활성은 Aber²⁸⁾의 방법에 준하여 H₂O₂의 분해에 따라 감소하는 흡광도를 측정하는 방법을 이용하였다. 50 mM 인산완충용액(pH 7.0)에 15 mM H₂O₂를 가하여 만든 기질용액 980 µl에 세포 추출액(단백질농도 5 mg/ml) 20 µl를 가한 후 240 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 효소의 활성단위(1 unit)는 1분간 1 mg 효소단백질(catalase)에 의해 소실되는 H₂O₂의 양을 1 µmol/min로 나타내었다.

통계처리

모든 실험결과는 평균±표준오차로 나타내었으며 자료분석은

ANOVA test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

실험결과 및 고찰

포도당에 의한 세포의 산화적 손상 유발 및 산화적 손상 억제작용

진핵세포에서 포도당의 정상적인 대사과정에서 산소가 불안정하게 환원되면 superoxide anion(O₂⁻), hydroxyl radical(·OH), H₂O₂와 같은 활성산소로 변하게 된다. 이 활성산소들은 반응성이 매우 커 핵산, 지질, 단백질 등의 생체 내 화합물을 산화 손상시키며, 생체막의 성분인 불포화지방산을 공격하여 과산화반응을 일으켜 체내 과산화지질을 축적하여 세포에 산화적 손상을 입히는 것으로 알려져 있다.¹⁻³⁾

본 실험에서는 포도당에 의한 Vero세포의 산화적 손상을 유발하기 위해, 다양한 농도의 포도당액을 Vero세포에 처리하였다. 2일간 배양 후 MTT assay에 의하여 세포의 생존률을 측정된 결과, 세포의 생존을 50% 억제시키는 포도당의 농도(inhibitory concentration of 50%, IC₅₀)는 125 mM인 것으로 나타났다(Fig. 1).

오가피 추출물 처리에 의한 세포의 산화적 손상 억제정도는 125 mM 포도당과 오가피 물추출물을 농도별로 처리한 세포를 2일간 배양 후, MTT assay에 의하여 Vero 세포의 생존률을 측정하였다. 음성 대조군은 오가피 추출물을 처리하지 않고 세포의 생존을 50% 억제시키는 125 mM 포도당을 처리한 세포의 생존률을 측정하였다.

그 결과, 1 ng/ml의 오가피 추출물을 처리한 경우, 산화적 손상으로 인한 세포의 생존률이 83.6±4.9%(잎), 76.9±7.7%(뿌리),

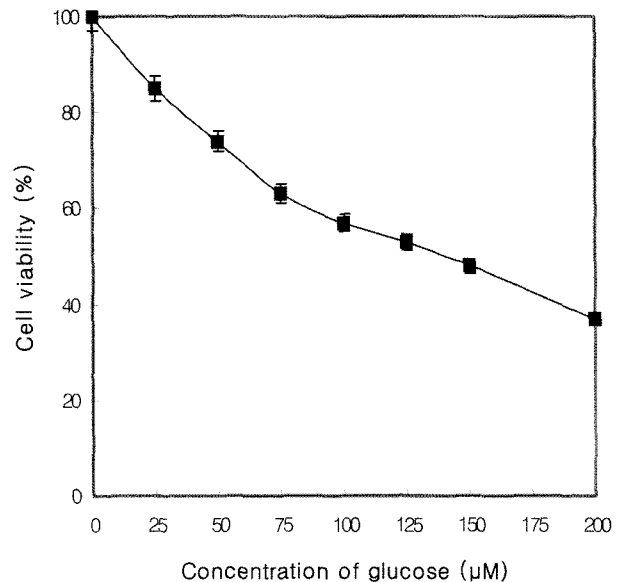


Fig. 1 - Cell viability of Vero cells incubated with glucose for 48 hours. Cell viability was determined by MTT reduction assay. The values represent as mean±standard deviations from three independent experiments.

Table I – Cell viability¹ of Vero cells incubated with glucose² and extracts of Acanthopanax

125 mM Glucose	Acanthopanax (ng/ml)	Cell viability (%)			
		Leaf extract	Root extract	Stem extract	Fruit extract
-	0	100	100	100	100
+	0	49.4±4.2	55.7±7.3	56.3±3.5	50.4±5.8
+	0.0001	62.1±2.7	57.0±4.3	57.1±0.9	53.7±5.2
+	0.001	63.4±6.7	58.9±5.5	69.4±8.0	53.4±3.1
+	0.01	77.6±10.1	64.4±14.1	68.2±5.5	57.3±5.1
+	0.1	83.7±6.6	64.3±8.5	70.6±6.2	59.3±7.9
+	1	83.6±4.9	76.9±7.7	72.5±3.9	58.5±14.7
+	10	80.9±7.9	76.4±5.0	70.4±7.0	67.3±7.9
+	100	87.6±8.8	78.1±8.7	71.8±3.6	65.0±7.9
+	1,000	84.0±4.4	79.8±9.8	70.2±4.5	64.2±4.9

¹Cell viability was determined by MTT reduction assay. The values represent as mean standard deviations from three independent experiments.

²The cells were incubated with 125 mM glucose (IC₅₀) with the extracts of Acanthopanax for 48 hours.

72.5±3.9%(줄기)까지 회복되었다. 특히 잎 추출물의 경우 0.1~1,000 ng/ml의 농도에서 세포의 생존이 80%이상으로 회복되었으며, 100 ng/ml의 잎 추출물을 처리 시 세포의 생존이 87.5±8.8%까지 회복되었다. 그러나 열매추출물의 경우에는 세포 생존의 회복정도가 비교적 낮았다(Table I).

DPPH· 유리 라디칼 소거활성능

DPPH는 화합물 내 질소 중심의 라디칼로 라디칼 전자의 비편재화에 의해 안정한 구조의 라디칼로 존재한다. DPPH는 520 nm에서 최대 흡수도를 나타내는데, 환원되면 520 nm에서 흡수가 없어지며, 환원정도는 환원제의 환원력에 달려 있다. 반응 중 DPPH의 감소는 유리의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측할 수 있다.²⁶⁾ 본 실험에서는 흰털오가피의 부위별 물추출물의 항산화효능의 정도를 DPPH에 대한 전자공여능(electron donating ability, EDA%)으로 측정하여 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 양(IC₅₀)을 측정하였다.

양성 대조군으로 α-tocopherol의 활성을 측정한 결과 농도의존적으로 자유라디칼을 억제하였으며, IC₅₀치는 12 µg/ml임을 알 수 있었다. 또한 흰털오가피 추출물의 자유라디칼 소거활성을 확인한 결과, 잎의 경우, IC₅₀=12 µg/ml로 기존의 항산화제인 α-tocopherol(IC₅₀=12 µg/ml)과 거의 대등한 항산화활성을 보였다. 또한, 뿌리(IC₅₀=48 µg/ml) 및 줄기(IC₅₀=65 µg/ml)의 경우에도 우수한 항산화활성을 보였다. 그러나 열매 추출물의 경우에는 자유라디칼 소거 활성이 비교적 낮은 것으로 나타났다(IC₅₀>1,000 µg/ml)(Fig. 2). 김 등은 흰털오가피의 잎 및 근피의 메탄을 추출물의 유리 라디칼 소거작용을 측정한 결과, 잎 추출물의 경우 활성이 매우 낮은 것(IC₅₀=1,000 µg/ml)으로 보고한 바 있다.²²⁾ 그러나 본 실험 결과에서는 잎 물추출물의 경우 우수한 항산화효과를 나타내는 것으로 보아 용매의

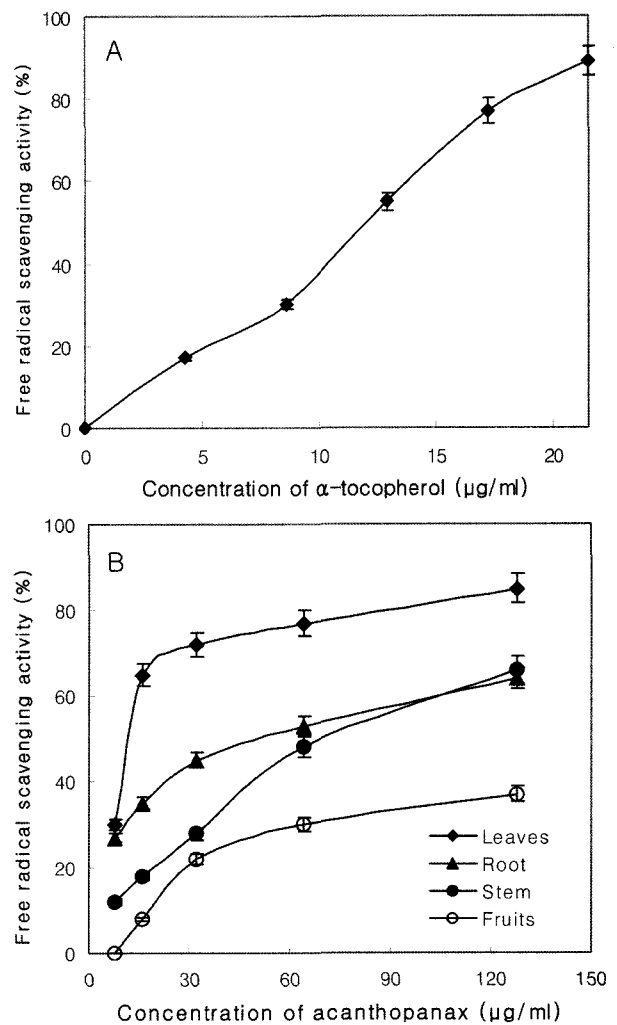


Fig. 2 – Free radical scavenging activity of α-tocopherol and Acanthopanax extract. α-Tocopherol or the extract of Acanthopanax were incubated with DPPH at 25°C for 15 min and the absorbance at 520 nm was measured. The results are shown as the means±standard deviations of 3 separate experiments.

종류, 온도 등 추출방법에 따라 활성이 크게 달라지는 것을 알 수 있었다.

세포 내 과산화수소(H₂O₂) 생성억제작용

오가피 추출물에 의해 세포의 정상적인 포도당 대사과정 중 생성되는 활성산소종의 하나인 과산화수소(H₂O₂)의 생성을 억제하는 정도를 알아보기 위해 세포에 125 mM 포도당 및 오가피 물추출물을 처리 후 파쇄하여 얻은 추출물에 FOX 용액을 첨가한 후, 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

그 결과, 포도당의 처리에 의해 세포 내에서 H₂O₂의 생성이 현저히 증가하였으며, 오가피 추출물의 처리에 의해 H₂O₂의 생성이 감소함을 알 수 있었다. 즉, 자유라디칼 소거활성이 가장 우수한 잎 추출물을 처리한 경우 1 ng/ml의 농도에서 거의 정상으로 회복되었으며, 뿌리, 줄기 및 열매 추출물을 처리한 경우에도 10 ng/ml의 농도에서 거의 정상으로 회복되는 것으로 나타났다 (Table II).

지질과산화 억제 작용

산화적 스트레스는 세포막을 구성하는 주된 성분인 인지질을 산화 손상시켜 세포에 대한 독성을 가지는 MDA(malondialdehyde)와 HNE 같은 지질 과산화물을 생성하게 하는데, 이는 산화 손상의 지표가 된다.¹³⁾ 본 실험에서는 지질과산화의 정도를 활성 aldehyde인 MDA 생성을 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)의 분석에 의하여 평가하였다. 그 결과, 포도당의 처리에 의해 Vero 세포에서 과산화지질의 생성이 증가하였으며, 오가피 추출물에 의해 과산화지질의 생성이 감소되는 것을 알 수 있었다. 잎과 뿌리 추출물의 경우 100 ng/ml의 농도에서 산화적 손상으로 인한 과산화지질의 생성이 거의 정상수준으로 회복되었으나 줄기 및 열매 추출물의 경우에는 억제정도가 다소 낮은 것으로 나타났다(Table III).

항산화효소 활성에 미치는 영향

산화적 대사과정 중에 생체 내에서는 항상 free radical이 생성되고 있으며, 이들 대부분은 생체내 항산화 방어계 (항산화 효소

Table II - Effect of water extract of Acanthopanax on the generation² of H₂O₂ in Vero cells¹

125 mM Glucose	Acanthopanax (ng/ml)	Absorbance (λ _{max} =560 nm)			
		Leaf extract	Root extract	Stem extract	Fruit extract
-	0	0.78±0.08	0.72±0.05	0.72±0.07	0.84±0.12
+	0	1.16±0.02	1.21±0.06	1.13±0.04	1.28±0.08
+	0.0001	1.09±0.04	1.05±0.03	1.09±0.02	1.26±0.06
+	0.001	1.04±0.03	1.10±0.05	1.09±0.03	1.27±0.06
+	0.01	1.02±0.03	0.98±0.03	0.99±0.03	1.15±0.12
+	0.1	0.82±0.04	0.88±0.03	0.84±0.01	1.05±0.10
+	1	0.76±0.05	0.81±0.03	0.84±0.05	0.98±0.08
+	10	0.80±0.06	0.77±0.04	0.76±0.01	0.85±0.04
+	100	0.82±0.06	0.75±0.02	0.79±0.07	0.85±0.07
+	1,000	0.85±0.05	0.76±0.06	0.75±0.02	0.80±0.01

¹The cells were incubated with 125 mM glucose (IC₅₀) with the extracts of Acanthopanax for 48 hours. The cells in lysis buffer were broken by sonication and were centrifuged.

²The generation of H₂O₂ was detected by addition of xylenol orange to the cell extract by measuring the absorbance at λ_{max}=560 nm.

Table III - Effect of water extract of Acanthopanax on the lipid peroxidation² in Vero cells¹

125 mM Glucose	Acanthopanax (ng/ml)	MDA level (Absorbance at λ _{max} =540 nm)			
		Leaf extract	Root extract	Stem extract	Fruit extract
-	0	0.15±0.01	0.18±0.01	0.17±0.01	0.16±0.01
+	0	0.33±0.02	0.31±0.02	0.35±0.02	0.34±0.02
+	0.0001	0.33±0.04	0.31±0.03	0.35±0.01	0.35±0.01
+	0.001	0.33±0.03	0.29±0.02	0.35±0.03	0.34±0.04
+	0.01	0.31±0.03	0.26±0.03	0.34±0.001	0.34±0.03
+	0.1	0.26±0.05	0.21±0.05	0.32±0.01	0.32±0.01
+	1	0.22±0.03	0.21±0.06	0.30±0.02	0.30±0.01
+	10	0.22±0.03	0.21±0.04	0.29±0.02	0.29±0.01
+	100	0.17±0.02	0.19±0.02	0.27±0.01	0.28±0.01
+	1,000	0.16±0.01	0.19±0.02	0.26±0.01	0.26±0.02

¹The cells were incubated with 125 mM glucose (IC₅₀) with the extracts of Acanthopanax for 48 hours. The cells in lysis buffer were broken by sonication and were centrifuged.

²The lipid peroxidation were determined by TBARS method. MDA levels were measured by the absorbance at λ_{max}=540 nm.

및 항산화물질)에 의하여 소거된다. Tolmasoff 등²⁹⁾은 SOD의 활성이 대사율에 비하여 높은 포유동물일수록 최장 수명이 길다는 사실을 밝힘으로써 free radical에 의한 산화적 스트레스와 노화와의 관련설을 강력히 제시한 바 있다. 이와 같이 세포의 정상적인 대사과정 중 활성산소종이 생성되고 있으나 생체 내에는 이들에 대한 방어기구로서 free radical 생성을 미리 방지하는 예방적 항산화제(preventive antioxidant)인 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase 등의 항산화효소가 존재하여 스스로를 보호하고 있다. 그 중 SOD는 superoxide anion을 H₂O₂로 전환시키고, catalase는 H₂O₂를 물로 전환시켜 산소기를 제거시킨다.

본 실험에서는 오가피의 부위별 물 추출물이 세포 내의 예방적 항산화제인 SOD 및 catalase의 활성에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, 포도당의 처리에 의하여 세포 내 SOD의 활성이 감소하였으며, 오가피 추출물에 의하여 효소활성이 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하는 것을 알 수 있었다. 잎 추출물의 경우 1 µg/ml의 농도에서 SOD의 활성이 1.64배 증가하였으며, 뿌리 추출물의 경우, 1 µg/ml의 농도에서 효소의 활성이 1.71배 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 줄기 및 열매 추출물의 경우, 잎 및 뿌리 추출물의 경우

보다 활성의 증가정도가 다소 낮은 것으로 나타났다(Table IV).

또한, catalase의 경우에도 포도당의 처리에 의하여 세포 내 효소의 활성이 감소하였으며, 오가피 추출물에 의하여 효소활성이 유의성 있게 증가하는 것으로 나타났다(Table IV). 잎 추출물의 경우, 10 ng/ml의 농도에서 세포에 포도당만 처리할 때보다 효소의 활성이 1.53배 증가하였으며, 뿌리 추출물의 경우, 1 ng/ml의 농도에서 효소의 활성이 1.56배 증가하였다. 그러나 줄기 및 열매 추출물의 경우에는 잎 및 뿌리 추출물의 경우보다 활성의 증가정도가 다소 낮은 것으로 나타났다(Table V).

이와 같은 결과는 세포 내 SOD는 포도당의 대사과정에서 생성된 superoxide anion(O₂⁻)을 H₂O₂로 전환시키고, catalase는 H₂O₂를 물로 전환시키는 과정에서 효소의 활성이 감소하나 오가피 추출물은 세포 내 효소의 활성을 유의성 있게 증가시켜 주는 것으로 해석된다.

결론

산화적 스트레스에 의해 일어나는 노화 및 각종 질환의 치료

Table IV - Effect of water extract of *Acanthopanax* on SOD activity² (U/mg) in Vero cells¹

125 mM Glucose	Acanthopanax (ng/ml)	SOD activity (U/mg)			
		Leaf extract	Root extract	Stem extract	Fruit extract
-	0	1.32±0.02	1.33±0.03	1.32±0.02	1.33±0.05
+	0	0.56±0.01	0.55±0.05	0.54±0.06	0.55±0.01
+	0.001	0.57±0.01	0.55±0.05	0.53±0.05	0.54±0.02
+	0.01	0.57±0.01	0.55±0.05	0.53±0.07	0.54±0.01
+	0.1	0.60±0.01	0.59±0.03	0.55±0.07	0.57±0.01
+	1	0.68±0.03	0.70±0.06	0.59±0.06	0.60±0.00
+	10	0.77±0.01	0.80±0.05	0.63±0.05	0.64±0.01
+	100	0.89±0.04	0.87±0.06	0.67±0.05	0.71±0.01
+	1,000	0.92±0.01	0.94±0.06	0.74±0.03	0.78±0.03

¹The cells were incubated with 125 mM glucose (IC₅₀) with the extracts of *Acanthopanax* for 48 hours. The cells in lysis buffer were broken by sonication and were centrifuged.

²The activities of SOD (U/mg) were determined by measuring the absorbance at λ_{max}=420 nm of the solution of cell extract and H₂O₂.

Table V - Effect of water extract of *Acanthopanax* on catalase activity² (U/mg) in Vero cells¹

125 mM Glucose	Acanthopanax (ng/ml)	Catalase activity (U/mg)			
		Leaf extract	Root extract	Stem extract	Fruit extract
-	0	9.78±1.2	10.54±2.88	9.96±1.71	9.56±0.12
+	0	5.76±1.05	5.73±1.27	5.54±0.52	5.02±0.36
+	0.001	5.60±0.87	6.14±1.49	5.64±0.71	5.24±0.49
+	0.01	6.09±1.03	7.23±2.55	6.05±0.77	5.55±0.78
+	0.1	7.30±0.95	8.38±2.87	6.19±0.89	6.08±1.11
+	1	8.37±1.79	8.93±3.00	6.56±0.3	6.42±1.13
+	10	8.80±1.01	8.29±1.55	7.14±0.6	6.66±0.51
+	100	8.60±0.69	8.40±1.08	7.60±0.69	6.82±0.45
+	1,000	8.57±0.63	8.34±1.16	7.92±0.92	7.44±0.47

¹The cells were incubated with 125 mM glucose (IC₅₀) with the extracts of *Acanthopanax* for 48 hours. The cells in lysis buffer were broken by sonication and were centrifuged.

²The activities of catalase (U/mg) were determined by measuring the absorbance at λ_{max}=240 nm of the solution of cell extract and H₂O₂.

물질을 개발하기 위하여 흰털오가피 부위별 물추출물의 항산화 활성을 측정한 결과는 다음과 같다.

1. 포도당에 의한 Vero 세포의 산화적 손상을 유발하기 위해, 포도당액을 Vero 세포에 처리하였으며, 세포의 생존을 50% 억제시키는 포도당의 IC₅₀는 125 mM이었다.

2. 오가피 추출물은 산화적 손상으로 인한 세포의 생존을 회복시켰으며, 특히 잎 추출물의 경우 세포의 생존이 87.5%까지 회복되었으나 열매추출물의 경우에는 세포 생존의 회복정도가 비교적 낮았다.

3. 오가피 추출물의 유리라디칼 소거활성능을 측정한 결과, 잎의 경우, α-tocopherol과 대등할 정도의 우수한 항산화능을 보였으며, 뿌리 및 줄기의 경우에도 우수한 항산화활성을 보였다. 그러나 열매 추출물의 경우에는 자유 라디칼 소거 활성이 비교적 낮았다.

4. 세포의 H₂O₂의 생성억제 정도를 측정한 결과, 오가피 추출물의 처리에 의해 H₂O₂의 생성이 감소하였으며, 잎과 뿌리 추출물에 의해 과산화지질의 생성이 거의 정상수준으로 회복되었다.

5. 오가피의 부위별 물 추출물이 세포 내의 SOD 및 catalase의 활성에 미치는 영향을 확인한 결과, 포도당의 처리에 의하여 세포 내 SOD의 활성이 감소하였으며, 오가피 추출물에 의하여 효소활성이 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다. 또한, catalase의 경우에도 추출물에 의하여 효소활성이 유의성 있게 증가하였다.

이상으로 항산화활성 검색을 통하여 흰털오가피 부위별 추출물 대부분이 우수한 항산화활성을 보였으며, 특히, 열매 및 줄기 추출물보다 잎 및 뿌리 추출물의 경우에 더 우수한 항산화 활성을 갖고 있는 것을 알 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 2005년도 서울여자대학교 바롬학술연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Fridovich, I. : Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 1 (1986).
- 2) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (ed.) : *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed., Clarendon Press, Oxford p. 1 (1989).
- 3) Harman, D. : Free radical theory of aging: Role of free radicals in the origination and evolution of life, aging, and disease processes, p. 3. In Johnson, Jr., J. E. R. Harmon W. D. and Miquel J. (eds.), *Free radicals, aging and degenerative disease*, Alan R. Liss, New York (1986).
- 4) Adelson, R., Saul R. L. and Ames B. N. : Oxidative damage to DNA; Relation to species metabolic and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2706 (1988).
- 5) Fridovich, I. : Superoxide radical; An endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**, 239 (1983).
- 6) Halliwell, B and Hoult J. R. S. : Oxidants, inflammatory and anti-inflammatory drugs. *FASEB J.* **2**, 2867 (1988).
- 7) Halliwell, B. : Oxidant and human disease; Some new concepts. *FASEB J.* **1**, 358 (1987).
- 8) Johnson, K. J., Rehan, A. and Ward, P. A. : The role of oxygen radicals in kidney disease. In Halliwell, B. (ed.), *Proceedings of the Upjohn Symposium on oxidants and Disease*. Allen Press, Kansas (1988).
- 9) Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D. and Lemasters, J. J. : Mechanism of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* **65**, 166 (2002).
- 10) Fukazawa, K. and Takaishi, Y. : Antioxidants. *J. Act. Oxyg. Free Rad.* **1**, 55 (1990).
- 11) Enesco, H. and Verdone, S. C. : α-Tocopherol increases life span in the rotifer *Philodina*. *Exp. Gerontol.* **15**, 335 (1980).
- 12) Frei, B., Stocker, R. and Ames, B. N. : Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9748 (1988).
- 13) Bindolo, A., Cavallini, L. and Siliprandi, N. : Inhibitory action of silymarin of lipid peroxide formation in rat mitochondria and microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 2405 (1977).
- 14) Hatano, T., Yasuhara, T., Yoshihara, R., Agata, I., Noro, T. and Okuda, T. : Effects of interaction of tannins with co-existing substances. VII. Inhibitory effects of tannins and related polyphenols on xanthine oxidase. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 1224 (1990).
- 15) Hou, J. D., Lambert, K. V. C. and Yang, C. S. : Effects of tea polyphenols on signal transduction pathways related to cancer chemoprevention. *Mutation Res.* **555**, 3 (2004).
- 16) Wei, Q. Y., Zhou, B., Cai, Y. J., Yang, L. and Liu, Z. L. : Synergistic effect of green tea polyphenols with trolox on free radical-induced oxidative DNA damage. *Food Chem.* **96**, 90 (2006).
- 17) Fukumoto, L. R. and Mazza, G. : Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3597 (2000).
- 18) Lee, S. H., Kim, B. K. and Shin, K. H. : Phytochemical constituents from the fruits of *Acanthopanax sessiliflorus*. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 280 (2002).
- 19) Shin, C. L. : Study on chemical constituents in *Acanthopanax senticosus* Harms. *Chin Pharm Bull.* **16**, 53 (1981).
- 20) Lee, S. H., Kim, B. K., Cho, S. H. and Shin, K. H. : Phytochemical constituents from the fruits *Acanthopanax sessiliflorus*. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 280 (2002).

- 21) Kim, Y. H., Chung, B. S. and Sankawa, U. : Pimaradine diterpenes from *Acanthopanax koreanum*. *J. Nat. Prod.* **51**, 1080 (1988).
- 22) Kim, J. Y. and Yang, K. S. : Screening of antioxidant activity of *Acanthopanax* species *in vitro*. *Yakhak Hoeji* **47**, 361 (2003).
- 23) Kim, J. Y. and Yang, K. S. : Antioxidative activities of triterpenoids and lignans from *Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus*. *Yakhak Hoeji* **48**, 236 (2004).
- 24) Kang, H. S., Kim, Y. H., Lee, C. S., Lee, J. J., Choi, I. and Pyun, K. H. : Suppression of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α production by acanthoic acid, (-)-pimara-9(11),15-dien-19-oic acid and its antifibrotic effects *in vivo*. *Cellular Immunol.* **170**, 212 (1996).
- 25) Kim, J. A., Kim, D. K., Tae, J., Kang, O. H., Choi, Y. A., Choi, S. C., Kim, T. H., Nah, Y. H., Choi, S. J., Kim, Y. H., Bae K. H. and Lee, Y. M. : Acanthoic acid inhibits IL-8 production via MAPKs and NF- κ B in a TNF- α -stimulated human intestinal epithelial cell line. *Clinica Chimica Acta* **342**, 1922 (2004).
- 26) Inkeda, N. and Fukuzume, K. : Tocopherols as anti-oxidants in oxidation of methyl linolate. *J. Japan Oil Chem. Soc.* **26**, 343 (1977).
- 27) Beauchamp, C. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase; Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276 (1971).
- 28) Abei H. : Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* **105**, 93 (1984).
- 29) Tolmasoff, J. M., Ono, T. and Culter, R. G. : Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2777 (1980).