

산화적 스트레스에 대한 섬오갈피 메탄올 추출물의 보호 효과

이상은 · 손동욱¹ · 윤여필 · 이상윤 · 이범종² · 이상현^{3*}

폴무원 식문화연구원, ¹KT&G 중앙연구원 인삼연구소,
²인제대학교 바이오헬스소재연구센터, ³중앙대학교 산업과학대학 식물응용과학과

Protective Effects of the Methanol Extracts of *Acanthopanax koreanum* against Oxidative Stress

Sang Eun Lee, Dongwook Son¹, Year Pill Yoon, Sang Yun Lee, Burm-Jong Lee², and Sanghyun Lee^{3*}

Institute of Food & Culture, R&D Center for Functional Food, Pulmuone Co. Ltd., Seoul 120-600, Korea

¹KT&G Central Research Institute, Daejeon 305-805, Korea

²Biohealth Products Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

³Department of Applied Plant Science, College of Industrial Science, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

Abstract – The protective effects of the aqueous MeOH extracts of stem and root of *Acanthopanax koreanum* Nakai against oxidative stress were investigated. Anti-oxidant activity of the stem extract of *A. koreanum* was observed in the DPPH free radical scavenging ($IC_{50} = 58.7 \mu\text{g/ml}$) and the SOD test ($IC_{50} = 17.52 \mu\text{g/ml}$). According to data analysis of cell survival ratio of normal fibroblasts, the skin irritation by both extracts from *A. koreanum* was concerned. However, in the skin primary patch test, both extracts obtained Grade I, which means that there was no skin irritation. After induction of oxidative irritation, cell survival ratio of normal fibroblasts was also monitored and it turned out that stress-inducing group with both extracts had more increased cell survival ratio. The cell extension of the stress-inducing group treated with the stem extract was the most dominant in morphological study. Based on these results, the stem extract of *A. koreanum* showed the protective effect against oxidative stress on normal fibroblasts.

Key words – *Acanthopanax koreanum*, Araliaceae, fibroblast, DPPH, SOD, oxidative stress

섬오갈피(*Acanthopanax koreanum* Nakai)는 인삼과 같은 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 낙엽성 활엽관목으로 제주 지역에 자생하는 특산 약용식물이다. 우리나라에서 자생하고 있는 *Acanthopanax* 속 식물로는 *A. koreanum*을 비롯하여 10종 3품종이 있다.^{1,2)} 이들 중 섬오갈피는 해발 500 m 아래의 제주도 전역에 분포하고 있고, 실생 또는 삽목 번식이 쉬운 식물이다. 우리나라에서는 *Acanthopanax* 속 식물의 근피와 수피를 오갈피라고 하여 한약재로 사용되어 왔다.

섬오갈피 나무의 성분연구로는 lignan 배당체인 syringaresinol diglycoside,³⁾ acanthoside D, syringoside,⁴⁾ eleutheroside B 및 eleutheroside E,⁵⁾ faltarindol, methyl *n*-hexacosanoate, coniferin,⁶⁾ pimaradiene diterpene⁷⁾ 및 sumogaside⁸⁾ 등이 보고 되어 있다.

향장산업의 발달과 더불어 향장 신소재 개발에 대한 산업적 중요성이 부각됨에 따라 기능성 신소재 연구 개발이 활발해지고 있다. 특히 천연물을 이용한 향장소재 연구는 기능성 화장품 원료개발에 활용되어 국제적으로도 우리 고유의 경쟁력을 확보할 수 있는 부분이다. 최근 수입에 의존하는 오갈피인 가시오갈피의 경우 여러 생리 활성에 대하여 보고^{9,12)} 된 반면 국내 자생하는 오갈피인 섬오갈피에 대해서는 많은 연구가 이루어지지 않은 실정이다. 가시오갈피의 경우 미용 효능이 이미 널리 알려져, ICID(International Cosmetic Ingredient Dictionary)에 수재되어 화장품 소재로 사용되고 있다. 특히, 여러 오갈피 중에서 항산화활성을 가지는 eleutheroside B가 가시오갈피(*A. senticosus*)와 섬오갈피(*A. koreanum*)에 존재하는 것이 보고 된 바 있다.¹³⁾ 따라서 본 연구는 섬오갈피의 뿌리와 줄기 추출물의 산화적 스트레스에 대한 보호효과에 대해 살펴보고자 하였다.

*교신저자(E-mail) : slee@cau.ac.kr
(FAX) : 031-676-4686

재료 및 방법

실험재료 - 섬오갈피(*A. koreanum* Nakai)는 제주도 탐라야채마을 영농조합법인에서 구입하여 사용하였으며, 사람 정상 섬유아세포는 경기도 부천시 중동 비뇨기과의원에서 환자의 동의 하에 포경 수술시 폐기되는 포피 조직을 적출 직후 4°C DMEM 배지에 보관된 상태로 3시간 이내에 공급받아 세포를 분리하여 사용하였다.

시약 - DPPH, SOD, MTT, DMSO 등은 Sigma사의 제품을, SOD assay kit은 Dojindo사(일본) 제품을, 기타 용매는 덕산과학의 제품을 사용하였고, 세포 배양 시 사용된 DMEM, F12 nutrient mixture, keratinocyte SFM, FBS, antibiotics, Dispase는 Gibco사의 제품을 사용하였다. 기타 세포배양에 필요한 기구는 Falcon사의 제품을 사용하였다.

섬오갈피 추출 - 섬오갈피의 줄기와 뿌리를 완전히 건조한 후 건조중량(각 10 g)에 대하여 추출용매 80% MeOH을 10배 부피량 가한다음 실온에서 7일간 3회 반복 냉침 추출하였다. 각각의 추출액은 감압 농축한 후 동결 건조하여 얻어진 추출물(줄기 0.59 g, 뿌리 1.71 g)을 시료로 사용하였다.

DPPH Free Radical Scavenging 효과 - 시료를 각 농도별로 조제한 용액 20 µl(MeOH)에 0.2 mM DPPH 용액(MeOH) 180 µl을 가하였다. Voltex mixer로 10초간 진탕 후 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조물로는 L-ascorbic acid를 조제하여 측정하였다.¹⁴⁾

Super Oxide Dismutase (SOD) 활성 측정 - 시료를 각 농도별로 조제한 다음 Dojindo사의 SOD assay kit-WST를 이용하여 Dojindo사에서 제공하는 사용법에 따라 측정하였다. 반응 후 spectrophotometer를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

SOD activity (inhibition rate %)

$$= \left(\frac{\text{Control OD} - \text{Sample OD}}{\text{Control OD}} \times 100 \right)$$

인체 피부 일차 세포의 분리 및 배양 - 포피조직의 표피와 진피를 분리 후, 진피에서 섬유아세포를 분리하여 형태를 확인하였다. 확인된 섬유아세포(Human diploid fibroblasts, HDFs)를 DMEM/F12(3:1) 배지에 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 가하여 25 cm² 조직 배양 flask 내에서 배양기 내부 공기 5% CO₂ 농도로 37°C에서 3-5일간 안정화하였다. 안정화 후 trypsin-EDTA 용액을 처리하여 계대배양하였으며, 초기 계대세포(passage 3)를 사용하였다.

Human Diploid Fibroblasts (HDFs)의 세포 생존율 - 96-well plate에 HDFs를 1.5 × 10⁴개/well씩 접종하여 24시간 배양한 후, 섬오갈피 추출액의 최종 농도가 각각 0.01, 0.1, 1 mg/ml 되도록 가하여 DMEM/F12 배지에서 72시간

배양하였다. MTT 용액 50 µl(5 mg/ml)씩 첨가하고 4시간 후 원심 분리하여 상등액을 제거하고 DMSO 50 µl씩 첨가한 후 570 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 세포생존율(%)은 다음과 같은 식으로 계산하여 나타내었다.

Cell viability (%)

$$= 100 - \left(\frac{\text{Control OD} - \text{Sample OD}}{\text{Control OD}} \times 100 \right)$$

인체 피부 일차 자극 실험 - 상기 시험은 인체 피부 일차 자극 시험으로 인체 첩포시험(human patch test)으로 하였다. 건강한 20-30대 여성 20명을 대상으로 CTFA 가이드라인(The Cosmetic Toiletry and Fragrance Association, Safety Testing Guideline)에 따라 실시하였다.¹⁵⁾ 핀 챔버(Finn Chamber)에 준비된 섬오갈피 추출물(0.01, 0.1%) 각각을 20 µl을 적하 시킨 후 시험부위인 우측 상완 내측에 첩포 검사를 실시하였다. 첩포는 24시간 폐쇄포한 후 첩포를 제거하여 펜으로 시험부위를 표시하여 30분, 24시간, 48시간 후에 각 시험 부위의 피부반응을 관찰하여 국제 접촉 피부염 연구회(International Contact Dermatitis Research Group; ICDRG)의 규정에 따라 판정하였다.

Mean Score

$$= \left(\frac{\text{Grade score} * \text{No. of responses} \times 100 \times 1/3}{3(\text{Maximum grade}) \times 20(\text{Total subjects})} \right)$$

*Grade score of examination results with the naked eye

Grade score	Degree of reaction
- 0	No reaction
± 0.5	Weak positive reaction (erythema)
+ 1	Moderate positive reaction (erythema)
++ 2	Strong positive reaction (erythema, edema)
+++ 3	Severe positive reaction (erythema, edema, vesicles)

HDFs의 Oxidative Stress 유도 후 세포 생존율 및 세포 형태학적 관찰 - HDFs의 경우 96-well plate에 대수증식기 1.5 × 10⁴개/well씩 접종하여 24시간 배양하여 안정화하였다. 여기에 1 mM H₂O₂를 2시간 처리하여 산화적 스트레스 조건을 유도하였다. 그 후 혈청이 포함되지 않으면서 섬오갈피 추출액(0.1 mg/ml)을 함유하는 DMEM/F12 배지에서 48시간 배양하였다. 세포 생존율의 분석은 앞선 실험과 동일하였으며 이미지 분석은 Leica Qwin Image Processing & Analysis System으로 세포 형태를 관찰하였다.

Data 분석 - 실험은 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 mean ± S.E로 표시하였으며, Student's *t*-test를 시행하여 *p*<0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

DPPH Free Radical Scavenging 효과 - DPPH는 free radical의 안정된 모델로, DPPH의 감소는 반응 중 유리기의 소거반응이 진행되는 이미 보고 되었다.¹⁶⁾ 섬오갈피의 줄기와 뿌리 추출물에 대한 항산화능의 정도를 DPPH에 대한 전자공여능(electron donating ability, EDA %)으로 측정하여 대조군의 흡광도(control O.D)를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 양(IC₅₀)을 측정하였다. 섬오갈피의 줄기 및 뿌리 추출물의 DPPH 소거능력에 대한 IC₅₀은 각각 58.7 µg/m과 433.9 µg/m이었다. 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid는 IC₅₀이 17.6 µg/m으로 이들 추출물들은 대조군에 비해 radical 소거능력이 낮았다. 하지만, 섬오갈피 추출물의 free radical 소거능력은 뿌리보다 줄기에서 보다 효과적임을 알 수 있었다. 이는 가시오갈피에서도 부위별 및 추출방법에 따라 유효성분의 차이가 있으며, free radical 소거능력은 물 추출물보다 알콜 추출물이 뿌리보다는 줄기가 효과적임을 보고한 결과¹⁷⁾와도 유사한 결과이다. 섬오갈피를 부위별로 냉침으로 메탄올 추출한 수율은 줄기(5.9%)보다 뿌리(17.1%)에서 획득률이 높았다.

Eleutheroside B는 오갈피의 유효 성분으로 잘 알려져 있으며 스트레스와 면역 활성화에 우수한 물질로 보고 되고 있다.¹⁸⁾ 가시오갈피와 섬오갈피 두 종 모두 뿌리보다 줄기에서 높은 함량으로 보고 되었으며,¹³⁾ 최근 가시오갈피에서 분리한 eleutheroside B의 항산화 활성이 보고 된 바 있다.¹⁹⁾

SOD 항산화 효소 활성 측정 - SOD(EC 1.15.1.1)는 생체에 매우 유해한 superoxide anion radical과 반응하여 과산화수소(H₂O₂)를 생성하는 효소로 산소를 소비하는 모든 생물 중에 존재하여 생체 내에서 활성산소 장해에 대한 방어 작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제이다.^{20,21)} 섬오갈피의 줄기와 뿌리 추출물을 사용하여 SOD 활성을 측정해 본 결과 농도 의존적으로 나타났으며 줄기 추출물에서 17.52 µg/ml, 뿌리 추출물에서 146.54 µg/ml의 IC₅₀ 값을 각각 나타내었다(Fig. 1).

SOD 활성저해는 뿌리에서 보다는 줄기에서 높았으며, 특히 줄기 추출물에서 매우 우수한 활성을 나타내었다. SOD는 상업적으로 매우 중요한 효소로서 화장품의 첨가제로 사용되고 있으며 류머티즘, 관절염 등 각종 퇴행성 질병 치료제로 개발되고 있다. 또한 각종 약용 식물 스크리닝 및 형질전환 식물체의 육종을 통해 내성 증가 시키는 연구 등 SOD 관련 연구가 활발히 진행되고 있다. 이로써 볼 때 섬오갈피 줄기 추출물의 SOD 활성에 대한 *in vitro* 결과에 대한 연구가 기대된다.

HDFs의 세포 생존율 - 섬오갈피 줄기와 뿌리 추출물이 HDFs의 세포독성 및 생존에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 섬오갈피

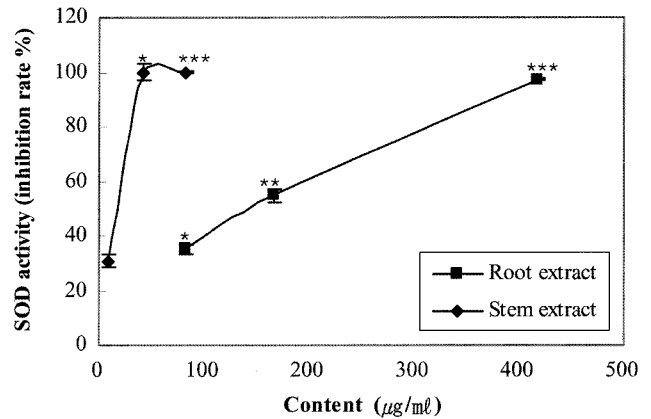


Fig. 1. SOD activity of *A. koreanum* extracts. Results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. **p*<0.05, ***p*<0.01 and ****p*<0.001 compared with the control group by Student's *t*-test.

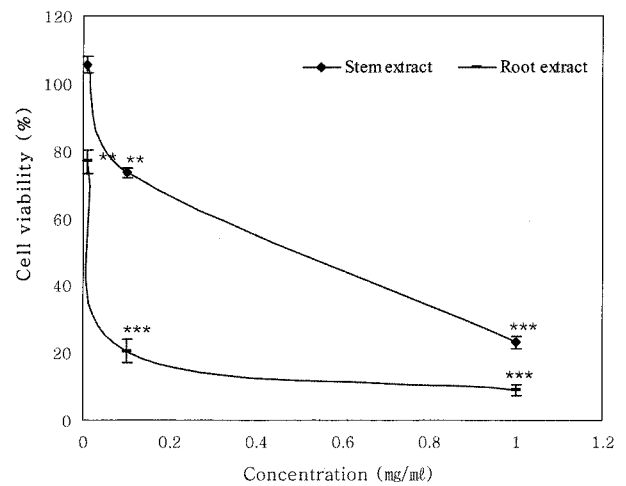


Fig. 2. Effect of *A. koreanum* extracts on the cell viability of human normal diploid fibroblasts. Results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ***p*<0.01 and ****p*<0.001 compared with the control group by Student's *t*-test.

줄기 추출물의 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml에서 105.8 ± 3.6%와 73.55 ± 3.3%의 세포 생존율을, 뿌리 추출물 0.01 mg/ml에서 76.86 ± 2.47%의 세포 생존율을 나타내어, 줄기의 추출물이 뿌리 추출물에 비하여 세포독성이 약함을 알 수 있었다.

인체 피부 일차 자극 실험 - 섬오갈피 줄기와 뿌리 추출물의 인체 피부 일차 자극 실험을 수행하였다. 일반적으로 인체 첩포시험은 피부 일차자극을 평가하는 방법으로 통상 홍반, 부종, 수포 등의 유발 정도를 평가한다. 피부 일차 자극 정도는 Mean score의 수치에 따라 크게 5개의 grade [0-0.75(Grade I, no irritation), 0.76-1.50(Grade II, slight irritation), 1.51-2.50(Grade III, moderate irritation), 2.51-5.00(Grade IV, strong irritation), 5.00-(Grade V, severe

Table I. Skin primary patch test of *A. koreanum* extracts

Preservative		No. of response									Mean score (n = 20)	Grade
		30 min			24 hr			48 hr				
		±	+	++	±	+	++	±	+	++		
Stem extract	0.01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	Grade I
	0.1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	Grade I
Root extract	0.01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	Grade I
	0.1%	2	-	-	-	-	-	-	-	-	0.56	Grade I

irritation)]로 나누어 평가하였다. 인체 피부 일차 자극 시험을 수행한 결과를 Table I에서 보듯이 섬오갈피의 뿌리 추출물에서 피험자 2명에게서 의양성이 보였으나, 24시간 후 자극을 관찰할 수 없었다. ICDRG의 판정 기준에 따라 피부 자극 유발 가능성의 평가를 계산식으로부터 계산한 결과 줄기 및 뿌리 추출물 각각 0.01%와 0.1%에서 피부 일차 자극 정도가 모두 Grade I으로 줄기 및 뿌리 추출물 모두 피부에 자극이 없을 것으로 판단된다. 또한, 세포 생존율 결과 비교에서 뿌리 추출물에서 보다 낮은 세포 독성을 나타내었던 줄기 추출물의 경우 인체 첩포 시험의 결과도 마찬가지로 보다 낮은 평균값을 나타내었다.

HDFs의 Oxidative Stress 유도 후 세포 생존율 및 형태학적 관찰 - 각종 환경스트레스를 받으면 생체내의 산소는 유해한 O₂⁻, H₂O₂, 'OH 등으로 변환되는데 이러한 스트레스 하에서 사람의 정상 피부 세포에 대한 섬오갈피 추출물의 효능을 관찰해 보고자 세포 생존율과 형태학적 관찰을 하였다(Fig. 3). 그 결과 HDFs의 세포 생존율은 H₂O₂ 단독 처리군에 비해 H₂O₂ 처리 후 섬오갈피 줄기 추출물(0.1 mg/ml) 처리군에서 24% 정도 증가하였음을 알 수 있었다. 뿌리 추출물의 경우 줄기 추출물(0.1 mg/ml)보다는 약하지만 15% 정도 증가하였다. 형태학적 관찰의 경우에 있어서도 H₂O₂ 단독 처리군 < 뿌리 추출물 < 줄기 추출물의 순으로 세포 활착 면에서 다소 우세함이 관찰하였다. 이는 피부에서 유래된 HDFs에서 섬오갈피의 추출물이 산화적 스트레스에 대해 세포 보호 효과가 있음을 시사한다.

결 론

국내 민간에서는 널리 생약재로 이용되고 있으나 아직 과학적인 자료가 미약한 소재인 섬오갈피 줄기 추출물은 *in vitro* 하에서 우수한 항산화 활성을 나타내었다. 또한, 정상 피부에서 유래된 HDFs의 세포 생존율과 인간 피부 일차 자극 실험을 통해 섬오갈피 추출물의 피부에 대한 안전성을 확인하였다. 더 나아가 정상 피부 섬유아세포에서 섬오갈피의 추출물이 산화적 스트레스에 대하여 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 이를 이용한 성분 및 기전 규명 등을 통해 더 많은 연구가 뒷받침된다면 새로운 항장 소재로서의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

사 사

사람 정상 피부 세포를 일차 배양 할 수 있도록 포피조직을 제공하여주신 중동 비뇨기과의원 홍두선 박사님께 감사드립니다.

인용문헌

1. Yook, C. S., Shin, M. C., Park, S. Y., Nam, J. Y., Lee, K. S.,

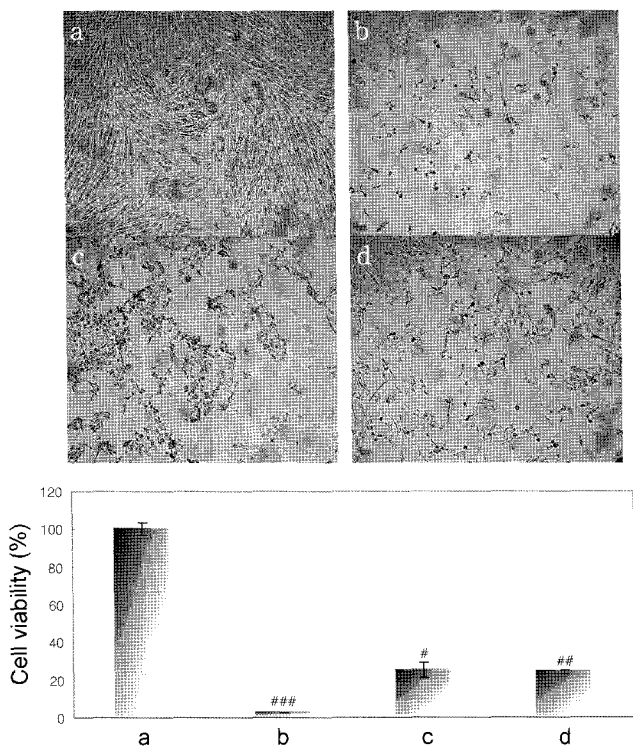


Fig. 3. Effects of *A. koreanum* extract on the oxidative stress. Results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. #*p*<0.05, ##*p*<0.01 and ###*p*<0.001 compared with the control group by Student's *t*-test. **a:** Non-treated, **b:** Only treated H₂O₂, **c** and **d:** After H₂O₂ treated, *A. koreanum* stem and root extracts (0.1 mg/ml) treated, respectively.

- Han, D. R., Seong, B. W. and Lee, W. T. (1994) Studies on morphological and chemotaxonomy and seco-triterpene glycoside component of Korean *Acanthopanax* spp. *Bull. D. S. Pharm. Sci. Inst.* **11**: 1-66.
2. Lee, W. T. (1979) Distribution of *Acanthopanax* plant in Korea. *Kor. J. Pharmacogn.* **10**: 103-107.
 3. Kim, Y. H., Chung, B. S. and Kim, H. J. (1985) Studies on the constituents of *Acanthopanax koreanum* Nakai (I). *Kor. J. Pharmacogn.* **16**: 151-154.
 4. Hahn, D. R., Kim, C. J. and Kim, J. H. (1985) A study on the chemical constituents of *Acanthopanax koreanum* and its pharmacobiological activities. *Yakhak Hoeji* **29**: 357-361.
 5. Chung, B. S. and Kim, Y. H. (1986) Studies on the constituents of *Acanthopanax koreanum*. *Kor. J. Pharmacogn.* **17**: 62-66.
 6. Kim, Y. H., Chung, B. S., Ko, Y. S. and Han, H. J. (1988) Studies on the chemical constituents of *Acanthopanax koreanum*. *Arch. Pharm. Res.* **11**: 159-162.
 7. Kim, Y. H., Chung, B. S. and Sankawa, U. (1988) Pimaradiene diterpenes from *Acanthopanax koreanum*. *J. Nat. Prod.* **51**: 1080-1082.
 8. Kim, Y. H., Ryu, J. H. and Chung, B. S. (1990) Diterpene glycoside from *Acanthopanax koreanum*. *Kor. J. Pharmacogn.* **21**: 49-51.
 9. Lee, S., Shin, D., Oh, K. and Shin, K. (2003) Antibacterial compounds from the leaves of *Acanthopanax senticosus*. *Arch. Pharm. Res.* **26**: 40-42.
 10. Jin, L., Han, S. and Choi, Y. (2002) Antioxidant effects of the extracts of *Acanthopanax senticosus*. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**: 359-363.
 11. Park, J., Ahn, B., Koh, H. and Choi, D. (2003) Inhibitory effect of methanol extract of *Eleutherococcus senticosus* Maxim. on the direct mutagen mutagenicity. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**: 217-221.
 12. Jun, Y., Cui C., Lee, H., Moon, S., Lee, D. and Ham, S. (2003) Antimutagenic and cytotoxicity effects of extracts of *Eleutherococcus senticosus* Maxim. fruits. *Kor. J. Food Preservation* **10**: 394-400.
 13. Kang, J. S., Linh, P. T., Cai, X. F., Kim, H. S., Lee, J. J. and Kim, Y. H. (2001) Quantitative determination of eleutherosides B and E from *Acanthopanax* species by high performance liquid chromatography. *Arch. Pharm. Res.* **24**: 407-411.
 14. Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G. I. and Nishioka, I. (1998) Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem. Pharmacol.* **56**: 213-222.
 15. CTFA safety Testing Guideline (1991) The cosmetic, toiletry and fragrance association, Inc. Washington, D. C. 20023.
 16. Kim, J. Y. and Yang, K. S. (2003) Screening of antioxidant activity of *Acanthopanax* species *in vitro*. *Yakhak Hoeji* **47**: 361-364.
 17. Jwa, C. S., Yang, Y. T. and Koh, J. S. (2000) Changes in free sugar, organic acids, free amino acids and minerals by harvest time and parts of *Acanthopanax koreanum*. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotech.* **43**: 106-109.
 18. Brekhman, I. I. and Dadyomov, I. V. (1969) New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Ann. Rev. Pharmacol.* **9**: 419-430.
 19. Lee, S., Son, D., Ryu, J., Lee, Y. S., Jung, S. H., Kang, J., Lee, S. Y., Kim, H. S. and Shin, K. H. (2004) Anti-oxidant activities of *Acanthopanax senticosus* stems and their lignan components. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 106-110.
 20. Lim, J. D., Yu, C. Y., Kim, M. J., Yun S. J., Lee, S. J., Kim, N. Y. and Chung, I. M. (2004) Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal products. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **12**: 191-202.
 21. Baehner, R. L., Murrmann, S. K., Davis, J. and Johnston, R. B. Jr. (1975) The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in phagocytosis-associated oxidative metabolic reactions. *J. Clin. Invest.* **56**: 571-576.

(2006년 1월 3일 접수)