KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 39, No. 6, pp. 694~700 (2007)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

가시오가피 추출물의 항산화활성 및 MG-63 조골세포 증식과 alkaline phosphatase 활성에 미치는 효과

임소영 · 임재윤[1] · 이충수[1] · 장여정 · 박정우 · 윤 선*
연세대학교 식품영양학과, [1]우석대학교 약학대학

Antioxidant and Cell Proliferation Effects of *Acanthopanax senticosus* Extract in Human Osteoblast-like MG-63 Cell Line

Soyoung Lim, Jae-Yoon Leem[1], Choong-Soo Lee[1], Yu-Jung Jang, Jeong-Woo Park, and Sun Yoon*
Department of Food and Nutrition, Yonsei University
[1]College of Pharmacy, Woosuk University

Abstract *Acanthopanax senticosus* is a common Asian herb also known as "Siberian Ginseng". It is often used as a traditional herbal medicine for reducing damage in the liver, kidney, bone and muscle. In the present study we investigated the ferric reducing/antioxidant power and total phenolic contents of the ethanol-/water-extracts obtained from the stems and leaves of *Acanthopanax senticosus*. Osteoblast cellular proliferation was evaluated using the MTT and alkaline phosphatase activity assays in the human osteoblast-like MG-63 cell line. *Acanthopanax senticosus* extracts exerted remarkable ferric reducing/antioxidant power and contained high amount of phenolics. Among the extracts the stem-/ethanol-extract showed the highest antioxidant activity and total phenol content. Interestingly a highly positive correlation was found between antioxidant activity and total phenol content ($p < 0.01$). Proliferation of MG-63 osteoblast cells was highest in the stem-/ethanol-extract and alkaline phosphatase activity significantly increased in the water-extract of the stems ($p < 0.05$). These findings suggest that *Acanthopanax senticosus* extracts have antioxidant activity for preventing oxidative stress-related diseases and may have beneficial effects on bone health through the proliferation of osteoblast cells.

Key words: *Acanthopanax senticosus*, antioxidative activity, total phenol content, human osteoblast-like MG-63 cell line, alkaline phosphatase activity

서 론

오가피 또는 가시오가피(*Acanthopanax senticosus* Harms, *Eleutherocosis maxim*)는 한반도와 시베리아 및 중국의 고지대에 자생하는 Araliaceae에 속하는 다년생 낙엽관목으로서 내건성 및 내한성 식물이다. 예로부터 오가피 속 식물의 뿌리와 줄기를 생약에서 오가피(*Acanthopanacis Cortex* Radicis)라 하며, 동의보감을 위시한 한약 집성방, 신농본초경 및 본초강목에 이르기까지 고전 한의서에 오가피의 약리 효능이 탁월한 것으로 기록되어 있다(1). 오가피는 고전에 따르면 발산, 구풍작용 등의 대사 촉진제로 이용되어져 왔고, 음위, 강장, 강정, 진경, 근골동통, 산기복통, 요슬동통 등에 유효한 약물로 알려져 있다(2).

일명 "시베리아 인삼"이라고 불리는 가시오가피는 강장제로서 기관지 천식 치료, 체력 증진, 근골격 증진, 항암, 항노화, 항피로, 그리고 인삼에 버금가는 신진대사 작용(adaptogenic activity)(3)이 있다고 알려져 있다. 우리나라를 비롯한 동양에서 주로 강장, 강정, 신경통, 중풍, 고혈압, 당뇨병 및 노인성 질환을 위한 귀중한 한약재의 하나로 사용되고 있다(4). 1969년 Brekhmann 등(6)에 의해 오가피의 뿌리에서 lignan계 배당체의 분리와 그 생리적 활성에 대한 연구가 시작되었으며, 특히 Brekhmann 등이 가시오가피에 adaptogen으로서 효능이 있음을 주창한 이래 인삼과 함께 국내외적으로 중요한 약용식물로서 연구 대상이 되고 있다. 중추신경계에 대해서 진정, 흥분의 양면성을 나타내어, 인삼과 같이 adaptogen의 성격을 보이지만, 그 작용기전이 인삼과 상이한 것으로 보고되었다(5).

가시오가피 나무의 근피나 줄기에서 수많은 유효성분들이 분리된 바 있으며, 이 성분들의 생리적 활성 연구도 많이 수행되고 있다. 오가피의 생리적 활성에 대한 연구가 이루어진 후부터 오가피의 항암작용(6), 항피로효과(5) 등에 대한 각종 연구가 보고되어 많은 관심이 집중되고 있으며, 실제로 임상에서는 류마토이드 관절염에 사용하고 있다.

한국산 오가피류의 효능에 대해서는 간 해독 작용, 동물의 생명연장, 대사촉진, 단백질 합성 촉진 등이 보고되었으며 지리오가피 나무에서 얻은 배당체에 관한 실험에서 항 histamine 작용, 항당뇨 작용, 해독작용 등의 생리활성을 보고하였다. 또한 최근 오가피의 항암작용, 수명연장시험, 항피로효과 등에 대한 각종 연구가 보고되어 많은 관심이 집중되고 있다. 특히, 오가피 효능성분의 일종인 eleutheroside E에 대한 생체 효능 실험 보고에 의하면 항암작용(7), T세포 증가(8), 정력증대, 학습력 향상, 위궤양 억

*Corresponding author: Sun Yoon, Department of Food and Nutrition, Yonsei University, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul, Korea
Tel: 82-2-2123-3119
Fax: 82-2-365-3118
E-mail: snkim@yonsei.ac.kr
Received July 7, 2007; accepted October 16, 2007

제(9) 등이 밝혀졌고, chiisanoside는 혈당저하(10), 항암 효과(11) 등의 효능이 확인되었다.

오가피의 항산화 작용에 대해서도 계속 보고되고 있는데, 항산화 작용은 암, 면역기능 저하, 혈관계 질환, 노화의 발생이나 진행의 주요 촉진 인자로 생체 내에 존재하는 free radical의 관련과 이에 중재되어지는 작용 기작이 오래 전부터 알려져 왔으며, 항산화제는 체내의 free radical을 소거함으로써 이와 관련된 질병 예방에 이용될 수 있는 것으로 사료되고 있다. 따라서 항산화 활성의 측정은 암이나 노화의 진행을 억제할 수 있는 천연물질의 규명에 이용될 수 있다(12).

골다공증은 동일 연령과 성별의 정상인에 비하여 골 밀도가 현저하게 감소된 상태로서(13), 어떠한 연령층에서도 발생할 수 있으나 남성과 여성 모두 노화과정에서 파골세포 작용의 증가로 인하여 유병률이 증가하며, 특히 여성의 경우 폐경 이후에 여성 호르몬인 에스트로겐 분비의 감소에 의해 골밀도의 감소 현상이 더욱 심하여 골다공증에 대한 발병률이 남성보다 현저히 높은 것으로 알려져 있어, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(14-17).

최근에는 에스트로겐 투여에 의한 위험성을 보완하기 위해 한약재 및 식품 등 천연물의 활성 성분을 이용한 대체 요법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(18-23). 폐경기 골다공증 예방 및 치료를 위한 대표적인 대체 요법으로 이소플라본(isoflavone)과 같은 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)의 경구 투여 또는 이를 다량 함유하고 있는 식품의 섭취가 시도되고 있다. 또한 서양에서는 이소플라본의 생리작용을 규명하고 이와 더불어 골다공증 환자들에게 이소플라본을 보충식으로 급여해야 한다는 주장이 현실화되고 있다(18,19).

그러나 오가피의 골다공증 예방효능에 관한 연구는 거의 이루어지지 않은 실정이며, 그 작용 기전 또한 밝혀진 바가 없다. 한의학 전통문헌과 임상경험을 바탕으로 효과적인 골다공증 예방 후보한약을 검색하여 오가피를 찾을 수 있었다. 또한, Yang 등(24)은 가시오가피가 함유된 성장 촉진용 조성물의 골성장 효과 연구의 결과 오가피가 골무기질 밀도를 증가시키는 효과를 가지며 성장 촉진 및 골 강화에 응용할 수 있는 소재로 개발 가능성이 있음을 제시하였다. 따라서 오가피를 이용하여 우수한 골다공증 예방용 건강기능식품의 개발이 가능할 것이라고 생각된다. 이에 본 연구에서는 가시오가피 추출물의 추출 용매, 추출 부위(잎, 줄기) 및 산 가수분해 전처리에 따른 가시오가피 추출물의 항산화 활성을 알아보고, 각각의 가시오가피 추출물이 MG-63 조골세포 생존력과 증식률 및 alkaline phosphatase(ALP)활성을 측정하여 가시오가피 추출물이 조골세포 활성에 미치는 영향을 분석하였다. 이와 같은 연구를 통하여 오가피 추출물의 항산화 활성과 조골세포 증식 효능을 검증하여 골다공증 개선 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

가시오가피의 추출 및 시료 준비

강원도 양구의 농장에서 구입한 생지 가시오가피의 줄기와 잎을 분리하여 80°C에서 15시간 동안 열풍 건조하였다. 농가의 경우는 60°C에서 36시간 동안 건조하였다. 건조 후 오가피의 줄기와 잎의 중량은 각각 처음 중량의 1/2, 1/4 정도가 감소하였으며, 수분은 약 4% 정도였다. 건조된 가시오가피의 줄기 50 g과 잎 30 g에 각각 13배의 증류수 혹은 50% 에탄올을 첨가하여 90°C에서 8시간 동안 추출하였다. 추출물을 원심분리 하여 상등액을 취하고 filter(1 μm pore size)로 여과한 후 얻어진 여액을 동결건조하여 시료로 사용하였다. 추출물의 수득률은 SE(ethanol extract of stem), SW(water extract of stem)가 각각 2.8, 2.5%, LE(ethanol extract of leaf)와 LW(water extract of leaf)는 각각 16.2, 16.3%이었다.

위 과정으로 얻어진 줄기와 잎의 최종 추출물의 일부를 1 N HCl을 처리하여 100°C에서 2시간 동안 열 가수분해하였다. 가수분해가 끝나면 10 N NaOH로 시료를 중화시킨 후 glucose assay kit(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용한 glucose 정량을 통해 가수분해가 잘 되었는지 확인 후 본 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용한 Trolox((+/−)-6-hydroxy-2,5,6,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), gallic aicd, MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)와 glucose assay kit는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

가시오가피 추출물의 항산화 활성 및 총 페놀 함량

FRAP(ferric reducing ability of plasma) assay: FRAP 분석은 Benizie와 Strain(25)의 방법을 응용하여 가시오가피 시료 내 항산화력을 측정하였다. 이 방법은 colored ferrous tripyridyl triazine complex에 의해 ferric ion이 ferrous로 전환되어지는 과정을 분석함으로써 시료 내의 총 항산화력을 측정하는 방법이다. 사용되는 시약은 300 mM sodium acetate buffer(pH 3.6)와 2.4.6-tri(2-pyridyl)-1.3.5-triazine(TPTZ) reagent, 그리고 20 mM $FeCl_3$이다. TPTZ reagent는 10 mM의 TPTZ를 40 mM HCl에 용해시켰다. Acetate buffer, TPTZ reagent, $FeCl_3$ solution을 혼합하여(10 : 1 : 1) 37°C에서 10-15분간 incubation 시켜두었다. 이때 모든 시약 제조와 시료의 희석 시에는 Chelex-treated(2 g/L) de-ionized Milli-Q water를 사용하였다. Trolox standard는 10% methanol/water에 녹여 1 mM로 만들어 100 μL씩 분주하여 사용 전까지 −80°C에 저장해 두었다.

희석시킨 가시오가피 추출물과 pre-warmed working FRAP reagent를 96-well plate에 분주한 후 약 15분간 incubation 시키고 microplate reader를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 페놀 함량(Total polyphenol content) 측정: 가시오가피 추출물의 총 페놀 함량을 측정하기 위하여 Folin-Denis방법을 이용하였다. 가시오가피 추출 시료 용액 20 μL에 3차 증류수 1,200 μL을 첨가한 수 Folin & Ciocalteau's phenol reagent 100 μL을 넣고 잘 섞은 후 5분 동안 상온에서 반응시켰다. 혼합한 용액을 20% Na_2CO_3 용액 300 μL를 넣어 다시 혼합한 다음 380 μL의 증류수를 넣어 총 혼합액의 양을 2 mL로 정용하였다. 이 혼합 용액을 23°C에서 2시간 동안 방치시킨 후 760 nm에서 absorbance를 측정하였다. 측정된 흡광도는 gallic acid를 이용하여 작성된 표준곡선을 이용하여 검량선을 작성하여 총 페놀 함량을 계산하였다.

조골세포 활성에 미치는 영향

조골세포 배양(monolayer culture): 본 실험에 사용한 human osteoblast-like MG63 세포는 한국 세포주 은행(서울대학교 의과대학, Seoul, Korea)에서 분양받아 본 연구실에서 계대 배양하여 사용하였다. MG-63 human osteoblast 세포를 세포 배양 접시에 부착시키고 penicillin 및 streptomycin이 함유된 1% antibacterial-antifungal solution(Gibco, Grand Island, NY, USA)과 10% FBS (Gibco)를 첨가한 Phenol-red free DMEM(Gibco)을 사용하여 배양하였다. 배양액은 2-3일에 한번 씩 교체하며, 1 : 1로 희석한 Tryphan blue 용액과 반응하여 염색되지 않은 살아 있는 세포를 계수하였다. 배양 시 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 5% CO_2를 계속 공급하였다.

가시오가피 추출물 처리 후 세포 생존력 및 증식률: 조골세포의 증식 측정은 단시간에 대량 검색이 가능한 MTT colorimetric assay 방법(Cell titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation assay: Promega)을 사용하여 측정하였다. 96-well plate에 2×10^3 cells/well의 농도로 분주하고 24시간 후에 가시오가피 추출물을 농도별(0, 5, 10, 15, 20, 25 μg/mL)로 투여하여 3일간 배양하였다. 3일째 되는 날 MTT(20 μL/well) 시약을 첨가하고 2시간 동안 37°C에서 배양한 후 MTT가 formazan 으로 분해되는 양을 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 각각의 처리 군을 6 well씩 준비하고 6회 반복실험을 하였으며, 각 오가피 추출물에 대한 세포 증식효과는 6번 반복 실험의 평균값을 취한 후 아무것도 처리하지 않은 DMEM 용액에 배양한 대조군에 대한 백분율로 표시하였다(26).

염기성 인산 분해 효소(alkaline phosphatase: ALP) 활성 측정: ALP 활성도 검사는 *p*-nitrophenyl phosphate(pNPP, Sigma, St. Louis, MO, USA)의 가수분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 것을 이용하여, 가수분해 반응의 산물인 *p*-nitrophenol의 양을 측정함으로써 ALP의 농도를 간접적으로 산출하는 것이다. 이때 세포수의 차이가 ALP 활성도에 영향을 미칠 수 있으므로 총 단백질 양을 측정하여 나누어 줌으로써 단위 세포 수 당 ALP 활성도를 계산한다.

본 실험에서는 MG-63 조골세포를 6-well plate에 1×10^5 cell/well 농도로 분주하고 밀생 단일층이 형성될 때까지 배양한 다음, 10% FBS, 1% antibiotics와 가시오가피 추출물이 적정 농도별(0, 5, 10, 15 μg/mL)로 함유된 배지로 교환한 후, 48시간 동안 배양하였다. 이후 각각의 well에서 배양액을 제거하고 0.25% trypsin/1 mM EDTA로 처리하여 세포를 분리한 다음 세포 부유액을 4°C, 8,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고, PBS로 세척한 후, 분리한 세포를 얼음에 옮겨 0.5% Triton X-100 100 μL, PBS 200 μL을 첨가하고 1시간 동안 방치하여 세포막을 파괴하였다. 그 후 4°C, 8,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 모아 ALP 활성도 측정에 사용하였다.

96-well plate에 각 well 당 세포 용해액 90 μL에 1 M Trizma base buffer(pH 10) 150 μL, 5 mM $MgCl_2$ 30 μL와 5 mM pNPP 30 μL를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 기질은 pNPP의 양을 ELISA reader(Wallac Victor2)를 이용하여 405 nm에서 비색정량 하였다.

단백질 농도는 표준시료로서 소의 혈청 알부민(bovine serum albumin: BSA)을 이용한 Bradford법을 사용하여 측정하였다. 실험은 5번 반복시행 하였으며 각 실험에서 얻어진 ALP 활성도는 단백질 양으로 보정하여 대조군의 ALP 활성에 대한 시료 첨가군의 ALP비를 %로 계산하였다(27).

자료 처리

자료 분석은 SPSS(12.0.1 for Windows) program을 이용하여 통계분석을 시행하였다. 모든 연속형 변수의 평균과 표준편차를 구하였으며, 군별 차이는 One-way ANOVA의 Scheffe와 Duncan법을 이용하여 분석하였다. 가시오가피 추출물의 용매, 부위, 전처리에 따른 변화 차이는 paired *t*-test를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

가시오가피 추출물의 항산화 활성 및 총 페놀 함량

자유 라디칼은 주로 노화와 질병의 원인으로 알려져 있다(28). 특히 자유라디칼이 생체막의 구성 성분인 불포화 지방산을 공격하여 생성되는 과산화 지질의 축적은 생체 기능의 저하나 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 활성 산소를 방어하는 항산화 물질이 이러한 질병의 치료 가능성 때문에 주목을 받고 있으며, 그 중 천연물에서 추출한 천연 항산화제에 관한 연구가 활발하다. 그 중 페놀 화합물의 다양한 항산화력은 그 구조적인 특징과 관련성이 높은데, 이들은 금속 킬레이트제, 환원제로서, 활성산소의 소거제로서, 사슬절단 항산화제(chain breaking antioxidants)등으로서의 역할에 기인하는 것으로 알려져 있다(29).

항산화 활성: FRAP assay에 의한 가시오가피 추출물의 항산화 활성도를 측정하여 TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity) 법으로 항산화 효과를 비교하여 Fig. 1와 Table 1에 나타내었다.

가시오가피 추출물 중 줄기의 에탄올 추출물(SE)의 TEAC 값이 782.60±53.55 μM Trolox equivalent로 가장 높았고, 산 가수분해 처리한 줄기 에탄올 추출물(SE-HCl)의 TEAC value도 759.24 ±20.73 μM Trolox equivalent로 높은 항산화 활성을 나타내어 줄기의 에탄올 추출물이 줄기의 물 추출물이나 잎 추출물들보다 항산화 효능이 뛰어난 것으로 나타났다. 이는 항산화능이 높다고 알려진 곰취의 경우보다 약 70,000배 정도 높은 수치로서, 가시오가피 줄기의 에탄올 추출물이 갖는 항산화능이 매우 뛰어나다고 할 수 있다.

추출 용매에 따른 오가피의 부위별 항산화 활성을 비교해 보았을 때, 에탄올을 추출 용매로 사용한 경우 잎(LE)보다는 줄기(SE)의 에탄올 추출물이 유의적으로 높은 항산화 활성을 보였으나($p < 0.001$), 물 추출물에서는 줄기(SW)보다 잎(LW)이 유의적으로 높은 항산화 활성을 보였다($p < 0.01$).

추출용매가 가시오가피 추출물의 항산화 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 용매별 비교를 해 보았을 때, 줄기($p < 0.01$)와 잎($p < 0.05$) 모두 에탄올 추출물에서 유의적으로 높은 항산화 활성을 나타내었다.

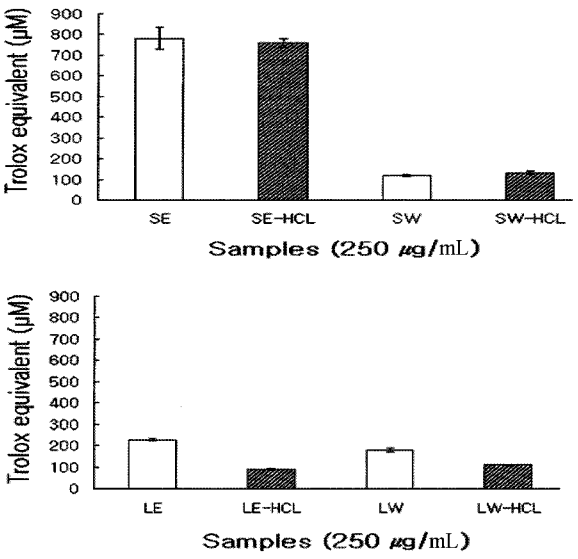

Fig. 1. Comparisons of TEAC values of *Acanthopanax senticosus* extracts by FRAP assay. SE: the ethanol extract of stem, SW: the water extract of stem, LE: the ethanol extract of leaf, LW: the water extract of leaf, □: raw material, ▨: hydrolyzed material by 1 N HCl.

Table 1. TEAC values of *Acanthopanax senticosus* extracts (250 μL/mL)

Solvent	Treatment part	Raw	1 N HCl
		TEAC value (μM)[1)]	
Ethanol	Stem	782.60±53.55[a2)]	759.24±20.73[a]
	Leaf	227.14± 5.45[b]	90.52± 3.21[e]
Water	Stem	118.34± 4.06[de]	132.77± 9.97[d]
	Leaf	179.26± 6.53[c]	110.34± 2.42[de]

[1)]Data indicate means±SD.
[2)]Values with different superscript within in a column are significant difference (F = 591.790, $p < 0.01$) by Duncan's multiple range test.

Kim 등(30)은 가시오가피 에탄올 추출물의 free radical 소거 능력이 물 추출물보다 높았고, 부위별로는 추출용매에 관계없이 줄기 > 뿌리 > 잎의 순서로 소거능력이 높다고 보고하였으며, 이는 본 실험 결과를 뒷받침 해준다.

1 N HCl 처리에 따른 가시오가피 추출물의 항산화 효능을 평가해 보았을 때, 줄기의 경우에는 에탄올 추출물과 물 추출물 모두 유의적인 차이가 없었으나, 잎 추출물의 경우에는 에탄올 추출물($p < 0.01$)과 물 추출물($p < 0.05$) 모두 1 N HCl 가수분해에 의해 항산화 활성이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 따라서 본 연구에서는 가시오가피 추출물의 성분에 관한 연구는 수행하지 않았으나, 가시오가피 추출물에는 항산화 활성을 가지는 성분이 다량 함유되어 있으며, 잎 추출물에 포함되어 있는 항산화 성분은 산에 의해 영향을 받는다고 사료된다.

총 페놀 함량: 식품 속에 함유되어 있는 많은 생리활성 화학물질중에서 페놀은 가장 널리 함유되어 있으며 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 알려져 있다(31,32). 본 실험에서는 가시오가피 추출물의 총 페놀 함량을 구하기 위하여 gallic acid를 페놀 표준물질로 하여 함량을 계산하였다.

8가지 가시오가피 시료에서의 gallic acid를 기준으로 한 총 페놀 함량은 Fig. 2과 Table 2에 나타내었다. 각각의 가시오가피 추출물 중 줄기의 에탄올 추출물(SE)의 총 페놀 함량이 7.593±0.016 mM gallic acid equivalent로 가장 높았고, 산 가수분해 처리한 줄기 에탄올 추출물(SE-HCl)의 총 페놀 함량도 5.887±0.005 mM gallic acid equivalent로 높은 수치를 나타내었다.

부위별 총 페놀 함량을 비교해 보았을 때, 에탄올 추출물에서는 잎(LE)보다는 줄기(SE)에서 총 페놀 함량이 유의적으로 높은 것으로 나타났으나($p < 0.001$), 물 추출물에서는 줄기(SW)보다 잎(LW)에서 총 페놀 함량이 유의적으로 높았다($p < 0.001$).

추출용매가 가시오가피 추출물의 총 페놀 함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 용매별로 비교해본 결과, 줄기($p < 0.001$)와 잎($p < 0.001$) 모두 에탄올 추출물에서 유의적으로 높은 페놀 함량을 나타내었다.

Kim 등(33)은 가시오가피 유식물체 추출물에서 항산화 활성 물질을 분리 동정하였으며 이들의 항산화 활성이 매우 높다고 보고하여 가시오가피 추출물이 천연 항산화제로서의 개발 가능성이 높음을 시사하였으며, Davydov 등(34)은 가시오가피 추출물에는 다수의 항산화 페놀 물질이 함유되어 있음을 보고하였다.

1 N HCl 처리에 따른 가시오가피 시료들의 총 페놀 함량 변화를 평가해 보았을 때, 모든 시료에서 HCl 가수분해에 의해 총 페놀 함량이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다($p < 0.001$)(Fig. 2). 따라서 가시오가피 추출물에 함유되어 있는 페놀성분들은 산

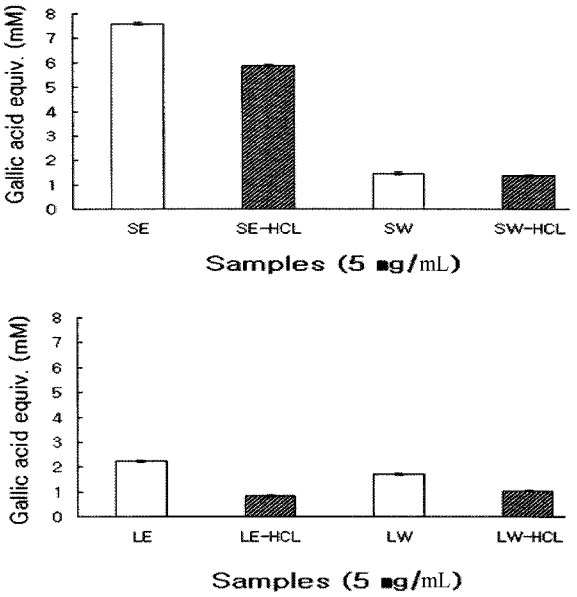

Fig. 2. Comparisons of total polyphenol contents of *Acanthopanax senticosus* extracts. SE: the ethanol extract of stem. SW: the water extract of stem, LE: the ethanol extract of leaf, LW: the water extract of leaf, □: raw material, ▨: hydrolyzed material by 1 N HCl.

Table 2. Total polyphenol contents of *Acanthopanax senticosus* extracts (5 mg/mL)

Solvent	Treatment part	Raw	1 N HCl
		Gallic acid equivalent (mM)[1)]	
Ethanol	Skin	7.593±0.016[a2)]	5.887±0.005[b]
	Leaf	2.219±0.003[c]	0.841±0.005[h]
Water	Skin	1.458±0.010[e]	1.381±0.005[f]
	Leaf	1.719±0.013[d]	1.041±0.008[g]

[1)]Data indicate means±SD.
[2)]Values with different superscript within in a column are significant difference (F = 233083.0, $p < 0.01$) by Duncan's multiple range test.

가수분해에 의해 영향을 받으며, 높은 항산화 효능을 위해서는 산 가수분해 전처리를 시행하지 않은 오가피 추출물을 이용하는 것이 바람직하다고 사료된다.

가시오가피 추출물의 항산화 활성과 총 페놀 함량의 상관관계 분석: 가시오가피 추출물 시료들의 항산화 활성과 총 페놀 함량의 상관관계를 살펴보면 Fig. 3과 같다.

TEAC 값으로 표현된 가시오가피 추출물의 항산화 활성과 총 페놀 함량은 강한 양의 상관성을 보였다($p < 0.001$). 그러므로 가시오가피 추출물의 높은 항산화 활성은 추출물에 함유되어 있는 다량의 페놀 화합물에 기인한 것이라고 할 수 있다.

추출 부위 및 용매, 전처리 조건에 따른 가시오가피 처리가 조골세포 증식 및 ALP 활성에 미치는 영향

조골세포 생존율 및 증식률에 미치는 영향 분석: 부위, 용매 및 전처리에 따른 가시오가피 추출물이 조골세포 생존 및 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 여러 차례 시행한 예비실험 결과에 의해 세포 독성이 나타나기 시작하는 고농도를 제외하고 시료 처리 농도(0, 5, 10, 15, 20, 25

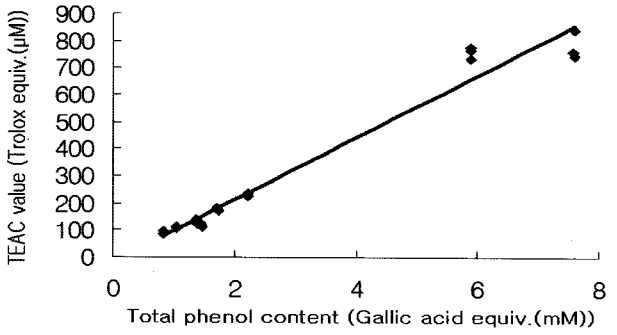

Fig. 3. The correlation of TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) value and total polyphenol content. Correlation is *P* value <0.001 level. r = 0.984.

μg/mL)를 선택하였으며, 조골 세포 생존율 및 증식률은 아무런 시료도 처리하지 않은 배양액만 넣어준 control군에 대한 비율로 나타내었으며 그 결과는 Fig. 4와 같다.

줄기의 에탄올 추출물(SE)의 경우, 산 가수분해 전처리를 하지 않은 시료를 5 μg/mL 처리한 군의 경우를 제외하고 모든 농도에서 유의적으로 조골세포 증식 효과를 나타내었다($p < 0.05$). 특히 줄기의 에탄올 추출물(SE) 20 μg/mL를 처리한 군과 1 N HCl로 가수분해 한 줄기 에탄올 추출물(SE-HCl) 10 μg/mL와 25 μg/mL를 처리한 군에서 유의적으로 높은 증식효과를 보였다($p < 0.01$).

잎의 에탄올 추출물(LE)을 처리한 경우는, 거의 모든 농도에서 control군에 비해 세포증식이 증가한 것으로 나타났으나, 1 N HCl로 가수분해 한 시료(LE-HCl)를 5 μg/mL와 10 μg/mL로 처리한 군($p < 0.05$)을 제외하고는 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

줄기의 물 추출물(SW)의 경우, 10 μg/mL와 15 μg/mL을 처리해 준 군에서만 유의적으로 세포가 증식하는 것을 보였으며($p < 0.05$), 잎의 물 추출물(LW)을 처리한 세포군에서는 control 군에 비해 세포 증식효과를 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

산 가수분해 전처리 여부가 조골세포 증식에 미치는 영향을 분석해 보았을 때, 잎의 에탄올 추출물 5 μg/mL와 10 μg/mL를 처리한 군을 제외한 모든 군에서 1 N HCl로 가수분해 한 시료 처리에 의한 조골세포 증식률의 차이는 나타나지 않았다. 이는 산 가수분해에 의해 glycoside형태의 비활성 물질이 aglycone의 활성형으로 전환되었다하더라도 페놀 화합물과 같은 다른 활성성분들에도 영향을 미쳤을 가능성이 있다. 이는 추후 연구를 통하여 산 가수분해에 따른 오가피 추출물의 성분 분석을 통하여 검증해야 할 것이라고 사료된다.

추출 용매에 따른 가시오가피 시료의 조골세포 증식 효과를 비교해 보았을 때, 에탄올 추출물이 물 추출물 보다 유의적으로 높은 조골세포 증식 효과를 나타내었으며($p < 0.05$), 추출 부위별로 비교해 본 결과, 잎 추출물 보다는 줄기 추출물이 효과적으로 조골세포를 증식시키는 것으로 나타났다($p < 0.05$). Kim 등(30)에 의하면 약콩은 0.001과 0.01 mg/mL 농도에서, 대두 추출물은 0.001, 0.01및 0.1 mg/mL 농도에서 조골세포(MG-63)의 증식을 대조군에 비하여 유의적으로 증가시켰다고 보고하였다. 이는 조골세포 증식 효과를 나타낸 제니스틴이나 다이드제인의 표준품 농도와 비교 하였을 때, 약콩과 대두 추출물은 더 낮은 이소플라본을 함유하고 있었음에도 더욱 현저한 조골세포 증식 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 약콩 및 대두에 함유된 저 농도 이소플라본과 다른 물질과의 상호 작용에 의한 시너지 효과 때문으로 풀이 되었다.

ALP 활성에 미치는 영향 분석: ALP는 거의 모든 조직에 존재하며 특히 골조직에 존재하는 ALP는 골 성장이 활발히 일어날 때 그 활성이 증가한다. 그러므로 조골세포 활성을 알아보는

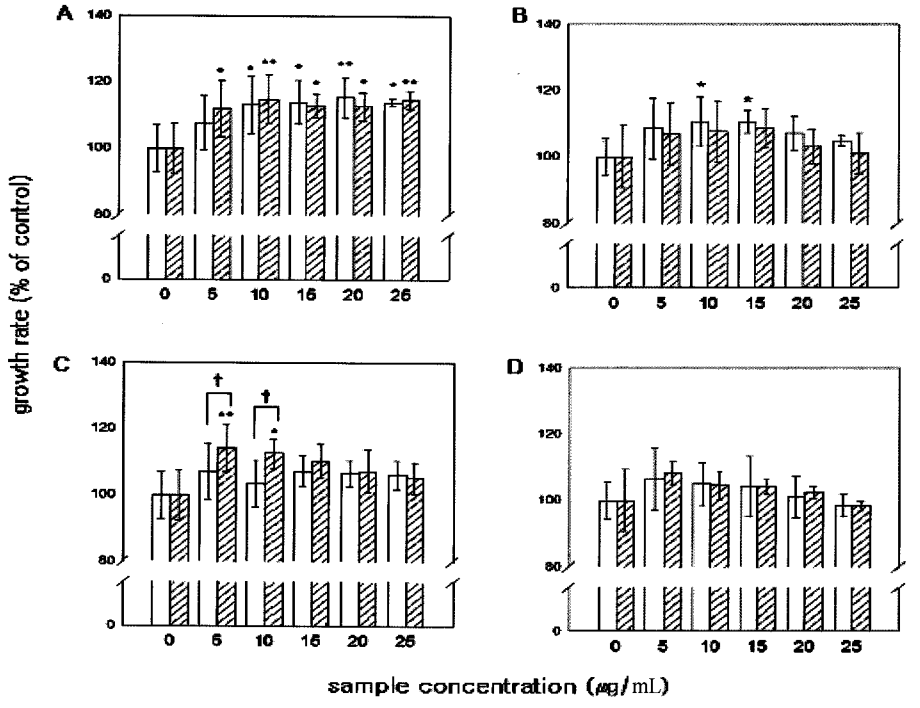

Fig. 4. Cell proliferation effect of *Acanthopanax senticosus* extractson MG-63 cell line. A: ethanol extract of stem (SE), B: water extract of stem (SW), C: ethanol extract of leaf (LE), D: water extract of leaf (LW), □: raw material, ▨: hydrolyzed material by 1 N HCl. *: Significantly different from control(0) at $p < 0.05$. **: Significantly different from control(0) at $p < 0.01$. †: Significantly differently by paired t-test at $p < 0.05$.

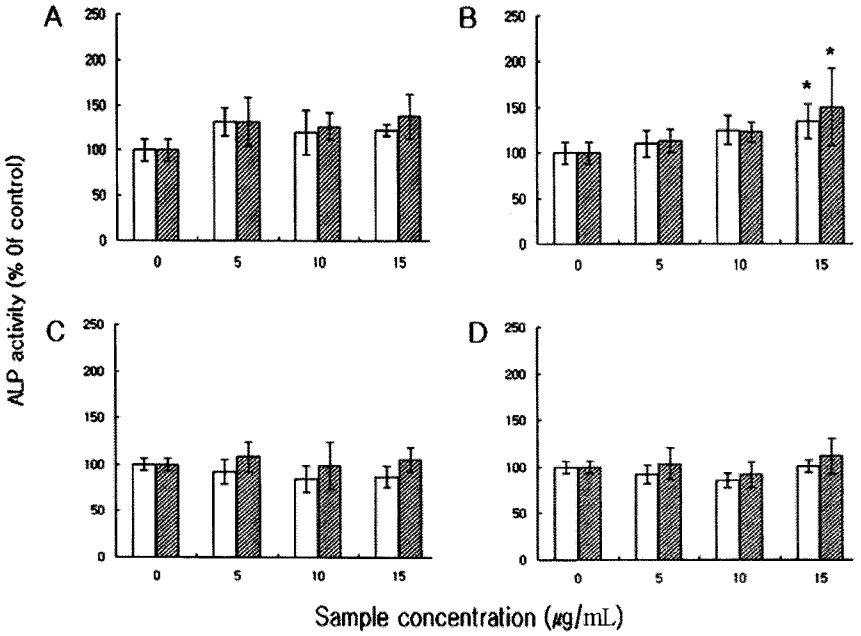

Fig. 5. The effect of *Acanthopanax senticosus* extracts on alkaline phosphatase (ALP) activities of MG-63 cell line. A: the ethanol extract of stem (SE), B: the water extract of stem (SW), C: the ethanol extract of leaf (LE) D: the water extract of leaf (LW), □: raw material, ▨: hydrolyzed material by 1 N HCl. *: Significantly different differently by paired t-test at $p < 0.05$.

biomarker로서 MG-63 조골세포에서의 ALP 활성을 측정함으로써, 가시오가피 추출물이 조골세포의 활성에 미치는 형향을 알아보았다. ALP활성은 아무런 시료도 처리하지 않은 배양액만 넣어준 control군에 대한 비율로 나타내었으며 그 결과는 Fig. 5와 같다.

각 오가피 시료를 농도별(0, 5, 10, 15 μg/mL)로 처리한 결과, 줄기의 물 추출물(SW) 15 μg/mL를 처리한 경우($p < 0.05$)를 제외하고는 염기성 인산 분해 효소 활성을 증가시키는 효과를 나타내지 않았다.

본 실험에서는 조골세포 증식에 큰 효과를 보였던 줄기의 에탄올 추출물의 처리가 조골세포의 ALP 활성을 유의적으로 증가시키지 못하고, 오히려 잎 추출물에서 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났는데, 이는 가시오가피의 부위별로 존재하는 활성 성분의 종류와 함량이 다르기 때문이라고 사료된다. 따라서 활성성분의 규명과 추출 조건을 최적화하는 공정 개발에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

요 약

본 연구에서는 가시오가피 추출물의 부위, 추출 용매, 산 가수분해 전처리에 따른 항산화 활성을 알아보고자 FRAP assay를 실시하였으며, 총 페놀 함량을 측정하고, 가시오가피 추출물의 항산화 활성과 총 페놀 함량간의 상관관계를 분석하였다. 또한 가시오가피 추출물 처리가 조골세포 증식률과 alkaline phosphatase 활성에 미치는 영향을 분석하여 가시오가피의 골다공증 예방 가능성을 규명하고자 하였다.

연구결과 가시오가피에 함유된 총 페놀 함량과 FRAP법으로 측정된 항산화 활성 간에 양의 상관관계가 있는 것으로 나타났으므로, 가시오가피의 항산화 활성은 함유된 폴리페놀에 의해 나타나는 것으로 풀이된다. 그러나 가시오가피에 함유된 폴리페놀 함량과 항산화 활성은 가시오가피의 부위와 추출 용매 및 산 처리 여부에 따라 차이가 나는 것으로 나타났다. 또한 가시오가피의 에탄올 추출물이 물 추출물에 비하여 조골세포 증식을 유의적으로 증가시켜주는 것으로 나타났다. 가시오가피의 물 추출물은 조골세포에서 염기성 인산 분해 효소의 활성을 유의적으로 증가 시켰다. 이는 가시오가피의 부위와 추출 용매 및 전처리 과정에 따라 추출되는 활성 성분의 종류와 양에 차이가 있기 때문으로 풀이된다. 이 결과는 가시오가피의 가공법을 선정하는데 고려되어야 할 중요한 사항으로 사료된다. 본 연구를 통하여 가시오가피의 항산화 활성과 조골세포 증식 효과가 제시되었다. 한국산 가시오가피를 건강 기능 식품 소재로 개발하기 위해서는 동물 실험과 인체 시험을 통한 심도 있는 연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 Brain Korea 21 project, 식품영양유전체사업과 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (A05-0716-AD0501-05N1-00040B).

문 헌

1. Lee YS, Jung SH, Lim SS, JJ, Lee SH, Shin KH. Effects of the water extract from the stem bark of *Acanthopanax senticosus* on hyperlipidemia in rats. Korean J. Pharmacogn. 32: 103-107 (2001)
2. Kim SK, Kim YG, Lee MK, Han JS, Lee JH, Lee HY. Comparision of biological activity according to extracting solvents of four acanthopanax root bark. Korean J. Med. Crop Sci. 8: 21-28 (2000)
3. Kao KB. Chinese *Ciwujia* Studies. Heilongjiang Institute of Traditional Chinese Medicine, Harbin, China. p. 2 (1981)
4. Kim YM. Pharmaceutical comparison of ginseng with *Acanthopanax* from the aspect of oriental medicine. Korean J. Pharmacogn. 8: 131-138 (1977)
5. Brekhmann II, Dardymov IV. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. Annu. Rev. Pharmacol. 9:

419-430 (1969)
6. Lee KH, Nam JO, Yoon WH. Effect of protein-bound polysacharide isolated from *Acanthopanax senticosus* in reducing the toxic effect of cisplatin. Korean J. Pharmacog. 38: 1-17 (2007)
7. Hacker B, Medon PJ. Cytotoxic effects of *Eleutherococcus senticosus* aqueous extracts in combination with N6-(delta 2-isopentenyl)-adenosine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine against L1210 leukemia cells. J. Pharm. Sci. 73: 270-282 (1984)
8. Bohn B, Nebe CT, Birr C. Flow-cytometric studies with *Eleutherococcus senticosus* extract as an immunomodulatory agent. Drug Res. 37: 1193-1196 (1987)
9. Fujikawa T, Yamaguchi A, Morita I, Takeda H, Nishibe S. Protective effects of *Acanthopanax senticosus* harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. Biol. Pharm. Bull. 19: 1227-1230 (1996)
10. Kim CJ, Hahn DR. The biological activity of a new glycoside, chiisanoside from *Acanthopanax chiisanensis* nakai leaves. Yakhak Hoeji 24: 123-134 (1980)
11. Yook CS, Rho YS, Sed SH, Leem JY, Han SH. Chemical compounds of *Acanthopanax divaricatus* and anticancer effect in leaves. Yakhak Hoeji 40: 215-261 (1996)
12. Frei B. Natural Antioxidants in Human Health and Disease. Academic Press, San Diago, CA, USA. pp. 1-21 (1994)
13. Seo JH, Lim BO, Kang SA, Han IK, Park DK. The effect of P diet on osteoporosis induced by ovariectomy in rats. J. Korean Soc. Menopause 8: 76-86 (2002)
14. Kim KS, Min BK, Lee SP, Kim IS, Kim HY, Sim JR. Evaluation of biological markers of bone turnover in postmenopausal osteophorotic women to alendronate treatment. J Korean Soc. of Menopause 6: 36-42 (2000)
15. Rogers J. Estrogens in the menopause and postmenopause. New Engl. J. Med. 280: 364-367 (1967)
16. Duda RJ, O'Brien JF, Katzmann JA. Concurent assays of circulating bone-gla protein and alkaline phosphate: Effects of sex, age, and metabolic bone disease. J. Clin. Endocr. Meta. 66: 951-957 (1988)
17. Bowles SA, Kurdy N, Davis AM, Franse MW, Marsh DR. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphate following isolated tibial shaft fracture. Ann. Clin. Biochem. 33: 196-200 (1996)
18. Anderson JJ, Garner SC. Phytoestrogen and bone. Bailliere Clin. Endoc. 12: 543-557 (1998)
19. Setchell KDR, Cassidy A. Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. J. Nutr. 129: 758S-767S (1999)
20. Lee HK. Effect of black bean and *samryungbakchulsan* on ovariectomy-induced postmenopausal osteoporotic rats. PhD thesis. Kyung Hee University, Seoul, Korea (1998)
21. Ryu IC, Lee Ym, Koo Y, Bae KW, Chung CP. Effect of safflower extracts on activity of PDL cells and MG-63 cells. J. Korean Acad. Periodontol. 27: 867-882 (1997)
22. Ho JY. Cell proliferation effects of *eucommiae* cortex and *Acanthopanacs* cortex methanol extraxts on the osteoblast-like cell line, MG-63 and Saos-2. PhD thesis. Kyung Hee University, Seoul, Korea (2001)
23. Kim MR, Yang CH, Seo BI. Effects of safflower seeds on bone mineral density in ovarientomy-induced postmenopausal osteoporotic rats. Korean J. Herbol. 13: 37-43 (1998)
24. Yang DS, Cha MH, Kang BJ, O SU, Kim YE, Yun YS. A study on the longitudinal bone growth of growth-stimulating material with *Eleutherococcus senticosus*. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 702-707 (2003)
25. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Anal. Biochem. 239: 70-86 (1996)
26. Cho YH, Park SJ, Shin HJ, Jang KH, Kang SA, Choue RW. Comparative estrogenic effects of 'Yack-kong' and soy bean on the proliferation of human osteoblastic cell line, MG-63. Korean J. Nutr. 34: 905-911 (2001)
27. Puzas JE, Brand JS. Bone cell phosphotyrosine phosphatase: Characterization and regulation by calcitropic hormones. Endocrinology 116: 2463-2468 (1985)
28. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev. 59: 527-605 (1979)
29. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee I-S. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis rehder*. Korean J. Food Sci. Technol. 38: 128-134 (2006)
30. Kim LH, Han SS, Choi YS. Antioxidant effect of the extracts of *Acanthopanax senticosus*. Korean J. Pharmacogn. 33: 359-363 (2002)
31. Lee JH, Lee SR. Analysis of phenolic substances content in Korean plant food. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 310-316 (1994)
32. Choi SY, Lim SH, Kim JS, Ha TY, Kim SR, Kang KS, Hwang IK. Evaluation of estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 549-556 (2005)
33. Kim MJ, Kwon YS, Yu CY. Antioxidative compounds in extracts of *Eleutherococcus senticosus* max. plantlets. Korean J. Med. Corp. Sci. 13: 194-198 (2005)
34. Davydov M, Krikorian AD. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (*Araliaceae*) as an adaptogen: A closer look. J. Ethnopharmacol. 72: 345-393 (2000)