백두산 자생참돌꽃의 생육과 이용
II. 유식물의 부위별 superoxide dismutase 활성

소 상 섭

전북대학교 자연과학대학 생물과학부

Growth and Utility of *Rhodiola sachalinensis* in Baekdu Mountain
II. Activities of Superoxide Dismutase in Portions of the Seedlings

Sang-Sup So

Division of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-765, Korea

Abstract – Superoxide dismutase (SOD) activities were investigated from the portions of shoots and roots in accordance with developmental stage and in response to environmental stress and antioxidants using *Rhodiola*-seedlings.

The rates of SOD activities were revealed highly at the portion of roots and its tip of seedlings in the latter stages rather than the initial stages. SOD activities of seedlings in the initial stages treated with sodium chloride and cadmium as environmental stressors showed the decrease by 15 and 30% with respect to the control, respectively. However, in spite of stressor-treatments, the activities in the roots were increased according to the growth period showing a maximum rate of up to 45%. Also, SOD activities of the seedling treated with ascorbic acid as a antioxidant were increased by 46% of control value, but this was similar to the rate revealed in the presence of stressors. These results suggest that SOD activities in *Rhodiola*-seedlings may be related with the important defence-system against injurious environments.

Key words : superoxide dismutase, *Rhodiola*-seedlings, environmental stressor, antioxidant

서 론

참돌꽃(*Rhodiola sachalinensis*)은 바위돌꽃, 경천 또는 홍경천으로 잘 알려진 고산식물이다. 우리나라에서는 주로 백두산 천지의 기슭이나 그 주변 일대에 분포하며 대개의 이들 서식지는 해발 1,800~2,300 m의 고산지대이다. 또한 유사종으로는 돌꽃, 가지돌꽃, 바위돌꽃 및 좁은잎돌꽃 등이 있으며 대부분 이 식물들의 이용부위는 잎과 뿌리이다(蕭 1994; 임 등 1996). 일반적인 백두산 자생 참돌꽃은 뿌리가 튼튼하고 직립하였으며 꽃대는 6~30 cm 정도이다. 잎은 길고 둥근 손가락 모양의 피침형으로 4 cm 정도의 길이에 0.5~1 cm 정도의 폭을 가진다. 꽃은 암꽃과 수꽃이 서로 다른 포기에서 피며 대개 7~8월 경에 개화한다. 참돌꽃은 고산식물로서 낮은지대의 평야지에서는 재배가 어려운 것으로 알려져 있다. 앞

* Corresponding author: Sang-Sup So, Tel. 063-270-2786, Fax. 063-270-3362, E-mail. sso@chonbuk.ac.kr

서 본인 등의 연구(Oh *et al.* 2004)에서도 밝힌 바와 같이 종자 발아율이 극히 저조하여 재배법과 더불어 이 부분의 문제는 앞으로 더욱 연구되어야 할 것이다.

참돌꽃은 최근에 인삼, 가시오갈피 이후에 발견한 보건약용식물의 일종으로 원기를 회복시키고 병과 독을 극복할 수 있다 하여 고원인삼이라는 별칭을 가지고 있다. 인삼과의 비교에서는 조절과 환경적응 능력이 더 강하며 조혈작용에서도 인삼과 달리 부작용이 없는 것으로 알려져 있고 면역기능도 인삼보다 강하며 약리학적 독성효과는 거의 없는 것으로 알려져 있다(문 1984; 김 등 1994). 또 다른 임상연구 결과(Petkov and Yonkov 1987; Zhang *et al.* 1989)에 의하면 참돌꽃은 산소 결핍, 마이크로파의 복사 등을 극복하는 효과를 나타내고 신체가 쇠퇴하는 것을 늦추는 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다(Yoshikawa *et al.* 1996; Kelly 2001). 특히 참돌꽃에는 이 같은 병의 원인으로 추정되는 활성산소종을 제거하는 superoxide dismutase (SOD)의 활성도가 큰 것으로 보고(Lee *et al.* 2000; Mook-Jung *et al.* 2002)되어 있다.

활성산소종은 대부분의 식물체가 병충해와 같은 생물학적 스트레스 등이나 다양한 종류의 환경 스트레스를 받게 되면 생명의 필수 원소인 산소(O_2)가 superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) 및 hydroxyl radical (OH^-) 등 반응성이 높은 독성으로 변한 것을 말한다. 이들은 강한 산화력을 가지고 있어 세포막분해, 광합성억제, 단백질분해 및 DNA합성억제 등 생체내에서 심각한 생리적인 장해를 유발하며 심한 경우 식물을 죽게 한다(Alscher and Hess 1993; Scandalios 1993). 생체는 이러한 활성산소종으로부터 자신을 보호하기 위하여 superoxide dismutase (SOD), peroxidase 및 catalase 등의 항산화효소와 ascorbate, α-tocopherol 또는 glutathione 등의 저분자 항산화물질을 생산한다(Alscher and Hess 1993). SOD는 산소분자가 1전자 환원되어 생기는 superoxide anion radical (O_2^-)을 제거시키는 작용을 하는 효소로서 식물을 포함한 모든 생물에 존재한다. SOD는 또한 항산화제로서 화장품, 식품 및 의약품의 첨가제로도 사용되어 상업적으로 중요한 효소로서 알려져 있다. 본 연구에서는 이와 같이 우수한 약리효과를 갖는 백두산 자생 참돌꽃 식물의 생육과정 중에서 주변의 환경조건에 가장 민감하게 반응하는 유식물 시기를 실험재료로 하여 이로부터 이 시기의 식물부위별 SOD의 활성도와 카드뮴 등의 처리에 의한 스트레스 및 ascorbate 등의 항산화제 처리시 나타나는 참돌꽃의 항산화 효과를 조사코자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용된 참돌꽃 종자는 2004년 중국 연변대 농학원 방문 시 허명자 교수로부터 분양 받은 것과 2006년 동대학 유헌호 교수의 한국 방문 시 분양 받은 종자를 사용하였다.

2. 종자 발아 및 유식물의 생육

종자의 발아는 vermiculite 상에서 실시하였으며 발아 후 유식물의 원활한 생육을 위하여 modified MS배지액 (Murashge and Skoog 1962)을 매일 분무 살포하였으며 생육온도는 앞서 보고의 결과(Oh *et al.* 2004)와 같이 18~20°C로 조정하였다.

3. 효소액 추출

식물체를 뿌리와 줄기부위로 각각 나누어 생 중량 0.2 g에 50 mM potassium phosphate 완충액(pH 7.0) 5 mL를 넣고 얼음 위의 유발에서 마쇄한 후 12,000 g에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Bradford 방법(1976)에 따라 측정하였다.

4. SOD 활성 측정

SOD 활성은 nitroblue tetrazolium (NBT)의 광화학적 환원을 이용한 Beauchamp와 Fridovich 방법(1971)에 따라 측정하였다. 효소측정을 위한 반응은 13 μm riboflavine, 13 μm methionine 및 63 μm NBT을 포함하는 50 mM potassium phosphate 완충액(pH 7.8)에 조효소액을 넣어 최종부피가 1 mL가 되도록 하여 빛 조사 하에서 10분간 반응시킨 후 560 nm에서 NBT의 광환원을 측정하였다. 효소활성의 1단위는 1 mL의 반응액에서 NBT의 광화학적 환원을 50% 억제하는 데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

5. 스트레스 및 항산화물질 처리

스트레스 처리는 생육 4일 째의 초기유식물과 14일째 유식물로 구분하여 식물체에 1.0% NaCl 및 150 μm $CdCl_2$를 처리(Oh and So 2004)하여 48시간 경과 후 시료를 채취하였으며 항산화물질로는 0.5% ascorbic acid를 처리(소 2006)하여 시료 채취 또한 위와 동일한 방법으로

Table 1. Relative growth of shoots and roots of *Rhodiola*-seedlings

Culture periods (Days)	Relative growth (%)	
	Shoot	Root
Germination	–	–
2	–	–
4	21.0	16.2
6	33.2	28.4
8	51.2	45.5
10	65.6	60.3
12	80.7	73.6
14	100.0*	92.4

*Maximum-value in the table reveals the growth of shoots at the 14 days after culture.

48시간 경과 후 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 유식물의 생육

참돌꽃 종자의 발아는 전보(Oh *et al.* 2004)에 따라 15~20°C 상태에서 유도하였으며 생육온도는 18~20°C로 조정하였다. 유식물의 생체량 측정은 Table 1에서와 같이 생육 4일째부터 가능하였으나 이 시기의 뿌리, 줄기 부위의 생체량은 최대 생육량을 나타낸 14일째 shoot 부위와는 상대적 비교에서 16.2 및 21%에 불과하였다. 또한 14일째의 줄기와 뿌리 부위의 비교에서는 줄기 부위의 생육이 뿌리보다 7~8% 정도 높은 비율로 나타남으로서 유식물시기는 줄기 생장이 뿌리보다 왕성함을 알 수 있었다.

2. 유식물의 SOD 활성

참돌꽃 유식물의 SOD 활성은 발아 후 4일째인 생육초기와 14일째의 것으로 구분하여 조사하였다. Fig. 1은 4일째 유식물의 줄기부위(S)와 뿌리부위(R)를 선단부(1)에서 기부(2, 3)에 이르는 5개 절편으로 구분하였다. SOD는 이미 이 시기에 비교적 낮은 활성도로 나타나지만 모든 절편부위에서 측정되었고 특히 줄기(S)보다는 뿌리(R)에서 또한 기부(2, 3)보다는 선단부(1)의 활성도가 높게 나타났다. 이 같은 결과는 생육 14일째 유식물의 경우도 같은 양상을 나타내고 있다(Fig. 2). 이 시기의 유식물은 줄기부위와 뿌리부위를 각각 4개의 절편으로 구분하였다. 각 부위 절편의 SOD 활성도는 4일째에 비하여 모든 절편에서 2~3배 이상 높은 μg protein당 2.1~3.5 unit를 나타내고 있다. SOD는 항산화체계의 주요한 구성성분의 하나이며 식물에서 위험한 활성산소종

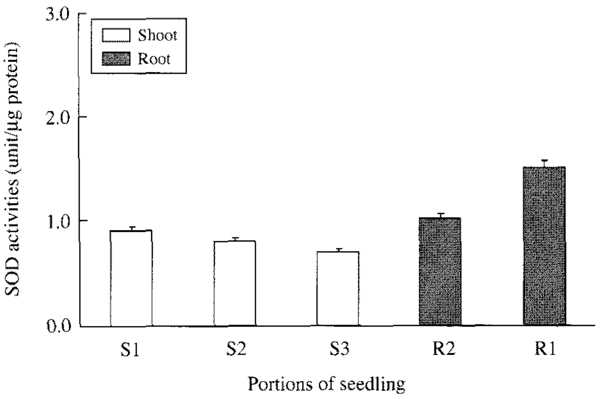

Fig. 1. SOD activities of shoot and root-segments of *Rhodiola*-seedlings grown during 4 days after culture. The number 1, 2 and 3 indicate the near position from the tip-segment (1). Statistical significance was tested using one-way ANOVA.

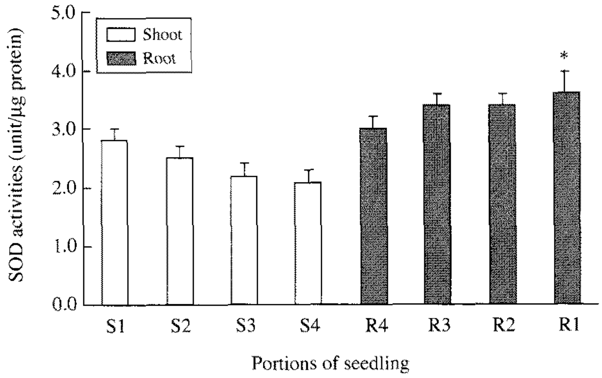

Fig. 2. SOD activities of shoot and root-segments of *Rhodiola*-seedlings grown during 14 days after culture. The number 1, 2, 3 and 4 indicate the near position from the tip-segment (1). Statistical significance was tested using one-way ANOVA. *$P < 0.05$ versus control.

을 효과적으로 제거할 수 있는 능력을 갖는 것으로서(Alscher *et al.* 2003), 이미 이 시기의 참돌꽃 유식물 또한 이 같은 방어기능에 주요역할을 하고 있음을 시사하였다. 여기서도 부위별 효과는 뿌리에서 높았으며 특히 기부에서 선단부에 이를수록 높은 활성도를 나타내었다.

3. 스트레스처리에 의한 SOD 활성

1) NaCl 처리

참돌꽃 유식물을 Table 1의 결과에 근거하여 초기 생육상태(4일째)와 후기 생육상태(14일째)로 구분하여 각 시기별로 NaCl처리에 대한 환경적 스트레스의 방어물질로서 SOD의 활성도를 조사하였다(Fig. 3). 식물체에서

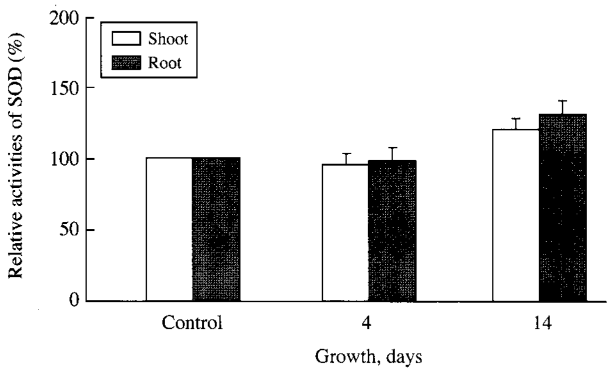

Fig. 3. SOD activities in crude extracts isolated from *Rhodiola*-seedlings grown under the stress condition treated with 1.0% NaCl. Statistical significance was tested using one-way ANOVA.

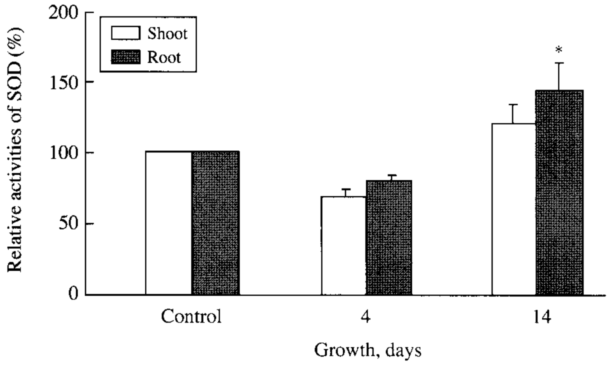

Fig. 4. SOD activities in crude extracts isolated from *Rhodiola*-seedlings grown under the stress condition treated with 150 μM $CdCl_2$. Statistical significance was tested using one-way ANOVA. $^*P<0.05$ versus control.

Na 또는 Cl 이온은 미량필수원소(Mengel and Kirkby 1987a)로서 생육에 필수적이나 필요 이상의 양은 식물에 축적되어 독성을 유발하는 것(Flowers *et al.* 1985)이 보통이다. Fig. 3의 결과에서 유식물 초기의 줄기부위도 NaCl 처리 48시간 경과 후 염의 축적에 따라 10% 정도 SOD 활성도 저하를 나타냈으나 뿌리는 유의한 변화를 보이지 않았다. 반면 14일째는 유식물 전체에서 SOD 활성도는 크게 증가하였는데 뿌리의 경우는 대조구에 비해 30% 정도의 높은 비율을 나타내었다. 이는 식물체가 스트레스 환경에 대한 적응현상으로 해석되며 참돌꽃의 경우는 이 시기가 유식물의 성숙단계부터 시작되는 것으로 사료되었다.

2) Cadmium 처리

식물체에서 cadmium(Cd)은 흡수등의 대사기능면에서 Zn과 유사하나 이는 Zn과는 달리 대단히 유독하며 특히 독성의 주원인은 단백질 내의 thiol기에 대해서 보다 큰 친화성을 갖기 때문으로 보통 Cd가 있으면 효소 활성도는 장애를 받는다(Mengel and kirkby 1987b). 이 같은 현상은 Fig. 4의 결과에서도 나타나고 있는데 이미 유식물 초기과정의 SOD 활성은 대조구에 비하여 뿌리와 줄기에서 각각 20과 25% 정도로 낮게 측정되었다. 따라서 이 시기의 유식물 상태에 연속적인 Cd의 처리는 곧 식물이 고사할 수도 있음을 의미하였다. 반면, 특기할 만한 것은 배양 14일째에 조사된 SOD의 활성은 cadmium의 처리에도 불구하고 뿌리의 경우는 대조구보다 45% 이상의 높은 활성증가를 보였는데 이는 앞서 NaCl의 결과와 같이 식물체가 불리한 환경에 대하여 효과적으로 적응되고 있음을 의미하였다. 인체에 치명적인 원소(Wagner 1993)로 알려진 cadmium은 또한 식물체에서도 엽록소 형성 저해와 필수원소의 흡수와 분포에 장해를 주는 것으로 납(Pd)과 함께 식물 성장에 유해한 중금속으로 알려져있다(Gussarson *et al.* 1996). 그러나 참돌꽃의 경우는 초기 유식물 상태를 지나게 되면 본 결과에서처럼 NaCl, cadmium 등의 유해인자 처리 또는 활성산소종 등으로 인한 산화적 스트레스에 대하여 자체의 SOD 활성수준은 상향되는 적응성을 나타내고 있다. 이러한 현상은 그림의 결과에서처럼 뿌리 부위에서 더욱 현저하였다.

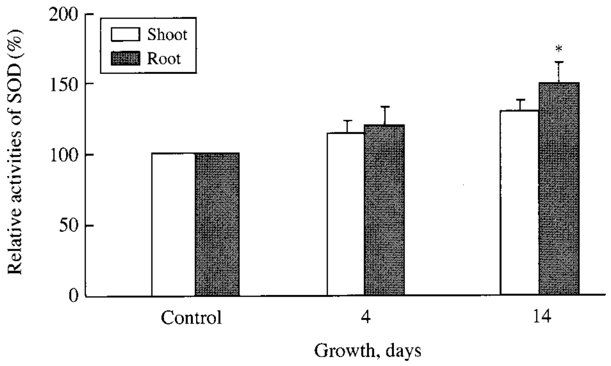

Fig. 5. SOD activities in crude extracts isolated from *Rhodiola*-seedlings grown under the condition of antioxidant treated with 1.0% Ascorbic acid. The Statistical significance was tested using one-way ANOVA. $^*P<0.05$ versus control.

4. 항산화물질 처리와 SOD 활성

식물의 항산화방어기작은 SOD, peroxidase 및 catalase 등의 항산화 효소에 의한 것과 ascorbic acid, α-tocopherol, glutathione 및 lycopene 등과 같은 항산화분자 등에 의한다(Gupta *et al.* 1993; Alscher *et al.* 2003). Fig. 5는 상기 항산화물질중 ascorbic acid를 참돌꽃 유식물에 처리

한 후 나타난 SOD 활성의 결과이다. 여기서는 NaCl 또는 cadmium 처리 등에 의한 앞서 결과와 달리 생육 초기부터 첨가된 항산화분자의 영향으로 SOD 활성도는 15~20%의 비율로 높아지고 있다. 이 같은 SOD 활성의 상승은 생육 후기인 14일째까지 이어짐을 보여 뿌리에서 최고 46%까지의 상승을 나타내었다. 그러나 항산화물질 처리에 의한 SOD 활성도의 증가비율은 앞서 생육후기 뿌리에서 나타난 동시기의 cadmium 처리 결과(45%)와 유의할 만한 차이를 나타내지는 않고 있다. 이러한 결과는 참돌꽃 유식물, 특히 뿌리부위는 ascorbic acid 등과 같은 항산화기질을 처리하지 않아도 자체에 유해한 free radical 등의 활성을 원활하게 억제시킬수 있는 항산화능력이 있음을 나타내었다.

적 요

참돌꽃 유식물에서 줄기와 뿌리의 부위별로 나타나는 superoxide dismutase (SOD)의 활성과 환경 스트레스 또는 항산화분자 처리에 따른 SOD 활성도를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

SOD의 활성은 줄기보다는 뿌리에서 높았고 각 기부보다는 선단부에 이를수록 높았으며 이러한 현상은 유식물 생육의 초기보다 후기에 더 상승된 결과를 나타내고 있다. 또한 환경 스트레스에 대한 SOD의 활성도는 유식물 초기생육 상태에서는 NaCl 또는 cadmium (Cd) 등 유해물질 처리 후 10 및 30% 정도 저해를 받고 있으나 생육 후기에 이를수록 처리된 유해인자에 의한 산화적 스트레스에 대하여 유식물은 자체의 SOD 활성 수준이 상향되는 방어능력을 보였으며 이러한 현상은 뿌리에서 더욱 현저하였다. SOD 활성도를 높이기 위해 항산화물질로 ascorbic acid를 처리한 유식물은 생육 후 최고 46%까지 높아짐을 보였으나 동시기의 스트레스 물질로 첨가한 cadmium 처리구에서 나타난 SOD 활성도에 비하여 유의할만한 상승효과의 차이를 보이지는 않았다. 이러한 결과는 참돌꽃 유식물 특히 뿌리부위는 항산화 기질의 처리 없이도 유해한 환경 인자에 노출되면 자체의 방어 수단으로 SOD 생성이 활발히 진행되고 있음을 시사하였다.

사 사

본 연구는 2007년도 전북대학교 지원연구비에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

金洙哲, 安相得, 李相來. 1994. 原色白頭山資源植物. 아카데미서적. 서울.

문관심. 1984. 약초의 성분과 이용. 일월서각. 서울.

소상섭. 2006. 절편고구마의 산화갈변방지 및 원료고구마의 저장방법개선. 산학연공동기술개발보고서, 전북대학교. 305-326.

蕭培根 中國本草圖鑑 (第一卷), 儷江出版社, 서울.

임웅규, 박석근, 류종원, 사동민, 이미순, 임규옥. 1996. 자원식물학. 서일출판사. 서울.

Alscher RG and JL Hess. 1993. Antioxidants in Higher Plants. CRC Press. Boca raton. 1-74.

Alscher RG, N Erturk and LS Heath. 2003. Role of superoxide dismutase (SOD) in controlling oxidative stress in plants. J. Exp. Bot. 53:1131-1341.

Beuchamp C and J Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44:276-287.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Flowers TJ, PE Troke and AR Yeo. 1985. The mechanism of salt tolerance in halophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 89-121.

Gupta AS, RP Webb, AS Holaday and RD Allen. 1993. Over expression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress: induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants. Plant Physiol. 103: 1067-1073.

Gussarson M, H Asp, S Adalsteinsson and P Jensen. 1996. Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch (*Betala pendula*) by buthionine sulphoximine (BSO). J. Exp. Bot. 47:211-215.

Kelly GS. 2001. *Rhodiola rosea*: a possible plant adaptogen. Altern. Med. Rev. 6:293-302.

Lee MW, YA Lee, HM Park, SH Toh, EJ Lee, HO Jang and YH Kim. 2000. Antioxidative phenolic compounds from the roots of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Arch. Pharm. Res. 23:455-458.

Mengel K and EA Kirkby. 1987a. Further Elements of Importances. pp. 573-588. In Principles of Plant Nutrition 4th. Ed. Intn. Potash Ins.

Mengel K and EA Kirkby. 1987b. Elements with More Toxic Effects. pp. 588-604. In Principles of Plant Nutrition. 4th Ed. Intn. Potash Ins.

Mook-Jung I, H Kim, W Fan, Y Tezuka, S Kadota, H Nishijo and MD Jung. 2002. Neuroprotective effects of constituents of the oriental crude drugs, *Rhodiola sacra*, *Rhodiola sacha-*

linensis and Tokaku-joki-to, against beta-amyloid toxicity, oxidative stress and apoptosis. Biol. Pharm. Bull. 25:1101-1104.

Murashige T and F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

Oh IS and SS So. 2004. Stress induced activities of matrix metalloproteinase in tobacco plants. Korean J. Plant Biotechnol. 31-4:313-317.

Oh IS, SS So and MZ Xu. 2004. Growth and utility of *Rhodiola sachalinensis* in Beakdu mountain I. Induction of callus and composition of free amino acids. Korean J. Environ. Biol. 22(1):148-152.

Petkov VD and D Yonkov. 1987. Effect of alcohol aqueous extract from *Rhodiola* roots on learning and memory. Acta Physiol. Pharmacol. Bulgarica. 12(1):3.

Scandalios JG. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. Plant Physiol. 101:7-12.

Wagner GJ. 1993. Accumulation of cadmium in crop plants and its consquences to human health. Adv. Agron. 51:173-212.

Yoshikawa M, H Shimada, N Murakami, J Yamahara and H Matsuda. 1996. Bioactive constituents of chinese natural medicines. II. *Rhodiolae radix.* (1). Chemical structures and antiallergic activity of rhodiocyanosides A and B from the underground part of *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey. (*Crassulaceae*). Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44: 2086-2091.

Zhang ZH, SH Fen, GD Hu, ZK Cao and LY Wang. 1989. Effect of *Rhodiola kirilowii* (Regal) Maxim on preventing high altitude reactions. A comparison of cardiopulmonary function on villagers at various altitudes. Chin. J. Chin. Mater. Med. 14(110):687.

Manuscript Received: October 2, 2008
Revision Accepted: November 15, 2008
Responsible Editor: Hak Young Lee