

비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.) 줄기로부터 항염 활성물질 β -Sitosterol의 분리

박유화^{1*} · 임상현¹ · 함헌주¹ · 김희연¹ · 정햇님² · 김경희¹ · 김성문³

¹강원도 농업기술원 농산물이용시험장

²강원도 농업기술원 인삼약초시험장

³강원대학교 바이오자원환경학과

Isolation of Anti-inflammatory Active Substance β -Sitosterol from Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Stem

Yu Hwa Park^{1*}, Sang Hyun Lim¹, Hun Ju Ham¹, Hee Yeon Kim¹,
Haet Nim Jeong², Kyung Hee Kim¹, and Songmun Kim³

¹Gangwon Provincial Agricultural Research & Extension Services, Gangwon-do 200-150, Korea

²Ginseng & Medicinal Plants Experiment Station, Gangwon-do 269-833, Korea

³Dept. of Biological Environment, Kangwon National University, Gangwon-do 200-701, Korea

Abstract

The objective of this study was to isolate and identify anti-inflammatory chemicals in *Hippophae rhamnoides* L. which was grown in Chuncheon, Korea. Treatment of ethanol extracts from stems, leaves, roots, and fruits to RAW 264.7 cells reduced amounts of nitrite by 56.0, 31.9, 49.1, and 18.9% respectively, compared to only lipopolysaccharide (LPS) treatment which is well-known as a inflammation-inducing agent. The stems were extracted with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol, and water and their nitrite contents in RAW 264.7 cells were measured. The dichloromethane extracts showed the highest inflammatory activity, exhibiting 80% reduction of the nitrite content at 1 mg/mL treatment. Activity-directed fractionation of dichloromethane extracts led to the identification of β -sitosterol as the anti-inflammatory chemical. 0.1 mg/mL treatment of β -sitosterol inhibited strongly the production of nitrite by 65%, compared to only LPS treatment. These results suggest that stem of *H. rhamnoides* L. may be useful for inflammation treatment.

Key words: seabuckthorn stem, anti-inflammatory, *Hippophae rhamnoides* L., β -sitosterol

서 론

시장 경제의 성장, 국민 소득의 증대, 웰빙 가치관의 변화에 따라 현대인들은 건강에 대하여 많은 관심을 갖게 되었으며, 신체에 부작용을 유발하는 합성 식·의약품을 지양하고 천연물 식·의약품을 선호하고 있다. 산업계에서는 이러한 사회적인 변화에 맞는 상품개발을 위하여 기능성 소재물질의 탐색 연구를 활발하게 진행하고 있다(1,2). 특히 만성 염증 질환과 퇴행성 뇌질환과 같은 염증 질환을 치료할 수 있는 식·의약품의 개발을 위하여 염증 매개 물질의 생성이나 활성을 억제하는 생리활성 효능 연구가 활발히 이루어지고 있다(3,4).

염증반응은 상처나 감염, 또는 자가면역 기전 등에 의해 나타나는 생체반응으로서, 조직의 혈관확장에 의한 부종, 발열, 조직손상, 세포증식 등을 특징으로 하는 생체반응이다

(5). 염증반응에서 활성화된 대식세포는 nitric oxide(NO), prostaglandin(PGE₂), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin(IL)-1, IL-6 등 여러 염증성 매개체들을 방출한다. 이런 염증성 매개체들은 조직 손상의 복구와 보호의 역할도 하지만, 과량 생산되면 정상조직에도 과도한 면역반응과 염증반응을 일으키게 된다(6,7).

비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.)는 중국, 몽골 등이 원산지인 보리수나무과(Elaeagnaceae)의 관목성 목본으로 유럽과 중앙아시아에서 폭넓게 자생하고 있으며(8) 척박한 토양에서 생육이 가능하고 질소고정 능력이 뛰어나서 토양 유실방지과 토양 개간 목적으로도 활용되고 있다(9,10). 비타민나무의 잎과 열매에는 비타민과 아미노산의 함량이 매우 높고, 면역, 항염, 항산화 등의 생리활성도 뛰어난 것으로 알려져 있어서 북유럽, 러시아, 북미, 중국 등에서 열매음료, 종자유를 이용한 건강보조제, 차와 같은 기능성식품으로

*Corresponding author. E-mail: pyh0524@hotmail.com
Phone: 82-33-248-6536, Fax: 82-33-248-6555

개발되어 있다(11,12). 비타민나무 종자유에는 필수 지방산인 linoleic acid와 α -linoleic acid가 다량 함유되어 있으며(13,14), 비타민 E가 많이 포함되어 있어 신진대사에 도움을 주고 아스코르빈산과 페놀의 균형 있고 풍부하게 포함되어 있어 노화방지에 탁월한 것으로 알려져 있다(15). 비타민나무에 관하여 많은 연구가 발표되었는데, Kim 등(10)이 비타민나무 잎과 뿌리에서 높은 항산화 활성이 있음을 보고하였고, Jeong 등(16)과 Han 등(17)은 각각 비타민나무 뿌리와 줄기 추출물로부터 알코올 분해능(ADH 활성 측정법)과 숙취해소(ALDH 활성 측정법) 활성을 측정한 결과 대조군인 aspartic acid보다 6~10배 정도 높은 수치를 나타내었다고 보고하였다. Upadhyay 등(18)은 초임계장치로 추출한 비타민나무 오일의 화상치료에 대한 효과를 보고하였으며, Ganju 등(19)은 비타민나무 잎 추출물이 관절염 치료와 염증치료에 높은 효과를 나타내고 있다고 보고하였고, Yang 등(20)은 비타민나무 가지 껍질의 acetone 추출물에서 2-O-caffeoyl-maslinic acid의 항염활성 효과를 보고하였다.

최근 국내에서 비타민나무는 식품재료로 활용 가능성이 커지면서 재배가 활성화되기 시작하였지만 국내에서 재배된 비타민나무의 생리활성물질에 관한 연구가 미흡한 실정이고, 면역과 염증 관련 연구가 국외에서는 수행되어 왔지만 비타민나무의 부위별 항염활성 효과 및 활성물질의 분리에 관한 연구는 없었다. 또한 비타민나무는 식품의약품안전청 식품원재료에 열매, 씨앗, 잎만 식용으로 등록되어 있어 매년 다량 생산되는 줄기 부산물에 대해서도 활용방안이 강구되어야 한다.

본 연구에서는 비타민나무의 줄기 활용방안을 위하여 중국 흑룡강성에서 2005년도에 도입되어 국내 여건에 맞게 재배되고 있는 비타민나무의 줄기 추출물을 대상으로 nitric oxide(NO) 생성량 측정, PGE₂ immunoassy, real-time PCR을 이용한 iNOS 단백질 발현양 측정, liquid chromatography를 이용한 물질 분리 등 항염활성 측정 및 물질을 구명하여 그 활용방안을 모색하고자 한다.

재료 및 방법

시료 채취 및 추출물 조제

본 실험에 사용된 비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.) 시료는 중국 흑룡강성에서 2005년 9월에 도입되었으며 HS-12 계통을 모본으로 강원도 춘천시 신북읍의 강원도 농업기술원 농산물이용시험장에서 재배되었다. Kim 등(21)의 방법에 따라서 2008년 8월 중순에 비타민나무의 줄기, 잎, 뿌리, 열매를 채취하여 50°C에서 원적외선 건조한 후 0.6 mm 이하로 마쇄하여 추출에 사용하였다.

유기용매를 이용한 분획물 조제

마쇄된 비타민나무 줄기, 잎, 뿌리, 열매 건조시료 100 g을 취하여 H₂O와 ethanol(EtOH) 2 L가 담겨 있는 5 L erlen-

meyer flask에 넣고 120 rpm의 진탕기(EURO STAR, IKA-Werke, Staufen, Germany)에서 12시간씩 2회 반복 추출하였다. 추출물을 여과지(No. 40, Whatman, Maidstone, England)가 깔려있는 Buchner funnel을 통과시켜 잔재물을 제거한 후 rotary vacuum evaporator(N-21NS, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 40°C에서 완전 농축한 다음, d-H₂O를 50 mL 첨가하였다. Flask 내의 건조물을 d-H₂O를 이용하여 용해시킨 다음 동결건조기(ILSHIN Lab Co. Ltd., Yangju, Korea)를 이용하여 건조한 후 수율을 계산하였다. 조추출물을 d-H₂O에 현탁시킨 후 용매의 극성에 따라 분획하여 n-hexane 층, dichloromethane(CH₂Cl₂) 층, ethyl acetate(EtOAc) 층, n-butanol(BuOH) 층 및 d-H₂O 층을 얻고 감압 농축하여 각각의 용매별 수율을 측정하였으며, -20°C의 냉동고에 보관하면서 항염활성 검정 및 분리·정제를 위한 시료로 사용하였다.

Nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO 소거활성은 한국세포주은행에서 분양받은 마우스의 대식세포 세포주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 측정하였다. 세포는 10%의 FBS가 함유된 DMEM media에서 계대배양하였다. NO 소거활성을 측정하기 위하여 세포를 24 well plate에 각 well당 2×10^5 cells를 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 그리고 final 농도를 1 mg/mL로 한 비타민나무 sample과 1 μ g/mL의 lipopolysaccharide (LPS) 20 μ L를 세포배양 well에 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 시료에 대한 대조구로는 1 μ g/mL의 lipopolysaccharide(LPS)만을 20 μ L 처리하여 활성화된 세포를 사용하였다. 배양 후 상등액 100 μ L를 회수하고 여기에 2-naphthylamine이 포함된 Griess solution(Fluka, Steinheim, Germany)을 첨가하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 상등액의 발색도를 ELISA reader(UVM-340, ASYS, Engendorf, Austria)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포가 생산한 NO는 sodium nitrate를 사용하여 표준곡선을 작성한 후 NO 함량을 정량하였다.

PGE₂ immunoassy

ParameterTM PGE₂ systems kit(R&D system, Abingdon, UK)를 이용하여 측정하였다. 상기에서 배양된 대조구, LPS 처리구, sample 처리구의 상등액 50 μ L를 96 well plate에 각각 분주한 다음 ParameterTM PGE₂ systems kit에 포함된 RD5-39 용액 150 μ L와 primary antibody 용액 50 μ L씩을 첨가하고, 추가적으로 PGE₂ conjugate 50 μ L를 넣고 adhesive strip으로 덮은 다음 25°C 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 각 well을 세척한 후 substrate solution 200 μ L를 넣고 25°C 상온에서 30분간 교반하였으며, 교반 후에는 stop solution 50 μ L를 첨가하여 ELISA reader(ASYU UVM-340, Biochrom, Cambridge, UK)로 450 nm와 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Real-time PCR을 이용한 iNOS 단백질 발현

Real-time PCR(CFX 96™ real-time system, BIO-RAD, Hercules, CA, USA)을 이용하여 iNOS 단백질 발현을 알아 보았다. 비타민나무로부터 분리한 MCD 추출물이 포함된 RAW 264.7 세포를 RNeasy Plus Mini kit(QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 순수 분리한 MCD 추출물의 total RNA로부터 cDNA를 합성하기 위하여 iScript cDNA Synthesis kit(BIO-RAD)를 사용하였다. 최종 부피 20 μ L로 45분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 본 연구에서는 β -actin은 forward 5'-TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT-3', reverse 5'-CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3', iNOS는 forward 5'-ATT GGC AAC ATC AGG TCG GCC ATC ACT-3', reverse 5'-GCT GTG TGT CAC AGA AGT CTC GAA CTC-3' PCR primers가 사용되었다.

비타민나무 줄기로부터 항염활성물질 분리 및 정제

비타민나무 줄기 에탄올 추출물로부터 분획된 5개의 분획 중 가장 항염활성이 높은 CH_2Cl_2 분획층을 medium pressure liquid chromatography system(Buchi 620, Flawil, Switzerland)을 사용하여 분리하였다. Silica gel(0.040~0.063 mm, Merck, Darmstadt, Germany)이 충전 되어 있는 26×460 mm glass column에 비타민나무 추출물 1 g을 주입하고 혼합용매(Hexane : CH_2Cl_2 : EtOAc : BuOH=1.5:7:1:0.5, v/v/v/v)를 분당 5 mL씩 용출시킨 다음 UV detector를 사용하여 흡광도 254 nm에서 측정하였으며, MCA-MCK(methylene chloride A-K)까지 총 11개의 fraction으로 분리되었고 회수율은 각각 10, 29, 18, 38, 44, 46, 158, 37, 447, 50, 25 mg이었다.

결과 및 고찰

추출물 수율

비타민나무를 줄기, 잎, 뿌리, 열매로 나누어 물과 에탄올로 추출한 수율은 물추출이 에탄올 추출보다 전반적으로 높았다. 물 추출물의 수율은 잎(24.5%)> 뿌리(15.2%)> 열매(11.5%)> 줄기(10.8%) 순으로 나타났다. 또한 부위별 에탄올 추출 수율은 뿌리(15.6%)> 잎(15.2%)> 열매(10.2%)> 줄기(9.5%)로 나타났다. 항염활성 효과가 높았던 비타민나무 줄기 에탄올 추출물을 유기용매를 이용하여 극성에 따라 분획하였을 때 추출 수율은 d- H_2O (32.2%)> BuOH(18.3%)> EtOAc(4.6%)> n-hexane(3.1%)> CH_2Cl_2 (0.1%)의 순으로 나타났으며(Fig. 1), 극성이 높은 용매에서 수율이 높았다.

비타민 나무 부위별 시료의 NO 생성량 측정

비타민나무 부위별 시료의 NO 생성량 측정을 통해 항염 효과를 확인한 결과, 모든 시료에서 물 추출물보다 에탄올 추출물이 더 높은 활성을 보였다. 그중 비타민나무의 줄기

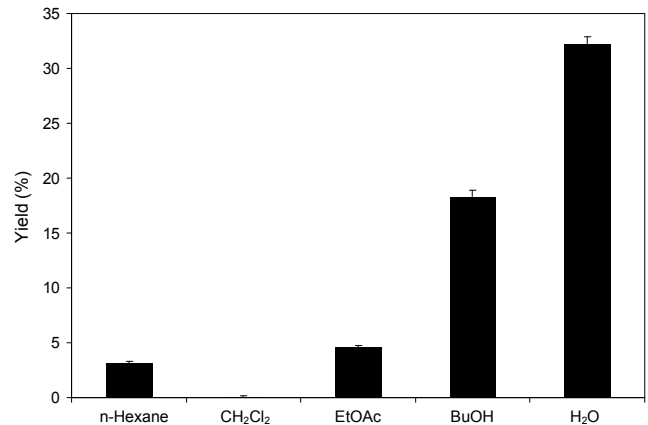


Fig. 1. Yield of various solvent extracts from ethanol extracts of *Hippophae rhamnoides* L. All values are mean \pm SD (n=3).

(에탄올 추출물)가 가장 높은 56.0%의 NO 생성억제효과를 보였으며, 그 다음으로는 뿌리(에탄올 추출물)와 잎(에탄올 추출물), 열매(에탄올 추출물)가 각각 49.1%, 31.9%, 18.9%의 순으로 나타났다. 특히 줄기(에탄올 추출물)의 경우에는 항염 유발물질인 LPS 단독 처리군과 비교하여 높은 NO생성 억제효과를 보였다(Table 1). 현재 한국에서 비타민나무는 열매를 이용한 가공 상품 및 잎을 이용한 차 등이 활용되고 있으나 줄기에 대한 활용 방안은 아직까지 보고되지 않았다. 이번 실험 결과를 바탕으로 향후 비타민나무 줄기는 부산물을 이용한 상품 개발 및 다양한 용도로 활용될 수 있을 것이다.

분획물의 NO 생성량 측정

항염 효과가 우수했던 비타민나무 줄기 에탄올 추출물을 다시 극성 용매로 순차 분획하여 NO 소거능을 측정된 결과 LPS 대비 CH_2Cl_2 (80%)> EtOAc(39%)> H_2O (21%)> BuOH(16%) 순으로 항염활성이 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과는 CH_2Cl_2 분획층의 NO 생성억제 효과가 탁월하였기 때문에 NO의 생성과 밀접한 관계가 있는 유도형 NO synthase

Table 1. Inhibitory activities of extracts from leaves, stem, root, and fruit of *Hippophae rhamnoides* L. on the production of nitric oxide in RAW 264.7 cell

Sample ¹⁾		Nitrite (μ M)
Control		1.7 \pm 0.3 ²⁾
LPS		18.6 \pm 0.4
Stem	H_2O	20.4 \pm 0.7
	Ethanol	9.1 \pm 0.4
Leaf	H_2O	16.5 \pm 0.7
	Ethanol	13.2 \pm 0.6
Root	H_2O	16.4 \pm 1.1
	Ethanol	10.8 \pm 0.4
Fruit	H_2O	15.8 \pm 0.4
	Ethanol	15.4 \pm 0.8

¹⁾Treatment concentration of samples: 1 mg/mL.

²⁾All values are mean \pm SD (n=3).

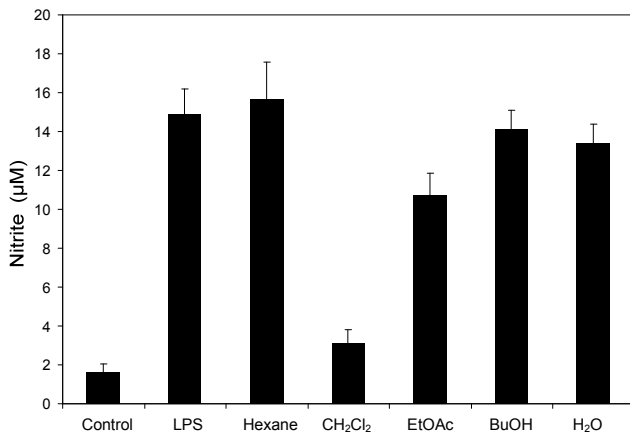


Fig. 2. Inhibitory effects of each fraction (1 mg/mL) of *Hippophae rhamnoides* L. on the production of nitric oxide in RAW 264.7 cell. All values are mean \pm SD (n=3).

(iNOS)에도 많은 영향을 줄 것이라 추론된다. 한편 CH₂Cl₂ 분획층의 NO 생성억제 효과가 탁월하였지만 회수율과의 상관관계를 볼 때 산업적으로 이용 시에는 적절한 추출 용매의 선택 및 추출 방법의 표준화를 통해 그 활용도를 극대화하는 방안을 강구해야 할 것이다.

CH₂Cl₂ 분획물로부터 분리된 물질의 NO 생성량 측정

MCA-MCK까지 총 11개 fraction에 대해서 NO 생성량을 측정하였다. 그 결과 MCD, MCE, MCF fraction에서 대조군에 비하여 높은 항염활성이 나타났다. 그중에서 MCD는 0.1 mg/mL 농도에서 LPS 단독 처리군 대비 65%의 가장 높은 저해활성을 나타내었다(Fig. 3). MCD는 전체 CH₂Cl₂ 분획물 중 3.8%의 비교적 높은 회수율을 보였다.

MCD의 항염활성 검증

가장 활성이 높았던 MCD에 대하여 염증 유발 매개체인 prostaglandin E₂(PGE₂)의 생성 억제 효능을 평가하였다. LPS로 활성화된 세포에서 PGE₂의 생합성이 증가하는 것을

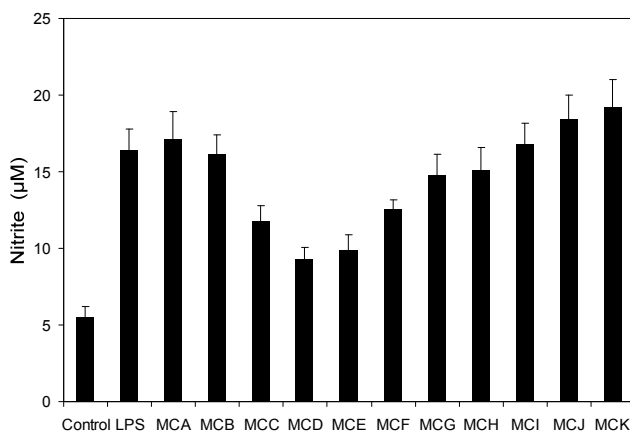


Fig. 3. Inhibitory effects of eleven fractions (MCA-MCK) obtained from CH₂Cl₂ layer of *Hippophae rhamnoides* L. on the production of nitric oxide in RAW 264.7 cell. All values are mean \pm SD (n=3).

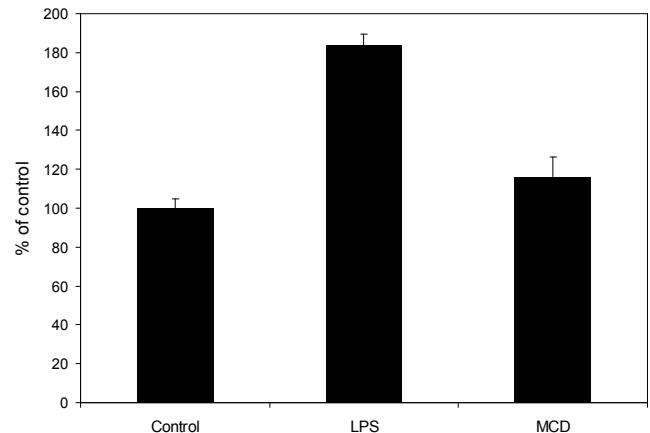


Fig. 4. Effect of MCD (0.1 mg/mL) isolated from dichloro-methane extract of *Hippophae rhamnoides* L. on induced PGE₂ released in RAW 264.7 cell. All values are mean \pm SD (n=3).

확인하였으며, 비타민나무로부터 분리된 MCD를 0.1 mg/mL 농도로 처리 시 LPS 단독 처리군 대비 약 75% 정도 PGE₂ 생성이 감소된 것을 확인하였다(Fig. 4). 이는 현삼과 (Scrophulariaceae) 오동나무 잎 추출물의 PGE₂ 생성 억제 효능 평가 결과 오동나무 추출물을 0.1 mg/mL 농도로 처리 시 약 40% 정도 PGE₂ 생성이 감소된 것과 비교했을 때 MCD가 PGE₂ 생성억제에 상당히 효과적임을 알 수 있었고(22), MCD는 NO 생성에 관련된 매커니즘뿐만 아니라 PGE₂의 생성 경로에도 영향이 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 체내 염증과정에서 PGE₂ 염증 인자는 cyclooxygenase(COX-2)에 의해 형성되는데, COX-2는 arachidonic acid를 pro-staglandins(PGs)로 전환시키는 효소이다. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장 기능의 유지 등 정상적 생체기능에 작용하지만 COX-2는 염증매개물질인 PGE₂를 형성시킨다(23). 비타민나무 추출물에 의한 PGE₂의 생성 저해는 염증전구물질의 형성억제를 나타내는 것으로 향후 비타민나무에서 분리된 MCD의 COX-2에 미치는 영향에 대해 평가되어야 한다.

MCD를 real-time PCR을 이용하여 iNOS 단백질 발현을 알아보았다. 현재 많은 정량분석 연구에 이용되고 있는 real-time PCR은 PCR의 각 증폭주기마다 만들어지는 amplicon의 생성량을 형광의 변화를 관찰하여 시료 중 mRNA의 함량을 평가하는 것이다. 본 연구의 결과 MCD는 LPS 단독 처리군 대비 약 91% 정도 iNOS mRNA 발현을 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 5). iNOS는 상대적으로 일부세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 type II인 유도형 NOS(iNOS)로(24) NOS들은 L-arginine을 L-citrulline으로 전환시키면서 NO를 형성한다. 이들 NOS 중 iNOS에 의한 NO 생성이 대부분을 차지한다. MCD의 경우 NO 소거능이 높았던 것과 마찬가지로 iNOS 단백질 발현을 효과적으로 저해하였다는 것을 알 수 있다(Fig. 5). 향후 tumor necrosis factor- α (TNF- α),

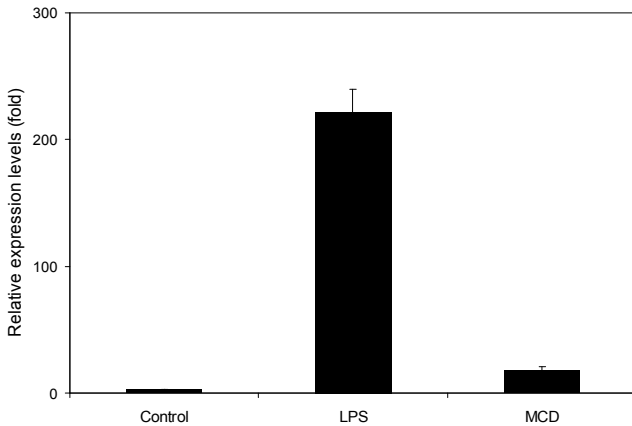


Fig. 5. Inhibition of iNOS gene expression by MCD isolated from dichloromethane extract of *Hippophae rhamnoides* L. All values are mean \pm SD (n=3).

interleukin(IL)-1, IL-6 등 여러 염증성 매개체들에 대해서 mRNA의 함량 평가 및 단백질 발현량 평가를 통해 구체적인 비타민나무의 항염 매커니즘에 대해 연구가 진행되어야겠다.

비타민나무 줄기에서 단리된 물질의 구조 동정

비타민나무 줄기 에탄올 추출물의 CH_2Cl_2 분획물에서 분리된 MCD의 구조를 구명하기 위하여 GC/MS(CP-3800, Varian, CA, USA), $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Bruker Avance 600, Bruker, Rheinstetten, Germany), $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, Bruker Avance 600, Bruker)을 이용하여 분석하였다.

비타민나무 줄기에서 분리된 MCD의 MS peak를 NIST library search한 결과 특징적인 fragment ion은 m/z 414, 396, 329, 303, 273, 255, 231, 213에 나타났다. 물질의 구조를 구명하기 위하여 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3)을 실시한 결과 δ 5.35(1H, m, H-6), 3.52(1H, m, H-3), 1.01(3H, s, CH_3), 0.93(3H, d, $J=6.5$ Hz, CH_3), 0.86(3H, t, $J=6.5$ Hz, CH_3), 0.85(3H, d, $J=6.7$ Hz, CH_3), 0.83(3H, d, $J=6.7$ Hz, CH_3), 0.68(3H, s, CH_3)에서 proton signal이 확인되었다. δ 5.35에서 1H분의 olefinic proton signal이 관찰되었다. δ 3.52에서는 C-3에서 1H분의 proton signal이 multiplet으로 관찰되었다. δ 0.68과 1.01에서 3H분의 methyl proton signal이 각각 singlet으로 관찰되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) spectrum에서는 140.75(C-5), 121.72(C-6), 71.81(C-3), 56.76(C-14), 56.05(C-17), 50.13(C-9), 45.84(C-24), 42.31(C-4), 42.31(C-13), 39.77(C-12), 37.25(C-1), 36.51(C-10), 36.14(C-20), 33.94(C-22), 31.91(C-2), 31.91(C-8), 31.67(C-7), 29.15(C-25), 28.24(C-16), 26.07(C-23), 24.3(C-15), 23.07(C-28), 21.09(C-11), 19.82(C-26), 19.4(C-19), 19.03(C-27), 18.78(C-21), 11.98(C-18), 11.85(C-29)에서 총 29개의 carbon signal을 관찰할 수 있었다. δ 71.81에서 나타나는 탄소 signal은 hydroxyl기에서 기인하는 것이고, δ 140.75, 121.72에서는 C-5,6의 이중결합이 있는 것으로 추정되었다. 이상의 spectral data와 mass spectrum 및 문헌(25,26)과 비교하여 MCD는

β -sitosterol로 동정하였다.

비타민나무 줄기로부터 분리된 β -sitosterol은 식물세포막의 구성성분인 스테롤(phytosterol)이다. 대표적인 식물 스테롤로는 β -sitosterol, β -sitostanol, campesterol, stigmasterol 등이 있으며, 특히 옥수수과 대두에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. Kahn 등(27)은 개똥쭉(*Artemisia annua*)에서 분리된 β -sitosterol이 항바이러스 효과가 있음을 보고하였으며, Gupta 등(28)은 향부자(*Cyperus rotundus*)에서 분리한 β -sitosterol이 류머티즘 염증성 관절염 치료제인 hydrocortisone와 유사한 항염 효과가 있음을 보고하였으며, 이는 비타민나무에서 추출한 β -sitosterol의 높은 항염 활성 효과와 유사한 결과임을 알 수 있었다.

본 연구를 통하여 구명된 항염활성물질인 β -sitosterol은 향후 *in vivo* 실험과 독성평가를 통하여 관절염이나 다양한 염증질환을 대상으로 주요 염증매개물질들의 생성이나 활성을 억제할 수 있는 염증 질환치료제, 기능성식품 개발에 활용될 수 있을 것이라 사료된다. 현재 비타민나무의 활용은 열매를 이용한 음료, 잎을 활용한 차 등이 대부분이지만 이번 연구 결과 비타민나무 줄기는 항염활성이 높음을 확인할 수 있었고 줄기 부산물을 이용한 가축사료, 가공품 등 다양한 기능성 소재로 활용될 가능성이 높은 것으로 나타났다.

요 약

이번 연구는 강원도 춘천에서 재배된 비타민나무의(*Hippophae rhamnoides* L.) 부위별 추출물을 대상으로 항염활성 작용에 미치는 영향을 구명하였고, 이에 함유되어 있는 항염활성물질을 fraction directed isolation 방법으로 단리하였다. 항염활성 측정을 위하여 비타민나무의 줄기, 잎, 뿌리, 열매의 에탄올 추출물에 대하여 nitric oxide(NO) 생성량 측정 결과 염증 유발 물질인 lipopolysaccharide(LPS) 대비 각각 56.0, 31.9, 49.1, 18.9%의 저해 활성을 나타내었다. 비타민나무 줄기를 다시 극성을 달리하여 용매로 분획을 실시하였고 각각의 분획층에 대하여 NO 생성량 측정 결과 CH_2Cl_2 분획층(1 mg/mL)에서 염증유발물질인 LPS 단독 처리군 대비 80%의 높은 항염활성을 나타내었다. 이에 항염활성이 가장 높았던 dichloromethane 분획층을 MCA-MCK까지 총 11개 분획층으로 분리하였고, 이 11개의 분획층에 대하여 NO 생성량을 측정한 결과 MCD 분획층이 0.1 mg/mL 농도에서 LPS 대비 65%의 가장 높은 항염활성을 나타내었다. MCD의 구조를 밝히기 위하여 GC/MS, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-NMR}$ 분석을 수행한 결과, 항염활성물질 MCD는 분자량 414.71 g/mol, 화학구조식이 $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ 인 β -sitosterol로 결정하였다. 향후 비타민나무 줄기는 염증예방 효능을 지닐 수 있는 기능성식품 및 의약품의 원료, 가공품 등 다양하게 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

문헌

- Kim HK, Na GM, Ye SH, Han HS. 2004. Extraction characteristics and anti-oxidative activity of *Schizandra chinensis* extracts. *Korean J Food Culture* 19: 484-490.
- Kim SA, Oh SI, Lee MS. 2007. Antioxidative and cytotoxic effects of solvent fractions from *Elaeagnus multiflora*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 20: 134-142.
- Lee SJ, Lee IS, Mar W. 2003. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 activity by 1,2,3,4,5-penta-O-galloyl- β -D-glucose in murine macrophage cells. *Arch Pharm Res* 26: 832-839.
- Talhok RS, Karam C, Fostok S, El-Jouni W, Barbour EK. 2007. Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. *J Med Food* 10: 1-10.
- Yoon WJ, Lee JA, Kim KN, Kim JY, Park SY. 2007. In vitro anti-inflammatory activity of the *Artemisia fukudo* extracts in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Korean J Food Sci Technol* 39: 464-469.
- Fenton MJ, Golenbock DT. 1998. LPS-binding proteins and receptors. *J Leuko Biol* 64: 25-32.
- Glaser MP. 1996. The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. *Drugs* 52: 9-17.
- Rousi A. 1977. The genus *Hippophae* L. a taxonomic study. *Ann Bot Fennici* 8: 177-227.
- Kato K, Kanayama Y, Ohkawa W. 2007. Nitrogen fixation in Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) root nodules and effect of nitrate on nitrogenase activity. *J Japan Soc Hort Sci* 76: 185-190.
- Kim KM, Park MH, Kim KH, Lim SH, Park YH, Kim YN. 2009. Analysis of chemical composition and *in vitro* anti-oxidant properties of extracts from Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J Kor Soc Appl Biol Chem* 52: 58-64.
- Chauhan AS, Negi PS, Ramteke RS. 2007. Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds. *Fitoterapia* 78: 590-592.
- Padwad Y, Ganju L, Jain M. 2006. Effect of leaf extract of Seabuckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 6: 46-52.
- Chen Y, Jiang Z, Qin W, Ni M, Li X, He Y. 1990. Chemical composition and characteristics of Seabuckthorn fruit and its oil. *Chem Industry Forest Prod* 10: 163-175.
- Yang B, Heikki K, Rajia T. 1999. Effects of dietary supplementation of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) oils on fatty acids in patients with atopic dermatitis. *J Nutr Biochem* 10: 622-630.
- Tiffany TYG, Stefan C, Arnie H. 2005. Effect of drying on the nutraceutical quality of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis*) leaves. *J Food Sci* 70: 514-518.
- Jeong JH, Lee CO, Lee JW, Choi EY, Kim JH, Han SN, Yu CY, Kim MJ. 2008. Biological activities of extract and fractions from *Hippophae rhamnoides* L. root and stem. *Korean J Medicinal Crop Sci* 16(suppl 1): 240-241.
- Han SN, Lee JW, Jeong JH, Lee CO, Kim JK, Yu CY, Kim MJ. 2007. Alcohol dehydrogenase activities from *Hippophae rhamnoides* L. stem. *Korean J Medicinal Crop Sci* 15 (suppl 1): 197-198.
- Upadhyay NK, Kumar R, Mandotra SK. 2009. Safety and healing efficacy of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil on burn wounds in rats. *Food Chem Toxicol* 47: 1146-1153.
- Ganju L, Padwad Y, Singh R. 2005. Anti-inflammatory activity of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *Int Immunopharmacol* 5: 1675-1684.
- Yang ZG, Li HR, Wang LY, Li YH, Lu SG, Wen XF, Wang J, Daikonya A, Kitankak S. 2007. Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and their nitric oxide production-inhibitory and DPPH radical-scavenging activities. *Chem Pharm Bull* 55: 15-18.
- Kim HY, Choi HJ, Lim SH, Heo SJ, Han SS, Kim DS, Hwang KH, Kim S. 2003. Herbicidal activity of Korean native plants (I). *Kor J Pest Sci* 7: 248-257.
- Kim NK, Kim MH, Yoon CS, Choi SW. 2006. Studies on the anti-inflammatory activity of *Paulownia coreana* Uyekii leaf extract. *J Soc Cosmetic Sci Kor* 32: 241-247.
- Duerksen-Hughes PJ, Day D, Laster SMA, Zacharidaes NA, Aquino L, Gooding LR. 1992. Both tumor necrosis factor and nitric oxide participate in lysis of simian virus 40-transformed cells by activated macrophages. *J Immunol* 149: 2114-2122.
- Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
- Moghaddam FM, Farimani MM, Salahvarzi S, Amin G. 2006. Chemical constituents of dichloromethane extract of cultivated *Satureja khuzistanica*. *eCAM* 26: 1-4.
- Yu YP, Kang SS, Kim CM. 1990. A study on the chemical constituents of *Tilia koreana* Nakai. *Kor J Pharmacogn* 21: 265-269.
- Kahn MMAA, Jain DC, Bhakuni RS, Mohd Z, Thakur RS. 1991. Occurrence of some antiviral sterols in *Artemisia annua*. *Plant Sci* 75: 161-165.
- Gupta MB, Nath R, Srivastava N, Shanker K, Kishor K, Bhargava KP. 1980. Anti-inflammatory and antipyretic activities of β -sitosterol. *Planta Med* 39: 157.

(2010년 3월 30일 접수; 2010년 5월 17일 채택)