

접골목 추출물에 의한 항산화 활성이 정상 간세포의 t-BHP 유발 산화스트레스에 미치는 영향

김기태*

세명대학교 한의과대학 내과학교실

Abstract

Antioxidant Activity and Protective Effects of Extracts from *Sambucus williamsii var. coreana* on
t-BHP Induced Oxidative Stress in Chang cells

Kitae, Kim

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Semyung University

In the present study, antioxidant activity and protective effect of extracts from *Sambucus williamsii var. coreana* stems (SWC) were evaluated on *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) induced oxidative stress in human liver (Chang) cells. Antioxidant activities of the SWC extracts were determined by various radical scavenging activities, such as DPPH, ferric reducing antioxidant power (FRAP), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. SWC extracts showed strong antioxidant effect on various assay. To determine the hepatoprotective effects of SWC on *t*-BHP induced oxidative damage, cell viability was measured using MTT assay. Pretreatment of SWC extracts showed increasing cell viability, decreasing ROS and restoring mitochondria membrane potential on *t*-BHP induced oxidative stress in Chang cells. Our findings suggest that SWC extracts may be considered a potential agent for therapeutic protective effect from oxidative stress through its antioxidant activity.

Key Words

antioxidant activity, *t*-BHP, *Sambucus williamsii var. coreana.*, oxidative stress

* 교신저자 : 김기태 / 소속 : 세명대학교 한의과대학 내과학교실

Tel: 043-649-1815 / E-mail: onehorn@hanmail.net

투고일 : 2013년 11월 29일 수정일 : 2013년 12월 20일 게재확정일 : 2013년 12월 21일

I. 서론

호흡을 통해 체내에 들어온 산소는 에너지를 생성하는 생명체의 생명유지에 절대적으로 필요한 물질이지만, 신진대사 과정에서 산소 중의 일부는 자연적으로 반응성이 강한 활성산소로 전환된다. 생체 내 이물이나 독소를 제거하는 동안 간에서 생성된 활성산소는 강한 산화력 뿐 아니라 구조적으로 매우 불안정한 특징을 가지는데, 정상적인 조건의 세포내에서는 간조직에 풍부한 내인성 항산화제에 의해 소거된다. 활성산소종과 내인성 항산화제의 불균형으로 인해 생긴 산화적 스트레스는 다양한 간 질병과 관련되므로 생체내의 활성산소의 생성을 억제하는 것은 질병 치료와 예방에 중요한 역할을 한다¹⁻³⁾. 생체 내 활성산소의 불균형을 조절하기 위한 연구는 다양하게 진행되어 왔는데, 안정성 확보를 위하여 폴리페놀과 플라보노이드 및 여러 가지 천연물 유래의 천연 항산화 물질에 대한 연구가 진행되었다⁴⁾.

접골목(*Sambucus williamsii* var. *coreana*)은 인동과 딱총나무속에 속하며 낙엽 활엽관목으로 산지의 습지 및 골짜기에 자란다. 우리나라에 자생하는 딱총나무속 종류로는 딱총나무(*Sambucus williamsii* var. *coreana*), 넓은잎딱총나무(*Sambucus latipinna* NAKAI), 덧나무(*Sambucus sieboldiana* BLUME), 지렁쿠나무(*Sambucus sieboldiana* var. *miquelii*) 등 여러 종류가 있으며 한약재로 딱총나무속에 속하는 나무를 접골목으로 사용해왔다.

접골목은 예로부터 뼈에 좋은 약재로 알려져 왔으며, 임상에서는 잎, 줄기, 뿌리, 꽃 등을 다양하게 쓰고 있는데 먼저 잎은 活血, 行瘀, 止痛, 打撲, 骨折, 류머티즘에 의한 痺痛, 筋骨疼痛을 치료하는데 사용되었다. 꽃은 利尿, 發汗 작용으로 사용되었고 줄기는 祛風, 利濕, 活血, 止痛의 효능으로, 뿌리는 류머티즘성 疼痛, 痰飲, 水腫, 熱痢, 黃疸, 打撲傷, 火傷에 사용하였다⁵⁾.

접골목의 생리활성성분으로는 emulsin, tannin, resin 등⁶⁾과 α -amyrin, oleanolic acid, ursolic acid, β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, cerylalcohol, betulin, betulic acid, vanillin, acetovanillone, coniferyl alcohol, syringaldehyde, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, protocatechuic acid, sambucunol A, sambucunol B, buddlenol G, (-)-syringaresinol, (-)-pinosresinol, 3-propanediol, (-)-dihydrodehydro-diconiferyl alcohol, (-)-laricresinol, sitosterol-3-glucoside 등의 화합물을 함유하고 있다고 보고되었다^{7,8)}.

접골목의 생리활성에 관한 연구로는 딱총나무에서 분리된 triterpene류, 페놀류 등 화합물에 대한 쥐의 성골세포(UMR106)에 대한 증식, 분화에 미치는 연구⁹⁾ 및 ALP (alkaline phosphatase)의 활성 연구¹⁰⁾와 최근 연구로는 접골목추출물 및 약침액이 관절염에 미치는 영향¹⁰⁾, 항산화 효과에 관한 연구¹²⁾가 보고 되었다. 이처럼 접골목에 관한 연구는 생리활성 성분 분석에 관한 연구와 몇몇 생리활성에 관한 연구가 이루어졌을 뿐 항산화 활성 및 세포보호 효과에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 접골목 추출물의 항산화 활성 및 *t*-BHP로 유도한 산화스트레스로부터 세포 보호능을 검토하여 접골목의 항산화 소재 개발의 기초 자료를 얻고자 수행하였고 그 결과 몇 가지 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 추출

본 실험에 사용한 접골목은 경상북도 영천이 원산지로 한약재시장에서 구입하였으며, 접골목의 줄기 및 잔가지를 세절하여 사용하였다. Folin-Ciocalteu's

reagent, Ferrous chloride, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP), 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ), 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), potassium persulfate, silymarin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하여 사용하였으며, 그 외에 사용된 시약은 특급 및 일급을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 시료 추출은 시료 100 g을 3차 증류수 1 L를 첨가하여 95°C에서 90분 동안 추출하였다. 추출물은 여과지로 잔사를 제거한 후 rotary vacuum evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고 동결건조하여 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis¹³⁾을 약간 변형하여, 시료 1.0 mL에 1.0 N Folin-Ciocalteu 시약 및 20% Na₂CO₃ 용액을 각 1.0 mL씩 차례로 가하여 잘 섞어주고 실온에서 30 분 반응시킨 후 microplate reader (BioTek, Winooski, USA)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 0-200 µg/mL의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 곡선으로부터 시료 추출물의 총 폴리페놀 함량을 산출하였고 gallic acid equivalents (mg GAE/g extract)로 나타내었다.

3. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Jia 등¹⁴⁾의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 추출물 0.5 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL 및 1.0 M potassium acetate 0.1 mL, ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40 분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin (Sigma Co.)을 표준물질로 하

여 0 ~ 1 mg/mL의 농도 범위에서 얻어진 표준 곡선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

4. DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical에 대한 소거활성은 Blois¹⁵⁾의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 각 시료 0.5 mL에 100 µM DPPH 3 mL를 넣고 vortex한 후 15분 동안 실온의 명반응조건에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 (%)은 다음 식으로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능 (%) = (1- 반응구의 흡광도/대조구의 흡광도) X 100

5. ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력 측정

ABTS 라디칼을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 유리 라디칼이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 Re 등¹⁶⁾의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 어두운 곳에서 14-16시간 동안 반응시켰다. 이를 414 nm에서 흡광도가 1.5 가 되도록 증류수로 조정한 후 3.0 mL를 취하여 추출물 1.0 mL를 가하여 실온에서 10분 간 반응시켜 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 Trolox를 표준물질로 하여 mM Trolox eq./mg extract으로 나타내었다.

6. FRAP (Ferric reducing antioxidant power)을 이용한 총 항산화력 측정

FRAP 측정은 Benzie와 Strain¹⁷⁾의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 즉, 300 mM acetate buffer

(pH 3.6), 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ 및 20 mM FeCl₃·6H₂O를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP 시약을 제조하였다. 시료액 0.15 mL과 3.0 mL의 FRAP 시약을 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 FeSO₄·7H₂O를 표준물질로 하여 mM FeSO₄ eq./mg extract으로 표시하였다.

7. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 측정

접골목 추출물의 항산화 활성을 peroxy radical의 생성과 소멸에 의한 fluorescent의 감소율로 측정하였다. 과산화 라디칼의 생성을 위해 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)를 사용하였고, 항산화 활성 비교 표준액으로 20 μM Trolox를 사용하였다. Fluorescent 표준용액은 Ou 등¹⁸⁾의 방법을 약간 변형하여 fluorescein sodium salt (Sigma-Aldrich Co.)를 75 mM phosphate buffer에 가하여 7.8 μM 농도로 제조하였다. 항산화 활성의 측정은 접골목 추출물과 표준용액 50 μL에 fluorescent 표준용액 50 μL를 가하고, 과산화 라디칼 유발물질인 AAPH를 인산완충액에 가해 221 mM로 희석한 후 25 μL를 가하여 반응시킨 후, spectrofluorometer (SpectraMax M2/M2e, CA, USA)를 사용하여 excitation 485 nm, emission 538 nm에서 2시간 동안 5분마다 형광을 측정하였다. ORAC는 trolox를 이용하여 산출하였는데, 그 식은 다음과 같다.

$$\text{ORAC}(\mu\text{M TE}) = \frac{C_{\text{trolox}}}{(AUC_{\text{Sample}} - AUC_{\text{Blank}})} \cdot (AUC_{\text{Sample}} - AUC_{\text{Blank}})$$

C_{trolox} 는 trolox의 농도 (20 μM), C_{sample} 은 샘플의 농도 (g/L)이며 AUC (Area under curve) 계산식은 다음과 같다.

$$\text{AUC} = 1 + f_5/f_0 + f_{10}/f_0 + \dots + f_{n+5}/f_0$$

8. 세포 배양

정상 간세포(human liver cells, Chang)를 불활성화한 10% fetal bovine serum (FBS)과 1.0% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지에서 37°C 및 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

9. 세포 독성 측정 및 t-BHP에 의한 세포의 손상으로부터 간세포 보호 효과 측정

세포 독성 및 간세포 보호 효과는 MTT colorimetric assay로 세포의 생존율을 측정하였다. 우선 세포 독성 측정은 Chang 세포를 48-well plates에 7×10^3 cells/well 농도로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후, 각 시료를 최종 농도(0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/mL)가 되도록 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액을 가하고 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에 떨어져나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. DMSO를 200 μL 분주하고 20분 동안 혼합하여 세포 내 formazan crystal을 용해시켜 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

t-BHP에 의한 산화적 손상에 대한 접골목 추출물의 세포보호 효과를 관찰하기 위하여, Chang 세포를 48-well plates에 7×10^3 cells/mL 농도로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후, 각 시료를 최종 농도(0, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL)가 되도록 세포에 한 시간 전 처리한 후 t-BHP(최종농도 100 μM)를 첨가하고 24시간 더 배양하였다. 이후 MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다. 대조군으로는 간질환 치료보조제로 사용하고 있는 실리마린을 사용하였다.

10. 세포내 활성 산소종(ROS) 소거능

활성산소와 반응하여 형광을 발산하는 2',7'-di-

Table 1. Extraction yields, total polyphenol and total flavonoid contents of *Sambucus williamsii* var. *coreana* extracts.

Sample	Extraction yields (% w/w)	Total polyphenol (mg GAE/g extract) ^a	Total flavonoid (mg CE/g extract) ^a
SWC	4.4 %	33.23 ± 0.23	9.97 ± 1.38

GAE (gallic acid equivalents), CE (catechin equivalents).

^a Values represent means ± SD (n=4)

chlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하여 세포 내에서 발생하는 활성산소의 양을 Fluorospectrometer (SpectraMax M2/M2e, CA, USA)를 이용하여 (excitation, 485 nm; emission, 538 nm) 로 측정하였다. 96 well black plate에 2 x 10⁴개의 Chang 세포를 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 배양한 후, 여러 가지 농도의 시료를 한 시간 전처리 하였다. 200 μM t-BHP를 30분 처리한 다음 DCF-DA를 최종농도 10 μM이 되도록 넣고 37°C에서 30분간 더 배양하고 PBS로 3회 세척한 후 측정 하였다.

11. Mitochondrial membrane potential (MMP, Δψ m) 측정

6 well plate에 1 x 10⁵ 개의 Chang 세포를 분주한 후, 24 시간 배양하였다. 시료를 1시간 전처리 하고, t-BHP (100 μM)을 24 시간 처리 한 후, 10 μM Rhodamin123을 처리하여 30분 동안 37°C에서 반응시켰다. 반응시킨 세포를 회수하고 1,500 rpm으로 원심분리하여 상층액을 버린 후 세포들만 모았다. 1 mL의 차가운 PBS로 세척하고 원심분리한 후, 300 μL의 PBS를 첨가하여 FACS Calibur flow cytometer (Becton & Dickinson Co., USA) 를 이용하여 MMP의 변화 정도를 분석하였다.

12. 통계분석

각 군 간의 유의성의 검증은 GraphPad Prism 5.0

version을 이용하여 One-way ANOVA 중 Tukey test 로 검증하여 p값이 0.05 미만을 유의한 것으로 간주 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 수율, 총폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량

접골목 추출물의 수율은 5.4 %였다. 접골목의 총 폴리페놀 함량, 총플라보노이드 함량을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Gallic acid를 표준물질로 하여 총폴리페놀 함량을 분석한 결과 1.0 g의 접골목 추출물은 33.23 ± 0.23 mg GAE의 함량을 나타내었다. 접골목의 총플라보노이드 함량을 분석한 결과는 catechin을 표준물질로 나타내었다. 추출물 1.0 g의 총플라보노이드 함량은 9.97 ± 1.38 mg CE의 함량을 나타내었다. Chae 등¹²⁾이 딱총나무 추출물의 총 폴리페놀 함량 분석한 결과 2.0 ± 1.2 mg를 나타내었는데, 추출물의 총폴리페놀 함량 차이가 나는 이유는 침지하여 추출한 것과 끓여서 추출한 추출 방법의 차이에 의한 것이라고 판단되며, 물에 침지하여 추출하는 것보다 끓여서 추출하는 경우 총폴리페놀 함량이 높은 것으로 판단된다.

2. DPPH 라디칼 소거 활성

DPPH 라디칼은 비교적 안정한 프리라디칼이기 때문에, 다양한 천연물로부터 항산화 물질을 검색하

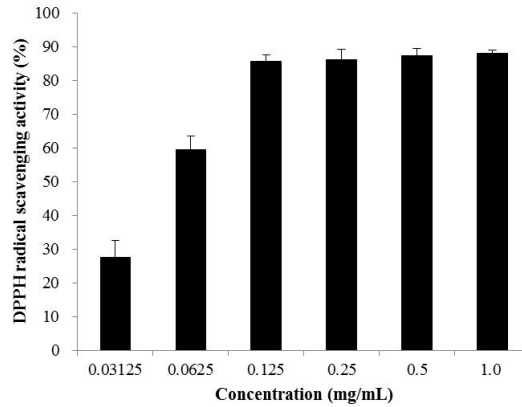


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of *Sambucus williamsii* var. *coreana* extracts.

^a Values represent means \pm SD ($n=4$)

Table 2. ABTS radical scavenging, FRAP activity and ORAC values of *Sambucus williamsii* var. *coreana* extracts.

Sample	TEAC (mM Trolox eq./mg extract) ^a	FRAP (mM FeSO ₄ eq./mg extract) ^a	ORAC (μ M TE) ^a
SWC	0.452 \pm 0.025	0.521 \pm 0.018	114.57 \pm 0.64
BHT	1.267 \pm 0.121	1.123 \pm 0.153	20.48 \pm 4.51

TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), FRAP (Ferric reducing antioxidant power), ORAC (Oxygen radical absorbance capacity). ^aValues represent means \pm SD ($n=4$)

는데 많이 이용 되고 있다¹⁹). 접골목 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 접골목 추출물의 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 0.125 mg/mL 농도까지 85%의 높은 라디칼 소거활성을 나타내었다.

3. ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력

DPPH 라디칼 소거활성과 같이 일반적으로 많이 이용되는 ABTS 라디칼 소거활성은 ABTS와 potassium persulfate와의 반응으로 ABTS^{•+} radical이 생성되면 특유의 색인 청록색을 띠게 되는데, 시료를 첨가함에 따라 연한녹색으로 decolorization 되는 것을 측정하는 방법이며, hydrogen donating antioxidant

와 chain breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있다. 접골목 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성을 평가한 결과, Table 2에 나타난 것처럼 1.0 mg/mL의 농도에서 0.452 \pm 0.025 mM Trolox eq./mg extract를 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 BHT와 비교하여 낮은 활성을 보였다.

4. FRAP을 이용한 총 항산화력

FRAP assay는 시료 내의 총 항산화력을 측정하는 방법 중 하나로 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine (Fe³⁺-TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine (Fe²⁺-TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용하여 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여 고안되어진 방법이다²⁰). 접골목

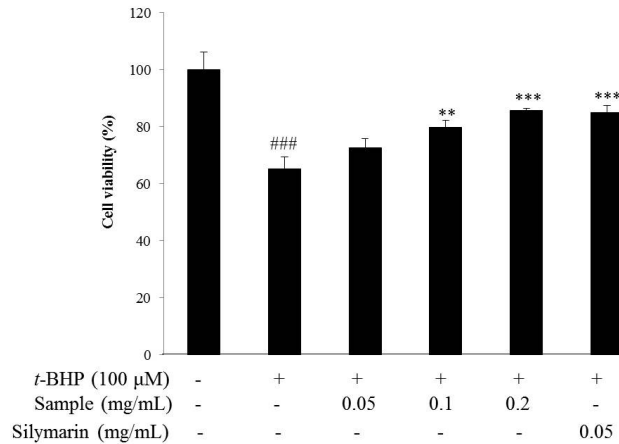


Fig. 2. Protective effect of *Sambucus williamsii* var. *coreana* extracts on t-BHP induced oxidative damage in Chang cells. Cells were pre-treated with various concentrations of SWC extracts for 1 hr, and then were treated with t-BHP (100 μM) for 24 hr. ###p<0.001 versus control, **p< 0.01, ***p<0.001 versus t-BHP are significantly different as analyzed by One way ANOVA followed by Tukey' s test.

추출물의 FRAP을 이용한 총항산화력 평가 결과, 0.521 ± 0.018 mM FeSO₄ eq./mg extract로 높은 항산화 활성을 보였으며, 양성 대조군으로 사용한 BHT 보다는 낮은 활성을 나타내었다 (Table 2). 기존 연구에 의하면 식물로부터 추출된 페놀류의 화합물은 페놀함량이 높을수록 항산화력이 증가한다고 보고하였는데, 접골목 추출물은 높은 항산화 활성을 보였으나 절대적 페놀 함량에 있어서는 우수한 항산화력을 나타낸 다른 식물 추출물보다 적게 함유하고 있기 때문인 것으로 사료된다.

5. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)에 의한 항산화 활성

ORAC assay는 AAPH에 의해 생성된 free radical에 대한 항산화 물질의 소거능력, 즉 radical chain breaking antioxidant capacity를 AUC (Area under curve)를 측정하는 항산화능 측정 방법이다. Trolox를 표준물질로 사용하여 AAPH에 의해 생성된 peroxy radical에 대한 소거활성을 형광도로 측정하였

으며, 접골목 추출물 1.0 mg/mL의 농도의 ORAC은 114.57 ± 0.64 μM TE 이었으며, 양성 대조군으로 사용한 BHT 1.0 g/mL의 농도의 ORAC은 20.48 ± 4.51 μM TE로 나타나, 접골목 추출물의 peroxy radical 소거활성이 BHT에 비해 월등히 높았다 (Table 2). 또한, Yang 등²¹⁾은 국내 자생 자원식물 140종을 ORAC assay 및 DPPH assay를 이용하여 항산화 효능을 screening 하였는데, trolox를 ORAC value를 1로 기준하여 1보다 높은 식물자원으로 쥘레나무, 신갈나무, 싸리 등이 각각, 2.18, 1.57, 1.50 ORAC value를 나타내었다.

6. 세포 생존율

MTT assay법을 이용하여 접골목 추출물만을 농도별로 처리한 후 24시간 후의 세포 생존율을 측정 한 결과 0.2 mg/mL의 농도 이하에서는 세포의 생존율이 95% 이상으로 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 2).

t-BHP로 유도한 산화스트레스로부터 접골목 추

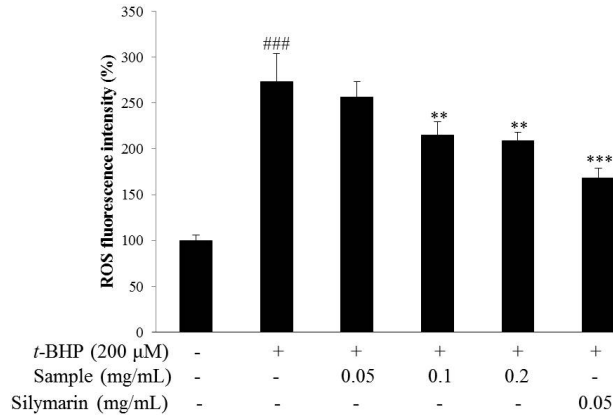


Fig. 3. Changes of intracellular ROS generated by *t*-BHP treatment in Chang cells. The extracts from *Sambucus williamsii* var. *coreana* were treated with various concentrations in Chang cells for 1 hr prior to 200 μM *t*-BHP treatment for 30 min. Data were represented as mean ± S.D (n=4) with One Way ANOVA followed by Tukey' s test. ^{###}*p*<0.001 versus control, ^{**}*p*<0.01 and ^{***}*p*<0.001 versus *t*-BHP.

출물의 간세포 보호능에 미치는 영향을 알아보기 위하여, Chang 세포에 여러 가지 농도의 접골목 추출물 (0.05, 0.1, 0.2 mg/mL)을 한 시간 전 처리하고 100 μM *t*-BHP를 24시간 처리한 후 생존율을 비교하였다. Fig 2와 같이 접골목을 처리하지 않고 *t*-BHP만 처리했을 때의 세포생존율이 60 %인 것과 비교하였을 때 접골목 추출물 처리군은 농도의존적으로 세포생존율이 증가하는 경향을 나타내었다.

특히 접골목 추출물 0.2 mg/mL 농도로 전처리했을 때, *t*-BHP로 유도한 세포 손상으로부터 약 20% 정도 유의적으로 세포생존율이 증가함을 나타내었으며, 양성 대조군인 실리마린과 비슷한 생존율을 나타내었다. 이는 접골목 추출물이 인간 정상 간세포주인 Chang 세포에서 *t*-BHP로 유도한 산화 스트레스로부터 세포를 보호하고 있음을 보여주고 있다.

7. 세포내 활성산소종 (ROS) 소거능

Chang 세포에 200 μM *t*-BHP 처리하였을 때의 활성산소종은 *t*-BHP를 처리하지 않은 control군에

비해 270%를 증가를 나타내었지만, 접골목 추출물을 전 처리한 경우 농도 의존적으로 세포내 활성산소종 수준이 감소하는 것을 확인하였다. 특히 접골목 추출물을 0.2 mg/mL 처리했을 때 활성산소종이 210%로 대조군에 비해 약 22 % 감소하였다 (Fig. 3). 따라서 *t*-BHP 처리로 인해 증가하는 세포내 활성산소종을 접골목 추출물이 효과적으로 감소시킴으로써 간세포 보호 효과를 나타내는 것으로 판단된다. Kim 등²²⁾은 *t*-BHP로 발생한 세포내 산화스트레스 증가를 돼지감자잎 추출물이 억제하여 세포보호를 나타낸다고 보고 하였으며, 본 연구의 결과에서도 세포내 활성산소종을 접골목 추출물이 효과적으로 감소시킴으로써 간세포 보호 효과를 나타내는 것과 비슷한 경향을 나타내었다.

8. Mitochondrial membrane potential (MMP, Δψ m) 측정

접골목 추출물이 산화스트레스를 받은 미토콘드리아에 미치는 영향을 확인하기 위하여 미토콘드리아막 전위 (MMP, Δψ m)를 측정한 결과는 Fig. 4와

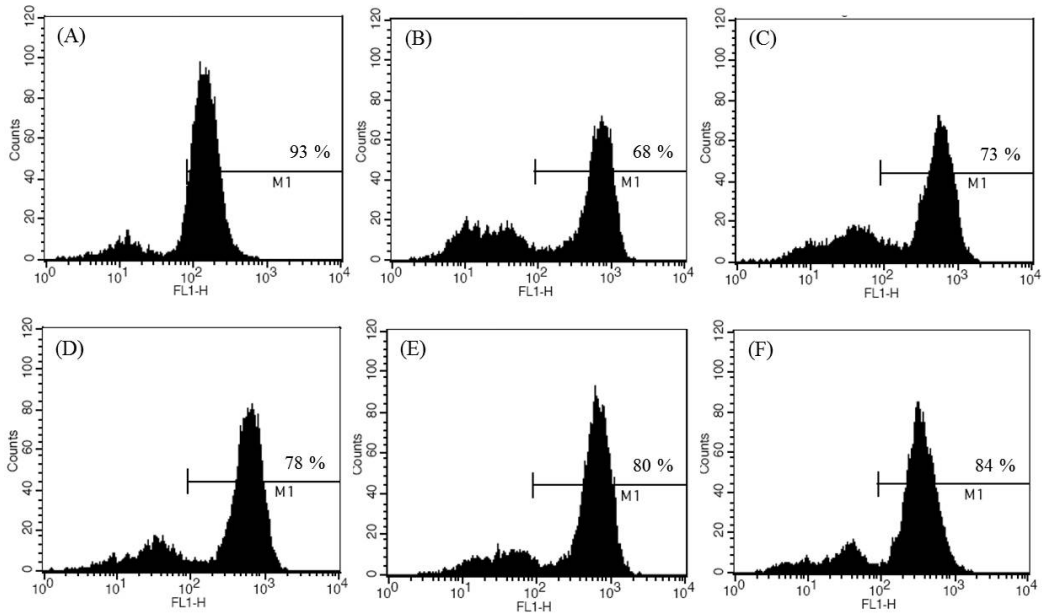


Fig. 4. Effect of *Sambucus williamsii* var. *coreana* (SWC) extracts on mitochondrial membrane potential in Chang cells. After treatment SWC extract prior to t-BHP treatment for 24 hr, Chang cells were incubated with rhodamine123 for 30 min, and then immediately subjected to flow cytometric analysis. (A) Control; (B) t-BHP (100 μM); (C) t-BHP (100 μM) + Sample (0.05 mg/mL); (D) t-BHP (100 μM) + Sample (0.1 mg/mL); (E) t-BHP (100 μM) + Sample (0.2 mg/mL); (F) t-BHP (100 μM) + Silymarin (0.05 mg).

같다. 산화 스트레스를 처리하지 않은 정상군은 정상적인 MMP를 가진 세포는 약 93 %, 손상된 MMP를 가진 세포는 약 7 %로 나타났지만, t-BHP로 산화스트레스를 주었을 때는 손상된 MMP를 가진 세포가 32 %까지 증가하였다. 그러나 접골목 추출물 (0.05, 0.1, 0.2 mg/mL)을 한 시간 전처리 했을 때는 손상된 MMP를 가진 세포가 각각 28, 22와 20 %로 나타났으며, 농도 의존적으로 MMP 손상이 억제되는 경향을 확인하였다. 접골목 추출물 0.2 mg/mL의 농도를 처리하였을 때 대조군인 실리마린 (0.05 mg/mL)의 MMP 측정 결과를 비교하였을 때 비슷한 미토콘드리아 보호효과를 나타내었다. 이것은 접골목 추출물이 산화적 스트레스로 인한 미토콘드리아의 기능 손상을 효과적으로 보호하는 것으로 판단된다.

IV. 결론

접골목은 祛濕止痛하는 효능으로 근골격계 질환에 사용되었고, 水腫, 産後血暈, 熱痢 등 내과질환에서도 광범위하게 응용되는 한약제이다. 최근 연구 논문에서 현대적인 진통소염의 효과를 확인하였고, 백서를 이용하여 골다공증에 유의한 효과를 확인하였으며, collagen 유발 관절염에 약침을 투여하여 유의한 결과를 도출하였다²³⁻²⁵. 특히 항염증 작용에 있어서 TNF-α의 생성을 억제하고 염증효소인 COX-2 작용을 차단하는 작용이 있다는 전 연구 결과에 따라 본 연구에서는 다양한 약리학적 활성을 가진 것으로 알려진 접골목의 산화적 스트레스에 의한 간 손상 보호효과를 알아보기 위하여 접골목

추출물의 항산화 활성 및 간세포 보호 효과를 측정하였다. 접골목 추출물의 항산화 활성을 탐색하고자 접골목 추출물에 포함된 총폴리페놀 함량, 총플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거활성, ABTS를 이용한 라디칼 소거활성, FRAP을 이용한 총항산화능 및 ORAC을 측정하였다.

페놀성 물질은 항산화 작용 및 항염증 작용을 나타내므로 접골목 추출물의 총폴리페놀 함량과 총플라보노이드 함량을 측정하였는데, 접골목 추출물의 총폴리페놀 함량은 33.23 ± 0.23 mg GAE/g, 총플라보노이드 함량은 9.97 ± 1.38 mg CE/g으로 나타났다.

항산화 활성을 측정하는데 간단하며 널리 사용되는 DPPH 라디칼 소거능은 항산화 물질에 의한 지질과산화 연쇄반응에 영향을 미치는 자유라디칼에 대한 억제 효과를 측정하는 것으로 DPPH 라디칼 소거능은 비타민 C와 비슷한 활성을 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거능의 측정방법은 녹색을 띠는 양이온 ABTS⁺가 항산화 물질에 의해 제거되면 특유의 색깔인 청록색으로 변화되는 원리를 이용한 것이고, FRAP 방법은 직접적으로 자유라디칼을 소거하지 않고 산성 pH에서 환원제에 의하여 전환되는 과정을 이용하여 간접적으로 항산화능을 측정하는 것으로, 본 실험에서 ABTS를 이용한 라디칼 소거활성, FRAP을 이용한 총항산화능 측정을 통한 항산화 활성을 평가한 결과에서도 접골목 추출물이 항산화 효과를 가지고 있음이 확인되었다.

또한 세포 독성을 살펴보기 위하여 정상 간세포 (human liver, Chang cells)를 이용하여 MTT assay를 수행한 결과, 세포의 생존율은 1.0 mg/mL의 농도까지는 전혀 독성을 나타내지 않았고, 간세포 보호 효능 실험에서는, *t*-BHP로 유도한 산화적 스트레스로 인해 생존율이 60%로 낮은 대조군과 비교할 때 접골목 추출물을 한 시간 동안 전처리 한 샘플군은 농도의존적으로 생존율이 증가하였다. 세포내 활성

산소종을 측정한 결과와 미토콘드리아 막 전위차를 측정된 결과에서도 접골목 추출물은 효과적으로 산화적 스트레스에 대한 간세포 보호 효과를 가지고 있는 것으로 나타났다.

이는 접골목 추출물이 가진 항산화 활성이 산화 스트레스로부터 증가된 세포내 활성산소종을 효과적으로 소거하고 있으며, 미토콘드리아의 손상을 억제하여 세포를 보호하는 것으로 사료된다. 이와 같은 실험 결과는 임상에서 만성적 근골격계 질환을 가지고 있는 환자에 대하여 장기 투여를 고려할 때 접골목을 선용할수 있는 근거가 될수 있을 것으로 판단된다. 이상의 결과로 접골목을 기능성 소재로 활용할 때 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 판단되며 추후 분자생물학적 기전에 관한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2012 학년도 세명대학교 교내 학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

參 考 文 獻

1. Bartsch, H., Nair, J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: Role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck Arch Surg.* 2006;391: 499-510.
2. Van Houten, B., Woshner, V., Santos, J.H. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair.* 2006;5:145-152.
3. Comelli, M.C., Mengs, U., Schneider, C., Prosdocimi, M. Toward the definition of the mech-

- anism of action of silymarin: Activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy. *Integr Cancer Ther.* 2007;6:120-129.
4. Ku KM, Kim HS, Kim BS, Kang YH. Antioxidant activities and antioxidant constituents of pepper leaves from various cultivars and correlation between antioxidant activities and antioxidant constituents. *J Appl Biol Chem.* 2009;52:70-76.
 5. 조태동. 한국의 허브. 서울. 대원사, 2006: 111.
 6. Cho, S.K., Chung, Z.M., Kim, C. J. Analgesic and Anti-inflammatory Activity of *Sambucus sieboldiana* Water extract, *Chung-Ang J Pharm Sci.* 1994;8:57-65.
 7. 배기환. 한국의 약용식물. 서울. 교학사, 2000: 472.
 8. Lee, J.S. A Screening of the Antioxidative, Antimicrobial, and Whitening Effects of the Ethanol Extract from *Sambucus williamsii* var. coreana NAKAI, Graduate School, Wonkwang University, 2012: 21-103.
 9. Yang, X.J., Wong, M.S., Wang, N.L., Chan S.C., Yao, X.S. Effect of phenolic acids isolated from *Sambucus Williamsii* on proliferation and differentiation of rat osteoblastic UMR106 cells. *Chinese Trad and Herb Drugs.* 2005;36:1604-1607.
 10. Yang, X.J., Wang, N.L., Wong, M.S., Chan S.C., Yao. X.S. Studies of triterpenoids isolated from *Sambucus williamsii* bance and their effects on UMR106 cell proliferation and alkaline phosphatase activity. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University.* 2005;22:449-457.
 11. Lee, D.G., Kim, E.J., Lee, E.S., Wang, K.H., Cho, H.S. Lee, S.D., Kim, K.S., Kim, K.H. Effect of Suppressing the Activation of Macrophage Migration Inhibitory Factor by *Sambucus williamsii* HANCE Extract & Pharmacopuncture Solution on Type II Collagen-induced Arthritis. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society.* 2012;29:103-113.
 12. Chae, J.W., Cho, Y.J. Antioxidative Activity of Extracts from *Sambucus williamsii* var. coreana. *Korean J Plant Res.* 2012;25:363-371.
 13. Gutfinger, T. Polyphenols in olive olis. *J Am Oil Chem Soc.* 1981;58:966-968.
 14. Jia, Z., Tang, M., Wu, J. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 1999;64:555-559.
 15. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature.* 1958;26:1198-1199.
 16. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med.* 1999;26:1231-1237.
 17. Benzie, I.F.F., Strain, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 1999;299:15-27.
 18. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem.* 2001;49:4619-4626.
 19. Heo, S.J., Ahn, H.Y., Kang, M.J., Lee, J.H., Cha, J.Y., Cho, Y.S. Antioxidative Activity and

- Chemical Characteristics of Leaves, Roots, Stems and Fruits Extracts from *Acanthopanax senticosus*. J Life Sci. 2011;21:1052-1059.
20. Yoshizawa, S., Horiuchi, T., Fujiki, H., Yoshida, T., Okuda, T., Sugimura, T. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of "tannin" in green tea. Phytother Res. 1987;1: 44-47.
21. Yang, Y.J., Kim, H.J., Kang, S.H., Kang, S.C. Screening of Natural Herb Resources for Anti-oxidative Effects in Korea. Korean J. Plant Res. 2011;24:1-9.
22. Kim, Y.S., Lee, S.J., Hwang, J.W., Kim, E.H., Park, P.J., Jeon, B.T. Antioxidant Activity and Protective Effects of Extracts from *Helianthus tuberosus* L. Leaves on *t*-BHP Induced Oxidative Stress in Chang Cells. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2011;40:1525-1531.
23. Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. J Biol Chem. 1999;274: 18100-6.
24. Lacey D, Sampey A, Mitchell R, Bucala R, Santos L, Leech M, Morand E. Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum. 2003;48:103-109.
25. 차봉오. 접골목이 진통소염에 미치는 효과. 경희대학교 대학원. 1982.