

# 생강나무 잎 및 가지 추출물의 생리활성

홍주헌

대구가톨릭대학교 식품공학전공

## Physiological Activities of Leaf and Twig Extracts from *Lindera obtusiloba* Blume

Joo-Heon Hong

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsansi 712-702, Korea

### Abstract

We investigated the physiological activities of extracts from *Lindera obtusiloba* Blume leaf and twig (LLW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf, LLE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf, LTW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig, LTE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig). Total polyphenol and total flavonoid contents of LTE were 445.38 mg/g and 302.09 mg/g, respectively. The electron donating ability (95.38%) of LTE was higher than that of the LLE (93.76%), LTW (88.09%), and LLW (82.06%). The oxygen radical absorbance capacity of extracts were improved with 50% ethanol condition, rather than hot water. Superoxide radical scavenging activity and FRAP activity of the extracts were improved with an increase of treatment concentration. All the extracts (1,000 µg/mL) stimulated a production of nitric oxide (NO) in macrophage RAW264.7 cells. In particular, the NO stimulating activity of LTE was superior to that of LLE, LTW, and LLW. The antitumor activity of LTE (500 µg/mL) in A549, HeLa and SNU719 was 55.63%, 83.87% and 68.11%, respectively. The UVB-induced MMP-1 production in HS68 cells was suppressed by the treatment of LTE (88.28%), LLE (83.96%), LTW (80.59%) and LLW (76.08%).

Key word : *Lindera obtusiloba* Blume, antioxidant activity, antitumor activity, matrix metalloproteinase-1

### I. 서론

소득수준의 향상 및 산업의 발달로 인하여 식생활, 식습관 등 라이프스타일이 빠르게 서구화됨에 따라 만성질환이나 성인병환자가 급격히 증가하고 있다. 그에 따라 건강과 장수에 대한 관심이 빠르게 증대되고 있으며 안전한 먹거리 확보에 대한 관심도 고조되고 있다. 이런 관계로 유용생리활성을 가지면서 부작용이 없는 천연물 유래의 활성물질 탐색에 연구

가 집중되고 있으며, 특히 천연 식물자원을 대상으로 항균, 항노화, 성인병 예방, 면역증강, 항산화 효과 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Chaovanalikit A와 Wrolstad RE 2004, Choi OK 등 2002). 천연식물은 예로부터 여러 가지 민간요법으로 사용 또는 섭취가 되어 오면서 효능이 검증되어 왔고, 최근에 와서 현대의학의 대체요법으로 많이 사용되고 있다. 선진국에서는 이미 전 세계에 분포하는 식물자원에 대한 질병 예방 또는 치료기능과 경제적 효용가치를 평가하여 보다 다양한 식물종의 확보에 주력하고 있다. 천연물을 기원으로 하는 생약은 기존에 한방에서의 질병 치료제나 보약의 처방으로 널리 사용되어 왔으나, 최근에 각종 기능성식품 및 화장품 등의 소재로 다양하게 개발되고 있다(Park BG 등 2007).

생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)는 녹나무과(Lauraceae)로 산기슭 양지쪽에 자라는 낙엽관목으로 높이가 3 m에 달하며 일본, 중국에도 분포한다. 잎은 심장형 또는 난형이고 끝

†Corresponding author : Joo-Heon Hong, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Geumnakro 5, Gyeongsansi, Gyeongbuk, 712-702, Korea  
Tel : +82-53-850-3218  
Fax : +82-53-850-3217  
E-mail : jhhong@cu.ac.kr

부분이 3~5 갈래로 갈라지고 가장자리는 밋밋하다. 변종으로는 둥근 잎 생강나무, 고로쇠 생강나무, 털 생강나무 등이 우리나라에 자생하고 있으며, 가지와 잎을 문지르면 생강냄새가 난다고 알려져 있다(Park JC 등 1996). 생강나무는 특유의 방향성 성분인 monoterpenoid와 sesquiterpenoid를 가지고 있으며 이들 성분에 대한 산업적 이용과 함께 정유성분과 화학조성에 대한 연구가 계속적으로 이루어지고 있다(Kwon DJ 등 2007, Seo KH 등 2011). 또한 생강나무는 북통이나 해열 그리고 차의 대용품으로 사용되기도 하였으며, 열매의 기름은 두발용이나 등화용으로 사용되기도 하고 현재에도 생강나무 추출물에 대한 항산화와 항균 작용 그리고 염증반응 억제 등에 대한 응용 연구가 이루어지고 있다(Hwang KA 등 2005, Kim SH 등 2009). 전통적으로 식용으로 섭취되어 온 식물들은 오랜 경험적 사용과 시간에 따라 일반적으로 안전하다고 여겨지고 있다. 생강나무 또한 과학적으로 검증이 되지 않은 채 의약품이나 기능성식품으로서의 이용 가치는 점차 증가하고 있는 관계로 다양한 기능적 특성 및 안전성에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 생리활성이 우수하다고 알려져 있는 생강나무의 부위별 기능적 특성을 확인하고자 잎 및 가지 추출물을 이용하여 항산화, 항암활성 및 MMP-1 저해활성을 분석하였으며 이를 통해 다양한 기능성 식품 및 화장품 소재로서의 활용 가능성을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume, 국내산)의 잎과 가지는 시료간 오차를 줄이기 위해 경북 영천지역에서 자생한 것을 대구소재 약령시장에서 구입하여 사용하였으며, 실험 재료는 분쇄하여 60 mesh 체를 통과한 분말을  $-20^{\circ}\text{C}$  이하의 냉동고에 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다.

### 2. 추출물의 제조 및 추출수율 측정

생강나무 잎과 가지 분말 10 g에 증류수와 50% 에탄올을 각각 200 mL 첨가하여  $80^{\circ}\text{C}$ 에서 6시간 환류추출 하였다. 추출 후 불순물을 제거하기 위해 whatman No.2로 여과한 다음 감압농축기 (Model N-1N, Eyela Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 감압농축하고 동결건조(Freezezone Plus 2.5, Labconco Co., Kansas City, MO, USA)하여  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

추출수율은 생강나무 잎 및 가지 추출물을 감압 농축한 후 건조오븐(Forced convection oven, Jeico Tech, Korea)을 이용하여  $105^{\circ}\text{C}$  상압가열건조법으로 항량이 될 때까지 건조한 후 추출물 제조에 사용한 원료 건물량에 대한 고형분 수율(%)로 나타내었다.

### 3. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Singleton VL과 Rossi JA 1965)에 따라 추출조건별 각각의 분말을 1,000  $\mu\text{g/mL}$  농도로 희석한 시료 1 mL에 1 N folin-ciocalteau reagent(Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 1 mL를 첨가하고 충분히 혼합한 다음 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 mL를 첨가하고 실온의 암소에서 30분간 반응시킨 후 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co., Sweden)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 함량은 tannic acid(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

총 플라보노이드함량 측정은 Davis법(Davis WB 1947)에 따라 1,000  $\mu\text{g/mL}$  농도로 희석한 시료 100  $\mu\text{L}$ 에 1 mL diethyl glycol을 혼합하여 실온에서 5분간 반응시키고 1 N NaOH 100  $\mu\text{L}$ 와 혼합하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨 후 420 nm에서 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co., Sweden)로 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

### 4. 항산화활성 분석

#### 1) DPPH radical 소거능 측정

전자공여능(electron donating ability, EDA)은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)의 환원력을 이용하여 측정하였다(Lee EJ 등 2008). 즉, 1,000  $\mu\text{g/mL}$  농도로 희석한 시료 1 mL에  $4 \times 10^{-4}$  M DPPH용액(99.9% ethyl alcohol에 용해) 1 mL를 가하여 총액의 부피가 2 mL가 되도록 하였다. 이 반응액을 약 10초간 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 후 분광광도계(Ultaspec 2100 pro, Amersham Co., Sweden)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 ascorbic acid를 사용하였으며 전자공여효과는 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$EDA(\%) = \left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

#### 2) ORAC 측정

ORAC 측정은 Talcott ST와 Lee JH(2002)가 항산화 활성 측정에 사용한 oxygen radical absorbance capacity(ORAC) 분석법을 이용하였다. 본 시험에서 검액 및 표준액의 농도별 희석과 실험용 시료의 제조에는 중성 phosphate buffer(61.6:38.9 v/v, 0.75 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and 0.75 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )를 사용하였다. 검량 곡선을 작성하기 위하여 항산화 활성 비교 표준액으로 trolox(water soluble analogue of vitamin E, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Aldrich Chem, Inc., USA) 10  $\mu\text{L}$ 를 phosphate buffer 50 mL에 용해하여 제조하였고, 측정기기는 fluorescent microplate reader(Infinite M200 PRO, Tecan Co., Austria)를 사용하여 485 nm에서 전자가 여기되고

538 nm에서 방출되게 조절하여 본 실험에 적용하였다.

### 3) FRAP 측정

Ferric reducing antioxidant potential(FRAP) 측정은 Benzie IF와 Strain JJ(1996)의 방법에 의해 다음과 같이 측정하였다. FRAP reagent는 25 mL acetate buffer(300 mM, pH 3.6)를 37°C에서 가온한 후, 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma, St. Louis, MO, USA) 2.5 mL와 20 mM ferric chloride(FeCl<sub>3</sub>) 2.5 mL를 가하여 제조하였다. 시료의 최종반응농도가 100, 250, 500, 1,000 µg/mL이 되도록 하여 각각 0.03 mL씩 취해 제조된 FRAP reagent 0.9 mL와 증류수 0.09 mL를 넣은 후 37°C에서 10분간 반응 시킨 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co., Sweden)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP는 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

### 4) Superoxide radical 소거 활성 측정

Superoxide radical 소거 활성 측정은 Nishikimi M 등(1972)의 방법에 따라 측정하였다. 시료의 최종반응농도가 25, 50, 100, 200 µg/mL이 되도록 하여 각각 20 µL에 62 µM nitro blue tetrazolium (NBT)와 98 µM β-nicotinamide adenine dinucleotide(NADH)를 함유한 20 mM Tris 용액(pH 8.0) 800 µL를 혼합한 다음, 20 mM Tris 용액 80 µL와 33 µM phenazine methosulfate(PMS) 100 µL를 각각 첨가하였다. 즉, 비효소적으로 PMS/NADH로 유발된 superoxide radical은 formazan을 측정하기 위해 560 nm에서 10분 동안 반응물의 흡광도를 측정하였고 아래 식으로 계산하였다.

Superoxide radical scavenging ability = [(A-B)/A]×100  
 A : absorbance of not added sample  
 B : absorbance of added sample

### 5. 세포주 및 세포 배양 방법

실험에 이용한 세포주는 인간 폐암세포(A549), 인간 자궁경부암세포(HeLa), 인간 위암세포(SNU719) 및 마우스 대식세포(RAW264.7)를 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. A549, HeLa 및 SNU719 세포주는 RPMI 1640배지를 사용하였고 RAW264.7 세포주는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지를 이용하여 각각 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포는 모두 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (MCO-18AIC, SANYO Co., Japan)에 적응시켜 각각 배양하였다.

### 6. Nitric oxide 함량 측정

RAW264.7 세포로부터 생성되는 nitric oxide(NO)의 양을 Griess reagent를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 배양된

세포주를 2×10<sup>4</sup> cell/well로 96 well plate에 각각 100 µL씩 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하고 증류수에 녹인 시료군(100, 250, 500, 1,000 µg/mL) 및 양성대조군인 LPS(1 µg/mL)를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액 50 µL에 동량의 Griess reagent를 혼합하여 10분간 암반응 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 함량은 sodium nitrite를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

### 7. 항암활성 측정

Won JH와 Kim MR (2012)의 방법을 이용하여 생강나무 잎 및 가지 추출물의 MTT assay를 수행하였다. 배양된 세포주를 2×10<sup>4</sup> cell/mL로 96 well plate에 각각 100 µL씩 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하고 증류수에 녹인 시료를 최종반응농도가 500 µg/mL가 되도록 조제한 후 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 phosphate buffered saline(PBS) 완충용액에 녹인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 5 mg/mL 용액을 각 well에 10 µL씩 첨가하고 다시 4시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양종료 후 생성된 formazan 결정이 흐트러지지 않게 배양액을 완전히 제거하고 제거된 각 well에 100 µL씩의 dimethyl sulfoxide를 가하여 10분간 반응시켜 formazan 결정을 용해한 다음 ELISA reader(Asys UVM340, Biochrom, Eugendorf, Austria)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 doxorubicin(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 10 µg/mL 농도로 사용하여 비교하였다.

### 8. MMP-1저해활성 측정

사람 진피 섬유아세포주인 HS68은 American Type Culture Collection(ATCC)에서 분양받아 10% FBS 및 100 unit/mL penicillin, 100 ng/mL의 streptomycin을 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>를 공급하면서 3일마다 계대 배양을 하여 본 실험에 이용하였다. Ultraviolet B(UVB) 조사를 통한 HS68 세포의 광노화 유도는 24 well plate에서 2×10<sup>5</sup> cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양하여 세포를 부착 시킨 뒤 Quan T 등(2001)의 방법을 변형하여 수행하였다. 즉, 세포를 24시간 배양한 뒤 배지를 제거하고 PBS로 두 번 세척한 다음 세포에 1 mL PBS를 첨가하고 UV 램프를 이용하여 UVB(280~320 nm)를 80 mJ/cm<sup>2</sup> 되게 조사하였다. 이 때, UVB 조사량은 UV-radiometer를 이용하여 측정하였다. 시료에 의한 MMP-1 생산량 변화는 상기와 같이 UVB를 조사한 세포에 PBS를 제거하고 10% FBS 및 100 unit/mL penicillin, 100 ng/mL의 streptomycin을 첨가한 DMEM 배지와 함께 시료를 처리하고 24시간 추가 배양한 후 6,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 상등액을 회수하고 matrix metalloproteinase-1(MMP-1) human biotrak에 대해 ELISA system(Amersham life science, Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 MMP-1 생산량을 측정하였다.

## 9. 통계처리

모든 실험결과는 SPSS(version 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였고 각 측정 평균값의 유의성( $p < 0.05$ )은 Duncan's multiple range test를 실시하여 검정하였다.

## III. 결과 및 고찰

## 1. 추출수율, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

생강나무 잎 및 가지 추출물의 추출수율은 Table 1과 같다. 잎 부위의 추출수율은 열수추출이 10.9%, 50% 에탄올 추출물이 12.3%로 분석되어 가지 추출물에 비해 약 2배 가량 수율이 높게 나타났으며 50% 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 높은 수율을 나타내었다.

Table 1. Yield, total polyphenol content and total flavonoid content in extracts from *Lindera obtusiloba* Blume leaf and twig

Sample <sup>1)</sup>	Yield (%)	Total polyphenol content (mg/g)	Total flavonoid content (mg/g)
LLW	10.9	178.58±2.05 <sup>d2)</sup>	151.79±4.67 <sup>c</sup>
LLE	12.3	311.84±2.03 <sup>b</sup>	259.05±8.39 <sup>b</sup>
LTW	4.8	228.12±1.84 <sup>c</sup>	171.79±8.23 <sup>c</sup>
LTE	5.7	445.38±2.91 <sup>a</sup>	302.09±5.63 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>LLW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf  
LLE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf  
LTW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig  
LTE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig

<sup>2)</sup>The values are means±SD of three experimental data. a-dMeans with different superscripts in the same column are significantly different at  $p < 0.05$ .

폴리페놀 화합물은 식물계에서 널리 분포하는 2차 대사산물로서 phenolic acid, benzoic acid, cinnamic acid, flavonoid, lignan, stilbene, anthocyanin, proanthocyanin 및 tannin 등이 있으며, 항암뿐만 아니라, 항고혈압, 항염증, 항산화 및 항노화 등 다양한 생리활성을 가진다고 보고되고 있다(Kim SM 등 2001, Nacz M과 Shahidi F 2003). 생강나무 잎 및 가지 추출물의 총 폴리페놀함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 생강나무 가지 50% 에탄올 추출물(LTE)이 445.38 mg/g으로 총 폴리페놀 함량이 가장 높았으며 생강나무 잎 50% 에탄올 추출물(LLE)이 311.84 mg이었다. 또한 열수 추출의 경우 가지 및 잎 추출물이 각각 228.12 mg/g(LTW)와 178.58 mg/g(LLW)로 분석되어 50% 에탄올 추출 조건이 우수함을 알 수 있었다. Hong CO 등(2013)은 생강나무 잎을 70% 에탄올로 추출하여 총 페놀화합물을 정량한 결과 66.1 µg/mg이 함유되어 있다고 보고하였다. 플라보노이드류는 여러 가지 식물에 널리 분포되어 있으며, 플라보노이드 화합물은 비교적 간단한 화학구조를 가지면서

화학 작용이 다양한 많은 유도체들이 보고되어 있다(Kim HP 등 2004). 총 플라보노이드함량은 LTE가 302.09 mg/g으로 분석되어 가장 높았고 LLW가 151.79 mg/g으로 가장 낮아 총 폴리페놀 함량 분석과 동일한 결과를 보여주었다. Hwang KA 등(2003)은 생강나무 잎 열수추출물의 총 플라보노이드 함량이 140.46 mg/g이라고 보고하여 본 연구결과와 유사하였는데, 뒤음처리를 전처리로 하였을 때 증가하는 경향이라고 보고하였다. Park JC 등(1996)은 생강나무에 함유되어 있는 플라보노이드의 화학구조 분석에서 앞에는 이노작용, 심수축 증가작용 등 기능성을 가지는 quercitrin이 가지에는 hyperoside(querceetin-3-O-galactoside)가 함유되어 있다고 보고하였다.

## 2. DPPH radical 소거능 및 ORAC

전자공여능은 식품 중의 지질 산화 억제나 인체 내에서 노화를 억제하는 작용의 척도로 이용된다. 지금까지 보고된 항산화력을 측정하는 여러 가지 방법 중 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical(DPPH)을 이용한 수소공여능 측정은 가장 보편적으로 이용되고 있는데, 이는 빠른 시간 내에 항산화력을 비교할 수 있지만 재현성이 낮다는 단점을 가지고 있다(Blois MS 1958). 생강나무 잎 및 가지추출물의 전자공여능은 각각 93.76%(LLE)와 95.38%(LTE)로 측정되어 라디칼 소거능이 매우 우수함을 보여주었는데, 이는 양성대조군으로 사용한 천연 항산화 물질로 잘 알려져 있는 ascorbic acid와 같은 농도에서 비교한 결과인 95.41%와 유사한 것으로 분석되었다(Table 2). 열수 추출물인 LTW가 88.09%이었고, LLW가 82.06%로 분석되어 열수 추출조건도 상당히 우수한 라디칼 소거능을 나타내었다. Wang SY 등(2003)은 일반적으로 약용식물의 경우 총 폴리페놀함량이 증가할수록 DPPH 소거활성도 증가한다고 보고하였는데 본 연구결과도 유사하였다.

ORAC 분석은 식물성 소재의 추출물, 순수 정제물 및 복합물에 대한 항산화능을 평가하기 위해 폭넓게 활용되고 있으며, 유리 라디칼 손상에 대한 억제 시간과 억제율을 모두 반영하는 항산화능 측정 방법으로 알려져 있다(Alarcon E 등 2008, Prior RL 등 2003). Trolox를 표준물질로 사용하여 AAPH에 의해 생성된 peroxy radical에 대한 소거활성을 형광도로 측정하였으며 Table 2에 나타내었다. 생강나무 잎 추출물의 경우 LLE가 3,119.23 µmoles TE/g이었고 LLW에서 2,771.83 µmoles TE/g으로 분석되어 50% 에탄올 추출조건이 우수하였다. 또한, 생강나무 가지 추출물은 LTE와 LTW가 각각 3,451.94 µmoles TE/g와 2,601.52 µmoles TE/g로 열수 추출물과 유사한 경향이었다. Shelly H 등(2010)은 항산화 특성이 우수하다고 알려져 있는 Acai의 ORAC값은 60% 메탄올 추출물에서 2,589 µmoles TE/g을 보인다고 하였는데 본 연구에서 사용한 생강나무 잎 및 가지 추출물의 항산화 활성이 더 높게 분석되어 향후 다양한 기능성 항산화 소재로 활용가능함을 확인하였다.

Table 2. Electron donating ability and ORAC in extracts from *Lindera obtusiloba* Blume leaf and twig

Sample <sup>1)</sup>	Electron donating ability (%)	ORAC (μmoles TE/g)
LLW	82.06±1.42 <sup>d2)</sup>	2,771.83±63.69 <sup>c</sup>
LLE	93.76±0.16 <sup>b</sup>	3,119.23±75.68 <sup>b</sup>
LTW	88.09±0.81 <sup>c</sup>	2,601.52±87.62 <sup>c</sup>
LTE	95.38±0.17 <sup>a</sup>	3,451.94±92.25 <sup>a</sup>
Ascorbic acid	95.41±0.03 <sup>a</sup>	-

<sup>1)</sup>See the footnote of Table 1.

<sup>2)</sup>The values are means±SD of three experimental data. <sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05.

3. FRAP assay와 Superoxide radical 소거 활성

FRAP는 산성 pH영역에서 ferric tripyridyltriazine(Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) 복합체가 환원성 물질에 의해 청색의 ferrous tripyridyltriazine(Fe<sup>2+</sup>-TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용한 것으로 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여 고안된 방법으로 많이 이용되고 있다(Benzie IF와 Strain JJ 1996). 생강나무 잎 및 가지 추출물의 농도별 FRAP 값을 Fig. 1에 나타내었다. FRAP 값은 열수추출보다는 50% 에탄올 추출조건에서 우수하였으며 농도가 증가함에 따라 높아짐을 알 수 있었다. 최대값을 보인 1,000 μg/mL의 농도에서 LLE와 LTE는 각각 1.830 mM와 1.701 mM로 분석되어 양성대조군인 ascorbic acid와 유사하였다. Hong CO 등(2013)의 연구 결과에 따르면 생강나무 잎 70% 에탄올 추출물의 FRAP 값은 3.2 mM로 높은 함량을 나타내었는데 추출시 에탄올 농도가 증가함에 따라 FRAP값도 증가하였다고 보고하였다.

비효소적 방법인 PMS/NADH로 유발된 superoxide radical 생성계인 경우 NBT는 자주색의 formazan으로 환원되며 시료 내 superoxide radical 소거 활성이 존재하는 경우, 시료첨가에 의해 formazan의 생성이 억제되며 흡광도가 감소하게 된다(Rhim TJ 등 2009). 생강나무 잎 및 가지 추출물의 추출조건과 농도별 superoxide radical 소거 활성은 Fig. 2와 같다. 생강나무 가지 추출물은 200 μg/mL의 농도에서 LTE 79.95%, LTW 73.27%로 분석되었는데 같은 농도에서 양성대조군으로 사용한 카테킨은 96.23%와 비교시 양호한 항산화 활성을 가짐을 알 수 있었다. 모든 시료군에서 농도가 증가함에 따라 superoxide radical 소거 활성이 증가하였고, 생강나무 잎 추출물보다 생강나무 가지 추출물의 항산화 소거 활성이 높음을 확인하였다.

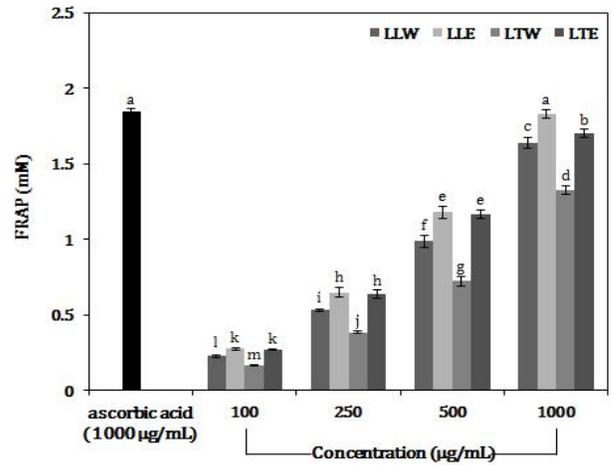


Fig. 1. FRAP activity of extracts from *Lindera obtusiloba* Blume leaf and twig

Bars represent mean±SD. Different superscripts (a-m) indicate significant differences at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

LLW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf, LLE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf, LTW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig, LTE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig.

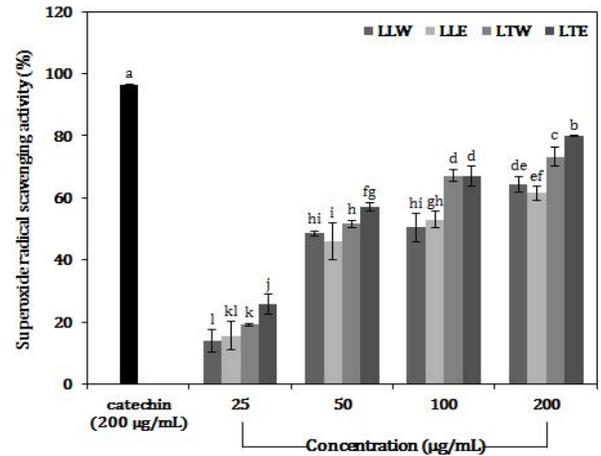


Fig. 2. Superoxide radical scavenging activity of extracts from *Lindera obtusiloba* Blume leaf and twig

Bars represent mean±SD. Different superscripts (a-l) indicate significant differences at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

LLW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf, LLE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf, LTW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig, LTE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig

4. Nitric oxide 생성량 및 항암활성

Nitric oxide(NO) 생성량은 RAW264.7 세포의 배양액 중에

NO의 함량을 측정하는 것으로 NO는 L-arginine에 NO synthetase가 작용하여 생성되며, 생성된 NO는 암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다(Hibbs JB 등 1987). 생강나무 잎 및 가지 추출물을 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 농도로 처리한 다음 NO 생성량을 조사하였다(Fig. 3). LPS 처리군(1 µg/mL)의 경우 NO 생성량이 22.38 µM였으며, 모든 시료에서 RAW264.7 세포에 대한 NO 생성이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 특히 LTE의 경우 농도가 증가함에 따라 3.537~17.238 µM로 NO 생성량이 증가하였으며, 1,000 µg/mL 농도에서 양성 대조군으로 사용한 LPS보다는 낮았으나 비교적 양호한 항염증 효과를 나타내었다. 전반적으로 열수추출보다는 50% 에탄올 추출조건이 우수하였다.

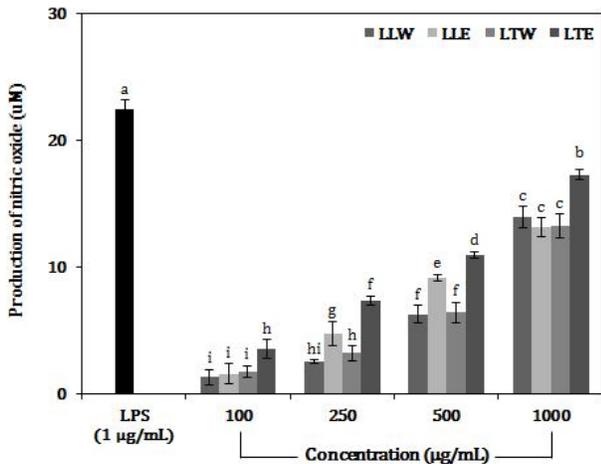


Fig. 3. Nitric oxide production in RAW264.7 cells of extracts from *Lindera obtusiloba* Blume leaf and twig  
 Bars represent mean±SD. Different superscripts (a-i) indicate significant differences at p<0.05 by Duncan's multiple range test.  
 LLW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf,  
 LLE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf,  
 LTW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig,  
 LTE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig

생강나무 잎 및 가지 추출물을 암세포에 500 µg/mL 농도로 조절하여 인간 폐암세포(A549), 인간 자궁경부암세포(HeLa) 및 인간 위암세포(SNU719)를 대상으로 항암활성을 측정하였다(Fig. 4). 시료별 암세포주에 대한 저해율은 LTE가 A549, HeLa 및 SNU719에서 각각 55.63%, 83.87%, 68.11%로 가장 높은 항암활성을 나타내었는데 양성대조군으로 사용한 doxorubicin(DOX)은 10 µg/mL농도에서 85.33%의 저해율을 보여주었다. 생강나무 가지 에탄올 추출물은 다양한 성분이 혼합되어 있는 복합물질로 향후 분리정제를 통한 단일물질의 생리활성 연구가 필요하다 사료된다. 또한 LLE도 암세포주에 대한 저해율이 각각 47.60%, 84.01%, 62.80%로 비교적 높은 항암 활성을 보여주었으며 열수추출물에 비해 50% 에탄올 추출물이 우수함을 확인하였다. 특히 3종의 인체 암세포주 중 HeLa에서 높은 저해율을 나타내었는데 향후 여성관련 기능성 식품 및 의약품 소재로서의 활용을 기대할 수 있을 것으로

사료된다. 일반적으로 식용으로 섭취되어 온 식물들은 오랜 경험적 사용과 시간에 따라 안전하다고 인식하고 있으나 지속적으로 사용하고자 할 경우 안전성에 대한 검증은 필요하다. 항암활성은 우수하나 독성이 보고되어 사용에 제한을 받는 원료가 많이 있지만 생강나무는 식용 가능한 원료이며 70% 에탄올 추출물을 대상으로 한 단회 및 반복독성 연구결과 안전하다고 보고되었다(Hong CO 등 2009).

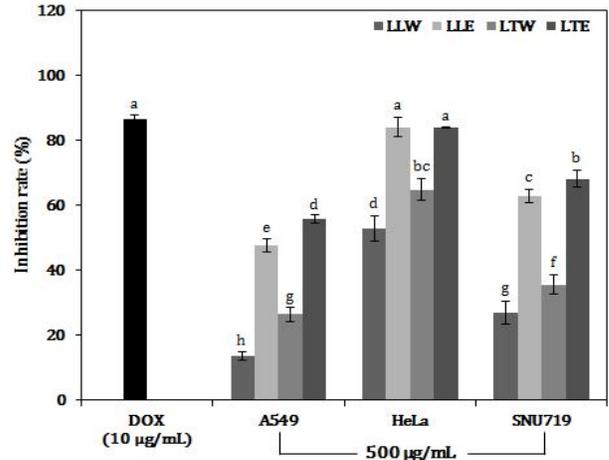


Fig. 4. Inhibition rate of the proliferation of A549, HeLa, and SNU719 cells of extracts from *Lindera obtusiloba* Blume leaf and twig  
 Bars represent mean±SD. Different superscripts (a-h) indicate significant differences at p<0.05 by Duncan's multiple range test.  
 LLW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf,  
 LLE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf,  
 LTW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig,  
 LTE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig

### 5. MMP-1 저해활성

자외선 노출로 인해 피부의 matrix metalloproteinases(MMPs)가 증가하며, 증가된 MMPs는 피부의 콜라겐을 분해하여 피부 주름이 생성되는 것으로 알려져 있다(Yang ES 등 2007). 체내에서 생성되는 MMPs 가운데 MMP-1은 collagen에 특이적으로 작용하는 protease로서 MMP-1의 활성을 억제하면 collagen의 분해를 감소시켜, 피부조직의 탄력을 유지하고 주름 생성을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다(Nagase H와 Woessner JF 1999). Lee SY 등(2003)은 HS68 세포를 대상으로 UVB를 조사 시 MMP-1의 분비가 증가됨을 확인하였으며 본 연구에서는 UVB에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 대해 생강 잎 및 가지 추출물이 미치는 영향을 측정하였다. 생강나무 잎과 가지 추출물의 추출조건 및 농도에 따른 MMP-1 유전자 발현은 Fig. 5와 같다. 생강나무 잎 및 가지 추출물은 250 µg/mL에서 농도 의존적으로 MMP-1 발현이 억제되는 것으로 나타났으며 UVB 조사군과 비교하였을 때 LTE 처리군에서의 발현 저해효과가 가장 우수하였다. 생강나무 추출물의 MMP-1의 유전자 발현은 추출조건과 시료부위에 따라 상이 하였는데 열수추출물보다

50% 에탄올 추출물이 우수하였고 생강나무 잎보다는 가지 추출물이 양호하였다. 따라서 생강나무 잎 및 가지 추출물은 MMP-1 발현을 저해시켜 피부 구조 단백질의 분해를 억제하여 피부 주름생성 억제에 도움을 줄 수 있다 판단된다.

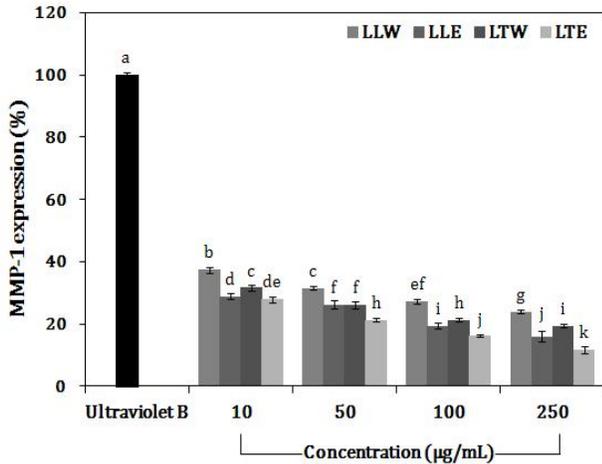


Fig. 5. Effect of MMP-1 production in HS68 cells treated UVB of extracts from *Lindera obtusiloba* Blume leaf and twig

Bars represent mean±SD. Different superscripts (a-k) indicate significant differences at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

LLW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf, LLE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume leaf, LTW: water extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig, LTE: 50% ethanol extract from *Lindera obtusiloba* Blume twig

#### IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 다양한 생리활성을 가지는 생강나무의 부위별 기능적 특성을 확인하고자 잎 및 가지 추출물을 이용하여 항산화, 항암활성 및 MMP-1 저해활성을 분석하였다. 생강나무 잎 50% 에탄올 추출물의 추출수율은 12.3%였고 총 폴리페놀 및 총 폴리페놀 함량은 각각 445.38 mg/g 및 302.09 mg/g이었다. 생강나무 잎 및 가지 추출물의 전자공여능은 50% 에탄올 추출조건에서 각각 93.76%와 95.38%로 측정되어 라디칼 소거능이 매우 우수함을 보여주었고 ORAC 값은 생강나무 가지 50% 에탄올 추출물이 3,451.94 µmoles TE/g로 항산화 활성이 다른 시료군에 비해 높음을 확인하였다. FRAP와 superoxide radical 소거 활성은 각 시료의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 증가하였으며, 50% 에탄올 추출조건이 열수추출보다 높았다. 생강나무 가지 50% 에탄올 추출물은 농도가 증가함에 따라 3.537~17.238 µM로 NO 생성량이 증가하였으며, 1,000 µg/mL 농도에서 양성 대조군으로 사용한 LPS보다는 낮았으나 비교적 양호한 항염증 효과를 나타내었다. 암세포주에 대한 저해율은 생강나무 가지 50% 에탄올 추출물이 A549, HeLa 및 SNU719에서 각각 55.63%, 83.87%,

68.11%로 비교적 높은 항암활성을 나타내었다. 생강나무 잎 및 가지 추출물은 농도 의존적으로 MMP-1 발현량이 낮아져 저해효과가 증가하였으며 최고 농도인 250 µg/mL에서 UVB 조사군과 비교하였을 때 높은 MMP-1 발현 저해를 나타내었고 생강나무 가지 50% 에탄올 추출물 처리군이 다른 시료군에 비해 우수하였다. 따라서 생강나무 잎 및 가지 추출물은 항산화 및 항암 활성 등 생리활성이 우수함을 확인하였고 향후 다양한 기능성 식품 및 화장품 소재로 활용 가능하다 하겠다.

#### V. 감사의 글

본 연구는 2012학년도 대구가톨릭대학교 연구비 지원에 의하여 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

Alarcon E, Campos AM, Edwards AM, Lissi E, Lopez-Alarcon C. 2008. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chem* 107: 1114-1119

Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 230: 70-76

Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1204

Chaovanalikit A, Wrolstad RE. 2004. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *J Food Sci* 69(1): 67-72

Choi OK, Kim YS, Cho GS, Sung CK. 2002. Screening of antimicrobial activity from Korean plants. *Korean J food Nutr* 15(4): 300-306

Davis WB. 1947. Determination of flavonones in citrus fruits. *Anal Chem* 19: 476

Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z. 1987. Macrophage cytotoxicity role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235: 473-476

Hong CO, Seo MY, Koo YC, Nam MH, Lee HA, Kim JH, Wang Z, Yang SY, Lee SH, No SH, Lee KW. 2009. Single and 14-day repeated oral toxicity studies of 70% ethanol extract of *Lindera obtusiloba* Blume leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38(10): 1324-1330

- Hong CO, Rhee CH, Won NH, Choi HD, Lee KW. 2013. Protective effect of 70% ethanolic extract of *Lindera obtusiloba* Blume on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 53: 214–220
- Hwang KA, Kim KS, Kim NW, Shin SR. 2003. Changes on the components of *Lindera obtusiloba* BL. leaf teas by manufacturing process. *Kor J Food Preserv* 10(4): 488–492
- Hwang KA, Shin SR, Kim KS. 2005. Changes on the flavor components in the leaf teas of *Lindera obtusiloba* BL. by processing methods. *Kor J Food Preserv* 12(1): 68–74
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. 2004. Anti-inflammatory flavonoids: Modulators of proinflammatory gene expression. *Natural Product Sciences* 10(1): 1–10
- Kim SH, Son JH, Lee SH. 2009. Inhibitory effects of water extract of *Lindera obtusiloba* on the mast cell-mediated allergic inflammation. *Kor J Pharmacogn* 40(3): 233–237
- Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33(6): 626–632
- Kwon DJ, Kim JK, Bae YS. 2007. Essential oils from leaves and twigs of *Lindera obtusiloba*. *Jour Korean For Soc* 96(1): 65–69
- Lee EJ, Kim JS, Kwon JH. 2008. Optimization of microwave-assisted extraction conditions for total catechin and electron donating ability of grape seed extracts. *Korean J Food Preserv* 15(6): 840–846
- Lee SY, An JH, Chun H, Cho HY. 2003. Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida* Bunge in fibroblast cell line HS68 cells. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46(1): 60–65
- Naczki M, Shahidi F. 2003. Phenolic compounds in plant foods: chemistry and health benefits. *Nutraceutical and Food* 8(2): 200–218
- Nagase H, Woessner JF. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274(31): 21491–21494
- Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 46(2): 849–854
- Park BG, Lee HS, Jung SH, Koo YC, Hong CO, Lee SJ, Lee KW. 2007. Single and 14-day repeated oral toxicity study and genotoxicological safety estimate of plantainoside isolate from *Plantago asiatica*. *J Toxicol Pub Health* 23(2): 79–86
- Park JC, Yu YB, Lee JH. 1996. Isolation and structure elucidation of flavonoid glycosides from *Lindera obtusiloba* BL. *J Korean Soc Food Nutr* 25(1): 76–79
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of plasma and other biological and food samples. *J Agri Food Chem* 51(11): 3273–3270
- Quan T, He T, Voorhees J, Fisher G. 2001. Ultraviolet irradiation blocks cellular responses to transforming growth factor- $\beta$  by down-regulating its type II receptor and inducing Smad7. *J Biol Chem* 276(28): 26349–26356
- Rhim TJ, Jeong HS, Kim YJ, Kim DY, Han YJ, Kwon HY, Kwon KR. 2009. A study on the comparison of antioxidant effects among cultivated ginseng, and cultivated wild ginseng extracts. Using the measurement of superoxide and hydroxy radical scavenging activities. *Journal of Korean Pharmacopuncture* 12(2): 7–12
- Seo KH, Baek MY, Lee DY, Cho JG, Kang HC, Ahn EM, Baek NI, Lee YH. 2011. Isolation of flavonoids and lignans from the stem wood of *Lindera obtusiloba* Blume. *J appl Biol Chem* 54(3): 178–183
- Shelly H, Chung H, Lei Z, Jianrong L, Lee YW, Yumin D, Kequan Z. 2010. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from Acai. *Food Chem* 118: 208–214
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16: 144–158
- Talcott ST, Lee JH. 2002. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *J Agri Food Chem* 50(11): 3186–3192
- Wang SY, Chang HN, Lin KT, Lo CP, Yang NS, Shyur LF. 2003. Antioxidant properties and phytochemical characteristics of extracts from *Lactuca indica*. *J Agri Food Chem* 51(5): 1506–1512
- Won JH, Kim MR. 2012. Analysis of antibacterial activity against food spoilage and food-borne pathogens and cytotoxicity on human cancer cell lines of extracts from Pericarp and seed of *Vitis coignetiea*. *Korean J Food Cookery Sci* 28(2): 175–182
- Yang ES, Hong RH, Kang SM. 2007. The effects of genistein on the proliferation and Type I pN collagen synthesis in aged normal human fibroblasts. *J Microbiol Biotechnol* 35(2): 316–324

2013년 8월 1일 접수; 2013년 8월 2일 심사(수정); 2013년 9월 6일 채택