

## 산겨릅나무 줄기 추출물의 항당뇨, 알코올 대사 효소 및 간 보호 활성

조은경 · 정경임 · 최영주

신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과

### Anti-Diabetic, Alcohol Metabolizing Enzyme, and Hepatoprotective Activity of *Acer tegmentosum* Maxim. Stem Extracts

Eun Kyung Cho, Kyung Im Jung, and Young Ju Choi

Department of Food and Nutrition, College of Medical Life Sciences, Silla University

**ABSTRACT** This study was carried out to investigate the antidiabetic, alcohol metabolism, anti-inflammatory, and hepatoprotective effects of *Acer tegmentosum* extracts (ATE). *A. tegmentosum* has been traditionally used as a folk medicine to treat hepatic disorders. The antioxidative activities of ATE were measured by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and superoxide (SOD) assay. DPPH radical scavenging and SOD activities of ATE were about 89% and 82.9% at 0.5 µg/mL, respectively. Alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase activities were 118.0% and 177% at 2 mg/mL, respectively.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of ATE was 75% higher at 50 µg/mL and remarkably increased in a dose-dependent manner. Nitric oxide productions in macrophage RAW 264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide was reduced to 16.7% by addition of ATE at 1 mg/mL. ATE showed significant protective effects against tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells at 100 µg/mL. Based on our results, we conclude that ATE may be used as a major pharmacological agent and anti-diabetic, anti-hepatitis, and anti-inflammatory remedy.

**Key words:** *Acer tegmentosum*, anti-inflammatory,  $\alpha$ -glucosidase, alcohol dehydrogenase, hepatoprotective

## 서 론

산겨릅나무(*Acer tegmentosum* Maxim.)는 단풍나무과(Aceraceae)의 낙엽 소교목으로 민간에서는 벌나무 혹은 산청목으로 불리며, 항산화 활성 및 간질환에 효능이 있어 식용 및 약용 소재로 활용 가능성이 매우 높은 것으로 알려져 있다(1,2). 산겨릅나무에 대한 연구는 줄기와 수피 등 추출물의 유효성분 분석 및 항산화 작용에 대한 연구가 주로 수행되었으며, 산겨릅나무의 유효성분은 다양한 페놀성 화합물(1,3), isoprenoid 화합물(4), phenolic glycoside(5) 및 salidroside(6) 등이 존재하며 항산화 작용은 매우 높은 것으로 알려져 있다(1,3,7).

산겨릅나무 추출물에 대한 연구는 식품성분 함량 분석(2), 간 보호 효과 연구(7-10), 안정성 분석(11), 과일세포의 분화 억제 효과(12), 통증 억제 효과(13) 및 산겨릅나무 유효성분 중의 하나인 catechin의 anti-adipogenic 활성(14)에 대한 연구 결과를 보고하였다. 산겨릅나무 에탄올 추출물의 항염증 효과(15), 산겨릅나무에서 분리한 화합물의 항산

화 및 항염증 효과(16), 알코올 분해능에 대한 연구(17) 및 암세포 성장 억제 효과(18) 등에 대하여 보고하였다.

산겨릅나무는 전통적으로 민간요법에서 간질환을 치료하기 위해서 사용되어 왔지만 항당뇨 효과 등에 대한 연구는 거의 없는 실정으로 산겨릅나무의 활성이나 작용 기작에 대한 연구는 상대적으로 미흡한 실정이다. 간의 주요한 병태생리적인 증상이나 간질환은 염증반응에 의해서 야기되기 때문에 항염증 연구는 중요하다(19). 염증은 많은 염증 유도 cytokines, prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>), inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해서 생성된다. 특히 iNOS는 interferon- $\gamma$ , lipopolysaccharide(LPS) 및 다양한 염증 유도 cytokines에 노출되는 경우에만 발현된다(20). 이러한 nitric oxide(NO) 합성은 세균을 죽이거나 종양을 제거하는 중요한 역할을 하지만 병리적인 원인에 의해서 과도한 NO 형성은 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다(21).

간 기능 보호 실험은 많은 간세포 기능을 가지고 있는 Hep G2 cells를 이용하여 tacrine에 의해서 유발된 가역성 간 손상을 감소시키는 천연물 소재개발을 위해 중요한 것으로 생각된다. Tacrine은 알츠하이머 증후군 치료제의 하나로 사용되고 있으나 약물복용 환자의 30~50%가 가역성 간 손상을 유발하기 때문에 신중한 투여가 요구된다(22,23).

Received 12 August 2015; Accepted 11 September 2015

Corresponding author: Young Ju Choi, Department of Food and Nutrition, College of Medical Life Science, Silla University, Busan 46958, Korea

E-mail: yjchoi@silla.ac.kr, Phone: +82-51-999-5459

본 연구에서는 산겨릅나무 줄기의 열수 추출물의 항당뇨 활성과 알코올 분해능, 항염증 및 간 보호 효과에 대한 생리 활성을 조사하여 새로운 소재로의 가능성을 검토하고자 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 추출의 분리

본 연구에 사용한 산겨릅나무(*Acer tegmentosum* Maxim.) 줄기는 강원도로부터 구입하여 시료로 사용하였다. 건조시킨 산겨릅나무 줄기 100 g을 autoclave를 이용하여 100°C에서 2시간씩 2회 반복 추출하였으며, 추출물은 Whatman No. 2 filter paper(Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과한 후 rotary evaporator(EYELA N-1000, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축하였다. 추출물들은 동결 건조하여 -70°C에서 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

### 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 법(18)을 약간 변형시켜 측정하였으며 표준물질로 tannic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 분석하였다. 일정 농도의 산겨릅나무 줄기 추출물을 시험관에 취한 후 Folin-Ciocalteu reagent 1 mL를 가하여 잘 혼합하고 3분간 실온에서 반응시켰다. 혼합물에 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 2 mL를 가하여 혼합하고 30°C에서 40분간 발색시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 총 페놀 함량은 mg tannic acid equivalents(TAE)/g으로 나타내었다.

### 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거능 측정

산겨릅나무 줄기 추출물의 전자공여능은 Blois(24)의 방법을 약간 변형하여 DPPH에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 96-well plate에 시료와 0.4 mM DPPH 용액을 1:4 비율로 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, ELISA reader(Versa Max Microplate Reader, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(electron donating ability, EDA)은 시료를 첨가하지 않은 대조구와 흡광도 차를 비교하여 free radical의 제거 활성을 백분율로 나타내었다.

$$\text{EDA} (\%) = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료 첨가구 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$

### Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

SOD 활성은 SOD assay kit(Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, USA)을 사용하여 manufacturer's instruction에 기술된 방법에 따라서 수행하였다. 시료를 농도별로 희석하여 96-well plate에 20 µL씩 분주한 후

WST working solution 200 µL를 넣고 혼합한 다음 효소반응 용액 20 µL를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구 실험은 효소 대신 20 µL dilution buffer를 넣고 수행하였다. SOD 활성은 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{SOD activity} (\%) = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구 흡광도}}\right) \times 100$$

### α-Glucosidase 활성 억제 효과 측정

산겨릅나무 줄기 추출물의 α-glucosidase 활성 억제 효과 측정은 Tibbot와 Skadsen(25)의 방법에 따라 측정하였다. 기질 용액은 50 mM sodium succinate buffer(pH 4.2)에 p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside(PNPG, Sigma-Aldrich Co.)를 용해시켜 1 mg/mL의 농도로 조제하였다. 반응 용액은 기질 용액 0.2 mL와 효소액(0.075 unit/mL)을 혼합하고 대조구에는 증류수 0.1 mL, 반응구에는 시료 0.1 mL를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 mL를 첨가하여 발색시켰다. Positive control로는 acarbose를 사용하였으며, α-glucosidase 효소 활성 측정은 생성된 p-nitrophenol(PNP) 양을 405 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식으로 저해율을 나타내었다.

$$\text{저해율} (\%) = \left(1 - \frac{\text{반응구의 p-nitrophenol 생성량}}{\text{대조구의 p-nitrophenol 생성량}}\right) \times 100$$

### Alcohol dehydrogenase(ADH) 활성 측정

ADH 효소 활성 측정은 Choi 등(26)과 Racker(27)의 방법을 변형하여 수행하였으며, 생성된 NADH의 양을 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험관에 alcohol 0.1 mL, NAD 수용액(2 mg/mL) 0.5 mL 및 시료 0.1 mL를 첨가하고 10 mM glycine-NaOH buffer(pH 8.8)를 총 부피가 1.8 mL가 되게 조절한 후 25°C 항온수조에서 10분간 반응시키고, ADH(10 unit/mL)를 가하여 340 nm에서 spectrophotometer(Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, UK)를 이용하여 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 증류수를 첨가하였으며, positive control로 사용한 Hepos는 약국에서 구입하여 처방전에 따라 1/2로 희석하여 사용하였다. ADH의 활성은 다음과 같은 식으로 상대적인 백분율로 계산하였다.

$$\text{ADH activity} (\%) = \frac{\text{실험구의 최대 흡광도}}{\text{대조구의 최대 흡광도}} \times 100$$

### Acetaldehyde dehydrogenase(ALDH) 활성 측정

ALDH의 효소 활성 측정은 Koivula와 Koivusalo(28)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 반응 용액은 증류수 2.1 mL, 1.0 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 0.3 mL, 20 mM NAD<sup>+</sup> 0.1 mL, 0.1 M acetaldehyde 0.1 mL, 3.0 M KCl 0.1 mL, 0.33 M 2-mercaptoethanol 0.1 mL 및 시료 0.1

mL를 혼합한 후 25°C에서 10분간 반응시킨 다음, ALDH(1 unit/mL) 0.1 mL를 첨가하여 25°C 항온수조에서 5분간 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 TE buffer(pH 8.0)를 첨가하여 상대 활성(%)으로 나타내었고, positive control과 활성 측정은 ADH 활성 측정식과 동일한 식을 사용하였다.

### NO assay 및 cell viability 측정

NO 소거 활성은 마우스의 대식세포 세포주인 RAW 264.7 세포를 배양관에  $1.0 \times 10^5$  cells/mL의 세포가 되도록 분주하여 LPS 자극 하에 24시간 배양하고, 그 배양 상층액 내의 NO의 생성은 Griess 반응으로 세포 상층액에 축적되는 nitrite 양으로 측정하였다(29). 시료에 대한 대조군으로 10 µg/mL의 LPS를 처리하여 활성화를 유도한 세포를 사용하였다. 배양 후 100 µL의 상층액을 취하여 동량의 Griess 시약[1% sulfanilamide(30% acetic acid)과 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride(60% acetic acid) 혼합액]을 가하여 상온에서 20분간 반응시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포독성 실험은 mitochondrial dehydrogenase activity의 index를 나타내는 MTT calorimetric reduction assay법으로 추출물이 세포생존율에 미치는 영향을 측정하였다. 96-well microtiter plate(SPL Lifesciences, Gyeonggi, Korea)에 RAW 264.7 macrophage를  $1.0 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주하였다. 분주 24시간 후 각 추출물이 함유되어 있는 배지를 100 µL씩 넣어 48시간 동안 배양하였다.

Plate에 MTT 2 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.) 용액을 20 µL씩 첨가하여 4시간 동안 배양시키고 formazan을 형성시킨 후 조심스럽게 상층액을 제거하였다. Dimethyl sulfoxide 150 µL를 첨가하여 formazan을 녹인 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Hep G2 세포 배양 및 세포 보호 활성 측정

실험에 사용한 간암세포인 Hep G2는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였으며 세포의 배양을 위해 10% heat-inactivated fetal bovine serum 및 100 U/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin이 첨가된 MEM(Cellgro by Mediatech, Inc., Manassas, VA, USA) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

세포의 성장과 cell viability를 확인하기 위해 96-well cell culture plate(SPL Lifesciences)에 Hep G2 세포를 배지 100 µL에  $1 \times 10^4$  cells/well의 농도로 각 well에 분주하였다. 그리고 tacrine(Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) 및 다양한 농도의 산겨릅나무 줄기 추출물을 동시에 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간의

배양 후 EZ-Cytox Cell viability assay solution WST-1<sup>®</sup> (Daeil Lab Service, Seoul, Korea)을 각 well에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3시간 동안 반응시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 460 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 성장 상태는 현미경을 사용하여 확인하였다.

### 통계처리

실험 결과는 통계 SAS package(Version 9.1, Statistical Analysis System, Chicago, IL, USA)를 사용하여 각 시료의 평균과 표준편차를 사용하였고, 분산분석(ANOVA)과 Duncan's multiple range test를 실시하여  $\alpha=0.05$  수준에서 유의차를 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 폴리페놀 함량

약용식물에 널리 분포되어 있는 폴리페놀 화합물들은 다양한 기능을 하는 phytochemical로서 항산화, 항돌연변이 및 phytoestrogen 효과 등의 생리활성이 있는 것으로 알려져 있다(22,30). 본 연구에서는 산겨릅나무 열수 추출물의 총 페놀 함량을 tannic acid 표준 곡선으로부터 측정하였다. 산겨릅나무 열수 추출물의 총 페놀 함량은 198 mg TAE/g으로 높게 나타났다(Table 1). 이러한 결과는 항산화 효과가 높은 것으로 알려진 편백나무의 총 폴리페놀 함량(138 mg/g)보다 산겨릅나무의 총 페놀 함량이 높게 나타났다(31).

Choi 등(17)은 산겨릅나무 열수 추출의 총 폴리페놀 함량이 171 mg/g으로 다소 낮게 나타났는데 본 연구 결과와의 차이점은 추출방법에 기인한 것으로 사료된다. Jeong 등(32)은 추출방법에 따른 약용식물의 총 페놀 함량을 비교하였는데 추출방법에 따라 총 페놀 함량은 다르게 나타나는 것으로 보고하였다.

Phenolic 화합물들은 지질 free radical 불활성화 및 지질 과산화물이 free radical로의 분해를 저해함으로써 항산화력을 나타내는 매우 효과적인 free radical scavengers인 것으로 알려져 있다(33).

### DPPH assay

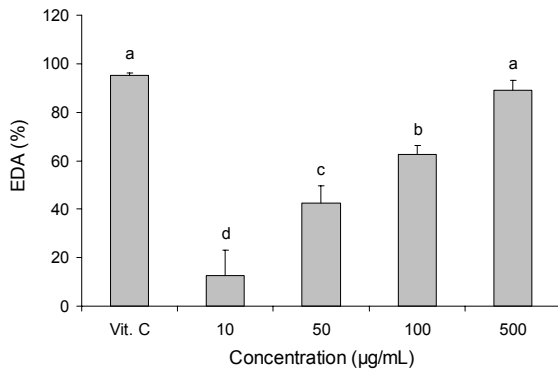
항산화 활성은 안정한 DPPH radical을 소거하는 항산화 물질인 phenolic compound와 aromatic amine 화합물 등에 의해서 환원되는 성질을 이용하여 전자공여능을 측정하는 DPPH 방법이 널리 사용되고 있다(34). 산겨릅나무 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 농도 의존적으로 증가하

**Table 1.** Total polyphenol contents of *Acer tegmentosum* extracts

	Total polyphenol (mg TAE/g) <sup>1)</sup>
<i>Acer tegmentosum</i> extracts	198.07±2.12 <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>TAE standards for tannic acid equivalent.

<sup>2)</sup>Results are mean±SD of triplicate data.



**Fig. 1.** DPPH free radical scavenging activity of *Acer tegmentosum* extracts. Results are mean±SD of triplicate data. Vitamin C (Vit. C, 0.1 mg/mL) is used as positive control. Different letters (a-d) among samples differ significantly ( $P<0.05$ ).

였으며( $P<0.05$ ), 50 µg/mL 농도에서 약 43% 라디칼 소거능을 나타내었다(Fig. 1). Choi 등(17)은 산겨릅나무 열수 추출물 25 µg/mL 농도에서 76.37%의 소거능을 보고하였는데 이러한 결과는 실험방법에서의 차이인 것으로 사료된다. 약용식물 추출물의 DPPH radical에 대한 scavenging 활성은 phenolic 화합물의 함량과 밀접한 관계가 있으며, 특히 플라보노이드보다는 폴리페놀 성분에 의해서 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(35).

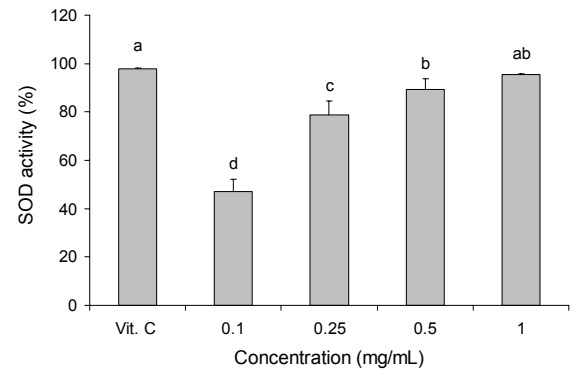
### SOD 활성

세포의 전자전달과정에 의해 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 세포막에 작용하여 손상을 주거나 DNA 및 단백질에 영향을 주어 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. Superoxide anions는 약한 산화제이지만 매우 유해한 radical을 만들 수 있어 산소 독성의 가장 중요한 원인 중의 하나이며, *in vivo*에서 생성되는 첫 번째 oxygen radical로서 다른 라디칼보다 더 오랫동안 지속된다(36). 세포질이나 미토콘드리아에 존재하는 SOD는 superoxide를 과산화수소와 산소 분자로 전환시켜주는 반응을 촉매하여 활성산소로부터 세포를 방어하는 중요한 효소 중의 하나다.

산겨릅나무 열수 추출물의 SOD 활성은 농도 의존적으로 증가하였으며( $P<0.05$ ), 0.1 mg/mL 농도에서 약 47%의 SOD 활성을 나타내었고(Fig. 2), 산겨릅나무에 대한 SOD 활성 측정에 대한 보고는 거의 없다.

Superoxide dismutase는 산소를 소비하는 모든 생물종에 존재하며 생체 내에서 발생하는 활성산소에 대한 방어 작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제이다. 또한 가장 독성이 강한 hydroxy radical의 생성을 예방하여 항염증 소재나 피부 노화 방지를 위한 소재로 사용되고 있다(37).

SOD는 분자량이 비교적 큰 단백질로 열이나 알칼리에 약하여 이러한 단점을 보완할 수 있는 저분자 물질로 체내에서 역할이 유사한 SOD 유사 활성 물질에 대한 연구가 진행

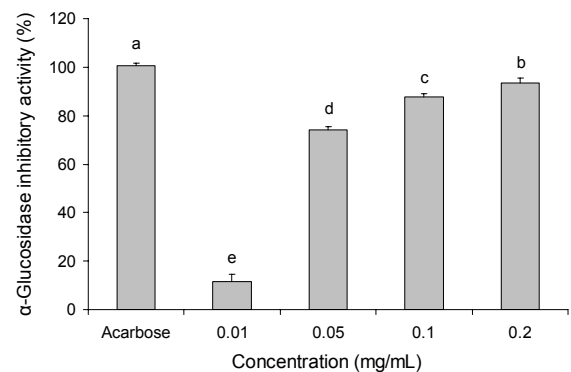


**Fig. 2.** Superoxide dismutase (SOD) activity of *Acer tegmentosum* extracts. Results are mean±SD of triplicate data. Vitamin C (Vit. C, 0.5 mg/mL) is used as positive control. Different letters (a-d) among samples differ significantly ( $P<0.05$ ).

되고 있다. SOD 유사 활성 물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로, 주로 phytochemical에 속하며 superoxide의 반응성을 억제하여 항산화력을 나타내는 것으로 밝혀져 있다(38).

### α-Glucosidase 활성 억제 효과

최근 많은 연구자들이 약용식물이나 해조류 등에서 천연 항당뇨에 유효한 새로운 소재를 탐색하고 있다. 당뇨병 치료제를 개발하기 위한 연구는 탄수화물의 소화 및 흡수 억제, 췌장세포의 insulin 분비 촉진, 간에서의 탄수화물 대사 조절 및 포도당에 대한 인슐린 sensitivity 등을 개선하기 위한 연구가 수행되고 있다(39). α-Glucosidase는 α-amylase에 의해 분해된 당질을 최종적으로 단당류로 전환시키는 효소로 이러한 효소의 활성 저해는 당질 가수분해와 흡수를 지연시켜 식후 혈당 증가를 개선하게 된다(37). 이러한 α-glucosidase 활성 억제제는 인슐린 분비와 관계없이 소장에서의 탄수화물 소화·흡수를 저해함으로써 기존 약물들에서 나타나는 저혈당 현상이나 간 독성 유발 및 췌장의 기능 저하 등의 부작용을 감소시킬 수 있는 특성을 가지고 있다



**Fig. 3.** Inhibitory effects of *Acer tegmentosum* extracts on α-glucosidase activity. Results are mean±SD of triplicate data. Acarbose (0.5 mg/mL) is used as positive control. Different letters (a-e) among samples differ significantly ( $P<0.05$ ).

(40).

산겨릅나무 추출물의  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성은 농도 의존적으로 증가하였으며( $P<0.05$ ), 0.1 mg/mL 농도에서 약 90%의  $\alpha$ -glucosidase 억제 활성을 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과는 현재 당뇨병 개선제로 시판되고 있는 acarbose(0.5 mg/mL)(40.4%)보다 현저한  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 나타내었다. 또한 당뇨병 처방전에 사용되고 있는 약용식물인 당귀, 백봉령, 상엽, 상백피, 총목피, 홍삼 등의 항당뇨 활성(32)에 비해 산겨릅나무 추출물의 항당뇨 활성이 높게 나타났다. 최근 선행연구에서 발표한 담쟁이덩굴 핵산 분획층의  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성이 0.1 mg/mL 농도에서 약 90% 저해 활성을 나타낸 것과 유사한 저해 활성을 나타내었다(41).

이러한 결과는 산겨릅나무 추출물이 당뇨병 개선을 위한 천연소재로서의 이용 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다.

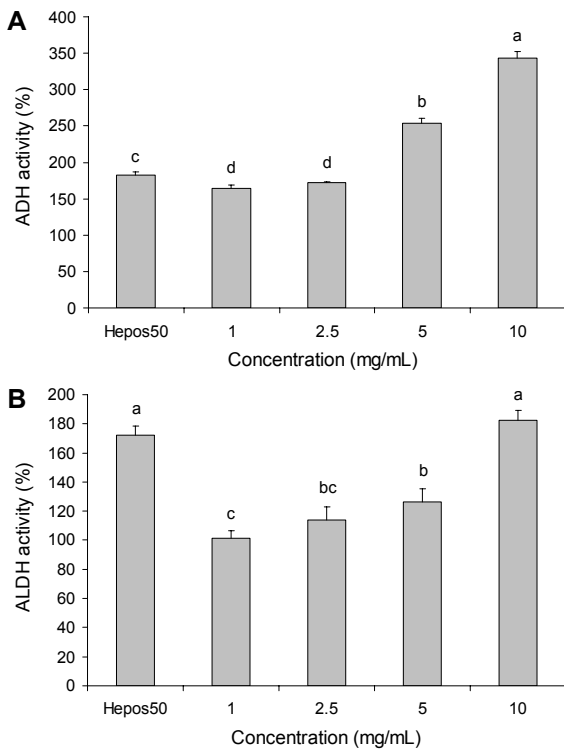
**알코올 분해 활성(ADH, ALDH)**

산겨릅나무 추출물의 숙취 해소능을 분석하기 위해서 체내 알코올 대사 1차 효소인 ADH 활성 및 acetaldehyde를 분해하는 ALDH 활성에 대한 산겨릅나무 열수 추출물의 영향을 분석하였다(Fig. 4A, 4B). 알코올 분해와 숙취에 효과가 있는 것으로 알려진 Hepos를 대조구(positive control)로 하여 추출물의 활성을 분석한 결과 농도 의존적으로 증가

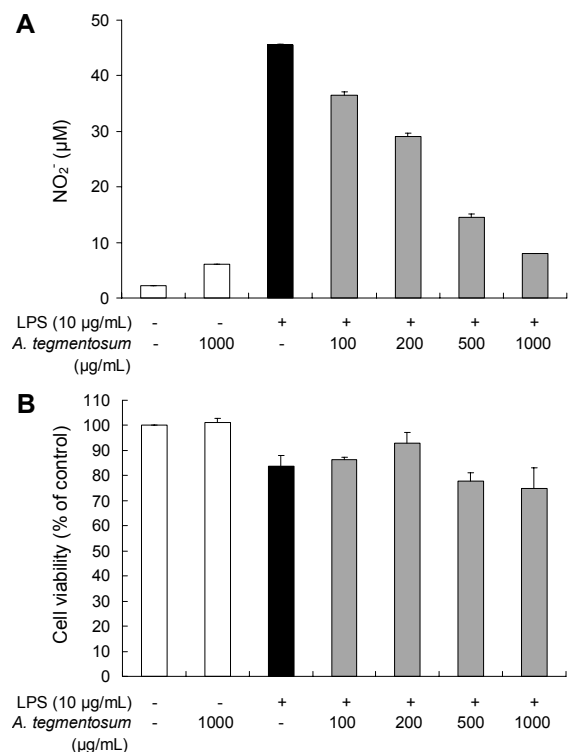
하였다( $P<0.05$ ). 산겨릅나무 추출물의 ADH 활성은 5 mg/mL 농도에서 약 254.2%로 대조구에 비해 높게 나타났지만, ALDH 활성은 같은 농도에서 약 126.3%로 대조구인 Hepos보다 다소 낮게 나타났다. 이러한 결과는 산겨릅나무 추출물이 에탄올을 acetaldehyde로 분해하는 ADH 활성은 높지만 상대적으로 ALDH 활성은 매우 낮은 것으로 나타났다. 이에 반해 Hepos의 ADH 및 ALDH의 활성은 별다른 차이를 보이지 않았다. Choi 등(17)은 산겨릅나무 추출물의 혈중 알코올 함량 감소에 효과가 있는 것으로 보고하였으며, 특히 Lee 등(42)은 숙취 해소에 중요한 약용식물 연구에서 약용식물 추출물과 추출물 발효액의 알코올 분해 활성을 조사하였는데 추출물 발효액에서 더욱 숙취해소 효과가 현저한 것으로 보고하였다. 헛개나무는 산겨릅나무와 함께 알코올 분해능에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 숙취 해소 효능은 헛개나무에서 다소 높게 나타났다(data not shown). 약용식물 추출물의 알코올 분해 효소에 대한 연구는 alcohol dehydrogenase 저해 활성 연구(42) 및 활성 촉진 연구(43) 등으로 수행되고 있다.

**NO assay 및 cell viability**

대장균 LPS를 대식세포에 처리하여 NO를 유도시킨 다음



**Fig. 4.** Effects of *Acer tegmentosum* extracts on the alcohol dehydrogenase (ADH) (A) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity (B). Results are mean±SD of triplicate data. Hepos (50%) is used as positive control. Different letters (a-d) among samples differ significantly ( $P<0.05$ ).



**Fig. 5.** Effects of *Acer tegmentosum* extracts on NO synthesis (A) and cell viability (B) in bacterial LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were cultured for 24 h with various concentration of PBE in the presence of LPS (10 µg/mL). NO release was measured using the method of Griess (nitrite). Cytotoxicity was determined by MTT assay. Results are presented as means±SD of three independent experiments.

산겨릅나무 열수 추출물을 대식세포에 처리하여 NO 합성에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 5A). LPS에 의하여 유도된 대식세포의 NO 합성은 산겨릅나무 추출물의 농도가 증가할수록 감소하였고, 추출물의 농도 1.0 mg/mL에서 NO 합성은 83.3%로 현저히 감소되었다. 이러한 결과는 산겨릅나무 추출물의 항염증 효능이 높은 것으로 나타나고 있다.

NO 합성은 L-arginine의 guanidino nitrogen으로부터 NOS에 의해 생성되어 분비 조직과 세포의 기능에 영향을 미치며, 세포독성이나 성장 억제 작용을 한다(44). 염증반응은 NO synthase(iNOS) 및 COX-2에 의하여 생산된 과량의 NO 및 PGE<sub>2</sub> 등의 염증인자가 염증반응에 중요한 작용을 한다(45). NO의 형성은 항균 작용 및 종양을 제거하는 중요한 기능을 하지만 병리학적인 원인에 의한 과도한 NO의 생성은 염증을 유발시키게 되며, 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다(21).

세포독성 실험은 MTT 분석을 통해서 측정하였으며 산겨릅나무 추출물로 처리된 대식세포의 세포생존율이 90% 정도를 나타내어 세포독성은 거의 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 5B). 또한 실험 결과에 나타난 NO의 생성량의 변화가 세포독성에 의한 영향과는 무관함을 확인할 수 있었다.

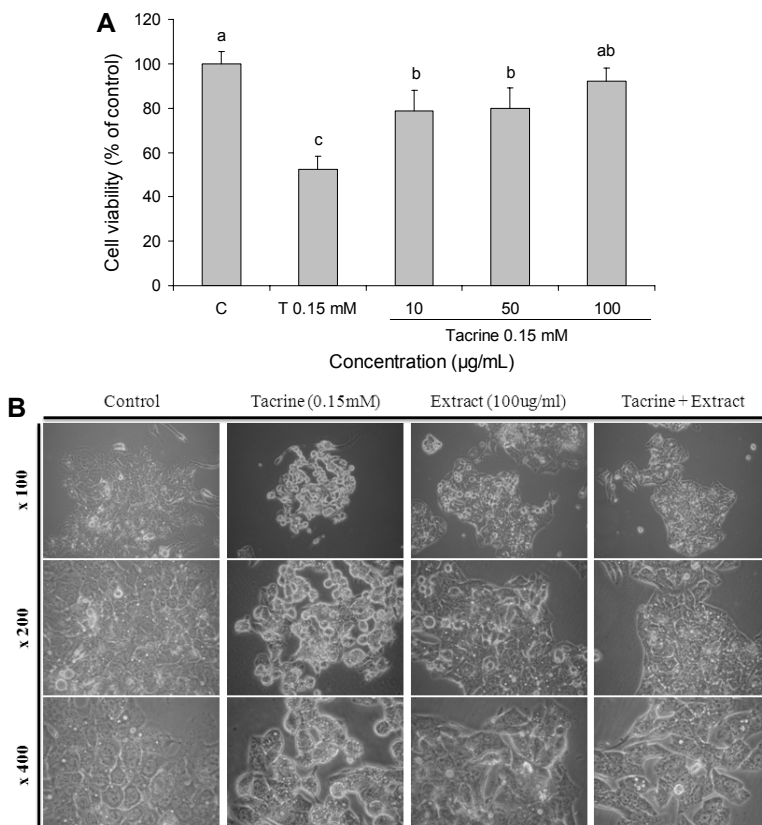
### 간세포 보호 효과

간세포 보호 효과 연구를 위해 많이 사용되는 Hep G2(간암 세포주) 세포를 이용하여 산겨릅나무 추출물의 간세포

보호 효과를 *in vitro* assay로 확인하였다. Tacrine은 알츠하이머 치료제로 사용되었으나, 간 독성을 나타내어 현재는 간세포 보호 효과 실험에 사용되고 있다. 본 연구에서는 tacrine으로 독성을 유발한 간암세포 유래의 Hep G2 세포주를 대상으로 산겨릅나무 추출물의 세포생존율에 대한 증가 여부를 관찰하고 간암 세포주에 미치는 독성 및 간 보호 효과를 확인하였다. 먼저 tacrine이 간암 세포주에 미치는 효과를 조사한 후 tacrine과 산겨릅나무 추출물을 함께 처리하였을 때 세포의 생장이 tacrine만을 처리하였을 때보다 더 증가하였음을 확인하였다( $P < 0.05$ , Fig. 6A) 이러한 결과는 산겨릅나무 추출물이 간세포에 있어 독성에 의한 손상에 대해 보호 효과가 있는 것으로 사료된다.

Tacrine과 산겨릅나무 추출물이 간암 세포주에 미치는 영향을 세포 모양으로 확인하였다(Fig. 6B). Tacrine을 처리하였을 경우에는 세포의 모양이 전체적으로 응축되어 있고 본래의 모양을 갖추지 못한 반면에, 산겨릅나무 추출물만을 처리하였거나 tacrine 및 산겨릅나무 추출물을 함께 처리한 경우에는 아무것도 처리하지 않은 대조군의 세포와 비슷한 모양을 나타내거나 더 증식한 것을 확인할 수 있었다.

산겨릅나무에 대한 간 보호 효과는 지방간에 대한 효과(10), 마우스 혈장의 효소 활성 분석을 통한 간 보호 효과(7,8) 및 간 섬유화에 미치는 효과(9) 등을 제외하고는 산겨릅나무 추출물의 간 보호 효과에 대한 세포 수준의 연구는 거의 없는 실정이다.



**Fig. 6.** Hepatoprotective effects of *Acer tegmentosum* extracts against tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. (A) Cytotoxicity was assessed after 2 h with 0.15 mM of tacrine in RPMI medium. Results are mean±SD of triplicate data. Different letters (a-c) among samples differ significantly ( $P < 0.05$ ). (B) Morphological change by *Acer tegmentosum* Maxim. extracts on Hep G2 as examined by inverted microscope.

## 요 약

본 연구에서는 간질환 치료제로 알려진 산겨릅나무 줄기 추출물의 새로운 기능성 소재로서의 개발을 위하여 생리활성을 탐색하였다. 산겨릅나무 열수 추출물의 총 페놀 함량은 198 mg tannic acid equivalents/g으로 나타났다. 항산화 활성은 DPPH 및 SOD 활성 측정 방법을 이용하여 분석하였으며, 산겨릅나무 열수 추출물의 농도 0.5 mg/mL에서 각각 89%와 82%의 활성을 나타내었다. 산겨릅나무 추출물의 혈당 강하 효과는  $\alpha$ -glucosidase 활성 억제 효과를 측정하였으며, 추출물 50  $\mu$ g/mL 농도에서 75%의 억제 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 지금까지 항당뇨 소재로 사용된 약용작물보다 높은 항당뇨 효과가 있는 것으로 사료된다. 알코올 분해 효소 alcohol dehydrogenase 및 aldehyde dehydrogenase 활성 촉진 효과는 농도 의존적으로 증가하였으며 5 mg/mL 농도에서 각각 260%와 123%를 나타내었다. Lipopolysaccharide에 의하여 유도된 nitric oxide(NO) 함성은 1 mg/mL 농도의 산겨릅나무 추출물을 처리함으로써 NO 함성률이 16.7% 정도 감소하였다. 산겨릅나무 추출물이 tacrine으로 유도된 Hep G2 세포주에 대하여 유의한 보호 활성을 나타냈다. 이러한 결과들은 산겨릅나무 추출물이 우수한 항당뇨, 항염증 효과 및 간세포 보호 효과가 높은 것으로 나타나 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다.

## REFERENCES

- Hong BK, Eom SH, Lee CO, Lee JW, Jeong JH, Kim JK, Cho DH, Yu CY, Kwon YS, Kim MJ. 2007. Biological activities and bioactive compounds in the extract of *Acer tegmentosum* Maxim. stem. *Korean J Medicinal Crop Sci* 15: 296-303.
- Shin IC, Sa JH, Shim TH, Lee J. 2006. The physical and chemical properties and cytotoxic effects of *Acer tegmentosum* Maxim. extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 322-327.
- Kwon DJ, Kim JK, Bae YS. 2011. DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds isolated from the stem wood of *Acer tegmentosum*. *Mokchae Konghak* 39: 104-112.
- Hur JM, Jun M, Yang EJ, Choi SH, Park JC, Song KS. 2007. Isolation of isoprenoidal compounds from the stems of *Acer tegmentosum* Max. *Kor J Pharmacogn* 38: 67-70.
- Hur JM, Yang EJ, Choi SH, Song KS. 2006. Isolation of phenolic glucosides from the stems of *Acer tegmentosum* Max. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 149-152.
- Won SJ, Park HJ, Lee KT. 2008. Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by salidroside through the NF- $\kappa$ B inactivation in RAW 264.7 cells. *Kor J Pharmacogn* 39: 110-117.
- Kwon HN, Park JR, Jeon JR. 2008. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Acer tegmentosum* M. extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1389-1394.
- Kim SH, Park HJ, Cho JW. 2008. Hepatoprotective activity of salidroside isolated from *Acer termentosum* Max on D-galactosamine induced hepatotoxicity in rats. *Korean J Oriental Physiol* 22: 1525-1531.
- Lee S, Woo H. 2010. A study of the inhibitory effect of *Acer tegmentosum* Max. on fibrogenesis in hepatic stellate cell line T6. *Korean J Orient Int Med* 31: 346-355.
- Seo Y, Bazarsad D, Choe SY. 2012. Effect of *Acer tegmentosum* Maxim. extracts on acute hepatitis and fatty liver in rats. *J Biomed Res* 13: 165-170.
- Hwang YH, Park H, Ma JY. 2013. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Acer tegmentosum*. *J Ethnopharmacol* 148: 99-105.
- Ha H, Shim KS, Kim T, An H, Lee CJ, Lee KJ, Ma JY. 2014. Water extract of *Acer tegmentosum* reduces bone destruction by inhibiting osteoclast differentiation and function. *Molecules* 19: 3940-3954.
- Seo HW, Park KJ, Guahk GH, Im JS, Kim DK, Leem JY, Cha DS, Kwon J, Oh CH, Jeon H. 2013. Anti-nociceptive activity of *Acer tegmentosum* MeOH extract. *Kor J Pharmacogn* 44: 188-192.
- Liu Q, Shin E, Ahn MJ, Hwang BY, Lee MK. 2011. Anti-adipogenic activity of *Acer tegmentosum* and its constituent, catechin in 3T3-L1 cells. *Natural Product Sci* 17: 212-215.
- Yu T, Lee J, Lee YG, Byeon SE, Kim MH, Sohn EH, Lee YJ, Lee SG, Cho JY. 2010. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Acer tegmentosum*. *J Ethnopharmacol* 128: 139-147.
- Kim S, Hur SJ, Kim KH, Gi KS, Whang WK. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory compounds isolated from *Acer tegmentosum*. *J Med Plants Res* 6: 3971-3976.
- Choi JH, Lee SH, Park YH, Lee SG, Jung YT, Lee IS, Park JH, Kim HJ. 2013. Antioxidant and alcohol degradation activities of extracts from *Acer tegmentosum* Maxim. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 378-383.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 152-178.
- Chu CJ, Hsiao CC, Wang TF, Chan CY, Lee FY, Chang FY, Chen YC, Huang HC, Wang SS, Lee SD. 2005. Prostaglandin inhibition by indomethacin aggravates hepatic damage and encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *World J Gastroenterol* 11: 232-236.
- Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 10: 291-316.
- Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- $\gamma$ , bacterial lipopolysaccharide and  $N^G$ -monomethyl-L-arginine. *Biochem J* 316: 209-215.
- Byun E, Jeong GS, An RB, Li B, Lee DS, Ko EK, Yoon KH, Kim YC. 2007. Hepatoprotective compound of Cassiae Semen on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Kor J Pharmacogn* 38: 400-402.
- Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. 1994. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *J Am Med Assoc* 271: 992-998.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Tibbot BK, Skadsen RW. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative alpha-glucosidase gene from barley. *Plant Mol Biol* 30: 229-241.
- Choi JT, Joo HK, Lee SK. 1995. The effect of *Schizandra fructus* extract on alcohol fermentation and enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Chem Biotechnol* 38: 278-282.

27. Racker E. 1955. Alcohol dehydrogenase from baker's yeast. *Methods of Enzymology* 1: 500-506.
28. Koivula T, Koivusalo M. 1975. Different forms of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochim Biophys Acta* 397: 9-23.
29. Marletta MA. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 268: 12231-12234.
30. Choi SY, Lin SH, Kim JS, Ha TY, Kim SR, Kang KS, Hwang IK. 2005. Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plant. *Korean J Food Sci Technol* 37: 549-556.
31. Jung YT, Lee IS, Whang K, Yu MH. 2012. Antioxidant effects of *Picrasma quassioides* and *Chamaecyparis obtusa* (S. et Z.) ENDL extracts. *J Life Sci* 22: 354-359.
32. Jeong HJ, Lee SG, Lee EJ, Park W, Kim JB, Kim HJ. 2010. Antioxidant activity and anti-hyperglycemic activity of medicinal herbal extracts according to extraction methods. *Korean J Food Sci Technol* 42: 571-577.
33. Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R. 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem* 100: 1409-1418.
34. Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda Y, Takeuchi T, Chihara M, Yamamoto Y, Niki E, Karube I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J Appl Phycol* 9: 29-35.
35. Kim EY, Bai IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 333-338.
36. Kim SH, Choi DS, Athukorala Y, Jeon YJ, Senevirathne M, Rha CK. 2007. Antioxidant activity of sulfated polysaccharides isolated from *Sargassum fulvellum*. *J Food Sci Nutr* 12: 63-73.
37. Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Biore-source Technol* 96: 1613-1623.
38. Cho EK, Kang SH, Choi YJ. 2013. Biological analysis of enzymatic extracts from *Sargassum fulvellum* using polysaccharide degrading enzyme. *KSBB J* 28: 349-355.
39. Moller DE. 2001. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414: 821-827.
40. Lee EH, Ham J, Ahn HR, Kim MC, Kim CY, Pan CH, Um BH, Jung SH. 2009. Inhibitory effects of the compound isolated from *Sargassum yezoense* on  $\alpha$ -glucosidase and oxidative stress. *Kor J Pharmacogn* 40: 150-154.
41. Shinde J, Taldone T, Barletta M, Kunaparaju N, Hu B, Kumar S, Placido J, Zito SW. 2008.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel *in vitro* and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydr Res* 343: 1278-1281.
42. Lee KS, Kim GH, Seong BJ, Kim HH, Kim MY, Kim MR. 2009. Effects of aqueous medicinal herb extracts and aqueous fermented extracts on alcohol-metabolizing enzyme activities. *Korean J Food Preserv* 16: 259-265.
43. Cha JY, Jeong JJ, Yang HJ, Lee BJ, Cho YS. 2011. Effect of fermented sea tangle on the alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol* 21: 791-795.
44. Lugnier C, Keravis T, Eckly-Michel A. 1999. Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel. *J Physiol Pharmacol* 50: 639-652.
45. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.