J Korean Soc Food Sci Nutr
45(6), 828~834(2016)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.6.828

보리수나무 열매, 잎 및 줄기 에탄올 추출물의 함유성분 분석과 간암 세포 증식억제 효과

김민주[1] · 임종순[2] · 양선아[1]

[1]계명대학교 식품가공학 전공
[2]계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터

Component Analysis and Anti-Proliferative Effects of Ethanol Extracts of Fruits, Leaves, and Stems from *Elaeagnus umbellata* in HepG2 Cells

Min-Ju Kim[1], Jong-Soon Lim[2], and Seun-Ah Yang[1]

[1]Major in Food Science and Technology and
[2]Center for Traditional Microorganism Resources (TMR), Keimyung University

ABSTRACT The aim of this study was to evaluate the physicochemical properties and antioxidant and anti-proliferative activities of different plant parts of *Elaeagnus umbellata* Thunb. extracted with ethanol (EtOH). EtOH extract of stems presenting the highest content of polyphenols showed the strongest 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity (EC_{50}=54.04 μg/mL). The total content of free amino acids decreased in the order of leaves (6,179.12 mg/100 g)> stems (1,211.69 mg/100 g)> fruits EtOH extract (378.88 mg/100 g), and asparagine (1,907.57 mg/100 g), γ-aminobutyric acid (300.17 mg/100 g), and proline (233.48 mg/100 g) were the major free amino acid in leaves, stems, and fruits, respectively. Five phenolic compounds in each extract were measured by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and gallic acid (98.95 mg/100 g) and (+)-catechin (1,575.99 mg/100 g) were present as major components in leaves and stems, respectively. EtOH extract of leaves showed the highest anti-proliferative activity against HepG2 cells as measured by 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide and lactate dehydrogenase assay but had no effects on Chang liver cells.

Key words: *Elaeagnus umbellata* Thunb., antioxidant, free amino acids, phenolic compounds, antiproliferation

서 론

보리수나무(*Elaeagnus umbellata* Thunb., Autumn olive)는 보리수나무과(Elaeagnaceae) 보리수나무속(*Elaeagnus*)에 속하는 낙엽활엽 관목으로서 국내에서는 합천군 가야면에 널리 분포하고 있으며 민간에서 보리똥나무, 뻘똥, 핑크팝보리수로 알려져 있다. 이는 거제, 고성 등의 지역에서 재배되어 6~7월 수확되는 뜰보리수(*Elaeagnus multiflora* Thunb.) 및 7~8월에 화천, 춘천 등의 지역에서 재배되며 주황색 원형모양의 둥근 열매를 갖는 갈매보리수나무(일명 비타민나무, *Hippophae rhamnoides* L.)와는 달리 10~11월에 열매가 포도송이처럼 열려 붉은색으로 익는다. 열매는 길이 1 cm의 구형으로 다소 떫은맛과 단맛을 가지며, 잎은 어긋나고 타원형으로 윗부분은 짙은 녹색을 띤다. 보리수나무의 열매, 잎과 뿌리를 중국에서 우내자(牛奶子)라고 하며, 이질, 지혈, 지사제로 사용되고 있다(1). 한편 우리나라에서는 보리수나무의 열매를 한방에서는 목반하(木半夏)라고 하며 효능으로는 설사, 출혈, 소화불량 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(2,3), 민간에서는 열매뿐만 아니라 잎, 뿌리 및 가지를 기침, 천식 등의 치료에 많이 사용하고 있다(4).

보리수나무에 관한 효능 연구는 많지 않은 실정으로 열매, 잎, 꽃 추출물의 항균 활성(5), 열매의 일반성분 및 라이코펜 함량 분석(6,7), 열매 추출물의 항산화 및 암세포 증식억제 효과(8), 열매와 잎 용매 분획물의 항산화 활성 비교(9)가 보고되어 있으며, 뜰보리수 관련 연구로서 잎의 유용성분 분석(10), 열매 추출물의 항산화 및 항암(11,12), 미백효과, 항혈소판 및 항염증(13,14) 등의 보고가 있다.

보리수나무는 현재 합천군 일대에서 무농약 유기농으로 재배되고 있으나 체계적인 연구가 전무한 상태이며, 열매와 잎은 식용으로 허가되어 있으나 식품소재로써 활용이 전혀 되지 않고 있다. 이에 본 연구에서는 보리수나무의 잎, 줄기 및 열매의 부위별 기능성 및 유용성분에 대한 기초 활성을 비교하여 고부가가치 바이오 소재로서의 활용도를 제고하

Received 3 March 2016; Accepted 31 March 2016
Corresponding author: Seun-Ah Yang, Major in Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea
E-mail: seunahy@kmu.ac.kr, Phone: +82-53-580-5117

고자 하였다.

재료 및 방법

보리수나무 잎, 줄기, 열매의 추출물 제조

본 연구에 사용된 보리수나무 잎, 줄기, 열매는 보사모영농조합법인(Gyeongnam, Korea)으로부터 제공받아 사용하였다. 건조 상태의 보리수나무 잎, 줄기, 냉동 열매를 분쇄기로 분쇄하여 70% 에탄올(Duksan, Ansan, Korea)로 3회 반복 추출하였다. 추출한 시료는 Advantec(No. 5A, Tokyo, Japan) 여과지로 여과한 후 감압농축기를 이용하여 농축한 다음 동결 건조하여 분석용 시료로 사용하였다.

총폴리페놀 함량 측정

보리수나무 잎, 줄기, 열매의 총폴리페놀 함량은 AOAC법(15)에 따라 측정하였다. 70% 에탄올 추출물을 농도별로 희석한 용액 1 mL를 취하여 2%(w/v) Na_2CO_3 용액 1 mL를 가하여 3분간 방치한 후, 50% Folin-Ciocalteu 시약(Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan) 0.2 mL를 가하여 반응시켜 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 증류수로 gallic acid 0.1%(w/v)를 제조한 후 최종농도가 0, 20, 40, 60, 80, 100 μg/mL 용액이 되도록 조제하고 이를 일정량 취하여 위와 같은 방법으로 750 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

보리수나무 잎, 줄기, 열매의 플라보노이드 함량 측정

보리수나무 잎, 줄기, 열매의 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등(16)의 방법에 따라 측정하였다. 시료를 10배 희석한 희석액 0.1 mL를 80% 에탄올 0.9 mL에 희석한 후 0.1 mL를 취하여 10% aluminium nitrate와 1 M potassium acetate를 함유하는 80% 에탄올 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분 방치한 뒤 spectrophotometer(UVICON 922, Kontron Instruments, Milan, Italy)를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 함량을 구하였다.

DPPH radical 소거 활성

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 라디칼에 대한 소거 활성은 Blois(17)의 방법에 따라 측정하였다. 시료를 각각의 용매에 녹여 농도별로 희석한 희석액 0.8 mL와 에탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 0.2 mL를 가하여 실온에서 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 유리라디칼 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는 데 필요한 시료의 농도인 EC_{50} 값으로 나타내었다. 이때 상대 활성의 비교를 위하여 대조군으로 butylated hydroxy toluene(BHT), butylated hydroxy anisole(BHA), 비타민 C를 사용하였다.

유리 아미노산 측정

일정량의 시료를 취하여 완전히 건조한 후 phenylisothiocyanate(PITC)로 유도체를 만들고 용매 A(140 mM NaHAc, 0.1% triethanolamine(TEA), 6% CH_3CN, pH 6.1)에 용해, 원심분리 한 후 시료로 사용하였다. 이때 사용한 칼럼은 Waters Nova-Pak C18 4 μm(3.9×300mm), 검출기는 UV detector(HP Agilent 1100 HPLC, GMI, Ramsey, MN, USA)를 사용하여 254 nm에서 측정하였고, 이동상은 용매 A와 용매 B(60% CH_3CN)를 gradient 법으로 용매 이동속도 1.0 mL/min, 시료 주입량 10 μL, 칼럼 온도 46°C의 조건으로 측정하였다.

페놀성 화합물의 정량 분석

페놀성 화합물의 LC-MS/MS 분석은 Agilent Technologies(Palo Alto, CA, USA) model 1200 series HPLC와 Agilent 6410 Triple Quad, tandem mass spectrometry를 이용하였다. ESI 방법으로 이온화하였고, negative selected ion monitoring(SIM) mode를 사용하였다. 이온화 조건으로는 capillary temperature와 voltage가 각각 350 °C, 4 kV였으며, nebulizer pressure는 40 psig, nitrogen flow rate는 12 L/min으로 설정하였다. 칼럼은 Halo column(2.1×150 mm, 2.7 μm, Advanced Materials Technology Co., Wilmington, DE, USA)을 사용하여 flow rate 0.2 mL/min 및 injection volume 1 μL로 설정하였고, 이동상은 다음과 같다. A: 0.1% formic acid in D.W. B: 0.1% formic acid in ACN-5~15% B; 5~10 min, 15~30% B; 10~15 min, 30~60% B; 15~20 min, 60~100% B; 20~25 min, 100% B.

표준액은 각각 MeOH를 사용하여 0.5~100 mg/mL로 제조하였으며, myricetin, kaempferol, gallic acid, (+)-catechin 및 chlorogenic acid의 혼합용액은 1 mg/mL의 농도를 사용하였다. 시료는 고감도 분석을 위하여 EtOAc, BuOH, 그리고 H_2O층으로 분획하여 H_2O층은 제거한 후 나머지 두 분획을 합쳐서 2 mg/mL MeOH로 제조하여 분석하였다.

세포주 배양

본 실험에 사용한 인간 유래 정상 간 세포주 Chang cell과 간암 세포주 HepG2 cell은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받았으며, 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Rockville, MD, USA)과 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지(Gibco BRL)를 이용하여 5% CO_2가 존재하는 37°C incubator에서 2~3회 계대 배양한 후 사용하였다.

세포 생존율 측정

HepG2 및 Chang 세포 생존율에 대한 시료의 영향을 측정하기 위해 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-

tetrazoliumbromide(MTT; Amresco, Solon, OH, USA) assay를 실시하였다. MTT assay는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용 때문에 노란색의 수용성 기질인 MTT가 불용성의 보라색 formazan으로 환원되는 원리를 이용한 방법으로, 생성된 formazan의 흡광도는 대사가 왕성하고 살아있는 세포의 농도를 반영한다. HepG2 세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하고, 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 시료를 다양한 농도로 HepG2 cell에 2~16시간 동안 전처리하였고, 그 후 1 mM의 농도로 증류수에 녹여 첨가한 후 2시간 배양하였다. 이 상태의 HepG2 cell에 MTT stock solution(5 mg/mL, 10 μL/well)을 처리하여 37°C에서 4시간 배양한 후 dimethyl sulfoxide(DMSO) 100 μL를 활용하여 반응을 종결시켰다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 μL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan crystal을 용해해 550 nm 파장에서 ELISA reader(SPECTRA max 340PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Lactate dehydrogenase(LDH) leakage 억제 효과

세포의 세포막 손상에 따라 세포질 내에 존재하는 효소인 LDH가 유출된다. 이에 대한 억제 효과를 측정함으로써 세포 생존율에 대한 시료의 영향을 평가할 수 있다. LDH leakage 억제 효과를 알아보기 위하여 Lima 등(18)의 방법을 이용하여 LDH assay kit(BioVision, Milpitas, CA USA)을 이용하여 측정하였다. 배양된 HepG2 cell을 96 well에 2×10^4 cells/well로 분주한 후 CO_2 incubator에서 16~24시간 예비 배양한 다음, 농도별로 희석한 시료를 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 250×*g*에서 10분간 원심분리 한 후 상층액 100 μL를 새로운 plate에 분주하고, reaction mixture 100 μL를 각 well에 넣고 혼합한 후 암소상태에서 30분 동안 반응시킨다. ELISA reader(SPECTRA max 340 PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험 결과는 평균(mean)±표준편차(SD)로 나타내었고 통계적 유의성은 Student's t-test를 이용하여 그룹 간의 차이를 통계처리한 후 $P<0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

항산화 효과

보리수나무 각 부위의 총폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과, Table 1과 같이 총폴리페놀 함량에는 큰 차이가 없었으나 줄기 에탄올 추출물에서 가장 높게 나타났으며(829.62 mg/g), 플라보노이드는 잎, 줄기, 열매 에탄올 추출물의 순으로 각각 28.84, 15.05, 2.64 mg/g으로 나타났다. 또한, 보리수나무 각 부위의 라디칼 소거능을 측정한 결과 폴리페놀 함량이 가장 많은 줄기 에탄올 추출물에서 가장 낮은 EC_{50} 값을 나타내어 50%의 라디칼을 소거하는데 필요한 시료 농도가 가장 낮음을 확인하였다(Table 2). 부위별 라디칼 소거능(EC_{50} 값)은 열매(539.62 μg/mL), 잎 93.53 μg/mL), 줄기(54.04 μg/mL) 에탄올 추출물의 순으로 나타났다.

Table 1. Contents of polyphenol and flavonoid of *E. umbellata* extracts (Unit: mg/g)

Sample	Polyphenol content	Flavonoid content
Leaves	803.22±10.00	28.84±0.35
Stems	829.62±18.61	15.05±0.21
Fruits	761.18±68.29	2.64±0.20

Data represent mean±SD of three independent experiment.

Table 2. DPPH radical scavenging activity of *E. umbellata* extracts (Unit: μg/mL)

Sample	DPPH radical scavenging activity (EC_{50})
Leaves	93.53±7.11
Stems	54.04±1.84
Fruits	539.62±33.29

Data represent mean±SD of three independent experiment.

Kang 등(9)은 핑크팝 보리수 열매와 잎 분획물의 총폴리페놀 함량을 측정한 결과 부탄올 분획물에서 각각 106.34 및 252.46 mg/g으로 클로로포름 및 물 분획물보다 높은 것을 보고하였으며, 이는 Kim 등(19)이 보고한 뜰보리수 열매의 총폴리페놀 함량인 2.8 mg/g보다 훨씬 높은 것을 알 수 있다. 핑크팝 보리수의 DPPH 라디칼 소거능도 잎 부탄올 분획물에서 가장 높게 나타나 핑크팝 보리수 잎의 기능성 식품 소재로서의 활용 가능성이 보고되었다(9).

유리 아미노산 함량

보리수나무 잎, 줄기, 열매 에탄올 추출물의 유리 아미노산 함량을 측정하기 위하여 시료 건조 후 PITC(phenylisothiocyanate)로 유도체화하여 HPLC로 분석하였다. 그 결과 열매에서는 proline(233.48 mg/100 g)의 함량이 가장 높았고 그다음으로 GABA, tryptophan, glutamine, alanine의 순이었으며, 잎에서는 asparagine(1,907.57 mg/100 g), GABA, alanine, proline, valine의 순이었고 줄기에서는 GABA(300.17 mg/100 g), proline, asparagine, alanine의 순으로 나타났다. 또한 보리수나무 잎 에탄올 추출물의 총유리 아미노산 함량은 6,179.12 mg/100 g으로 열매(378.88 mg/100 g) 및 줄기(1,211.69 mg/100 g) 에탄올 추출물보다 높았다(Table 3).

Kim 등(19)은 뜰보리수 열매의 유리 아미노산은 serine과 alanine의 함량이 가장 높았으며 그다음 aspartic acid, cysteine, methionine의 순으로 보고하여 본 연구의 보리수

Table 3. Free amino acids contents of *E. umbellata* extracts

Free amino acids	Concentration (mg/100 g)		
	Leaves	Stems	Fruits
Cysteine	24.04	17.01	0.00
Aspartic acid	22.82	0.00	0.00
Glutamic acid	156.67	0.00	0.00
Asparagine	1,907.57	160.05	6.11
Serine	324.35	35.75	2.92
Glutamine	87.70	65.49	16.19
Glycine	26.26	2.06	0.00
Histidine	9.89	3.91	4.77
Arginine	0.00	0.00	0.00
Threonine	92.17	7.29	0.00
Alanine	736.43	132.76	11.43
γ-Amino-n-butyric acid (GABA)	809.40	300.17	20.22
Proline	609.46	296.55	233.48
Tyrosine	188.05	7.99	10.75
Valine	379.90	40.70	3.67
Methionine	0.00	7.25	0.00
Isoleucine	0.00	0.00	0.00
Leucine	206.31	22.15	2.56
Phenylalanine	186.58	26.60	6.57
Tryptophan	154.54	12.24	16.78
Lysine	174.40	19.07	0.00
Total	6,179.12	1,211.69	378.88

나무 열매의 유리 아미노산 조성과는 큰 차이가 있는 것으로 나타났다.

유리 아미노산은 식품에 있어서 단백질의 합성, 면역계 강화, 신경전달물질 기능 등의 중요한 역할과 함께 관능적 기능도 하는데, 본 연구 결과 보리수나무 열매와 잎에 비교적 높게 함유된 것으로 나타난 alanine 및 serine은 단맛에 관여하며 소량 함유된 tryptophan, phenylalanine, leucine, valine 등은 쓴맛을 부여하는 것으로 알려져 있다(20,21). 또한 잎에 월등히 높게 함유된 asparagine은 암모니아의 독성을 감소시키며(22) 체내에서 알코올 탈수소효소의 합성을 촉진해 숙취에 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다(23). 한편, 보리수나무 모든 부위에서 공통으로 높게 함유된 것으로 나타난 proline은 콜라겐의 주요성분으로서 피부조직 개선과 연골 및 근육 강화 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, GABA는 천연에 존재하는 비단백 아미노산으로써 뇌 영양소로 작용하여 뇌 기능 활성화(24), 억제성 신경전달 물질로서 숙면 촉진 효과(25), 간 기능 개선(26), 항당뇨 효과(27) 등이 밝혀지면서 기능성 식품 소재로 기대되는 물질로 잘 알려져 있다.

LC-MS/MS를 이용한 추출물의 페놀성 화합물의 분석

보리수나무 잎, 줄기, 열매에 함유된 flavonol 및 phenol 성분 분석에 대한 정확한 보고는 없으나 뜰보리수(28)에 함유된 것으로 알려진 성분을 참고하여 myricetin, kaempferol, gallic acid, (+)-catechin 및 chlorogenic acid의 함량을 각각의 표준용액을 바탕으로 분석하였다. 보리수나무의 각 에탄올 추출물을 LC-MS/MS로 정량 분석한 결과는 Table 4와 같다. 잎 에탄올 추출물에는 kaempferol이 81.85 mg/100 g, gallic acid가 98.95 mg/100 g이 함유되어 있었으며, 줄기 에탄올 추출물의 경우 catechin이 1,575.99 mg/100 g, kaempferol이 43.99 mg/100 g, gallic acid가 9.00 mg/100 g의 순으로 확인되었다. 한편 열매 에탄올 추출물에서는 후보 물질 중 myricetin 및 kaempferol만이 미량 검출되었으며 모든 추출물에서 chlorogenic acid는 검출되지 않았다. Fordham 등(6)은 보리수나무 열매의 lycopene 함량이 15~54 mg/100 g이며, 이는 lycopene의 주요 공급원으로 잘 알려진 토마토(3 mg/100 g)에 비해 월등히 높은 함량을 나타낸다고 보고하였다.

페놀성 화합물은 식물계에 함유된 2차 대사산물로서 다양한 기능을 나타내는 활성 성분으로 잘 알려져 있는데, 항균 활성, 항산화 효과, 항염증 작용, 콜레스테롤 저하 작용, 지방간 억제 작용 및 여러 종양 세포의 성장 및 분화를 저해시키는 효과 등이 다수 보고되어 있다(29,30). 하지만 보리수나무 부위별 유용성분에 대해 최초로 보고하는 본 연구 결과를 바탕으로 보리수나무의 기능성을 밝히고 식품소재로 활용하기 위해서는 부위별 활성 성분 및 지표성분을 좀 더 체계적으로 규명할 필요가 있다.

간암 세포 증식억제 활성

보리수나무 잎, 줄기 및 열매의 70% 에탄올 추출물을 농도별(0.1~1,000 μg/mL)로 24시간 동안 처리한 후 인체 간암 세포인 HepG2의 증식억제 정도에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 열매 에탄올 추출물의 경우 0.1~250 μg/mL의 구간에서는 암세포 증식억제가 비교적 낮게 나타났으나, 추출물의 농도가 500, 1,000 μg/mL에서는 각각 42.4 및 76.7%의 억제 효과를 나타내었다. 잎 에탄올 추출물의 경우는 250, 500, 1,000 μg/mL에서 83.5, 92.1 및 93.2%의 억제 효과를, 줄기 에탄올 추출물은 75.6, 75.8 및 83.9%로 농도 의존적으로 유의한 암세포 증식억제 효과가 관찰되었다. 이처럼 잎과 줄기 에탄올 추출물은 유사한 암세포 증식억제 효과를 보였으며, 열매 에탄올 추출물과 1,000

Table 4. Phenolic compounds in *E. umbellata* extracts

Sample	Concentration (mg/100 g)			
	Gallic acid	(+)-Catechin	Myricetin	Kaempferol
Leaves	98.95	ND	<LOQ	81.85
Stems	9.00	1,575.99	ND	43.99
Fruits	ND	ND	<LOQ	<LOQ

ND: Not detected. LOQ: Limit of quantitation.

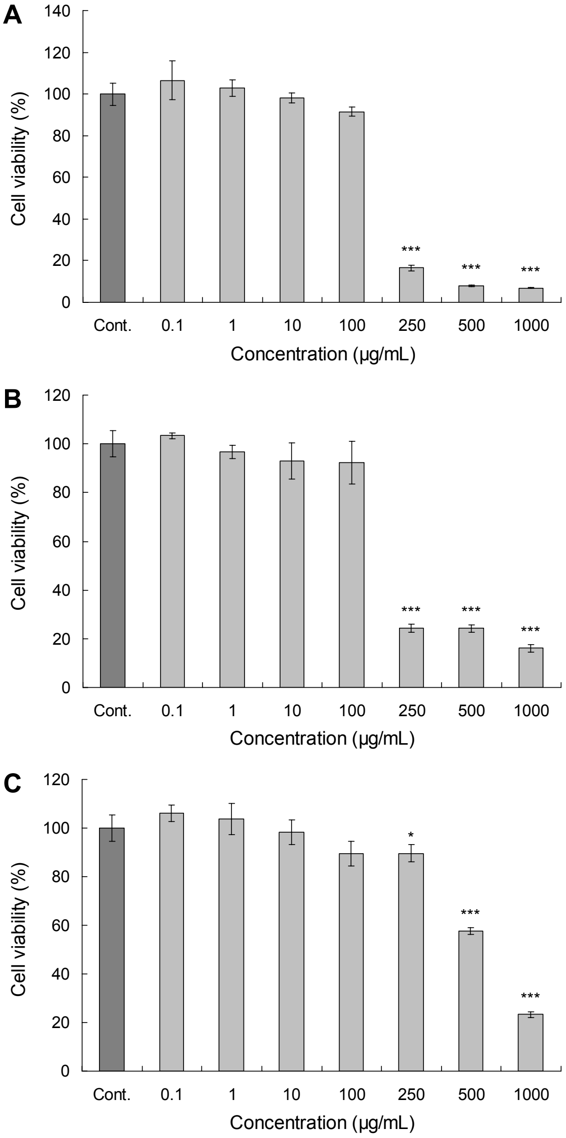

Fig. 1. Effects of *E. umbellata* extracts on HepG2 cells proliferation. (A) Leaves, (B) Stems, (C) Fruits. Values represent mean±SD of three independent experiments performed in triplicate. $^{*}P<0.05$ versus control, $^{***}P<0.001$ versus control.

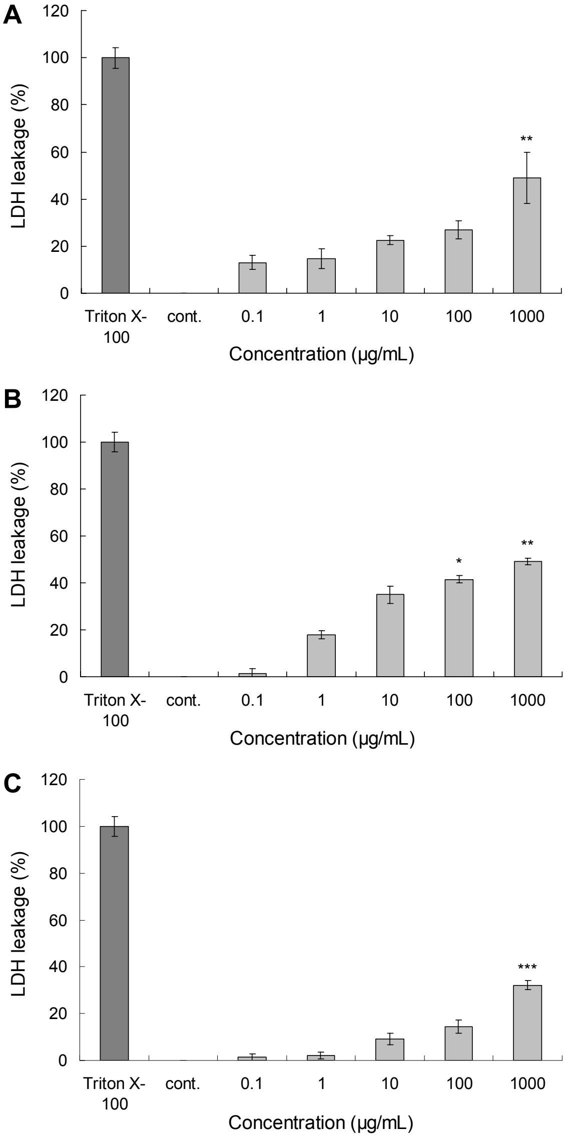

Fig. 2. Effects of *E. umbellata* extracts on LDH leakage in HepG2 cells. (A) Leaves, (B) Stems, (C) Fruits. Values represent mean±SD of three independent experiments performed in triplicate. $^{*}P<0.05$ versus control, $^{**}P<0.01$ versus control, $^{***}P<0.001$ versus control.

μg/mL에서 억제능을 비교하면 각각 93.2, 83.9 및 76.7%로 잎, 줄기, 열매의 순으로 억제 효과가 나타났다. 또한 세포 손상 시 배지 내로 유출되는 LDH의 활성을 측정한 결과 Fig. 2와 같이 모든 추출물에서 농도에 의존적으로 LDH 유출이 증가하였으며, 1,000 μg/mL의 열매, 잎 및 줄기에서 Triton X-100 처리군 대비 각각 32.2, 48.9 및 49.2%가 유출되어 MTT assay에 의한 세포 생존율에 대한 경향과 일치하는 결과를 얻었다. 이러한 보리수나무 잎, 줄기 및 열매의 암세포 증식억제 효과가 암세포를 특이적으로 공격하는지를 검토하기 위하여 정상 간세포에 처리하여 세포 증식에 대한 영향을 측정한 후 간암 세포에 대한 독성과 비교 검토한 결과, 잎과 열매 에탄올 추출물의 경우 대조군과 비교하여 유의적인 정상 간세포 생장억제 효과가 나타나지 않았으며, 줄기 에탄올 추출물은 100 μg/mL까지의 농도에서는 유의적인 독성이 나타나지 않았고 1,000 μg/mL에서 58.6%의 세포 손상을 나타냈으나 암세포(93.9%)와 비교하여 손상이 현저히 줄어든 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과로 보리수나무 에탄올 추출물의 세포 증식억제 효과가 정상 세포보다 간암 세포에 높은 활성을 나타내며, 특히 잎과 줄기에 더욱 유효한 항암 활성 물질이 존재할 것으로 추정된다. 이와 같은 정상 간세포와 간암 세포주의 증식억제에 대한 유효성 비교는 만병초 잎(31) 등의 다양한 식물 추출물을 이용하여 보고되어 있다. Wang 등(8)은 보리수나무 열매 추출물의 백혈암 세포 HL-60 cell 및 폐암 세포 A549 cell

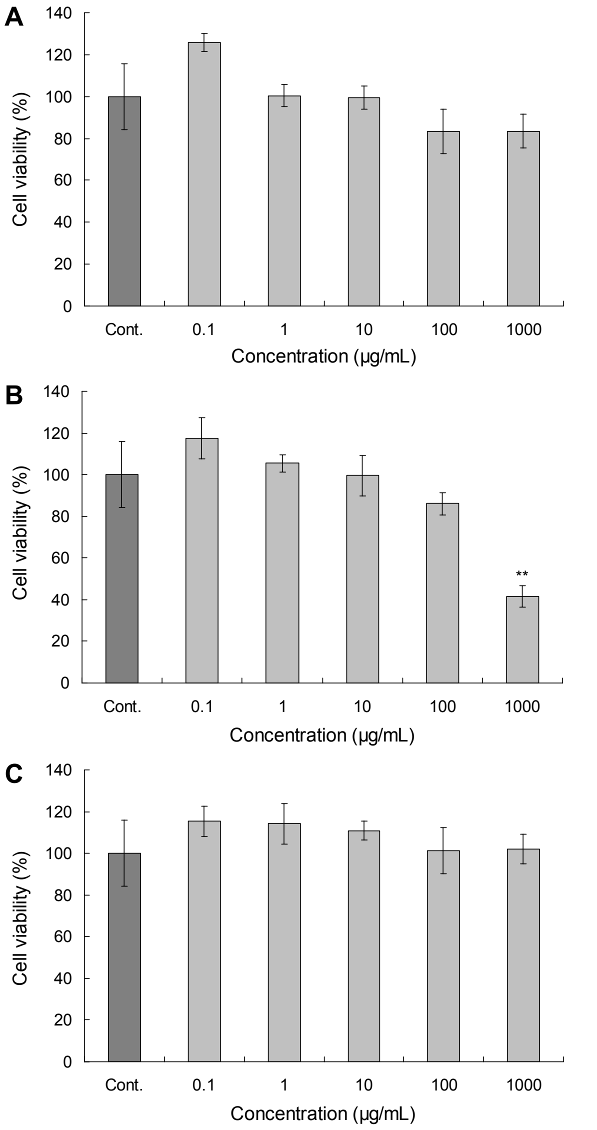

Fig. 3. Effects of *E. umbellata* extracts on Chang cells proliferation. (A) Leaves, (B) Stems, (C) Fruits. Values represent mean±SD of three independent experiments performed in triplicate. $^{**}P<0.01$ versus control.

에 대한 증식억제 효과를 보고하였으며, Oh와 Lee(12)는 뜰보리수 종실의 에탄올 추출물이 과육에 비해 암세포(자궁경부암 세포 HeLa cell, 유방암 세포 MCF-7 cell, 위암 세포 SNU-638 cell) 증식억제 효과가 큰 것으로 보고하였다. 또한 Park 등(32)은 비타민나무로 알려진 갈매보리수의 경우 뿌리에서 대장암세포 HT-29 cell과 전립선암세포 DU-145 cell에 높은 항암 효과를 나타내었다고 보고하였다. 현재까지 이와 같은 보리수나무과 식물 이외에도 많은 천연식물에서 다양한 암세포주를 이용하여 항암 활성이 보고되고 있으며 식품 소재로 활용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이번 연구에서는 매년 수확량이 많은 보리수나무 부위별로 간암 세포 증식억제 활성을 비교 차원에서 측정하였으며 활성의 차이를 확인하였다. 특히 보리수나무 잎은 본 실험에 사용된 농도 구간에서 암세포에만 특이적으로 높은 활성을 나타내어 항암 및 면역 증진 등의 항노화 식품소재로 활용 가능성의 여지가 있다고 생각한다.

본 연구에서 보리수나무의 부위별 에탄올 추출물의 생리적 기능에 대한 특징을 탐색한 결과, 열매 에탄올 추출물은 주요 유리 아미노산으로 proline과 GABA를 함유하고, 잎 에탄올 추출물은 asparagine과 gallic acid의 함량이 높고 뛰어난 간암 억제 활성을 나타내며, 줄기 에탄올 추출물은 GABA와 catechin의 함량이 높고 라디칼 소거능이 우수한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이는 보리수나무를 향후 기능성 식품, 화장품 등의 바이오 소재 자원으로 개발하기 위한 기초자료로 중요한 의미가 있다고 생각한다.

요 약

경남 합천 일대에서 재배된 보리수나무(*Elaeagnus umbellata* Thunb.)의 생리활성을 부위별(열매, 잎, 줄기)로 평가한 결과는 다음과 같다. 항산화 특성을 측정한 결과, 총폴리페놀 함량이 높게 나타난 줄기(829.6 mg/g) 에탄올 추출물에서 DPPH 라디칼 소거능(EC_{50}=54.04 μg/mL)이 가장 우수하였다. 유리 아미노산 분석에서는 잎(6,179.12 mg/100 g) 에탄올 추출물이 열매(378.88 mg/100 g)와 줄기(1,211.69 mg/100 g) 에탄올 추출물보다 유리 아미노산 함량이 높았으며, 열매의 proline, 잎의 asparagine 및 줄기의 GABA가 대표적인 유리 아미노산인 것을 확인하였다. LC-MS/MS를 이용한 주요 페놀 성분 분석에서는 잎 에탄올 추출물에서 gallic acid, 줄기 에탄올 추출물에서 catechin의 함량이 가장 높았으며, HepG2 cell과 Chang cell의 암세포 증식억제 효과를 측정한 결과 잎 에탄올 추출물이 HepG2에 특이적으로 높은 억제 활성이 나타났다. 향후 보리수나무를 국내 우수 자원으로 활용하기 위해서는 추가로 다양한 암세포에 대한 활성 차이, 부위별 활성 물질의 구명 및 작용 기전 등에 대한 계속된 연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 중소기업청에서 지원하는 2015년도 산학연협력 기술개발사업(No. C0351348)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

REFERENCES

1. Shanghai Science and Technology Press. 1985. *Chinese dictionary*. Shogakukan, Tokyo, Japan. Vol 1, p 461.
2. Park J. 2004. *South Korea herb encyclopedia*. Book Publishing Shinil Books, Seoul, Korea. p 953-954.
3. Lee S. 1966. *Korean folk medicine*. Publishing Center of Seoul National University, Seoul, Korea. p 101.
4. Kim JG. 1984. *Illustrated natural drugs encyclopedia*. Namsandang, Seoul, Korea. Vol 1, p 279.

5. Sabir MS, Ahmad DS, Hussain IM, Tahir KM. 2007. Antibacterial activity of *Elaeagnus umbellata* (*Thunb.*) a medicinal plant from Pakistan. *Saudi Med J* 28: 259-263.
6. Fordham IM, Clevidence BA, Wiley ER, Zimmerman RH. 2001. Fruit of autumn olive: a rich source of lycopene. *HortScience* 36: 1136-1137.
7. Khattak KF. 2012. Free radical scavenging activity, phytochemical composition and nutrient analysis of *Elaeagnus umbellata* berry. *J Med Plants Res* 6: 5196-5203.
8. Wang SY, Bowman L, Ding M. 2007. Variations in free radical scavenging capacity and antiproliferative activity among different genotypes of autumn olive (*Elaeagnus umbellata*). *Planta Med* 73: 468-477.
9. Kang SK, Jeong CH, Heo HJ, Shim KH. 2010. Antioxidant activities of various solvent fractions from fruit and leaf of *Pinkpop Borisu*. *J Agric Life Sci* 44: 69-78.
10. Yoon KY, Hong JY, Shin SR. 2007. Analysis on the components of the *Elaeagnus multiflora* Thunb. leaves. *Korean J Food Preserv* 14: 639-644.
11. Kim SA, Oh SI, Lee MS. 2007. Antioxidative and cytotoxic effects of solvent fractions from *Elaeagnus multiflora*. *Korean J Food & Nutr* 20: 134-142.
12. Oh SI, Lee MS. 2008. Antioxidative and cytotoxic effects of ethanol extracts from *Elaeagnus multiflora*. *Korean J Food & Nutr* 21: 403-409.
13. Park SH, Hwang HS, Han JH. 2004. Development of drink from composition with medicinal plants and evaluation of its physiological function. *Korean J Nutr* 37: 364-372.
14. Kim CK, Chung JD, Lee HS, Kim CB, Yoon JT, Choi BS. 1996. Effect of plant growth regulators on organogenesis of rhizome in mature embryo cultures of *Nelumbo nucifera*. *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 195-198.
15. AOAC. 2000. *Official method of analysis*. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 17.
16. Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
17. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
18. Lima CF, Andrade PB, Seabra RM, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. 2005. The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *J Ethnopharmacol* 97: 383-389.
19. Kim NW, Joo EY, Kim SL. 2003. Analysis on the components of fruit of *Elaeagnus multiflora* Thumb. *Korean J Food Preserv* 10: 534-539.
20. Mau JL, Chyau CC, Li JY, Tseng YH. 1997. Flavor compounds in straw mushrooms *Volvariella volvacea* harvested at different stages of maturity. *J Agric Food Chem* 45: 4726-4729.
21. Solms J. 1969. The taste of amino acids, peptides, and proteins. *J Agric Food Chem* 17: 686-688.
22. Byun SM, Huh NE, Lee CY. 1977. Asparagine biosynthesis in soybean sprouts. *J Korean Agric Chem Soc* 20: 33-42.
23. Park SC. 1994. Effect of bean sprout extracts on metabolism and biological functions of ethanol *in vitro* and *in vivo*. *Korea Soybean Digest* 10: 123-143.
24. Leventhal AG, Wang Y, Pu M, Zhou Y, Ma Y. 2003. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science* 300: 812-815.
25. Kim SS, Oh SH, Jeong MH, Cho SC, Kook MC, Lee SH, Pyun YR, Lee HY. 2010. Sleep-inductive effect of GABA on the fermentation of mono sodium glutamate (MSG). *Korean J Food Sci Technol* 42: 142-146.
26. Butterworth RF. 1994. Cerebral dysfunction in chronic alcoholism: role of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol Suppl* 2: 259-265.
27. Soltani N, Qiu H, Aleksic M, Glinka Y, Zhao F, Liu R, Li Y, Zhang N, Chakrabarti R, Ng T, Jin T, Zhang H, Lu WY, Feng ZP, Prud'homme GJ, Wang Q. 2011. GABA exerts protective and regenerative effects on islet beta cells and reverses diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 11692-11697.
28. Lee JH, Seo WT, Cho KM. 2011. Determination of phytochemical contents and biological activities from the fruits of *Elaeagnus multiflora*. *J Food Sci Nutr* 16: 29-36.
29. Cha JY, Kim HJ, Chung CH, Cho YS. 1999. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 1310-1315.
30. Choi Y, Gu JB, Kim M, Lee J. 2008. Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from thirty Korean medicinal plants. *Food Sci Biotechnol* 17: 1235-1239.
31. Byun KS, Lee YW, Jin HJ, Lee KM, Lee HY, Lee KJ, Heo MY, Yu CY, Lee JH. 2005. Genotoxicity and cytotoxicity in human cancer and normal cell lines of the extracts of *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves. *Korean J Med Crop Sci* 13: 199-205.
32. Park YH, Lim SH, Ham HJ, Jeong HN, Lee KJ, Kim KH, Kim S. 2010. Comparison of biological activities of extracts from different parts of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 975-979.