

# 신갈나무 추출물의 안전성 및 항산화성<sup>1</sup>

정지영<sup>2</sup> · 양재경<sup>2</sup> · 이원희<sup>3,†</sup>

## Antioxidant and Safety Test of Natural Extract of *Quercus mongolica*<sup>1</sup>

Ji-Young Jung<sup>2</sup> · Jae-Kyung Yang<sup>2</sup> · Won-Hee Lee<sup>3,†</sup>

### 요약

본 연구는 폭쇄처리된 신갈나무로부터 유래된 열수추출물의 안전성 및 항산화성 효과에 대해 검토하였다. 안전성 시험으로는 세포독성시험, 경구투여 독성시험이 실시되었으며, 신갈나무 폭쇄처리 열수추출물의 항산화성 유무를 확인하기 위해서 실험동물은 일본 Air Logistics사의 4주령 B6C3F1 숫컷 생쥐로 다섯 군(1군 10마리)으로 나누어서 실험을 하였다. 신갈나무 폭쇄처리 열수추출물의 세포독성 및 경구투여 독성시험의 결과로 독성은 관찰되지 않았으며, 신갈나무 폭쇄처리 열수추출물의 투여군에서 과산화물분해효소의 활성이 29% 이상 증가하여 과산화물분해효소의 활성이 유의적으로 인정되었다. 따라서 신갈나무 폭쇄처리 열수추출물은 뛰어난 안전성과 항산화성이 있음을 확인하였다.

### ABSTRACT

In this study, natural extract of *Quercus mongolica* by steaming explosion treatment were tested for antioxidant activity and safety. To determine the antioxidative properties of the hot water extracts, experiments were carried out by dividing into four groups (10 mice per group) of four-week-old B6C3F1 male mice from Air Logistics, Japan. As safety test, cell viability test, oral toxicity test were done. The activity of peroxidase was increased by more than 29% in the group treated with hydrothermal extract. From 4 kinds of safety tests, toxicity was not observed. From experimental results, natural extract of *Quercus mongolica* by steaming explosion treatment showed superb safety and antioxidant effect.

**Keywords :** *Quercus mongolica*, steaming explosion, antioxidant activity, safety, natural extract

<sup>1</sup> Date Received January 4, 2017, Date Accepted January 11, 2017

<sup>2</sup> 경상대학교 농업생명과학대학 환경재료과학과, 농업생명과학연구원. Department of Environmental Materials Science, College of Agriculture & Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

<sup>3</sup> 경북대학교 농업생명과학대학 임산공학과 Department of Wood Science & Technology, College of Agriculture & Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

<sup>†</sup> 교신저자(Corresponding author): 이원희(E-mail: leewh@knu.ac.kr)

## 1. 서 론

신갈나무를 포함한 6종의 참나무류는 우리나라의 대표적인 활엽수이다. 한방에서는 타닌이 있는 것으로만 알려져 약재로서 사용되지 아니하고 숯이나 버섯의 배지로서만 이용이 되어 왔다. 서양에서는 예부터 위스키나 와인 제조 시에 참나무의 향을 첨가하거나 참나무 추출물의 항산화성에 대한 이용한 자료가 일부 있지만(Nedamani *et al.*, 2014), 우리나라 식약청에서는 아직도 첨가물로서만 인정을 받고 있을 뿐 식품이나 약용소재로서의 인정은 받고 있지 못한 실정이다. 일부 폴리페놀의 일종인 타닌의 효능에 대해 심혈관계 질환에 대한 연구에 관심을 보이고 있지만 아직 우리 분야에서는 수목 추출물의 생리활성에 대한 연구는 매우 미미한 실정이다.

일부 천연물들이 동맥경화억제에 사용되고 있으며(Heber, 2001), 전통 한약자원들이 동맥경화치료에 쓰이고 있다(IARC, 1991; Inoue *et al.*, 1998). 수목추출액 중 목초액은 한방에서 혈관질환에 사용되지만 동맥경화억제기전이 해명되지 않았다.

현재 많은 연구자들에 의해 matrix metalloproteinase (MMP)에 대한 저분자의 선택적 저해제의 탐색 및 합성 design의 연구가 활발히 진행되고 있으며, 화학적으로 합성된 저해제와 천연물로부터 분리된 저해제의 전 임상 또는 임상 실험의 결과는 MMP 저해제가 암의 치료에 있어서 새롭고 유망한 치료제가 될 수 있음을 보여주고 있다(Wang *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2002; Haas, 2005; Malemud, 2006). 식물이나 미생물 등의 천연물로부터 몇 종류의 MMP 저해제가 탐색되어 개발과정 중에 있지만 효소 저해활성의 빈약함과, 강한 세포 독성 때문에 치료약으로 개발되기까지는 많은 문제점이 있다. 기존의 MMP 저해제들의 이러한 문제점들을 극복하기 위한 한 방법으로 민간에서 임상효능이 실증되어온 한약재로부터 MMP 저해제를 탐색하여 치료약으로의 개발은 매우 실제적이고 효과적인 전략이라 할 수 있다.

최근, 생약의 약리활성을 이용한 암의 치료 및 예방이 중요시되고 있다. 예를 들어, 대나무잎에서 추

출한 다당류는 사르코마-180 (Sarcoma-180)이 이식된 생쥐의 복강암에 효과적인데, 이러한 종양억제 약리활성은 간접적인 숙주를 매개로 한 면역증강효과에 기인하며, 특히 담자균류 세포벽에 존재하는 다당류의 활성이 중요한 것으로 알려져 있다(Maeda *et al.*, 2003).

이러한 약리활성을 가지는 식물은 숙주방어활성(host-defense activity)과 탐식세포(macrophage)활성을 촉진함으로써 면역증강(immuno-potentiating)과 항종양활성(anti-tumoral activity)을 나타내는 것으로 평가된다(Cuperus *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2016; Olefsky, 2009; Kim *et al.*, 2012).

지금까지 리그노 셀룰로오스계 바이오매스 소재의 고분자물질을 저분자화하는 한 방법으로서 폭쇄처리법이 있다. 지금까지 바이오에너지 생산이나 효소당화를 위한 전처리법의 한 방법으로 이용되어 왔다(Cara *et al.*, 2006; Sheehan *et al.*, 1999; Jung and Yang, 2016; Huang *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2014). 이와 같이 고온 고압 상태 하에서의 수증기 폭쇄 처리법은 그 대부분의 연구가 고분자 수목자원의 글루코스 집합체로부터 에탄올 및 바이오 가스 생산을 위한 리그노 셀룰로오스 물질의 전처리 기술 중의 하나로서 집중 조명되어 왔다. 여기서는 물리화학적 전처리에 의한 목재의 저분자화로 이온화된 유기산이나 페놀산 화합물, 탄수화물과 휘발성 화합물들을 동물실험에 적용함으로써 미용과 숙취해소 등의 식품 소재 등으로 활용할 수 있는 방법을 모색하는 일련의 연구를 진행해 왔다. 그러나 아직 그 추출물의 안전성에 대해서는 약리성분이 인정된 동의보감에 실린 약재이거나 오랜 기간 민간에서 사용되어 온 재료에 대해서는 식품으로서 인정을 받고 있을 뿐, 대부분의 수목추출물의 이용에 대해 갈 길이 멀다고 하겠다. 본 연구에서는 신갈나무 폭쇄재 추출물의 안전성 탐색과 항산화효능에 대하여 조사함으로써 건강증진을 위한 식품소재 및 약용성분의 개발을 위한 기초자료로 제공하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 공시재료

국산 참나무재 6종 중에서 본 연구를 위한 공시재료는 신갈나무재(*Quercus mongolica*)를 이용하였다. 목재는 가로 세로가 약 2 cm × 5 cm, 두께 약 5 mm 정도의 칩 상태로 세절한 후, 연화를 위하여 물속에 하루 동안 침지시킨 후에 폭쇄 처리 재료로 이용하였다. 목재 칩이 들어 있는 밀폐된 용기 속 보일러의 온도가 220℃의 고압수증기 조건으로 수증기를 밀폐된 용기 내에 넣고 포화 상태를 유지시켜 10분간 처리한 후, 연화된 목재 칩을 대기 중에 순간적으로 방출하여 분해된 목재 칩을 얻었다. 이 폭쇄 처리된 목재 칩을 121℃의 열수추출기에서 폭쇄재 중량 대비 20배 부피의 물에 넣어 30분 동안 오토클레이브 속에서 열수 추출하여 수목추출물로서 실험에 제공하였다. 독성 실험에 사용된 세포는 인체유래 동맥평활근 세포인 HASMC (Human aortic smooth muscle cells)를 사용하였으며, 수목추출액의 모든 분획에 대한 항산화성 유무를 확인하기 위해서 실험동물은 일본 Air Logistics사의 4주령 B6C3F1 숫컷 생쥐로 한국 바이오 제노믹스사를 통하여 구입하여 다섯 군(1군 10마리)으로 나누어서 실험을 하였다.

### 2.2. 생약추출 및 세포배양

폭쇄된 신갈나무에서 추출된 추출물은 동결건조 후, 분쇄하여 50 mM PBS (pH 7.2)용액에서 균질화한 뒤, 4℃, 15,000 xg에서 20분간 원심 분리하였다. 그 후 Sample 5 g을 취하여 10배량의 MeOH을 가하여 70℃에서 3시간 동안 가온 침출하여 여과(동양여지 No. 1)하고 여액을 모아 감압농축 후 정량하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 세포는 인체유래 동맥평활근 세포인 HASMC를 사용하였으며(Moon *et al.*, 2003), HASMC은 10% FBS (fetal bovine serum), 2 ng/ml human basic fibroblast growth factor, 0.5 ng/ml human epidermal growth factor, 50 µg/ml

gentamicin, 50 µg/ml amphotericin-B, 5 µg/ml bovine insulin을 첨가한 배지에서 배양하였다.

### 2.3. 세포증식 측정

HASMC 세포에 대한 시료의 세포증식 효과는 XTT kit (XTT II, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) (Ha *et al.*, 2004c)로 측정하였다. 세포를 96-well culture plate에서 2시간 동안  $1 \times 10^4$  cells/well DMEM로 배양하고 수목추출액을 0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml의 농도로 희석하여 3일험군으로 나누어 처리하였다. 72시간 후 50 µl의 XTT 환원용액(sodium 3'-[1-(phenyl-aminocarbonyl)-3, 4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate; 50 : 1로 혼합)을 첨가하고, 4시간 후 490 nm에서 ELISA plate reader로 측정하였다. 실험은 3회씩 독립적으로 실시하였다.

### 2.4. 이주능 시험 및 사람 동맥평활근 세포에 대한 독성

이주능 시험은 Matrigel migration assay 방법으로 Chung 등과 Ha 등(Chung *et al.*, 2004a and 2004b; Ha *et al.*, 2004c)에 의한 방법으로 실험하였으며, Matrigel-코팅된 filter inserts를 Becton-Dickinson (NJ, USA)사의 24-well invasion chambers에 고정 후, HASMC ( $5 \times 10^4$  cells/well) 세포를 일정량으로 배양시킨 후, TNF-처리 HASMC를 24시간 배양 후 여러 농도(0, 50, 100, 250, 500 µg/ml)로 처리 후, 500 ml의 배양액을 invasion chamber에 첨가하였다. TNF-처리배지를 처리하지 않은 세포는 대조군으로 사용하였고 Matrigel invasion chamber를 37℃, 24시간, 5% CO<sub>2</sub>에서 보온하였다.

수목추출액의 사람 동맥평활근 세포(HASMC)에 대한 독성은 HASMC cells ( $5 \times 10^4$  cells/well)를 24시간 동안 96-well microplates로 수목추출액농도(0, 50, 100, 200, 500 µg/ml)에서 XTT cell proliferation assay kit를 사용하여 측정하였다.  $5 \times 10^4$  cells를 24

시간 동안 96-well microplates (volume 100  $\mu$ l/well)배지에서 여러 가지 농도의 수목추출액(0, 50, 100, 200, 500  $\mu$ g/ml)으로 처리 후 보온하였다. 간세포주와 간암세포에 대한 세포독성 조사를 위한 세포 생존력의 저해는 modified colorimetric assay (Mosmann, 1983; Sua *et al.*, 2007)에 의해 평가되었다. 흡광도는 Multiscan 광도계(MRX II, Dynatech, McLean, VA)상에서 590 nm에서 마이크로 플레이트 판독기로 측정하였다.

## 2.5. 수목추출액의 MMP-9 젤라틴젤 zymography측정

본 실험에서는 gelatin zymography를 약간 변형하여 MMP 저해제 탐색에 이용하였다. 먼저 acrylamide 젤 제조시 기질인 gelatin을 1.0 mg/ml 첨가한 분리 젤을 만들어 SK-Hep1세포 혈청 배양액을 SDS 시료 완충용액(4% SDS, 125 mM Tris-Cl (pH 6.8), 10% glycerol)으로 전기영동한 후 Triton X-100이 포함된 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액으로 30분간 2회 세척하여 SDS를 제거한 후 zymography 용 incubation 완충용액(50 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01% NaN<sub>3</sub>)으로 20분간 다시 세척하였다. 용매 수목추출액과 zymography용 incubation 완충용액을 혼합하여 37°C에서 20시간 배양한 다음 gel을 2.5% Gel을 0.1% Coomassie brilliant blue로 염색시킨 후 탈색하여 gelatin 분해능이 현저하게 저하된 것을 MMP 저해제 활성이 있는 것으로 판단하였다. MMP-9 활성은 Ha 등(Demeule *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2004b; Ha *et al.*, 2004a)의 방법으로 실시하고 수목추출액은 농도별로(0, 1, 10, 50, 100, 500, 1000  $\mu$ g/ml) 실시하였다.

## 2.6. 수목추출액의 항산화성 측정

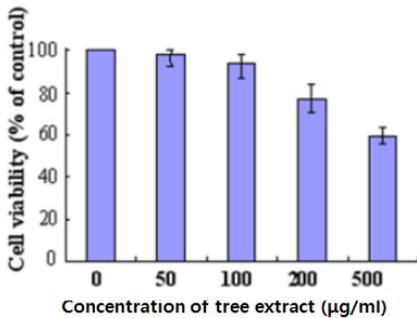
수목추출액의 모든 분획에 대한 항산화성 유무를 확인하기 위해서 실험동물은 일본 Air Logistics사의 4주령 숫컷 생쥐로 다섯 군(1군 10마리)으로 나누어서 실험을 하였다. 제1군(이하, 1군)은 정상군으로 물

과 사료만으로 사육하였다. 제2군(이하, 2군)은 생쥐 당 17.5 mg/Kg의 비율로 DEN (N, N-diethylnitrosamine)을 주 2회씩 8주간 복강 주사하였고 이후에 12주를 더 사육한 다음에 경추 탈구법으로 도살하여 생화학적 검사를 실시하는데 이용하였다. 제3군(이하, 3군)은 처음부터 열수 수목추출액을 물에 희석하여(500 ppm) 사료와 함께 사육하였고, 제4군(이하, 4군)은 DEN을 8주간 복강 주사한 후에 9주부터 열수 수목추출액을 물에 희석하여 사료와 함께 사육하였다. 제5군(이하, 5군)은 DEN을 복강 주사하면서 열수 수목추출액과 사료로 사육하는 군으로 분류하여 실험하였다.

Glutathione peroxidase는 생체 내에서 생성되는 과산화수소를 물로 바꿔주는 과정에 관여하는 효소이며, Glutathione peroxidase의 활성도는 이 효소에 의해 생성된 oxidized glutathione (GSSG)이 glutathione reductase에 의해 glutathione (GSH)으로 되어 일정 수준의 GSH를 유지할 때, NADPH가 산화되는 것을 측정하는 방법으로 그 검정 방법은 다음과 같다. 0.1 mM EDTA를 함유하는 0.1 mM 인산염 완충용액(pH 7.0) 0.5 ml와 glutathione reductase 0.1 ml (0.24 unit), 10 mM GSH 0.1 ml 그리고 시료 0.1 ml를 혼합하였다. 이 혼합용액에 1.5 mM NADPH 용액 0.1 ml를 넣고 12 mM cumene hydroperoxide 0.1 ml를 가하여 340 nm에서 5분간 흡광도의 감소를 측정하였다. 1분 동안에 1  $\mu$ M의 NADPH를 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

## 3. 결과 및 고찰

우리나라의 산림자원 중에서 목재소재인 리그노셀룰로오스 바이오매스 자원을 이용한 약리성분이나 그 성분의 의학적인 임상효과에 대한 연구는 거의 전무하다고 하겠다. 목재 세포벽의 분해에 의한 약리성분의 추출은 물리화학적 고압의 수증기 폭쇄법이 가장 적합하다고 판단되며, 이 방법에 의해 무독성의 약리성분을 스크리닝할 수만 있다면 식품분야와 제약분야에 일대 혁신을 가져올 수 있을 것으로 판단된다. 에너지 분야에서 이용되어온 이러한 방법



**Fig. 1.** Effect of wood extract on cell proliferation and toxic effects on HASMC cells.

이 고분자 목질계 소재의 저분자화로 식품소재로의 이용이 될 수 있는 가능성은 충분하다. 그러나 아직 국내 식품공전에는 예부터 많이 식용이나 약용으로 이용되어 온 재료에 대해서만 허가를 하고 있고 참나무와 같은 목질계 재료에 대해서는 식품 등의 소재로의 이용에는 한계를 보이고 있는 실정이다. 이에 고압의 수증기 폭쇄재의 이용에 앞서 그 수목 추출물의 안전성에 대해 평가하고 노화방지 효과에 대하여 검토한 결과는 다음과 같다.

### 3.1. 수목추출액의 동맥평활근 세포에 대한 독성

수목추출액의 사람 동맥평활근 세포(HASMC)에 대한 독성을 kit를 사용하여 HASMC cells ( $5 \times 10^4$  cells/well)를 24시간 동안 96-well microplates로 수목추출액농도(0, 50, 100, 200, 500 µl/ml)에서 측정한다. 수목추출액의 사람 동맥평활근 세포(HASMC)에 대한 독성은 농도의존적으로 세포독성이 인정되었다(Fig. 1). 그림에서 보는 바와 같이 세포생존력은 수목추출액의 농도가 높아짐에 따라 대조구에 비해 감소하는 경향을 보였으며, 수목추출액의 농도가 200 µg/ml에서 대조구의 약 80%까지, 그리고 이보다 2.5배 더 높은 500 µg/ml에서 대조구의 약 60%까지 감소함을 알 수 있었다. 그러나 본 수목추출액은 사람 동맥평활근 세포(HASMC)에 대해 ( $IC_{50} > 500 \mu\text{l/ml}$ )농도로 독성을 나타내어 독성이 미약하



**Fig. 2.** Effect of tree extract fraction on MMP-9 Activity in TNF-treated human artery smooth muscle cells.

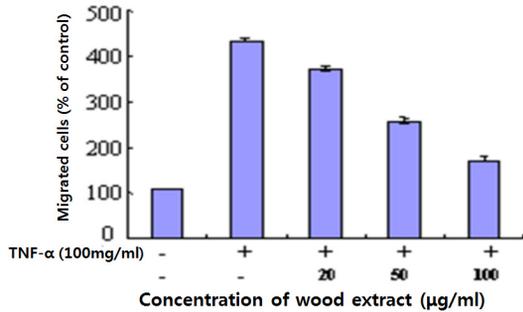
여 인체에 해가 없을 것으로 판단되었다.

### 3.2. 수목추출액의 MMP-9 저해활성 및 동맥평활근 세포 이주능에 미치는 영향

혈관평활근세포(vascular smooth muscle cells (VSMC))의 이주능과 matrix metalloproteinases (MMPs) 생성능은 동맥경화의 중요한 요인이다. 본 연구에서는 수목추출액의 혈관계질환 치료예방에 효과가 있음을 확인하고 TNF-로 유발된 사람동맥평활근세포(Human Aortic Smooth Muscle Cells (HASMC))의 이주능, MMP-9활성에 대한 억제활성을 검토하였다. Zymography는 HASMC cells에 TNF-α와 수목추출액(0, 10, 20, 50 µl/ml)을 첨가하여 활성의 densitometric intensity를 측정하여 수목추출액의 MMP-9 억제활성을 검토한 결과, Fig. 2에 나타내었듯이, 수목추출액의 농도가 10 µl/ml가 50 µl/ml로 증가함에 따라서 농도 의존적으로 MMP-9 활성을 억제함을 확인할 수 있었다( $IC_{50} : 24 \mu\text{g/ml}$ ). 수목추출액은 이 이상의 농도에서도 MMP-9활성을 강력하게 저해하여 세포독성은 미약하면서 MMP-9활성은 강하게 저해하였다.

Fig. 3에 나타내었듯이, 필타 안으로 침윤한 세포 수가 수목추출액 농도 의존적으로 크게 감소한( $IC_{50} = 22 \mu\text{g/ml}$ ) 결과를 나타냈으며, 수목추출액이 사람 동맥평활근 세포의 침윤-이주능을 효과적으로 억제함을 확인하였다. 수목추출액의 농도가 100 µl/ml에서 control의 약 40% 수준으로 감소하여 농도 의존적으로 MMP-9 활성을 억제함을 확인할 수 있었다.

수목추출액의 사람 동맥평활근세포에 대한 독성을 XTT방법으로 검토한 결과,  $IC_{50} = 90 \mu\text{g/ml}$ 에서



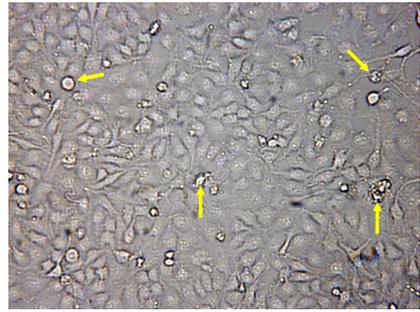
**Fig. 3.** Human arterial smooth muscle cell migration ability test.

약한 세포독성을 나타내었다. gelatin zymography 법으로 이들 수목추출액 분획에 대한 matrix metalloproteinase (MMP)-9 활성에 대한 억제도를 검토한 결과, TNF- $\alpha$ 처리 HASMC는 세포이주 활성이 관여하는 MMP-9을 분비하였으며 수목추출액은 이 효소를 강하게 억제하였다. 수목추출액은 농도의존적으로 MMP-9활성을 억제하였으며 Matrigel migration 방법에서 농도 의존적으로 수목추출물의 농도가 증가함에 따라서 TNF-유발 HASMC세포이주를 직선적으로 억제하였다(IC<sub>50</sub> = 65  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). 이러한 결과는 수목추출액이 TNF-유발 HASMC세포의 이주억제활성을 가진 항동맥경화 활성을 가짐을 알 수 있었다.

### 3.3. 수목추출액의 사람정상 간세포주에 대한 세포독성

사람의 간암세포(Chang, 5 × 10<sup>3</sup>)를 각각 96well microplate에 well당 198  $\mu\text{L}$ 씩 분주한 후 MTT assay를 실시하였던 바, 세포 독성이 없거나 낮은 것으로 나타났다(Fig. 4). 수목추출액이 폐놀계 화합물을 함유하며 간세포보호능, 적혈구 산화방지 등이 알려져 있다. 그리고, acetylcholinesterase 저해활성과 항염증 활성이 있다.

항동맥경화제제들이 녹차의 polyphenols, resveratrol, limonene, 마늘의 organosulfur 성분에서 보고된 바 있다(Kaegi, 1998). 특히 녹차의 polyphenol과 그 성분인 epigallocatechin gallate는 MMP-9활성을 억



**Fig. 4.** Normal hepatocellular toxicity. Arrows indicate a slight cytotoxicity induced by apoptosis.

제한다(Demeule *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2004a; Ha *et al.*, 2004b; Ha *et al.*, 2004c; Chung *et al.*, 2004b). 사람의 간암세포(Hep3B, 5 × 10<sup>3</sup>)를 각각 96well microplate에 well당 198  $\mu\text{L}$ 씩 분주한 후 세포독성을 검사한 결과, 간암세포에는 강한 선택적인 독성을 나타내었다.

또한 추출된 열수 수목추출액을 임상적으로 사용하려면 독성이 없어야 하므로, 독성검사와 간세포계 효소에 미치는 영향을 검토하였다. 무처리군의 정상 랫트(1군 5마리)에 대한 열수추출 다당류의 복강 내 투여시의 치사량을 구하고자 하였으나, 5일 동안 950  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이하 투여시에 사망을 일으키지 않았다. 또한 950  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 복강내 투여시, 24시간 후의 S-GOT, S-GPT, S-Alp에 어떠한 영향도 미치지 않았다(Table 1).

### 3.4. 수목추출액의 항산화성에 대한 효과

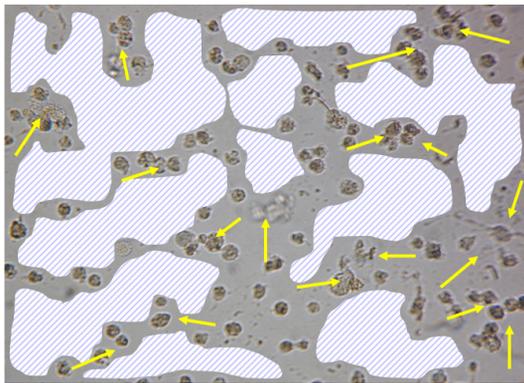
암 유발 물질을 투여하지 않은 군들(1군과 2군)간의 비교에서 열수 수목추출액의 투여군에서 과산화물분해효소의 활성이 29% 이상 증가함을 나타내었다, 또한 암 유발 물질의 투여군들간(2군, 4군 그리고 5군)의 비교에서도 열수 수목추출액의 투여군(4군과 5군)에서 과산화물분해효소의 활성이 유의적으로 증가하였다(Table 2).

본 연구의 수목추출액은 임상 투여시에 경구 또는 비경구 투여가 가능하며 일반적인 의약품제제의 형

**Table 1.** Toxicity of wood extract and its effect on blood leaking enzyme

Dose ( $\mu\text{l}/\text{kg}$ )	Time (h)	Activation.(%)			
		S-GOT <sup>a</sup>	S-GPT	S-Alp	
Normal group (no treatment group)		100	100	100	
Wood extract	500	1	101.4 $\pm$ 8.1	100.6 $\pm$ 6.2	98.3 $\pm$ 5.2
		6	98.7 $\pm$ 5.2	105.3 $\pm$ 5.3	101.5 $\pm$ 3.3
		12	99.4 $\pm$ 7.5	105.3 $\pm$ 3.7	109.5 $\pm$ 9.6
		24	103.2 $\pm$ 6.3	96.5 $\pm$ 7.3	103.3 $\pm$ 8.6
Wood extract	1000	1	102.2 $\pm$ 3.3	101.2 $\pm$ 4.8	100.5 $\pm$ 8.6
		6	99.3 $\pm$ 7.3	109.3 $\pm$ 8.8	105.8 $\pm$ 12.1
		12	104.7 $\pm$ 10.2	105.2 $\pm$ 7.4	98.6 $\pm$ 8.7
		24	98.4 $\pm$ 8.7	106.4 $\pm$ 8.1	105.2 $\pm$ 9.4

<sup>a</sup> Each value is the result of 3 repeated experiments with 5 animals. ( $\pm$  S.E).



**Fig. 5.** Toxicity to liver cancer cell lines. Arrows indicate strong apoptosis-inducing cytotoxicity.

태로 사용될 수 있다. 즉, 본 연구의 수목추출액은 실제 임상투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 생약 수목추출액에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순

**Table 2.** Effect of wood extract on peroxidase

Group	unit/ mg protein (% activation)
Normal group (1 group)	1.018 $\pm$ 0.063 (100)
Control group (2 group)	0.871 $\pm$ 0.074 (85.53)
(3 group)	1.315 $\pm$ 0.148 (129.15)
(4 group)	0.980 $\pm$ 0.111 (96.30)
(5 group)	1.168 $\pm$ 0.100 (114.87)

한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 수목추출액의 유효용량은 350~600 mg/kg이고, 바람직하기로는 200~500 mg/kg이며, 하루 1~3회 투여될 수 있다. 또한, 열수 수목

추출액 중에서 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 하는 기능성 건강보조식품을 제공할 수 있다.

우리나라 임지의 거의 절반을 차지하는 참나무류는 국내에 6종으로 알려져 있고 도토리를 이용한 식용 재료에 대한 연구는 일부 알려져 있지만 목질 자체의 약리성분에 대한 연구는 이루어져 있지 못한 실정이다. 참나무의 목초액 유기물을 사용하여 항암 활성을 나타내는 암치료 및 예방, 항균 및 항산화 효과를 갖는 목초액 유기물(한국 특허등록 제733982호)에 관한 기술이 일부 기재되어 있다. 그러나, 상기 목초액 유기물은 탄화공정으로 제조되므로 유해물질을 함유하고 있어 인체에 유해한 문제점이 있다. 이런 점에서 고압의 수증기 폭쇄재를 이용한 참나무류 수목추출물의 이용은 탄화에 의한 유해 유기물의 발생을 억제하고 최소한 식품의 첨가물로서 이용이 가능하게 되었다. 수목추출액의 약리성분은 글루코스를 비롯한 일련의 탄수화물류와 리그닌 등의 페놀성 화합물류 및 우론산 등의 유기산류와 소량의 휘발성 분류가 존재한다. 탄수화물류는 생리활성물질이고, 에너지 대사 물질로서, 영양 균형이 제대로 이루어지도록 하여, 영양의 과소나 과다에 의한 암 확장을 감소시킨다. 폴리페놀류인 상기 페놀성화합물류는 산화를 방지하는 작용, 즉 항산화 기능을 갖고 있다. 또한, 폴리페놀류는 콜레스테롤이 소화관으로 흡수되는 것을 막아주기 때문에 혈중 콜레스테롤의 수치를 낮게 해주는 작용도 한다. 그중 여러 플라보노이드 성분들은 몸안의 면역세포를 활성화시키고, 모세혈관투과억제, 항알러지, 진경, 혈압강하, 살충, 항균, 간세포보호, 항산화작용등이 있으며, 항바이러스, 혈당강하, 항암작용이 있다. 상기 유기산류는 혈액순환을 원활히 하고, 고혈압, 당뇨, 동맥경화 등 성인병을 예방하는 효과가 있다. 상기 휘발성분류는 암세포 성장을 억제하고, 고혈압에 효과가 있고, 간기능을 활성화하는 효과가 있다. 따라서 리그노 셀룰로오스계 바이오매스 물질의 저분자화에 의한 수목 추출물의 안전성이 검증된 참나무와 같은 재료에 대해서는 식품의 원료 및 첨가물, 나아가 약리성분을 이용한 제약 원료로의 이용이 크게 기대된다고 하겠다. 따라서 이런 일련의 결과들은 목질계 바이오매스 자원이 폭

쇄처리를 적용하여 추출된 약용성분이 건강식품이나 약리성분의 원료로 사용하는데 중요한 기초 자료를 제공할 것이다.

## 4. 결 론

폭쇄처리된 신갈나무로부터 유래된 열수추출물에 대한 안전성과 항산화활성에 대해 조사하였다. 그 결과, 수목추출액은 사람 동맥평활근 세포에 대해 (IC50 > 500  $\mu\text{l/ml}$ )농도로 독성을 나타내었으나 독성이 미약하여 인체에 해가 없을 것으로 판단되었다. 수목추출액의 MMP-9 억제활성을 검토한 결과, 농도 의존적으로 MMP-9 활성을 강력하게 저해하여 세포 독성은 미약하면서 Matrigel migration방법에서 농도 의존적으로 TNF-유발 HASMC세포이주를 억제하였다. 또한 사람의 간세포에 대한 세포 독성이 없거나 낮은 것으로 나타났다. 폭쇄처리된 신갈나무로부터 유래된 열수추출물은 노화방지(항산화성) 및 면역증강활성을 가지며, 독성이 없으므로 미용식품 등의 건강보조식품 및 고혈압 제제 등 의약품의 원료로도 접목되어 임산자원인 목재소재가 고부가화한 제품으로 널리 이용될 수 있을 것으로 판단되었다. 본 연구 결과, 신갈나무 폭쇄처리재의 열수추출물은 뛰어난 안전성과 항산화성이 있음을 확인하였다.

## 사 사

본 연구는 산업통상자원부 지역주력산업육성-창의 융합R&D “제주지역 물과 식물자원을 이용한 숙취 해소제의 개발(과제번호: R0004218)”의 지원에 의하여 수행되었습니다.

## REFERENCES

- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, I., Negro, M.J., Castro, E. 2006. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochemistry* 41: 423-429.

- Chung, T.W., Lee, Y.C., Kim, C.H. 2004a. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB Journal* 18(10): 1123-1125.
- Chung, T.W., Moon, S.K., Chang, Y.C., Ko, J.H., Lee, Y.C., Cho, G., Kim, S.H., Kim, J.G., Kim, C.H. 2004b. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB Journal* 18(14): 1670-1681.
- Cuperus, T., Coorens, M., van Dijk, A., Haagsman, H.P. 2013. Avian host defense peptides, *Developmental and Comparative Immunology* 41(3): 352-369.
- Demeule, M., Brossard, M., Page, M., Gingras, D., Beliveau, R. 2000. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1478: 51-60.
- Ha, K.T., Kim, J.K., Lee, Y.C., Kim, C.H. 2004a. Inhibitory effect of Daesungki-Tang on the invasiveness potential of hepatocellular carcinoma through inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities. *Toxicology and Applied Pharmacology* 200(1): 1-6.
- Ha, K.T., Lee, T.K., Kwak, K.H., Kim, J.K., Kim, D.I., Choi, D.Y., Kim, C.H. 2004b. Inhibitory effect of Cho-Deung-San on human aortic smooth muscle cell migration induced by TNF- $\alpha$  through inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activity. *Vascular Pharmacology* 41(3): 83-90.
- Ha, K.T., Kim, J.K., Kang, S.K., Kim, D.W., Lee, Y.C., Kim, H.M., Kim, C.H. 2004c. Inhibitory effect of Sihoga-Yonggol-Moryo-Tang on matrix metalloproteinase-2 and -9 activities and invasiveness potential of hepatocellular carcinoma. *Pharmacological Research* 50(3): 279-285.
- Haas, T.L. 2005. Endothelial cell regulation of matrix metalloproteinases. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 83(1): 1-7.
- Heber, D. 2001. Herbs and atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*: 93-96.
- Huang, Y., Wei, X., Zhou, S., Liua, M., Tu, Y., Li, A., Chen, P., Wang, Y., Zhang, X., Tai, H., Peng, L., Xia, T. 2015. Steam explosion distinctively enhances biomass enzymatic saccharification of cotton stalks by largely reducing cellulose polymerization degree in *G. barbadense* and *G. hirsutum*. *Bioresource Technology* 181: 224-230.
- Inoue, M., Tajima, K., Hirose, K., Hamajima, N., Takezaki, T., Kuroishi, T., Tominaga, S. 1998. Tea and coffee consumption and the risk of digestive tract cancers: data from a comparative case-referent study in Japan, *Cancer Causes Control* 9: 209-216.
- International Agency for Research on Cancer. 1991. Coffee, tea, mate, methylxanthines, and methylglyoxal. Lyon, France: IARC Monogor Eval Carcinog Risk Hum 51: 41-271.
- Jung, J.Y., Yang, J.K. 2016. Enhancing Enzymatic Digestibility of *Miscanthus sinensis* using Steam Explosion Coupled with Chemicals. *Journal of the Korean Wood Science and Technology* 44(2): 218-230.
- Kaegi, E. 1998. Unconventional therapies for cancer: 2. Green tea. The Task Force on Alternative Therapies of the Canadian Breast Cancer Research Initiative. *Canadian Medical Association Journal* 158: 1033-1035.
- Kim, J.H., Lee, J.S., Lee, K.R., Shim, M.J., Lee, M.W., Shin, P.G., Cheong, J.C., Yoo, Y.B., Lee, T.S. 2012. Immunomodulating and Antitumor Activities of *Panellus serotinus* Polysaccharides, *Mycobiology* 40(3): 181-188.
- Kondo, S., Kubota, S., Shimo, T., Nishida, T.,

- Yosimichi, G., Eguchi, T., Sugahara, T., Takigawa, M. 2002. Connective tissue growth factor increased by hypoxia may initiate angiogenesis in collaboration with matrix metalloproteinases. *Carcinogenesis* 23(5): 769-776.
- Lee, M.O., Jang, H.J., Rengaraji, D., Yang, S.-Y., Han, J.Y., Lamont, S.J., Womack, J.E. 2016. Tissue expression and antibacterial activity of host defense peptides in chicken. *BMC Veterinary Research* 12: 231-240.
- Maeda, K., Kuzuya, M., Cheng, X.W., Asai, T., Kanda, S., Tamaya-Mori, N., Sasaki, T., Shibata, T., Iguchi, A. 2003. Green tea catechins inhibit the cultured smooth muscle cell invasion through the basement barrier. *Atherosclerosis* 166: 23-30.
- Malemud, C.J. 2006. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *FRONTIERS IN BIOSCIENCE* 11: 1696-1701.
- Moon, S.K., Cho, G.O., Jung, S.Y., Gal, S.W., Kwon, T.K., Lee, Y.C., Madamanchi, N.R., Kim, C.H. 2003. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cellcycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301: 1069-1078.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Nedamani, E. Ranjbar, Sadeghi Mahoonak, A.R., Ghorbani, M., Kashaninejad, M. 2014. Antioxidant interactions in green tea and oak extracts combination. *Journal of Food Science & Technology* (2008-8787) 12(49): 121-130.
- Olefsky, Jerrold M; Glass, Christopher K, Macrophages. 2009. inflammation, and insulin resistance, *Annual Review of Physiology* 72: 219-246.
- Sheehan, J., Himmel, M.E. 1999. Enzymes, energy, and the environment: Cellulose development in the emerging bioethanol industry. *Biotechnology Progress* 15: 817-827.
- Sua, C.-L., Wub, C.-J., Chenc, F.-N., Wangd, B.-J., Sheue, S.-R., Wonf. S.-J. 2007. Supernatant of bacterial fermented soybean induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma Hep 3B cells via activation of caspase 8 and mitochondria. *Food and Chemical Toxicology* 45(2): 303-314.
- Sun, S., Cao, X., Zhang, X., Xu, F., Sun, R., Jones, G. 2014. Characteristics and enzymatic hydrolysis of cellulose-rich fractions from steam exploded and sequentially alkali delignified bamboo (*Phyllostachys pubescens*). *Bioresource Technology* 163: 377-380.
- Wang, M., Qin, X., Mudgett, J.S., Ferguson, T.A., Senior, R.M., Welgus, H.G. 1999. Matrix metalloproteinase deficiencies affect contact hypersensitivity: Stromelysin-1 deficiency prevents the response and gelatinase B deficiency prolongs the response, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(12): 6885-6889.