생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
50(1) : 32 ~ 36 (2019)

황칠나무 추출물의 항산화 및 간세포보호효과

이창용 · 양민혜 · 문전옥*
부산대학교 약학대학

Antioxidant and Hepatoprotective Effects of the Ethanol Extract of *Dendropanax morbifera* Leveille on the *t*-Butyl Hydroperoxide-Induced HepG2 Cell Damages

Changyong Lee, Minhye Yang, and Jeon-Ok Moon*
College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Abstract – *Dendropanax morbifera* Leveille, an endemic species in Korea, is best known as a tree that produces a resinous sap. Although *D. morbifera* is used in folk medicine for various diseases, its active ingredients are largely unknown. In this study, we investigated antioxidative activities of ethanolic extracts of three parts of this plant including leaves, debarked stems, and roots. The root extracts exhibited strong 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) scavenging activity compared with leaf or stem extracts. The root extracts showed hepatoprotective activity against *t*-butyl hydroperoxide-induced HepG2 cells, and reduced the ROS level in the cells. The root fractions lowered the mRNA level of COX-2 on lipopolysaccharide-stimulated Raw246.7 cells. These results suggest that ethanolic root extracts of *D. morbifera* are a source of antioxidant and hepatoprotective compounds, which indicate a potential for a botanical drug.

Keywords – *Dendropanax morbifera*, Hepatoprotective activity, Antioxidant activity

황칠나무(*Dendropanax morbifera* Leveille)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 상록활엽수로 우리나라의 제주도와 전남도서지역에서 자생하고 있다. 황칠나무의 껍질에 상처를 낼 때 분비되는 황색 수액은 예로부터 목공예품의 고급 도료로 사용해 왔고 민간에서 잎은 차로, 황칠나무의 추출물은 혈행개선, 면역력강화, 당뇨병 등에 약재로 사용해 왔다.

최근 들어 황칠나무가 지니고 있는 약리활성이 보고되고 있는데 그 범주가 상당히 넓다. 많은 경우 잎을 사용한 연구로서 황칠나무 잎의 메탄올 추출물을 사용한 tyrosinase 저해 및 멜라닌 생성억제 활성이 보고되었고,[1] 잎의 에탄올 추출물을 사용하여 지질 대사 개선 기능이 있음이 보고되었다.[2] 잎 추출물이 생식샘 저하증[3]에 효과가 있고, 항비만,[4] 면역기능개선[5]과 파킨슨질환 개선[6]에 효과가 있을 가능성도 보고되었다. 또한 항산화 효과, 항염증효과, 항혈소판응집효과와 항암효과를 지님에 따라 갱년기 여성장애에 도움을 줄 수 있는 천연물으로의 개발 가능성을 제시하고 있다.[6]

*교신저자(E-mail) : mjo@pusan.ac.kr
(Tel) : +82-51-510-2808

한편, 민간에서 간기능 개선효과를 위해서는 잎, 줄기 뿌리를 적당히 혼합한 황칠나무 추출액을 음용하는 경우가 많다. 일반적으로 급성 및 만성 간손상에 대한 예방 및 치료를 기대하고 사용되는 건강기능식품들은 간세포의 손상을 경감시키는 치료의 보조제에 해당하는 것으로 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 항산화 및 항염증 효과를 보이고 있다.[7] 식품 속에는 항산화능을 지니는 다양한 피토케미칼이 존재하여 각종 질병의 예방에 효과가 있는 것으로 보고되고 있는데 황칠나무의 경우 항산화능에 기반한 여러 효과들이 보고되고 있으나 간보호효과를 지니는 유효성분이 따로 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 간보호효과를 지닌 유효성분을 규명하기 위한 연구의 일환으로 황칠나무의 잎, 줄기 및 뿌리를 에탄올을 사용하여 따로 추출하고, 이들 에탄올 추출분획을 이용하여 각 분획의 항산화활성을 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 포촉능을 사용하여 비교 검토하였다. 간세포주를 이용하여 *t*-butyl hydroperoxide(*t*-BHP)로 유도된 세포상해에 대하여 황칠나무 추출물이 간세포 보호 기능효과를 발휘하는지를 비교 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용된 황칠나무(*Dendropanax morbifera* Leveille)는 2017년 보길도에서 채취한 것을 구입하여 사용하였으며, 양민혜(부산대학교 약학대학) 교수가 감별하였고, 표본(PNU-0051)은 부산대학교 약학대학 생약학 연구실에 보관 중이다.

황칠나무 추출 – 건조된 황칠나무의 뿌리(143.8 g), 잎(77.0 g), 줄기(291.3 g)를 각각 95% EtOH 2 L씩 2 회 반복하여 초음파 추출하였다. 이를 진공농축기를 이용하여 감압하에 농축한 결과, 황칠나무 뿌리 추출물(0.8 g, 수율 0.6%), 잎 추출물(5.8 g, 수율 7.5%), 줄기 추출물(1.1 g, 수율 0.4%)을 얻었다. 각 추출물은 사용 용도에 따라 DMSO 또는 에탄올에 녹여 사용하였다.

기기 및 시약 – 세포배양에서 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지와 fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin 용액은 Hyclone 제품을 구입해 사용하였다. *t*-BHP, DPPH, 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFDA), lipopolysaccharide(LPS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromides(MTT)와 Trolox는 Sigma-Aldrich사에서 구입하여 사용하였다.

세포주배양 – HepG2 cells과 Raw264.7 cells은 한국 세포주 은행에서 구입하여 사용하였다. FBS와 100 units/ml penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 1~2일에 한번씩 배양액을 바꿔주면서 세포분화가 최대에 도달했을 때 phosphate buffered saline(PBS)으로 세포를 세척한 후 trypsin을 처리하여 부착된 세포를 분리, 원심분리 하여 세포를 모은 다음, 배지를 잘 혼합하여 계대 배양 하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정 – 항산화능은 DPPH라디칼에 대한 환원력으로 측정하였다.[8] 에탄올에 농도를 달리한 황칠나무 추출물 100 μl와 100 μM DPPH용액 100 μl를 96 well plate에 혼합하여 30분간 실온에 차광시켜 방치시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

***t*-BHP 유도 세포 독성에 대한 간세포보호효과 검토** – 96 well plate에 HepG2 cells을 1×10^4 cells/ml로 seeding하여 24시간 37°C에서 배양한 후 세포가 잘 부착되면, 황칠나무 추출물을 농도별로 4시간 전 처리한 후 *t*-BHP(30 μM)로 3시간 처리하였다.[9] Cell viability는 1 mg/ml의 MTT solution을 각 well당 50 μl씩 주입하여 37°C에서 4시간 동안 재배양한 후 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다.

ROS Level 측정 – HepG2 cell을 96 well plate에 5×10^4 cells/ml로 seeding 후, 다양한 농도의 황칠추출물과 함께 37°C incubator에서 12시간 동안 배양 후 배양액을 제거하였다. FBS-free medium에 녹인 DCFDA를 100 μl 주입하여 (최종농도 25 μM) incubator에서 1시간 동안 배양하였다. PBS로 세척 후에 30 μM *t*-BHP를 처리하여 fluorescence platereader, GENios(Tecan Instrument, Salzburg, Austria)를 이용해 5분 간격으로 30분간 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였다.[10]

LPS로 유도한 Raw264.7 Cell의 Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA발현량 측정 – 6 well plate에 Raw264.7 cells을 1×10^6 cells/ml로 분주하여 24시간 37°C에서 배양하여 황칠나무 추출물을 농도별로 4시간 전 처리한 뒤, LPS (1 μg/ml)를 6시간 처리하였다. Total RNA 분리를 위해 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, Trizol reagent(Invitrogen) 1 ml를 첨가하여 세포를 수집하였다. 수집한 세포에 Chloroform을 200 μl를 첨가하고 vortexing 후, 12,000 *g*에서 10분간 원심분리를 하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮기고, isopropanol을 500 μl을 넣어 얼음에 10분간 방치 후 다시 원심분리 하였다. 침전된 RNA를 70% 에탄올용액 1 ml을 넣고 2회 세척한 후, 건조시켜 DEPC가 처리된 증류수에 용해시켰다. A260/A280 nm의 비율이 1.8~2.0 범위 내의 값을 갖는 RNA를 0.2 μg/μl로 정량하여 total RNA 시료로 실험에 사용하였다. cDNA 합성은 iScript cDNA Synthesis Kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였고. PCR은 PromegaGoTaq FlexiDNA Polymerase PCR kit를 사용하여 1 μg cDNA와 GAPDH(forward: 5′-GAC AAC TTT GGC ATC GTG GA-3′, reverse: 5′-ATG CAG GGA TGA TGT TCT GG-3′), COX-2(forward: 5′-CCA GAG CAG AGA GAT GAA ATA CCA-3′, reverse: 5′-GCA GGG CGG GAT ACA GTT C-3′) Primer (Bioneer, 대전)를 포함하는 20 μl 반응액으로 수행하였다. COX-2는 95°C에서 2분(1 cycle), 95°C에서 30초, 59°C에서 1분(36 cycles), 72°C에서 1분(1 cycles), 72°C에서 5분(1 cycle) 반응시켰고, GAPDH는 95°C에서 2분(1 cycle), 95°C에서 30초, 55.5°C에서 1분(35 cycles), 72°C에서 1분(1 cycles), 72°C에서 5분(1 cycle) 반응시켰다. PCR 산물은 ethidium bromide를 첨가한 agarose gel에 전기영동한 후 자외선 광으로 유전자 발현정도를 구했다. 밴드의 강도는 UV light illumination(Gel Doc/ ChemiDoc imager, Azure) 소프트웨어에 의해 정량분석 하였다.[11]

통계분석 – 실험결과의 통계적인 유의성은 Student's *t*-test로 분석하였으며 *p* value가 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의성 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

DPPH 라디칼 소거능 – 황칠나무 추출물의 항산화능은 DPPH라디칼에 대한 환원력으로 측정하였다. 대표적인 라디칼 소거제인 Trolox의 IC_{50}이 15.80 μM인 실험계에서 황

Table I. Effects of the ethanolic extracts from *Dendropanax morbifera* on DPPH radical scavenging activity

Substances	Concentration	Inhibition (%)	IC_{50}
DMR (μg/ml)	10	9.21 ± 0.01	40.74
	25	26.98 ± 0.00	
	50	54.92 ± 0.00	
	75	58.41 ± 0.01	
	100	91.42 ± 0.01	
	200	106.98 ± 0.01	
DMS (μg/ml)	25	8.89 ± 0.01	52.74
	50	36.67 ± 0.01	
	75	65.56 ± 0.01	
	100	101.11 ± 0.01	
DML (μg/ml)	25	11.53 ± 0.00	108.98
	50	22.77 ± 0.00	
	75	30.26 ± 0.00	
	100	40.35 ± 0.00	
	200	70.03 ± 0.00	
	500	106.05 ± 0.00	
Trolox (μM)	10	36.13 ± 0.00	15.80
	50	85.24 ± 0.00	
	75	95.17 ± 0.00	
	100	100.00 ± 0.00	

The reaction mixture consisted of 0.1 ml of 100 μM ethanolic solution of DPPH and 0.1 ml of various concentrations of sample solution. After allowing the mixture to stand at room temperature for 30 min, the absorbance of the remaining DPPH was determined at 517 nm. Trolox was used as a positive control. DMR: the root extracts; DMS: the stem extracts; DML: the leaf extracts

칠나무의 뿌리(DMR), 줄기(DMS) 및 잎(DML) 추출물의 IC_{50}은 각각 40.74, 52.74, 108.98 μg/ml로서 세 분획 모두 DPPH라디칼 소거능을 보이고 있으나 뿌리 추출물의 라디칼 소거능이 가장 높았다(Table I).

t-BHP 유도 세포 독성에 대한 간세포보호효과 검토 – 본 연구에서 사용한 *t*-BHP는 세포 독성 유발 물질로 널리 사용되는 물질로서, 세포내 미토콘드리아의 cytochrome c에 의해 대사되어 *t*-butoxyl, *t*-butylperoxyl 및 methyl radical 등의 free radical을 생성하여 지질과산화, 단백질 산화 및 핵산의 손상을 초래한다고 보고되어 있다.[12] 본 실험에서도 최종 농도가 30 μM이 되게 *t*-BHP를 3시간 처리하였을 때의 cell viability는 대조군의 약 50%정도로 감소하였다. 이때 농도를 달리한 황칠나무의 뿌리, 줄기 및 잎 추출물을 4시간 전처리하여 *t*-BHP의 간세포주에 대한 세포 독성에 미치는 영향을 각각 살펴보았다. 대조군의 cell viability를 100%로 보고 *t*-BHP 처리군의 cell viability를 0으로 하여 비교하였을 때, 뿌리 추출물은 농도의존적으로 세포보호효과를 나타내었으며 50, 100, 150 및 200 μg/ml를 전처리하였을 경우 각각 15.5, 26.7, 49.3 및 80.5%의 세포보호효과를 보였다(Fig. 1A). 줄기와 잎의 추출물을 전 처리한 후 *t*-BHP를 처리하였을 경우에도 추출물의 농도가 높아짐에 따라 세포보호효과는 상승하였으나(Fig. 1B와 1C) 뿌리 추출물의 결과와 비교할 때 상대적으로 그 효과가 약한 것을 알 수 있었다. 이 결과를 근거로 할 때, 황칠나무 추출물의 간세포보호효과는 뿌리 분획에 포함되어 있는 유효 성분이 가장 큰 기여를 할 가능성이 제시되었다.

황칠나무 추출물의 간세포내 ROS 생성에 미치는 영향 – *t*-BHP로 유도한 간세포 상해에 대한 황칠나무의 세포보호효과가 세포내의 활성산소 생성 억제와 관련 있는 지를 검토하기 위해 DCFDA의 형광물질 생성량을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 세포내에서 *t*-BHP 처리에 의해 ROS가 발생하면 형광강도가 강해진다. 이때 항산화제 역할을 하는 유효성분이 추출물 내에 존재하면 세포내에서 발생한 ROS와 반응하여 형광물질의 생성을 억제하게 된다. 황칠나무 뿌리 추출물을 전 처리하였을 경우, 추출물의 농도의존적으로 형광물질의 생성이 억제되는 것을 알 수 있다(Fig. 2A). 같은 조건하에서 황칠나무의 줄기와 잎 추출물은 형광물질 생성 억제능을 보이지 않고 있다(Fig. 2B와 2C). 황칠

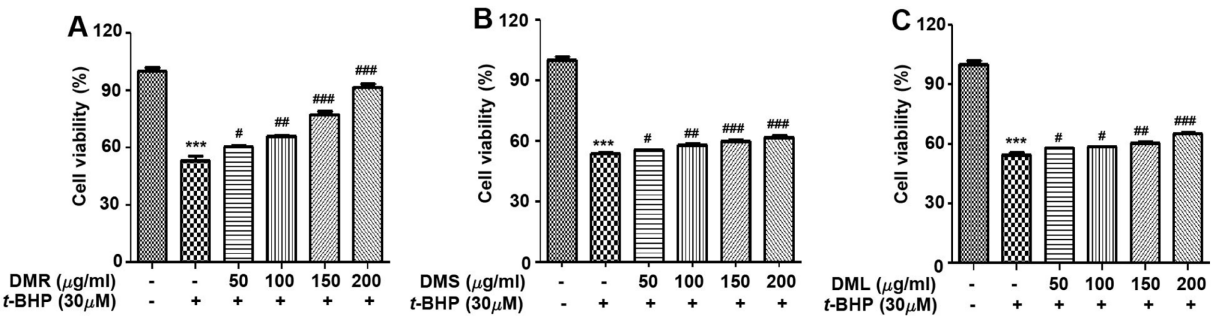

Fig. 1. Effect of *Dendropanax morbifera* root (A), stem (B), and leaf (C) extracts on HepG2 cell damage induced by *t*-BHP. Cell viability was assessed using MTT assays. Data shown represent means ± standard deviation of triplicate experiments.

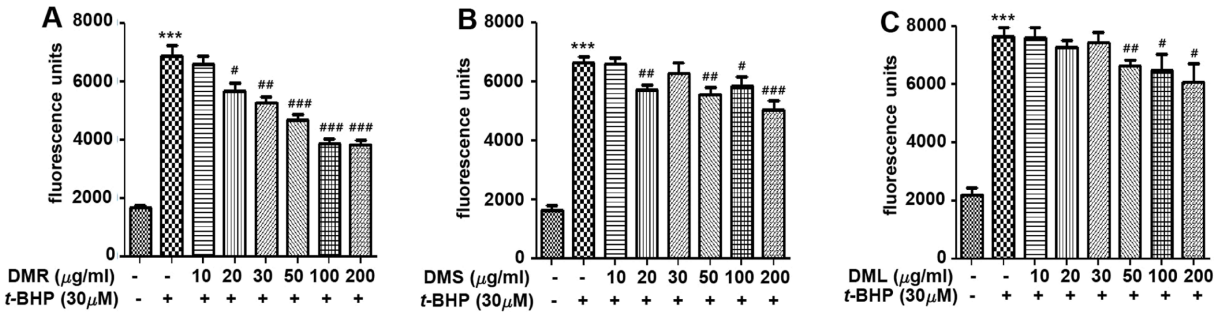

Fig. 2. Effects of *Dendropanax morbifera* root (A), stem (B), and leaf (C) extracts on cellular reactive oxygen species (ROS) levels. HepG2 cells were treated with 30 μM *t*-BHP and loaded with 2',7'-dichlorofluorescin-acetate (DCFDA). Levels of ROS were measured with DCF fluorescence and expressed as fluorescence intensity compared to control. ***p<0.001 compared with the control group and $^{\#}p$<0.05, $^{\#\#}p$<0.01, and $^{\#\#\#}p$<0.001 compared with the *t*-BHP group.

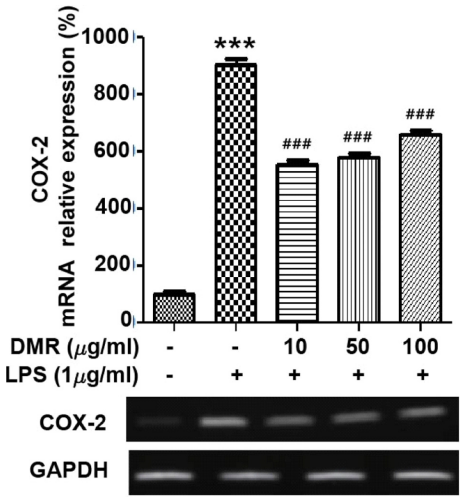

Fig. 3. Effects of *Dendropanax morbifera* root extracts on COX-2 mRNA expression after lipopolysaccaride (LPS) treatment. RT-PCR was performed to measure COX-2 mRNA expression in Raw264.7 cells. ***p<0.001 compared with the control group and $^{\#\#\#}p$<0.001 compared with the LPS group.

나무 추출액이 *t*-BHP처리로 인해 생성된 ROS와 반응하는 것을 볼 때, 각종 산화적 스트레스로부터 간세포를 보호할 능력이 있는 유효성분은 뿌리분획에서 더 많이 존재함을 알 수 있다.

황칠나무 뿌리 추출물의 항염증 효과 – 간질환은 다양한 원인에 의해 지속적인 간염증이 발생할 때 이를 잘 제어하지 못함으로써 발생된다. 간의 Kupffer cell은 외부의 자극에 의해 염증성 mediator들을 분비하여 간세포상해를 가중시킨다.[13] Raw264.7 cells은 murine 마크로파지 계통의 세포로서 LPS 등의 자극에 의해 염증성 인자의 분비를 상승시킨다.[14] 본 실험에서 LPS로 Raw264.7 cells을 자극하였을 때 염증성 단백질인 COX-2의 mRNA 발현량을 증가시키는데 반해서 뿌리 추출물을 전 처리하였을 경우 COX-2의 mRNA 발현양이 감소되는 것을 알 수 있다(Fig. 3). 이 결과는 황칠나무의 뿌리 추출물이 간에서 항염증효과를 나타낼 가능성을 보여준다.

결 론

본 연구는 간기능개선을 목적으로 민간에서 사용되고 있는 황칠나무를 잎, 줄기, 뿌리 분획으로 나누어 각각 에탄올로 추출하여 그 추출물의 항산화효과와 간세포보호효과와의 관계를 비교 검토한 것이다. 황칠나무의 추출물은 높은 항산화효과를 보였는데 그 세기는 뿌리, 줄기와 잎의 순이었다. 각 추출물의 간세포보호효과를 검토한 결과 특히 뿌리 분획의 효과가 큰 것으로 나타났는데 이는 뿌리 추출물의 간세포내의 ROS 생성 억제능과도 일치하는 결과를 보였다. 잎과 줄기는 뿌리와 비교할 때 간세포보호효과가 상대적으로 크지 않은 것으로 보인다. 민간에서 널리 사용되는 황칠나무의 간보호효과를 검토할 때, 우선적으로 뿌리에 포함된 유효성분의 규명이 간보호 효과를 지닌 건강기능성 식품의 개발에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

사 사

이 과제는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Mo, J. H. and Oh, S. J. (2013) Tyrosinase inhibitory activity and melanin production inhibitory activity of the methanol extract and fractions from *Dendropanax morbifera* Lev. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **11**: 275-280.
2. Youn, J. S., Kim, M. S., Na, H. J., Jung, H. R., Song, C. G., Kang, S. Y. and Kim, J. Y. (2018) Screening test for *Den-*

dropanax morbifera Leveille extracts: in vitro comparison to ox-LDL-induced lipid accumulation, ethanol-induced fatty liver and HMG-CoA reductase inhibition. *J. Appl. Biotechnol. Biochem.* **61**: 1-8.

3. Jung, M. A., Oh, K. N., Choi, E. J., Oh, D. R., Kim, Y. J., Bae, D., Hong, J. A., Pan, S., Kim, K. M., Kim, D. W. and Choi, C. Y. (2018) In vitro and in vivo androgen regulation of *Dendropanax morbiferus* leaf extract on late-onset hypogonadism. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* **64**: 20-27.
4. Song, J. H., Kang, H. B., Kim, J. H., Kwak, S., Sung, G. J., Park, S. H., Jeong, J. H., Kim, H., Lee, J., Jun, W., Kim, Y. and Choi, K. C. (2018) Antiobesity and cholesterol-lowering effects of *Dendropanax morbifera* water extracts in mouse 3T3-L1 cells. *J. Med. Food* **21**: 793-800.
5. Birhanu, B. T., Kim, J. Y., Hossain, M. A., Choi, J. W., Lee, S. P. and Park, S. C. (2018) An in vivo immunomodulatory and anti-inflammatory study of fermented *Dendropanax morbifera* Léveille leaf extract. *BMC Complement Altern. Med.* **18**: 222.
6. Park, S. Y., Karthivashan, G., Ko, H. M., Cho, D. Y., Kim, J., Cho, D. J., Ganesan, P., Su-Kim, I. and Choi, D. K. (2018) Aqueous extract of *Dendropanax morbiferus* leaves effectively alleviated neuroinflammation and behavioral impediments in MPTP-induced Parkinson's mouse model. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**: 3175214.
7. Casas-Grajales, S. and Muriel, P. (2015) Antioxidants in liver health. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **6**: 59-72.
8. Lv, Q., Si, M., Yan, Y., Luo, F., Hu, G., Wu, H. and Chen, K. (2014) Effects of phenolic-rich litchi (Litchi chinensis Sonn.) pulp extracts on glucose consumption in human HepG2 cells. *J. Funct. Foods* **7**: 621-629.
9. Cheong, K. O., Shin, D. S., Bak, J., Lee, C., Kim, K. W., Je, N. K., Chung, H. Y., Yoon, S. and Moon, J. O. (2016) Hepatoprotective effects of zingerone on carbon tetrachloride- and dimethylnitrosamine-induced liver injuries in rats. *Arch. Pharm. Res.* **39**: 279-291.
10. Yoon, J., Ham, H., Sung, J., Kim, Y., Choi, Y., Lee, J. S. and Kim, D. (2014) Black rice extract protected HepG2 cells from oxidative stress-induced cell death via ERK1/2 and Akt activation. *Nutr. Res. Pract.* **8**: 125-131.
11. Bak, J., Je, N. K., Chung, H. Y., Yokozawa, T., Yoon, S. and Moon, J. O. (2016) Oligonol ameliorates CCl_4-induced liver injury in rats via the NF-Kappa B and MAPK signaling pathways. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**: 3935841.
12. Kennedy, C. H., Church, D. F., Winston, G. W. and Pryor, W. A. (1992) *tert*-Butyl hydroperoxide-induced radical production in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **12**: 381-7.
13. Czaja, A. J (2014) Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J. Gastroenterol.* **20**: 2515-2532.
14. Jin, Z., Yang, Y. Z., Chen, J. X. and Tang, Y. Z. (2017) Inhibition of pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells by 7-hydroxyflavone and 7,8-dihydroxyflavone. *J. Pharm. Pharmacol.* **69**: 865-874.

(2019. 1. 16 접수; 2019. 1. 28 심사; 2019. 2. 8 게재확정)