

Physiological Activity of Methanol Extracts from *Sambucus sieboldiana* var. *miquelii* (Nakai) Hara

Yu Jin Oh¹, Hae Jin Cho¹, Hyun Sim Woo¹, Jun-Gi Byeon², Yeong-Su Kim^{1*} and Dae Wook Kim^{1*}

¹Wild Plant Industrialization Research Division, Baekdudaegan National Arboretum, Bonghwa-gun 26209, Korea

²Forest Bioresource Conservation Division, Baekdudaegan National Arboretum, Bonghwa-gun 26209, Korea

Received July 14, 2020 / Revised August 12, 2020 / Accepted August 18, 2020

Sambucus sieboldiana var. *miquelii* (Nakai) Hara is distributed in Korea, China, and Japan, and has been used as an anti-rheumatic in folk medicine in oriental countries. The present study aims to investigate the potential use of this species in health functional foods, cosmetics, and food preservatives. Methanol extracts of leaves and branches from this plant were prepared to quantitatively analyze the total phenol and flavonoid contents, and to investigate the antioxidative and enzyme inhibitory activities, and the inhibition of nitric oxide (NO) production activity. The results showed that the total polyphenol and flavonoid contents of the crude extract were 1.52±0.1 mg/g and 1.73±0.1 mg/g, respectively. *S. sieboldiana* polyphenols exhibited potent scavenging activity shown by 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay and 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical cation assay. The crude extract also exhibited significant α -glucosidase and tyrosinase inhibitory activity with IC₅₀ values of 183.5 μ g/ml and 323.9 μ g/ml, respectively. Additionally, the crude extract exhibited strong anti-inflammatory activity determined through the nitric oxide inhibition assay in a dose-dependent manner with an IC₅₀ value of 36.7 μ g/ml and no cytotoxic effect on the macrophages. Therefore, we demonstrated that the leaves and branches of *S. sieboldiana* extract possess antioxidant, anti-diabetic, depigmentation potential, and NO production inhibitory activities. According to recent research, *S. sieboldiana* has great potential as a source of the bioactive compound which could be used as food, cosmetics, and pharmaceutical agents.

Key words : α -Glucosidase inhibitory activity, anti-inflammatory effect, antioxidant, *Sambucus sieboldiana* var. *miquelii* (Nakai) Hara, tyrosinase inhibitory activity

서 론

인동과(Caprifoliaceae)에는 딱총나무속(*Sambucus* LINNE), 가막살나무속(*Vibrunum* LINNE), 땀강나무속(*Abelia* R, BROWN), 병꽃나무속(*Weigela* THUNBERG), 인동덩굴속(*Lonicera* KINNE)이 있다. 딱총나무속 식물은 세계에 약 20종이 분포하고 한국에는 말오줌나무, 덧나무, 지령쿠나무, 넓은 잎 딱총나무, 딱총나무 등을 포함하여 8종이 소교목 또는 관목으로 분포하고 있다. 이 중 지령쿠나무(*Sambucus sieboldiana* var. *miquelii* (Nakai) Hara)는 산토끼꽃목(Dipsacales) 인동과에 속하는 낙엽관목으로 내공해성과 내음성이 강하다[19]. 딱총나무속은 식용, 관상용, 공업용, 약용에 쓰이고 관상수 및 울타리용에

쓰며 민간적으로 풍습성 관절염, 요통, 골절상 등에 쓴다. 약리 작용은 항진균 효과, 집골 효과, 항산화 작용, 항염증 효과, 항암 효과, 항혈당 효과, 위 보호 효과, 항바이러스 효과 등이 보고되고 있다[10, 12, 17, 31, 39]. 딱총나무속에서 분리된 성분으로는 terpene, flavonoid, fatty acid, phenolic compound, lignan, iridoid glycosides 계열의 화합물을 분리, 보고되었다 [6, 9, 11, 24, 31]. 한편 phytochemical이 풍부한 자원으로 예측되는 딱총나무속의 지령쿠나무에 관한 생리 활성 연구가 된 바 없었다.

최근 의학기술이 발전되어 인간의 평균수명이 늘어나는 반면, 과도한 스트레스에 노출된 현대인들의 건강에 관한 관심이 증가하여 노화 억제 및 건강 유지를 위해 항산화제에 관한 관심이 높아지고 있다. Butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT)와 같은 합성 항산화제의 부작용으로 인하여 천연물 유래의 항산화제에 관련된 연구가 활발하게 진행되고 있다[2, 14]. 활성산소종(Reactive Oxygen species, ROS)은 생명체의 호흡 과정과 에너지 대사 과정에서 발생하며, 생체 내 제거 기전에서 거의 소멸하지만, 활성산소가 만성적으로 많이 발생하면, 항산화 방어계의 균형이 깨져서 다양한 질환의 원인이 된다[37]. 특히, free radical (NO, OH, O₂)은 분자 상 산소가 활성산소로 변하여 다른 분자들과 반응

*Corresponding authors

Tel : +82-54-679-2740, Fax : +82-54-679-0636

E-mail : yskim@kiam.or.kr (Yeong-Su Kim)

Tel : +82-54-679-2738, Fax : +82-54-679-0636

E-mail : dwking@kiam.or.kr (Dae Wook Kim)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하면서 생성되어 각종 성인병과 노화의 원인으로 큰 관심의 대상이 되고 있으며, 피부 면역기능을 억제해 피부 염증을 유발하여, 노화를 가속한다[5, 10, 33].

염증반응은 다양한 세포에서 분비되는 산화적 스트레스 물질이나 감염성 물질에 의하여 유발되는 정상적인 방어 기전으로서 한시적으로 일어나고 빠르게 회복되지만, 다양한 염증 질환에서는 염증성 면역세포에 분비되는 ROS, 과도한 염증성 cytokine이 여러 조직에 만성적인 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있다. 대식세포는 식균작용을 통해 항상성을 유지에 관여하며, lipopolysaccharide (LPS)와 같은 자극 때문에 염증성 매개 인자인 proinflammatory cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α)을 비롯하여 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 효소의 발현을 통해 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂)를 생성하여 염증반응을 유도하고 염증이 발생한 부위로 면역세포의 이동이 촉진된다[12, 18, 20]. 이 중 NO는 반응성이 높은 물질로 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되며 NOS는 constitutive NOS와 inducible NOS (iNOS)로 나누어진다. 특히 iNOS는 외부 자극이나 염증 매개성 cytokine 등에 의해 자극을 받게 되면 hepatocyte, smooth muscle cell, bone marrow cell, monocyte, macrophage 등 다양한 세포에서 발현되어 다량의 NO를 생성하여 염증반응을 촉진하는 역할을 한다[21, 34]. 따라서 NO의 생성과 pro-inflammatory cytokine의 발현을 억제하는 천연물을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 딱총나무속의 생리화학적 유용성이 확인되었음에도 아직 지렁쿠나무의 다양한 생리 활성에 대한 구체적인 연구결과가 미흡한 것을 확인한바 지렁쿠나무 잎과 가지 추출물을 이용하여 항산화 활성, 세포독성, tyrosinase 활성, α -glucosidase 활성 및 염증 인자 발현 저해 효과를 확인함으로써 지렁쿠나무의 기능성 바이오 소재 개발 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 지렁쿠나무 잎과 가지는 경상북도 봉화군 묘봉(석포면 석포리) 일대에서 2019년 05월 02일에 채집하여 건조 후 사용하였으며, 국립백두대간수목원 변준기박사가 동정하였다. 지렁쿠나무 표본(BDNA-2019-48)은 국립백두대간수목원 표본실에 보관하였다.

시료제조

건조한 지렁쿠나무 잎과 가지를 분쇄한 후 무게의 20배량(w/v)의 95% methanol로 시료가 충분히 잠기도록 하여 상온에서 3일간 침지한 후 총 3회 반복 추출하였다. 추출액은 Filter

paper (NO. 4 Whatman international Ltd., Maidstone, England)로 여과한 다음 rotary evaporator (UT-1000, EYELA, Tokyo, Japan)로 45°C에서 농축하여 추출물을 제조하여 10 mg/ml의 농도로 디메틸설폭사이드(DMSO; Sigma, USA)에 용해시켜 4°C에 보관하였다.

세포주 배양

대식세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포주는 한국 세포주 은행(KCLB No 40071, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 세포 성장을 위한 배지로는 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM) 배지를 이용하여 37°C 배양기에서 5%의 CO₂를 유지하면서 배양하였다. FBS와 antibiotics는 Gibco (Rockville, MD, USA), 배지는 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 배양된 세포는 2-3일마다 배지를 교환하면서 실험에 사용하였으며, 세포가 80% 이상 자랐을 때 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS, Gibco, Rockville, MD, USA)로 세척한 후 계대 배양하였다.

세포 생존율 측정

세포의 생존율 정도를 확인하기 위하여 MTT 시험법으로 측정하였다. RAW 264.7세포를 96 well plate에 1 \times 10⁴ cells/ml의 농도로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 지렁쿠나무 추출물을 농도별(12.5, 25, 50, 100 μ g/ml)로 처리하여 24시간 반응시킨 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액을 5 mg/ml 농도로 제조하여 각각 100 μ l 처리한 후 2시간 배양하였다. 배양 후 MTT 용액을 제거하고, dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 μ l 첨가하여 포마잔(formazan)을 완전히 용해한 후, 마이크로판독기(multiskan Go, Thermo scientific, USA)를 이용하여 540 nm의 파장에서 그 흡광도를 측정하여 생존율은 백분율로 계산하였다. 이때, 측정된 흡광도는 생존하는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소 작용에 의해 MTT가 formazan으로 환원된 양을 나타내며, 생존하는 세포 수와 비례한다. 지렁쿠나무 추출물로 전 처리한 세포의 생존율은 시료 무첨가 군의 생존율의 평균값에 대한 상대적인 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

산화질소(Nitric oxide, NO) 측정

NO는 대표적인 자유라디칼 중 하나로 생체 내에서 중요한 세포 신호전달물질로서 작용하고 있으며, 세포막을 쉽게 통과할 수 있는 성질이 있어 생체 내에서 다양한 작용을 하나 과잉 생산 시 산화적 스트레스의 유발을 통해 염증 및 세포 손상의

원인이 된다[15, 26]. 배양액 내의 산화질소(II) 함량 측정은 아질산염(nitrite)을 산화질소(II) 생산의 지표로 이용한 Griess 반응을 이용하여 실시하였다. RAW 264.7 세포를 24 well plate에 1×10^5 cells/ml 농도로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 지렁쿠나무 추출물을 최종 농도가 12.5, 25, 50, 100 µg/ml가 되도록 처리하여 2시간 배양 후, 지방질다당류(lipopolysaccharides, LPS)를 최종 농도 1 µg/ml가 되도록 처리한 뒤, 24시간 자극한 후 배양 상층액을 취하여 100 µl씩 새 96 well plate에 옮긴 후 Griess 시약(reagent) 100 µl씩 혼합하여 15분 동안 상온에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 이용하여 표준 검량 곡선을 작성하였고 함량 계산에 이용하였다. 실험에 사용한 시약은 모두 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구하여 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

지렁쿠나무 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법을 변형하여 측정하였다[36]. 10 mg/ml 농도의 추출물 20 µl를 넣고 Folin-Ciocalteu 시약(Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA) 100 µl를 넣어 상온에서 5분간 반응시키고 sodium carbonate (Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA)를 80 µl씩 가한다. 상온에서 2시간 동안 반응한 후에 Microplate Reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid (Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA)로 작성한 표준 검량곡선으로 계산하여 구하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

지렁쿠나무 추출물의 flavonoid 함량은 Abdel-Hameed[1]의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 추출물 50 µl를 넣고 메탄올로 녹인 2% aluminum nitrate (Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA) 50 µl를 첨가 후 실온에서 10분 동안 반응시킨다. 이후 Microplate Reader를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 흡광도는 quercetin (Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA)으로 작성한 표준 검량곡선으로 계산하여 구하였다.

DPPH radical 소거 활성 측정

지렁쿠나무 추출물의 항산화능을 확인하기 위해 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거 활성을 측정하였다[16]. 지렁쿠나무 추출물은 농도별로 메탄올에 녹여 준비한 후, DPPH 활성 저해율을 측정하기 위해 추출물 5 µl에 6×10^{-5} M 메탄올에 녹인 DPPH 용액을 195 µl를 가하여 상온 암실에서 15분 반응시키고 Microplate Reader를 사용하여 흡광도를 515 nm에서 측정하였다. 각 추출물의 radical 소거 활성은 50% 저해 농도(Inhibitory Concentration, IC₅₀)를 계산하였

다. 양성 대조군은 ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

ABTS radical 소거 활성

ABTS (2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS cation decolorization assay에 의한 방법을 일부 변형하여 시행하였다[22]. 7.4 mM ABTS reagent를 증류수로 용해하여 1:1로 혼합한 후 암소에서 실온으로 15시간 이상 동안 방치하여 ABTS radical을 형성시킨 후 735 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.01 이 되도록 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS radical 용액 198 µl에 지렁쿠나무 추출액 2 µl를 넣은 후 실온에서 5분간 반응시켜 735 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 radical 소거 활성은 50% 저해 농도(Inhibitory Concentration, IC₅₀) 값으로 계산하였고, ascorbic acid를 표준곡선으로 사용하였다.

Tyrosinase 저해 활성

멜라닌(Melanin) 합성 주요 단계에 관여하는 tyrosinase 저해 활성 측정은 효소 작용 결과 형성되는 DL-β-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) chrome을 비색법으로 측정하였다[28]. 96 well plate에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 분주한 후 지렁쿠나무 추출물을 각각 최종 농도가 62.5, 125, 250, 500 µg/ml 되도록 10 µl씩 넣는다. 그 후 sodium phosphate buffer (pH 6.5)에 녹인 2000 unit/ml의 mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA)를 10 µl씩 넣어 준 후 1.5 mM의 L-tyrosine을 20 µl씩 넣은 후 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5)로 최종 200 µl가 되게 조절하였다. Tyrosinase 활성 억제능은 37°C에서 20분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다. 양성대조구로는 arbutin (Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition activity (\%)} = \frac{1 - (C_{\text{Abs}} - S_{\text{Abs}})}{(C_{\text{Abs}} - B_{\text{Abs}})} \times 100$$

C_{Abs}: 대조구 흡광도, S_{Abs}: 시료 흡광도

B_{Abs}: 시료 무첨가구의 흡광도

α-Glucosidase 저해 활성

α-Glucosidase에 대한 저해 활성 측정은 Tibbot과 Skadsen의 방법에 따라 pNPG (p-nitrophenyl β-D-glucoside)에서 유리되어 나오는 반응 생성물인 p-nitrophenol을 측정하여 수행하였다[17]. 지렁쿠나무 추출물을 각각 최종 농도가 62.5, 125, 250 µg/ml 되도록 20 µl씩 넣는다. 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) 120 µl와 0.1 U/ml α-glucosidase 50 µl를 가하여 37°C에서 10분 동안 방치한다. 이후 2 mM pNPG 10 µl를 가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 혼합액에 100

mM sodium carbonate 100 μ l를 넣어 반응을 정지시키고 흡광도를 UV-spectrometer를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다. 양성대조구로는 acarbose (Sigma-Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

$$\alpha\text{-glucosidase inhibition activity (\%)} = [1 - (C_{\text{Abs}} - S_{\text{Abs}}) / (C_{\text{Abs}} - B_{\text{Abs}})] \times 100$$

C_{Abs} : 대조구 흡광도, S_{Abs} : 시료 흡광도

B_{Abs} : 시료 무첨가구의 흡광도

통계학적 분석

본 실험에서 얻어진 결과에 모든 값은 3회 이상의 반복 실험의 측정값의 평균(mean) \pm 표준오차(SD)로 나타내었으며, 각 실험 결과 값에 대한 통계적 분석은 student's t-test를 이용하여 분석하였으며, p 값이 0.05 미만(p -value<0.05)이면 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

지렁쿠나무 추출물의 세포 독성 및 항염증 활성

Nitric oxide (NO) 합성 효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 반응성이 강한 NO는 염증반응 및 염증을 촉진해서 조직을 손상시키는 것으로 알려져 있으며, 세포독성, 신경전달계 및 혈관 이완 및 혈소판 억제 등의 여러 가지 생물학적인 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 다량 생성될 경우 기관지염, 관절염, 종양 발생 및 세포의 돌연변이와 같은 생태병리학적 과정과 밀접한 관계가 있다[29]. 그람 음성균의 세포 외막에 있는 내 독소로 알려져 있는 LPS는 대식세포 또는 단핵구를 자극함으로써 염증 매개성 cytokine들의 분비를 자극하여 정상적인 세포의 기능을 방해할 수 있고, 염증 반응을 촉매 한다.

본 연구에서는 지렁쿠나무 추출물에 대한 항염증 효과를 확인하기 위하여 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 macrophage의 세포 독성 및 NO 생성 억제를 확인하였다(Fig. 1). 지렁쿠나무 추출물의 세포독성은 MTT assay를 이용하여 확인하였다. 지렁쿠나무 추출물은 100 μ g/ml 농도에서 세포 생존율이 99.5%로 측정되어 고농도 처리에서도 세포 생존에 영향을 미치지 않아 지렁쿠나무 추출물의 RAW264.7 macrophage에 대한 독성이 없음을 확인할 수 있었다. 따라서 지렁쿠나무 추출물이 macrophage에 대해 세포독성에 영향을 미치지 않은 농도인 100 μ g/ml 이하의 다양한 농도에서 실험을 진행하였다. 대식 세포가 LPS로 자극될 때 iNOS와 COX-2가 발현되어 NO를 생성하게 되고 활성 산소 결합종에 의해 염증 반응을 나타낸다. 따라서 항염증 효능을 확인하는 biomarker로써 LPS에 의해 과생산된 대식세포의 NO 생성 억제를 측정

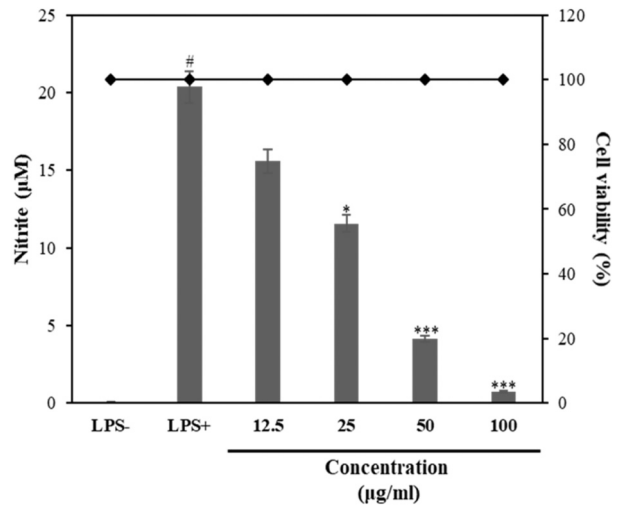


Fig. 1. Effect of the sample extract from *Sambucus sieboldiana* var. *miquelii* (Nakai) Hara on nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Raw 264.7 cells. LPS, 1 μ g/ml; Sample extract, final concentration 12.5, 25, 50, 100 μ g/ml respectively. The data shown represent means \pm SD of three independent experiments; # p <0.05 vs. the control group; * p <0.05, *** p <0.001 vs. the LPS-treated group. The cytotoxicity was determined by MTT assay as described in Materials and Methods.

하는 방법이 일반적이다. 따라서 본 연구에서는 지렁쿠나무 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위해 LPS로 과생산된 대식세포의 NO 생성 억제를 확인하였다. 그 결과, 지렁쿠나무 추출물의 농도별(12.5, 25, 50, 100 μ g/ml) 처리에 대한 NO 생성이 각각 23.5%, 43.2%, 79.6%, 96.3%로 모두 유의적으로 감소시키는 것으로 나타나 항염 효과가 매우 우수함을 확인하였다(Fig. 1).

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

폴리페놀(polyphenol)은 식물에서 발견되는 화합물질의 일종으로 한 분자 내에 2개 이상의 페놀성 하이드록실 그룹을 가지는 방향족 화합물들이며 식물계에 분포되어 폴리페놀에는 phenolic acid, flavonoid, lignin, stilbene 계열로 분류된다. 페놀성 계열은 현재까지 식물에서 유래된 천연 항산화제로 보고되고 있으며, 강력한 항산화 능력을 가지고 있다. 플라보노이드 계열은 식물에서 꽃의 색을 만들어내며, 고등 식물에서 향기를 만들어내는 가장 중요한 역할을 한다. 이들 폴리페놀 물질들은 항산화, 항균력이 있으며, 항염, 항암, 항알레르기 효과와 심장질환, 노화 방지 등을 지연하거나 예방하는 효과가 있어 현재까지 의약품, 식품, 화장품 등을 활용되고, 총 폴리페놀의 함량이 증가할수록 항산화 활성이 우수하다고 알려졌다[29]. Folin-Ciocalteu reagent를 사용하여 표준물질인 GA를 10-500 μ g/ml로 제조하여 작성한 검정 곡선에 기초하여 총 페놀성 화합물 함량을 측정하였다. 플라보노이드 함량은

Table 1. ABTS , DPPH , total phenolic and total flavonoid contents of methanol extract from the *Sambucus sieboldiana* var. *miquelii* (Nakai) Hara

Sample	RSA(ABTS) (µg/ml)	RSA(DPPH) (µg/ml)	Total phenolic content (mg/g)	Total flavonoid content (mg/g)
<i>Sambucus sieboldiana</i> var. <i>miquelii</i> (Nakai) Hara	85.6	124.0	1.5±0.1	1.73±0.1

Total phenolic and total flavonoid contents were measured 1 mg/ml, 500 µg/ml respectively.

표준물질인 rutin을 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml 농도로 제조하여 작성한 검정 곡선으로부터 비교 정량하였다. 지렁쿠나무 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 분석 결과, 폴리페놀 함량은 mg/g, 플라보노이드 함량은 1.73±0.1 mg/g으로 측정되었다 (Table 1). 기존에 알려진 딱총나무 잎과 줄기 추출물의 페놀 함량 분석 결과와 유사한 페놀 함량을 나타내어 생리 활성도 우수할 것으로 판단되었다[4].

DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼 소거 활성

체내 활성산소종(ROS)은 환원 대사, 체내 효소계, 물질적 또는 환경적 요인 등에 의해 끊임없이 생성되고 항산화 효소계와 비타민과 같은 항산화 화합물이 존재함으로써 활성산소종의 생성과 제거 사이에 균형을 갖추어 세포 기능을 유지하게 된다. 그러나 활성산소종이 만성적으로 발생하거나 항산화 시스템의 기능이 저하되면 지질 과산화 유도, 단백질 및 DNA 손상시켜 세포의 노화와 변형을 유도하고 간은 산화적 스트레스가 일어난다. 이런 산화기전 억제 효과를 확인하기 위해 DPPH와 ABTS radical 소거능과 환원력을 본 실험에서 측정하였다. DPPH는 화학적으로 안정화된 free radical을 지닌 수용성 물질로 플라보노이드 및 페놀 화합물과 같은 항산화 활성이 있는 물질에 의해 수소나 전자를 받아들여 불가역적으로 안정한 분자를 형성, 환원됨에 따라 짙은 보라색이 탈색되는 원리를 이용하여 천연물로부터의 항산화 활성을 측정하기 위하여 많이 사용되는 방법이다[36]. 환원력 또한 항산화 활성에 관계되는 중요한 인자로 ABTS radical cation decolorization은 친수성 및 친유성 물질의 항산화 활성을 측정하기 위해 사용되는 방법이기 때문에 더 민감하게 항산화 능력을 알아볼 수 있다 [25].

지렁쿠나무 추출물의 DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 IC₅₀으로 나타내었다. 지렁쿠나무 추출의 DPPH 라디칼 소거 활성의 IC₅₀은 124.0 µg/ml, ABTS 라디칼 소거 활성의 IC₅₀은 85.6 µg/ml로 나타났다(Table 1). 이는 positive control인 BHT, viatmin과 비교해서도 더 우수한 결과를 나타내어 천연 항산화제로서의 산업화 적용 가능성은 매우 높다고 할 수 있을 것이다.

Tyrosinase 저해활성

피부의 색소 물질인 melanine은 모든 살아있는 유기체에서

발견되는 흑갈색 또는 적갈색을 띠는 천연 색소이다. Melanine은 피부세포가 자외선과 같은 자극에 노출되었을 때 세포 내 소기관인 리보솜에서 tyrosinase의 생합성에서 합성되며 [23, 32], 미백효과는 melanine의 형성이 억제되면 기대할 수 있다. Tyrosinase는 피부 세포 내에 존재하는 tyrosine을 산화시켜서 melanine 생성 경로에서 필수적인 역할을 하는 효소이며, 멜라닌 생합성 초기 단계에서 tyrosine이 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)으로 변환되고, DOPA를 산화시켜 DOPA quinone으로 변환시킨 후, 붉은 계열의 eumelanin과 갈색 계열의 pheomelanin을 합성시켜 멜라닌이 형성되는데, tyrosinase는 이들 반응의 속도 조절에 관여해 멜라닌 생합성에서 가장 중요한 역할을 수행한다[3, 13].

본 연구에서는 지렁쿠나무 추출물 처리에 대한 tyrosinase 저해 활성을 평가하였다. 양성대조군은 arbutin을 사용하였다. 지렁쿠나무 추출물을 농도별(62.5, 125, 250, 500 µg/ml)로 처리하여 tyrosinase의 저해 활성에 관하여 평가한 결과, 각각 15.4%, 35.6%, 46.9%, 54.5%의 저해능이 나타났다(Fig. 2). 지렁쿠나무 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 유의적으로 tyrosinase를 억제하는 것으로 관찰되었다. 따라서 지렁쿠나무

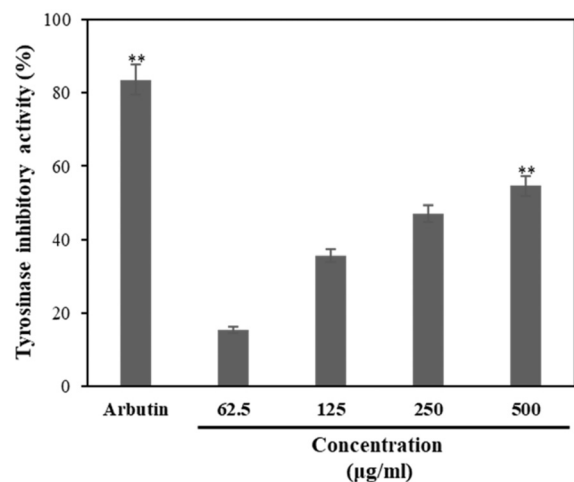


Fig. 2. Tyrosinase inhibitory activity of the sample extract from *Sambucus sieboldiana* var. *miquelii* (Nakai) Hara. Arbutin, 500 µg/ml; Sample extract, final concentration 62.5, 125, 250, 500 µg/ml respectively. The data shown represent means ± SD of three independent experiments; **p<0.01 vs. the control group.

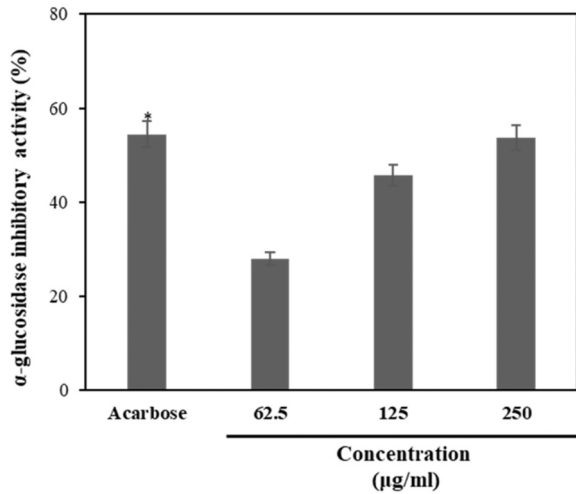


Fig. 3. α-glucosidase inhibitory activity of the sample extract from *Sambucus sieboldiana* var. *miquelii* (Nakai) Hara. Acarbose, 500 μg/ml; Sample extract, final concentration 62.5, 125, 250 μg/ml respectively. The data shown represent means ± SD of three independent experiments; **p* < 0.05 vs. the control group.

추출물의 처리는 melanin 형성에 관여하는 tyrosinase 효소 활성을 억제함으로써 멜라닌 생합성 저해에 기여하는 것으로 생각된다.

α-Glucosidase 저해 활성

당뇨의 치료 방법 중 섭취한 탄수화물 소화과정에서 α-glucosidase는 α-amylase에 의해 분해된 이당류를 단당류로 최종 분해하는 효소로 혈액 내 포도당을 증가시킨다[35]. 국내 시판되고 있는 α-glucosidase 저해제는 acarbose와 voglibose가 있다. 그러나 이들 약제는 방귀와 설사, 경련성 복통 등의 부작용이 있으며[7, 8], 소화 흡수 장애를 동반한 만성 장 질환, 간경화, 중증 신장 장애, 중증 감염 환자에게 사용이 금지되어 있어 이런 부작용을 줄이고 식후 혈당 강하 효과가 있는 대체식품 및 천연물에 대한 관심이 증가하고 있다.

지렁쿠나무 추출물의 농도별(62.5, 125, 250 μg/ml) 처리에 대한 α-glucosidase 저해 활성이 각각 27.9%, 45.7%, 53.7% 억제되는 것으로 나타났다. 지렁쿠나무 추출물 250 μg/ml 농도에서 53.7% 억제되는 결과는 positive control로 사용된 acarbose 500 μg/ml 농도에서 54.4% 억제되는 것과 유사한 활성을 나타내었다(Fig. 3). 최근 부작용이 적은 천연물로부터 α-glucosidase 저해활성을 조사하여 혈당조절 효과가 우수한 소재를 발굴하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 지렁쿠나무 추출물은 혈당 조절에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 산림식물자원 유래 버거능 향상

소재개발(No. 2019061270)과 2020년도 경상북도의 재원으로 수행된 네이처 생명산업 기술개발 기업지원사업의 연구결과로 이에 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Abdel-Hameed, El-S. S. 2008. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chem.* **114**, 1271-1277.
2. Ahn, J., Gammon, M. D., Santella, R. M., Gaudet, M. M., Britton, J. A., Teitelbaum, S. L., Terry, M. B., Nowell, S., Davis, W., Garza, C., Neugut, A. I. and Neugut, A. I. 2005. Associations between breast cancer risk and the catalase genotype, fruit and vegetable consumption, and supplement use. *Am. J. Epidemiol.* **162**, 943-952.
3. Berneburg, M., Plettenberg, H. and Krutmann, J. 2000. Photoaging of human skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **16**, 239-244.
4. Chae, J. W. and Cho, Y. J. 2012. Antioxidative Activity of Extracts from *Sambucus williamsii* var. *coreana*. *Kor. J. Plant Res.* **25**, 363-371.
5. Cencioni, C., Spallotta, F., Martelli, F., Valente, S., Mai, A., Zeiher, A. M. and Gaetano, C. 2013. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 17643-17663.
6. Choi, H., Lee, J., Chang, Y. S., Woo, E. R. and Lee, D. G. 2013. Isolation of (-)-olivil-9'-O-β-d-glucopyranoside from *Sambucus williamsii* and its antifungal effects with membrane-disruptive action. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 2002-2006.
7. Clissold, S. P. and Edwards, C. 1988. Acarbose. *Drugs* **35**, 214-243.
8. Dabhi, A. S., Bhatt, N. R. and Shah, M. J. 2013. Voglibose: an alpha glucosidase inhibitor. *JCDR* **7**, 3023.
9. de Melo, C. L., Queiroz, M. G. R., Arruda Filho, A. C. V., Rodrigues, A. M., de Sousa, D. F., Almeida, J. G. L. and Santos, F. A., et al. 2009. Betulinic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 8776-8781.
10. Gonzalez-Burgos, E. and Gomez-Serranillos, M. P. 2012. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr. Med. Chem.* **19**, 5319-5341.
11. Hwang, B., Cho, J., Hwang, I. S., Jin, H. G., Woo, E. R., and Lee, D. G. 2011. Antifungal activity of lariciresinol derived from *Sambucus williamsii* and their membrane-active mechanisms in *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**, 489-493.
12. Jang, B. C., Paik, J. H., Kim, S. P., Shin, D. H., Song, D. K., Park, J. G. and Suh, S. I. 2005. Catalase induced expression of inflammatory mediators via activation of

- NF-kappaB, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia. *Cell. Signal.* **17**, 625-633.
13. Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V. J., Lozano, J. A. and Garcia-Borron, J. C. 1994. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J. Biol. Chem.* **269**, 17993-18000.
 14. Joung, Y. M., Park, S. J., Lee, K. Y., Lee, J. Y., Suh, J. K., Hwang, S. Y., Park, K. E. and Kang, M. H. 2007. Antioxidative and antimicrobial activities of Liliun species extracts prepared from different aerial parts. *Kor. J. Food Sci Technol.* **39**, 452-457
 15. Kalyanaraman, B. 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox. Biol.* **1**, 244-257.
 16. Kedare, S. B. and Singh, R. P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* **48**, 412-422.
 17. Kim, K. Y., Nam, K. A., Kurihara, H. and Kim, S. M. 2008. Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry* **69**, 2820-2825.
 18. Kim, Y. S., Lee, S. J., Hwang, J. W., Kim, E. H., Park, P. J. and Jeong, J. H. 2012. Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264. 7 macrophages. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1205-1210.
 19. Lee, C. B. 2006. Korea illustrated plant book II. *Hyangmoonsa* **227**, 228.
 20. Lee, J. Y., Yoo, D. H., Jeng, Y. S., Joo, S. H. and Chae, J. W. 2018. Verification of anti-inflammatory activities of the ethanol extracts of *Glechoma hederacea* var. *longituba* in RAW 264.7 cells. *J. Life Sci.* **28**, 429-434.
 21. Lee, K. H., Nam, H. O. and Yoon, W. H. 2007. Effect of protein-bound polysaccharide isolated from *Acanthopanax senthopolitanum* in reducing the toxic effect of cisplatin. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**, 1-17.
 22. Lee, Y. M., Bae, J. H., Kim, J. B., Kim, S. Y., Chung, M. N., Park, M. Y., Ko, J. S., Song, J. and Kim, J. H. 2012. Changes in the physiological activities of four sweet potato varieties by cooking condition. *Kor. J. Nutr.* **45**, 12-19.
 23. Lerner, A. B. and Fitzpatrick, T. B. 1950. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**, 91-126.
 24. Lima-Júnior, R. C. P., Sousa, D. I. M., Brito, G. A. C., Cunha, G. M., Chaves, M. H., Rao, V. S. N. and Santos, F. A. 2007. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, α , β -amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK 1-receptors, and K⁺ ATP channels. *Inflammation Res.* **56**, 487-494.
 25. Loizzo, M. R., Bonesi, M., Di Lecce, G., Boselli, E., Tundis, R., Pugliese, A., Menichini, F. and Frega, N. G. 2013. Phenolics, aroma profile, and in vitro antioxidant activity of Italian dessert passito wine from Saracena (Italy). *J. Food Sci.* **78**, C703-708.
 26. Lowenstein, C. J., and Snyder, S. H. 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* **70**, 705-707.
 27. Lv, H., Chen, S., Xu, X., Zhu, M., Zhao, W., Liu, K. and Liu, K. 2015. Isolation of linoleic acid from *Sambucus williamsii* seed oil extracted by high pressure fluid and its antioxidant, antiglycemic, hypolipidemic activities. *Int. J. Food Engineer.* **11**, 383-391.
 28. VJ, H. 1987. Mammalin monophenol monooxygenase (tyrosinase): Purification, properties and reaction catalyzed. *Methods Enzymol.* **142**, 154-165
 29. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747.
 30. Nathan, C. and Xie, Q. W. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915-918.
 31. Oliveira, F. A., Chaves, M. H., Almeida, F. R., Lima Jr, R. C. P., Silva, R. M., Maia, J. L., Brito, G. A. and Rao, V. S. 2005. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *J. Ethnopharmacol.* **98**, 103-108.
 32. Park, H. Y., Kosmadaki, M., Yaar, M. and Gilchrest, B. A. 2009. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol. Life Sci.* **66**, 1493-1506.
 33. Pillai, S., Oresajo, C. and Hayward, J. 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation induced matrix degradation - a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* **27**, 17-34.
 34. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. and Freeman, B. A. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**, 4244-4250.
 35. Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Hu, B., Kumar, S., Placido, J. and William, Z. S. 2008. α -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydr Res.* **343**, 1278-1281.
 36. Sim, H. J., Seo, W. T., Choi, M. H., Kim, K. H., Shin, J. H. and Kang, M. J. 2016. Quality characteristics of vinegar added with different levels of black garlic. *Kor. J. Food Cook Sci.* **32**, 16-26.
 37. Stanely Mainzen Prince, P. and Menon, V. P. 2001. Antioxidant action of *Tinospora cordifolia* root extract in alloxan diabetic rats. *Phytother. Res.* **15**, 213-218.
 38. Suh, W. S., Kim, C. S., Subedi, L., Kim, S. Y., Choi, S. U., and Lee, K. R. 2017. Iridoid Glycosides from the Twigs of *Sambucus williamsii* var. *coreana* and Their biological activities. *J. Nat. Prod.* **80**, 2502-2508.
 39. Wang, Z. Y., Han, H., Yang, B. Y., Xia, Y. G. and Kuang, H. X. 2011. Two new iridoid glycosides from the root barks of *Sambucus williamsii* Hance. *Molecules* **16**, 3869-3874.
 40. Xiao, H. H., Dai, Y., Wong, M. S. and Yao, X. S. 2014. New lignans from the bioactive fraction of *Sambucus williamsii* Hance and proliferation activities on osteoblastic-like UMR 106 cells. *Fitoterapi* **94**, 29-35.
 41. Xiao, H. H., Zhang, Y., Cooper, R., Yao, X. S. and Wong, M. S. 2016. Phytochemicals and potential health effects of *Sambucus williamsii* Hance (Jiegumu). *Chin. Med.* **11**, 36.

초록 : 지렁쿠나무 메탄올 추출물의 생리활성 연구

오유진¹ · 조해진¹ · 우현심¹ · 변준기² · 김영수^{1*} · 김대욱^{1*}

(¹국립백두대간수목원 야생식물산업화연구실, ²국립백두대간수목원 산림생물자원보전실)

한국, 중국, 일본에 분포한 지렁쿠나무는 관절염 치료제로 동양의 민간요법에 사용되었다. 본 연구에서는 지렁쿠나무의 건강기능성 식품, 화장품 및 식품 보존료 등의 기능성 소재로 개발하기 위한 기초자료를 제공하고자 연구를 수행하였다. 지렁쿠나무의 잎, 가지 부위를 메탄올 추출물로 제조하여 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정하고, 항산화 활성, α -glucosidase 저해 활성 및 tyrosinase 저해 활성과 항염증 활성을 검증하였다. 지렁쿠나무 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 1.52 ± 0.1 mg/g and 1.73 ± 0.1 mg/g로 측정되었고, DPPH와 ABTS radical 소거 활성은 처리 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 소거 효과를 나타냈으며, 각각 IC_{50} 값이 124.0 μ g/ml (DPPH), 85.6 μ g/ml (ABTS)로 높은 항산화 효과를 나타내었다. 또한, α -glucosidase 저해 활성 및 tyrosinase 저해 활성은 각각 IC_{50} 값이 183.5 μ g/ml와 323.9 μ g/ml로 우수한 억제 활성을 보였다. 게다가 RAW 264.7 cell에서 LPS로 염증을 유발시켜 nitric oxide (NO) 억제효과 실험에서 지렁쿠나무 추출물의 IC_{50} 값을 측정하였을 때 NO 생성을 농도 의존적으로 저해하는 농도는 36.7 μ g/ml이고, 추출물 100 μ g/ml의 농도에서도 독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로부터 지렁쿠나무 추출물은 항산화, 항염증, 미백, 및 항당뇨 효능을 확인할 수 있었으며, 이는 지렁쿠나무가 기능성 식품, 화장품 및 의약품 소재로서의 활용 가능성을 시사한다. 또한, 지렁쿠나무로부터 생리활성물질의 분리 동정과 메커니즘 규명에 관한 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.