

A Study on Antioxidant and Anti-inflammatory Effects Based on Analysis of Functional Components of *Cornus officinalis* Siebold & Zucc.

Hyun Hwangbo^{1,2}, Ji-Suk Jeung³, Min Young Kim^{1,2}, Seon Yeong Ji^{1,2}, Seonhye Yoon⁴, Tae Hee Kim⁵, Sung Ok Kim⁶ and Yung Hyun Choi^{1,7*}

¹Anti-Aging Research Center, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

²Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

³Gurye-gun Agricultural Center and Gurye Wild Flower Institute, Gurye 57660, Korea

⁴R&D Center, Naturetech Co. Ltd., Jincheon 27858, Korea

⁵R&D Center, Hamsopharm Central Research, Jinan 55442, Korea

⁶Department of Food Science and Nutrition, College of Life and Health Sciences, Kyungsung University, Busan 48434, Korea

⁷Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

Received September 7, 2020 / Revised September 21, 2020 / Accepted September 22, 2020

Cornus officinalis Siebold & Zucc. is traditionally used as an edible and medicinal plant in many countries in East Asia. Previous studies have shown the pharmacological potential of extracts and components of *C. officinalis*, but comparative analysis of the composition of the leaf, stem, and fruit extracts has been insufficient to date. In the present study, the content of active antioxidant and anti-inflammatory ingredients was verified in different *C. officinalis* parts (under-ripe sansuyu, ripe sansuyu, seed, leaf, stem, and dried sansuyu). One active component, murrone, was high in fruit (under-ripe and ripe sansuyu), while loganin was high in fruit (under-ripe sansuyu) and cornin was high in seeds. Total polyphenol contents were highest in fruit (ripe sansuyu) and flavonoids were highest in leaves. DPPH radical scavenging activity was highest in leaves, followed by seeds and then ripe sansuyu extract. The anti-inflammatory efficacy of leaf extracts of *C. officinalis* (LCO) was further investigated by measuring their effects on levels of nitric oxide (NO) and the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-6 in RAW 264.7 macrophages. Non-cytotoxic concentrations of LCO effectively decreased the lipopolysaccharide (LPS)-induced expression of inducible NO synthase, resulting in decreased NO production. LCO also significantly suppressed LPS-induced production and expression of IL-1 β and IL-6. Taken together, the present findings suggest that *C. officinalis* leaves have potential as natural materials for the development of antioxidant and anti-inflammatory agents.

Key words : Active components, anti-inflammation, antioxidant, *Cornus officinalis*

서 론

생체 내 에너지 생성을 위한 정상적인 대사과정에서도 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 발생하며, 이는 불안정하고 반응성이 높아 지나치게 많이 생성되거나 항산화 시스템에 의해 제거되지 못하면 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하게 된다[2, 28, 41]. 지속적인 산화적 스트레스의 자극은 세포막, 핵산, 지질 및 단백질을 포함한 세포 구조물을 손상시키므로써 조직에 비가역적인 변화를 유도하여 노화를 촉진시킬 뿐만 아니라 암, 치매, 관절염, 자가면역질환 등의 질병을

유발하거나 촉진시킨다고 알려져 있다[13, 32]. 그러나 항산화 효소(catalase, glutathione-peroxidase, superoxide dismutase 등)의 활성 증대뿐만 아니라 항산화 활성을 가지는 식약 소재의 적용을 통하여 ROS를 제거함으로써 산화적 스트레스로부터 보호할 수 있다[11, 14].

염증(inflammation)은 물리, 화학적 손상 또는 세균 감염 등의 다양한 외부 자극에 대해 신체를 보호하기 위한 면역 방어기전으로, 면역세포가 이를 인지하고 염증반응이 일어나는 동안 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)과 염증성 매개 인자(pro-inflammatory mediator) 등이 생성된다[16, 26]. 그러나 방어기전에 의한 염증반응이 아닌 병리적인 원인에 의해 발생한 과도하고 지속적인 염증반응은 다양한 질환의 발병 또는 진행을 촉진하는 요인으로 작용한다[9, 12]. 예를 들어 미분화된 대식세포(macrophage)가 그람음성 세균(Gram negative bacteria)의 외막에 존재하는 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)에 과도하게 노출되면 대식세포로 활성화되면서 일련의 염증반응이 촉발된다[27, 33]. 특히 LPS에 노출된

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-3319, Fax : +82-51-893-3333

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

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.

세포는 전사인자인 nuclear factor-κB (NF-κB)가 핵 내로 이동하여 활성화되어 interleukin-1β (IL-1β), IL-6, tumor necrotic factor-α (TNF-α) 등과 같은 염증성 사이토카인의 발현과 생성을 촉진하며, 염증성 매개 인자인 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E₂ (PGE₂)를 생성하는 inducible NO synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 유도한다[23, 27].

층층나무과에 속하는 산수유 나무(*Cornus officinalis* Siebold & Zucc.)의 열매인 산수유(山茱萸, Corni Fructus)는 우리나라를 비롯하여 중국과 일본 등에서 오랫동안 다양한 질환의 예방과 치료의 목적으로 사용되어왔다[7, 15, 17, 29]. 최근 연구들에 의하면 산수유 나무의 추출물은 면역증강, 혈당감소, 항부정맥 및 항균 활성을 포함한 다양한 약리적 효능이 있음이 보고된 바 있으며, 그 열매인 산수유 또한 항고혈당증, 노화방지, 항산화, 신장 및 신경보호 효과 등을 가지고 있다고 알려져 있다[17, 25, 38, 46]. 그럼에도 불구하고 산수유 나무의 잎, 줄기, 열매에 대한 체계적인 성분 분석은 여전히 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 산수유 나무의 부위별 유효성분 함량의 분석과 항산화 및 항염증 활성을 재검증하여 향후 산수유의 기능성 평가를 위한 기초 자료를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

시료 제조

본 연구에서 사용된 산수유의 잎, 줄기, 산수유 열매는 전라남도 구례군 산동면에서 채취한 것으로 구례군 야생화연구소로부터 제공받았다. 잎과 줄기는 2017년 9월 첫 주에 채취 후 세척하여 동결건조(EYELA FDU-2100, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)하여 사용하였으며, 산수유 열매는 9월 첫 주에 덜 익은 산수유 열매(이하 청산수유로 약함)와 12월 첫 주에 익은 산수유 열매(이하 적산수유로 약함)를 직접 채취하

여 씨를 제거한 과육만 동결건조 하였고, 건조 과육(이하 건과로 칭함)은 농가에서 제조하는 방식으로 예비건조, 데치기, 씨앗분리기를 활용한 씨 분리 및 열풍건조의 과정으로 제조하였다. 씨앗은 적산수유의 과육을 제거한 이후 수거하여 열풍건조 분쇄(Laboratory Mill 120, Perten Instruments, Sweden)하였다. 부위별 분말 10 g을 70% ethanol 200 ml와 혼합한 후 1시간씩 3회 반복하여 환류 냉각 추출하였다. 추출된 용액은 여과지(No. 2, Advantec Co. Ltd, Tokyo, Japan)로 여과한 후 감압농축기(EYELA SB-1000, Tokyo Rikakikai Co. Ltd.)로 농축하여 동결건조 후 각각의 수율을 조사하고, 초저온냉동고(MDF-U53V, Sanyo, Japan)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Morroneiside, loganin 및 cornin 함량 분석

산수유의 대표 기능물질인 morroneiside, loganin 및 cornin의 함량은 선행 방법[19, 35]을 참고하여 high-performance liquid chromatography(HPLC, Agilent 1200 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용해 동시 분석하였다. 시험용액은 각 시료 100 mg을 100 ml 정용플라스크에 정밀히 칭량하여 3차 증류수를 가하고 약 30분간 초음파 추출하였다. 방냉 후 10배 희석하여 0.50 μm polytetrafluoroethylene hydrophilic syringe filter (Advantec Co., Tokyo, Japan)로 여과한 후 HPLC를 이용하여 Table 1에 제시한 조건에서 분석하였다. 표준품은 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.(Chengdu, China)에서 구입하였고, 순도는 morroneiside와 loganin이 각각 99.35%와 98.92%이었다. 이동상에 사용한 용매 acetonitrile과 phosphoric acid는 HPLC용을 사용하였다. 검량선 작성을 위해 표준품 약 10 mg을 정밀히 칭량하여 10 ml 용량플라스크에 넣고 3차 증류수로 정용하고 용해하여 1 mg/ml이 되도록 고농도 stock solution을 제조한 후 단계적으로 희석하여 0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 μg/ml의

Table 1. HPLC/DAD operating condition for morroneiside, loganin, cornin and extracts from different parts of *C. officinalis*

Parameter	Condition		
Instrument	Agilent Technologies 1,200 series		
Detector	Diode array detector		
Column	Myghtysil RP-18GP (250×4.6 mm, 5 μm)		
Wavelength	240 nm		
Oven temperature	25°C		
Flow rate	0.6 ml/min		
Run time	45 min		
Injection volume	5 μl		
Mobile phase	Time (min)	Acetonitrile (%)	0.1% Phosphoric acid in DDW (%)
Gradient conditions	0	0	100
	23	21	79
	30	70	30
	35	70	30
	35.1	0	100
	45	0	100

농도로 조제하였다. 각 시료의 지표성분 함량은 표준용액의 크로마토그램에서 얻은 피크의 농도별 면적에 대해 검량선을 작성하여 표준용액의 검량선 대비 농도를 산출하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

각각의 시료에 함유된 총 페놀성 물질의 함량(total phenolic content, TPC)은 Folin-Ciocalteu의 방법을 일부 변형하여 측정하였다[36]. 이를 위하여 시료 200 μ l와 증류수 2.5 ml를 혼합한 후 혼합 용액에 Folin-Ciocalteu's 용액(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 200 μ l를 가하여 30초간 혼합하였다. 이후 6분간 반응시킨 후 탄산나트륨(Na_2CO_3) 용액 2 ml를 가하여 상온에서 90분간 방치한 후 UV-visible spectrophotometer (Optizen 3220 uv, Mecasys, Deajeon, Korea)로 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 표준물질로 하여 표준검량선을 작성하고 시료 중의 총 폴리페놀 함량을 gallic acid equivalents (mg GAE/g, dry weight)로 환산하여 나타냈다.

총 플라보노이드 함량 측정

각각의 시료에 함유된 총 플라보노이드 함량(total flavonoid, TFC)을 측정하기 위하여 추출물 100 μ l에 10% aluminum nitrate 20 μ l, 1 M potassium acetate 20 μ l 및 80% ethanol 860 μ l를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 안정화시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin (Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 표준물질로 하여 표준검량선을 작성하고 시료 중의 총 플라보노이드 함량을 quercetin equivalents (mg QUE/g, dry weight)로 환산하여 나타내었다.

2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능 측정

전자공여능은 Blois의 방법에 따라 DPPH에 대한 수소 공여 효과를 측정하여 전자공여능(EDA; electron donating ability)으로 나타냈다[3]. 이를 위하여 시료 용액 2 ml에 0.2 mM의 DPPH 용액(dissolved in 99% ethanol, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 1 ml 넣고 교반한 후 37°C에서 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도 감소율 차이를 백분율(%)로 나타내어 전자공여능으로 표시하고, 양성 대조군으로는 butyl hydroxy anisole (BHA, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 사용하였다.

세포배양

본 실험에서 사용한 RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collections (Manassas, VA, USA)에서 분양받았다. RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum (WelGENE, Inc., Gyeongsan, Korea)를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's

minimum essential medium (WelGENE, Inc.)을 사용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였고, LPS에 의한 자극 실험을 위해, 세포를 6-well plate (5×10^5 cells/well)에 분주한 후 24시간 배양하고 LPS (100 ng/ml, *Escherichia coli* 055:B5, Sigma-Aldrich Chemical Co.)와 시료를 첨가하여 24시간 동안 다시 배양하였다.

산수유 에탄올 추출물의 세포독성 측정

RAW 264.7 세포에 대한 산수유 에탄올 추출물의 세포독성 여부를 평가하기 위하여 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay를 적용하였다. 이를 위하여 RAW 264.7 세포를 6 well plate (5×10^5 cells/well)에 분주한 뒤 24시간 동안 세포를 부착 및 안정시킨 후 각 추출물을 농도별로 24시간 동안 처리하였다. 24시간 후 5 mg/ml 농도로 MTT 용액(Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 제조하여 각 well 당 200 μ l씩 첨가하고 2시간 동안 37°C, 5% CO_2 incubator에서 반응시킨 후, 용액을 제거하고 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan을 dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Chemical Co.)로 용해시켜 동의대학교 생체조직재생 핵심지원센터의 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

NO 생성 저해 활성 측정

LPS로 자극된 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 NO의 양은 세포배양액 중에 존재하는 NO_2 -형태를 Griess reagent와 반응시켜 측정하였다. 이를 위하여 6 well plate에 분주한 RAW 264.7 세포(5×10^5 cells/well)에 LPS (100 ng/ml)를 단독으로 24시간 처리하거나 20 μ g/ml의 산수유 추출물을 1시간 전처리한 후 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 세포배양 상등액 100 μ l와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 25% phosphoric acid, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 100 μ l를 혼합하여 96 well plates에서 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성의 저해 정도를 평가하기 위하여 sodium nitrite (NaNO_2)의 농도별 표준 곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 산출하였다.

Cytokine 생성량 측정

세포배양액 내의 염증성 사이토카인(IL-1 β 및 IL-6)의 양을 측정하기 위한 Quantikine ELISA kit는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 이를 위하여 NO 생성 저해능 평가와 동일한 조건에서 배양된 세포배양 상등액을 이용하여 제조사의 protocol에 따라 IL-1 β 및 IL-6의 농도를 측정하였다.

단백질 발현 측정을 위한 Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출을 위해 배양이 끝난 세포를 수집하여 phosphate-buffered saline로 세척한 후, lysis buffer (0.5% Triton, 50 mM β-glycerophosphate (pH 7.2), 0.1 mM sodium vanadate, 2 mM MgCl₂, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM dithiothreitol, 2 μg/ml leupeptin, 0.1 mM phenylmethylsulfonylurea 및 4 μg/ml aprotinin, all from Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시켜 세포를 용해시키고 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상층의 단백질은 Bradford protein assay kit (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 이용하여 정량하였다. 동량의 단백질을 Laemmli sample buffer (Bio-Rad Lab.)와 혼합하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel로 전기영동한 후, polyvinylidene difluoride membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시켰다. 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 전이시킨 membrane을 5% skim milk로 blocking하고, 분석하고자 하는 단백질에 해당되는 1차 항체(BD Biosciences, San Jose, CA, USA 및 Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA, Table 2)를 가하여 4°C에서 overnight 반응시켰다. 이를 상온에서 2차 항체(Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA)로 1시간 반응 후 enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Amersham Corp.)를 적용시킨 후 단백질 발현 변화 여부를 가시화하였다.

통계처리

본 연구의 물질 함량분석 결과는 반복 측정된 후 평균±표준편차로 나타내었으며, SPSS Statistics (ver. 22, IBM, NY, USA)를 사용하여 각 처리군 간의 유의성을 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 Duncan's multiple range test로 검증하였다. 세포실험 결과는 3회 실시한 독립적인 실험을 통해 얻은 값을 평균±표준편차로 나타내었으며, Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test 실시한 후 Tukey test로 사후 검증하여 유의적 차이를 판단하였다.

결과 및 고찰

Morroniside, loganin 및 cornin 함량

산수유 나무의 부위별 추출물의 기능성분 함량의 분석을 위하여 morroniside, loganin 및 cornin을 지표성분으로 선택하였으며, 표준용액과 산수유 시료의 크로마토그램을 비교하였다. 지표성분은 서로 간섭되지 않고 분리되었으며, 표준용액과 시료의 peak 유지시간(retention time, RT) 또한 각각 morroniside (22.4 min), loganin (25.7 min) 및 cornin (26.2 min)과 일치하였다. 다음은 표준용액을 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 μg/ml 농도에서 검량선을 작성한 결과, morroniside, loganin 및 cornin의 상관계수(R²) 값이 모두 0.99 이상으로 우수한 직선성을 보였다. 이를 바탕으로 산수유 나무의 열매(청산수유, 적산수유 및 건피), 씨앗, 잎, 줄기의 지표물질 함량을 분석한 결과, morroniside는 열매 중에서 청산수유 및 적산수유에, loganin은 청산수유와 씨앗에 cornin은 잎과 청산수유에 높게 측정되었다(Table 3). 청산수유와 적산수유의 지표물질 함량은 각각 37.5 mg/g 및 22.8 mg/g으로 가장 높으며, 열매의 성숙과정에서 지표물질 함량이 감소하는 것을 알 수 있었다. 건피의 경우 지표물질 함량이 18.8 mg/g으로 적산수유에 비해 낮았으며, loganin은 유의적인 차이가 없으나 morroniside와 cornin의 함량은 유의적으로 낮아졌다. 이는 데치기, 열풍건조 등으로 인해 감소하였으며, loganin은 상대적으로 열에 강한 것으로 판단된다. 이는 선행 연구의 결과들과 유사하였다[5, 42]. 한편, 산수유 씨앗은 morroniside와 cornin은 검출되지 않았으며, loganin의 함량이 10.99 mg/g 청산수유 다음으로 높게 측정되었다. Cornin은 생과에서 씨앗이 70% 이상을 차지하고 있으나, 기능성 소재의 원료로서 활용도가 매우 낮은 편이다. 최근, 산수유 씨앗의 추출물을 이용한 화장품의 방부 효과와 구성 성분에 관한 미백 효과 등과 같은 일부 효능이 보고되었으나[45] 다양한 기능성 및 안전성 평가에 대한 연구는 미비하다. Loganin과 cornin은 기억장애 개선 및 간 손상 보호[44] 등을 포함한 다양한 기능이 있는 것으로 보고되어 있으므로 다른 부위에 비해 loganin과 cornin 함량이 높은 잎을 활용한 기능성 연구는 향후 산업적 활용에 도움이 될 것으로 사료된다.

총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량

산수유 나무의 부위별 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는

Table 2. List of antibodies used for western blot analysis in the present study

Antibody	Dilution	Product no.	Species of origin	Supplier
iNOS	1:1,000	610328	Rabbit polyclonal	BD Biosciences
IL-1β	1:1,000	sc-7884	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
IL-6	1:1,000	sc-53865	Mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.,
Actin	1:1,000	sc-1615	Goat polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Table 3. Active ingredients of morroniside, loganin and cornin of extracts from different parts of *C. officinalis*

Sample	Yield rate (%)	Active ingredients (mg/g)			
		Morrisoniside	Loganin	Cornin	Total
Underripe sansuyu	64	20.76±2.07 ^a	12.28±1.16 ^a	4.43±0.45 ^b	37.5
Ripeness sansuyu	73	13.23±1.20 ^b	6.41±0.55 ^c	3.12±0.48 ^c	22.8
Seed	23	ND ^e	10.99±1.18 ^b	ND ^e	11.0
Leaf	40	2.67±0.31 ^d	6.63±0.86 ^c	6.83±1.53 ^a	16.1
Stem	12	3.04±0.32 ^d	0.57±0.15 ^d	0.46±0.11 ^e	4.1
Sansuyu	72	10.63±0.70 ^c	6.30±0.41 ^c	1.88±0.43 ^d	18.8
F-value		403.421 ^{****}	208.956 ^{****}	106.897 ^{****}	

Value are mean ± SD (n=8). Different letters within a column (a-f) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. **** $p < 0.0001$. ND, Not Detected.

Fig. 1과 같으며, 추출 수율은 열매(64~73%)에서 가장 높았다 (Table 2). 적산수유와 청산수유가 각각 79.39 및 72.19 mg GAE/g으로 높게 측정되었다. 다음은 잎(64.84 mg GAE/g), 씨앗(56.91 mg GAE/g), 건피(38.49 mg GAE/g)의 순이었으며, 줄기(14.32 mg GAE/g)가 가장 낮게 측정되었다. 비록 추출 방법과 용매 및 시간에 따른 차이는 있으나, 선행연구 결과 [24, 25, 31]에 의하면, 산수유 열매, 꽃, 잎을 증류수와 99% ethanol로 37°C에서 1~48시간 진탕 추출한 결과에서 추출 시간이 길어질수록 추출 수율이 증가하였으며, 추출 부위는 열매보다는 꽃과 잎이, 추출 용매는 ethanol 보다는 증류수에서의 추출 수율이 높았다. 산수유 건피 추출 용매의 경우, Im 및 Lee [19]과 Kim 및 Son [22]의 100% 및 80% methanol 추출물의 결과(각각 31.56 mg CAE/g 및 26.7 mg TAE/g)와 비슷한 수준이었다. 산수유 나무의 부위별 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 제시된 결과에서처럼 잎이 20.45 mg QE/g로 가장 높았으며, 열매는 청산수유(3.20 mg QE/g)를 제외한 부위에서 거의 측정되지 않았다. 한편, Jeon et al. [20]은 총 플라보노이드가 5.67 mg QE/g로 총 폴리페놀 34.22 mg/g · hesperidin 함량보다 낮다고 보고한 바 있다.

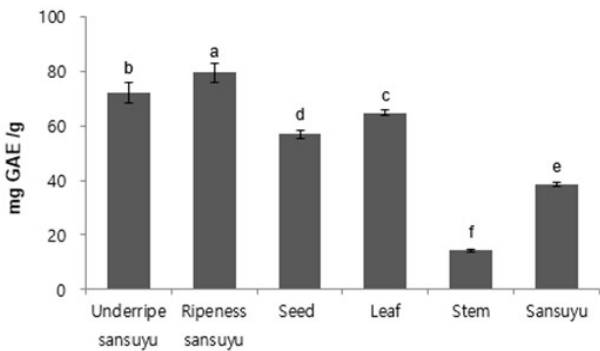


Fig. 1. Total polyphenol contents of extract from different parts of *C. officinalis*. Value are mean ± SD (n=3). Different letters (a-f) above the bars are significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

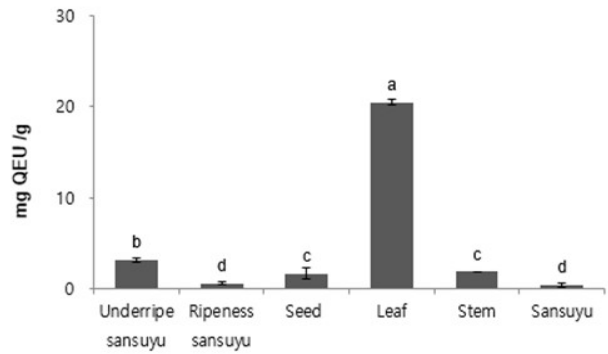


Fig. 2. Total flavonoid contents of extract from different parts of *C. officinalis*. Value are mean ± SD (n=3). Different letters (a-d) above the bars are significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

DPPH radical 소거능

산수유 나무의 부위별 DPPH radical 소거 활성으로 항산화능을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 산수유 전 부위가 양성 대조

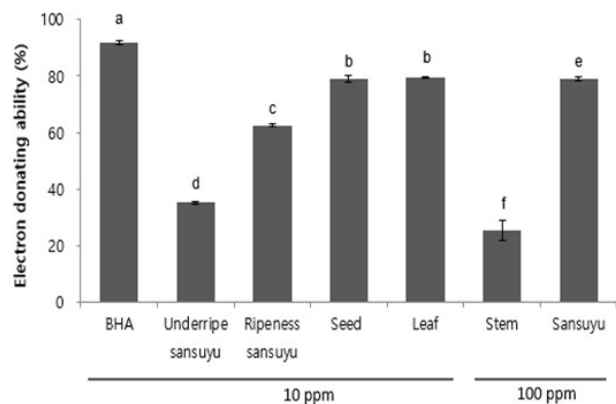


Fig. 3. DPPH free radical scavenging ability of extracts from different parts of *C. fructus*. Value are mean ± SD (n=3). Different letters (a-f) above the bars are significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

군 BHA 보다 항산화능이 낮은 것으로 나타났으나, 10 ppm 농도에서 BHA는 91.83%의 소거능을 보였으며, 잎과 씨앗이 각각 79.52%, 79.01%로 가장 높은 radical 소거 능을 보였다. 열매는 적산수유, 청산수유 순으로 각각 62.51, 35.22%의 radical 소거 활성을 보였다. 건피와 줄기는 100 ppm 농도에서 각각 78.91, 25.48%의 radical 소거능을 보여 산수유 열매의 경우 건피보다 생과의 항산화 활성이 높은 것으로 확인되었다. 유사한 선행 연구로서, Park et al. [31]은 100 ppm 농도에서 산수유 성숙과와 완숙과가 각각 50.96%, 47.92%의 radical 소거 활성이 있었으며, Im 및 Lee [19]는 산수유 건피 methanol 추출물이 2.075 mg/ml로 본 실험결과가 더 낮은 농도에서 radical 소거능을 보였다. 아울러 Lee et al. [25]은 대조구 0.1% 및 1% L-ascorbate의 91.13%와 92.21% 보다 산수유 건피의 마이크로웨이브 추출물, 30, 60 및 90% 에탄올 추출물 및 물 추출 모두 93.54~97.20%의 높은 소거능이 있었음을 보고한 바 있다. 측정 조건의 차이는 있으나 산수유 부위별 모든 추출물들은 모두 적절한 항산화능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 다양한 실험 모델에서 밝혀진 산수유 추출물 및 유효 성분들의 항산화 효능을 잘 뒷받침하여 주는 결과이다[6, 18, 39, 40]. 이들 선행 연구에서 산수유 추출물

및 유효 성분들은 공통적으로 세포 내 다양한 신호 전달계의 조절을 통하여 항산화 효소의 활성을 증가시키거나 과도한 산화적 스트레스에 의한 세포사멸을 억제시켰다. 따라서 본 연구의 결과에서 얻은 항산화능이 높았던 추출물들을 대상으로 그들의 항산화 효능과 연계된 기전 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것이다.

RAW 264.7 세포에서 NO 생성 및 세포 생존율에 미치는 각 추출물의 영향

염증 매개 인자인 NO는 NOS에 의하여 L-arginine으로부터 생성되는 높은 반응성을 가진 생체 분자로서, 과도한 NO의 형성은 염증을 유도하며 산소와 결합하여 생성된 peroxynitrite (ONOO-)는 세포와 조직에 산화적 손상을 주고 유전자 변이, 패혈성 쇼크 및 신경 손상 등을 일으키기 때문에 생리적 수준의 NO 농도를 유지하는 것은 매우 중요하다[4, 30]. 본 연구에서는 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리에 따라 유도되는 NO의 생성에 산수유 나무의 채취 부위별 에탄올 추출물이 미치는 영향에 대하여 조사하였다. Fig. 4에 나타낸 바와 같이, LPS (100 ng/ml) 단독 처리에 의한 NO 생성은 대조군에 비하여 약 14배 높게 나타났다. 산수유 나무의 채취 부위에 따른

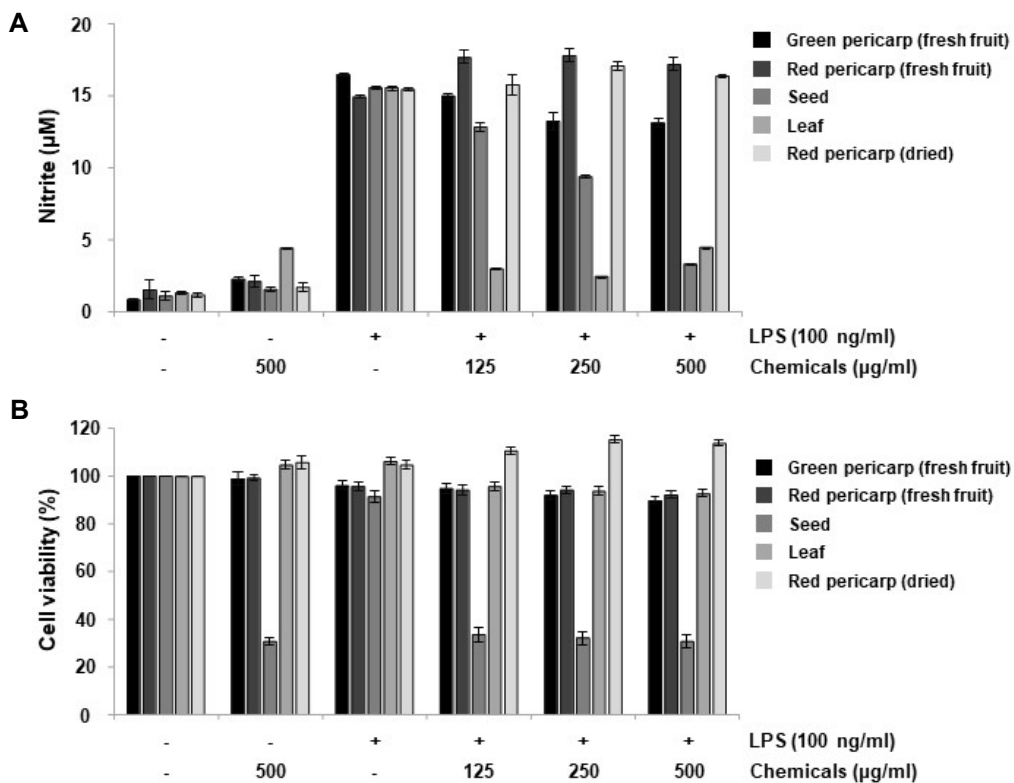


Fig. 4. Effects of the extracts from different parts of *C. officinalis* on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were pre-incubated with or without the indicated extracts from different parts of *C. officinalis* for 1 hr, and then treated with or without LPS (100 ng/ml) for 24 hr. (A) The nitrite concentration in culture media was evaluated by Greiss reaction. (B) Cell viability was determined by an MTT assay. Results are expressed as the percentage of surviving cells over control cells. Each data point represents mean ± SD of three independent experiments.

각각의 에탄올 추출물을 다양한 농도(125, 250 및 500 µg/ml)로 전처리한 후, LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 씨앗과 잎 에탄올 추출물에서 NO 생성이 유의적으로 억제되었음을 확인하였다. 동일 조건에서 MTT assay를 통해 세포 생존율의 변화를 확인해 본 결과, 산수유 나무 잎 추출물 (leaf extracts of *C. officinalis*, LCO)에서는 세포 생존에 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 125 µg/ml의 씨앗 추출물 처리군에서는 대조군에 비하여 33.5%로 나타나 씨앗 추출물에 의한 NO 생성의 억제는 세포독성에 기인한 것으로 사료된다. 따라서 이후 실험에서는 세포독성이 없으면서 NO의 생성을 효과적으로 억제시킨 잎 추출물을 대상으로 진행하였으며, 본 결과에서 가장 낮은 농도인 125 µg/ml에서도 강한 NO 생성 억제 효과를 나타내어 처리 농도 범위를 100 µg/ml 이하로 설정하였다.

산수유 나무 잎 추출물이 RAW 264.7 세포의 생존율과 LPS로 유도된 NO의 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 산수유 나무 잎 추출물 단독 처리 및 잎 추출물과 LPS의 동시 처리에 따른 세포 생존율의 변화를 조사하였다. 이를 위하여 LPS와 잎 추출물을 다양한 농도 (12.5, 25, 50 및 100 µg/ml)로 처리하고 24시간 동안 배양 후

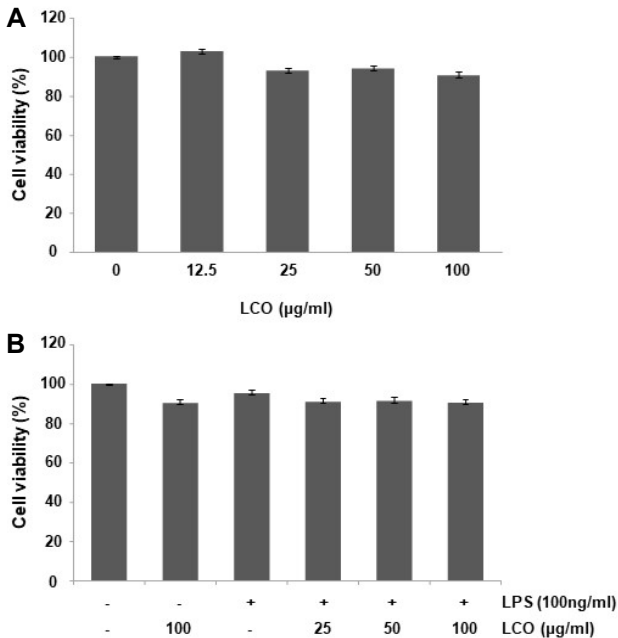


Fig. 5. Effects of leaf extracts of *C. officinalis* (LCO) on cell viability in RAW 264.7 cells. (A) The cells were treated with various concentrations of LCO extracts for 24 hr. (B) The cells were pretreated with the indicated concentrations of LCO for 1 hr prior to treatment with 100 ng/ml LPS for 24 hr. Cell viability was assessed by MTT assay. The results are expressed as means ± SD of three independent experiments duplicate in each run.

MTT assay를 수행한 결과, 모든 실험 조건에서 세포 생존율이 90% 이상으로 나타났다(Fig. 5). 염증반응과 동반된 NO의 과다 축적에는 iNOS의 전사 활성 증가가 관여하게 되며, iNOS의 발현 수준은 NO 생성의 척도가 된다[1, 4]. 동일한 조건에서 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포의 NO 생성과 NO 생성에 관여하는 iNOS의 발현에 미치는 산수유 나무 잎 추출물의 효과를 Griess 시약과 Western blotting을 이용하여 확인한 결과는 Fig. 6에 나타났다. 제시된 결과에서 알 수 있듯이, 잎 추출물의 처리 농도 의존적으로 LPS에 의해 생성된 NO의 양이 유의적으로 감소하였으며, iNOS의 발현도 유사하게 LPS 단독 처리군에 비하여 감소되었다. 따라서 산수유 나무 잎 추출물에 의한 NO의 생성 차단은 iNOS의 발현 억제에 의한 것임을 알 수 있다.

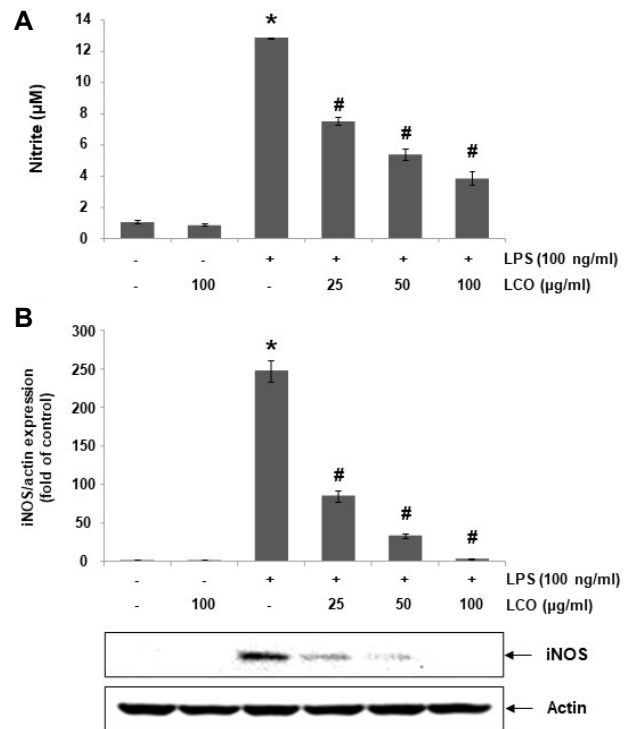


Fig. 6. Inhibition of NO production and iNOS expression by leaf extracts of *C. officinalis* (LCO) in RAW 264.7 cells. The cells were exposed to the indicated concentrations of LCO 1 hr prior treatment of LPS (100 ng/ml) for 24 hr. (A) Amounts of NO production in culture media were determined by Griess reaction. (B). Total proteins were isolated and subjected to Western blot analysis with specific antibody against iNOS. Experiments were repeated three times and similar results were obtained. Actin was used as a control for equal loading. iNOS/actin ratio was calculated and analyzed. All experiments were repeated three times ([#]*p*<0.05 in comparison with the control group; * *p*<0.05 in comparison with the LPS group).

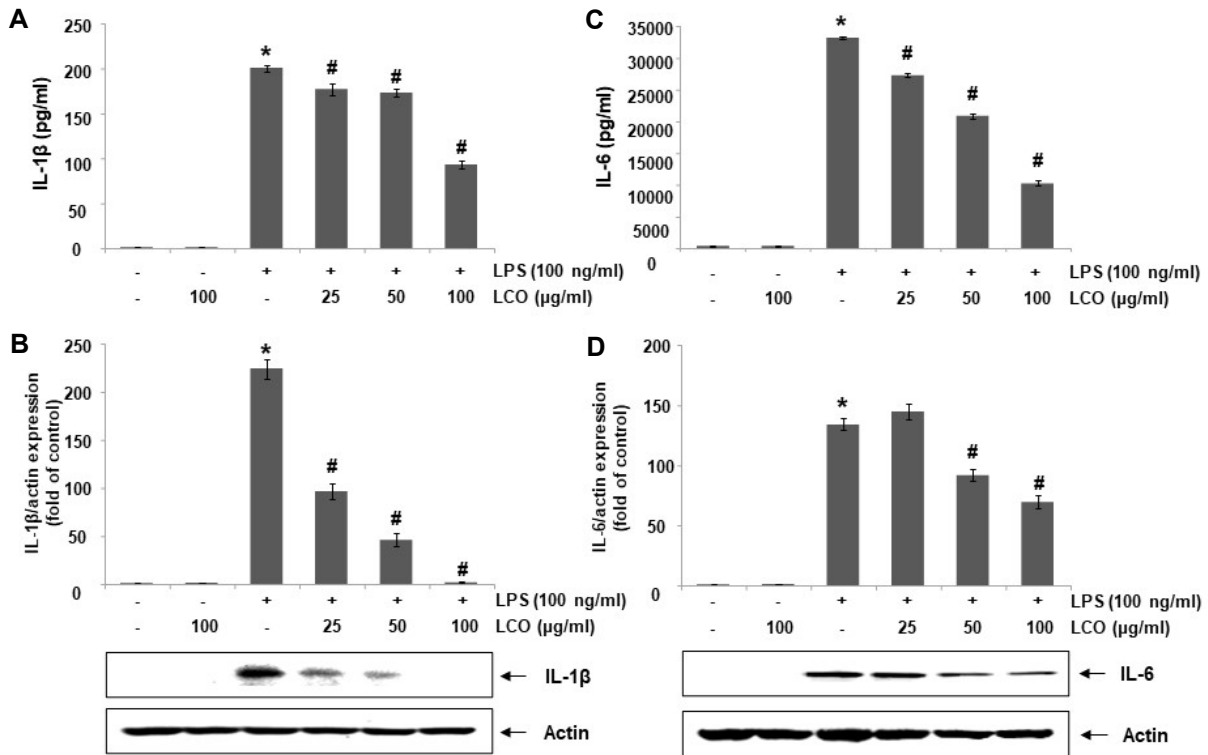


Fig. 7. Inhibition of IL-1 β and IL-6 secretion and expression by leaf extracts of *C. officinalis* (LCO) in RAW 264.7 cells. The cells were exposed to the indicated concentrations of LCO 1 hr prior treatment of LPS (100 ng/ml) for 24 hr. (A and C) The IL-1 β (A) and IL-6 (C) levels in medium were evaluated using commercial IL-1 β and IL-6 cytokine ELISA kits. (B and D) Total proteins were isolated and subjected to Western blot analysis with specific antibodies against IL-1 β and IL-6. Experiments were repeated three times and similar results were obtained. Actin was used as a control for equal loading. IL-1 β and IL-6/actin ratio were calculated and analyzed. All experiments were repeated three times ($\#p < 0.05$ in comparison with the control group; $*p < 0.05$ in comparison with the LPS group).

RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 산수유 나무 잎 추출물의 영향

대식세포가 병원체 등의 감염에 의한 비정상적으로 활성화되면 iNOS에 의한 NO 생성과 COX-2에 의한 PGE₂와 같은 염증 매개 인자의 생성 증가와 함께 염증성 사이토카인의 생성 또한 증가한다[26, 34]. 따라서 본 연구에서는 LPS에 의한 IL-1 β 및 IL-6와 같은 대표적인 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 산수유 나무 잎 추출물의 영향을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면, LPS 단독 처리에 의해 IL-1 β 의 생성과 단백질의 발현이 LPS를 처리하지 않은 대조군에 비하여 현저하게 증가되었다. 그러나 잎 추출물을 다양한 농도(25, 50 및 100 μg/ml)로 전처리한 군에서는 처리 농도 의존적으로 LPS에 의해 증가된 IL-1 β 의 생성과 단백질의 발현이 억제되었다(Fig. 7A, Fig. 7B). 그리고 IL-6의 생성과 단백질 발현 또한 LPS에 의하여 증가되었으며 산수유 나무 잎 추출물을 전처리하였을 때 시료의 처리 농도가 높아질수록 IL-6의 생성 농도와 그 발현이 점차적으로 감소하였다(Fig. 7C, Fig. 7D).

본 연구에서는 산수유 나무의 부위별 추출물에 함유된 유효 활성 성분 분석과 항산화 효능을 분석하였으며, 그중 가장 높

은 활성을 나타낸 잎 추출물을 이용하여 항염증 활성 실험을 수행하였다. 본 연구의 결과에 의하면, 잎 추출물은 강력한 항산화 활성뿐만 아니라 항염증 활성을 지니고 있음을 확인하였으며, 이는 산수유 추출물 및 구성 성분들의 효능에서 확인된 결과들과 잘 일치되었다[8, 10, 21, 37, 43]. 따라서 선행 연구들의 결과를 토대로 산수유 나무 잎 추출물에 의한 항염증 효능의 새로운 기전 연구가 추가로 수행되어야 할 것이며, 본 연구에서 제시된 추출 방법은 향후 다양한 기능성 검증을 위한 추출법의 향상을 위한 조건 설정의 기준으로 활용될 것이다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역 특화산업육성사업(R&D, S2874684)”와 구례군 야생화연구소 운영 연구개발비 지원으로 수행된 연구 결과임.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest

with the contents of this article.

References

- Aktan, F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* **75**, 639-653.
- Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373-399.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Bogdan, C. 2015. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.* **36**, 161-178.
- Cai, H., Cao, G. and Cai, B. 2013. Rapid simultaneous identification and determination of the multiple compounds in crude Fructus Corni and its processed products by HPLC-MS/MS with multiple reaction monitoring mode. *Pharm. Biol.* **51**, 273-278.
- Cao, G., Cai, H., Cai, B. and Tu, S. 2013. Effect of 5-hydroxymethylfurfural derived from processed *Cornus officinalis* on the prevention of high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells and its mechanism. *Food Chem.* **140**, 273-279.
- Cao, G., Zhang, Y., Feng, J., Cai, H., Zhang, C., Ding, M., Cong, X. and Cai, B. 2011. A rapid and sensitive assay for determining the main components in processed Fructus corni by UPLC - Q-TOF-MS. *Chromatographia* **73**, 135-141.
- Choi, Y. H., Jin, G. Y., Li, G. Z. and Yan, G. H. 2011. Cornuside suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators by inhibiting nuclear factor-kappa B activation in RAW 264.7 macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 959-966.
- Chung, H. Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A. Y., Carter, C., Yu, B. P. and Leeuwenburgh, C. 2009. Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* **8**, 18-30.
- Cui, Y., Wang, Y., Zhao, D., Feng, X., Zhang, L. and Liu, C. 2018. Loganin prevents BV-2 microglia cells from A β (1-42)-induced inflammation via regulating TLR4/TRAF6/NF- κ B axis. *Cell Biol. Int.* **42**, 1632-1642.
- Deng, Y., Liu, Y., Tang, S., Zhou, C., Han, X., Xiao, W., Pastur-Romay, A. L., Vazquez-Naya, J. M., Loureiro, J. P., Munteanu, C. R. and Tan, Z. 2017. General machine learning model, review, and experimental-theoretic study of magnolol activity in enterotoxigenic induced oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.* **17**, 2977-2988.
- Franceschi, C. and Campisi, J. 2014. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **69**, S4-9.
- Grune, T. 2000. Oxidative stress, aging and the proteasomal system. *Biogerontology* **1**, 31-40.
- Gülcin, I. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol.* **86**, 345-91.
- Han, Y., Jung, H. W. and Park, Y. K. 2014. Selective therapeutic effect of *Cornus officinalis* fruits on the damage of different organs in STZ-induced diabetic rats. *Am. J. Chin. Med.* **42**, 1169-1182.
- Hanada, T. and Yoshimura, A. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 413-421.
- Huang, J., Zhang, Y., Dong, L., Gao, Q., Yin, L., Quan, H., Chen, R., Fu, X. and Lin, D. 2018. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *J. Ethnopharmacol.* **213**, 280-301.
- Hwang, K. A., Hwang, Y. J. and Song, J. 2016. Antioxidant activities and oxidative stress inhibitory effects of ethanol extracts from *Cornus officinalis* on raw 264.7 cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **16**, 196.
- Im, D. Y. and Lee, K. I. 2017. Antioxidative activity and active compound analysis of the extract and fractions of Corni fructus. *Kor. J. Pharmacogn.* **48**, 208-212.
- Jeon, Y. H., Kim, M. H. and Kim, M. R. 2008. Antioxidative antimutagenic, and cytotoxic activities of ethanol extracts from *Cornus officinalis*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 1-7.
- Kang, D. G., Moon, M. K., Lee, A. S., Kwon, T. O., Kim, J. S. and Lee, H. S. 2007. Cornuside suppresses cytokine-induced proinflammatory and adhesion molecules in the human umbilical vein endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1796-1799.
- Kim, Y. J. and Son, D. Y. 2016. Antioxidant activity and suppression of pro-inflammatory mediator of Corni fructus extracts in activated RAW 264.7 macrophage. *Kor. J. Food Preserv.* **23**, 876-882.
- Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G. Y., Nizet, V. and Karin, M. 2005. IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* **434**, 1138.
- Lee, M. H., Kim, J. M. and Park, E. J. 2011. Antioxidant and antigenotoxic effects of sansuyu fruit (Corni fructus) extracted with water at different temperatures. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 149-155.
- Lee, N. H., Seo, C. S., Lee, H. Y., Jung, D. Y., Lee, J. K., Lee, J. A., Song, K. Y., Shin, H. K., Lee, M. Y., Seo, Y. B., Kim, H. and Ha, H. 2012. Hepatoprotective and antioxidative activities of *Cornus officinalis* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2012**, 804924.
- Lin, W. W. and Karin, M. 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* **117**, 1175-1183.
- Lu, Y. C., Yeh, W. C. and Ohashi, P. S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145-151.
- Lushchak, V. I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* **224**, 164-175.
- Ma, W., Wang, K. J., Cheng, C. S., Yan, G. Q., Lu, W. L., Ge, J. F., Cheng, Y. X. and Li, N. 2014. Bioactive compounds from *Cornus officinalis* fruits and their effects on diabetic nephropathy. *J. Ethnopharmacol.* **153**, 840-845.
- Moncada, S. and Higgs, A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* **329**, 2002-2012.
- Park, S. J., Lee, G. E., Kim, Y. J. and Jeong, J. S. 2016. Preparation and quality characterization of low sugar san-

- suju jam using fresh Corni fructus. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **45**, 222-229.
32. Ramos-Tovar, E. and Muriel, P. 2020. Free radicals, anti-oxidants, nuclear factor-E2-related factor-2 and liver damage. *J. Appl. Toxicol.* **40**, 151-168.
 33. Rossol, M., Heine, H., Meusch, U., Quandt, D., Klein, C., Sweet, M. J. and Hauschildt, S. 2011. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit. Rev. Immunol.* **31**, 379-446.
 34. Schett, G., Elewaut, D., McInnes, I. B., Dayer, J. M. and Neurath, M. F. 2013. How cytokine networks fuel inflammation: toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nat. Med.* **19**, 822.
 35. Schönbichler, S. A., Bittner, L. K. H., Pallua, J. D., Popp, M., Abel, G., Bonn, G. K. and Huck, C. W. 2013. Simultaneous quantification of verbenalin and verbascoside in *Verbena officinalis* by ATR-IR and NIR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **84**, 97-102.
 36. Singleton, V. L. and Rossi, Jr. J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.
 37. Sung, Y. H., Chang, H. K., Kim, S. E., Kim, Y. M., Seo, J. H., Shin, M. C., Shin, M. S., Yi, J. W., Shin, D. H., Kim, H. and Kim, C. J. 2009. Anti-inflammatory and analgesic effects of the aqueous extract of corni fructus in murine RAW 264.7 macrophage cells. *J. Med. Food.* **12**, 788-795.
 38. Telang, N. T., Li, G., Sepkovic, D. W., Bradlow, H. L. and Wong, G. Y. C. 2012. Anti-proliferative effects of Chinese herb *Cornus officinalis* in a cell culture model for estrogen receptor-positive clinical breast cancer. *Mol. Med. Rep.* **5**, 22-28.
 39. Tian, W., Zhao, J., Lee, J. H., Akanda, M. R., Cho, J. H., Kim, S. K., Choi, Y. J. and Park, B. Y. 2019. Neuroprotective effects of *Cornus officinalis* on stress-induced hippocampal deficits in rats and H₂O₂-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Antioxidants (Basel)* **9**, 27.
 40. Tseng, Y. T., Lin, W. J., Chang, W. H. and Lo, Y. C. 2019. The novel protective effects of loganin against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity: Enhancement of neurotrophic signaling, activation of IGF-1R/GLP-1R, and inhibition of RhoA/ROCK pathway. *Phytother. Res.* **33**, 690-701.
 41. Victor, V. N. and Rocha, M. 2007. Targeting antioxidants to mitochondria: A potential new therapeutic strategy for cardiovascular diseases. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 845-863.
 42. Wang, L., Chen, H., Jiang, Y., Liu, Z., Wang, Q. and Zheng, X. 2018. Simultaneous determination of 11 high-polarity components from Fructus Corni: A quantitative LC-MS/MS method for improved quality control. *J. Chromatogr. Sci.* **56**, 56-64.
 43. Wen, H., Xing, L., Sun, K., Xiao, C., Meng, X. and Yang, J. 2020. Loganin attenuates intestinal injury in severely burned rats by regulating the toll-like receptor 4/NF-κB signaling pathway. *Exp. Ther. Med.* **20**, 591-598.
 44. Yamabe, N., Noh, J. S., Park, C. H., Kang, K. S., Shibahara, N., Tanaka, T. and Yokozawa, T. 2010. Evaluation of loganin, iridoid glycoside from *Corni Fructus*, on hepatic and renal glucolipototoxicity and inflammation in type 2 diabetic db/db mice. *Eur. J. Pharmacol.* **648**, 179-187.
 45. Yang, J. C. 2016. A study on the cosmetic preservative effects of *Cornus officinalis* seed extracts. *J. Kor. Oil Chemists. Soc.* **33**, 333-341.
 46. You, Q., Yin, X. and Zhao, Y. 2013. Enzyme assisted extraction of polysaccharides from the fruit of *Cornus officinalis*. *Carbohydr. Polym.* **98**, 607-610.

초록 : 산수유의 채취 부위에 따른 기능 성분 분석과 항산화 및 항염증 효과에 관한 연구

황보현^{1,2} · 정지숙³ · 김민영^{1,2} · 지선영^{1,2} · 윤선혜⁴ · 김태희⁵ · 김성옥⁶ · 최영현^{1,7*}

(¹동의대학교 항노화연구소, ²부산대학교 분자생물학과, ³구례군농업기술센터 야생화연구소, ⁴㈜네이처텍, ⁵함소아 제약 중앙연구소, ⁶경성대학교 식품영양학과, ⁷동의대학교 한의과대학 생화학교실)

산수유 나무는 그 열매인 산수유와 함께 동아시아의 많은 국가에서 식용 및 약용으로 오랫동안 널리 사용되고 있다. 선행 연구들에 의하면 산수유 나무 추출물 및 구성 성분은 다양한 약리학적 잠재력을 가지고 있음에도 불구하고 부위별 추출물에 대한 체계적인 성분 분석은 아직 충분하지 않은 실정이다. 본 연구에서는 산수유 나무의 각 부위(청산수유, 적산수유, 씨앗, 줄기, 잎, 건피)의 유효 성분 함량을 분석하여 항산화 활성을 검증하였다. 본 연구의 결과에 따르면 조사된 3가지 지표 성분 중 morroniside은 청산수유와 적산수유에 가장 많이 함유하고 있었으며, loganin은 청산수유와 씨앗에 많았다. 잎, 적산수유, 건피의 함량은 비슷한 수준이었다. Cornin은 잎에 가장 많았으며, 청산수유, 적산수유 건피 순이었다. 또한 총 폴리페놀 함량은 적산수유, 청산수유, 잎 순으로 높았으며, 총 플라보노이드 함량은 잎이 가장 높았다. 그리고, DPPH radical 소거능은 잎, 씨앗, 적산수유 추출물 순으로 높은 소거 활성을 나타냈다. 따라서 항산화 활성이 가장 높은 잎 추출물의 항염증 효능을 조사하였으며, 이를 위하여 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 NO와 같은 염증성 매개 인자와 IL-1 β 와 IL-6를 포함한 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 잎 추출물의 영향을 평가하였다. 본 연구의 결과에 의하면 세포독성이 없는 조건에서 잎 추출물은 LPS에 의하여 증가된 iNOS의 발현과 NO의 생성을 유의적으로 억제하였다. 또한 잎 추출물은 LPS에 의한 IL-1 β 및 IL-6의 생성 및 발현을 현저하게 감소시켰다. 따라서 산수유 나무의 잎 추출물은 항산화제와 항염증제의 개발을 위한 천연 재료로서 잠재력이 있음을 시사하며, 관련 기전 연구가 추가로 진행되어야 할 것이다.