

오가피류의 시험관내 항산화활성 검색

김지연 · 양기숙[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received August 27, 2003; Revised October 6, 2003)

Screening of Antioxidant Activity of *Acanthopanax* species *in vitro*

Ji Youn Kim and Ki Sook Yang[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — *Acanthopanax* species (Araliaceae) has been traditionally used as tonic, analgesic, stimulant of immune system, and replenishment of body function. The antioxidant activities of leaf and root bark of *Acanthopanax* species were determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay and relative electrophoretic mobility (REM) on human plasma low density lipoproteins (LDL). *Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus* and *Acanthopanax* for. *nambunensis* showed potent antioxidant activities.

Keywords □ *acanthopanax* speciess, DPPH, TBARS, antioxidant activity

오가피속 식물의 근피(根皮)와 수피(樹皮)는 오가피(*Acanthopanax Cortex*)라하여 강장, 병후회복촉진, 정신집중력 개선, 면역기능 증진의 목적으로 사용되고 있다. 우리나라에는 *Acanthopanax* 속으로 10종, 5품종, 3변종으로 약 18종의 식물이 분포하고 있다.¹⁾ 성분으로는 coumarin, phenylpropanoid, lignan, terpenoid²⁻⁵⁾ 등이 알려져 있으며 생리활성에 관한 연구로는 흰 털 오갈피나무의 항 바이러스작용,⁶⁾ 가시오갈피나무의 고지혈증 억제작용,⁷⁾ 혈당 저하작용,⁸⁾ 지질대사 억제작용,⁹⁾ 항산화작용,¹⁰⁾ 면역증강작용,¹¹⁾ 항균작용,¹²⁾ anaphylaxis 억제작용¹³⁾ 등이 보고 되어 있다. 노화 및 노화에 관련된 퇴행성 질환과 고혈압등의 성인병질환의 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 산소 유해설이 알려지고 있다.^{14,15)} 활성산소는 특히 동맥경화 저해인자로 알려진 저밀도지단백(low density lipoprotein, LDL)을 쉽게 산화시켜 산화 LDL을 생성하고 이것은 동맥경화의 유발인자로 작용한다¹⁶⁾는 사실이 알려짐에 따라 합성 또는 천연 항산화제의 LDL 산화에 대한 억제제로서의 역할과 그들의 동맥경화 예방과 치료 효과에 대한 관심과 연구가 활발히 진행되고 있다. 이에 우리나라에 자생하는 10여종의 *Acanthopanax*속 식물에 대한 항산화 활성을 비교하고자 유리기소거작용 및 저밀도지단백의 산화에 미

치는 영향을 검토하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

재료식물인 오갈피나무류의 잎과 근피는 경희대학교 약학대학 육창수교수님께서 제공해 주셨으며 종류는 지리오갈피나무(*Acanthopanax chiisanensis*), 개오갈피나무(*A. divaricatus*), 수신오갈피나무(*A. divaricatus* for. *sushinmyunensis*), 남부오갈피나무(*A. divaricatus* for. *nambunensis*), 흰털오갈피나무(*A. divaricatus* var. *albeofructus*), 섬오갈피나무(*A. koreanum*), 가시오갈피나무(*A. senticosus*), 서울오갈피나무(*A. seoulense*), 오갈피나무(*A. sessiliflorus*), 중부오갈피나무(*A. sessiliflorus* for. *chungbunensis*)를 이용하였다.

실험 동물

체중 200±20 g의 Sprague-dawley계 웅성 흰쥐를 일주일 이상 동일 조건하에서 사육하여 동물실 환경에 적응시켰으며, 동물실 온도는 20±2°C, 습도는 50±10%로 유지하였고, 실험기간 동안 삼양유지(주)의 고형사료와 상수는 충분히 공급하였다.

시료의 조제

재료식물의 잎과 줄기를 음건 후 세절하여 수욕상에서 70%

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9578 (팩스) 02-715-9498
(E-mail) ksyang@sdic.sookmyung.ac.kr

MeOH로 열시 추출하였다. 여과한 후 감압농축하고 동결건조하여 메탄올엑스를 얻었다.

DPPH를 이용한 유리기 소거작용의 측정

유리기 소거작용의 측정은 Inkeda 등¹⁷⁾의 방법에 의해 다음과 같이 측정하였다. 각 시료를 농도별로 ethanol에 용해하여 조제한 후 시료 100 μ l에 0.1 mM DPPH 용액(ethanol에 용해) 1.9 ml을 가하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕하고 37°C에서 30분 동안 배양 시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 시료 무첨가의 대조군의 흡광도를 50%로 감소시키는데 필요한 시료의 양(μ g)을 기존의 항산화제인 ascorbic acid를 양성대조군으로 하여 시험하였다.

LDL(low density lipoprotein)의 수식에 대한 항산화작용

LDL의 분리는 human plasma에 aprotinine 0.002%, EDTA, NaN_3 를 0.05%씩 가해 천천히 혼합한 후 KBr를 가해 밀도($d=1.006 \rightarrow 1.025$)를 조정하여 1차 초원심분리 하였다(40,000 rpm, 5°C, 15 hr). 이때 분리된 VLDL을 제거하고 LDL이 포함된 분획을 취한 후 KBr를 가하여 밀도($d=1.026 \rightarrow 1.055$)를 조정하여 2차 초원심분리(40,000 rpm, 5°C, 15 hr)한 후 LDL을 분리하였다.¹⁸⁾ 분리한 LDL을 pH 7.4의 phosphate-buffer saline (PBS)으로 4°C에서 48시간 동안 투석하고 LDL중 protein 농도는 bovine serum albumin을 표준으로 하는 Lowry's method¹⁹⁾에 의해 결정하였다.

LDL의 금속유도에 의한 산화

Cu^{++} 에 의해 유도되는 LDL의 산화는 LDL(400 μ g protein/ml), 1 mM CuSO_4 16 μ l, 농도별로 조제한 각 시료 100 μ l에 PBS buffer(pH 7.4)를 섞어 전체 부피가 1 ml이 되도록 하였다. 진탕 수욕소에서 4시간 동안 37°C에서 배양하여 산화시킨 후 1 mM EDTA 20 μ l를 첨가하여 산화를 중지시켰다.²⁰⁾

지질과산화 억제작용의 측정

지질과산화 억제도를 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)의 형성으로 평가하였다. LDL(100 μ g)이 함유된 배양 혼합액 1.0 ml에 25% trichloro acetic acid를 넣어 단백질을 침전시키고 그 상정액에 1% thiobarbituric acid를 첨가하여 95°C 수욕상에서 30분간 가열하여 발색시킨 후 냉각시켰다. 냉각 후 10분간 원심분리(2000 rpm)한 다음 상정액을 취하여 532 nm에서 spectrophotometer(Jasco V-530)를 이용하여 과산화 지질의 생성을 50% 억제하는데 필요한 시료의 함량을 구하였다.²¹⁾

LDL 산화에 따른 electrophoretic mobility(REM)의 측정

LDL에 대한 산화억제작용은 agarose gel을 이용한 전기영동

이동도로 평가하였다. 즉 LDL을 산화시킨 후 speed vac concentrator에서 농축하고 시료완충액과 3:1로 섞어 0.7% agarose gel에 20 μ l 정도를 점적하였다. TBE buffer(pH 7.4)를 loading buffer로 사용하여 20 mA의 전류로 전기영동을 시행하고 염색액에서 30분간 염색한 후 4°C에서 탈색을 실시하고 이동도를 측정하여 산화억제도를 평가하였다.²²⁾

실험결과 및 고찰

DPPH를 이용한 항산화능에 미치는 영향

DPPH · 는 유리기의 안정된 모델로 반응 중 DPPH · 의 감소는 반응 중 유리기의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과 산화의 초기반응의 억제정도를 예측 할 수 있다. 유해산소라 불리는 활성산소는 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로써 생체 기능이 저하되고 동시에 노화 및 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있으며²³⁾ 식물성분 및 추출물에 의한 항산화작용에 등이 보고되어 있다.^{24,25)}

Acanthopanax속 식물의 잎과 근피에 대한 항산화능의 정도를 DPPH에 대한 전자공여능(electron donating ability, EDA %)으로 측정하여 대조군의 흡광도(control O.D)를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 양(IC₅₀)을 측정하였다.

Acanthopanax속 식물의 부위별에 따른 유리기 소거작용은 흰 털오갈피나무의 잎이 IC₅₀ 12.3 μ g/ml로 기존의 항산화제인 ascorbic acid IC₅₀ 7.70 μ g/ml과 대동할 정도의 우수한 항산화능을 보였으며 근피도 IC₅₀ 27.6 μ g/ml로 우수한 활성을 보였다. 서 울오갈피나무의 잎이 IC₅₀ 1000.0 μ g/ml로 가장 활성이 낮게 나타났으며 가시오갈피나무의 항산화작용은 김 등¹⁰⁾의 가시오갈피 나무의 EtOH 엑스의 근(IC₅₀ 60 μ g/ml)과 잎(IC₅₀ 130 μ g/ml)의

Table I - Antioxidative activity of Acanthopanax species on free radical scavenging activity

Group	IC ₅₀ (μ g/ml)	
	leaf	root bark
<i>A. chiisanense</i>	45.2	77.5
<i>A. divaricatus</i>	570.0	69.5
<i>A. divaricatus</i> for. <i>sushinmyunensis</i>	122.0	56.2
<i>A. divaricatus</i> for. <i>nambunensis</i>	92.2	28.0
<i>A. divaricatus</i> var. <i>albeofructus</i>	12.3	27.6
<i>A. koreanum</i>	1000.0	68.3
<i>A. senticosus</i>	168.0	84.2
<i>A. seoulense</i>	695.0	112.3
<i>A. sessiliflorus</i>	160.0	276.2
<i>A. sessiliflorus</i> for. <i>chungbunensis</i>	330.0	420.8
Ascorbic acid	7.70	

IC₅₀ : Required sample amount (μ g/ml) for 50% reduction of 0.1 mM DPPH solution (1.9 ml).

Table II – Effects of *Acanthopanax* species on Cu⁺⁺- induced LDL (mg protein) lipid peroxidation

Group	IC ₅₀ (μg/ml)	
	leaf	root bark
<i>A. chiisanense</i>	15.4	7.0
<i>A. divaricatus</i>	18.4	15.0
<i>A. divaricatus</i> for <i>sushinmyunensis</i>	25.0	20.8
<i>A. divaricatus</i> for <i>nambunensis</i>	13.9	3.5
<i>A. divaricatus</i> var <i>albeofructus</i>	9.1	7.7
<i>A. koreanum</i>	13.9	8.1
<i>A. senticosus</i>	14.2	9.5
<i>A. seoulense</i>	26.5	18.6
<i>A. sessiliflorus</i>	28.8	13.8
<i>A. sessiliflorus</i> for <i>chungbunensis</i>	14.9	9.8

LDL was incubated for 4 hr at 37°C in the presence of increasing concentrations of *Acanthopanax* species. Oxidation was initiated by the addition of 1 mM CuSO₄ in the presence or absence of *Acanthopanax* species. The lipidperoxide content was determined by TBARS method and was expressed as IC₅₀ (required sample amount for 50% inhibition of Cu⁺⁺-induced LDL).

활성과 비슷하게 나타났다. 그리고 전반적으로는 근피가 엽보다 활성이 높게 나타났다(Table I).

지질과산화 억제효과

천연 항산화제의 LDL 산화 저해제로서의 역할과 그들의 동맥경화 예방과 치료 효과 등이 *Ginkgo biloba* 등에서 보고되었으며²⁶⁾ LDL oxidative modification은 지질과산화물의 증가(TBARS activity의 증가)와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

LDL 지질과산화 억제작용은 근피에서는 남부오갈피나무 IC₅₀ 3.5 μg/ml, 엽에서는 흰털 오갈피나무 IC₅₀ 9.10 μg/ml에서 활성을 나타내었으며 전반적으로 근피가 엽보다 우수한 지질과산화 억제작용을 나타내었다(Table II).

LDL 산화 억제효과

LDL에 대한 산화억제작용을 agarose gel상에서 전기영동 이동도로 평가하였다. 이동도의 증가는 산화에 의해 LDL의 surface negative charge의 증가됨을 의미하며 이는 LDL중 apoprotein B의 lysine잔기의 유도화에 기인되는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ *Acanthopanax*속 식물 엽과 근피의 메탄올 엑스 100 μg/ml을 가한 후 산화시킨 LDL의 agarose gel상의 이동도를 비교한 결과는 다음과 같다(Table III).

*Acanthopanax*속 식물의 엽 중에서는 흰털오갈피나무 REM 44.4±1.93(%), 가시오갈피나무와 오갈피나무가 각각 REM 48.2±2.08(%), 48.5±3.28(%)로 LDL에 대한 항산화활성을 나타내었다. 천연물로서는 isoflavonoid 성분인 daidzin^{28b)}이 macrophage로 유도된 산화LDL의 REM에 대한 항산화작용과 비슷한 활성을 보여 주었다. 부위별로 보면 엽과 근피 모두 유의성있는 억제

Table III – Effects of *Acanthopanax* species on electrophoretic mobility change by LDL oxidation

Group	REM (%)	
	leaf	root bark
Ox-LDL	100±2.3	
<i>A. chiisanense</i>	55.6±2.9**	76.7±8.4
<i>A. divaricatus</i>	92.6±8.8	56.7±10.5*
<i>A. divaricatus</i> for <i>sushinmyunensis</i>	96.3±8.1	60.8±9.0*
<i>A. divaricatus</i> for <i>nambunensis</i>	92.6±5.7	63.3±8.5*
<i>A. divaricatus</i> var <i>albeofructus</i>	44.4±2.0**	61.1±6.5*
<i>A. koreanum</i>	51.9±3.3**	60.0±10.7*
<i>A. seoulense</i>	48.2±2.1**	66.7±8.8*
<i>A. seoulense</i>	92.6±8.3	53.3±14.0**
<i>A. sessiliflorus</i>	48.5±3.3**	60.0±6.4*
<i>A. sessiliflorus</i> for <i>chungbunensis</i>	51.9±5.1*	69.5±6.2*

REM (relative electrophoretic mobility) was expressed as migration relative to oxidized LDL. All data represent the mean ± S.E.M. significantly different from Ox-LDL(*P<0.05, **P<0.01).

를 나타낸 것은 흰털오갈피나무, 섬오갈피나무, 가시오갈피나무, 오갈피나무, 중부오갈피나무이었으며 나머지 종은 엽 또는 근피가 유의성있는 LDL 산화억제작용을 나타내어 사용된 종이 전체적으로 항산화작용이 있음을 확인하였다. 부위별로 보면 근피에 있어서 지리오갈피나무를 제외하고는 모두 유의한 LDL 산화억제작용을 나타내었다. 엽과 근피가 모두 활성을 나타낸 것은 남부오갈피나무, 흰털오갈피나무, 섬오갈피나무, 가시오갈피나무, 오갈피나무 및 중부오갈피나무였다.

결 론

*Acanthopanax*속 식물 10여종의 엽과 근피 메탄올엑스에 대한 항산화작용을 검토하고자 DPPH를 이용한 항산화작용, TBARS assay를 이용한 지질과산화물 생성억제작용과 agarose gel electrophoresis mobility를 이용한 LDL 산화에 대한 억제 효과를 비교 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 유리기 소거작용은 엽에서는 흰털오갈피나무가 ascorbic acid와 비슷한 항산화능을 보였으며 근피에서는 남부오갈피나무와 흰털오갈피나무가 활성을 나타내었으며 전반적으로는 근피가 엽보다 활성이 높게 나타났다.
2. 지질과산화 억제작용은 지리오갈피나무, 남부오갈피나무와 흰털 오갈피나무의 근피에서 활성이 우수하였고 모든 식물에서 근피가 엽보다 높은 지질과산화 억제활성을 나타내었다.
3. LDL 산화억제작용은 남부오갈피나무, 흰털오갈피나무, 섬오갈피나무, 가시오갈피나무, 오갈피나무 및 중부오갈피나무의 엽과 근피 모두에서 유의한 활성을 나타내었으며 이외의 종에서는 근피가 우수한 활성을 보였다.

이상으로 *in vitro* 항산화 활성검색을 통하여 *Acanthopanax*속 식물의 대부분이 우수한 항산화 활성을 보였으며 근피뿐만 아니

라 업에서도 활성을 나타내어 항산화자원으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 2002년도 숙명여자대학교 교내연구비에 의해 이루어진 것이며 연구비 지원에 감사드립니다.

문헌

- 1) 옥창수 : Medicinal herbs of *Acanthopanax* in Asia, Kyeongwon Media, Seoul (2001).
- 2) Park, S. Y., Chang, S. Y., Yook, C. S. and Nohara, T. : New 3,4-secolupane-type triterpene glycosides from *Acanthopanax senticosus* var. *inermis*. *J. Nat. Prod.* **63**, 1630 (2000).
- 3) Oh, O. J., Chang, S. Y., Yook, C. S., Yang, K. S., Park, S. Y. and Nohara, T. : Two 3,4-seco-lupane-type triterpenes from leaves of *Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus*. *Chem. Pharm. Bull.* **48**, 879 (2000).
- 4) Shin, K. H. and Lee, S. H. : The chemistry of secondary products from *Acanthopanax* species and their pharmacological activities. *Nat. Prod. Sci.* **8**, 111 (2002).
- 5) Nishibe, S., Kinoshita, H., Takeda, H. and Okano, G. : Phenolic compounds from stem bark of *Acanthopanax senticosus* and their pharmacological effect in chronic swimming stressed rats. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 1763 (1990).
- 6) Bae E. A., Yook, C. S., Oh, O. J., Chang, S. Y., Nohara, T. and Kim D. H. : Metabolism of chiisanoside from *Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus* by human intestinal bacteria and its relation to some biological activities. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 582 (2001).
- 7) Shi, Z., Liu, C. and Li, R. : Effect of a mixture of *Acanthopanax senticosus* and *Elsholtzia splendens* on serum-lipids in patients with hyperlipemia. *Chung-Hsi-I-Chieh-Ho-Tsa-Chih* **10**, 155 (1990).
- 8) Shi, D. Y., Lu, Z. Z., Li, S. H. and Cai, Y. : Hypoglycemic effect of saponin isolated from leaves of *Acanthopanax senticosus*. *J. Chin. Mate. Med.* **19**, 683 (1994).
- 9) 이연실, 정상훈, 임순성, 지준, 이상현, 신국현 : 가시오가피 줄기의 물 추출물이 지질대사에 미치는 영향. *생약학회지* **32**, 103 (2001).
- 10) 김려화, 한상섭, 최용순 : 가시오가피 추출물의 항산화 효과. *생약학회지* **33**, 359 (2002).
- 11) Yi, J. M., Hong, S. H., Kim J. H., Kim, H. K., Song, H. J. and Kim, H. M. : Effect of *Acanthopanax senticosus* stem on mast cell dependant anaphylaxis. *J. ethnopharm.* **79**, 347 (2002).
- 12) 황수현, 하은숙, 유광원, 신광순, 이상훈, 이재권, 이경호, 윤택준, 박우문 : 오가피 조다당의 항원에 대한 면역증강 효과. *약학회지* **47**, 167 (2003).
- 13) Lee, S. H., Shin, D. S., Oh, K. B. and Shin, K. H. : Antibacterial compounds from the leaves of *Acanthopanax senticosus*. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 40 (2003).
- 14) Halliwell, B. : Drug oxidant effects. *Drugs* **42**, 569 (1991).
- 15) 皆川信子 : 活性酸素が關與する代表的疾患. *ファルマシア* **29**, 1029 (1993).
- 16) Luc, G. and Fruchart, J. C. : Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 206 (1991).
- 17) Inkeda, N. and Fukuzume, K. : Tocopherols as antioxidants in oxidation of methyl linolate. *J. Japan Oil Chem. Soc.* **26**, 343 (1977).
- 18) Converse, C. A. and Skinner, E. R. : Lipoprotein analysis, A practical approach, Oxford University, New York, p. 113 (1992).
- 19) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 20) Choi, J. H., Park, Y. J., Son, H. S., Yang, K. S. and Kim, T. W. : Functional properties of modified low density lipoprotein and degradation of modified LDL by human monocyte macrophage. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **24**, 362 (1995).
- 21) Watts, G. F., Mandalia, S., Slavin, B. M., Brunt, J. N., Coltart, D. J. and Lewis, B. : Metabolic determinants of the course of coronary artery disease in men. *Clinical Chemistry* **40**, 2240 (1994).
- 22) Park, Y. J., Yang, K. S., Kim, T. H. and Kim, T. W. : Effect of glucose and nonenzymatic glycation on LDL oxidation. *Korean Journal of Lipidology* **5**, 249 (1995).
- 23) Kitahara, K., Matsumoto, Y., Ueda, H. and Ueoka, R. : A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of γ -irradiated methyl linolate. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2208 (1992).
- 24) Hatano, T. : Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species- Tannins and related polyphenols. *Natural Medicines* **49**, 357 (1995).
- 25) Masaki, H., Sakaki, S., Atsumi, T. and Sakurai, H. : Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 162 (1995).
- 26) Liang, J. Y., Marie, T. D. L. and Lester, P. : *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects human low density lipoproteins against oxidative modification mediated by copper. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **212**, 360 (1995).
- 27) Ishwarlal, J., Edward, P. N., Louis, C. and Scott, M. G. : β -Carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochemica et Biophysica Acta* **1086**, 134 (1991).
- 28) Park, C. O., Kim, K. S., Ji, Y. A. and Ryu, B. H. : Antioxidant activity of daidzin and puerarin on human lowdensity lipoprotein. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 25 (1997).