

산초 종자 정유의 항산화 및 항염 효능

김보애†

목원대학교 테크노과학대학 생의약화장품학부
(2014년 8월 11일 접수; 2014년 9월 19일 수정; 2014년 9월 22일 채택)

Anti-oxidant and Anti-inflammatory activities of *Zanthoxylum schinifolium* Essential Oil

Bo-Ae Kim†

College of Sciences & Technology, Division of Biomedical & Cosmetics, Mokwon University,
Doanbuk-ro 88, Seo-gu, Daejeon 302-729, Korea

(Received August 11, 2014; Revised September 19, 2014; Accepted September 22, 2014)

요약 : 본 연구의 목적은 RAW 264.7 세포에 산초 종자 정유 성분의 항염 및 항산화 효과에 대하여 알아보려고 하였다. 산초 종자로부터 정유를 추출하였으며, 추출물의 항산화 및 항염 활성에 대하여 평가하였다. 추출물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능과 SOD 유사 활성 평가법을 이용하였다. 또한 세포독성 평가를 위해 MTT를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에 대하여 산초 정유가 NO생성과 PGE₂ 생성 정도에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 산초 종자 정유는 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능과 SOD 유사 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 세포 생존율 평가에서는 40 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ 이하의 농도에서 98% 이상의 낮은 세포독성을 나타냈으며, 항염 효능 평가에서는 LPS를 단독으로 처리한 양성대조군보다 산초 정유 성분을 처리한 군에서 NO와 PGE₂ 생성이 현저하게 감소되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 산초 정유가 염증매개인자를 감소시키고 산화의 활성을 방지할 수 있는 기능성 식물소재로서의 가능성을 나타낸다.

주제어 : 정유, 산초, 항산화, 항염

Abstract : The purpose of this study was to investigate anti-inflammatory and antioxidant effects of essential oil from seed of *Zanthoxylum schinifolium* on cultured RAW 264.7 cell line. Antioxidant activity of essential oil was evaluated by two different assays as 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and super oxide dismutase (SOD) like activities. This essential oil was tested for cell viability on RAW 264.7 cell line by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. The effects of anti-inflammatory on LPS-induced RAW 264.7 cell line was studied by the content of nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) in cells. The essential oil of seed from *Zanthoxylum schinifolium*

†Corresponding author
(E-mail: kba@mokwon.ac.kr)

obtained dose-dependently increased the scavenging activity on DPPH radical scavenging activity and SOD like activity. The essential oil showed low cytotoxicity as more than 98% cell viability in $40 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ concentration. The essential oil of seed extracted from *Zanthoxylum schinifolium* presented obvious effect on inflammation. These results suggest that essential oil of seed from *Zanthoxylum schinifolium* may have value as the potential anti-inflammatory effects by decreasing the action of NO and PGE₂ and preventing the activation of oxidative.

Keywords : essential oil, *Zanthoxylum schinifolium*, antioxidant, anti-inflammatory

1. 서론

최근 약용식물에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 생리활성물질의 연구, 합성, 의약품 개발, 임상응용 등에 관한 실험과 더불어 줄기, 잎, 꽃, 뿌리, 열매 등의 모든 부위가 인간에게 유용하게 활용되는 이른바 식물성 정유에 대한 소비자의 요구가 높아지고 있다. 식물 정유는 예로부터 음식의 맛과 향을 증진시키고, 휘발성 정유의 경우 불쾌한 냄새를 없애기 위한 향신료로 많이 활용되고 있다. 아울러 소화촉진, 항균, 강장, 소염, 살균, 항산화, 항염 활성 등에 효과가 있어 민간에서는 물론 의학에서도 예로부터 이용되고 있다. 최근 전 세계적으로 식용유지의 생산과 소비는 날로 급증하는 추세이나 우리나라는 유지소비량에 비하여 공급량은 부족한 실정으로 상당수 해외 수입에 의존하고 있다. 따라서 다양한 식물 정유를 개발하기 위해서는 착유방법, 안정성 및 효능효과, 인체 안전성 검증에 이르는 일련의 과정을 과학적으로 규명하여 유통 및 이용에 유익하게 활용될 수 있도록 해야 한다.

산초 (*Zanthoxylum schinifolium*)는 운향과 (*Rutaceae*)에 속하는 낙엽관목으로 방향성 식물 자원으로 우리나라를 포함한 아시아 전역에서 널리 자생하며[1], 추위에 강하고 산기슭 양지에서 잘 자란다[2-3]. 산초나무의 열매는 연한 녹색과 실로 둥글고 푸른색을 띠고, 당년에 자란 가지 끝에 열매가 열리며, 8월 하순부터 10월까지 종자를 수확하며 성숙한 초피의 종자와 유사하여 구별이 어렵다[4]. 산초나무는 정원용, 공업용, 식용, 한약재 등으로 다양하게 이용되며 전통적으로 한국의 정서에 친숙한 식미와 향기를 가진다. 한 의학에서 예로부터 위장병, 건위, 소염, 이노, 구충제 등에 유용하며 식욕부진, 치통, 지혈압증, 감기, 천식, 지사제 등의 다양한 질환에 치료제로

서 이용되어 왔다[5-6]. 산초 열매의 메탄올 추출물은 quercetin의 함량이 높아 높은 항산화 효능을 나타내며, 클로로포름 분획물은 대장균, 황색포도상구균, 치아우식균에 대하여 높은 항균활성을 갖는 것으로 조사되었다[7].

산초는 고추가 이용되기 이전의 향신료의 하나로 열매를 이용하여 지방을 착유하거나, 분말 향신료, 약용 기름으로 널리 이용되어 왔다. 그러나 산초 정유에 대한 연구의 대부분은 산초나무의 수피, 잎과 열매 위주로 생리활성 규명이 국한되어 있어 산초 정유에 대한 연구는 미비한 실정이다. 본 연구에서는 산초의 과피를 제거한 종자의 정유를 이용하여 항산화 효능 및 염증매개인자에 미치는 영향을 평가하기 위해 *in vitro* 실험을 적용하였으며, 긍정적인 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

2. 실험

2.1. 소재추출방법

실험에 사용된 산초 (*Zanthoxylum schinifolium*)는 국내산으로 2012년 9월 하순에 생산된 것을 구입하여 사용하였다. 산초 열매로부터 종피를 분리한 산초 종자만 선별하여 세척한 후 음건하여 수분을 제거하고 분쇄기 (HMF-502, 한일전기)로 파쇄한 후 65~75°C에서 30분간 건열처리 한 뒤 95°C로 예열된 착유기에서 30분 동안 압착하여 정유 (essential oil)를 획득하였다. 3.00 kg의 산초 종자로부터 0.94 kg의 정유를 획득하였으며, 31%의 추출 수율을 나타내었다.

2.2. 생리활성 측정

2.2.1. 항산화 효과 (DPPH scavenging activity, SOD-like activity)

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 그 자체가 매우 안정한 Free radical로서 517nm에서 특이적인 광흡수를 나타내는 진한 보라색의 화합물이다. 추출물의 항산화 활성 측정 (Electron donating abilities, EDA)은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료용액 2.0 ml에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 0.5 ml를 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

추출물의 SOD 효소 활성은 SOD assay Kit-WST를 이용하여 지시대로 측정하였다. 96-well plate에 추출물을 넣고 WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, mono-sodium salt)과 xanthine oxidase working solution을 첨가한 후 37°C에서 20분간 incubation한 후 microplate reader에서 450 nm 파장을 측정하였다.

2.2.2. 세포배양 (Cell culture)

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포 (KCLRF, Seoul, Korea)는 DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium)에 10% FBS (fetal bovine serum)와 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하였고, 37°C, 5% CO₂조건의 incubator (Sanyo, Japan)에서 배양하였다. RAW 264.7 세포를 24 well plate에 1×10⁵ cells/well로 분주한 다음 24시간 후에 serum을 포함하지 않는 배지로 교환하여 24시간 동안 배양하였다. 추출물을 농도별로 처리한 다음 1시간 후에 LPS (lipopolysaccharide) 500ng/L를 처리하였다.

2.2.3. 세포독성 평가 (MTT assay)

배지를 제거하고 MTT solution (MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide])을 넣고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 후 MTT solution을 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 녹여 ELISA microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.4. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 수준 측정

PGE₂의 생성은 PGE₂ enzyme-immunoassay

kit를 이용하여 지시한 방법에 따라 측정하였다. 세포를 2,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 얻은 상등액 50 µL와 50 µL PGE₂ antibody, 50 µL PGE₂ AchE tracer를 가한 후 2-8°C에서 overnight으로 진탕 배양시켰다. 이후 세척액으로 4번 washing한 뒤, 200 µL의 Ellman's reagent를 가하고 상온에서 1시간 동안 진탕 배양하였다. ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정한 다음 농도를 알고 있는 PGE₂로 standard curve를 구한 후 단백질 정량한 값으로 환산하여 pg/mL/mg protein 값으로 표기하였다.

2.2.5. Nitric oxide (NO) 수준 측정

약물 처리 1시간 후에 LPS를 처리하고, 24시간 후 배지를 수거하여 세포배양 상등액 50 µL와 Griess 시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H₂O) 50 µL를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다.

2.3. 통계학적 분석

실험결과에 대한 통계처리는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 평균치간의 유의성은 Student's test를 이용한 후 P값이 0.05미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항산화 결과

산초 정유 성분의 DPPH 라디칼 소거능과 SOD (super-oxide dismutase) 효소 활성에 대하여 측정하였다(Fig. 1). 그 결과 추출물을 처리한 경우 농도 의존적으로 DPPH 라디칼에 대한 시료의 환원력이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, SOD-like activity 또한 농도 의존적으로 증가하였다. Reactive oxygen species (ROS)는 세포 내의 DNA와 RNA를 손상시키고, 사이토카인, 단백질 합성, 효소, 대사활성에 작용하여 산화적 스트레스를 가함으로써 유전정보의 변화 및 질병을 유발하게 하는 인자이다[8-9]. 이중원의 선행연구에서 산초 정유성분의 주요 화합물은 limonene, cumic alcohol, geranyl acetate, β

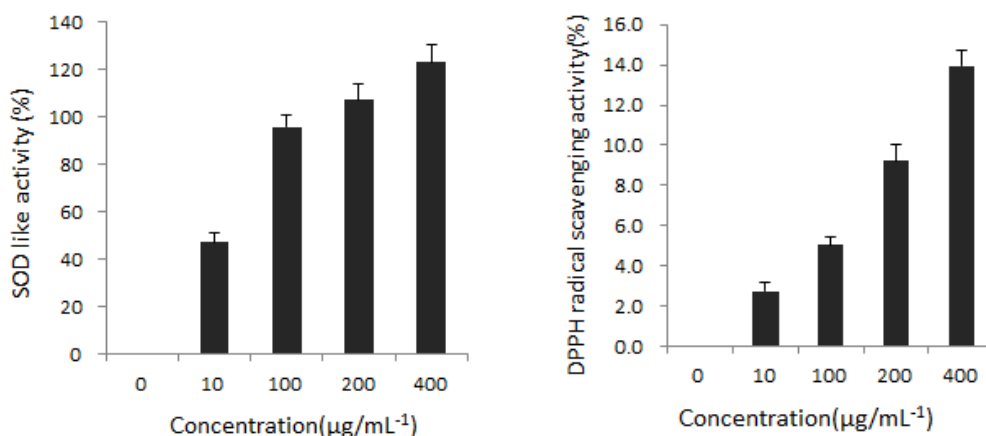


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity(%) and SOD-like activity(%) of dependent on concentration from essential oil of *Zanthoxylum schinifolium*.

-phellandrene, D-limonene, citronellal, geraniol 등의 주요성분을 보고하였으며[10], 이는 항산화 효능과 관련되는 것으로 사료된다.

3.2. 세포독성에 미치는 영향

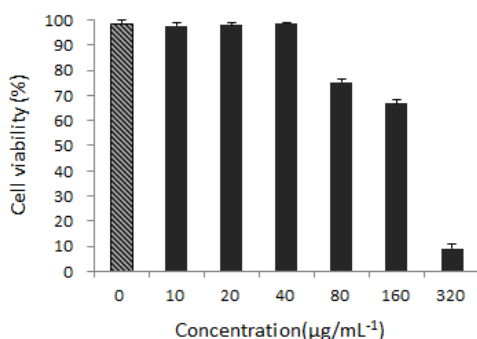


Fig. 2. Effect of essential oil of *Zanthoxylum schinifolium* on the cell viability of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 500ng/mL lipopolysaccharide (LPS) alone or with 10-320 μg/mL⁻¹ of extracts, and cell viability was measured by an MTT assay.

산초 정유 성분이 세포 독성에 미치는 영향을 측정한 결과 40 μg/mL⁻¹이하의 농도에서는 98.67±0.47%로 세포독성을 나타내지 않았으며,

80, 160, 320 μg/mL⁻¹ 농도에서는 세포생존율이 각각 75.33±1.25, 66.67±1.89, 9.00±1.63%로 감소하였다(Fig. 2). 본 결과를 바탕으로 세포독성을 나타내지 않는 40 μg/mL⁻¹ 이하의 농도에서 염증매개인자의 변화를 관찰하였다.

3.3. PGE₂와 NO 생성에 미치는 영향

염증반응 매개물질인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현 유도는 nitric oxide (NO) 형성을 통해 염증반응과 밀접하게 관련이 되어 있으며, 염증성 사이토카인의 자극에 의하여 여러 세포에서 유도된다[11-12]. 외부 자극에 의해 염증이 유발되어 전달되는 과정에서는 COX-2가 일시적으로 발현이 되어 염증이 일어난 곳에서 프로스타글란딘을 과량 방출하게 된다[13-15]. 이를 바탕으로 본 연구에서는 산초 정유 성분이 항염증 효능에 미치는 영향을 평가하기 위해 염증매개인자의 변화를 관찰하였으며, 정유의 농도는 세포독성을 나타내지 않는 40 μg/mL⁻¹이하의 농도에서 실시하였다. 그 결과 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에 산초 정유 성분을 처리하였을 때 염증매개물질이 감소되는 것으로 나타났다. LPS를 단독으로 처리한 양성대조군보다 산초 정유 성분을 처리한 군에서 농도 의존적으로 NO와 PGE₂의 생성이 감소되는 것을 관찰하였다. NO 생성의 경우 40 μg/mL⁻¹ 농도에서 33.25±3.30 μM의 NO 생성 수준을 나타내었으며, PGE₂의 경우 40 μg/mL⁻¹ 농도에서 0.67±0.06 ng/mL의

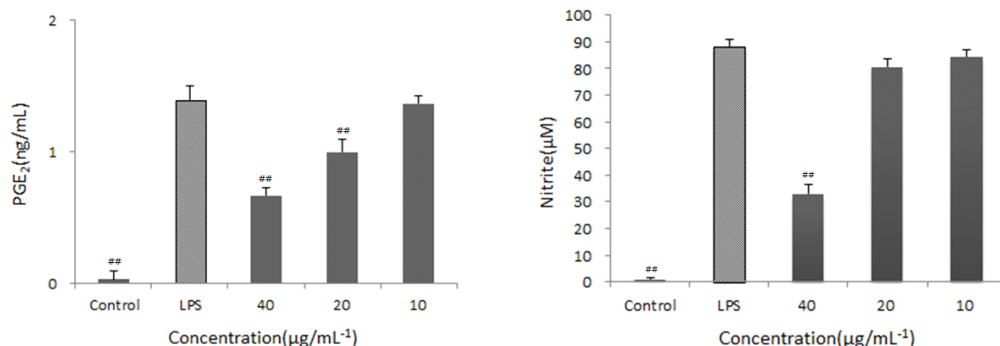


Fig. 3. The essential oil of *Zanthoxylum schinifolium* suppressed lipopolysaccharide (LPS)-induced NO and PGE₂ production. RAW 264.7 cells were treated with 500ng/mL LPS alone or with various concentrations of extracts. Data were presented as them \pm S.D., #: P<0.05 compared with positive control, ##: P<0.01 compared with positive control.

수준으로 나타났다(Fig. 3). 기존 연구에 의하면 산초 정유 성분은 iNOS와 COX-2 발현을 감소시켜 항염 효능을 나타내는 것으로 보고된 바 있으며, 본 연구의 실험 결과와 항염효능 측면에서 유의한 관련성을 나타내는 것으로 사료된다[16].

감소하였다. 이상의 결과는 산초 정유 성분이 세포의 산화를 억제하고 염증매개물질을 감소시키므로 다양한 사업에 활용될 수 있는 가능성이 충분하다고 판단된다.

4. 결론

본 연구는 산초 종자로부터 정유를 추출한 후 세포생존율, 항산화, 항염 효능을 평가하여 염증유발 물질부터 세포를 보호할 수 있는 천연 기능성 소재로서의 가능성을 평가하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 산초 정유 성분이 세포생존율에 미치는 영향에 대하여 MTT assay로 평가한 결과 80 μ g/mL⁻¹ 이상의 농도부터 낮은 세포생존율을 나타내었으며, 40 μ g/mL⁻¹ 이하의 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 산초 정유 성분을 처리한 경우 농도 의존적으로 DPPH 라디칼에 대한 시료의 환원력이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, SOD-like activity 또한 농도 의존적으로 증가하였다.
3. 산초 정유 성분의 항염효능을 평가한 결과 LPS를 단독으로 처리한 양성대조군과 비교해서 염증매개물질인 NO와 PGE₂ 생성율이 억제되는 것으로 나타났으며 농도 의존적으로

References

1. H. K. Seong, Y. H. Lee and C. K. Seong, Herbal home remedies. Happy Blue. Seoul, Korea, 69 (2012).
2. J. W. Lee, Volatile flavor components of Korean sancho fruit and tree (*Zanthoxylum schinifolium*). *Korean J. Community Nutr.*, **11**, 493 (1998).
3. S. J. Lee, Korean folk medicine-monographs series. No. 3. Publishing center of Seoul National University, Seoul, Korea, 88 (1996).
4. M. S. Jung, Y. M. Shin, M. K. Kim, C. H. Kim and J. S. Choi, Physicochemical properties of Sancho (*Zanthoxylum schinifolium*) seeds oil base extracts from different method. *Korean J. Food Preserv.*, **20**(6), 827 (2013).
5. T. J. Kim, Korean resources plants. Publishing center of Seoul National University, Seoul, Korea, 266 (1998)

6. S. M. Bae, Y. M. Jin, E. H. Jeong, M. B. Kim, H. Y. Shin, C. W. Ro and S. C. Lee, Studies on proximate composition, fatty acids and volatile compounds of *Zanthoxylum schinifolium* fruit according to harvesting time. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **19**(1), 1 (2011).
7. S. Kim, Y. Han, Isolation and identification of antimicrobial compound from Sancho (*Zanthoxylum schinifolium*). *Korean J. Soc Food Sci.*, **13**(1), 56 (1997).
8. S. K. Hur, S. S. Kim, Y. H. Heo, S. M. Ahn, B. G. Lee and S. K. Lee, Effect of the grapevine shoot extract on free radical scavenging activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production in raw 264.7 macrophages. *J. Applied Pharmacology*, **9**(3) : 188 (2001).
9. M. Roberforid, P. B. Calderon, Free radicals and oxidation phenomena in biological system. *Marcel Dekker, Inc.*, New York, 193 (1995).
10. J. W. Lee, Volatile flavor components of Korean sancho fruit and tree (*Zanthoxylum schinifolium*). *Korean J. Community Nutr.*, **11**(5), 493 (1998).
11. Akira Murakami and Hajime Ohigashi, Targeting NOX, iNOS and COX-2 in inflammatory cells. *Int. J. Cancer*, **121**(11), 2357 (2007).
12. W. K. Alderton, C. E. Cooper and R. G. Knowles, Nitric oxide synthase : Structure, function and inhibition. *Biochem J.*, **357**, 593 (2001).
13. H. S. Ryu, K. H. Chang, H. W. Yang, M. S. Kim, H. C. Kwon and K. S. Oh, High cyclooxygenase-2 expression in stage IB cervical cancer with lymph node metastasis or parametrial invasion. *Korean J. Gynecol. Oncol.*, **76**, 320 (2000).
14. D. K. Gaffney, J. Holden, M. Davis, K. Zempolich, K. J. Murphy and M. Dodson, Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J. Radiat Oncol. Biol. Phys.*, **42**(9), 494 (2001).
15. J. R. Vane, Y. S. Bakhle and R. M. Botting, Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**(1), 97 (1998).
16. J. Hyuk Lee, K. M. Chang and G. H. Kim, Composition and anti-inflammatory activities of *Zanthoxylum schinifolium* essential oil:suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, cytokines and cellular adhesion. *J. Science of Food and Agriculture*, **89**(10), 1762 (2009).