

<원 저>

## 발효 율 추출물의 생리활성 및 단회 경구 투여 독성시험

최명진<sup>1</sup> · 이승진<sup>1</sup> · 장승희<sup>1</sup> · Md. Ahsanur Reza<sup>1</sup> · 홍주현<sup>2</sup> · 정희경<sup>3</sup> · 박승춘<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 수의과대학, <sup>2</sup>대구가톨릭대학교 외식식품산업학부, <sup>3</sup>대구테크노파크 바이오산업지원센터  
(게재승인: 2010년 7월 27일)

## Biological activities and single oral dose toxicity in rat of fermented *Rhus verniciflua* extract

Myung-Jin Choi<sup>1</sup>, Seung-Jin Lee<sup>1</sup>, Seung-Hee Jang<sup>1</sup>, Md. Ahsanur Reza<sup>1</sup>,  
Joo-Heon Hong<sup>2</sup>, Hee-Kyun Jung<sup>3</sup>, Seung-Chun Park<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyungsan 712-702, Korea

<sup>3</sup>Bio Industry Center, Daegu Technopark, Daegu 704-701, Korea

(Accepted: July 27, 2010)

**Abstract :** In this study, we investigated the biological activities such as anti-tumor, anti-oxidant and anti-inflammatory activities as well as single oral dose toxicity of fermented *Rhus verniciflua* extract (FRVE). In order to examine anti-tumor activity of FRVE, the sarcoma 180 cells were treated with FRVE at various concentrations (0.03, 0.3, 3 and 30 mg/mL) in microtetrazolium (MTT) assay. In MTT assay, all the cells treated with FRVE at various concentrations have shown a significant difference compared with control ( $p < 0.05$ ). In xanthine oxidase inhibition assay to examine the antioxidant activity, the xanthine oxidase inhibition rate of FRVE at 1.5 mg/mL and 15 mg/mL was  $85 \pm 15.01\%$  and  $99 \pm 16.02\%$ , respectively. Nitric oxide production in RAW 264.7 cells showed that FRVE showed a significant anti-inflammation effect at 3 mg/mL ( $p < 0.05$ ). In single oral dose toxicity study, no differences were observed between control and treated groups in clinical signs, body weight gains, feed and water consumptions. The results indicated that lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>) of FRVE was found to be higher than 5,000 mg/kg in this experiment. From the above results, we may suggest that FRVE might have useful as a material for functional food and/or animal pharmaceuticals.

**Keywords :** anti-inflammation, anti-oxidant, anti-tumor, *Rhus verniciflua*, single-dose toxicity

## 서 론

플라보노이드(Flavonoid)란 플라본(Flavone)을 기본 구조로 식물의 성장, 분화에 관여하는 식물의 2차 대사산물로 식물의 잎, 꽃, 뿌리, 열매 그리고 줄기 등에 많이 들어있다 [17]. 플라보노이드에 대한 생리활성에 관한 연구로 성분 중 hesperidin, rutin, 그리고 eriodictin은 모세혈관투과율을 저하시키고 [18], 플라보노이드가 많이 함유하고 있는 창포(*Acorus calamus* L. var. *angustatus*

Bess.) 추출물은 미백효과 [6], 금은화(*Lonicera japonica*)와 율나무(*Rhus verniciflua*) 추출물은 항염증 작용 [14, 18]이 알려져 있다.

율나무는 율나무과(*Anacardiaceae*)에 속하는 식물로 일본 그리고 중국을 포함한 동북 아시아에서 위염, 위암 그리고 동맥경화증에 사용되었으며 가구의 도료 및 공업용으로 사용되었다. 율나무의 주요 성분은 fisetin, fustin, gallic acid, protocatechuic acid, butein, quercetin 그리고 sulfuretin 등의 pheon계 화합물로 알려져 있다 [2].

\*Corresponding author: Seung-Chun Park

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea  
[Tel: +82-53-950-5964, Fax: +82-53-950-5964, E-mail: parksch@knu.ac.kr]

이러한 성분이 포함된 옻나무 추출물은 항산화와 항염증 기능 [2, 14]이 알려져 있으며, 간암, 림프종 그리고 유방암 등에 대한 항암 연구가 많이 이루어지고 있다 [12, 13]. 그러나 옻나무 추출물은 사람 피부에 자극을 일으켜 사용에 제약을 받고 있는 실정으로 원인 성분으로 urushiol이 알려져 있다 [2]. 이러한 부작용을 제거하기 위한 방법으로 아세톤, 에탄올, 클로로포름 그리고 부탄올을 이용한 유기용매 분획법 [2, 13, 14]으로 urushiol을 제거하고 있으나, 유기 용매의 독성작용 및 유기용매 용해 물질만의 획득 등의 문제로 인해 옻나무 중 여러 생리활성 물질의 획득 및 사용이 어려운 실정이다.

이와 같은 부작용을 해결하고자, 최근 미생물 발효를 통해 식물추출물의 독성 관련 물질 및 화학적 관련 작용기를 제거 혹은 변형을 유도하고 있다. 윤 등은 겨우살이(Mistletoe, *Viscum album*)의 렉틴이 일으키는 염증성 cytokine 분비 및 발열반응 등이 발효 공정을 거침으로써 독성효과를 감소시켰으며, 이는 렉틴 중 A 및 B chain의 분리 혹은 peptides의 변화 등으로 독성 관련 부위를 변화시켜 독성효과를 낮추는 것으로 알려져 있다 [23]. 이와 같은 식물추출물의 발효는 독성효과의 감소 이외에 생리활성을 나타내는데, *in vitro*에서 밀 배아 발효 추출물이 T세포 유래 백혈병의 세포사멸(apoptosis)을 유도하였으며 [3], *in vivo*에서 발효된 콩의 급여가 돼지의 사료 효율성을 증가시켰고 육즙(drip)의 손실을 감소시켰다 [20]. 따라서 본 실험에서는 옻나무의 자극성 물질인 urushiol의 효과를 감소시키고, 생리활성을 극대화 하기 위해 발효공정을 적용하였으며, 그 결과 얻어진 추출물(fermented *Rhus verniciflua* extract; FRVE)을 이용하여 항암, 항산화 및 항염증 활성 작용에 대한 생리활성을 규명하고, 추출물에 대한 안전성을 확보하여 향후 동물용 생약개발 및 기능성 식품개발을 위한 기초자료를 확보하고자 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 준비

강원도 횡성군에서 구입한 참옻나무(8년 생)의 옻나무 80%와 수피 20%로 구성된 1kg의 시료를 세절하고, 수세 후 추출조(Bio Feedback Cosmos 660; 경서기계, 한국)에 정제수 8L를 첨가하여 95°C에서 6시간 추출하였다. 참옻나무 추출액으로부터 피부자극물질로 알려져 있는 urushiol을 무독화하기 위해 Laccase 생산 균주인 장수버섯(*Fomitella fraxinea*)을 Korea Culture Center of Microorganisms에서 분양 받아 본 연구에 이용하였다. 즉, 참옻나무 추출액을 1L 삼각 플라스크에 600 mL씩 분주한 다음 멸균(121°C, 15 min)하고 계대 배양하여 보

관 중인 *Fomitella fraxinea*를 직경 1.5 cm 코르크보러를 사용하여 100 mL 참옻나무 추출액 당 직경 1.5 cm 균주 하나를 접종하여 총 600 mL에 해당하는 균주를 접종한 뒤 3일간 130 rpm, 25°C 조건에서 배양한 발효물을 시료로 사용하였다.

### 세포 배양

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포주(KCLB No. 40071)와 마우스 복강암세포인 Sarcoma 180 세포주(KCLB No.40066)는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 실험에 사용하였다. RAW 264.7 세포주는 각각 100 unit/mL-100 µg/mL의 penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)이 들어 있는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Welgene, Korea) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며, Sarcoma 180 세포주는 위와 같은 농도의 penicillin-streptomycin과 FBS가 포함된 RPMI(Gibco, USA) 배지를 사용하여 배양하였다. 세포주 은행에서 분양 받은 후 계대 번호를 기록하였고 2일 간격으로 계대 배양하여, RAW 264.7 세포주(계대번호 25)와 Sarcoma 180 세포주(계대번호 17)가 80% 배양되었을 때 사용하였다.

Sarcoma 180 세포주는 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후 5% Trypsin-EDTA로 부착된 세포를 분리하여 2,500 rpm으로 5분 동안 원심 분리한 후 집적된 암세포를 1대 10 비율로 희석하여 계대하였다.

### Sarcoma 180 세포주에서 FRVE의 항암활성

FRVE의 항암활성 정도는 microtetrazolium(MTT)법 [3]을 변형하여 시행하였다. 암세포주는 각 well당 1만개가 되도록 180 µL씩 96 well plate에 접종되었고, 배양 전에 농도 별로 희석된 시료를 20 µL씩 접종하였다. 접종 4일 후에 2 mg/mL로 희석된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide(MTT; Sigma, USA) 용액을 각 well당 50 µL씩 접종하여 4시간 동안 배양한 후, 염색된 세포가 떨어지지 않도록 배지를 제거하였다. 그 후 dimethylsulphoxide를 150 µL씩 가하여 formazan crystal을 녹여 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Xanthine oxidase 저해 활성과 항산화 효과

항산화 효과를 측정하기 위해 일정 농도로 희석한 FRVE의 xanthine oxidase 저해 활성을 측정하였으며, Geetha [21]와 Lee [16] 등의 방법을 변형하여 실시하였다. 큐벳에 10 mM의 PBS(PH 7.4) 1,760 µL와 0.175 mg/mL 농도로 녹인 xanthine(Sigma, USA) 용액 100 µL를 첨가하고, 희석한 시료 100 µL와 10 mM PBS(PH 7.4)

에 녹인 0.15 unit/mL의 xanthine oxidase(Sigma, USA) 40  $\mu$ L를 첨가하여 3분 동안 반응시킨 후 생성된 uric acid 양을 측정하기 위해 spectrophotometer(Kontron Instrument, Switzerland)를 이용하여 295 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군은 시료 대신 PBS 100  $\mu$ L를 첨가하였고, 추출물 처리군과 대조군의 흡광도 감소율을 다음과 같이 저해율(%) = (대조군의 흡광도 - 반응군의 흡광도) / 대조군의 흡광도  $\times$  100% 식을 이용하여 계산하였다. 양성 대조군으로 사용된 ascorbic acid(A. acid)는 빛의 노출을 최소화 하여 농도 별로 희석하여 사용하였다.

#### RAW 264.7세포주에서 염증 억제 효과

염증 억제 효과는 Griess reaction system(Promega, USA)을 이용하여 nitrite 발생 농도로 측정하였다. RAW 264.7세포주를  $1.5 \times 10^5$  cells/mL로 접종하고, 여러 농도로 희석한 FRVE로 전 처리한 후, 1시간 뒤에 lipopolysaccharide(LPS) 1  $\mu$ g/mL을 처리하여 24시간 배양하였다. 96 well plate에 세포 배양 상층액 50  $\mu$ L와 Griess 시약 1%(w/v) sulfanilamide 50  $\mu$ L를 첨가한 다음 차광하여 10분 동안 실온에서 반응시킨 후, 2.5%(v/v) phosphoric acid에 녹인 0.1%(w/v) N-1-naphthylethylenediamine을 50  $\mu$ L 혼합하여 10분 동안 차광하여 반응시키고, 30분 이내에 microplate reader(Molecular Device, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. nitric oxide(NO)의 생성량 산출은 nitric oxide standard solution을 이용하여 계산하였다.

#### 단회 경구 투여 독성시험

**실험동물 및 사육환경:** 실험동물은 5주령 Sprague-Dawley 계통의 특정병원균 부재(specific pathogen free) 랫트(오리엔트 바이오, 한국)로, 시험군은 암컷과 수컷(127.5  $\pm$  2.16 g, 103.1  $\pm$  1.52 g) 각 5마리씩 대조군과 투여군으로 정하였다. 이 동물들은 인수 시 및 적응 기간 동안 일반증상의 이상이 관찰되지 않았다. 본 실험은 경북대학교 동물실험윤리위원회의 승인(KNU 2010-33) 하에 실시를 하였다. 사육조건은 온도 22  $\pm$  2°C, 상대습도 55  $\pm$  10%, 조명시간 12시간(오전 6시~오후 6시) 및 조도 150~300 Lux로 설정 한 뒤 수행하고, 방사선조사로 멸균된 실험 동물용 고형사료(효창 싸이언스, 한국)와 정수시스템을 이용한 물(Tap water)을 자유섭취 하도록 하였다.

**투여용량의 설정:** 옷 발효 추출물의 독성 시험은 옷 추출물을 멸균 생리식염수에 0, 625, 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg 투여량을 결정하였다 [21]. 대조군은 생리식염수를 투여하였으며, 랫트는 시료 투여 12시간 전에 절식

시키고 3 mL/kg으로 1회 경구투여 한 후 14일 동안 관찰하였다.

**관찰 및 검사항목:** 식품의약품안전청의 독성시험기준 [1] 및 OECD test guideline 420(TG 420) [14]에 따라 임상증상 관찰은 모든 실험동물에 투여 당일 날에 투여 후 6시간 동안 매 시간마다 관찰 하였으며, 다음날부터 14일까지는 1일 1회씩 동물의 일반상태의 변화, 중독증상의 발현 및 사망유무를 관찰하였다. 또한 시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여일, 투여 후 3일, 7일, 14일째에 체중과 체온을 측정하였다. 시험 종료 후 실험동물을 에테르 마취하여 복대동물 절단방법으로 치사 시킨 다음 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안적으로 관찰하였다.

#### 통계분석

본 시험 결과는 평균값과 표준편차로 표기하였으며, 통계학적 분석은 SAS System(Version 9.1; SAS, USA)을 이용하였다. 측정 항목 중 추출물 생리활성관련 결과 및 단회 경구 투여 독성시험 중 체중 결과에 대하여 one-way analysis of variance(ANOVA) 검정법을 사용하였고, 이때 *p*-value가 0.05 이하일 경우 유의한 것으로 판정하였다. 단회 경구 투여 독성시험에서 사망동물이 관찰되지 않아 반수치사량(LD<sub>50</sub>)의 산출을 위한 통계는 실시하지 않았다.

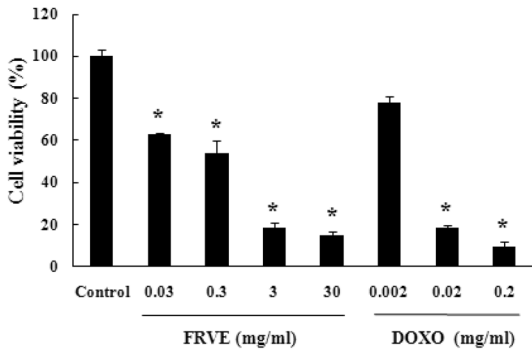
## 결 과

#### Sarcoma 180 세포주에서 FRVE의 항암활성

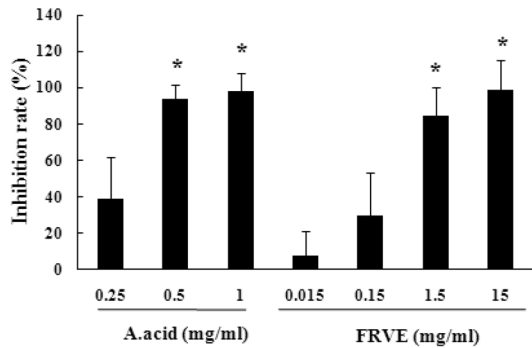
양성 대조군으로 항암제인 doxorubicin은 항암활성이 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었고, IC<sub>50</sub>값은 6.29  $\pm$  2.83  $\mu$ g/mL이었다 (data not shown). FRVE에서도 항암활성이 농도 의존적으로 증가하였으며, IC<sub>50</sub>값은 0.23  $\pm$  0.25 mg/mL로 doxorubicin(DOXO)의 항암활성 정도와 비교시 DOXO의 약 2% 정도의 항암활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. FRVE의 0.03 mg/mL 이상에서 유의적인 항암활성을 보였으며(*p* < 0.05), FRVE의 3 mg/mL 농도에서 세포 생존율은 18.56  $\pm$  2.19%로, DOXO의 0.02 mg/mL 농도에서의 세포 생존율인 18.43  $\pm$  1.57%와 유사하였다(Fig. 1).

#### Xanthine oxidase 저해 활성과 항산화 효과

FRVE의 항산화 효과를 측정하기 위해 xanthine oxidase 저해 활성을 측정하였다. 양성 대조군으로 항산화 효과를 가진 것으로 알려져 있는 A. acid를 사용하였으며, 농도 의존적으로 xanthine oxidase를 저해하였다. A. acid 0.5 mg/mL과 1 mg/mL에서 각각 94  $\pm$  8.23%, 98  $\pm$  10.12%



**Fig. 1.** Dose-dependent fermented *Rhus verniciflua* extract (FRVE) induced cytotoxicity in Sarcoma 180 cells. Cells were incubated with FRVE for 4 days followed by analysis of cell viability by a microtetrazolium assay. Values are mean of three experiments  $\pm$  SD. Significant difference between control and treated groups was expressed as \* $p < 0.05$ . DOXO: doxorubicin.

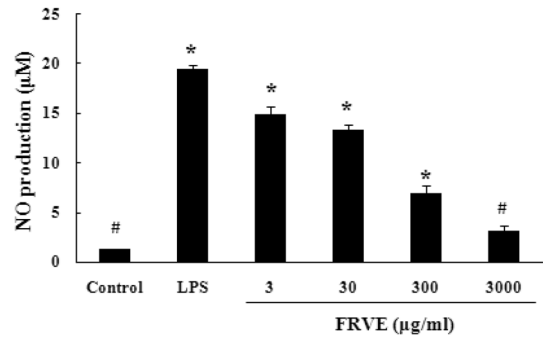


**Fig. 2.** Xanthine oxidase inhibition of FRVE. Values are mean of three experiments  $\pm$  SD. Significant difference between control and treatment groups was expressed as \* $p < 0.05$ . A. acid: ascorbic acid.

의 xanthine oxidase 저해활성을 보였으며, 유의적인 항산화능을 보였다. FRVE 또한 농도의존적으로 항산화 활성이 증가함을 보였으며, 여러 희석 농도 중 1.5 mg/mL 과 15 mg/mL에서 각각  $85 \pm 15.01\%$ ,  $99 \pm 16.02\%$ 로 유의적인 항산화능을 보였다( $p < 0.05$ )(Fig. 2).

**RAW 264.7세포주에서 염증 억제 효과**

양성 대조군으로 이미 알려진 염증 유도물질인 LPS 를 이용하여, 마우스 대식세포에서 면역반응으로 인한 NO 생산을 측정할 결과, 여러 농도로 희석된 FRVE의 NO 생산 정도가 농도-의존적으로 감소함을 알 수 있었다. 0.3 mg/mL 이하의 FRVE 전처리 후 LPS 처리군과 LPS 1  $\mu$ g/mL 단일 처리군 모두 대조군의 NO 생산과 유의적인 차이를 나타내었으며, 염증을 억제정도에 따라



**Fig. 3.** Effect of FRVE on nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with lipopolysaccharide (LPS; 1  $\mu$ g/mL) or FRVE at various concentrations for 24 h. Data represent the mean with SD of three independent experiments. Significant difference with respect to control group was expressed as \* $p < 0.05$ . Significant difference with respect to LPS group was expressed as # $p < 0.05$ .

NO 발생 정도가 감소하는 것으로 볼 때, FRVE는 3 mg/mL에서 유의적인 항염증 효과가 있는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

**단회 경구 투여 독성시험**

**치사율 및 임상증상:** 여러 농도의 FRVE를 랫트에 경구 투여시 모든 시험군에서 14일 동안 FRVE에 기인한 사망은 관찰되지 않았으며(Table 1), 시험 물질에 의한 독성증상과 특이적 임상조건도 나타나지 않았다(data not shown). 위의 결과를 통해, FRVE를 랫트에 단회 경구 투여 하였을 때 LD<sub>50</sub>값은 암컷과 수컷 모두에서 5,000 mg/kg 이상임을 알 수 있었다.

**체중변화 및 체온변화:** 시험기간 동안 체중의 변화를 관찰한 결과, 모든 시험군의 체중이 정상적으로 증가하였다(Table 2). 체온변화에서도 대조군과 시험군에서 유의적인 이상체온은 나타나지 않았으며, 시험군간의 유의적인 이상체온도 없었다(data not shown).

**사료 섭취량 및 음수량 변화:** 0, 625, 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg의 FRVE를 랫트에 경구 투여한 후, 투여일로부터 시험기간인 14일 동안 매일 사료량 및 음수량의 변화를 관찰한 결과, 모든 시험군의 암,수 동물에서 정상적인 사료 섭취량과 음수량을 보였다. 또한, 대조군과 비교시 유의성 있는 섭취변화는 관찰되지 않았으며, FRVE의 농도에 따른 유의적인 차이가 발견되지 않았다(Fig. 4).

**부검 및 장기무게:** 14일 동안의 시험기간 종료 후, 내부 장기에 대하여 육안적 병변을 관찰한 결과 이상 소견이 발견되지 않았다. 또한, 간, 신장, 비장의 무게를 관찰한 결과, 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(Table 3).

**Table 1.** Mortality and LD<sub>50</sub> values in male and female rats treated orally with fermented *Rhus verniciflua* extract (FRVE)

Groups	Dose (mg/kg)	Hours after treatment						Days after treatment							Final mortality	
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7-14		
Male	0	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

\*Number of dead animals.

**Table 2.** Body weight changes in male and female rats after single oral administration of FRVE

Sex	Dose (mg/kg)	Days after treatment				
		0	1	3	7	14
Male	0	273.4 ± 2.7	285.2 ± 1.3	316.2 ± 1.9	326.2 ± 1.3	347.0 ± 1.6
	625	272.4 ± 2.1	285.0 ± 1.6	314.0 ± 2.2	326.0 ± 1.6	346.2 ± 1.6
	1,250	273.4 ± 1.7	284.6 ± 0.9	316.8 ± 1.8	325.6 ± 1.8	347.6 ± 0.9
	2,500	274.4 ± 3.2	283.8 ± 2.4	315.6 ± 2.7	325.4 ± 1.1	347.0 ± 2.2
	5,000	272.8 ± 1.5	283.8 ± 0.8	314.6 ± 0.5	325.0 ± 0.7	346.6 ± 0.5
Female	0	184.0 ± 1.6	195.0 ± 1.9	206.2 ± 1.8	209.6 ± 1.5	213.8 ± 0.8
	625	184.8 ± 1.3	194.8 ± 2.4	205.4 ± 1.1	209.0 ± 1.6	212.6 ± 1.1
	1,250	185.2 ± 1.8	194.2 ± 1.5	205.8 ± 1.5	208.2 ± 0.8	213.6 ± 1.1
	2,500	185.6 ± 1.1	194.4 ± 1.1	206.2 ± 0.8	209.6 ± 1.5	213.4 ± 1.1
	5,000	185.6 ± 0.5	194.2 ± 0.8	204.8 ± 0.8	208.8 ± 0.8	213.2 ± 0.8

**Table 3.** Absolute organ weights (g) for male and female rats orally administrated with FRVE

Sex	Parameters	Dose (mg/kg)	0	625	1,250	2,500	5,000	
		No. of animals	5	5	5	5	5	
Male	Body weight (g)		347 ± 1.6	346.2 ± 1.6	347.6 ± 0.9	347 ± 2.2	346.6 ± 0.5	
	Liver (g)		15.1 ± 0.2	15.1 ± 0.1	15.0 ± 0.2	15.0 ± 0.1	15.0 ± 0.1	
	Spleen (g)		0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	
	Kidney (g)	Right		1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0
		Left		1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.3 ± 0.0
Female	Body weight (g)		213.8 ± 0.8	212.6 ± 1.1	213.6 ± 1.1	213.4 ± 1.1	213.2 ± 0.8	
	Liver (g)		9.1 ± 0.0	9.1 ± 0.1	9.1 ± 0.1	9.1 ± 0.0	9.1 ± 0.1	
	Spleen (g)		0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	
	Kidney (g)	Right		0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.9 ± 0.0
		Left		0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.9 ± 0.1

Values are presented as mean ± SD. No significant difference observed ( $p < 0.05$ ).

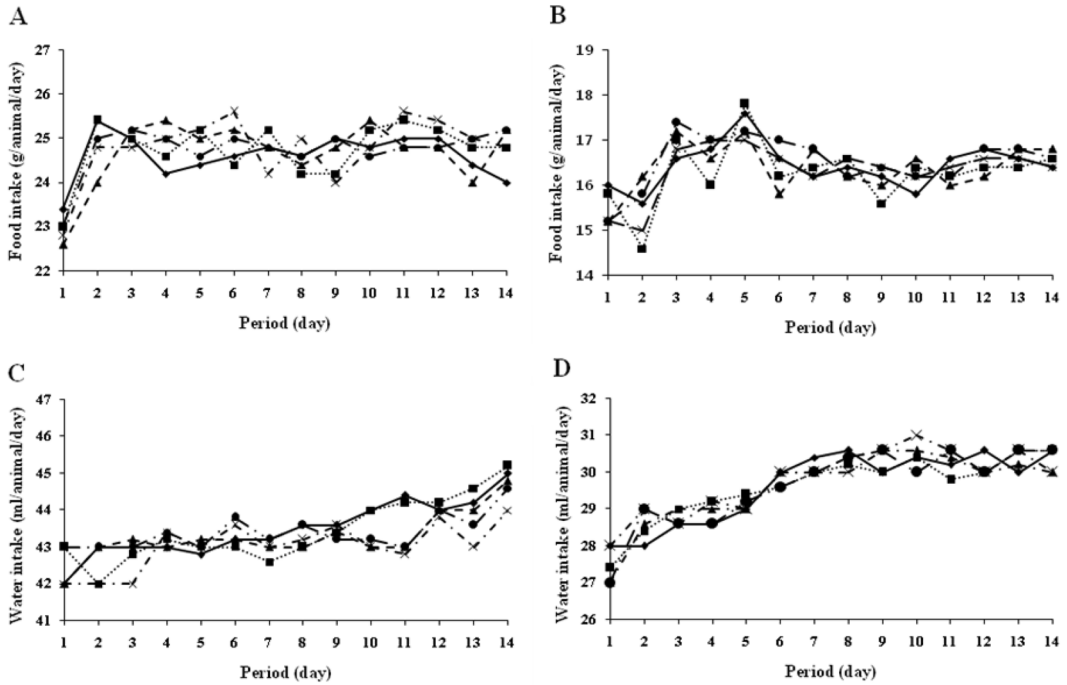


Fig. 4. Food and water consumption of male (A, C) and female (B, D) rats given FRVE for 14 days. Values are mean  $\pm$  SD.  $\blacklozenge$ -; 0 mg/kg,  $\blacksquare$ -; 625 mg/kg,  $\blacktriangle$ -; 1,250 mg/kg,  $\blacktimes$ -; 2,500 mg/kg,  $\bullet$ -; 5,000 mg/kg.

### 고찰

식물의 여러 부분에 함유되어 있는 플라보노이드는 hesperidin, catechins, rutin을 포함하여 약 4,000 종류 이상이 알려져 있다 [18]. 생리 및 약리 활성에 미치는 몇 종류의 플라보노이드 중 *in vitro*와 *in vivo*에서 항산화 및 항염증 작용과 같은 생리활성 효과가 보고되었으며 [14], 그 예로 플라보노이드를 함유하는 것으로 알려진 창포(*Acorus calamus* L. var *angustatus*), 금은화(*Lonicera japonica*) 그리고 옷나무 추출물에 대한 생리활성 연구 등이 있다 [6, 14, 18]. 그 중 옷나무 추출물은 생리활성 물질로서, gallic acid, protocatechuic acid, butein, quercetin, sulfuretin 그리고 fisetin 등의 플라보노이드가 보고되었다 [2]. 또한, 옷나무 추출물은 간암, 림프종, 그리고 유방암 등에 대한 항암작용 [12, 13] 그리고 항산화 및 항염증 기능 [18]이 알려져 있다. 그러나 옷나무의 성분 중 urushiol은 사람의 피부에 자극을 일으키는 부작용이 있어 [2], 유기용매에 의한 분획 추출로 [2, 13, 14] urushiol을 제거하고 있으며 이는 옷나무의 플라보노이드 사용을 어렵게 만든다.

본 연구에서는 이와 같은 문제점을 해결하고자, 옷나무 추출액에 장수버섯(*Fomitella fraxinea*)을 접종하여

urushiol을 제거하였다. 위의 방법은 최 등 [4]에 의해 보고되었으며, 옷나무 추출물에 장수버섯 접종이 구름버섯(*Trametes versicolor*) 접종 보다 뛰어난 laccase 활성을 보였으며, 옷나무 중 urushiol을 154.15 mg/100g에서 10.73 mg/100g로 제거하였다고 보고되었으나, urushiol 독성의 감소에 국한하여 보고되었던 연구결과로 그에 따른 생리 활성에 대한 시험을 실시한 보고는 없다.

따라서 본 실험에서는 옷나무의 풍부한 플라보노이드의 이용 및 추출을 위해 장수버섯(*Fomitella fraxinea*)을 접종하여 발효시킨 옷나무 추출물(FRVE)을 시험에 사용하였으며, FRVE의 생리활성을 알아보고자 항암활성, 항산화 그리고 항염증 작용에 대한 시험을 실시하였다. 또한 FRVE의 산업적 응용을 위하여 단회 경구 투여 독성시험을 실시하였다.

MTT법을 이용한 FRVE의 항암활성 정도를 측정된 결과, 양성 대조군으로 사용되어진 DOXO와 FRVE의 IC<sub>50</sub> 값은 각각  $6.29 \pm 2.83 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.23 \pm 0.25 \text{ mg/mL}$ 로 FRVE는 doxorubicin의 그것에 약 4% 수준의 항암활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. Lee 등 [13]의 연구에서 옷나무의 크로로포름-메탄을 분획 추출물 50  $\mu\text{g/mL}$ 이 사람 B 세포구 림프종 세포인 BJAB 세포에서 10.4%의 항암활성을 가짐이 보고되었으며, 본 시험의 FRVE의 항

암활성은 Sarcoma 180세포에 대하여 0.03 mg/mL 농도에서 37.29%의 항암 활성능을 나타내었다. FRVE는 Lee 등[13]이 보고한 항암 활성능의 약 3.7배로 상대적으로 높은 항암 활성능을 나타내고 있으며 이러한 차이는 암세포주에 따른 항암 활성능의 차이점, 크로로포름-메탄올의 독성에 대한 세포독성과 분획 및 추출 방법에 따른 구성 성분의 차이점 등에 의한 영향 등으로 사료된다.

또한 FRVE에 대한 항산화 활성을 측정하고자, xanthine oxidase 저해 활성을 측정한 결과, 대조군으로 사용되어진 A. acid의 1 mg/mL와 FRVE의 15 mg/mL의 xanthine oxidase의 저해 활성은 각각  $98 \pm 10.12\%$  그리고  $99 \pm 16.02\%$ 로 유사한 항산화 효과를 나타내었다. FRVE의 여러 희석 농도들 중 1.5 mg/mL와 15 mg/mL에서 각각  $85 \pm 15.01$  그리고  $99 \pm 16.02\%$ 로 유의적인 항산화능을 보였다 ( $p < 0.05$ ). 상백피(*Morus alba* L.)의 열수추출물과 에탄올 추출물 500  $\mu$ g/mL에서 항산화능이 각각 40.4%, 62.8% [7]인 반면, FRVE의 경우 0.15 mg/mL에서  $30 \pm 23.12\%$ 의 xanthine oxidase 저해활성을 나타내었음을 비교하여 볼 때, FRVE의 높은 항산화 효과를 확인 할 수 있었다. Geetha 등 [21]은 *Swietenia mahagoni*의 씨앗에서 높은 항산화 효과를 발견하였으며, 폐놀계 물질 중 플라보노이드로 인한 것으로 보고하였으나 정확한 구성성분의 분석은 미흡한 실정이다. 따라서 본 시험 또한 항산화 효과를 가지는 폐놀계 물질의 분석을 위하여 High Performance Thin Layer Chromatography, High performance liquid Chromatography, Gas Chromatography 등을 이용한 추가적인 시험이 필요하다고 사료된다.

Lee 등 [14]의 연구결과에서 류미티스성 관절염으로부터 얻은 세포로부터 염증관련 cytokine인 IL-6, IL-8 및 chemokine 수준을 PCR을 이용하여 측정한 결과, 열수추출 후 n-hexane으로 추출한 옷나무 추출물이 항염증 활성을 가지고 있다는 것이 밝혀졌으며, 이를 토대로 본 시험은 RAW 264.7 세포주를 이용한 NO 생성 측정을 통해 항염증 활성을 알아보려고 하였다. 그 결과 FRVE의 3 mg/mL 농도에서 유의적인 항염증 효과가 입증되었으며, Jung 등 [8]의 연구결과에서 옷나무 추출물 중 폐놀계 분획물이 25 g/mL 이상의 농도에서 유의적인 항염증 효과를 가짐과 비교하여 볼 때, FRVE의 항염증 작용 또한 폐놀계 물질의 작용에 기인된 것으로 사료되며 이러한 폐놀계 분획물의 획득은 효율적인 항염증 작용을 기대하는 기능성 식품 또는 의약품으로의 이용을 가능케 할 것이다.

위와 같은 생리활성이 풍부한 FRVE추출물의 사용 및 응용에 앞서 독성에 대한 안전성을 확인하기 위해 단회 경구 독성시험을 실시하였다. 그 결과 FRVE 0, 625, 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg 농도 투여군에서 시험기간 동

안 시험물질에 의한 사망은 관찰되지 않았으며, 시험물질에 의한 독성증상과 특이적 임상증상도 나타나지 않았다. 또한, 체중, 사료 섭취량 및 음수량은 정상적으로 증가하였고, 장기의 무게 또한 Lee 등 [15]의 뱀장어로부터 분리된 *Lactobacillus pentosus* PL11의 배양액에 대한 단회 경구독성 시험과 일치하였다. 따라서 FRVE의 LD<sub>50</sub>는 5,000 mg/kg 이상으로 볼 수 있으며, 한약재로 널리 이용되어진 *Balbusae caulis* [22]의 LD<sub>50</sub> 또한 5,000 mg/kg 이상이였음과 비교하여 볼 때, FRVE의 사용은 안전한 추출물로 산업적 응용이 가능할 것으로 생각된다. 한방 첨가물로 인한 *Campylobacter jejuni* 방제효과 [10]와 혼합 식물 추출물 및 한방 발효물의 사료첨가로 인한 육계의 체중증가 증례 [9]를 바탕으로, FRVE를 이용한 생리활성 효과를 기대하는 사료 및 소재의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서는 기능성 소재의 개발을 위하여 발효 옷나무 추출물(FRVE)에 대한 생리활성 및 안전성 시험을 실시한 결과 FRVE에 대한 항암, 항산화 및 항염증 활성을 확인하였으며, 또한 단회 경구 독성시험에서 안전성이 확인되어 동물용 사료 첨가제 및 기능성 식품 개발에 응용이 가능할 것으로 판단된다.

## 결 론

장수버섯으로 발효시킨 옷나무 추출물(FRVE)에 대한 생리활성 소재를 확보하고자 항암활성, 항산화, 항염증 작용 그리고 단회 경구 투여 독성시험을 실시하였다. MTT법에 의한 FRVE의 항암활성을 측정한 결과, FRVE는 농도-의존적으로 항암활성이 증가하였으며, IC<sub>50</sub> 값은  $0.23 \pm 0.25$  mg/mL를 보였다. 항산화 측정을 위하여 xanthine oxidase 저해 활성을 측정한 결과, FRVE의 1.5 mg/mL과 15 mg/mL 농도에서 각각  $85 \pm 15.01\%$ ,  $99 \pm 16.02\%$ 로 xanthine oxidase 저해하여 유의적인 항산화 효과를 보였다( $p < 0.05$ ). RAW 264.7 세포주에서 NO 생성을 측정한 결과, FRVE 3 mg/mL 농도에서 유의적인 NO 생성을 보였다( $p < 0.05$ ). FRVE의 안전성을 입증하고자 랫드에서 단회 경구 독성시험 결과, 5,000 mg/kg 투여군에서 사망이 관찰되지 않았다. 따라서 FRVE는 안전한 동물사료첨가제 및 안전한 기능성 식품 개발에 응용이 가능한 소재로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국산업단지공단의 추진단특성화사업과 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것으로, 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 식품의약품안전청. 의약품등의 독성시험기준. 식품의약품 안전청고시 제 1999-61호. 식품의약품안전청, 서울, 1999.
2. **Ahn EM, Park SJ, Choi WC, Choi SH, Baek NI.** Antioxidant activity of isolated compounds from the heartwoods of *Rhus verniciflua*. J Korean Soc Appl Biol Chem 2007, **50**, 358-361.
3. **Begona CA, Laszlo GB, Silvia M, Joan B, Carles CM, Josep JC, Josep LT, Neus A, Sara B, Marta C.** Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly (ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. J Biol Chem 2002, **277**, 46408-46414.
4. **Choi HS, Kim MK, Park HS, Yun SE, Mun SP, Kim JS, Sapkota K, Kim S, Kim TY, Kim SJ.** Biological detoxification of Lacquer Tree (*Rhus verniciflua* stokes) stem bark by mushroom species. Food Sci Biotechnol 2007, **16**, 935-942.
5. **Choi WY, Park KY.** Anticancer effects of organic Chinese cabbage kimchi. J Food Sci Nutr 1999, **4**, 113-116.
6. **Heo BG, Park YS, Yoo YK, Han TH, Park YJ, Sin JS, Cho JY.** *In vitro* assay on biological characteristics of different extracts from *Acorus calamus* L. var *angustatus*. Flower Res 2008, **16**, 168-173.
7. **Jee SO.** Antioxidant activities and whitening effect of the mulberry (*Morus alba* L.) root bark extracts. Korean J Plant Res 2009, **22**, 145-151.
8. **Jung CH, Kim JH, Hong MH, Seog HM, Oh SH, Lee PJ, Kim GJ, Kim HM, Um JY, Ko SG.** Phenolic-rich fraction from *Rhus verniciflua* stokes (RVS) suppress inflammatory response via NF-B and JNK pathway in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. J Ethnopharmacol 2007, **110**, 490-497.
9. **Kim DW, Kim SH, Yu DJ, Kang GH, Kim JH, Kang HG, Jang BG, Na JC, Suh OS, Jang IS, Lee KH.** Effects of single or mixed supplements of plant extract, fermented medicinal plants and *Lactobacillus* on growth performance in Broilers. Korean J Poult Sci 2007, **34**, 187-196.
10. **Kim GS, Jung TS, Shin GW, Han DY, Cha HJ, Kim YH.** Antimicrobial activity and preventive effect of oriental herbal medicine feed additives for *Campylobacter jejuni* in Korean native chickens. J Vet Clin 2006, **23**, 41-49.
11. **Kim SY, Chung MA, Song DU, Shin JH, Chay KO, Jung YD, Yang SY, Ahn BW.** Effects of flavonoids on amyloid  $\beta$  peptide toxicity in PC12 cells. Kor J Gerontol 2001, **11**, 41-48.
12. **Lee JC.** Flavonoid fraction purified from *Rhus verniciflua* stokes actively inhibits cell growth via induction of apoptosis in mouse tumorigenic hepatocytes. Nat Prod Sci 2004, **10**, 74-79.
13. **Lee JC, Lee KY, Kim J, Na CS, Jung NC, Chung GH, Jang YS.** Extract from *Rhus verniciflua* stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. Food Chem Toxicol 2004, **42**, 1383-1388.
14. **Lee JD, Huh JE, Jeon GS, Yang HR, Woo HS, Choi DY, Park DS.** Flavonol-rich RVHxR from *Rhus verniciflua* stokes and its major compound fisetin inhibits inflammation-related cytokines and angiogenic factor in rheumatoid arthritic fibroblast-like synovial cells and *in vivo* models. Int Immunopharmacol 2009, **9**, 268-276.
15. **Lee JS, Jang SH, Choi MJ, Gebru E, Park SC.** Pathogenicity of *Lactobacillus pentosus* PL11 isolated from eel (*Anguilla japonica*) intestine and single oral toxicity of its culture broth in rats. Korean J Vet Res 2009, **49**, 335-343.
16. **Lee YS, Ahn DS, Joo EY, Kim NW.** Antioxidative activities of *Syneilesis palmata* extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 2009, **38**, 1471-1477.
17. **Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev 2000, **52**, 673-751.
18. **Moon TC, Park JO, Chung KW, Son KH, Kim HP, Kang SS, Chang HW, Chung KC.** Anti-inflammatory activity of the flavonoid components of *Lonicera japonica*. Yakhak Hoeji 1999, **43**, 117-123.
19. **Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).** OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Revised Draft Guideline 420. OECD, paris, 2001.
20. **Park JM, Shin JH, Bak DJ, Lee DW, Jeon WM, Song JC, Sunwoo SY, Lyoo YS, Kim JM.** The effect of dietary fermented soybean on the growth performance and meat quality of pigs. Korean J Food Sci Ani Resour 2009, **29**, 296-301.
21. **Saghal G, Ramanathan S, Sasidharan S, Mordi MN, Ismail S, Mansor SM.** *In vitro* antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of methanolic



- Swietenia mahagoni* seed extracts. *Molecules* 2009, **14**, 4476-4485.
22. **Shin DH, Shin JY, Kim SH, Kim JH, Chung HJ, Kim JC.** Single oral dose toxicity study of *Balbusae caulis* in Taeniam in rats. *J Toxicol Pub Health* 2004, **20**, 325-328.
23. **Yoon TJ, Yang WS, Park SM, Jung HY, Lee AN, Jung JH, Kang TB, Yoo YC, Kim JB.** *In vivo* toxicity and immunoadjuvant activity of Korean Mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract fermented with Lactobacillus. *Korean J Food Sci Technol* 2009, **41**, 560-565.