

## 비타민 나무 Seed 추출물의 항산화 활성 및 항염증에 관한 연구

윤미연\*

# A Study on Anti-oxidant Activity and Anti-inflammatory Action of Sea Buckthorn Seed Extract

Mi Yun Yoon\*

접수: 2013년 9월 5일 / 게재승인: 2013년 10월 26일  
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** This study aimed to observe the effects of Sea Buckthorn seed extracts (SEB) on anti-oxidation and anti-inflammation. SEB were found to strongly depress ROS production depending on concentration, and 46.5% anti-oxidation effects were found in the top concentration of 100 µg/mL. Histamine and arachidonic acid release were measured to observe the effects of SEB on anti-inflammation. SEB inhibited histamine release and arachidonic acid release on dose dependent manner. Based on the results above, the conclusion is drawn that SEB have the potential to be used as natural materials that are effective for anti-oxidation and anti-inflammation.

**Keywords:** Sea buckthorn, Anti-oxidant, ROS, Histamine, Arachidonic acid

### 1. 서론

인체의 노화와 질병 유발 및 합병증으로 건강에 유해한 작용을 일으키는 주요 원인으로 알려진 활성산소는 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen 등 다양하며 [1,2], 정상적인 세포는 이러한 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)에 끊임없이 대항하며 산화적 스트레스를 입게 된다 [3]. 일반적으로 활성산소를 억제시키는 항

산화제는 superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase 등의 효소계열의 항산화제와 phenolic 화합물, flavone 유도체, ascorbic acid, carotenoids, glutathione 등의 천연 항산화제, butylated hydroxyanisole (BHA)와 butylated hydroxytoluene (BHT), PG (propyl gallate) 등의 합성 항산화제가 널리 알려져 있다 [4]. 오늘날 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 노화 억제를 위한 항산화물질에 대한 관심이 고조되면서 활성산소를 방어하는 항산화물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며 [5], 특히 인체에 부작용이 적은 천연식물을 이용한 항산화 물질에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는 실정이다 [6,7].

염증 (inflammation)은 물리적인 충격이나 화학물질, 세균 감염 등의 자극에 대항하는 인체방어기전이며, 지속적인 염증반응은 통증, 부종, 발적, 발열 등을 일으켜 기능장애를 유발한다 [8,9]. 염증반응으로 인해 나타나는 피부증상으로는 아토피성 피부나 여드름성 피부가 대표적이다. 그 중 아토피성 피부염은 다양한 사이토카인 (IL-4, CCL27)분비, IgE의 증가, 조직내 세포의 침윤 (CD4+, CD25+, 호산구, 또는 비만세포 등)과 연관되어 있는 대표적인 알러지성 질환이다 [10]. 아토피를 비롯하여 대부분의 피부염증의 초기 증상은 비만세포 (Mast cell)에서 분비되는 히스타민 (Histamine)에 의해 일어나며 히스타민에 의해 나타나는 증상들을 치료하기 위해서는 항히스타민 계열의 약물을 사용하는 것이 일반적이다 [11]. 히스타민은 비만세포의 탈 과립에 의해 분비되는 물질 중에서 가장 잘 알려져 있고 즉시형 과민 반응을 일으키는 중요한 인자이다 [12]. 지금까지 개발된 합성 항염증제는 스테로이드와 비스테로이드로 나누어지며, 이들은 위장, 신장 및 심장질환 등의 부작용이 나타날 수 있다 [13]. 따라서 보다 안전하고 효과적인 천연 유래 항염증제의 개발이 활발

동남보건대학교 피부미용과  
Department of Cosmetology, Dongnam Health College, Suwon 440-714, Korea  
Tel: +82-31-249-6576, Fax: +82-31-249-6570  
e-mail: ymy@dongnam.ac.kr

하게 이루어지고 있다.

비타민 나무는 (*Hippophae rhamnoides* L.)는 유럽과 러시아, 캐나다, 중국, 몽골 등에서 폭넓게 재배되고 있는 낙엽관목이다 [14]. 한국과 북한에서는 비타민 나무 또는 산자나무로 알려져 있으며 내한성이 매우 강한 식물로서 가뭄과 한발에서도 잘 자란다 [15]. 중국에서는 Saji로 불리며 1~3년생은 한해 90~150 cm까지 성장하며 암수가 다른 자웅이주이며 은회색의 피침형 잎이 호생하고 열매는 4월과 10월경에 수확한다 [16]. 비타민 나무는 씨앗, 나무 (pulp), 열매 등에 190종 이상의 성분을 포함하고 있으며 비타민 성분 (A, K, E), 22종의 지방산, 42종의 지질 (Lipid), 유기산, 아미노산, 비타민 C, B1, B2, 폴릭산 (Folic acid), 토코페롤, 페놀, 탄닌 등과 20종의 탄수화물 등을 포함하고 있다 [17]. 최근 국내에서 비타민 나무의 열매, 잎을 활용한 식품재료 및 다양한 기능성 물질로 활용 가능성이 커지고 있으며 재배가 활성화되고 있다.

따라서 본 연구에서는 다양한 약리효과가 있는 비타민 나무 중 연구가 미비한 seed 추출물이 항산화 및 항염증에 미치는 영향을 관찰함으로써 추후 항염증, 항산화와 관련된 기능성 화장품의 원료로서의 활용방안을 모색하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Molecular Probe Co., (Eugene, OR, USA) 에서 구입하였다. RAW 264.7 세포, RBL 2H3 세포는 서울대학교 세포주 은행으로부터 구입하였다.

### 2.2. 실험 재료

비타민 나무 seed 건조물을 분말화 하여 95% 주정 (EtOH, EP grade)으로 72시간 상온에서 추출하는 것을 2회 반복하였다. 추출을 통해 얻어진 상층액을 3M filter paper를 이용하여 정제하고, 정제된 추출물을 Rotary evaporator를 이용하여 농축한 뒤 Heating block을 이용하여 남아있는 EtOH를 모두 날리고 최종 Extracts를 얻어 시료로 사용하였다.

$$\begin{aligned} \text{수득률} &= (\text{Extracts 무게} / \text{Seed 분말의 무게}) \times 100 \\ &= (0.553 \text{ g} / 4.0327 \text{ g}) \times 100 = 13.713\% \end{aligned}$$

### 2.3. 세포배양

RAW 264.7 세포, RBL 2H3 세포는 10% fetal bovine과 penicillin/streptomycin (100 IU/50 µg/mL)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 용액으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 2.4. MTT를 이용한 세포독성 측정

비타민 나무 seed 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 MTT

(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 하였다. 세포주는 RAW 264.7 세포를 사용하였으며, 96 well plate에 well 당 1×10<sup>4</sup>의 세포수로 분주하고 각각의 시료를 농도별로 가한 후 48시간 동안 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 48시간 후 배양 용액을 버리고, Krebs 용액 (mM: NaCl 137, KCl 2.7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4, MgCl<sub>2</sub> 0.5, HEPES [pH 7.4] 10, CaCl<sub>2</sub> 1.8, glucose 5)에 녹인 MTT 용액 500 µg/mL을 각 well에 200 µL씩 가하고 어두운 곳에서 4시간 배양 후 상층액을 버리고, DMSO를 각 well에 200 µL를 가하여 MTT formazan을 용해시켰다. 실온에서 15분간 MTT formazan을 완전히 용해 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.5. Reactive oxygen species (ROS) 측정

RAW 264.7 세포를 15 mL의 Krebs 용액 (mM:NaCl 137, KCl 2.7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4, MgCl<sub>2</sub> 0.5, HEPES [pH 7.4] 10, CaCl<sub>2</sub> 1.8, glucose 5)에 suspend시킨 후 20 M DCF-DA를 가하고 1시간 빛을 차단한 곳에서 배양하였다. DCF-DA가 없는 Krebs 용액으로 한번 세척한 후 10 cell/mL로 분주하고 비타민 나무 seed 추출물을 전처리하고 1 mg/mL silica를 처리한 후 1시간 배양하였다. 원심분리 후 세포를 200 µL의 Krebs 용액에 분산시킨 후 형광 (EX: 485 nm; Em: 535 nm)을 측정하였다.

### 2.6. Histamine release 측정

RBL 2H3 세포를 10<sup>6</sup> cells/mL로 분주하고 시료를 10분간 전처리한 후 0.5 µM melittin을 처리하여 30분간 histamine을 유리시켰다. 반응이 끝난 후 원심 분리하여 상층액과 세포를 분리하고 세포는 초음파 분쇄기로 파괴시킨 후 각각 증류수를 가하여 최종 부피가 2 mL가 되게 조절하였다. 각 튜브에 1 N NaOH 0.4 mL, 1% OPT (o-phthaldialdehyde, 10 mg/mL in absolute methanol) 0.1 mL를 가하여 잘 혼합한 후 실온에서 4분 이상 배양하고 3 N HCl 0.2 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 96 well microplate 에 200 µL씩 소분하여 형광측정 (Ex. 355 nm / Em. 455 nm)하였다. 상층액에 있는 histamine의 양을 유리된 histamine 양으로 간주하였다.

### 2.7. Arachidonic acid 활성 측정

RBL 2H3 세포를 10% FBS이 함유된 DMEM에서 충분히 배양한 후에 24 well plate를 이용하여 10<sup>5</sup> cell/wells로 분주하였다. FBS가 없는 DMEM에 [<sup>3</sup>H]Arachidonic acid (0.4 µCi/mL)를 가하여 24시간 동안 labeling 하였다. Labeling이 끝난 후 serum-free DMEM으로 washing하여 labeling 되지 않은 [<sup>3</sup>H]Arachidonic acid를 제거하였다. 여기에 다시 serum-free DMEM을 1 mL 가하고 각각의 시료를 전처리한 후 1 µM melittin을 처리하여 30분간 Arachidonic acid를 유리시켰다. 상층액을 취하여 원심분리하고 세포가 없는 상층액 500 µL를 취해 액체 섬광계수기로 radioactivity를 측정하였다.

### 2.8. 자료분석 및 통계적 검정

실험 결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 실험 성적은

non-paired Student's t-test로 검정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 세포독성 측정

식물 추출물에 의한 세포 생존율에 관한 선행 연구를 보면 맨드라미 추출물의 경우에는 100 µg/mL 농도에서 89.5%의 생존율을 나타내었으며 [18], 질경이 추출물 100 µg/mL 농도에서 81.8%의 생존율을 나타내어 [19] 화장품 및 원료 개발에 있어서 유효한 물질의 가능성을 시사하였다. 비타민 나무 seed 추출물이 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정하였다. RAW 264.7 cell에 비타민 나무 seed 추출물 1, 3, 10, 30, 100 µg/mL 농도로 처리하여 관찰한 결과 비타민 나무 seed 추출물은 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았으며 (Fig. 1), 100 µg/mL 농도에서 99.2%의 강한 세포생존율을 나타냄으로써 인체에 적용하였을 때 안전성에 있어 매우 효과적인 물질이라 사료된다.

#### 3.2. RAW 264.7 세포에서 reactive oxygen species (ROS) 소거 활성

DCF-DA 형광물질을 이용하여 세포내에서 생성되는 hydrogen peroxide를 측정하였다. ROS는 산소의 환원 대사물로서 산소를 필요로 하는 정상 세포 내 대사 과정이나 세포질 내 효소 작용에 의해 내부로부터 형성되거나 다양한 외부 요소에 의해 형성된다. 세포들은 ROS의 축적과 손상에 대항하기 위해 항산화 방어기전을 갖추고 있는데, ROS 발생이 세포의 항산화 능력을 초과하는 경우 산화적 스트레스에 노출된다 [20]. 실험에서 stimulant로 사용한 silica는 macrophage에서 뿐만 아니라 fibroblast에서도 reactive oxygen species를 생성하는 물질로 알려져 있다 [21]. Silica에 의해 생성된 ROS의 억제효과를 관찰한 결과 비타민 나무 Seed 추출물은 농도 의존적으로 ROS 생성을 강하게 억제하였으며 최고 농도인

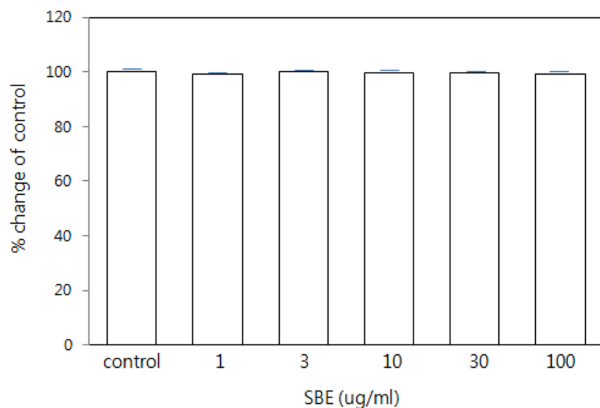


Fig. 1. The cytotoxicity of Sea Buckthorn seed extract. Results are means±SD from 4 separate experiments.

100 µg/mL에서는 46.5%의 항산화 작용을 나타내었다 (Fig. 2). 이것은 비타민나무 잎 추출물, 즉 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 모두 비교 물질인 강력한 수용성 항산화제인 비타민 C인 ascorbic acid보다도 훨씬 강한 항산화능을 나타낸 연구결과 [22]와 유사하며, 이러한 결과로 볼 때 비타민 나무 seed 추출물의 강한 항산화능은 화장품 응용에 어려움이 있는 수용성 비타민 C를 대신하여 화장품에 응용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

#### 3.3. Histamine release 활성

알레르기 반응은 만성 염증성 질환의 원인세포로 지목되는 호염구 및 비만세포는 알레르기원과 면역복합체를 이룬 IgE가 세포막의 Fc-ε 수용체와 결합하여 histamine을 분비하여 염증반응을 유도하게 된다. 따라서 histamine의 정량은 이들 세포에서 탈 과립의 지표이기 때문에 알레르기 억제물질의 생물활성 측정에 유용하게 사용되고 있다 [23]. 호염구 세포주인 RBL 2H3 세포에 melittin 이용하여 histamine을 유도하여 정량한 결과 비타민 나무 seed 추출물은 농도 의존적으로 histamine 유리를 억제하는 경향을 나타내었으며 최고농도인 100 µg/mL에서는 35.8% 억제하였다 (Fig. 3). 따라서 생활환경, 식생활의 변화로 인해 알레르기원에 지속적으로 자극되어지는 현대인에게 부작용이 많은 스테로이드제가 아닌 천연물질로 피부에 나타나는 알레르기성 질환을 호전시킬 수 있는 소재로서 비타민 나무 Seed 추출물의 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

#### 3.4. Arachidonic acid(AA) release 활성

Histamine과 더불어 염증매개물질로 알려진 arachidonic acid에 장기간 자극받게 되면 기관지 천식, 아토피성 피부염과 같은 만성적인 알레르기 상태를 반영하게 된다. 가장 일반적으로 사용되고 있는 비타민 나무의 제품으로는 열매 및 종자로부터 추출한 오일류가 대부분이며, 중국, 러시아, 몽골 등에서는 민간요법으로 구내염 (Oral mucositis), 질염 (vaginal mucositis) 등의 염증성 질환에 다양하게 사용되어왔다 [24]. 이같이 항염증 작용이 있는 것으로 알려진 비타민 나무의

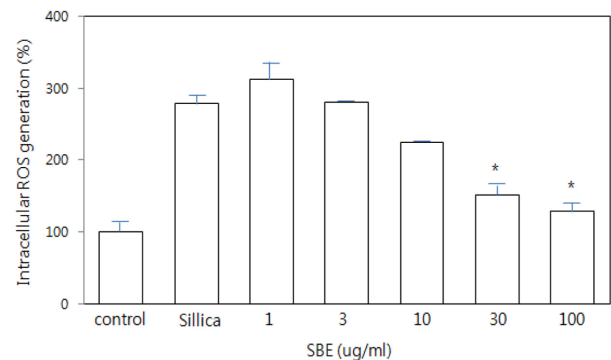
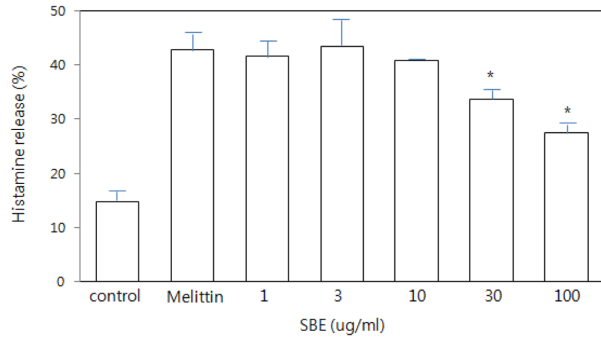
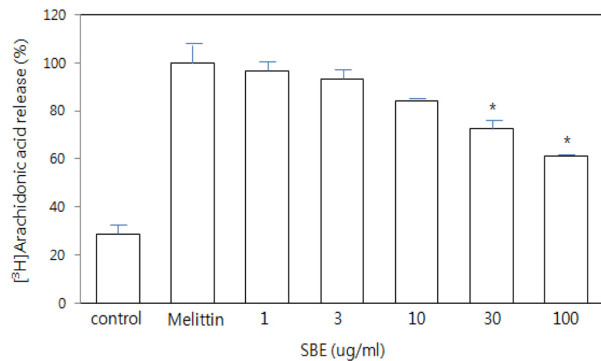


Fig. 2. Effects of Sea Buckthorn seed extract on ROS generation in RAW 264.7 cells. Data were expressed as % change of silica. Results are means±SD from 4 separate experiments.



**Fig. 3.** Effects of Eea Buckthorn seed extract on Histamine release in RBL 2H3 cells. Results are means $\pm$ SD from 4 separate experiments.



**Fig. 4.** Effects of Sea Buckthorn seed extract on [3H]AA release in RBL 2H3 cells. Results are means $\pm$ SD from 4 separate experiments.

seed 추출물이 염증매개체인 arachidonic acid의 유리를 어느 정도 억제하는지 알아보기 위해 arachidonic acid를 labeling 시킨 RBL 2H3 세포에서 melittin에 의한 arachidonic acid에 미치는 영향을 관찰하였다. 비타민 나무 seed 추출물은 melittin에 의한 arachidonic acid의 유리를 농도 의존적으로 억제하는 경향을 나타내었으며 30, 100  $\mu$ g/mL 농도에서 유의하게 억제하였다 (Fig. 4). 이러한 결과로 볼 때 비타민 나무 seed 추출물이 피부에 나타나는 염증반응을 완화시켜주고 인체에 부작용이 없는 화장품 소재로의 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다.

#### 4. 결론

본 연구는 다양한 약리효과가 있는 비타민 나무 중 seed 추출물이 항산화 및 항염증에 미치는 영향을 관찰함으로써 추후 항염증, 항산화에 관련된 기능성 화장품의 원료로써의 활용 방안을 모색하고자 하였다. 연구의 결과는 다음과 같다. RAW 264.7 세포를 이용하여 세포독성 실험을 실시한 결과 비타민 나무 seed 추출물은 모든 농도에서 이렇다 할 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 적용된 농도 범위 내에서는

피부에 적용하였을 때 안전한 물질이라 사료된다. 비타민 나무 Seed 추출물의 항산화 작용을 알아보기 위하여 세포내에서 생성되는 hydrogen peroxide을 DCF-DA 형광물질을 이용하여 ROS를 측정하였다. silica에 의해 생성된 ROS의 억제 효과를 관찰한 결과 비타민 나무 Seed 추출물은 농도 의존적으로 ROS 생성을 강하게 억제하였으며 최고 농도인 100  $\mu$ g/mL에서는 46.5%의 항산화 작용을 나타내었다. 비타민 나무 seed 추출물의 항염증에 미치는 영향을 관찰하기 위해 histamine과 arachidonic acid release를 측정하였다. 비타민 나무 seed 추출물은 melittin에 의해 유리된 histamine을 농도 의존적으로 억제하였으며, arachidonic acid 유리도 적용 농도에 따라 억제하였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 비타민 나무 seed 추출물이 화장품 소재개발에 있어서 항산화와 항염증에 관련된 천연물로서 효과적으로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

#### REFERENCES

1. Droge, W. (2001) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 47: 82-95.
2. Halliwell, B., R. Aeschbach, J. Loliger, and O. I. Aruoma (1995) The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* 33: 601-617.
3. Baynes, J. W. (1991) Role of oxidative stress in the development of complication in diabetes. *Diabetes.* 40: 405-421.
4. Shin, Y. S., J. E. Lee, I. K. Yeon, H. W. Do, J. D. Cheung, C. K. Kang, S. Y., Choi, S. J. Youn, J. G. Cho, and D. J. Kwoen (2008) Antioxidant and antimicrobial effect with water and ethanol of oriental melon (*Cucumismelo L. vrmakuwaMakino*). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 51: 194-199.
5. Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, and G. Paganga (1997) Antioxidant propeties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2: 152-159.
6. Kwon, J. W., E. J. Lee, Y. C. Kim, H. S. Lee, and T. O. Kwon (2008) Screening of antioxidant activity from medicinal plant extracts. *Korean J. Pharmacogn.* 39: 155-163.
7. Han, J. H., J. H. Kim, S. G. Kim, S. H. Jung, D. H. Kim, G. E. Kim, and W. K. Whang (2007) Anti-oxidative compounds from the aerial parts of *Atractylodes macrocephala koidzumi*. *Yakhak Hoeji.* 51: 88-95.
8. Jew, S. S., O. N. Bae, and J. H. Chung (2003) Anti-inflammatory effects of asiaticoside on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 cell line. *J. Toxicol. Pub. Health.* 19: 33-37.
9. Ljung, T., S. Lundberg, M. Varsanyi, C. Johansson, P. T. Schmidt, M. Herulf, J. O. Lundberg, and P.M. Hellstrom (2006) Rectal nitric oxide as biomaker in the treatment of inflammatory bowel disease: responders versus non-responders. *World J. Gastroenterol.* 12: 3386-3392.
10. Homey, B., M. Steinhoff, T. Ruzicka, and D. Y. Leung (2006) Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118: 178-189.

11. Assanasen, P. and R. M. Naclerio (2000) Antiallergic effects of H1-receptor antagonists. *Allergy*. 55. 64: 17-27.
12. Moon, P. D., H. J. Na, and H. M. Kim (2003) Action of enzyme food, green life enzyme of systemic and local ana-phylaxis. *Orient Pharm. Exp. Med.* 3: 46-50.
13. Dong, J. M., J. Hanson, C. Supuran, and D. Pratio (2006) Coxibs and cardiovascular side-effect: from light to shadow. *Curr. Pharm. Des.* 12: 917-975.
14. Kim, J. E., K. Y. Chae, and S. N. Park (2011) Antioxidative and inhibitory activities on tyrosinase of *Hippophae rhamnoides* leaf extracts. *J. Soc. cosmet.* 37: 265-273.
15. Kim, K. M., M. H. Park, K. H. Kim, S. H. Im, Y. H. Park, and Y. N. Kim (2009) Analysis of chemical composition and *in vitro* antioxidant properties of extracts from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). *J. Appl. Biol. Chem.* 52: 58-64.
16. Rousi, A. (1971) The genus *Hippophae L.A* taxonomic study. *Ann. Bot. Fenn.* 8: 177-227.
17. Lee, S. A., H. K. Jo, S. H. Cho, and S. K. Ko (2010) Comparison of the contents of phenolic compounds of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) cultivated in Korea and Mongolia. *Kor. J. Pharmacogn.* 41: 308-312.
18. Pyo, Y. H., M. Y. Yoon, J. H. Son, and T. B. Choe (2008) The effect of *Celosia cristata L.* ethanol extract in anti-oxidant and anti-aging activity. *J. Biotechnol. Bioeng.* 23: 431-438.
19. Yoon, M. Y., E. H. Han, and Y. S. Han (2013) A study on anti-oxidant activity and whitening action of *Plantago asiatica L.* seed extract. *J. Kor. Soc. Beauty Art.* 14: 259-269.
20. Beckman, K. B. and B. N. Ames (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol. Reviews.* 78: 547-581.
21. Cho, Y. J., M. S. Seo, J. K. Kim, Y. Lim, G. Chae, K. S. Ha, and K. H. Lee (1999) Silica-induced generation of reactive oxygen species in Rat2 fibroblast: role in activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 262: 708-712.
22. Kim, J. E., K. Y. Chae, and S. N. Park (2011) Antioxidative and inhibitory activities on tyrosinase of *Hippophae rhamnoides* leaf extracts. *J. Soc. Cosmet.* 37: 265-273.
23. Lee, E., E. J. Choi, H. Cheong, Y. R. Kim, S. Y. Ryu, and K. M. Kim (1999) Anti-allergic actions of the leaves of *Castanea crenata* and isolation of an active component responsible for the inhibition of mast cell degranulation. *Arch. Pharm. Res.* 22: 320-323.
24. Bae, Y. J. (2009) *Functional properties of sea buckthorn and quality Characteristics of the Korean rice cake added with sea buckthorn leaf.* Ph.D. Thesis. University of Sejong, Seoul, Korea.