

## 천연약용식물의 활성산소종에 의한 산화적 손상의 보호 효과

이 시 은, 주 은 미, 김 정 희

경희대학교 치과대학 구강생화학교실

## Protective Effect of Natural Medicinal Plants against Oxidative Damage Induced by Reactive Oxygen Species

Si Eun Lee, Eun Mi Ju and Jeong Hee Kim

Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, KyungHee University,  
Seoul, 130-701, Korea

### ABSTRACT

In order to evaluate anti-oxidant activities and protective effect against oxidative damage, DPPH radical scavenging activity and lipid peroxidation inhibitory activity were measured among methanol extracts prepared from natural medicinal plants. Fourteen natural medicinal plants which were reported to have anti-oxidative or anti-inflammatory effects were selected based on our previous report. In addition to the total methanol extracts, n-hexane, dichloromethane, ethylacetate, n-butanol and water fractions were prepared from each total extract. DPPH radical scavenging assay was performed against 14 total extracts and all samples showed dose-dependent activities in various extent. Among those, 6 samples, methanol extracts of *Euryale ferox*, *Paeonia suffruticosa*, *Areca catechu* var. *dulcissima*, *Cinnamomum cassia*, *Alpinia katsumadai* and *Betula platyphylla* var. *japonica* showed IC<sub>50</sub> value lower than 6.0 µg/ml. The highest DPPH radical scavenging activity was found in ethylacetate fraction of *Paeonia suffruticosa* with IC<sub>50</sub> value of 1.1 µg/ml. Analysis of lipid peroxidation inhibitory activity on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in Chinese hamster lung fibroblast (V79-4) cells revealed that the highest inhibitory effect was observed in methanol extract of *Betula platyphylla* var. *japonica*. Lipid peroxidation inhibitory activity was observed as a dose-dependent manner in all samples used in this study. Among fraction samples, ethylacetate fraction of *Alpinia katsumadai* had the strongest inhibitory activity with IC<sub>50</sub> value of 0.9 µg/ml.

**Key words** : Natural medicinal plants, DPPH radical scavenging activity, Lipid peroxidation inhibitory activity

### 서 론

인체 등의 유산소 호흡을 하는 생명체는 세포 내에서의 호기성 물질 대사에 필요한 전자전달과정을 통해 에너지를 생성하고 이용할 수 있다. 생리적 조건에서 산소분자는 전자전달계를 거쳐 물

로 환원되지만, 상대적으로 높은 산소분압에서는 superoxide anion ( $O_2 \cdot^-$ ) 등의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 전자전달계의 부산물로서 생성된다. 그 외의 활성산소종으로는 산소가 전자를 받아 생기는 superoxide radical ( $O_2 \cdot$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )와 hydroxyl radical ( $OH \cdot$ ) 등이 있

다. 이들은 반응성이 매우 크며, 따라서 생체 내의 여러 물질과 반응할 수 있다. 활성산소종이 생체 내에서 일으키는 반응은 자동 산화 반응의 개시 및 지질의 과산화 반응 등을 초래하며, 이러한 반응을 통해 DNA strand breakage (Ward, 1994; Thomson, 1995), DNA 염기의 변형, 돌연변이, 발암, 노화 및 관절염 등의 원인이 된다. 특히 많은 양의 산소를 필요로 하고 있어 항상 산화적 스트레스의 조건에 노출되어 있다고 할 수 있는 뇌조직의 경우 과잉의 활성산소종이 뇌조직의 지질 과산화를 유도함으로써 세포막이 손상되어 파킨슨병 (Marttila *et al.*, 1988; Johannsen *et al.*, 1991), Alzheimer병 (Zelman *et al.*, 1988; Frlich and Riederer, 1995) 등과 같은 각종 뇌신경계 장애가 발생한다는 사실이 보고되고 있다. 따라서 이러한 질환의 원인이 되는 활성산소종을 소거하거나 그 작용을 억제하는 메카니즘을 활성화하는 약물 또는 물질을 개발하는 것은 그 중요도가 높다고 할 수 있다.

생체 내에는 자체적으로 활성산소종의 양을 조절하거나 활성산소종에 의한 손상의 방어에 관련된 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase 등의 여러 가지 효소들이 있다. 이러한 효소들의 활성을 증대시키는 물질 및 항산화 작용이 있는 물질을 이용하여 활성산소종에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호하고자 합성 화합물과 천연약용식물들에 대한 연구와 보고가 이어지고 있다. 천연약용식물은 부작용이 적으며, 자연에서 손쉽게 얻을 수 있고 음식물로도 섭취할 수 있는 등의 여러 가지 장점으로 인하여 각광을 받고 있다. 잘 알려져있는 천연물로서 항산화 및 항암 효과가 탁월한 Vit. C는 *in vivo*에서 방사선에 대한 방어 효과가 보고된 바 있다 (Narra *et al.*, 1993). 그리고, Vit. E와 ellagic acid가 rat liver nuclear DNA 내에서 활성산소종인 hydroxyl radical에 의해 생기는 매우 치명적인 간독성을 지닌 물질인 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG)의 형성을 억제하는 효과에 대한 보고가 있다 (Tagaki *et al.*, 1995). 또한 녹차 잎에서 추출한 polyphenol 화합물들 (Green tea polyphenols, GTPs)은 glutathione peroxidase, catalase 및 glutathione reductase 등의 활성을 증가시키며 (Khan *et al.*, 1992), superoxide radical과 hydroxyl radical에 대한 소거 활성이 있고 lipid peroxyl radical을 감소시켜 과산화

지질의 형성을 억제한다는 등의 항산화 작용에 대한 보고가 있으며 (Salah *et al.*, 1995), 또한 발암 물질인 benzo[a]pyrene (B[a]P)의 발암성 대사물질인 B[a]P-7,8-diol-9,10-epoxide-2를 소거하는 등의 항암작용이 보고된 바 있다 (Stoner and Mukhtar, 1995). 한편 Sugiyama 등은 카레의 주성분인 curcumin에 glutathione 함량과 glutathione-S-transferase의 활성을 증가시키고, 과산화지질과 8-OH-dG의 형성을 억제하는 등의 항산화 및 항암 작용이 있음을 보고하였다 (Sugiyama *et al.*, 1996; Bonte *et al.*, 1997). 그외에도  $\alpha$ -tocopherol, glutathione, melatonin 및 포도 껍질에 다량 함유된 resveratrol (Chanvitayapongs *et al.*, 1997) 등의 항산화 효과도 잘 알려져 있다.

최근에는 여러 난치성 질환의 치료제 개발에 있어서 천연물에서부터 약효를 검색하여 신약으로 개발하려는 노력이 활발하게 진행되고 있으며 (Pezzuto, 1997), 이에 부응하여 천연약용식물에서 항산화 작용을 보이는 후보 물질을 추출, 분리하려는 노력이 시도되고 있다. Mantle 등은 39종의 영국 약용식물에 대해 항산화 효과를 검토하여 보고하였고 (Mantle *et al.*, 2000), Park 등은 한방에서 쓰이는 신경 안정 생약 추출물이 신경 전달 효소 및 항산화계에 미치는 영향에 대해 연구하였으며 (Park *et al.*, 2000), 국내외적으로 인삼 추출물과 그 분획 (Takeda *et al.*, 1981; Cho *et al.*, 1995) 그리고 천연물 복합 제제 (Kim *et al.*, 1998)의 항산화 효과에 대한 다각적인 연구가 진행되고 있다. 그러나 천연약용식물의 종류는 매우 광범위하고, 그들의 항산화 작용 또한 복합적이며 다양하게 나타나므로 이에 대한 보다 체계적인 활성 검색이 요구되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 여러 가지 천연약용식물 중에서 기발표된 결과 (Kim *et al.*, 2000)를 토대로 선정한 14종의 천연약용식물의 메탄을 추출물과 분획시료에 대해 1차적으로 DPPH 자유기 소거 활성을 검색하여 그 효능이 인정되는 추출물과 분획을 선별하고 이들의 산화적 손상원인 과산화수소에 의해 유도된 세포막의 과산화지질 형성의 억제 활성에 대해 검토하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 약용식물 메탄올 추출물 및 분획의 제조

실험에 사용한 약용 식물은 감인 (*Euryale ferox*), 감초 (*Glycyrrhiza uralensis*), 단삼 (*Solvia miltiorrhiza*), 두충 (*Eucommia ulmoides*), 목단피 (*Paeonia suffruticosa*), 부평초 (*Spirodela polyrrhiza*), 빈랑자 (*Areca catechu* var. *dulcissima*), 산수유 (*Cornus officinalis*), 양강 (*Alpinia officinarum*), 연자육 (*Nelumbo nucifera*), 육계 (*Cinnamomum cassia*), 초두구 (*Alpinia katsumadai*), 토복령 (*Smilax china*), 화피 (*Betula platyphylla* var. *japonica*) 등 14종이며 경동시장에서 구입하여 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 먼저 구입한 약용식물을 잘게 분쇄한 후 둥근 플라스크에 약 100 g을 넣고 70% 메탄올로 80°C로 가열하여 환류하면서 3시간 이상 추출하였다. 이를 상온으로 온도를 낮추고 거름종이를 이용하여 추출액을 걸러 남은 시료를 다시 위와 같은 방법으로 1회 반복하여 추출하고 거름액을 합쳐서 rotary evaporator (Eyela, Japan)로 감압 농축하였다. 이를 증류수에 녹여 freezing dryer (Ilsin, Korea)를 이용하여 동결 건조시켜 분말로 만든 후 -70°C에 보관하였다. 분획은 n-hexane, dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), ethylacetate (EtOAc), n-butanol (BuOH)을 단계적으로 가하여 추출한 후 rotary evaporator로 용매를 증발시키고 DMSO에 100 µg/ml가 되도록 녹여 -70°C에 보관하였다. 본 연구에서는 이들을 세포배양배지 또는 PBS에 여러 가지 농도로 희석하여 사용하였다.

### 2. 세포배양

본 연구에서 사용한 세포주는 V79-4 (Chinese hamster lung fibroblast, ATCC CCL-93)이며 배양액으로는 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지 (Gibco, BRL, USA)에 5% FBS (BioWhittaker, USA), streptomycin/penicillin (Gibco, BRL, USA)과 2 mM L-glutamine을 넣고 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>/95% 공기의 조건하에 배양하였다.

### 3. DPPH 자유기 소거 활성 측정

Blosi의 방법 (Blosi, 1958)에 따라 1.5 × 10<sup>-4</sup> M DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma) 600

µl에 각 생약 추출물의 농도가 100, 20, 4 및 0.8 µg/ml가 되도록 각각 가한 후 methanol 용액을 가하여 최종 부피를 3 ml로 만들었다. 이를 vortex mixer (Scientific industries, USA)로 10초간 진탕하여 잘 섞은 후 520 nm에서 흡광도를 측정 (Ultraspec 2000 UV/Visible spectrometer, Pharmacia Biotech)하여 다음 식에 의해 DPPH 자유기의 소거 활성을 산정하였다.

Radical scavenging activity (%)

$$= \{(OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}}) / OD_{\text{control}}\} \times 100$$

각 시료의 항산화 작용은 IC<sub>50</sub> (DPPH 자유기 형성을 50%로 억제하는데 필요한 시료의 농도)값으로 나타내었다.

### 4. 과산화지질 억제 활성 측정

과산화지질 억제 활성을 측정하기 위하여 배양한 V79-4 세포에 각 생약 추출물의 농도가 100, 20 및 4 µg/ml가 되도록 가한 후 1시간 동안 배양하였다. 다음 산화적 스트레스를 일으키기 위하여 과산화수소의 농도가 1 mM 되도록 가한 후 다시 1시간 동안 배양하였다. 처리한 세포를 PBS로 잘 씻은 후 1.15% KCl 500 µl를 가하여 세포를 수확하고 microfuge tube로 옮긴 다음 4°C를 유지하면서 homogenization하여 사용하였다. 이 마쇄 균질액 100 µl에 Ohkawa 등의 방법 (Ohkawa et al., 1979)에 준해 8.1% SDS 200 µl, pH를 3.5로 조절한 20% acetic acid 1.5 ml 및 0.8% TBA 1.5 ml를 각각 가하고 증류수로 최종 부피가 4 ml 되도록 채웠다. 이 용액을 잘 섞은 후 95°C에서 2시간 동안 가열하여 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 착색 물질을 n-butanol : pyridine (15 : 1, v/v) 혼합액으로 추출하여 1,800 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 취해 532 nm에서 흡광도를 측정하고 과산화지질 억제 활성을 구하였다.

## 결 과

본 연구에서는 천연약용식물추출물의 1차적인 활성 검색을 위하여 총 14종의 천연약용식물의 메탄올 추출물과 각각의 5종의 용매 분획에 대하여 DPPH 자유기 소거 활성을 측정하였고 이들의

IC<sub>50</sub>값을 구하여 활성을 비교한 결과를 Table 1과 2에 수록하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 총 14종의 메탄올 추출물 중에서 특히 초두구와 빈랑자가 각각 IC<sub>50</sub>값이 1.6과 1.8 µg/ml로서 매우 높은 자유기 소거 활성을 나타내었다. 또한 화피, 육계, 감인 및 목단피 등도 2.4, 5.0, 5.6 및 5.9 µg/ml의 IC<sub>50</sub>값을 보여 높은 소거 활성을 나타내었다. 이와 같이 IC<sub>50</sub>값이 6.0 µg/ml 이하인 6종의 메탄올 추출물의 농도를 0.8 µg/ml에서 100 µg/ml 까지 변화시키면서 얻은 항산화 효과를 log-dose inhibition curve로 작성하여 Fig. 1에 도시하였다. 그 결과, 6종의 메탄올 추출물 모두 100 µg/ml를 가했을 때 가장 높은 자유기 소거 활성을 보임으로서 농도의존성을 나타내었다. 특히 감인과 목단피의 경우는 4 µg/ml를 가했을 때보다 20 µg/ml를 가했을 때 각각 37, 92%와 34, 83%로서 2배 이상의 증가된 소거 활성을 나타내었고, 빈랑자, 초두구 및 화피는 0.8 µg/ml를 가했을 때보다 4 µg/ml를 가했을 때 각각 28, 74%, 23, 85% 그리고 18, 65%로서 4배 이상의 증가된 소거 활성을 보였다. 또한 육계의 경우 가해진 농도가 0.8, 4, 20 µg/ml로 증가함에 따라 자유기 소거 활성은 각각 8.9, 40, 91%로서 5배와 2배 이상 높아지는 결과로 보아 농도의존성이 다른 추출물들에 비해 매우 크다는 것을 알 수 있었다. 한편 두충의 IC<sub>50</sub>은 89 µg/ml로서 대상 식물 중 가장 낮은 소거 활성을

보였다.

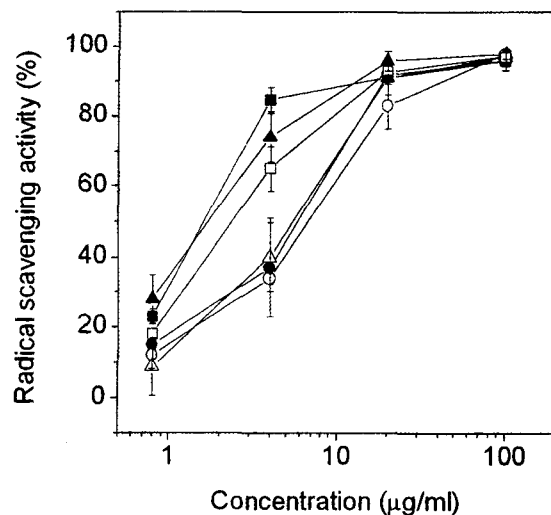
각각의 분획은 메탄올 추출물에 n-hexane, dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), ethyl acetate (EtOAc), n-butanol (BuOH)을 단계적으로 가하여 추출한 후 rotary evaporator로 용매를 증발시키고, n-butanol로 추출한 후에 남은 수층은 freezing dryer로 동결 건조 시켜 분말로 만든 후 DMSO에 녹여 제조하였다. 분획시료 중에서 가장 우수한 DPPH 자유기 소거 활성을 나타낸 시료는 Table 2에서 보는 바와 같이 목단피의 ethylacetate 분획 (1.1 µg/ml)이었고, 감인의 ethylacetate 분획 (1.5 µg/ml), 빈랑자의 dichloromethane (1.9 µg/ml), ethylacetate (1.2 µg/ml), 수층 분획 (1.8 µg/ml), 육계의 ethylacetate 분획 (1.6 µg/ml) 및 초두구의 ethylacetate (2.0 µg/ml), butanol (1.8 µg/ml), 수층 분획 (1.8 µg/ml) 등도 2.0 µg/ml 이하의 IC<sub>50</sub>값을 나타내어 높은 자유기 소거 활성을 보임을 알 수 있었다. 분획시료의 경우에도 가장 낮은 소거 활성을 나타낸 식물은 두충으로서 IC<sub>50</sub>은 모든 분획에서 20 µg/ml 이상의 값을 보였다.

세포막의 구성 성분인 인지질의 불포화 지방산은 자유기에 의해 과산화반응을 일으키며 이 때

**Table 1.** DPPH radical scavenging activity of methanol extracts of natural medicinal plants

| Natural medicinal plant                             | IC <sub>50</sub> (µg/mL) |
|---|--------------------------|
| <i>Euryale ferox</i> (감인)                           | 5.6 ± 1.7*               |
| <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (감초)                   | 48.8 ± 8.4               |
| <i>Solvia miltiorrhiza</i> (단삼)                     | 20.0 ± 2.8               |
| <i>Eucommia ulmoides</i> (두충)                       | 89.3 ± 9.7               |
| <i>Paeonia suffruticosa</i> (목단피)                   | 5.9 ± 0.2                |
| <i>Spirodela polyrrhiza</i> (부평초)                   | 11.0 ± 1.4               |
| <i>Areca catechu</i> var. <i>dulcissima</i> (빈랑자)   | 1.8 ± 0.4                |
| <i>Cornus officinalis</i> (산수유)                     | 18.8 ± 5.1               |
| <i>Alpinia officinarum</i> (양강)                     | 6.7 ± 0.4                |
| <i>Nelumbo nucifera</i> (연자육)                       | 12.3 ± 2.9               |
| <i>Cinnamomun cassia</i> (육계)                       | 5.0 ± 1.4                |
| <i>Alpinia katsumadai</i> (초두구)                     | 1.6 ± 0.1                |
| <i>Smilax china</i> (토복령)                           | 7.4 ± 1.6                |
| <i>Betula platyphylla</i> var. <i>japonica</i> (화피) | 2.4 ± 0.4                |

\* Data are represented as mean ± S.D.



**Fig. 1.** DPPH radical scavenging activity of methanol extract of natural medicinal plants. Data are represented as mean ± S.D. ● - *Euryale ferox*, ○ - *Paeonia suffruticosa*, ▲ - *Areca catechu* var. *dulcissima*, △ - *Cinnamomun cassia*, ■ - *Alpinia katsumadai*, □ - *Betula platyphylla* var. *japonica*.

**Table 2.** DPPH radical scavenging activity of fractions of natural medicinal plants methanol extracts

| Natural medicinal plant                              | Fraction                        | IC <sub>50</sub><br>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | Natural medicinal plant                                | Fraction                        | IC <sub>50</sub><br>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) |
|--|---------------------------------|---|--|---------------------------------|---|
| <i>Euryale ferox</i><br>(감인)                         | Hexane                          | 10.4 $\pm$ 2.3*                                 | <i>Cornus officinalis</i><br>(산수유)                     | Hexane                          | >20   |
|  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 9.4 $\pm$ 2.4                                   |  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | >20   |
|  | EtOAc                           | 1.5 $\pm$ 0.1                                   |  | EtOAc                           | 2.4 $\pm$ 0.7                                   |
|  | BuOH                            | 2.2 $\pm$ 0.6                                   |  | BuOH                            | 7.1 $\pm$ 1.5                                   |
|  | H <sub>2</sub> O                | 9.0 $\pm$ 0.7                                   |  | H <sub>2</sub> O                | >20   |
| <i>Glycyrrhiza uralensis</i><br>(감초)                 | Hexane                          | >20   | <i>Alpinia officinarum</i><br>(양강)                     | Hexane                          | >20   |
|  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 9.5 $\pm$ 0.3                                   |  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 8.0 $\pm$ 2.3                                   |
|  | EtOAc                           | 12.1 $\pm$ 0.1                                  |  | EtOAc                           | 5.5 $\pm$ 1.8                                   |
|  | BuOH                            | >20   |  | BuOH                            | 8.1 $\pm$ 2.6                                   |
| <i>Solvia miltiorrhiza</i><br>(단삼)                   | Hexane                          | >20   | <i>Nelumbo nucifera</i><br>(연자육)                       | Hexane                          | >20   |
|  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | >20   |  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | >20   |
|  | EtOAc                           | 2.1 $\pm$ 0.5                                   |  | EtOAc                           | 5.4 $\pm$ 1.2                                   |
|  | BuOH                            | 3.1 $\pm$ 0.6                                   |  | BuOH                            | 4.4 $\pm$ 2.4                                   |
| <i>Eucommia ulmoides</i><br>(두충)                     | Hexane                          | >20   | <i>Cinnamomun cassia</i><br>(육계)                       | Hexane                          | >20   |
|  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | >20   |  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 16.5 $\pm$ 5.0                                  |
|  | EtOAc                           | >20   |  | EtOAc                           | 1.6 $\pm$ 0.0                                   |
|  | BuOH                            | >20   |  | BuOH                            | 3.2 $\pm$ 0.1                                   |
| <i>Paeonia suffruticosa</i><br>(목단피)                 | Hexane                          | >20   | <i>Alpinia katsumadai</i><br>(초두구)                     | Hexane                          | >20   |
|  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 9.9 $\pm$ 8.3                                   |  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | >20   |
|  | EtOAc                           | 1.1 $\pm$ 0.5                                   |  | EtOAc                           | 2.0 $\pm$ 0.1                                   |
|  | BuOH                            | 4.8 $\pm$ 2.3                                   |  | BuOH                            | 1.8 $\pm$ 0.1                                   |
| <i>Spirodela polyrrhiza</i><br>(부평초)                 | Hexane                          | >20   | <i>Smilax china</i><br>(토복령)                           | Hexane                          | >20   |
|  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | >20   |  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 16.0 $\pm$ 6.4                                  |
|  | EtOAc                           | 8.3 $\pm$ 1.8                                   |  | EtOAc                           | 5.7 $\pm$ 1.7                                   |
|  | BuOH                            | 5.5 $\pm$ 0.1                                   |  | BuOH                            | 6.7 $\pm$ 0.8                                   |
| <i>Areca catechu</i> var.<br><i>dulcissima</i> (빈랑자) | Hexane                          | >20   | <i>Betula platyphylla</i> var.<br><i>japonica</i> (화피) | Hexane                          | >20   |
|  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 1.9 $\pm$ 1.7                                   |  | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | >20   |
|  | EtOAc                           | 1.2 $\pm$ 0.2                                   |  | EtOAc                           | 5.9 $\pm$ 3.4                                   |
|  | BuOH                            | 7.4 $\pm$ 0.7                                   |  | BuOH                            | 8.1 $\pm$ 4.9                                   |
|  | H <sub>2</sub> O                | 1.8 $\pm$ 1.1                                   |  | H <sub>2</sub> O                | 11.0 $\pm$ 1.4                                  |

\* Data are represented as mean  $\pm$  S.D.

생성된 과산화지질은 세포막 손상의 주요 원인이 되는 것으로 알려지고 있다. 따라서 지질 과산화 반응의 억제제인 항산화 활성 검정에 중요한 지표로 이용되고 있다. 본 연구에서는 상기의 DPPH 자유기 소거 활성 검색의 결과를 토대로 총 14종의 메탄올 추출물 중 6.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 IC<sub>50</sub> 값을 보인 감인, 목단피, 빈랑자, 육계, 초두구 및 화피 등 6종의 천연약용식물을 각각 V79-4 세포에 가한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 과산화지질 형성의 억제

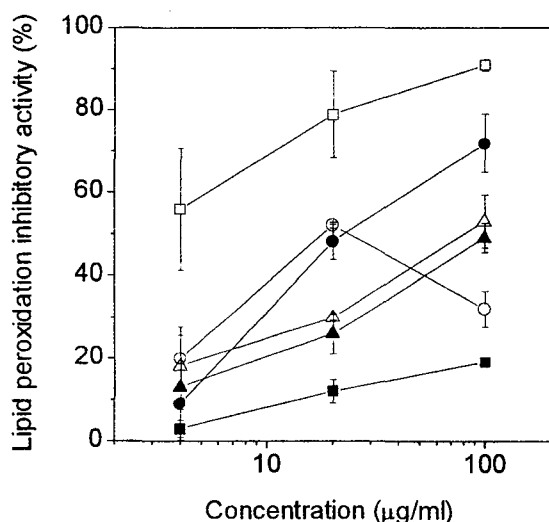
활성을 측정하였다. 먼저, 산화적 손상을 일으키는 원인 물질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가한 후의 세포배양 시간을 변화시키면서 과산화지질 생성량을 조사한 결과 최적의 조건은 1 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 1시간의 배양 시간이었다 (data not shown). Table 3에 수록한 바와 같이 6종의 천연약용식물의 메탄올 추출물 중에서 가장 높은 과산화지질 억제 활성을 보인 것은 화피로서 IC<sub>50</sub>은 4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 값이었다. 감인 역시 IC<sub>50</sub> 21  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 비교

적 높은 활성을 나타냈지만, 빈랑자, 육계 및 초두구는  $IC_{50}$  90  $\mu\text{g/ml}$  이상의 매우 낮은 억제 활성을 보여 DPPH 자유기 소거 활성과는 다소 차이를 나타내었다. 이들 6종의 메탄올 추출물의 농도를 4  $\mu\text{g/ml}$ 에서 100  $\mu\text{g/ml}$ 으로 변화시키면서 세포에 가해준 후 얻은 과산화지질 억제 활성을 역시 log-dose inhibition curve로 작성하여 Fig. 2에 도시한 결과, DPPH 자유기 소거 활성에서 보여지는 것처럼 크지는 않았으나 농도가 증가함에 따라 억제 활성도 증가하는 농도의존성을 나타내었다. 그러

**Table 3.** Lipid peroxidation inhibitory activity of methanol extracts of natural medicinal plants against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative damage in V79-4 cells

| Natural medicinal plant                             | $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---|--------------------------------|
| <i>Euryale ferox</i> (감인)                           | $20.5 \pm 0.7^*$               |
| <i>Paeonia suffruticosa</i> (목단피)                   | $19.0 \pm 0.4$                 |
| <i>Areca catechu</i> var. <i>dulcissima</i> (빈랑자)   | > 100                          |
| <i>Cinnamomun cassia</i> (육계)                       | $94.2 \pm 4.2$                 |
| <i>Alpinia katsumadai</i> (초두구)                     | > 100                          |
| <i>Betula platyphylla</i> var. <i>japonica</i> (화피) | < 4.0                          |

\* Data are represented as mean  $\pm$  S.D.



**Fig. 2.** Lipid peroxidation inhibitory activity of methanol extract of natural medicinal plants against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative damage in V79-4 cells. Data are represented as mean  $\pm$  S.D. ● - *Euryale ferox*, ○ - *Paeonia suffruticosa*, ▲ - *Areca catechu* var. *dulcissima*, △ - *Cinnamomun cassia*, ■ - *Alpinia katsumadai*, □ - *Betula platyphylla* var. *japonica*.

나, 목단피는 100  $\mu\text{g/ml}$ 을 가했을 때 많은 세포들이 사멸하는 세포 독성을 보임으로서 20  $\mu\text{g/ml}$ 을 가했을 때보다 억제 활성은 오히려 줄어드는 결과를 나타냈으며, 초두구의 경우에도 DPPH 자유기 소거 활성의 결과와는 달리 모든 농도에서 매우 낮은 과산화지질 억제 활성을 보였는데 이 역시 세포 독성과 관련이 있을 것으로 생각된다.

분획시료 중에서는 DPPH 자유기 소거 활성 측정에서 2.0  $\mu\text{g/ml}$  이하의  $IC_{50}$  값을 나타낸 목단피의 ethylacetate 분획, 감인의 ethylacetate 분획, 빈랑자의 dichloromethane, ethylacetate, 수층 분획, 육계의 ethylacetate 분획 및 초두구의 ethylacetate, butanol, 수층 분획 등 9종의 분획시료와  $IC_{50}$ 은 5.9  $\mu\text{g/ml}$ 로서 다른 9종의 시료에 비해서는 다소 낮은 활성을 보였지만, Matsuda 등의 보고(Matsuda et al., 1998)와 메탄올 추출물에 대한 결과를 종합해 볼 때 항산화 효과가 있을 것으로 기대되는 화피의 ethylacetate 분획의 과산화지질 형성 억제 활성을 분석하였다. 결과는 Table 4에 수록한 바와 같이 모든 시료가  $IC_{50}$  6.5  $\mu\text{g/ml}$  이하의 매우 높은 억제 활성을 보였으며, 가장 높은 억제 활성을 나타낸 시료는 초두구의 ethylacetate 분획 (0.9  $\mu\text{g/ml}$ )이었다. 그 밖에 목단피의 ethylacetate 분획 (2.6  $\mu\text{g/ml}$ ), 빈랑자의 ethylacetate 분획 (2.7  $\mu\text{g/ml}$ )과 육계의 ethylacetate 분획 (3.0  $\mu\text{g/ml}$ ) 등도 비교적 높은 억제 활성을 보였고, 메탄올 추출물과는

**Table 4.** Lipid peroxidation inhibitory activity of fractions of natural medicinal plants methanol extracts against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative damage in V79-4 cells

| Natural medicinal plant                             | Fraction                 | $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---|--------------------------|--------------------------------|
| <i>Euryale ferox</i> (감인)                           | EtOAc                    | $5.1 \pm 0.4^*$                |
| <i>Paeonia suffruticosa</i> (목단피)                   | EtOAc                    | $2.6 \pm 0.2$                  |
|   | H <sub>2</sub> O         | $3.2 \pm 0.4$                  |
| <i>Areca catechu</i> var. <i>dulcissima</i> (빈랑자)   | $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ | $3.5 \pm 0.4$                  |
|   | EtOAc                    | $2.7 \pm 0.1$                  |
|   | H <sub>2</sub> O         | $3.2 \pm 0.4$                  |
| <i>Cinnamomun cassia</i> (육계)                       | EtOAc                    | $3.0 \pm 0.2$                  |
|   | H <sub>2</sub> O         | $4.6 \pm 1.1$                  |
| <i>Alpinia katsumadai</i> (초두구)                     | EtOAc                    | $0.9 \pm 0.1$                  |
|   | BuOH                     | $5.4 \pm 0.7$                  |
|   | H <sub>2</sub> O         | $4.6 \pm 1.1$                  |
| <i>Betula platyphylla</i> var. <i>japonica</i> (화피) | EtOAc                    | $6.5 \pm 0.6$                  |

\* Data are represented as mean  $\pm$  S.D.

달리 DPPH 자유기 소거 활성과도 잘 일치하고 있음을 볼 수 있었다.

## 고 찰

1956년에 제안된 인간의 노화에 미치는 활성산소종의 영향에 관한 가설에 의하면 활성산소종은 매우 위험한 화학종으로 인식되고 있다. 계속된 연구의 결과로 현재 이 가설은 활성산소에 의한 세포손상과 이를 방어하는 세포의 항산화능 사이의 항상성이 깨져서 세포의 기능이 저해되고 결국 개체의 노화에 이른다라는 것과 활성산소에 의해 손상받은 DNA가 완전히 복구되지 못하면 이들의 유전자 발현이 감소하여 세포가 사망하게 되고 결국은 조직이 제대로 기능을 발휘하지 못하여 노화하게 된다는 등의 여러 가지 주장으로 나뉘어지고 있다(Finkel and Holbrook, 2000). 이와 같은 심각성으로 인해 활성산소종을 파괴시키고 산화적 손상으로부터 세포를 방어할 수 있는 물질의 개발 특히, 천연물에 대한 연구가 전세계적으로 활발히 이루어지고 있다. 이러한 맥락에서 시작된 본 연구는 전통적으로 사용되고 있는 천연약용식물 중에서 항염증 작용과 항산화 작용 등이 보고되어 있고, 본 연구실에서 기발표된 결과를 토대로 총 14종의 천연약용식물을 선정하여 이들의 메탄올 추출물과 분획시료를 제조하고, DPPH 자유기 소거 활성과 과산화지질 억제 활성 등을 조사 검토함으로써 이들의 항산화 작용을 *in vitro*에서 검토하였다.

그 결과에 따르면 천연약용식물의 메탄올 추출물과 분획시료 각각의 DPPH 자유기 소거 활성과 과산화지질 억제 활성은 매우 다양하게 나타났으며, 두 경우에서 모두 시료의 농도가 증가함에 따라 억제 활성도 증가하는 농도 의존성이 관찰되었다. DPPH 자유기 소거 활성을 조사한 결과에서는 특히 초두구, 빈랑자, 화피, 육계, 감인 및 목단피의 메탄올 추출물의 소거 활성이 매우 높았고, 분획시료 중에서는 목단피의 ethylacetate 분획, 감인의 ethylacetate 분획, 빈랑자의 dichloromethane, ethylacetate, 수층 분획, 육계의 ethylacetate 분획, 초두구의 ethylacetate, butanol, 수층 분획 및 화피의 ethylacetate 분획 등의 소거 활성이 높게 나타남으로서 우수한 소거 활성을 보이는 천연약용식

물의 종류가 메탄올 추출물과 분획시료에서 일치함을 알 수 있었다. DPPH 자유기 소거 활성을 조사한 결과를 토대로 6종의 메탄올 추출물과 10종의 분획시료에 대하여 과산화지질 억제 활성을 측정한 결과에서는 메탄올 추출물의 경우 화피를 제외한 다른 5종 즉 감인, 목단피, 빈랑자, 육계 및 초두구의 억제 활성이 IC<sub>50</sub>값 19 µg/ml 이상으로 낮게 나와 DPPH 자유기 소거 활성과는 다소 차이를 나타내었다. 이는 외부에서의 반응과 세포 내에서의 물질 대사 과정이 다르기 때문에 생기는 현상으로 생각되며, 따라서 세포에 가해진 천연약용식물의 작용 기전에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 그에 비해 10종의 분획시료들의 과산화지질 억제 활성은 IC<sub>50</sub>값 6.5 µg/ml 이하의 매우 높은 값을 나타냄으로서 DPPH 자유기 소거 활성의 결과와도 잘 일치함을 볼 수 있었다.

본 연구에서 검토한 두 결과를 종합해 볼 때 가장 높은 억제 활성이 관찰되는 천연약용식물의 메탄올 추출물과 분획시료는 각각 다르게 나타났지만, 화피의 경우 메탄올 추출물과 ethylacetate 분획에서 모두 높은 과산화지질 억제 활성이 관찰되었고, DPPH 자유기 소거 활성과도 잘 일치하는 결과를 얻음으로서 매우 우수한 항산화 효과가 있음을 확인하였다.

이상과 같이 DPPH 자유기 소거 활성이나 과산화지질 억제 활성을 검토한 결과와 함께 향후에는 SOD (superoxide dismutase) 및 CAT (catalase) 등과 같은 항산화 관련 효소들의 활성에 미치는 영향을 조사하여 우수한 항산화 작용이 관찰되는 천연약용식물의 메탄올 추출물과 분획시료의 구성 성분을 확인하고 활성을 나타내는 물질을 단일 순수 화합물로 분리함과 동시에 유전자 및 단백질 발현 비교 분석 등의 분자 생물학적 분석을 통하여 항산화 작용 기전을 규명하는 연구를 계속함으로써 *in vivo*에서의 활성 검정이 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

본 연구에서는 총 14종의 천연약용식물의 메탄올 추출물과 분획시료를 제조하고 이들의 활성산소종에 의한 산화적 손상의 보호 효과를 검토하기 위해 DPPH 자유기 소거 활성과 과산화지질

억제 활성을 측정, 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPH 자유기 소거 활성을 측정한 결과 총 메탄올 추출물 중 초두구의 메탄올 추출물과 분획시료 중 목단피의 ethylacetate 분획이 각각 IC<sub>50</sub>값 1.6과 1.1 µg/ml로서 가장 높은 소거 활성을 보였다.
  2. V79-4 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 과산화지질의 생성을 억제하는 활성은 총 메탄올 추출물 중 화피의 메탄올 추출물과 분획시료 중 초두구의 ethylacetate 분획이 각각 IC<sub>50</sub>값 4.0과 0.9 µg/ml로서 가장 높은 활성을 나타내었다.
  3. 천연약용식물의 농도에 따른 활성의 변화를 검토한 결과, DPPH 자유기 소거 활성 및 과산화지질 형성 억제 활성 모두 농도가 증가함에 따라 활성도 증가하는 농도 의존성이 관찰되었다.
  4. 화피의 메탄올 추출물과 ethylacetate 분획은 DPPH 자유기 소거 활성과 과산화지질 억제 활성 측정에서 모두 높은 활성을 보여 활성산소종에 의한 산화적 손상에 대해 우수한 보호 효과를 나타내었다.
- tion-induced DNA strand breaks. J. Kor. Soc. Ther. Radiol. 1995 ; 13 : 113-120.
- Finkel, T. and Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 2000 ; 408 : 239-247.
- Erlich, I. and Riederer, P. Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidative treatment. *Arzneim-Forsch. Drug Res.* 1995 ; 45 : 443-449.
- Johannsen, P., Velandar, G. and Mai, J. Glutathione peroxidase in early and advanced Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurol. Psychiat.* 1991 ; 54 : 679-683.
- Khan, S.G., Katiyar, S.K., Agarwal, R. and Mukhtar, H. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice : possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res.* 1992 ; 52 : 4050-4052.
- Kim, J.H., Kim, S.H., Lee, E.J., Gao, J., Wu, Z., Mar, W. and Chang, I.M. Radioprotective effect of lifukang, a chinese medicinal plant prescription. *Natural Product Sci.* 1998 ; 4 : 26-31.
- Kim, J.H., Lee, E.J., Shin, D.O., Hong, S.E. and Kim, J.K. Protective effect against oxidative stress in medicinal plant extracts. *J. Korean Asso. Radiat. Prot.* 2000 ; 25 : 37-43.
- Mantle, D., Eddeb, F. and Pickering, A.T. Comparison of relative antioxidant activities of british medicinal plant species in vitro. *J. Ethnopharmacol.* 2000 ; 72 : 47-51.
- Marttila, R.J., Lorenz, H. and Rinne, U.K. Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 1988 ; 86 : 321-325.
- Matsuda, H., Ishikado, A., Nishida, N., Ninomiya, K., Fujiwara, H., Kobayashi, Y. and Yoshikawa, M. Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998 ; 8 : 2939-2944.
- Narra, V.R., Howell, R.W., Sastry, S.R. and Rao, D.V. Vitamin C as a radioprotector against iodine-131 in vivo. *J. Nucl. Med.* 1993 ; 34 : 637-640.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979 ; 95 : 351-358.
- Park, Y.K., Kang, B.S., Yun, E.K., Kang, S.I., Park, C.H., Lee, D.U., Ha, J.H. and Huh, K. Effects of some sedative oriental medicines on neurotransmission and antioxidative system in vitro. *Yakhak Hoe.* 2000 ; 44 : 22-28.
- Pezzuto, J.M. Plant-derived anticancer agents. *Biochem. Pharmacol.* 1997 ; 53 : 121-133.

### 감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력 연구 개발 사업으로 수행되었기에 이에 감사드립니다. 또한 이 시은은 post-doctoral researcher로서, 주은미는 graduate fellow로서, 교육부의 두뇌한국 21 사업에서 지원 받았기에 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

- Blosi, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958 ; 181 : 1199-1200.
- Bonte, F., Hudson, M.S., Wepierre, J. and Meybeck, A. Protective effect of curcuminoids on epidermal skin cells under free oxygen radical stress. *Planta Med.* 1997 ; 63 : 265-266.
- Chanvitayapongs, S., Lusiak, B.D. and Sun, A.Y. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. *NeuroReport* 1997 ; 8 : 1499-1502.
- Cho, C.K., Kim, T.H., Yoo, S.Y., Koh, K.H., Kim, M.S., Kim, J.H., Kim, S.H., Yoon, H.K. and Ji, Y.H. The effect of alkaloid fraction of korean ginseng on the radia-



- Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G. and Tijburg, L. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. & Biophys.* 1995 ; 322 : 339-346.
- Stoner, G.D. and Mukhtar, H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cellular Biochem.* 1995 ; 22 : 169-180.
- Sugiyama, Y., Kawakishi, S. and Osawa, T. Involvement of the  $\beta$ -diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochem. Pharmacol.* 1996 ; 52 : 519-525.
- Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y. Inhibitory effects of vitamin E and ellagic acid on 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver nuclear DNA of rats treated with 2-nitropropane. *Cancer Lett.* 1995 ; 91 : 139-144.
- Takeda, A., Yonezawa, M. and Katoh, N. Restoration of radiation injury by ginseng I. responses of X-irradiated mice to ginseng extracts. *J. Rad. Res.* 1981 ; 22 : 323-330.
- Thomson, C.B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995 ; 267 : 1456-1462.
- Ward, J.F. DNA damage as the cause of ionizing radiation-induced gene activation. *Radiat. Res.* 1994 ; 138 : 85-88.
- Zelman, F.A., Thienhaus, O.J. and Bosmann, H.B. Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease : possible mechanism for paired helical filament formation. *Brain. Res.* 1988 ; 476 : 160-165.