

천연 허브 메탄올 추출물의 V79-4 세포에서 항산화 활성 검색

장정화 · 유경미¹ · 황인경
서울대학교 식품영양학과, ¹서울대학교 생활과학연구소

Screening of Natural Herb Methanol Extracts for Antioxidant Activity in V79-4 cells

Jeong-Hwa Chang, Kyung-Mi Yoo¹, In-Kyeong Hwang
Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Seoul National University,
¹Research Institute of Human Ecology, Seoul National University

Abstract

To investigate the worth of herbs as functional food ingredients, the antioxidant activity of 15 kinds of herb methanol extracts was evaluated. Green tea, chamomile, dandelion, and lemon vervena extracts, with IC₅₀ values of 1.45 g/100mL, 1.49 g/100mL, 1.50 g/100mL and 1.55 g/100mL, respectively, had significantly higher superoxide radical scavenging activity than any other herb extracts. Green tea and lemon vervena extracts, which had high radical scavenging activity, showed inhibition of cell proliferation in Chinese hamster lung fibroblasts (V79-4 cells). Most herb extracts, except for chamomile, fennel and dandelion, enhanced cell viability against H₂O₂-induced oxidative damage in V79-4 cells. At a dose of 1600 µg/mL, lemon vervena, green tea, hawthorn and rosemary extracts showed a cell viability of more than 50% which was significantly higher than that of the control culture treated with only H₂O₂. Thus, the results suggest that some herb extracts exhibited a V79-4 cell protective effect. The investigation of the cellular antioxidant enzymes activities of the five selected herb extracts revealed that extracts of lemon vervena and chamomile dose-dependently increased superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity but that this increase was not significant. In conclusion, some natural herb extracts exhibited high antioxidant activity.

Key words : natural herbs, antioxidant activity, cytotoxicity, antioxidant enzymes

1. 서 론

현대인에게 많이 발생하는 다양한 질병은 식품의 섭취와 관련이 높은 것으로 알려져 왔다. 최근에는 이러한 질병 발생을 예방할 수 있는 물질을 식품 중에서 찾으려는 노력이 많이 이루어지고 있으며 식용, 약용 식물의 페놀성 성분들은 항산화, 항염 활성을 보이며 이것은 암예방(chemopreventive) 특성을 갖는 식품으로서 의미가 있고 잠재적인 항암성, 항돌연변이 활성을

가지고 있다고 보고되고 있다(Surh YJ 1999).

호기성 생물체의 경우, 생체 내에 필요한 에너지를 생산하는 호흡 대사 과정에서 대부분의 산소는 산화적 인산화 과정을 통해 정상적으로 환원되고 있으나, 일정량의 산소는 부분 환원되어 계속적으로 반응성이 높은 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)이라는 유해 물질을 생성하게 된다(Halliwel B와 Gutteridge JMC 1992). 활성 산소종에는 hydroxyl radical (OH·), superoxide anion radical(O₂^{·-}), peroxy radical (RO₂[·])과 같은 자유기 라디칼들과 라디칼의 형태가 아닌 과산화수소(H₂O₂), singlet oxygen과 오존 등이 있는데 이러한 과정으로 생성된 ROS는 생체막 지질의 과산화를 유발하여 그 2차 산물로 결국 malondialdehyde (MDA)나 4-hydroxynonenal(4-HNE)와 같은 지질 과산화

Corresponding author : In-Kyeong, Hwang, Seoul National University,
San 56-1, Shillim-dong, Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
Tel : +82-2-880-5708
Fax : +82-2-884-0305
E-mail : ikhwang@snu.ac.kr

물이 축적되도록 한다(Kehrer JP 1993, Halliwell B 1996). ROS는 식균 작용이나 면역체계에서도 생성되어 이물질 침입에 대한 방어기작으로 이용되고 있으나, 체내에 고농도로 존재하는 경우 높은 반응성으로 인하여 산화적 스트레스를 유발하고 DNA 변이와 노화를 촉진한다(Halliwell B 1996). 이러한 자유기에 대한 방어기작으로 생물들은 superoxide dismutase, catalase, glutathion peroxidase와 같은 항산화 효소 체계를 가지고 있으며 그 외 항산화 물질로 비타민 A, C, E나 glutathione 등이 활성산소종을 제거할 수 있다. 효소적 방어기작에서 superoxide dismutase는 superoxide anion radical($O_2^{\cdot-}$)을 과산화수소(H_2O_2)로 변환시키고 생성된 H_2O_2 는 catalase에 의해 물과 산소 분자로 분해된다. 생성된 H_2O_2 와 환원형 glutathione의 소비로 불포화지방산으로부터 생성된 hydroperoxide는 seleno-dependent glutathione peroxidase(GPx)에 의해 분해된다(Halliwell B 1996, Alia 등 2005).

생체 내에서 일어나는 이러한 반응을 제어하기 위해 생리 활성 소재를 개발하기 위한 연구가 많이 이루어지고 있는(Chung HY와 Kim HB 2000, Lee SE 등 2003a, Kim EY 등 2004) 가운데 과일과 채소의 섭취는 식도암, 대장암 등과 같은 암, 심혈관질환, 뇌기능장애 등 퇴행성 질환의 위험성을 낮추준다고 보고되고 있다(Ames BN 1998). 채소와 과일뿐만 아니라 코코아와 같은 차류, 와인 등에서도 항산화 활성이 높은 것으로 보고되고 있다(Cao G 1996, Sato M 등 1996, Lee KW 등 2003).

차(tea)는 세계적으로 많이 소비되는 음료 중에 하나로 최근에는 생리활성 물질을 다량 함유하고 있다는 점에서 각광 받고 있으며 catechin, theaflavin과 같은 항산화 작용을 갖는 polyphenol이 풍부하여 암의 예방, 심혈관 질환 등에 효과가 있다고 보고되고 있다(Lambert JD와 Yang CS 2003). 최근에는 생활이 풍족해지면서 기호 식품을 많이 이용하는데 여러 생리활성 물질을 많이 함유하고 있다고 알려진 허브류를 차로 많이 음용하고 있으며 이 때 가장 대표적인 생리활성 물질은 폴리페놀 화합물이다. 폴리페놀 화합물은 탄소 6개로 이루어진 phenolic acid의 단순한 구조에서부터 탄닌과 같은 고분자 화합물에 이르기까지 약 8000 종류 이상의 페놀성 구조가 식물계에 존재한다고 알려져 있다(Kris-Etherton PM 등 2002). 이러한 폴리페놀 성분

은 항산화성, 항암 효과 및 항동맥경화 활성 등을 가진다고 보고되고 있다(Kris-Etherton PM 등 2002, Yang CS 등 2000, Scalbert A와 Williamson G 2000). 이렇듯 차(tea)에는 폴리페놀 성분을 비롯한 기능성 성분이 함유되어 있어 다양한 생리 활성을 보임에도 아직 녹차, 홍차와 같은 몇 가지 차 종류에 한정된 연구가 주로 이루어지고 있는 실정이다(Chung HY와 Kim HB 2000, Choi YM 등 2003). 따라서 이용도가 높아지고 있는 다양한 허브는 그 향기나 풍미가 탁월하고 독특하여 식품 소재로서 기호성을 증진시킬 수 있으며 피로회복, 진정효과, 항균작용, 노화방지 등의 효능이 알려져 있어 생리 활성 측면에 있어 가치 있는 소재라 할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 천연 허브류의 자유기 소거능을 측정함으로써 항산화성을 살펴보았으며, 세포주를 이용하여 세포 독성 및 산화적 스트레스에 대한 보호효과를 측정함으로써 생리 활성을 살펴보았다. 세포주의 선택에 있어서는 폐가 산화적 스트레스에 매우 민감한 기관이라고 보고되고 있는(Pryor 등 1998) 점을 감안하여, 산화적 스트레스에 대한 허브 추출물의 효과를 살펴보기 위해 폐 조직에서 유래된 Chinese hamster lung fibroblast(V79-4)라는 세포주를 이용하였다(Kang 등 2005). 이에 더하여 항산화성 및 생리 활성이 높은 몇 가지의 허브류에 대하여서는 세포주를 이용한 항산화 효소계의 활성을 관찰함으로써 허브류의 식품 소재로서의 가치를 검토하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에는 총 15종의 허브가 사용되었고 건조되어 판매되는 것으로 2005년 4월 27일 이사벨아로마(Isabellaroma)에서 구입하였다. Table 1과 같이 사용된 15종의 건조 허브는 분쇄기(FM-681 food mixer, Han Il, Korea)를 이용하여 가루로 만들어 $-20^{\circ}C$ 에 보관하며 실험하였다.

1) 시료의 추출 및 제조

분쇄된 허브 가루를 80% 메탄올로 3시간 동안 교반기(Shaking incubator, SI-600R, Jeio Tech Co. Ltd., Korea)를 이용하여 교반하여 추출액을 모았다. 각각의 추출액을 여과지로 거른 후 남은 잔사를 이용하여 같

은 방법으로 1회 더 반복 추출하여 메탄올 추출액을 얻었다. 추출액은 감압하면서 농축, 건조하여 무게를 측정하여 수율을 구하였고 증류수를 사용하여 1 g/mL의 농도로 제조하여 항산화 실험 및 세포독성 검색에 사용하였다.

2) Superoxide radical 소거 활성

Superoxide radical 소거 반응은 Nishikimi M 등(1972)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, superoxide radical을 78 μ M NADH(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 50 μ M의 nitro blue tetrazolium(NBT ; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 10 μ M phenazin methosulfate(PMS ; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)가 포함된 Tris-HCl buffer(16 mM, pH 8.0) 3 ml에서 생성한 후에 다양한 농도의 허브 추출액을 첨가하여 반응시켰다. 5분 동안 실온에서 배양한 후에 superoxide radical과 NBT 사이의 색반응을 560 nm에서 흡광도로 측정하여 다음의 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Inhibition ratio(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

3) 세포주 및 세포배양

Chinese Hamster lung fibroblasts인 V79-4 세포(ATCC, CCL-93)는 ATCC(American Tissue Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 10% fetal bovine serum(FBS ; Gibco™ Invitrogen, Camarillo, CA, U.S.A.)과 100 unit/mL의 penicillin 및 100 μ g/mL의 streptomycin(Gibco™ Invitrogen, Camarillo, CA, U.S.A.)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium ; Gibco™ Invitrogen, Camarillo, CA, U.S.A.)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기(MCO-175, Sanyo, Japan)에서 배양하였으며 2일 간격으로 배지 교환 및 계대 배양을 실시하였다.

4) 세포 독성 검색

허브 추출물의 세포 독성 실험은 Lee SE 등(2001)의 방법에 따라 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 tetrazolium salt의 cleavage로 형성된 보라색 formazan의 정도를 측정함으로써 상대적인 세포의 생존율을 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium

bromide(MTT ; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 사용하여 측정하였다. 즉, V79-4 세포를 5×10^5 cell/mL의 농도로 96 well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기(MCO-175, Sanyo, Japan)에서 24시간 배양한 후, 배양에 사용된 배지는 병아리관을 이용하여 빨아들여 제거한 후, 새로운 배지에 400, 800, 1600 μ g/mL 농도로 녹인 시료액을 분주하였다. 다시 72시간 배양한 후, 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 well당 10 μ L씩 분주한 다음 4시간 후, 2-propanol에 녹인 0.04N HCl을 100 μ L 넣은 후 ELISA microplate reader(Bio-rad, Benchmark, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 산화적 스트레스에 대한 보호효과 측정

산화적 스트레스를 받은 V79-4 세포에 대한 허브 추출물의 보호효과를 Lee SE 등(2001)의 방법에 따라 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT ; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 사용하여 세포 생존율을 측정함으로써 실시하였다. 즉, 세포 독성 실험과 마찬가지로 5×10^5 cell/mL의 농도로 96 well plate에 분주하고 24시간 배양한 후, 배양에 사용된 DMEM 배지를 제거하고 배지에 녹인 여러 가지 농도(400, 800, 1600 μ g/mL)의 시료를 분주하였다. 1시간 후 1 mM의 H₂O₂를 분주함으로써 세포에 산화적 스트레스를 유발시켰다. 다시 24시간 배양한 후, 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 well당 10 μ L씩 분주하였다. 추가로 4시간 배양 후, 0.04N HCl을 100 μ L 넣고 ELISA microplate reader(Bio-rad, Benchmark, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 항산화 효소액의 조제

V79-4 세포를 1×10^6 cell/mL의 농도로 100 mm petri dish에서 24시간 배양 후, 병아리관을 이용하여 배지를 빨아들여 제거하였다. 일정 농도(400 μ g/ml, 800 μ g/ml, 1600 μ g/ml)가 되도록 시료를 새로운 배지에 녹여 petri dish에 분주하였다. 24시간 시료와 반응시킨 후, 원심분리하여 얻은 세포만을 350 μ L 용해 buffer(1% Triton-X 100, 50 mM Tris-Cl pH 7.4, 20 mM EDTA)에 현탁시키고 혼합하여 세포를 파쇄하였다. 15000 rpm/min에서 20분 동안 원심분리 후 그 상층액을 모아서 항산화 효소액으로 사용하였으며 -80°C에 보관하였다. Bradford

(1976) 방법을 변형하여 단백질 농도를 결정하였고 그 결과는 mg 당 단백질 양에 대한 항산화 효소의 활성을 비교함으로써 나타내었다. 일정량의 효소액에 1M NaOH를 동량 넣은 후, 95% ethanol, 88% phosphoric acid와 Brilliant Blue G(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 염색약이 포함된 용액을 넣어 일정 부피를 맞추었다. 5분 정도 반응을 시킨 후, 생성된 파란색 formazan을 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

Superoxide dismutase 활성의 측정은 Crapo JD 등(1978)의 방법을 변형하여 이루어졌다. 3 mM xanthine, 0.75 mM NBT, 3 mM EDTA, 1.5 mg/mL BSA와 효소액이 포함된 50 mM sodium carbonate buffer(pH 10.2)에 xanthine oxidase(0.1 mg/mL)를 첨가하여 반응을 개시하였다. 효소 활성 반응에 사용한 모든 시약은 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였다. 실온에서 30분간 반응을 진행시켰고 6 mM의 copper (II) chloride를 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 1500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 그 상층액에 생성된 푸른색 formazan을 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) Glutathione Peroxidase(GPx) 활성 측정

Glutathione Peroxidase 활성 측정은 Paglia DE와 Valentini WN(1967)의 방법에 따라 측정하였는데 1 mM EDTA, 10 mM glutathione(GSH), 1 mM NaN_3 , 1 unit의 glutathione reductase가 포함되어 있는 0.1 M의 phosphate buffer(pH 7.0)에 50 μL 의 NADPH와 시료를 넣은 후 전체 1.0 mL가 되도록 한 다음 30 mM *t*-butyl hydroperoxide를 가하여 10초 단위로 1분간 340 nm에서 NADPH의 산화에 의해 감소되는 흡광도의 변화를 측정하였다. 사용된 모든 시약은 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였다. NADPH의 흡광계수는 $6.22 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 을 사용하여 mg 단백질에 대한 효소 활성으로 결과를 나타내었다.

Catalase 활성 측정

Catalase 활성의 측정은 Carrillo MC 등(1991)의 방법에 따라 H_2O_2 (Fluka Co., Switzerland)가 분해되는 정도에 의해 시행하였다. 효소액과 12 μL 의 3%(v/v) H_2O_2 가 포함되어 있는 50 mM의 phosphate buffer(pH 7.0)에 첨가하여 최종 부피가 1.0 mL이 되도록 맞춰 주었다.

37°C에서 2분간 반응시킨 후에 240 nm에서 5분 동안 시료의 흡광도를 측정하였다.

9) 통계 분석

통계처리는 SAS 프로그램을 이용하여 시료간의 superoxide radical 소거 활성의 차이 및 세포주를 이용한 실험에 있어서 대조군과 실험군 사이의 유의성 및 실험군 내의 농도에 따른 차이는 ANOVA(analysis of variance) 처리하였으며 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Superoxide radical 소거 활성

Phenazine methosulfate(PMS)가 매개한 NADH와 nitro blue tetrazolium(NBT)의 환원은 superoxide dismutase에 의해 억제되고 이는 NBT의 환원반응과 superoxide radical(O_2^-)이 관련 있음을 보여준다(Nishikimi M 등 1972).

농도에 따른 superoxide radical 소거 활성을 측정하여 허브 추출물의 최대 활성의 50%를 나타낼 수 있는 농도인 IC_{50} 값으로 Table 1에 표현하였다. 총 15종의 허브 추출물 중에서 green tea의 IC_{50} 값이 1.45 g/100mL로 활성이 가장 높은 것으로 나타났다. Chamomile, dandelion, lemon vervea 추출물도 각각 1.49 g/100mL, 1.50 g/100mL, 1.55 g/100mL로 green tea 추출물과 마찬가지로 다른 허브 추출물에 비해 유의적으로 높은 소거활성을 보였다. Eucalyptus, thyme은 다른 허브 추출물에 비해 유의적으로 낮은 superoxide radical 소거능을 보였다.

2. 허브 메탄올 추출물의 V79-4 세포에 대한 세포독성

MTT assay를 통하여 허브 추출물의 Chinese Hamster lung fibroblast인 V79-4 세포에 대한 세포 독성 효과를 Table 2에 나타내었다. 400~1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 허브 추출물을 투여한 결과 모든 농도의 green tea 추출물(16%, 21%, 41%)과 고농도의 lemon vervea, eucalyptus, thyme, fennel 추출물에서 세포 생존율이 각각 54%, 44%, 63%, 66%로 모두 유의적으로 낮게 나타났다. superoxide radical 소거 활성이 높게 나타

난 green tea 추출물의 경우 모든 농도에서 세포 생존율은 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났는데 이는 강한 소거 활성이 세포 성장에 있어서도 영향을 미친 것으로 사료된다. 낮은 농도의 lavender, rose hip, peppermint 등의 추출물은 세포 생존율에 있어 대조군과 유의적 차이가 없는 것으로 미루어 보아 세포 성장에 크게 영향을 미치지 않는다고 여겨진다. 양성대조군으로 사용된 비타민 C의 경우 허브 추출물과 같은 농도에서는 세포 생존율이 매우 낮았기 때문에 실험군과의 비교를 위해 200 µg/mL의 낮은 농도에서 실험을 실시하였다. 그 결과 비타민 C를 처리하였을 때, 허브 추출물에 비해 낮은 농도에서 비슷한 효과가 나타났으며 농도가 높아질수록 세포 생존율이 떨어지는 농도 의존적인 결과를 보였다.

3. 산화적 스트레스에 대한 허브 추출물의 세포 보호 효과

세포에 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유발하고 허브 추출물의 세포에 대한 보호 효과를 Table 2에 나타내었다. V79-4 세포에 허브 추출물을 H₂O₂보다 1시간 미리 처리하고 일정 시간 배양시킨 후 상대적인 세포 생존율을 통하여 추출물의 보호효과를 측정하였다. H₂O₂만을 처리한 세포의 경우 그 생존율은 세포 독성을 살펴본 것에 비하여 현저하게

낮은 43% 정도였다. 허브 추출물을 함께 투여한 세포의 경우 그 생존율에 있어 크게 차이가 보이지는 않았으나 1600 µg/mL의 추출물을 투여하였을 때 chamomile, fennel, dandelion을 제외한 대부분의 허브에서 대조군과는 유의적인 차이를 보였다. H₂O₂에 노출된 V79-4 세포를 생강과의 약용 식물인 *Alpinia katsumadai* 씨 추출물(Lee SE 등 2003b), 감초, 산수유, 계피 등과 같은 약용 식물(Lee SE 등 2003a), 자작나무 추출물(Ju EM 등 2004)을 처리하였을 때 그 생존율이 농도 의존적으로 증가하였고 세포의 morphology도 변하지 않았다. *Alpinia katsumadai* 씨 메탄올 추출물의 경우 100 µg/mL를 처리하였을 때, V79-4 세포의 생존율은 대조군에 비해 63%가 높은 약 70%의 생존율을 보였으며 이것은 식물 추출물이 산화적 스트레스에 대해 세포를 보호하는 효과를 가지고 있다고 할 수 있다(Lee SE 등 2003b). 가시연꽃(*Euryale ferox*) 씨 추출물의 경우 에틸 아세테이트 분획이 다른 분획에 비해 현저하게 세포 생존율이 높음을 보였다(Lee SE 등 2002). 톱풀과(*Achillea spp.*) 식물은 erythrocytes와 leucocytes에서 산화적 스트레스를 받은 대조군에 비하여 항산화계 효소 체계에 효과적임을 보였으며 이것으로 이 식물 추출물이 산화적 스트레스에 대한 보호효과를 가지고 있음을 보여주었다(Konyalioglu S와 Karamenderes C 2005). 이러한 연구

Table 1. Recovered weight and superoxide radical scavenging activity expressed as IC₅₀ of various herbs

Herbs	Scientific Name	Weight recovered (mg/mL)	IC ₅₀ ¹⁾ (g/100mL)
Lavender	Lavendula angustifolia	32.49	1.89 ^b
Lemon vervena	Vervena Triphylla	27.51	1.55 ^a
Lemon grass	Antropogon citrates	18.46	2.46 ^c
Chamomile	Matricaria recutita	22.56	1.49 ^a
Rooibos	Asparathus llinearis	10.14	1.65 ^b
Rose hip	Rosa rubiginosa	41.23	2.52 ^c
Green tea	Camellia sinensis	37.85	1.45 ^a
Jasmine	Jasmin	28.36	2.21 ^c
Hawthorn	Crataegus pinnatifida Bunge Leaves	28.00	2.47 ^c
Peppermint	Mentha piperita	33.31	1.91 ^b
Rosemary	Rosemary coronarium	15.61	1.84 ^b
Eucalyptus	Eucalyptus globules LABILL	19.32	2.66 ^d
Thyme	Thyme aestivus	24.30	3.30 ^d
Fennel	Foeniculum officinale	12.34	2.01 ^c
Dandelion	Taraxacum platycarpum	19.69	1.50 ^a

¹⁾Values in the same column that are followed by a different letter are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 2. Effect of herb extracts on cell proliferation and cell protective effect of herb extracts against H₂O₂-induced oxidative damage in V79-4 cells¹⁾

Herbs	Relative cell proliferation (%)			
	cell proliferative effect ²⁾		cell protective effect ³⁾	
	concentration (µg/mL)		concentration (µg/mL)	
Lavender	control	100.00 ± 5.30 ^b	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^a
	400	110.99 ± 7.98 ^a		39.27 ± 4.63 ^b
	800	85.39 ± 8.17 ^c		40.45 ± 3.77 ^b
	1600	99.86 ± 6.70 ^b		41.21 ± 2.24 ^b
Lemon vervena	control	100.00 ± 5.30 ^a	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^b
	400	86.45 ± 5.43 ^c		41.74 ± 3.27 ^b
	800	94.33 ± 7.55 ^b		46.87 ± 2.71 ^b
	1600	54.01 ± 6.63 ^d		49.46 ± 2.78 ^a
Lemon grass	control	100.00 ± 5.30 ^a	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^a
	400	87.10 ± 9.07 ^b		37.38 ± 2.13 ^c
	800	86.31 ± 6.58 ^b		40.87 ± 1.96 ^b
	1600	83.30 ± 9.66 ^b		38.06 ± 2.53 ^c
Chamomile	control	100.00 ± 5.30 ^c	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^a
	400	119.45 ± 4.53 ^a		42.16 ± 3.74 ^{ab}
	800	95.45 ± 5.34 ^b		40.64 ± 2.48 ^b
	1600	77.36 ± 8.20 ^d		42.28 ± 2.25 ^{ab}
Rooibos	control	100.00 ± 5.30 ^b	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^a
	400	107.21 ± 9.13 ^a		40.61 ± 2.35 ^b
	800	91.08 ± 9.21 ^b		39.71 ± 4.82 ^b
	1600	91.61 ± 9.21 ^b		41.31 ± 2.37 ^b
Rose hip	control	100.00 ± 5.30 ^a	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^a
	400	94.38 ± 4.89 ^{ab}		40.84 ± 2.51 ^b
	800	85.76 ± 3.04 ^b		39.27 ± 7.08 ^b
	1600	88.19 ± 2.70 ^{ab}		38.81 ± 1.84 ^b
Green tea	control	100.00 ± 5.30 ^a	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^c
	400	16.83 ± 5.38 ^c		42.87 ± 2.44 ^c
	800	21.90 ± 4.47 ^c		46.94 ± 3.20 ^b
	1600	41.38 ± 1.66 ^b		52.85 ± 7.10 ^a
Jasmine	control	100.00 ± 5.30 ^{ab}	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^b
	400	93.88 ± 5.61 ^a		42.59 ± 3.01 ^b
	800	84.26 ± 4.68 ^{bc}		43.49 ± 1.74 ^b
	1600	80.50 ± 5.22 ^c		45.63 ± 2.57 ^a
Hawthorn	control	100.00 ± 5.30 ^a	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^b
	400	82.19 ± 8.97 ^{ab}		38.58 ± 3.02 ^c
	800	71.61 ± 6.92 ^c		44.08 ± 6.69 ^b
	1600	79.73 ± 4.37 ^{bc}		50.27 ± 1.17 ^a
Peppermint	control	100.00 ± 5.30 ^a	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^{bc}
	400	101.30 ± 4.63 ^a		42.54 ± 2.63 ^c
	800	92.77 ± 9.61 ^a		44.70 ± 1.69 ^b
	1600	93.82 ± 8.29 ^a		55.78 ± 1.16 ^a
Rosemary	control	100.00 ± 5.30 ^a	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^b
	400	74.25 ± 6.97 ^c		41.31 ± 1.35 ^c
	800	71.88 ± 5.46 ^c		44.78 ± 2.67 ^b
	1600	84.69 ± 9.32 ^b		50.22 ± 1.99 ^a
Eucalyptus	control	100.00 ± 5.30 ^{ab}	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^{ab}
	400	83.10 ± 7.39 ^b		44.63 ± 3.70 ^a
	800	98.33 ± 12.05 ^a		41.41 ± 2.97 ^b
	1600	44.26 ± 8.63 ^c		37.89 ± 2.71 ^c

(continued)

Table 2. Effect of herb extracts on cell proliferation and cell protective effect of herb extracts against H₂O₂-induced oxidative damage in V79-4 cells¹⁾

Herbs	Relative cell proliferation (%)			
	cell proliferative effect ²⁾		cell protective effect ³⁾	
	concentration (µg/mL)		concentration (µg/mL)	
Thyme	control	100.00 ± 5.30 ^a	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^b
	400	92.64 ± 8.08 ^a		42.44 ± 3.15 ^b
	800	71.92 ± 9.50 ^b		46.50 ± 2.84 ^a
	1600	63.71 ± 16.91 ^b		47.70 ± 2.01 ^a
Fennel	control	100.00 ± 5.30 ^a	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^a
	400	75.76 ± 9.66 ^b		43.62 ± 2.45 ^a
	800	66.05 ± 12.82 ^b		44.82 ± 2.50 ^a
	1600	69.54 ± 9.01 ^b		44.73 ± 3.56 ^a
Dandelion	control	100.00 ± 5.30 ^b	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^a
	400	119.90 ± 4.40 ^a		43.96 ± 1.70 ^a
	800	115.78 ± 2.63 ^a		43.45 ± 4.11 ^a
	1600	100.78 ± 5.17 ^b		42.08 ± 2.82 ^a
Vitamin C	control	100.00 ± 5.30 ^b	H ₂ O ₂ treated only	43.25 ± 3.55 ^b
	200	109.81 ± 3.33 ^a		48.94 ± 4.12 ^a
	400	90.48 ± 8.27 ^c		50.17 ± 7.22 ^a
	800	57.88 ± 8.56 ^d		29.00 ± 4.26 ^c

¹⁾V79-4 cells were seeded in 96-well plates and cultured for 24hr, and then treated with various herb extracts. After culturing for 72hr, cell proliferation was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay,

²⁾and was expressed as the percentage of the value obtained in the control culture treated with medium alone.

³⁾V79-4 cells were caused oxidative stress using 1mM H₂O₂ and treated with herb extracts. Cell proliferation was evaluated by MTT assay, and expressed as the percentage of the value obtained in the control. All Mean value are triplicate determinations. Mean ± S.D. values in the same column(each herb) that are followed by a different letter are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

들에 비추어 허브 추출물의 경우 산화적 스트레스에 대해 모든 추출물이 농도 의존적으로 V79-4 세포를 보호하지는 않으나 대조군과 유의적인 차이를 보이며 50%가 넘는 생존율을 나타낸 lemon vervein, green tea, hawthorn, peppermint, rosemary 추출물의 경우 V79-4 세포에 대해 보호 효과를 일부 가지고 있다고 사료된다.

4. 허브 추출물에 의한 V79-4 세포의 SOD, GPx, CAT 활성 변화

허브 추출물의 superoxide radical 소거활성 및 세포 성장에 미치는 영향 등의 결과를 토대로 활성이 높게 나타났던 lemon vervein, chamomile, green tea와 상대적으로 활성이 낮게 나타났던 lemon grass, jasmine의 5종의 허브 추출물로 V79-4세포에서 대표적 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase(CAT) 활성 변화를 측정하였고 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 1600 µg/mL green tea

추출물을 제외하고는 허브 추출물을 처리하지 않은 대조군(44 unit/mg protein)에 비해 SOD 활성이 대체로 높게 나타났다. 1600 µg/mL lemon vervein 추출물을 처리하였을 경우 73 unit/mg protein으로 유의적으로 가장 높은 SOD 활성을 보였고, 800 µg/mL lemon vervein, 1600 µg/mL chamomile 추출물을 처리한 경우 대조군에 비해 SOD 활성에서 유의적인 차이가 보였다. 이 허브 추출물들은 농도가 증가할수록 효소 활성이 증가하는 경향을 보였다. 양성 대조군으로 사용한 비타민 C의 경우 상대적 비교를 위하여 세포 독성 실험에서와 마찬가지로 낮은 농도를 처리하였는데, 추출물에 비해 낮은 농도에서 비슷한 효소 활성을 보였다. *Alpinia katsumadai*를 비롯한 여러 약용 식물 추출물에서도 농도 의존적으로 SOD 활성이 나타났는데 본 연구의 경향과 유사하였다(Lee SE 등 2003a, Lee SE 등 2003b). 신유진 등(2004)은 세포 생존율에 차이가 없어도 암세포의 경우 알레지 추출물에 의해 독성 상태가 되어

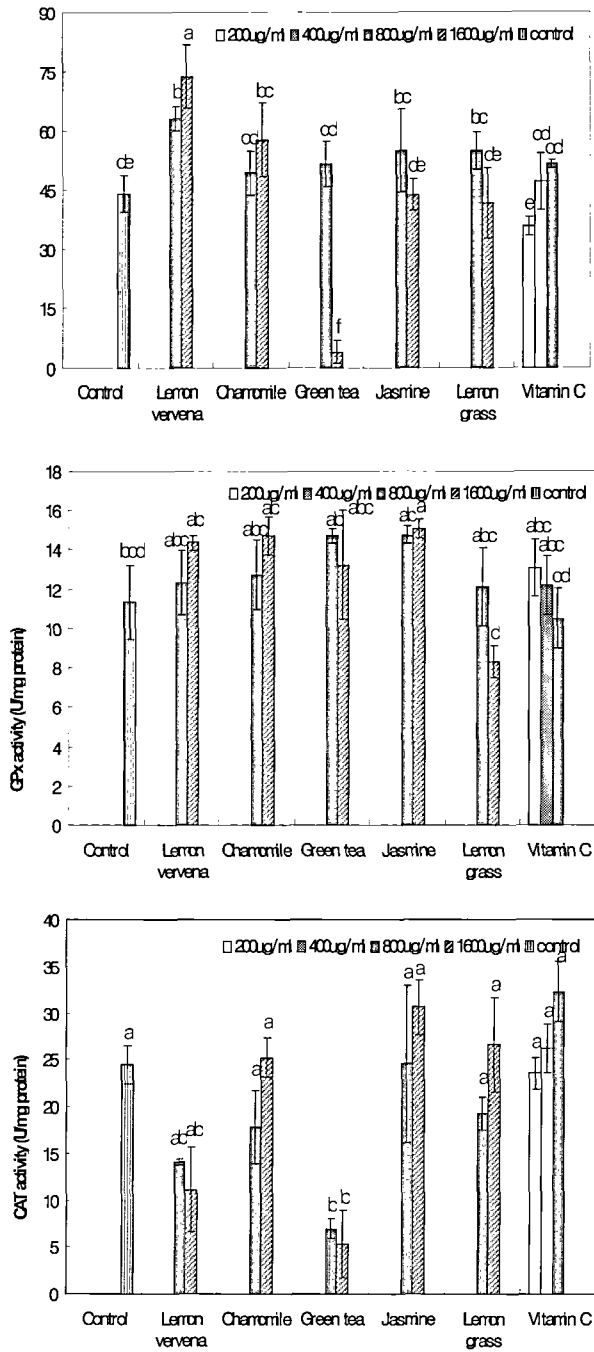


Fig. 1. Effects of various herb extracts on SOD, GPx, CAT activity in V79-4 cells¹⁾

¹⁾Data represent the mean±S.D. of three individual experiments. Different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

O₂를 생성시키고 이 O₂를 제거하기 위하여 SOD 활성이 높아지는 것으로 보았다. 세포 독성실험과 연관시켰을 때, 고농도의 green tea 추출물에서 SOD 활성이 낮게 나온 것은 세포 독성으로 인하여 세포수의 감소 때문이라 사료된다.

5종의 허브 추출물을 처리한 V79-4 세포의 GPx 효소 활성은 대조군을 비롯한 모든 허브 추출물에서 8~15 unit/mg protein 정도로 나타났으며 허브 추출물을 처리한 경우 대조군에 비해 그 활성이 높아지는 경향을 보였고, 농도 의존적으로 효소 활성이 증가하였으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다. *Alpinia katsumadai*를 비롯한 여러 약용 식물 추출물을 처리한 V79-4 세포의 GPx 활성의 경우 농도 의존적으로 증가하였고 그 효소 활성의 범위는 본 연구와 유사하였다(Lee SE 등 2003a, Lee SE 등 2003b). 신유진 등(2004)은 SOD의 활성이 증가한다는 것은 그 생성물인 H₂O₂이 생긴다는 것을 의미하므로 H₂O₂를 제거하기 위해 GPx나 CAT 활성의 변화가 수반될 수도 있다고 보았으며 얼레지 추출물을 L1210 세포에 투여하였을 경우 SOD와 더불어 GPx 활성이 증가한다고 보고하였는데 본 연구에서 lemon vervena, chamomile 추출물을 처리하였을 때, 효소 활성이 증가하는 경향을 보인 것과 유사하였다.

V79-4 세포에서의 CAT 효소활성을 살펴보면 허브 추출물을 처리하지 않은 대조군의 CAT 활성은 24 unit/mg protein 정도였고 1600 µg/mL chamomile, jasmine 추출물, 800 µg/mL 비타민 C를 처리하였을 때의 CAT 효소 활성도 비슷한 범위에서 나타났으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. *Alpinia katsumadai* 추출물을 V79-4 세포에 처리하였을 경우 CAT 활성은 SOD, GPx와 활성과 마찬가지로 농도 의존적이면서 대조군에 비하여서는 활성이 높게 나타났던 연구(Lee SE 등 2003b)와 달리 본 연구에서는 lemon vervena, green tea 추출물을 처리한 경우에는 앞에서의 SOD, GPx 활성 결과와는 달리 대조군에 비하여 그 활성이 낮게 나타났으며 농도가 증가할수록 그 활성이 증가하는 경향도 보이지 않았다. 신유진 등(2004)은 GPx가 주로 세포질에 널리 분포되어 있는 반면, H₂O₂를 분해하는 또 다른 효소인 CAT는 세포내의 peroxisome에 존재하기 때문에 GPx와는 달리 반응이 제한적이거나

생성된 H_2O_2 분해에는 관여하지 않고, 세포수 감소에 수반되는 것으로 보여 그 활성이 나타나지 않았다고 보고하였다. 본 연구의 CAT 활성도 이러한 이유로 대조군과 추출물 사이의 CAT 활성 차이가 SOD나 GPx에 비해 뚜렷하지 않은 것으로 사료된다.

결과적으로 superoxide radical 소거 활성이 크고 세포 성장을 효과적으로 억제하였던 lemon vervena, chamomile 추출물이 항산화 효소 SOD와 GPx 활성에 있어서도 대조군에 비해 활성이 높게 나타나 효과적으로 활성 산소종을 제거하였을 것이라 사료된다. 다양한 허브 추출물의 활성 검색을 토대로 허브를 차(tea)로 우려마실 경우 그 기능성 성분으로 인한 항산화 활성 효과를 얻을 수 있음을 짐작할 수 있다. 활성의 차이를 보이는 허브류를 중심으로 그 기능성 성분의 종류와 함량 등에 관한 연구가 진행되어야 할 것이며 이로써 허브류의 식품 소재로서의 가능성을 평가, 예측할 수 있을 것이다.

IV. 요약

본 연구에서는 천연 허브류의 항산화성 및 세포주를 이용한 세포 독성, 산화적 스트레스에 대한 보호 효과, 항산화 효소 활성 등을 살펴보았다. Chinese Hamster lung fibroblasts인 V79-4에서는 green tea 추출물, 고농도의 lemon vervena, eucalyptus 등의 추출물에서 세포 독성을 보였다. H_2O_2 로 유발한 산화적 스트레스에 대해 허브 추출물의 V79-4 세포 보호효과는 모든 추출물이 농도 의존적으로 효과를 갖지는 않으나 chamomile, fennel, dandelion을 제외한 대부분의 고농도 추출물에서 대조군에 비해 세포 보호 효과를 가지고 있다고 보인다. 항산화 활성 및 세포 독성 실험을 토대로 활성이 높은 5가지 허브 추출물의 V79-4 세포를 이용한 항산화 효소 활성에서 lemon vervena, chamomile을 처리하면 superoxide dismutase, glutathione peroxidase 활성이 대조군보다 증가하는 결과를 보였다. 이러한 다양한 허브 추출물의 항산화 활성 검색을 토대로 허브류의 식품 소재로서의 가능성을 평가할 수 있을 것이다.

참고문헌

- Alia M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L. 2005. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Available online <http://www.sciencedirect.com>
- Ames BN. 1998. Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicology Letters* 102-103 : 5-18.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 : 248-254.
- Cao G, Sofic E, Prior RL. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 : 3426-3431.
- Carrillo MC, Kanai S, Nokubo M, Kitani K. 1991. Deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life Science* 48 : 517-521.
- Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition* 32(5) : 723-727.
- Chung HY, Kim HB. 2000. *In vitro* Studies on the superoxide scavenging activities, the cytotoxic and the immunomodulating effects of thirteen kinds of herbal extracts. *Korean Journal of Food Science and Technology* 32(3) : 699-705.
- Crapo JD, McCord JM, Fridovich I. 1978. Preparation and assay of superoxide dismutase. *Methodology in Enzymology* 53 : 382-393.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease : where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119 : 598-620.
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition* 16 : 33-50.
- Ju EM, Lee SE, Hwang HJ, Kim JH. 2004. Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Life Science* 74 : 1013-1026.
- Kang KA, Lee KH, Chae SW, Zhang R, Jung MS, Lee YK, Kim SY, Kim HS, Joo HG, Park JW, Ham YM, Lee NH, Hyun JW. 2005. Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS letters* 579 : 6295-6304.
- Kehrer JP. 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 23 : 21-48.
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal

- plants. *Korean Journal of Food Science Technology* 36(2) : 333-338.
- Konyalioglu S, Karamenderes C. 2005. The protective effects of *Achillea L.* species native in Turkey against H₂O₂-induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 102 : 221-227.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. 2002. Bioactive compounds in Foods : Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine* 113(9B) : 71S-88S.
- Lambert JD, Yang CS. 2003. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutation Research* 523-524 : 201-208.
- Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 : 7292-7295.
- Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS, Kim JH. 2003a. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Science* 73 : 167-179.
- Lee SE, Ju EM, Kim JH. 2001. Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from *Smilax china* root. *Experimental and Molecular Medicine* 33(4) : 263-268.
- Lee SE, Ju EM, Kim JH. 2002. Antioxidant activity of extracts from *Euryale ferox* seed. *Experimental and Molecular Medicine* 34(2) : 100-106.
- Lee SE, Shin HT, Hwang HJ, Kim JH. 2003b. Antioxidant Activity of Extracts from *Alpinia katsumadai* Seed. *Phytotherapy Research* 17 : 1041-1047.
- Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 46(2) : 849-854.
- Paglia DE, Valentien WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 70 : 158-164.
- Pryor WA, Stone K, Zang LY, Bermudez E. 1998. Fractionation of aqueous cigarette tar extracts : fractionation that contain the tar radical cause DNA damage. *Chemical Research in Toxicology* 11 : 441-448.
- Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H. 1996. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of vines from different sources. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 44 : 37-41.
- Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130 : 2073S-2085S
- Shin YJ, Jung DY, Ha HK, Park SW. 2004. Anticancer effect of *Erythronium japonicum* extract on ICR mouse and L1210 cells with alteration of antioxidant enzyme activities. *Korean Journal of Food Science and Technology* 36(6) : 968-973.
- Surh YJ. 1999. Molecular mechanism of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutation Research* 428 : 305-327.
- Yang CS, Chung JY, Yang G, Chhabra SK, Lee M. 2000. Tea and tea polyphenols in Cancer Prevention. *Journal of Nutrition* 130 : 472S-478S

(2005년 12월 5일 접수, 2006년 7월 26일 채택)