

## 鎖陽의 Diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) 소거 활성 및 HepG2 세포에 대한 항산화 효과

장문석<sup>1</sup>, 양응모<sup>1</sup>, 김도림<sup>1</sup>, 박은화<sup>1</sup>, 박수연<sup>2</sup>, 박성규<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>경희대학교 한의과대학 처방제형학교실, <sup>2</sup>경희대학교 체육대학

### ABSTRACT

## Antioxidant Effect of *Cynomorii Herba* on HepG2 Cells and Diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Activity

Mun Seog Chang<sup>1</sup>, Woong Mo Yang<sup>1</sup>, Do Rim Kim<sup>1</sup>, Eun Hwa Park<sup>1</sup>, Soo Yeon Park<sup>2</sup>, Seong Kyu Park<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University,

<sup>1</sup> Hoeki-dong Dongdaemoon-gu, Seoul 130-701, Korea

<sup>2</sup> College of Physical education, Kyung Hee University

The purpose of this study was to investigate the anti-oxidant effect of *Cynomorium songaricum*. The extract of *Cynomorii Herba* was studied for diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, HepG2 cell viability and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity by a modified MTT assay. DPPH radical scavenging activity was measured after 30 minutes. The extract was tested by 1, 5, 10, 50, 100 and 500 µg/ml concentrations. HepG2 cell viability by a modified MTT assay was measured in the concentrations of 10, 50, 100, 250, 500 ug/ml for 24 h. The results showed that the extract scavenged DPPH radical up to 52.2% with 50 ug/ml concentration. The extract did not reduced the cell viability and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity

- 
- 교신저자 : 박성규
  - 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실
  - Tel : 02-961-0330 Fax : 02-961-0536 E-mail : comskp@khu.ac.kr
  - 접수 : 2007/ 12/ 11 수정 : 2007/ 12/ 13 채택 : 2007/ 12/ 25

(69.4%) was blocked by the extract in the concentrations of 50, 100, 250 and 500 µg/ml. In conclusion, the extract of *Cynomorii Herba* has potent antioxidant activity.

**Key word :** *Cynomorii herba*, diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH), HepG2 cells, cytotoxicity, MTT assay

## 1. 서 론

鎖陽은 쇠양과의 여러해살이 기생성 육질 식물 쇠양 *Cynomorium songaricum* Rupr.의 육질 줄기로써<sup>1)</sup>, 봄과 가을에 채집하여 花序를 제거하고 晒乾하여 사용한다. 補腎壯陽하는 효능으로 인하여 陽痿증상을 치료하며 精液의 遺泄을 固精하는 효능이 있어 鎖陽이라 하였다<sup>2)</sup>. 鎖陽의 藥性은 味甘, 性溫하며, 腎, 大腸經과 足厥陰肝經으로 歸經한다<sup>1)</sup>. 鎖陽의 성분은 全草에 cynoterepene, acetylursolic acid, ursolic acid가 포함되어 있고, 脂肪酸에 palmitic acid, oleic acid, linoleic acid, β-sitosterol, campesterol, palmitate, daucosterol, aspartic acid, proline, serine, alanine 등이 포함되어 있다<sup>2,3,4)</sup>. 이외에 K, Na, Fe, Mn, Zn 등 15종의 금속원소와 가용성 무기물 등이 함유되어 있다<sup>5)</sup>.

鎖陽의 약리작용과 관련하여 潤腸通便의 효능으로 위장운동을 증강시키고 장관운동을 촉진하는 작용과<sup>1,2,5)</sup> 면역력 증진, 혈소판 응집 억제와 항혈전 작용 및 내분비 계통에 대한 작용이 보고되었다<sup>5)</sup>. 鎖陽은 정자형성과 밀접한 관계가 있는 생식세포의 일종인 germ cell-1 spermatogonia (GC-1)의 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대하여 유의성 있는 보호 효과가 보고되었다<sup>6)</sup>.

鎖陽은 補陽 처방과 肝腎虛弱으로 인한 下肢痿軟 증상의 치료 처방 및 老人 便秘 개선 처방에

다양하고 장기간 사용되고 있으나<sup>7)</sup>, 鎖陽이 간손상에 미치는 영향에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 선행연구로서 쇠양 전탕액은 알코올 투여로 손상된 흰쥐의 체내 free radical의 소거효과가 있어 superoxide dismutase (SOD) 활성을 촉진하고 lipid peroxide (LPO)의 생성을 저해하는 작용이 밝혀졌다<sup>2)</sup>. 이와 같이 鎖陽의 간손상 동물 모델에 대한 항산화 효과가 보고된바 있으나, 간 조직 세포인 HepG2 세포에 미치는 산화 스트레스의 영향에 대한 연구는 보고되지 않았다.

이에 鎖陽의 항산화작용을 평가하기 위하여 diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) 자유기 소거 활성에 미치는 영향을 측정하고, hydrogen peroxide에 의해 유도된 산화 스트레스에 대한 HepG2 세포의 생존율에 미치는 영향을 비교하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 약재 및 시료의 제조

#### 1) 약재

본 실험에서 사용된 鎖陽은 쇠양 *Cynomorium songaricum* Rupr.으로 서울특별시 동대문구 제기동 경동약령시장의 원광약업사를 통하여 구입하여, 경희대학교 처방제형학교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며, 일부는 경희대학

교 한의과대학 처방제형학교실에 보관하였다.

## 2) 시료의 제조

쇄양 50 g을 정확하게 중량을 측정된 뒤 환류추출기에 1차 증류수 1,000 ml와 함께 넣은 뒤 탱액이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열하여 추출한 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 후 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 15.6 g을 얻었으며, 수율은 31.2%이었다.

## 2. Cell culture

### 1) 세포주

실험에 사용된 간조직 세포는 HepG2 (human hepatoma cell line)로서 한국 세포주 은행 (KCLB, Korea)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)과 Fetal Bovine Serum (FBS) 및 trypsin-EDTA 등은 GIBCO BRL사 (USA)에서 구입되어 사용되었으며, 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)(Sigma, USA), ascorbic acid (Sigma, USA), ethanol (Duksan, Korea), tetrazolium salt 3, [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA), hydrogen peroxide (Sigma, USA), sodium dodecyl sulfate (SDS), 2-thiobarbituric acid (TBA) 등이 Sigma (USA)에서 구입되어 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 rotary evaporatory (Eyela, Japan), freeze dryer (Eyela, Japan), deep freezer (Revco, USA), microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA), CO<sub>2</sub> incubator (Sanyo, Japan) 등이다.

### 2) 세포 배양

HepG2 cells은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. HepG2 cells은 75 cm<sup>2</sup> flask (Falcon, USA)에서

충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (Sigma, USA) 용액으로 씻어준 후 50 ml flask 당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 20의 split ratio로 CO<sub>2</sub> 배양기 (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

## 3. DPPH에 의한 radical 소거 작용의 측정 (DPPH radical scavenging method)

DPPH에 의한 radical scavenging activity를 알아보기 위하여 동결건조된 시료를 증류수에 녹여서 1, 5, 10, 50, 100, 500 µg/ml의 농도로 시액을 제조하였다. 양성 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였고 시료와 같은 농도로 조제하였다. 96 well microplate (Corning, USA)에 동량의 ethanol에 녹인 0.1mM DPPH와 각 농도의 시액을 첨가한 후 잘 흔들어 섞어 준 후, 실온에서 30 분간 방치한 후 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA)를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. Radical scavenging activity는 다음 공식으로 계산되었다<sup>8)</sup>.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{[(A_B - A_T) / A_B] \times 100,}{}$$

A<sub>B</sub> : absorbance of blank sample.

A<sub>T</sub> : absorbance of tested extract solution.

## 4. HepG2 cells에 대한 cell viability 측정

시료가 HepG2 cells의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 박 등<sup>9)</sup>의 방법을 응용하였다. 96 well plate에 1×10<sup>4</sup> cells/well의 cell을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered

saline (PBS) 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL을 각 well에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/mL MTT (Sigma, USA)를 40  $\mu$ l씩 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광시킨 후 나머지 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100  $\mu$ l 처리하고 37°C에서 2시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times A_T / A_C$$

$A_C$  : absorbance of control.

$A_T$  : absorbance of tested extract solution.

### 5. Hydrogen Peroxide-induced Cytotoxicity에 대한 항산화효과 측정

시료의 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 보호효과를 알아보기 위해 Mosmann(1983), Kotnik(1990) 등의 MTT test를 응용하여 다음과 같이 실험하였다<sup>10)</sup>. 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/mL의 cell을 100  $\mu$ l씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS, Sigma) 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL와 동량의 media를 처리 후 20시간동안 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 FBS free DMEM에 녹인 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 각각의 well에 처리한 후 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 버리고 PBS로 세척한 후 PBS에 녹인 5mg/mL tetrazolium salt 3, [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA)를 20  $\mu$ l씩 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광 후 4시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100  $\mu$ l 처

리한 후 37°C에서 2시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6. 통계처리

실험성적은 평균치  $\pm$  표준오차 (Mean  $\pm$  S.E.)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test로 검정하여  $p < 0.05$ 일 때를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## III. 결 과

### 1. DPPH radical 소거 활성

쇄양의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과 ascorbic acid와 쇄양은 저농도에서 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. 쇄양은 5, 10, 50  $\mu$ g/ml의 저농도에서 20.0, 25.1, 52.2%의 DPPH radical 소거 활성을 나타냈으나, 100, 500  $\mu$ g/ml의 고농도에서 각각 69.9, 63.0%의 DPPH radical 소거 활성이 감소하였다 (Fig. 1).

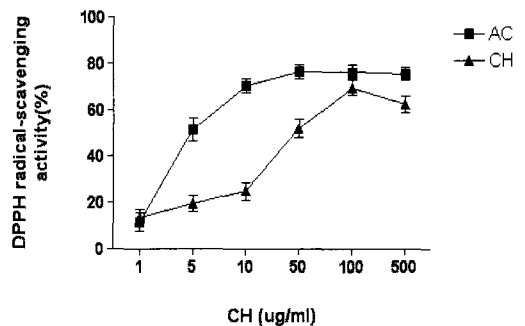


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of ascorbic acid (AC) and aqueous extract from Cynomorii Herba (CH)

Values indicate the mean  $\pm$  S.E. of six replications. DPPH radical scavenging activity (%) =  $[(A_B - A_T) / A_B] \times 100$ .  $A_B$ : absorbance of blank sample,  $A_T$ : absorbance of tested extract solution.

## 2. HepG2 cells에 대한 쇠양의 세포 독성

쇠양의 HepG2 cells에 대한 세포 독성을 측정하기 위하여 시료 10, 50, 100, 250, 500 ug/ml의 범위에 대하여 24시간동안 배양한 후 세포 생존율을 측정하였다.

쇠양 10 ug/ml의 농도에서 HepG2 cells의 생존율은 86.8%로 감소하였으나 세포 독성에 영향을 미치지 않는았다. 쇠양 50, 100 ug/ml의 농도에서 HepG2 cells의 생존율은 각각 150.3, 165.1%로 유의성 있게 증가하였으며 (p < 0.05, p < 0.01), 250, 500 ug/ml의 농도에서 HepG2 cells의 생존율은 각각 125.1, 132.3%로 증가하였다. 특히 쇠양 100 ug/ml의 농도에서 HepG2 cells의 생존율은 165.1%로 가장 높았다 (Fig. 2).

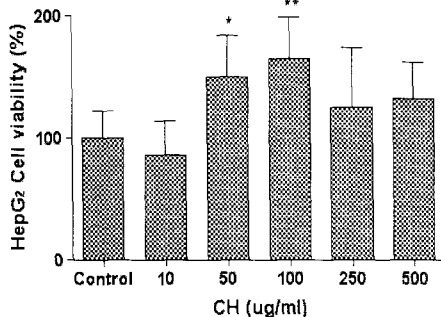


Fig. 2. Effect of water extract from Cynomorii herba (CH) on HepG2 cells.

HepG2 cells were seeded at a density of  $1 \times 10^4$  cells/ml and grown at 37°C for 24 h. Response to CH was dose-dependent up to 100 ug/ml. Each column represents mean  $\pm$  S.E. (n = 4) with respect to 100% of control. \*, Significantly different from the control value (\*: p < 0.05, and \*\*: p < 0.01).

## 3. 쇠양과 hydrogen peroxide의 동시처리에 대한 항산화효과 측정

쇠양의 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 보호효과를 측정하기 위해 시료 10, 50, 100, 250, 500 ug/ml와 25 uM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 24시간 동안 동시배양 하였다. Hydrogen peroxide

만 처리된 군에서는 cell viability가 69.4%로서 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 (p < 0.01). Hydrogen peroxide와 시료를 동시에 처리된 군에서는 10 ug/ml에서 68.5%로 cell viability가 감소되었으나, 농도 50, 100, 250 ug/ml에서 각각 126.4, 118.7, 109.5%로 cell viability가 유의성 있게 증가되었다 (p < 0.05, 0.01, 0.05). 특히 500 ug/ml의 농도에서는 hydrogen peroxide만 처리된 군에 비해 cell viability가 220.3% 증가되어 높은 항산화 효과를 나타내었다 (p < 0.01, Fig. 3).

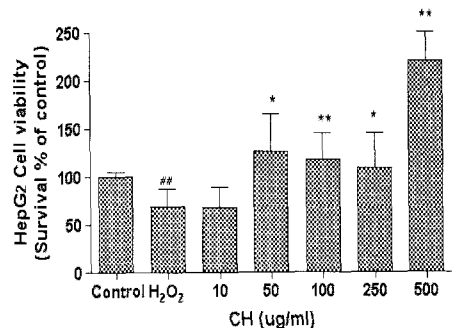


Fig. 3. Protective effect of water extract from Cynomorii herba (CH) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity.

HepG2 cells treated were incubated with 25 uM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence or absence of CH at 37°C for 24 h. Each column or point represents the mean value  $\pm$  S.E. (n = 4). Each column represents the mean value  $\pm$  S.E. (n = 4). #, Significantly different from the control value (##: p < 0.01); \*, significantly different from the cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone (\*: p < 0.05, and \*\*: p < 0.01).

## IV. 고찰 및 결론

鎭陽은 不老藥, 地毛球, 鏤鐵棒, 黃骨狼 등의 異名이 있는데, 모두 효능과 形色에서 유래한 것이다<sup>21</sup>. 鎭陽의 약리작용과 관련하여 체내 free radical의 소거효과가 있어 SOD 활성을 촉진하고 LPO의 생성을 저해하는 작용이 밝혀졌다<sup>1,2)</sup>. 또한 潤腸通便의 효능에 대하여 위장운동을 증강시키고

장관운동을 촉진하는 작용과 이 외에 면역력 증진, 혈소판 응집 억제와 항혈전 작용 및 내분비 계통에 대한 작용이 보고되어 있다<sup>5)</sup>.

이에 산화 스트레스에 의해 유발된 간 조직 세포인 HepG2 세포에 미치는 쇄양의 세포독성을 연구하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수성을 나타내는 보라색 화합물이다. 이 radical은 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며, 특히 여러 가지 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다<sup>8)</sup>. 일반적으로 반응성이 강한 DPPH radical은 항산화제로부터 전자 혹은 수소원자를 얻음으로써 안정한 형태의 생성물인 DPPH-H로 전환하는 것으로 알려져 있다. 쇄양 추출물의 농도별 희석액이 DPPH radical 소거 효과가 있는지의 여부를 관찰하기 위하여 대표 적인 항산화 물질인 ascorbic acid의 활성과 쇄양의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 비교하였다. 실험 결과 ascorbic acid와 쇄양은 모두 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. 쇄양은 10 µg/ml의 농도에서 25.1%의 DPPH radical 소거 활성을 나타냈으며 50, 100, 500 µg/ml의 농도에서 각각 52.2, 69.9, 63.0%의 우수한 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다.

쇄양이 HepG2 cells의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정한 결과 쇄양 추출물은 HepG2 cells에 대하여 농도 의존적으로 생존율을 증가시켰음이 관찰되었다. 쇄양을 10, 50, 100 µg/ml에서 처리하였을 때 HepG2 cells의 생존율은 각각 86.8% 및 150.3, 165.1%로서 농도 의존적으로 HepG2 cells의 생존율을 증가시켰다. 쇄양 250, 500 µg/ml의 농도에서는 HepG2 cells의 생존율은 125.1, 132.3%로 약간 저하되었으나 쇄양을 처리하지 않았을 때에 비하여 생존율은 증가하였다. 특히 쇄양 100 µg/ml의 농도에서 HepG2 cells의 생존율은 165.1%

로서 가장 높았다.

이와 같이 HepG2 cells에 대한 cell viability 결과에 근거하여 쇄양이 HepG2 cells의 hydrogen peroxide에 의해 유도된 산화적 손상을 보호할 수 있는가를 관찰하기 위하여 cytotoxicity를 측정하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 HepG2 cells은 정상군에 비하여 69.4%의 cytotoxicity를 나타내었다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 HepG2 cells에 대하여 쇄양 처리군은 50, 100, 250 µg/ml의 농도에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity에 대한 항산화 효과가 증가되었으며, 500 µg/ml의 농도에서 최대 220%의 항산화 효과를 나타내었다.

이상에서 살펴본 바와 같이 補腎壯陽과 肝腎虛弱으로 인한 下肢痿軟 증상 및 老人 便秘의 치료에 활용되어온 鎖陽이 간 조직 HepG2 세포의 산화 스트레스에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실험을 수행하였다. 실험 결과 鎖陽은 DPPH radical 소거활성에 우수한 효과가 나타났으며, MTT assay를 실시하여 세포생존을 측정 실험을 수행한 결과 최대 500 µg/ml의 농도까지 HepG2 cells에 대한 생존율이 증가하여 세포독성이 없음이 확인되었으며, hydrogen peroxide에 의해 유도된 HepG2 cells의 산화 스트레스에 대하여 유의성 있는 보호 효과가 확인되었다.

## 감사의 글

본 연구는 경희-아모레퍼시픽 미용건강 연구센터의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 참고문헌

1. 한의과대학 본초학 편찬위원회. 본초학. 서울: 영림사. 2004:624-5
2. 國家中醫藥管理局. 中華本草. 上海:上海科學技術出版. 1999:722-4

3. 張百舜. 中葯材. 北京:國家醫葯管理局. 1991:36
4. 張百舜. 中葯葯. 北京:國家醫葯管理局. 1992:577
5. 王本祥. 現代中葯藥理學. 天津:天津科學技術出版社. 1997:1272-3
6. 오명숙, 김도림, 양용모, 장문석, 박수연, 강순아, 박성규. Hydrogen Peroxide에 의해 유도된 남성 생식세포의 세포독성에 미치는 鎖陽의 효과. 대한한의학방제학회지. 2004;12(2):155-62
7. 박성규, 김윤경, 오명숙. 처방제형학. 서울:영림사. 2006:210-2
8. 오명숙, 김도림, 강지웅, 김산웅, 유태원, 박정열, 김동민, 박완수, 장문석, 박수연, 박성규. DPPH 방법을 통한 菟絲子, 補骨脂, 蛇床子, 淫羊藿의 항산화 활성에 대한 연구. 대한한의학방제학회지. 2005;12(2):101-10
9. 박완수, 오명숙, 장문석, 양용모, 이병희, 김원남, 이학철, 강순아, 박성규. 한국·중국·일본 當歸의 HepG2 세포 독성 비교 연구. 동의생리병리학회지. 2006;20(5):1155-8
10. 오명숙, 김도림, 성은진, 장문석, 박성규. 山茱萸가 남성 생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2005;19(6):1541-54