

산수유(*Cornus officianalis*) 에탄올 추출물의 항산화, 항돌연변이 활성 및 암세포 성장 억제 효과

전연희¹ · 김미현¹ · 김미라^{2*}

¹경북대학교 식품영양학과

²경북대학교 식품영양학과, 장수생활과학연구소

Antioxidative, Antimutagenic, and Cytotoxic Activities of Ethanol Extracts from *Cornus officianalis*

Yeon Hee Jeon¹, Mi Hyun Kim¹, and Mee Ra Kim^{2*}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Dept. of Food Science and Nutrition, Center for Beautiful Aging,
Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

The antioxidative, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanol extract from *Cornus officianalis* have been studied. The antioxidant activity of the ethanol extract was measured by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method. The inhibition effects on the mutagenicity in *Salmonella* Typhimurium TA100 were evaluated by Ames test and cancer cell inhibitory effects in Hep3B cell and HeLa cell were tested by MTT assay. *Cornus officianalis* had an important free radical-scavenging activity towards the DPPH radical. At a concentration of 500 ppm, the DPPH radical-scavenging activity of *Cornus officianalis* was similar to that of L-ascorbic acid. None of the extracts produced a mutagenic effect on *S. Typhimurium* TA100. The ethanol extract from *Cornus officianalis* showed about 77% of inhibition at 500 ppm on the mutagenicity induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. The extract from *Cornus officianalis* showed strong cytotoxicity against Hep3B and HeLa cells, with inhibition of 83 and 78% at a dose of 700 µg/plate, respectively. Moreover, the ethanol extracts had 34.33 mg H.E/g of polyphenols and 5.67 mg Q.E/g of flavonoids, respectively. Therefore, the present study showed antioxidative, antimutagenic and anticancer potential of the ethanol extract from *Cornus officianalis*.

Key words: *Cornus officianalis*, Ames test, DPPH, MTT assay

서 론

최근 증가하고 있는 환경오염 물질, 환경 호르몬, 흡연 및 알코올 등은 인체 내 산화적 스트레스를 가중시키고 있다. 이러한 산화적 스트레스는 정상적인 경우에는 체내 항산화 시스템에 의해 제거되어 진다. 그러나 체내 산화-항산화 시스템의 균형이 깨어지게 되면 지질의 과산화, 단백질의 변성, DNA의 손상 및 면역계 교란 등으로 인하여 여러 성인병, 노화 및 암이 유발될 수 있다. 따라서 산화적 스트레스를 억제하고 각종 질병과 노화로부터 예방하기 위하여 항산화제의 섭취에 대한 관심이 증가하고 있다(1).

기존에 많이 사용되고 있는 항산화제로는 butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT)와 같은 합성 항산화제와 토코페롤과 같은 천연 항산화제가 있다. BHT와 BHA는 우수한 항산화력을 지니고 있지만 과량 섭

취 시 암 유발 가능성 등 안전성이 논란이 되고 있으며, 토코페롤은 가격이 높아 이들을 대체할 수 있는 안전하고 경제적인 항산화제의 개발이 요구되고 있다(2). 이에 식품과학 분야에서는 천연 생물자원으로부터 항산화력이 우수한 물질을 탐색하는 연구가 활발히 행해지고 있으며, 나아가 이들 생리활성 소재를 추출하여 첨가한 기능성 식품의 개발에 대한 연구가 진행되고 있다(3). 식물성 식품에 함유된 폴리페놀과 플라보노이드 등의 phytochemicals는 여러 가지 생리활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있는데, 이들은 특히 항산화제로서의 작용이 있으며 식품의 조리 및 가공 중에 생성되는 발암원이 소장에서 흡수되는 것을 감소시켜 암의 발생을 억제한다는 보고도 있다(4,5).

산수유(*Cornus officianalis*)는 층층나무과(*Cornaceae*)의 낙엽교목으로 중국에서 도입된 것으로 알려져 왔으나 최근 우리나라 토종나무임이 밝혀졌으며, 주로 중부이남 지역에

*Corresponding author. E-mail: meerak@knu.ac.kr
Phone: 82-53-950-6233, Fax: 82-53-950-6229

분포하고 있다. 산수유의 열매는 축산초라고도 불리며 윤이 나고 거친 주름이 있는 암적자색 외관에 독특한 냄새와 신맛 및 약간의 단맛이 난다. 생약 산수유는 가을에 익은 산수유의 열매를 따서 씨를 뽑아내고 햇볕에 말린 것을 말한다. 예로부터 생약 산수유는 당뇨병, 요통, 이명 및 폐결핵 등의 치료에 효과가 있고, 신경안정, 이노작용, 혈압강화작용, 항암 및 항균작용 등이 있는 것으로 알려져 있어 중요한 한약제로 많이 사용되어 왔다(6,7).

산수유 추출물에는 ursolic acid, tartaric acid, malic acid 및 glucoside 등이 함유되어 있다(8). Seo 등(9)은 산수유 열수추출물을 150 μ L 농도로 첨가하였을 때 48시간 이상 균의 성장을 완전히 억제하였으며, linoleic acid에 대한 항산화력 조사에서는 10 μ L 첨가 시 0.1% BHT 50 μ L를 첨가한 것과 같은 정도로 강력한 항산화력을 나타내었다고 보고하였다. 그 외에도 동물에서의 항당뇨, 항염증 작용이 있음이 보고되고 있으나(10,11) 항돌연변이나 항암활성에 관련된 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 산수유 에탄올 추출물의 항산화능, 항돌연변이 및 항암 활성을 분석하여 새로운 생리활성 물질의 탐색과 고부가가치의 기능성 식품으로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다. 이를 위해 산수유 에탄올 추출물의 항산화능을 측정하고, Ames test를 이용하여 돌연변이 유발 억제능을 검색하였다. 또한 MTT assay를 이용하여 Hep3B cell과 HeLa cell에 대한 암세포 증식 억제 효과를 비교하여 항암 효과를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

시약

실험에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), dimethyl sulfoxide(DMSO), sodium azide, 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium(MTT), L-ascorbic acid, 2,6'-di-tert-butyl-p-cresol(BHT), hesperitin 및 quercetin(dihydrate)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Folin-ciocalteu's phenol reagent는 Fluka Co.(USA)로부터 구입하였다. Nutrient broth와 agar는 Acumedia(Lansing, Mich, USA)에서 구입하였으며, Minimum Essential Medium(MEM, with L-Glutamine & Earle's Balanced salts)은 Hyclone Co.(USA)로부터, fetal bovine serum은 Gibco BRL(USA)로부터 구입하여 사용하였다.

시료

본 실험에 사용한 산수유 열매는 대구 약령시 한약방에서 음건된 형태로 시판되는 국내산 한약규격품을 구입하였다.

시료 추출

산수유 에탄올 추출물은 건조 시료를 분쇄한 후, 100 g에

70% 에탄올(2 L)을 가하여 실온에서 12시간 추출한 후 여과지(Advantec, Toyo No.2)로 여과하는 과정을 5회 반복하였다. 이 여과액을 회전감압농축기(EYELA, Rikakikai, Co., Japan)로 농축한 후, 동결 건조하였다. 추출 시료는 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)에 녹여 DPPH 라디칼 소거능 측정을 위한 시료로 사용하였고, DMSO에 용해시켜 Ames test를 위한 시료로 사용하였다. 시료는 -20°C 에서 냉동보관하며 실험에 사용하였다(12).

DPPH 라디칼 소거능

산수유 에탄올 추출물의 전자공여능은 Blois(13)의 방법에 의하여 측정되었다. 각 농도별로 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)에 녹인 시료 1 mL와 7.5×10^{-5} M DPPH 2 mL를 혼합하여 배양기(37°C)에서 30분간 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer(Beckman, USA)을 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 측정된 흡광도 값으로부터 먼저 Inhibition concentration(%)=(1-시료첨가구의 O.D/시료무첨가구의 O.D) $\times 100$ 을 구한 다음 $Y=aX+b$ 방정식을 작성하여 다음의 식으로 IC_{50} 값을 구하였다.

$IC_{50}=(0.5-b)/a$ (자유 라디칼의 활성을 50%로 저해하는데 필요한 농도)

돌연변이 및 항돌연변이 활성

Salmonella Typhimurium TA100 균주를 한국 세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 돌연변이 및 항돌연변이능을 측정하였다. 정기적으로 이들 균주의 histidine 요구성, deep rough(rfa) 돌연변이, uvrB 돌연변이와 R factor 등의 유전형질을 확인하였다. 이들 균주는 액체질소에 보관하면서 사용하였다.

돌연변이 유발물질로는 직접돌연변이 물질인 sodium azide와 4-NQO를 사용하였다. Sodium azide(1.5 μ g/plate)는 증류수에 녹여 사용하였고, 4-NQO(0.15 μ g/plate)는 DMSO에 녹여 사용하였다. 돌연변이원의 사용량은 예비실험을 통해 dose response test를 실시하여 최적의 농도를 확인하여 사용하였다.

Maron과 Ames(14)의 방법에 따라 Ames test를 실시하였으며 pre-incubation법으로 산수유 열매의 돌연변이 및 항돌연변이 활성을 측정하였다. 실험 전 master plate에 배양한 균주를 nutrient broth에 접종하여 37°C 에서 약 14~16 시간 동안 진탕 배양한 후 $1 \sim 2 \times 10^9$ cells/mL의 밀도가 되도록 희석하여 사용하였다. 실험에 사용하기 전에 시료의 돌연변이 유발실험을 실시하여 돌연변이능이 나타나지 않는 범위 내에서 시료의 농도를 결정하였다. 모든 실험은 2번 반복하여 실험하였다.

멸균된 cap tube에 변이원 50 μ L와 시료 50 μ L, 균 100 μ L를 넣고 0.2 M phosphate buffer를 이용하여 최종 부피를 700 μ L로 맞추어 준 후 섞어 주었다. 그 후, 37°C shaking

water bath(Vision Co., Korea)에서 30분간 진탕 배양하였다. 각 cap tube에 0.5 mM histidine/biotin이 포함된 top agar 2 mL를 첨가하고 3초간 섞은 후 minimal glucose agar plate에 증충하여 암소에서 굳혔다. 그 뒤 plates를 37°C incubator(SW90B, Sangwoo Scientific Co., Korea)에서 48시간 배양하여 복귀돌연변이 colony 수를 측정하였다. 항돌연변이능은 아래와 같은 식에 의해 산출하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [1 - (\text{복귀돌연변이} / \text{자연복귀돌연변이})] \times 100$$

암세포 성장억제 활성

본 실험에 사용된 암세포주는 인체 간암세포인 Hep3B cell lines과 인체 자궁암세포인 HeLa cell lines이며, 한국세포주은행(KCLB)에서 2007년 8월에 분양받아 사용하였다. 세포 배양액으로는 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-K-streptomycin이 첨가된 MEM을 사용하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 세포가 70~80% 자라나는 3~4일 간격으로 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

산수유 추출물의 암세포 성장억제 효과를 측정하기 위해 Carmichael 등(15)의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 암세포를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well이 되게 180 μL 씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지 100 μL와 각 농도의 시료를 100 μL씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 그 후 각 well에 MTT 용액(5 μg/mL in distilled water)을 20 μL씩 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 각 well 당 DMSO:ethanol(1:1) 용액 150 μL 첨가하여 shaking incubator에서 30분간 교반한 후, ELISA reader(Versamax, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 암세포 성장 억제 효과는 아래와 같이 구하였다. Cytotoxicity(%)=[1-(시료첨가군의 흡광도/시료무첨가군의 흡광도)]×100

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총폴리페놀 함량 측정은 Folin-Ciocalteu(FC)법(16)에 따라 시행되었다. 즉, 증류수 5 mL와 시료 1 mL, FC reagent 0.5 mL를 순서대로 혼합하여 8분간 방치한 후 10 mL의 7% Na₂CO₃를 첨가하였다. 증류수를 이용하여 최종 부피를 25 mL로 맞춘 후 상온에서 2시간 반응시켜 750 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준물질로는 hesperitin을 사용하였다.

총플라보노이드 함량 측정은 Moreno 등(17)의 방법에 따라 행하였다. 10% aluminum nitrate 0.1 mL와 1 M aqueous potassium acetate 0.1 mL, 80% ethanol 4.3 mL를 잘 혼합한 후, 시료 0.5 mL를 첨가하여 실온에 40분 간 방치한 뒤 510 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준물질로는 quercetin을 사용하였다.

통계분석

모든 실험 결과는 SPSS(v. 12.0) 프로그램을 이용하여 처

리하였다. 각 실험군의 평균치간의 차이의 유의성은 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다. 또한 돌연변이능 측정에서 시료와 양성대조군 간의 평균 차이를 검정하기 위해 Student's t-test를 사용하였다.

결과 및 고찰

항산화 활성

DPPH 라디칼은 비교적 안정한 화합물로 항산화 활성을 갖는 물질을 만나면 라디칼이 소거되어 탈색되는 점을 이용하여 항산화 활성을 검정하는데 사용되는 물질이다. DPPH 라디칼 소거 활성법은 식물 추출물의 항산화 활성을 쉽게 측정할 수 있으며 실제로 항산화 활성과 연관성이 매우 높다고 알려져 있다. 산수유 추출물의 농도별 전자공여능을 측정 한 결과는 Fig. 1과 같다.

산수유 에탄올 추출물의 전자공여능은 농도 의존적으로 증가하였다. 산수유 에탄올 추출물은 200 ppm 농도까지는 합성 항산화제인 BHT(64.3%)와 비슷한 전자공여능을 나타내었고, 300 ppm 이상의 농도에서는 BHT(73.4%)보다 높은 항산화 활성을 보였다. 또한 천연항산화제로 알려진 L-ascorbic acid는 저농도에서 높은 전자공여능을 나타내어 초기 항산화 활성은 시료들 중 가장 높았으나, 농도가 높아질수록 산수유 에탄올 추출물의 전자공여능이 증가하여 300 ppm부터는 L-ascorbic acid와 유의한 차이가 없었다.

Kim 등(4)의 연구에서 산수유 메탄올 추출물은 1000 ppm의 농도에서 67%의 전자공여능을 나타내었다. 그리고 산수유 에탄올 추출물의 IC₅₀ 값은 154 ppm으로 산수유 메탄올 추출물의 IC₅₀ 값인 189.3 ppm보다 낮아(18) 본 실험의 에탄올 추출물이 더 높은 항산화 활성을 보였다. 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보이는 물질에는 폴리페놀처럼 구조 중에

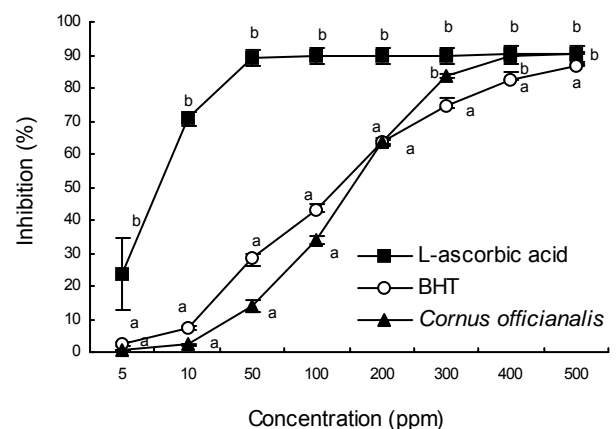


Fig. 1. The electron donating ability of ethanol extract from *Cornus officianalis* using the DPPH assay. Mean with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test at the same concentration. All experiments were independently performed triplicate.

hydroxyl group을 포함하며 DPPH 라디칼과 반응하기에 적합한 입체 구조를 가지는 화합물이 존재한다고 알려져 있다 (19). 따라서 본 실험에서 산수유 에탄올 추출물이 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보인 것도 산수유 추출물에 포함된 폴리페놀류 및 플라보노이드 화합물과 연관이 있을 것으로 사료된다.

돌연변이 및 항돌연변이 활성

Ames 실험계에서 산수유 에탄올 추출물의 돌연변이 유발 억제 효과를 직접 돌연변이원인 sodium azide와 4-NQO를 사용하여 염기쌍 치환 변이주인 *Salmonella* Typhimurium TA100으로 실험하였다. 직접 돌연변이원은 세포내 DNA 정보 발현에 직접적으로 이상을 일으켜 돌연변이를 유발시키는 물질이다. 산수유 에탄올 추출물은 본 실험 농도인 0.5, 1, 5 mg/mL에서는 돌연변이를 유발하지 않았으나 (Table 1) sodium azide와 4-NQO와 같은 돌연변이원은 대조군에 비해 복귀돌연변이의 숫자를 유의하게 증가시켰다.

산수유 에탄올 추출물의 sodium azide에 대한 항돌연변이 효과는 Table 2에 나타난 바와 같다. Sodium azide 사용 시 산수유 첨가 농도 0.5, 1, 5 mg/mL에서 각각 14.5, 21.6, 25.5%의 저해효과를 나타내었다. 4-NQO의 경우에는 추출물 농도가 증가할수록 저해효과가 농도 의존적으로 높아지는 경향을 보여주었다. 산수유 추출물 0.5, 1, 5 mg/mL 첨가

Table 1. The mutagenic activity induced by extracts from *Cornus officianalis* in *Salmonella* Typhimurium TA100

Extracts/Mutagens	Concentration	His ⁺ ¹⁾
Spontaneous revertants		186.3±8.8
<i>Cornus officianalis</i>	0.5 mg/mL	197.5±8.5
	1 mg/mL	193.0±4.0
	5 mg/mL	166.5±6.5
Sodium azide	1.5 µg/plate	1223.7±49.7*
4-NQO	0.15 µg/plate	1197.3±108.3*

¹⁾His⁺: mean number±SD of histidine positive revertant colonies on plates.

*The value is significantly different from that of the control value at p<0.05 by Student's t-test.

Table 2. The inhibitory effect of ethanol extract from *Cornus officianalis* on the mutagenicity induced by sodium azide (1.5 µg/plate) in *Salmonella* Typhimurium TA100

Amount of extracts (mg/mL)		His ⁺ ¹⁾	Inhibition rate (%)
Sodium azide	None	1223.7±49.7	
	None	141.0±10.7	
	0.5	1066.5±71.5 ^{a2)}	14.5
	1	990.0±77.0 ^b	21.6
	5	947.5±19.5 ^c	25.5

¹⁾Data were expressed as means±SD of histidine positive revertant colonies on plates.

²⁾Values in the same column with the different case letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

시 돌연변이 유발 저해효과는 각각 15%, 20%, 76.7%로 나타났다 (Table 3). 따라서 본 실험 결과, 산수유 에탄올 추출물은 *S. Typhimurium* TA100에 대해 직접돌연변이원 4-NQO에 대한 항돌연변이 효과가 우수한 것으로 나타났다.

산수유 에탄올 추출물의 4-NQO에 대한 항돌연변이 활성은 Ahn 등(20)에 의해 보고된 생약제 빈랑의 항돌연변이 활성(71%)과 비슷한 수준이었고, Park 등(21)에 의해 보고된 환삼덩굴 메탄올 추출물의 항돌연변이 활성(19.7%)보다 높게 나타났다. Sodium azide에 대한 산수유 추출물의 항돌연변이 활성은 Ahn 등(20)에 의해 보고된 단삼의 항돌연변이 활성(26%)과 비슷하였고, Moon 등(22)의 백굴채나 갈대의 직접돌연변이에 대한 항돌연변이 활성보다 높게 나타났다. 또한, 산수유 에탄올 추출물은 돌연변이 활성 억제능이 높다고 알려진 톳, 다시마, 미역, 김, 파래 등의 해조류보다 낮은 농도에서 직접변이원에 대한 높은 항돌연변이 활성을 나타내었다(23). 한편, Lee 등(24)의 연구에서 보고된 녹황색 채소들의 4-NQO에 대한 항돌연변이 활성은 대부분 산수유보다 낮았고, 상치(78%)와 풋고추(89%), 피망(82%), 비름(92%), 콩나물(94%)만이 산수유보다 높은 항돌연변이 활성을 보였다.

항돌연변이 물질은 발암원의 흡수를 방해하거나 발암원이 DNA에 결합하여 DNA adducts를 형성하는 것을 감소시킴으로 암 발생을 억제시키는 것으로 알려져 있다(25). 이에 따라 산수유 추출물의 보호 효과를 두 가지로 설명해 볼 수 있는데, 첫 번째는 발암원의 흡수의 경우와 같은 방식으로 산수유 추출물이 돌연변이원의 흡수를 방해하는 것이며 또 하나는 산수유 추출물이 DNA-repair system을 향상시키는 화합물을 함유하고 있을 가능성이 있다.

산수유 추출물의 항돌연변이능은 DPPH 라디칼 소거능을 통해 나타난 강력한 항산화 활성의 결과와 잘 일치하므로, 산수유 에탄올 추출물은 자유 라디칼에 의해 유도된 돌연변이 유발을 감소시킬 수 있을 것으로 보인다.

암세포 성장억제 활성

MTT 실험은 살아있는 세포의 효소 작용에 의해 MTT가

Table 3. The inhibitory effect of ethanol extract from *Cornus officianalis* on the mutagenicity induced by 4-NQO (0.15 µg/plate) in *Salmonella* Typhimurium TA100

Amount of extracts (mg/mL)		His ⁺ ¹⁾	Inhibition rate (%)
4-NQO	None	1369.7±46.1	
	None	96.3±19.8	
	0.5	421.0±9.0 ^{a2)}	15.1
	1	419.0±20.5 ^b	20.0
	5	388.0±0.0 ^c	76.6

¹⁾Data were expressed as means±SD of histidine positive revertant colonies on plates.

²⁾Values in the same column with the different case letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

환원되어 formazan crystal로 침전되는 정도를 흡광도로 측정하여 암세포의 사멸 또는 증식 억제 정도를 측정하는 방법이다. 인체 간암세포인 Hep3B cell과 인체 자궁경부암 세포인 HeLa cell에 산수유 에탄올 추출물을 농도별로 첨가하여 암세포 증식 억제 정도를 알아본 결과는 Fig. 2와 같다.

산수유 에탄올 추출물은 간암 세포와 자궁암 세포의 증식을 농도 의존적으로 억제하였다. 산수유 에탄올 추출물을 700 µg/plate 첨가 시 간암 세포와 자궁암 세포의 성장을 각각 83과 77.8% 저해하였다. 산수유 에탄올 추출물은 두 가지 암세포 중에서 간암 세포인 Hep3B 세포에 대한 항암 활성이 더 큰 것으로 나타났다.

산수유는 다른 연구에서도 암세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났는데 Kim 등(26)은 인체 폐암 세포주인 A549와 인체 유방암 세포주인 MCF-7을 대상으로 산수유 에탄올 추출물의 chloroform 층으로부터 항암 활성 물질을 분리하여 암세포 성장 억제 효과를 측정된 결과 이들이 암세포주의 성장을 억제하였으며 산수유 추출물이 apoptosis에 의해 암세포의 사멸을 유도하였음을 시사하였다. 한편, Kim 등(27)의 연구에서 인체 간암세포인 Hep3B 세포에 대한 홍경천의 생존 억제 효과가 72%로 보고되어 산수유 에탄올 추출물의 항암효과가 더 큰 것으로 나타났다.

암을 유발하는 발암원의 90% 이상이 돌연변이원으로 돌연변이의 억제효과는 발암 억제와 밀접한 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 항돌연변이원은 질병과 유전독성물질에 의해 유도되는 돌연변이를 차단하여 암의 예방에 기여하므로 매우 중요하다(28). 본 실험 결과, 산수유 에탄올 추출물은 직접돌연변이원인 4-NQO에 대하여 강한 항돌연변이 활성뿐 아니라 암세포에 대한 성장 억제 효과 또한 높게 나타나 암을 예방할 수 있는 기능성 소재로서의 가능성을 보여

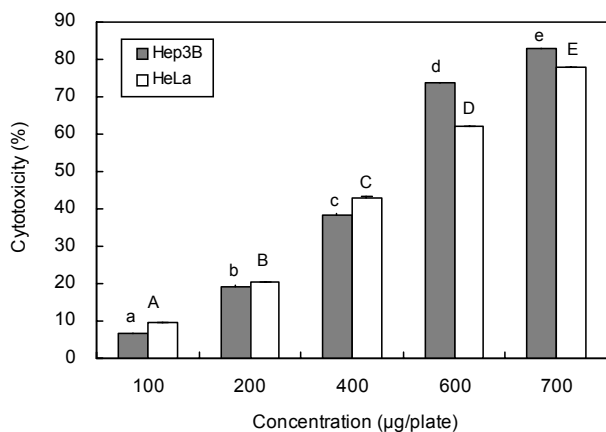


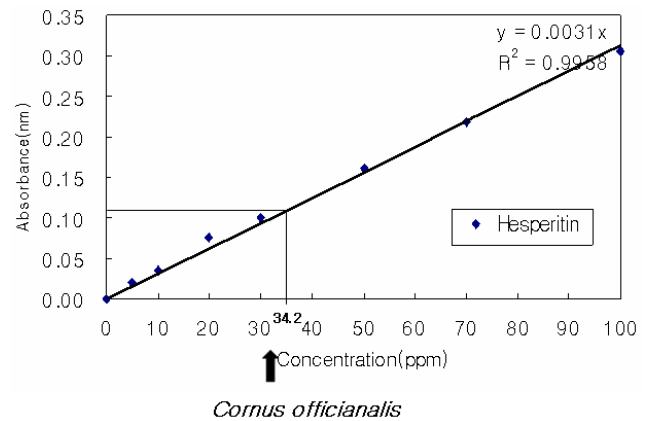
Fig. 2. Cytotoxicity of the ethanol extracts from *Cornus officinalis* on the growth of human hepatocellular carcinoma (Hep3B) and human uterine carcinoma (HeLa) cell lines. Values in the same cell line with the different upper case letters (A~E) and with lower case letters (a~e) are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test, respectively. All experiments were independently performed triplicate.

주었다.

총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량

산수유추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Fig. 3에 제시되어있다. 산수유 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 34.22 mg/g이고 총 플라보노이드 함량은 5.67 mg/g으로 총 플라보노이드 함량보다 총 폴리페놀 함량이 6배 이상 높게 나타났다. Ju 등(29)의 연구 결과에서 산수유 열수추출물의 총 페놀화합물 함량은 2.79 mg/100 g, 플라보노이드 함량은 1.81 mg/100 g으로 본 연구의 에탄올 추출물이 더 많은 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있는 것으로 나타났다. 또한 산수유 에탄올 추출물의 폴리페놀 함량은 황기, 구기자 및 작약 에탄올 추출물보다 높았으며 국화, 당귀 및 천궁 에탄올 추출물보다는 낮았다(30). 참마, 오미자, 등글레, 하수오, 황기 및 황정 열수 추출물의 플라보노이드 함량을 측정된 연구결과와 비교 시, 본 연구의 산수유 에탄올 추출물이 플라보노이드를 더 많이 함유하고 있는 것으로 나타났다(4).

(A)



(B)

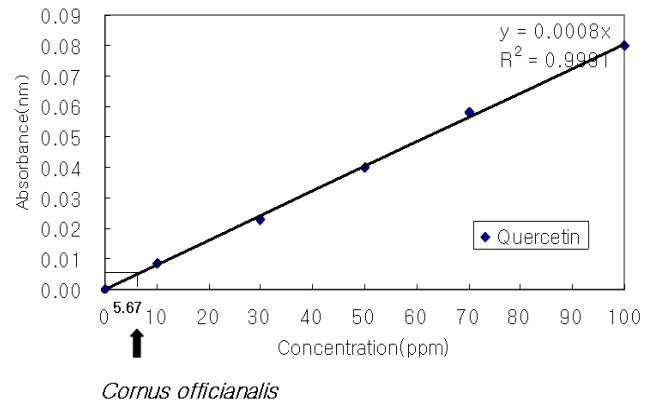


Fig. 3. Contents of total polyphenols (A) and flavonoids (B) of ethanol extracts from *Cornus officinalis*.

Absorbance were read by spectrophotometer using hesperitin and quercetin as standards for total polyphenol and flavonoids, respectively. Data were expressed as mean ± SD (n=3). All experiments were independently performed triplicate.

천연 자연물에서 얻어지는 항산화성 물질은 주로 페놀화합물과 플라보노이드 화합물로 특히 caffeic acid와 chlorogenic acid 등이 강한 항산화 효과가 있음이 보고되었다. 식물계에 널리 분포되어 있는 페놀성 화합물은 다양한 구조와 분자량을 가지고 있다. 그 중에서 phenolic hydroxyl기는 단백질 분자처럼 거대 분자와 결합하여 항산화, 항균 및 항암 등의 생리기능을 가지는 것으로 보고되고 있으며(31), 플라보노이드는 UV 광선, 해충 및 미생물로부터 식물체를 보호하고, 항산화, 효소 활성 조절 작용 및 식물체의 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(32). 일부 플라보노이드 화합물은 alkylperoxy 라디칼 소거능을 가지는데 이는 자유라디칼로 인해 발생하는 여러 질환과 발암을 억제시키는 것으로 알려져 있다(33).

한편, 여러 연구에서 DPPH 라디칼 소거능과 폴리페놀 화합물 함량 사이에 유의한 상관관계가 있음이 보고되고 있다(34). Jeong(35)에 의하면 프로폴리스에서 분리된 플라보노이드 화합물인 7-O-methyl-3',4'-didehydroxy quercetin과 quercetin은 농도 의존적으로 항산화 활성을 나타내었고, Yoon 등(36)은 일본잎갈나무 심재부로부터 분리한 플라보노이드 성분인 taxifolin, quercetin, aromadendrin의 높은 DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 플라보노이드 화합물들의 항산화 활성을 확인하였다. 또한, Kwak 등(32)은 한국산 메밀, 수수, 기장, 울무의 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거반응에서의 IC₅₀ 값 사이에 유의적인 음의 상관관계를 보고함으로써 플라보노이드가 항산화 활성과 관계가 있음이 보여주었다.

본 연구에서 산수유 에탄올 추출물은 다른 일부 생약재들에 비해 비교적 높은 함량의 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있으며 이는 산수유의 항산화능, 항돌연변이 및 항암 활성에 영향을 미칠 것으로 사료되었다. 그러나 동결건조한 산수유의 성분 분석 시 6.44 mg/g의 비타민 C가 함유되어 있다고 보고한 Kim(37)의 결과로 볼 때 산수유의 항산화 활성에 폴리페놀과 플라보노이드 외에 비타민 C를 비롯한 다른 항산화 물질의 영향도 있었을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 산수유 에탄올 추출물의 항산화능, 항돌연변이 및 항암활성을 분석하여 새로운 생리활성 물질의 탐색과 고부가가치의 기능성식품으로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다. 산수유 에탄올 추출물의 전자공여능은 농도 의존적으로 증가하여 500 ppm의 농도에서는 합성항산화제인 BHT보다 높았고 천연항산화제인 L-ascorbic acid와 유사하였다. 뿐만 아니라, *S. Typhimurium* TA100에 대해 산수유 에탄올 추출물은 직접돌연변이원인 4-NQO 사용 시 항돌연변이 효과가 우수한 것으로 나타났다. 또한, 산수유 에탄올 추출물은 700 µg/plate 첨가하였을 때 인체 간암 세

포와 자궁경부암 세포의 증식을 모두 78% 이상 억제하였다. 산수유 에탄올 추출물은 비교적 높은 함량의 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있어, 이들 물질이 항산화와 항암효과에 영향을 미칠 것으로 사료되었다. 그러나 산수유에는 비타민 C를 비롯한 다른 항산화 성분도 함유되어 있으므로 이들의 항산화성도 추출물의 항산화력에 영향을 주었을 것으로 생각된다. 결론적으로, 산수유 에탄올 추출물은 항산화능과 항돌연변이 활성이 있었으며 인체 간암세포, 자궁경부암 세포 및 대장암 세포에 대해 항암 활성이 있는 것으로 나타나 기능성식품의 소재로서의 이용 가능성을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 2단계 Brain Korea 21 사업에 의해 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Jung DS. 2003. Player's training of physical strength and reactive oxygen. *J Sports Sci* 86: 32-39.
- Branen AL. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole. *J Am Oil Chem Soc* 52: 59-63.
- Oh HS, Kim JH. 2006. Development of functional soy-based stew sauce including hot water extract of *Cornus officinalis* S. et Z. *Korean J Food Culture* 21: 550-558.
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, SR Kim, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 333-338.
- Bors W, Saran M. 1987. Radical scavenging by flavonoid antioxidant. *Free Rad Res Comm* 2: 289-294.
- Park YK, Whang WK, Kim IH. 1995. The antidiabetic effects of from *Cornus officinalis* seed. *Chung-Ang J Pharm Sci* 9: 13-22.
- Chung SR, Jeune KH, Park SY, Jang SJ. 1993. Toxicity and lectins constituents from the seed of *Cornus officinalis*. *Korean J Pharmacogn* 24: 177-182.
- Kim YH. 1999. Isolation of constituents from the fruits of *Cornus officinalis*. *Siebold* 14: 287-292.
- Seo KI, Lee SW, Yang KH. 1999. Antimicrobial and antioxidant activities of *Corni Fructus* extracts. *Korean J Postharvest Sci Technol* 6: 99-103.
- Dai Y, Hang B, Huang Z. 1992. Inhibition of *Corni fructus* on experimental inflammation. *Chung Kuo Chung Yao Ts Chih* 17: 307-309.
- Yamahara J, Mibu H, Sawada T, Fujimura J, Takino S. 1981. Antidiabetic principles of *Corni Fructus* experimental diabetes induced by streptozotocin. *Yakugaku Zasshi* 101: 86-90.
- Han SH, Woo NR, Lee SD, Kang MH. 2006. Antioxidative and antibacterial activities of endemic plants extracts in Korea. *Korean J Med Crop Sci* 14: 49-55.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated

- colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942.
16. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1998. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylene benzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Method Enzymol* 299: 379-389.
 17. Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
 18. Lee SE, Seong NS, Bang JK, Park CG, Sung JS, Song J. 2003. Antioxidative activities of Korean medicinal plants. *Korean J Med Crop Sci* 11: 127-134.
 19. Chen JH, Ho CT. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J Agric Food Chem* 45: 2374-2378.
 20. Ahn BY, Kim DG, Choi DS. 1999. Antimutagenic effect of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27: 197-202.
 21. Park SW, Kim SH, Chung SK. 1995. Antimutagenic effects and isolation of flavonoids from *Humulus japonicus* extract. *Korean J Food Sci Technol* 27: 897-901.
 22. Moon SH, Park KY, Chung HY, Young HS. 1995. Antimutagenic effects of traditional herbal drugs on the aflatoxin B₁. *J Food Hyg Safety* 10: 219-224.
 23. Kim SA, Kim J, Woo MK, Kwak CS, Lee MS. 2005. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 451-459.
 24. Lee KI, Park KY, Rhee SH. 1992. Antimutagenic effect of green-yellow vegetables toward aflatoxin B₁ and 4-nitroquinoline-1-oxide. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 143-148.
 25. Steele VE, Kelloff GJ. 2005. Development of cancer chemopreventive drugs based on mechanistic approaches. *Mutat Res* 591: 16-23.
 26. Kim BH, Park KW, Kim JY, Jeong IY, Yang GH. 2004. Purification and characterization of anticarcinogenic compound from *Corni fructus*. *Korean J Food Sci Technol* 36: 1001-1007.
 27. Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Bae GJ, Ahn JH. 2006. Increase effect of anticancer activities on *Rhodiola sachalinensis* A. Bor by the change of extraction process. *Korean J Medicinal Crop Sci* 14: 317-321.
 28. Kim SA, Kim J, Woo MK, Kwak CS, Lee MS. 2005. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 451-459.
 29. Ju JC, Shin JH, Lee SJ, Cho HS, Sung NJ. 2006. Antioxidative activity of hot water extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 7-14.
 30. Park YS. 2002. Antioxidant activities and contents of polyphenolic compound of medicinal herb extracts. *J East Asian Soc Dietary Life* 12: 23-31.
 31. Cuvelier ME, Richard H, Berset C. 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J Am Oil Chem Soc* 3: 645-652.
 32. Kwak CS, Im SJ, Kim SA, Park SC, Lee MS. 2004. Antioxidative and antimutagenic effects of Korean buckwheat, sorghum, millet and Job's tears. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 921-929.
 33. Jimenez-Escrig A, Rincon M, Pulido R, Saura-Clixto F. 2001. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *J Agric Food Chem* 49: 5489-5493.
 34. Iqbal S, Bhanger MI, Anwar F. 2005. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chem* 93: 265-272.
 35. Jeong IY. 2005. Antioxidant activity and radioprotection of two flavonoids from propolis. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 162-166.
 36. Yoon SY, Lee HJ, Lee SS, Choi DH, Paik KH. 2000. Studies on biological activity of wood extractives (V) - Identification of flavonoids from the heartwood of *Larix leptolepis* and their antioxidative activities. *Mokchae Konhak* 28: 78-84.
 37. Kim MJ. 1992. Comparative studies on nutrients in *Lycil Fructus* and *Corni Fructus* by the different drying methods. *MS Thesis*. Sookmyung Women's University, Seoul, Korea.

(2007년 11월 1일 접수; 2008년 1월 3일 채택)