

연수 추출물과 Kaempferol의 항산화 및 항암작용에 관한 연구

한두석¹, 전성우¹, 김현진^{1,2*}

1: 원광대학교 치과대학 2: 원광대학교 생명공학연구소

Study on the Antioxidant and Anticancer Effects of Extract of Stamens of *Nelumbo nucifera* and Kaempferol

Du-Seok Han¹, Sung-Woo Jeon¹, Hyun-Jin Kim^{1,2*}

1: Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University

2: Institute of Biotechnology, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives : The present study was performed to clarify the antioxidant and anticancer effects of extract of stamens of *Nelumbo nucifera* and Kaempferol.

Methods : Antioxidant effect was measured by DPPH-radical scavenging activity for electron donating ability (EDA), superoxide dismutase (SOD)-like activity for SOD and lipid peroxidation. Anticancer effect was assessed by MTT absorbance for cytotoxicity.

Results : Vitamin E, Kaempferol and ethyl acetate extract of stamens of *Nelumbo nucifera* increased SOD-like activity and DPPH-radical scavenging activity dose-dependently. On the contrary, lipid peroxidation was time-dependently decreased. Furthermore, Kaempferol and ethyl acetate extract of stamens of *Nelumbo nucifera* significantly decreased the growth rate of C6 glioma cells.

Conclusions : These results suggest that ethyl acetate extract of stamens of *Nelumbo nucifera* may be a putative antioxidant or anticancer substance.

Key words : *Nelumbo nucifera* stamens, Kaempferol, Antioxidant, Anticancer

서 론

성인병 중 암, 고혈압, 당뇨병 및 노화 등은 생체 내에서 생성되는 활성산소종(O₂⁻, H₂O₂, OH⁻)이 지질 이중층의 세포막을 공격하여 과산화반응을 촉진시켜 세포막의 손상을 초래함으로써 여러 가지 생리적 장애

를 발생시키는 것으로 알려져 있다¹⁾. 사람이 젊었을 때는 지질과산화 반응을 억제할 수 있는 비타민 C 나 E와 같은 항산화물질이 많이 존재하기 때문에 생리적 장애 발생이 드물지만 나이가 들어감에 따라 항산화 물질의 감소 또는 독성물질의 생성으로 인한 생체 내 항산화 방어시스템이 원활하게 작동되지 않아

* 교신저자 : 김현진, 전북 익산시 신용동 244-2 원광대학교 치과대학 구강해부학교실

· Tel : 063-850-6910 · E-mail : khjin1005@wonkwang.ac.kr

· 접수 : 2009년 1월 28일 · 수정 : 2009년 3월 18일 · 채택 : 2009년 3월 20일

여러 가지 질환의 발생 빈도가 높아질 수 있다²⁾. 보고에 의하면 여러 포유류의 수명은 지질과산화 반응의 속도와 밀접한 관계가 있는 것으로 밝혀지고 있으며, 특히 사람은 생체 내 지질과산화 반응을 억제할 수 있는 항산화 물질, 즉 비타민 E (tocopherol)가 많이 존재하기 때문에 다른 포유류 보다 수명이 길다는 것이 밝혀졌다³⁾.

특히 노화나 암, 심혈관계 및 신경계 질환을 일으키는 것으로 알려진 활성산소(reactive oxygen species: ROS)는 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학 반응과 같은 환경적 및 생화학적 요인들에 의하여 인체 내의 안정한 상태의 산소가 전환되어 세포구성 성분을 비가역적으로 파괴한다고 알려져 있다^{4,5)}. 이들 활성산소의 작용은 체내 방어기구인 슈퍼옥사이드 디스무타제 (superoxide dismutase, SOD), 카탈라아제(catalase), 퍼옥시다아제(peroxidase), 글루타치온(glutathione) 등과 같은 항산화성 효소 및 비타민 C (vitamin C, ascorbic acid), 비타민 E (tocopherol) 등 항산화 물질의 작용에 의하여 최소화 될 수 있다. 그러나 이러한 생체 방어력에 이상이 생기거나 과도한 활성산소에 노출될 경우, 활성산소가 생체에 치명적인 산소독성을 일으켜서 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨씨병과 같은 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 산화적 스트레스가 노화를 비롯한 각종 질환을 일으키는 중요한 원인으로 밝혀지면서 생체 내 활성산소를 제거하는 항산화제에 대한 관심이 점차 증가하고 있다.

최근 피부 노화의 원인에 관련된 학설 중 활성산소와 관련된 자유기이론(free radical theory)이 주목 받고 있다⁶⁾. 생체가 방사선에 노출되거나 여러 효소반응에 의해서 생성되는 자유산소기(O_2^- , H_2O_2 , OH^-)는 단백질의 -SH기와 반응해서 효소의 활성을 잃게 하거나 가교결합의 촉진, DNA, RNA, 효소 및 세포막에 손상을 일으켜 세포사를 유발한다⁷⁾. 또한 나이가 들어감에 따라 증가하는 자유산소기에 의해 세포 구성성분에 손상을 초래하여 돌연변이, 효소활성의 저하 및 세포막의 변화를 가져와 노화를 유발한다고 알려져 있다⁸⁾.

노화와 관련지어 항산화 물질 중의 하나로 알려진 연수는 연꽃의 수술을 말하며 연수에는 Kaempferol과 여러종류의 Kaempferol 유도체(Kaempferol 3-O-glucoside, Kaempferol 3-O-galactoside, Kaempferol 3-O-glucucronic acid 등)가 함유된 것으로 보고되고 있다⁹⁾. Kaempferol은 식물성 성분 중 flavonoids이며

flavonoids는 과일, 채소 및 차에서 분리되는 항산화 물질이다¹⁰⁾. 또한 Kaempferol은 연수에서 뿐만 아니라 다양한 식물의 줄기, 꽃, 잎에서도 분리된다¹¹⁻¹³⁾. Kaempferol은 A ring, B ring 및 C ring으로 구성(구조식 참고)되며 A ring의 5번과 7번에, B ring의 4번에, C ring에 3번과 4번에 수산기(OH)가 결합되어 있다. 이들 수산기가 공유 결합하면서 항산화 작용, 중금속의 해독작용, 항암작용 및 항염증작용 등 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다^{12,14-19)}.

Jung 등¹²⁾은 연수뿐만 아니라 산복사나무(*Prunus davidiana*)에서 분리한 Kaempferol이 활성산소 생성을 억제하는데 그 이유는 Kaempferol의 A ring, B ring 및 C ring에 결합된 수산기 때문이며 Li YL 등²⁰⁾은 청미래 덩굴의 줄기(*Smilax china* L. rhizome)에서 분리한 Kaempferol 유도체인 Kaempferol-7-O-beta-d-glucoside (KG)는 암세포인 HeLa cell의 분화를 억제하는데 이는 세포고사(apoptosis)에 의하여 야기된다고 하였다. Gates 등¹⁰⁾은 차와 brocoli에서 분리되는 Kaempferol은 난소암 예방에 중요한 역할을 한다고 보고 하였다.

본 연구는 Kaempferol이 함유되어 있는 연수의 ethyl acetate 추출물과 Kaempferol의 생리활성(항산화 작용과 항암작용)과 그 기전을 명확히 밝히기 위하여 전자공여능, 슈퍼옥사이드 디스무타제 유사활성 및 지질과산화능을 측정하여 항산화 효과를 측정하여 비타민 E의 항산화능과 비교하였으며 별야교종세포에 대한 항암효과를 측정하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH), pyrogallol, linoleic acid, ammonium thiocyanate, Folin-Ciocalteu reagent, sodium nitrite, sulfanilic acid, α -naphthylamine, sodium carbonate 그리고 gallic acid 및 kaempferol (Fig. 1)은 Sigma (ST. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 기타 시약은 분석용 등급 이상의 시약을 사용하였다. 세포배양에 사용한 minimum essential medium (MEM)과 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 및 fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, fungizone 시약은

Gibco (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 정량에 사용한 시약은 Sigma (ST. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

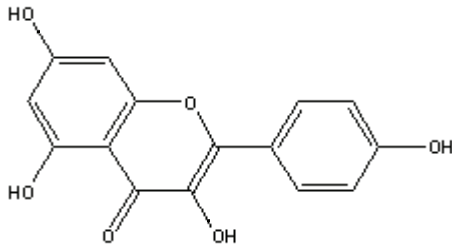


Fig. 1. Kaempferol

2) 연수추출물 제조

본 실험 재료인 연수(Fig. 2)는 전주시 덕진구 전미동에서 재배한 연꽃의 일부이다. 연꽃의 연수를 23.4 g을 파쇄한 후 수용성 ethanol과 ethyl acetate에 각각 3배량을 가하여 24시간, 6회씩 추출한 다음, 이 추출액을 여지로 여과하여 여액을 rotatory evaporator (36°C)에 농축하여 ethanol 추출물 2.6 g (11%), ethyl acetate 추출물 1.8 g (7.7%)을 얻었다. 이 중 ethyl acetate 추출물만 실험에 사용하였다.



Fig. 2. Nelumbo nucifera Stamens

3) 기기

세포의 배양은 CO₂ incubator (Vision scientific Co., Bucheon, Korea)를 사용하였으며, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기(Marienfeld Co., Mergentheim, Germany)를 이용하였다. MTT 정량에는 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 사용하였다.

4) 세포배양

Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물의 항암 효과를 측정하고 비교하기 위하여 원광대학교 의과대학 해부학교실에서 분양받은 별아교종세포(C₆ glioma)는 MEM배지에 10% fetal bovine serum, penicillin (25 unit/ml) 및 fungizone을 첨가하여 사용하였다. 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 분리한 후, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 5×10⁴ cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

2. 방법

1) 전자공여능 측정

전자공여능(electron donating ability)은 Blois 방법²¹⁾에 의한 DPPH free radical 소거법으로 측정되었다. 즉 시료는 메탄올에 녹여 준비하고 메탄올에 녹인 0.6 mM DPPH 용액을 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 양을 IC₅₀으로 하여 나타내었으며 100-[(시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)×100]으로 표시하였다.

2) 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 유사활성 측정

Marklund와 Marklund의 방법²²⁾에 따라 각 농도별 시료(0.2 mL)에 Tris-HCl buffer (50 mM tris [hydroxymethyl]amino-methane containing 10 mM EDTA, pH 8.5, 3 mL)와 10 mM pyrogallol (0.2 mL)을 가하고 25°C에서 10분간 방치하였으며, 1 N HCl (1 mL)로 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 슈퍼옥사이드 디스뮤타제의 유사활성은

100-[(시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)×100]으로 나타내었다.

3) 지질과산화 측정(Ferric thiocyanate: FTC method)

지질과산화는 Kikuzaki와 Nakatani의 방법²³⁾에 따라 측정되었다. 즉 시료(3.9 mL)와 에탄올(4 mL)을 혼합하고, 에탄올에 녹인 2.52% linoleic acid (4.1 mL)와 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0, 8mL)을 첨가하여 40°C에서 암조건을 유지시켰다. 24시간 배양 후, 이 반응액(0.1 mL)을 취하여 75% 에탄올(9.7 mL)과 30% ammonium thiocyanate (0.1 mL)을 혼합하고 3.5% HCl에 녹인 0.02 M ferrous chloride (0.1 mL)을 가한 다음, 실온에서 3분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료대신 증류수를 가하여 측정하였으며, 대조구의 흡광도가 최고치를 나타낼 때까지 24시간 단위로 흡광도를 측정하였다.

4) MTT 정량분석방법

Mosmann의 방법²⁴⁾에 의하여, 별아교종세포(C₆ glioma)를 각 배양용기에 5×10⁴ cells/mL 세포수를 넣고 24시간 배양 후 연수 추출물인 ethyl acetate 추출물과 Kaempferol의 세포독성을 측정하기 위하여 위 시료를 각각 농도별로 첨가하여 48시간 배양한 후 분석 당일 조제한 MTT 50 µg/mL가 포함된 배양액을 배양 용기당 1 mL씩 넣고 3시간 배양 후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide (DMSO)를 2 mL/well씩 넣어 5분간 실온 방치하여 MTT formazan을 용해한 후, 흡광도는 540 nm에서 분광광도계 ELISA reader로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다. Fig. 3에 개략적인 실험방법을 정리하였다.

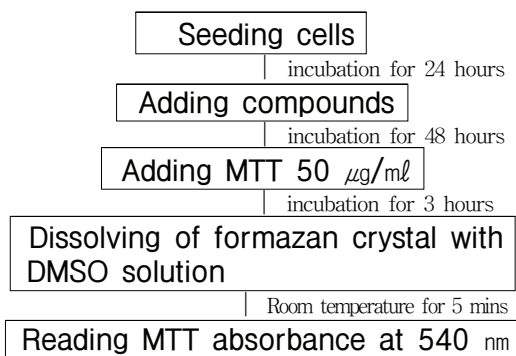


Fig. 3. Flow scheme of MTT assay

5) IC₅₀ 결정

연수 추출물과 Kaempferol의 IC₅₀ 결정은 배양 중인 별아교종세포(C₆ glioma)를 각 배양용기당 5×10⁴ cells/mL씩 넣고 24시간 배양 후 1, 25, 50, 75, 100 µM의 연수 추출물과 Kaempferol를 첨가하여 48시간 배양한 후 MTT 정량을 하여 이들 각각에 대한 50% 억제농도인 IC₅₀을 회귀방정식에 의해 구하였다.

6) 통계처리

실험결과의 통계처리는 Students' t-test를 시행하였고 p-value가 0.05미만 일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 전자공여능

일반적으로 항산화능은 자유라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력, 즉 DPPH의 전자공여능을 측정하는 방법이 이용된다. 지금까지 활성산소와 자유라디칼 생성을 억제하기 위하여 사용되고 있는 비타민 E와 연수 속에 다량 함유되어 있는 것으로 알려진 Kaempferol 및 ethyl acetate 연수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 환원시키는데 필요한 시료량(RC₅₀, 50 reduction concentration)으로 측정된 결과 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물은 각각 2.672 uM, 3.754 uM 및 6.283 uM이었다. 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물은 Table 1에서 보는 바와 같이 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능을 증가시켰고 DPPH 라디칼 소거능의 증가속도가 거의 비례하였으며 각각의 대조군과 비교한 결과 DPPH 라디칼 소거능은 비타민 E > Kaempferol > 연수의 ethyl acetate 추출물 순이었다 (Table 1, Fig. 4).

2. 슈퍼옥사이드 디스뮤타제의 유사활성

항산화 효소 중의 하나인 슈퍼옥사이드 디스뮤타제는 세포에 해로운 Superoxide를 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이다. 슈퍼옥사이드 디스뮤타제는 30 KDa 이상의 분자량을 가진 단백질로 체

Table 1. DPPH Radical Scavenging Activity of Vitamin E, Kaempferol and Ethyl Acetate Extract of *Nelumbo nucifera* stamens

Group Conc.(uM)	Vitamin E	Kaempferol	Ethyl acetate extract
Control	2.773 ± 0.08 (100)	2.428 ± 0.03 (100)	2.958 ± 0.12 (100)
1	1.410 ± 0.12 (49)	1.301 ± 0.06 (46)	1.473 ± 0.09 (50)
25	1.098 ± 0.09 (60)**	1.140 ± 0.04 (53)**	1.417 ± 0.06 (52)
50	0.718 ± 0.04 (74)***	0.885 ± 0.05 (64)***	1.303 ± 0.04 (56)**
75	0.268 ± 0.02 (90)***	0.626 ± 0.02 (74)***	1.163 ± 0.06 (61)***
100	0.138 ± 0.00 (95)***	0.384 ± 0.01 (84)***	1.052 ± 0.03 (64)***
IC ₅₀	2.672 uM	3.754 uM	6.283 uM

The values represent the mean ± standard deviations (% of DPPH radical scavenging activity) for triplicate experiments. Significantly different from the 1 uM value. ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (Students' t-test).

Table 2. SOD-like Activity of Vitamin E, Kaempferol and Ethyl Acetate Extract of *Nelumbo nucifera* Stamens (% of control)

Group Conc.(uM)	Vitamin E	Kaempferol	Ethyl acetate extract
Control	0.111 ± 0.00 (100)	0.141 ± 0.00 (100)	0.108 ± 0.00 (100)
1	0.131 ± 0.00 (18)	0.162 ± 0.00 (15)	0.118 ± 0.00 (09)
25	0.135 ± 0.00 (21)*	0.167 ± 0.00 (19)*	0.122 ± 0.00 (13)**
50	0.148 ± 0.00 (34)***	0.175 ± 0.01 (25)***	0.123 ± 0.00 (14)**
75	0.161 ± 0.00 (45)***	0.218 ± 0.01 (55)***	0.124 ± 0.00 (15)**
100	0.182 ± 0.00 (65)***	0.240 ± 0.01 (71)***	0.125 ± 0.00 (16)**

The values represent the mean ± standard deviations (% of SOD-like activity) for triplicate experiments. Significantly different from the 1uM value. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (Students' t-test).

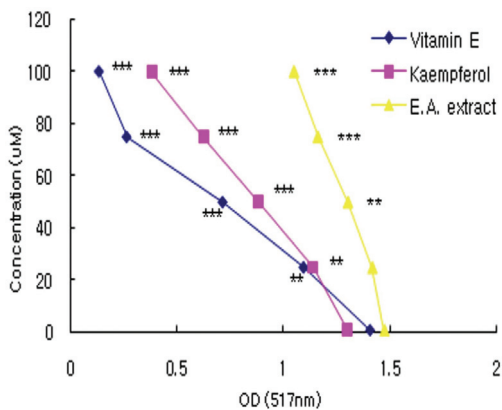


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of vitamin E, Kaempferol and Ethyl acetate extract of *Nelumbo nucifera* stamens

The values represent the mean ± standard deviations (% of DPPH radical scavenging activity) for triplicate experiments. Significantly different from the 1uM value. ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (Students' t-test).

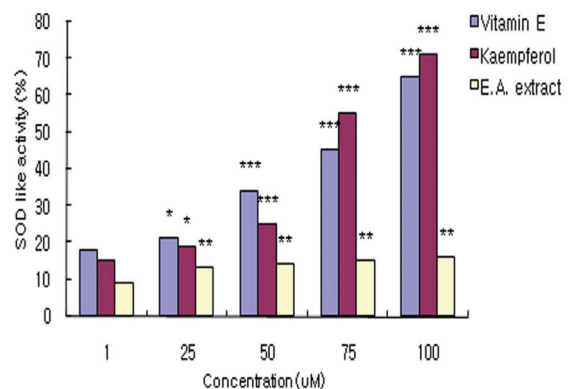


Fig. 5. SOD-like activity of vitamin E, Kaempferol and Ethyl acetate extract of *Nelumbo nucifera* stamens

The values represent the mean ± standard deviations (% of SOD-like activity) for triplicate experiments. Significantly different from the 1uM value. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (Students' t-test).

Table 3. Lipid Peroxidation of Vitamin E, Kaempferol and Ethyl acetate extract of *Nelumbo nucifera* stamens During Storage 40°C (% of Control)

Group	Control	Vitamin E	Kaempferol	Ethyl acetate extract
Incubation time (hour)				
0	0.0023±0.00(100)	0.0048±0.00(100)	0.0033±0.00(100)	0.0050±0.00(100)
24	0.0117±0.00(500)	0.0035±0.00(74)**	0.0028±0.00(85)**	0.0043±0.00(85)**
48	0.0187±0.01(700)	0.0033±0.00(68)**	0.0015±0.00(46)***	0.0040±0.00(80)**
72	0.0280±0.00(1350)	0.0018±0.00(37)***	0.0010±0.00(31)***	0.0038±0.00(75)***
96	0.0410±0.01(2100)	0.0005±0.00(11)***	0.0008±0.00(23)***	0.0015±0.00(30)***

The values represent the mean ± standard deviations (Lipid peroxidation) for triplicate experiments. Significantly different from the control value. ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (Students' t-test).

내에 흡수되지 않고 체외로 배출되며 열과 pH에 불안정하므로 이러한 단점을 보완할 수 있는 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 유사활성물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다. 연수에서 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 유사활성물질을 찾기 위하여 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물의 슈퍼옥사이드 디스뮤타제의 유사활성을 측정하였다. 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물의 슈퍼옥사이드 디스뮤타제의 유사활성은 농도 의존적으로 증가하였고 증가비율은 비례하였으며 100 μ M에서의 증가비율은 Kaempferol > 비타민 E > 연수의 ethyl acetate 추출물 순이었다. 1 μ M 농도의 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 유사활성을 기준으로 유의성을 검정한 결과 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물 모두에서 유의한 차이가 있었다(Table 2, Fig. 5).

3. 지질과산화 측정

지질의 산화에 의하여 생성된 hydroperoxide가 촉매력이 강한 전이 금속들에 의하여 분해되어서 생성되는 alkoxy radicals (RO), peroxy radicals (ROO), hydroxy radicals (OH) 및 malondialdehyde 및 4-hydroxynonenal 등은 간접적으로 단백질과 DNA의 손상을 일으킬 뿐만 아니라 노화와 암 발생의 중요한 인자가 되기도 한다. 이 원리를 이용하여 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물의 지질과산화를 측정하여 비교하였다. 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물은 시간이 경과함에 따라 대조군의 지질과산화의 증가에 반하여 지질과산화가 감소하였다. 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물의 지질과산화능은 24시간째에 각각 67%, 75%

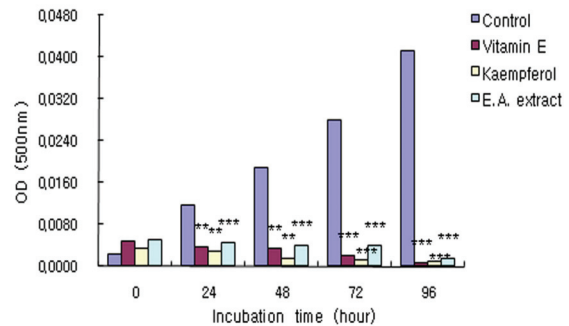


Fig. 6. Lipid peroxidation of vitamin E, Kaempferol and Ethyl acetate extract of *Nelumbo nucifera* stamens during storage 40°C

The values represent the mean ± standard deviations (Lipid peroxidation) for triplicate experiments. Significantly different from the control value. ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (Students' t-test).

및 67%이었고 96시간째에는 각각 98%, 98% 및 95%이었으며 24시간째부터 각각 유의한 차이가 있었다 (Table 3, Fig. 6).

4. 항암효과

수산화, 카르복실기 및 메톡시기가 결합된 페놀화합물과 플라보노이드는 암세포주에 대한 성장억제효과가 높은 것으로 보고되고 있다. 플라보노이드인 Kaempferol과 Kaempferol이 다량 함유된 것으로 알려진 연수의 ethyl acetate 추출물을 별야교종세포에 처리한 후 MTT정량분석법으로 흡광도를 측정한 결과 Kaempferol과 연수의 ethyl acetate 추출물은 별야교종세포의 성장률을 농도 의존적으로 감소시켰으며 100 μ M 농도에서는 Kaempferol이 57%까지 ethyl acetate 추출물이 70%까지 감소시켰다. Kaempferol과

Table 4. Inhibitory Effects of Kaempferol and Ethyl Acetate Extract of *Nelumbo nucifera* stamens by MTT Assay on C6-glioma Fibroblasts

Group Concentration (uM)	Kaempferol	Ethyl acetate extract
Control	3.970±0.01(100)	3.950±0.01(100)
1	3.866±0.01(97)	3.189±0.00(81)*
25	3.451±0.01(87)**	3.080±0.00(78)**
50	2.984±0.01(75)***	2.972±0.00(75)**
75	2.647±0.01(67)***	2.827±0.00(72)**
100	2.257±0.01(57)***	2.754±0.00(70)***
IC ₅₀	226.501 uM	268.570 uM

The values represent the mean ± standard deviations (% of MTT assay) for triplicate experiments. Significantly different from the control value. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (Students' t-test).

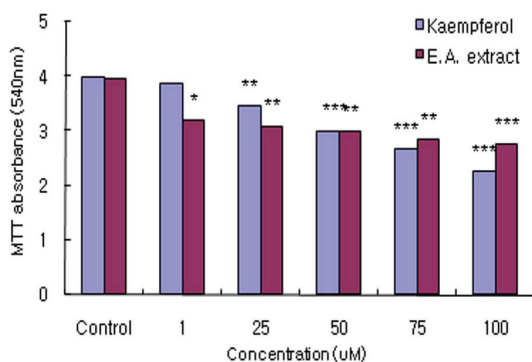


Fig. 7. MTT assay of Kaempferol, Ethyl acetate extract of *Nelumbo nucifera* stamens

The values represent the mean ± standard deviations (% of MTT assay) for triplicate experiments. Significantly different from the control value. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (Students' t-test).

ethyl acetate 추출물의 IC₅₀농도는 각각 226.5 uM과 268.6 uM였다(Table 4, Fig. 7).

고찰

고령화 사회에 진입하면서 건강하게 살기 위한 노력이 증가하고 있다. 규칙적인 운동은 물론 인체의 신진대사에 유익한 음식을 섭취하기 위한 연구뿐만 아니라 노인성 질환, 성인병 및 노화로부터 인체를 보호하기 위한 연구도 계속되고 있다.

노화란 생체의 기능과 신진대사가 스트레스에 대한 적응능력이 감소하는 현상으로 외부에서 가장 쉽

게 확인 할 수 있는 현상은 얼굴의 피부색이 불균일해지거나 피부가 건조해지고 각질이 많아진다. 최근 이러한 피부 노화의 직접적인 원인으로 활성산소가 주목 받고 있다⁶⁾. 생체가 자외선에 노출되거나 다양한 스트레스를 받게되면 인체 내 여러 가지 효소반응에 의하여 자유산소기(O₂⁻, H₂O₂, OH⁻)가 생성되고 이들 자유산소기는 단백질의 -SH기와 반응하여 효소의 활성을 상실 하거나 가교 결합의 촉진, DNA, RNA 효소 및 세포막에 손상을 일으켜 세포사를 유발하는 것으로 보고되고 있다⁷⁾. 인체 내에 생성되는 자유산소기가 노화를 유발하는 것으로 알려지게 됨으로써⁸⁾ 자유산소기에 대한 연구가 집중되었으며 그 결과 비타민 E (α-tocopherol), BHT, BHA, PG, TBHQ, 비타민 C (ascorbic acid) 등이 자유산소기를 제거할 수 있는 항산화제로 알려져 있다²⁵⁾. 이들 중 항산화효과가 뛰어난 BHT와 BHA는 돌연변이원성과 독성이 있어²⁶⁾, 최근에는 항산화제로의 사용이 감소되고 있는 실정이며 비타민 E와 비타민 C는 제품으로 생산되고 있으나 약과 같이 먹어야 하는 불편함이 있다. 따라서 비교적 안정적으로 쉽게 섭취할 수 있는 천연 항산화제를 식물성 성분으로부터 개발하기 위한 연구가 시도되고 있다. 그 대표적인 예로 유근피, 오배자, 황금, 천마, 머루종자, 고려엉겅퀴, 화살나무 등에서 항산화 효과가 보고되고 있다²⁷⁾.

비타민 E는 가장 강력한 지방용해성 항산화제로 세포막의 지질과산화물을 억제할 수 있고²⁸⁾ 자유산소기인 유해분자물질을 파괴하는 기능이 있음이 보고되었으며²⁹⁾ Royack 등³⁰⁾은 세포의 산소화적 손상을 감소시킨다고 보고하였다. 또한 비타민 E는 비타민 C와 함께 chlorpyrifos-ethyl (CE)에 의하여 증가하는 지질과산화물을 감소시킬수 있다고 보고되었다³¹⁾. 따라서, 본 연구에서는 비타민 E의 이러한 효과 때문에 Kaempferol과 연수의 ethyl acetate의 항산화효과에 대한 비교 대조군으로 선정하였다.

플라보노이드인 Kaempferol은 각종 스트레스에 의하여 유발되는 DNA손상을 방해하는 강력한 항산화제이며 항암 및 항 바이러스 효과도 있는 것으로 보고되고 있다³²⁾. Kaempferol은 식물의 줄기, 꽃 및 잎에서 분리되고 있으며^{9,11,12)} 항산화작용^{9,11-13)}, 간세포 보호¹³⁾, 항염증¹³⁾, 항당뇨¹³⁾ 및 암세포에 대한 세포독성^{10,13)} 등 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고되었다. 특히 수련과 연의 꽃에서 분리한 Kaempferol은 항산화 작용, 신경보호 효과 및 항암작용이 강한 것으로 보고되었다.

각종 식물로부터 추출물을 추출하는 데는 다양한 용매제인 에탄올, 메탄올, 부탄올, ethyl acetate 등이 사용되는데 이들 용매제를 사용한 추출물은 생리활성이 약간씩 다르게 나타난다. ethyl acetate를 이용한 추출물의 생리활성은 비교적 다른 용매제에 의한 추출물보다 생리활성이 좋은 것으로 보고되었다³³⁾. 이에 본 연구에서는 연수의 ethyl acetate 추출물을 선정하여 항산화작용과 항암작용을 측정하여 비타민 E와 Kaempferol의 효과와 비교하였다.

비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 비교한 결과 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물은 각각 2.672 uM, 3.754 uM 및 6.283 uM이었다. 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물은 Table 1에서 보는 바와 같이 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능을 증가시켰고 DPPH 라디칼 소거능의 증가속도가 거의 비례하였으며 DPPH 라디칼 소거능은 비타민 E > Kaempferol > 연수의 ethyl acetate 추출물 순이었다. 1 uM 농도에서 DPPH 라디칼 소거능을 기준으로 대조군 100%에 이르는 유의성을 검정한 결과 비타민 E, Kaempferol은 25 uM농도에서 유의한 차이가 있었으며, 연수의 ethyl acetate 추출물은 50 uM농도에서 유의한 차이가 있었다.

연수의 ethyl acetate 추출물에는 Kaempferol뿐만 아니라 Kaempferol 3-O-glucuronic acid, Kaempferol 3-O-glucoside 및 Kaempferol-3-O-galactoside 등도 함유하고 있는 것으로 알려져 있어 Kaempferol과 연수의 ethyl acetate 추출물의 IC₅₀농도에 차이가 있는 것으로 판단되며 연수는 우수한 전자공여능을 갖고 있어 항산화 작용을 나타낸다고 생각하였다.

슈퍼옥사이드 디스무타제 유사활성을 측정된 결과 유사활성은 농도 의존적으로 증가하였고 증가비율은 농도에 비례하였으며 100 uM에서의 증가비율은 Kaempferol > 비타민 E > 연수의 ethyl acetate 추출물 순이었다. 1 uM농도의 슈퍼옥사이드 디스무타제 유사활성을 기준으로 유의성을 검정한 결과 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물 모두에서 25 uM에서 유의한 차이가 있었다.

김 등³⁴⁾은 화살나무 메탄올 추출물의 지질과산화의 관련한 항산화 효과를 검토하기 위하여 linoleic acid의 추출물을 첨가하여 40°C에서 96시간 동안 지질과산화물을 흡광도(500 nm)로 측정하였다. 그 결과 대조군은 24, 48, 96 시간 후 0.779, 0.789, 1.442로 흡광도가 측정되었고 0.2 mg/mL의 추출물을 첨가하였을

때에는 각각 0.244, 0.267, 0.291로 흡광도가 나타나 대조군에 비해 추출물 첨가구의 지질과산화수치가 각각 68.69%, 66.16%, 79.83%로 유의성 있게 감소되었고 비타민 E도 유사하였다고 보고하였다.

김 등³⁵⁾은 37°C에서 24시간 동안 저장한 linoleic acid에 대한 20종의 약용식물 물추출물의 항산화 활성을 측정된 결과 음양곽·오미자·당귀·해동피·토자사 등이 1 mg/mL 농도에서 70% 이상의 높은 항산화 활성을 나타냈다고 보고하였다.

본 연구에서는 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물은 시간이 경과함에 따라 대조군의 지질과산화의 증가에 반하여 지질과산화가 감소하였다. 지질과산화의 시간경과에 따른 감소는 비타민 E ≥ Kaempferol > 연수의 ethyl acetate 추출물 순이었다. 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물의 지질과산화능은 24시간째에 각각 67%, 75% 및 67% 이었고 96시간째에는 각각 98%, 98% 및 95%이었으며 24시간째부터 각각 유의한 차이가 있었으므로, Kaempferol과 연수의 ethyl acetate 추출물은 우수한 지질과산화능이 있음을 관찰하였다. Gultekin 등³¹⁾도 비타민 E와 비타민 C는 Chlorpyrifos-ethyl에 의하여 증가하는 지질과산화를 감소시킬 수 있다고 보고하였다.

Kaempferol과 연수의 ethyl acetate 추출물을 별야교종세포에 처리한 후 48시간째 MTT 흡광도를 측정하여 IC₅₀농도를 산정한 결과 Kaempferol과 연수의 ethyl acetate 추출물은 IC₅₀농도는 각각 226.5 uM과 268.6 uM 농도였다. 이 결과는 Borenfreund 등³⁵⁾의 독성 판정 기준에 의하면 중간독성으로 판정할 수 있어 연수의 ethyl acetate 추출물은 우수한 항암효과가 있는 것으로 판정하였다.

Kaempferol의 항암효과에 대하여는 상피세포 암¹³⁾ 및 난소암¹⁰⁾ 등에 다양하게 보고되고 있다. 항산화 작용과 항암작용을 나타내는 기전에 대하여는 주로 Kaempferol의 구조와 활성과의 관계로 알려져 있다. Jung 등¹²⁾은 Kaempferol의 A ring, B ring, C ring에 결합된 수산기에 의하여 활성산소종(ROS)의 생산을 억제하고 Montana 등¹⁸⁾은 C3와 C7에 결합된 수산기가 O₂의 생산을 억제하나 B ring의 3-4'에 결합된 수산기는 O₂의 생산억제와는 관계가 없다고 보고하였으며, Wang 등¹⁹⁾은 B ring의 3' 4' catechol moiety가 항산화에 관여하고 특히 B ring의 4'에 결합된 수산기가 중요한 역할을 한다고 보고하였을 뿐만 아니라 플라보노이드의 구조와 항암작용과의 관계에 관한 연

구도 다양하게 보고되었다³⁶⁾.

항산화 작용이 있는 페놀산과 플라보노이드가 항암작용이 있는 것으로 보고되고 있는데 Kaempferol도 구조식에 수산기, 3'4' catechol moiety 및 4' 위치에 수산기가 결합하고 있으며 C ring의 1 위치의 O와 A ring의 7의 위치의 수산기와 B ring 4' 위치의 수산기가 항암작용을 나타낸다고 생각할 수 있다.

연수의 ethyl acetate 추출물에는 Kaempferol과 Kaempferol 유도체가 함유되어 있으며 항산화작용과 항암작용이 나타나는 것으로 판단되며 해독효과도 나타날 것으로 생각한다. 이를 바탕으로 지속적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

결 론

연수 추출물과 Kaempferol의 항산화능과 항암효과를 확인할 목적으로 항산화능은 전자공여능을 확인할 수 있는 DPPH 라디칼 소거능, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제를 확인 할 수 있는 슈퍼옥사이드 디스뮤타제의 유사활성 및 지질과산화능으로 측정하였다. 항암효과는 MTT 흡광도를 측정하여 세포독성을 산정하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물은 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능을 증가시켰고, DPPH 라디칼 소거능의 증가속도는 비례하였으며, DPPH 라디칼 소거능은 비타민 E > Kaempferol > 연수의 ethyl acetate 추출물 순이었다. DPPH 라디칼 소거능을 각각의 대조군과 비교한 결과 비타민 E, Kaempferol은 25 uM농도에서 통계학적으로 유의한 차이가 있었으며, 연수의 ethyl acetate 추출물은 50 uM 농도에서 통계학적으로 유의한 차이가 있었다.
2. 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물의 슈퍼옥사이드 디스뮤타제의 유사활성은 농도 의존적으로 증가하였고, 증가비율은 비례하였으며, 100 uM에서의 증가비율은 Kaempferol > 비타민 E > 연수의 ethyl acetate 추출물 순이었다. 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 유사활성은 각각의 대조군과 비교한 결과 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물 모두에서 25 uM에서 통계학적으로 유의한 차이가 있었다.

3. 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물은 시간이 경과함에 따라 대조군의 지질과산화의 증가에 반비례하여 지질과산화가 감소하였다. 비타민 E, Kaempferol 및 연수의 ethyl acetate 추출물의 지질과산화능은 24시간째에 각각 67%, 75% 및 67% 이었고, 96시간째에는 각각 98%, 98% 및 95%이었으며 24시간째부터 각각 통계학적으로 유의한 차이가 있었다.
4. Kaempferol과 연수의 ethyl acetate 추출물은 별아교종세포의 성장률을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 100 uM 농도에서는 Kaempferol이 57%까지 ethyl acetate 추출물이 70%까지 감소시켰다. Kaempferol과 Ethyl acetate 추출물의 IC₅₀농도는 각각 226.5 uM 과 268.6 uM 농도였다.

이상의 결과에서 연수의 ethyl acetate추출물은 우수한 항산화능과 항암효과가 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행되었으며 이에 감사를 드린다.

참고문헌

1. Acharya K, Samui K, Rai M, Dutta BB, Acharya R. Antioxidant and nitric oxide synthase activation properties of *Auricularia auricula*. *Indian J Exp Biol.* 2004 ; 42(5) : 538-40.
2. Cardoso SM, Rego AC, Penacho N, Oliveira CR. Apoptotic cell death induced by hydrogen peroxide in NT2 parental and mitochondrial DNA depleted cells. *Neurochem Int.* 2004 ; 45(5) : 693-8.
3. Ozdil S, Yanardag R, Koyuturk M, Bolkent S, Arbak S. Protective Effects of Ascorbic Acid, di- α -Tocopherol Acetate, and Sodium Selenate on Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury of Rats. *Bio Trace Elem Res.* 2004 ; 99(1-3) : 173-90.
4. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D.

- Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.* 1987 ; 107 : 526-45.
5. Adelman R, Saul LR, Ames NB. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 ; 85 : 2706-08.
 6. Chung HY, Yokozawa T. Study on Antioxidative and Antimutagenic Mechanism of Epicatechin 3-O-gallate Isolated from Green Tea. *Korean Society of Food Science and Technology.* 1995 ; 3 : 65-81.
 7. Harman D. Aging; A theory based on free radical and radical chemistry. *J Gerontology.* 1956 ; 11 : 298.
 8. Barry H, Okezie IA, Ellis H. DNA and free radical. West Sussex, England : Ellis Horwood. 1993 ; 1.
 9. Jung HA, Kim JE, Chung HY, Choi JS. Antioxidant principles of *Nelumbo nucifera* stamens. *Arch Pharm Res.* 2003 ; 26(4) : 279-85.
 10. Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2007 ; 121(10) : 2225-32.
 11. Prakash D, Suri S, Upadhyay G, Singh BN. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. *Int J Food Sci Nutr.* 2007 ; 58(1) : 18-28.
 12. Jung HA, Jung MJ, Kim JY, Chung HY, Choi JS. Inhibitory activity of flavonoids from *Prunus davidiana* and other flavonoids on total ROS and hydroxyl radical generation. *Arch Pharm Res.* 2003 ; 26(10) : 809-15.
 13. Marzouk MS, Soliman FM, Shehata IA, Rabee M, Fawzy GA. Flavonoids and biological activities of *Jussiaea repens*. *Nat Prod Res.* 2007 ; 21(5) : 436-43.
 14. Kajiya K, Ichiba M, Kuwabara M, Kumazawa S, Nakayama T. Role of lipophilicity and hydrogen peroxide formation in the cytotoxicity of flavonols. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001 ; 65(5) : 1227-9.
 15. Nakayama T, Yamada M, Osawa T, Kawakishi S. Pression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochem Pharmacol.* 1993 ; 45(1) : 265-7.
 16. Silva MM, Santos MR, Caroço G, Rocha R, Justino G, Mira L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a reexamination. *Free Radic Res.* 2002 ; 36(11) : 1219-27.
 17. Kaneko T, Baba N. Protective effect of flavonoids on endothelial cells against linoleic acid hydroperoxide-induced toxicity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999 ; 63(2) : 323-8.
 18. Montaña MP, Pappano N, Giordano SO, Molina P, Debattista NB, García NA. On the antioxidant properties of three synthetic flavonols. *Pharmazie.* 2007 ; 62(1) : 72-6.
 19. Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem.* 2006 ; 54(26) : 9798-804.
 20. Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Huang YP, Liu YW, Liu JW. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome *in vitro* anticancer effects on human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol.* 2007 ; 113(1) : 115-24.
 21. Blois MS. Antioxidant determination by the use a stable free radical. *Nature.* 1958 ; 26 : 1199-263.
 22. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974 ; 47 : 468-74.
 23. Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci.* 1993 ; 58 : 1407-10.
 24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 ; 65(1-2) : 55-63.
 25. Dziezak JD. Antioxidants. *Food Technol.* 1986 ; 40 : 94-102.
 26. Branen AL. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc.* 1975 ; 52 : 59-63.

27. Hah DS, Kim CH, Kim GS, Kim EG, Kim JS. Antioxidant effects of traditional medicinal plants on lipid peroxidation. *Korean J Ver Res.* 2005 ; 45(3) : 341-50.
28. Mason B, Ghanee N, Haigh WG, Lee SP, Oda D. Effect of vitamins A, C and E on normal and HPV-immortalized human oral epithelial cells in culture. *Anticancer Res.* 1999 ; 19(6B) : 5469-74.
29. Behari JR, Gupta S, Srivastava S, Srivastava RC. Modulation of liposomal lipid peroxidation in presence of nickel by incorporation of alpha-tocopherol in the bilayer. *J Microencapsul.* 1991 ; 8(2) : 215-20.
30. Royack GA, Nguyen MP, Tong DC, Poot M, Oda D. Response of human oral epithelial cells to oxidative damage and the effect of vitamin E. *Oral Oncol.* 2000 ; 36(1) : 37-41.
31. Gultekin F, Delibas N, Yasar S, Kilinc I. *In vivo* changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch Toxicol.* 2001 ; 75(2) : 88-96.
32. Kanakis CD, Tarantilis PA, Polissiou MG, Diamantoglou S, Tajmir-Riahi HA. An overview of DNA and RNA bindings to antioxidant flavonoids. *Cell Biochem Biophys.* 2007 ; 49(1) : 29-36.
33. 한두석, 백경현, 김영옥, 최규은,곽정숙, 백승화, 한국산 생약으로부터 항암물질의 개발(제6보). 금은화 Ethyl Acetate 가용성 분획의 인체 구강유상피암중세포에 미치는 세포독성작용. *생약학회지.* 1998 ; 29(1) : 22-7.
34. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol.* 2004 ; 36(2) : 333-8.
35. Boernfreund E, Babichi H, Matin-Alcuacil N. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assay. The neutral red(NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro.* 1998 ; 2 : 1.
36. 한두석, 오상걸, 오은상. 페놀산의 구조가 암세포에 대한 세포독성에 미치는 영향. *독성학회지.* 2003 ; 19(1) : 44-50.