

Antimutagenicity and Immuno Activity of Extracts from *Epimedium koreanum* Nakai Containing Different Icariin Quantity

Myoung-Su Park¹, Seo-Jin Kim¹, Fereidoun Forghani¹, S.M.E. Rahman¹, Ji-Hyun Eo²,
Jong-Bang Eun² and Deoghwan Oh^{1*}

¹Dept. of Food Science and Biotechnology, School of Biotechnology and Bioengineering
and Institute of Bioscience & Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Dept. of Food Science and Technology and Functional Food Research Center
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Icariin 함량에 따른 삼지구엽초 추출물의 항돌연변이 및 면역활성

박명수¹ · 김서진¹ · 페레이둔 포가니¹ · 라 만¹ · 어지현² · 은종방² · 오덕환^{1*}

¹강원대학교 바이오산업공학부 식품생명공학과

²전남대학교 식품공학 · 기능성식품연구센터

Abstract

Epimedium koreanum Nakai is a wild herb commonly consumed in South Korea due to its beneficial health effects. In the present study, the antimutagenic and immunoactivities of extracts from *E. koreanum* Nakai containing different icariin quantities were investigated for food use. In the Ames test, both the water and ethanol extracts were found not to have a mutagenic effect on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, respectively. The *E. koreanum* Nakai extracts showed over 80 and 90% antimutagenic effects on benzo(a)pyrene (B(a)P) in *S. typhimurium* TA98 and TA100, respectively. Moreover, all the extracts showed over 70% antimutagenicity on *S. typhimurium* TA98 and TA100 against 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO). The *E. koreanum* Nakai extract with ethanol showed strong antimutagenic activity, higher than that of the water extract and the sequenced KE9412, KE9408, and KE9405. In the immunomodulating activity test, the effect of *E. koreanum* Nakai on the B (Rhamos) and T (Jukat) cells were investigated. The immunoactivity results showed that the growth and viability of the B and T cells increased and were activated more in KE9405 (1.8 times), KE9408 (1.6 times), and KE9412 (1.32 times) in the water extracts, and least in KE9412 (1.74 times), KE9408 (1.52 times), and KE9405 (1.4 times) in the ethanol extracts. In the case of both the water and ethanol extracts (500 µg/mL) from *E. koreanum* Nakai, the highest cell number of the human B (Rhamos) and T (Jukat) cells was observed on day 4 in KE9405 and KE9412, and on day 5 in KE9408. Based on the obtained results, the development of *E. koreanum* Nakai as a food material is recommended.

Key words : *Epimedium koreanum* Nakai, icariin, Ames test, MTT assay

서 론

삼지구엽초(*Epimedium koreanum* Nakai)는 매자나무과 (*Berberidaceae*) 삼지구엽초속(*Epimedium* L)의 다년생 천근성 초본으로 온대지방에 약 20여종이 분포하며 우리나라에는 *Epimedium koreanum* Nakai 종이 있으며 주로 경기,

강원 중북부지역을 중심으로 자생하고 있다. 초장은 30 cm 내외로 줄기의 가지가 세 개로 1가지에 3개의 잎이 달려 삼지구엽(三指九葉)초라 하며 잎은 잎자루가 길고 난형이고 끝이 뾰족하며 밑 부분이 심장형으로서 가장자리에 털 같은 잔 톱니가 있다. 꽃은 황백색으로 4~5월에 총상화서로 아래를 향해 피는데 그 모양이 밑을 향한 배의 닳 모양과 같아 닳풀 이라고도 한다. 꽃받침은 8개이고 꽃잎은 4개이며 1개의 암술과 4개의 수술이 있다(1). 열매는 6월에 결실하게 되는데 1 삭과당 3~1개의 작은 종자가 있으며 지하경

*Corresponding author. E-mail : deoghwa@kangwon.ac.kr
Phone : 82-33-250-6457, Fax : 82-33-2241-0508

은 지표면에서 10 cm 내외의 깊이에 분포하며 구불구불 옆으로 뻗으며 잔뿌리가 많다. 용도로는 관상용, 약용으로 쓰이고 관상초 및 한방과 민간에서 잎과 줄기 및 전초, 강장이노, 창종, 생목, 장근골, 건망증, 음위 및 강정 등에 약재로 쓰이고 있다(2).

삼지구엽초의 주성분은 flavonoid인 icariin(3,4), quercetin, anhydroicaritin-3-O- α -rhamnoside, n-alkanes, phytosterols, phytosteryl glucosides, epimedin C, epimedin, icariside A1, maltol, salidroside, epimedin I, icaritin-3-O- α -rhamnoside, ikarisoside A-F 등이 분리 보고(5,6)되었다. 이중 icariin은 삼지구엽초의 주요 약효성분으로 고혈압과 간독성을 억제한다는 보고(7)가 있으며, flavonoid glycoside인 epimedin A, B 및 C가 추가로 보고(8)되었다. 또한 말초혈관을 확장시켜 지속성이 뚜렷한 혈압강화작용을 나타내며 항이노작용이 있다(9). 삼지구엽초에 대한 연구로는 잎과 생육 특성을 비교한 것(10), 일부지역에서의 자생지 식생 및 환경 특성 조사(12,13), 일부 생약성분의 구명(14) 등이 있다. 식품분야에서는 항산화제라면 유지의 산화억제 혹은 지연이라는 제한된 의미로 사용되고 있으나 근래에는 산화억제 혹은 지연기능이 생체 내에서도 발현될 수 있음이 알려지면서 여러 가지 생리적 장애를 억제하는데 관여하는 것으로 보고하였다(15).

최근 국민소득의 향상과 환경의 악화 등 사회적 변화에 따라 건강에 대한 관심도가 고조되면서 각종 건강보조식품이 개발되고 그 수요 또한 증가하고 있는 실정이다(14). 그 중에서도 삼지구엽초는 앞에서 언급한 바와 같이 이용성이 높은 식물임에도 불구하고 국내에는 삼지구엽초에 대하여 과학적으로 주로 연구된 바 없으며 다만 한방에서 약재 첨가물로서 일부 사용되고 있을 뿐이다. 이처럼 삼지구엽초는 항산화, 항암, 간기능 증진, 고혈압 억제효과 등 생리활성이 높아 활용성이 더욱 높은 것으로 판단되며, 이는 주성분인 icariin 함량 차이가 주원인인 것으로 보고되어 있으나(9), 삼지구엽초의 항돌연변이 및 면역활성에 관한 연구는 아직 미비하다. 따라서 본 연구에서는 삼지구엽초를 기능성식품 소재로서 활용하기 위하여 주성분인 icariin 함량에 따른 삼지구엽초 추출물의 항돌연변이 및 면역활성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 삼지구엽초(*Epimedium koreanum* Nakai)는 경기도 농업기술원에서 재배되고 있는 삼지구엽초를 icariin 함량의 차이에 따라 KE9405(icariin 함량 0.20%), KE9408(icariin 함량 0.40%)와 KE9412(icariin 함량 0.59%) 품종을 제공받아 본 실험에 사용하였다(15).

추 출

삼지구엽초의 뿌리, 줄기, 잎 중 뿌리와 줄기는 증류수로 2-3차례 수세한 다음 음건하였고, 잘게 세절하였다. 이들 시료를 일정량 취하여 삼각플라스크에 넣고, 10배의 증류수를 사용하여 열수추출에서는 90°C에서 7시간 동안 2회 환류 추출하였고, 에탄올 추출은 70% 에탄올을 첨가하여 50°C에서 3시간동안 2회 환류 추출한 다음 No. 2 여과지로 각각 여과하였다. 여과액을 감압농축기를 사용하여 농축 후 동결건조기로 건조시킨 다음 본 실험에 사용하였다.

돌연변이원성 및 항돌연변이원성 실험

변이원성 및 항돌연변이원성 실험에 사용한 균주 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100은 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양 받아 사용하였다. 변이원성 및 항돌연변이 원성 실험은 Ames test를 개량한 preincubation mutagenicity 방법(16)으로 실시하였다. 건열 멸균시킨 glass cap tube에 각각의 삼지구엽초 추출물 50 μ L씩 가하고, TA culture 배지에서 하룻밤 배양된 균주 100 μ L를 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 전체량이 700 μ L가 되도록 하였다. Histidine/biotin이 첨가된 top agar를 2 mL씩 각 tube에 붓고 3초간 vortex하고 minimal glucose agar plate 상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이(his⁺ revertant colony) 수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다. 항 돌연변이 실험에 사용된 발암물질은 B(a)P 및 4NQO를 사용하였다. 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 icariin 50 μ L를 첨가한 다음 하룻밤 배양된 균주를 100 μ L씩 주입한 후, 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 전체량이 700 μ L가 되도록 하였다. 이것을 20분간 preincubation한 다음 histidine/biotin이 첨가된 45°C의 top agar를 2 mL씩 각 tube에 붓고 minimal glucose agar plate 상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이 수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다. 돌연변이 억제효과의 정도(inhibition rate)는 아래의 식에 의하여 계산하였으며, 대조구로는 삼지구엽초 추출물을 첨가하지 않은 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하여 균 생육억제 유무를 판정하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [(a - b) / (a - c)] \times 100$$

여기서 a는 돌연변이원에 의하여 유도된 복귀돌연변이의 수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀돌연변이의 수이다.

MTT assay에 의한 면역활성

본 실험에 사용한 면역 증진 효과 검증세포는 인간 면역

세포인 T-cell (Molt-4)과 B-cell (Rhamos)을 이용하여 검증하였다. 삼지구엽초 추출물의 면역 증진 효과는 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetra-zolium bromide (MTT; Sigma, St Louis, MD, USA) assay(17, 18)와 24 well plate에 세포를 2.0×10^4 cells/mL의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 8일 동안 배양시키며 매일매일 각 well의 cell을 hemacytometer로 세포수를 측정하여 생육증강도를 측정하는 두 가지 방법을 사용하였다. MTT assay는 세포의 생육을 측정하는 방법으로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase에 의해 황색 수용성 물질인 MTT로부터 purple formazan이 생성되는 원리를 이용하였다. 이를 위해 각 세포주는 4×10^4 cells/mL의 농도로 조절하고 96 well plate에 cell을 100 μ L씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후, 시료를 농도별로 20 μ L씩 첨가하여 2-3일 동안 다시 배양하였다. 배양 완료 후 PBS에 2 mg/mL 농도의 용해시켜 제조한 MTT용액을 각 well에 10 μ L씩 가하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 후 MTT가 환원되도록 하였다. 시약이 포함된 배지를 제거하고 각 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO) 150 μ L를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 ELISA microplate reader(EL×808, Bio-teck[®] Inc., Highland Park, St Louis, MD, USA)를 이용, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\% \text{ of control} = \frac{\text{시료처리구의 흡광도}}{\text{control 흡광도}} \times 100$$

통계처리

모든 측정값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균값과 표준편차 (mean±SD)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 SAS(ver. 12.0, Statistical Analysis System, Milwaukee, WI, USA)를 이용하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA)을 사용하였고, Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

돌연변이원성 및 항돌연변이원성 실험

Salmonella typhimurium TA98과 TA100을 이용하여 Ames test를 수행한 결과는 Table 1과 같다. 음성대조군의 복귀 돌연변이 집락수는 TA98 균주에서 열수 추출물에서 icariin 함량에 따른 삼지구엽초 추출물 KE9405 14.0 μ L/mL, KE9412 12.5 μ L/mL, KE9408 10.7 μ L/mL의 순이고, 에탄올 추출물에서는 KE9412 13.0 μ L/mL, KE9408 12.0 μ L/mL, KE9405 10.0 μ L/mL의 순으로 Spontaneous 14.6 μ L/mL과

큰 차이가 없었다. TA100 균주에서도 열수 추출물 KE9408은 301.5 μ L/mL, KE9412 288.2 μ L/mL, KE9405 287.0 μ L/mL, 에탄올 추출물 KE9405 291.5 μ L/mL, KE9408 287.7 μ L/mL, KE9412 288.0 μ L/mL로 나타나 Spontaneous 293.3 μ L/mL과 비교하여 TA98 균주에서와 마찬가지로 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서, icariin 함량에 따른 삼지구엽초 추출물은 TA98 및 TA100 균주 모두에서 집락수가 음성대조군에 비하여 농도 변화에 따른 집락수의 큰 변화를 나타내지 않으므로 돌연변이원성이 없는 것으로 나타났다 (Table 1).

Table 1. Mutagenicity of *Epimedium koreanum* Nakai extract against *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

Samples	Concentration (μ L/mL) ¹⁾	
Strains	TA98	TA100
Spontaneous	14.6±2.6 ^a	293.3±12.1 ^a
Water extract	KE9405	14.0±2.1 ^a
	KE9408	10.7±1.5 ^a
	KE9412	12.5±1.3 ^a
Ethanol extract	KE9405	10.0±2.2 ^a
	KE9408	12.0±1.3 ^a
	KE9412	13.0±2.1 ^a

¹⁾The data represent the mean±SD of three determinations (p<0.05).

항돌연변이원성 실험은 microsomal enzyme의 대사활성에 의해서만 돌연변이원성을 나타내는 간접변이원으로서 실제로 식품을 통해 흡수될 수 있는 polycyclic aromatic hydrocarbon인 benzo(a)pyrene (B(a)P)을 사용하여 실험을 하였으며, *S. typhimurium* TA98에 대한 열수 추출물과 에탄올 추출물의 항돌연변이원성은 Fig. 1에 나타내었다. 열수 추출물에서 KE9405와 KE9408이 시료 농도 500 μ L/mL에서 inhibition이 80% 이상을 나타냈으며, 시료농도 1000 μ L/mL에서는 KE9405, KE9408, KE9412 모두에서 90% 이상 억제효과를 나타내었다(Fig. 1A). 에탄올 추출물에서는 KE9408과 KE9412가 시료 농도 750 μ L/mL에서 약 80% 정도의 항돌연변이를 나타내었고 시료농도 1000 μ L/mL에서는 KE9405, KE9408, KE9412 모두에서 열수 추출물과 마찬가지로 저해율이 90% 이상을 나타냈으며(Fig. 1B), 열수 추출물과 에탄올 추출물 모두 시료 농도가 증가할수록 돌연변이 억제율(%)이 증가함을 나타내었다. *S. typhimurium* TA100에 대한 열수 추출물과 에탄올 추출물의 항돌연변이원성은 Fig. 2에 나타내었다. 열수 추출물에서는 시료농도 750 μ L/mL에서 KE9408과 KE9412에서 돌연변이 억제율이 약 80%로 나타났으며, 1000 μ L/mL에서는 KE9405, KE9408, KE9412 모두에서 90% 이상으로 icariin 함량이 많은 시료가 더 높은 억제율을 나타내었다(Fig. 2A).

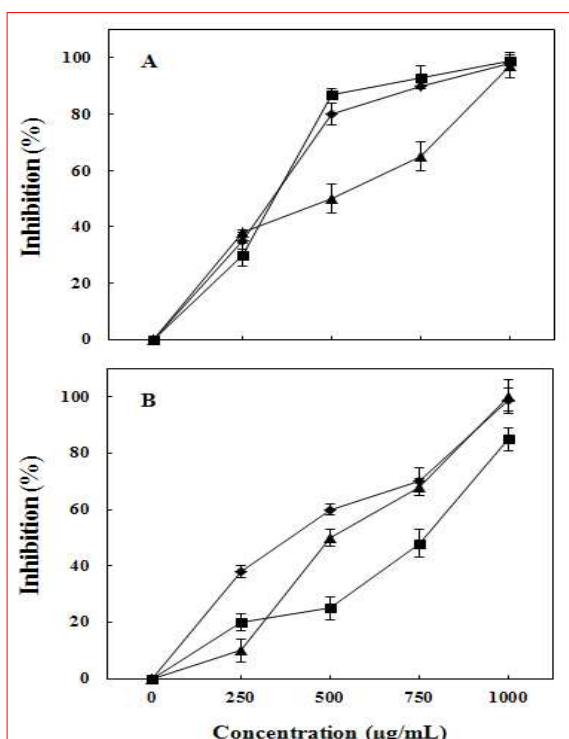


Fig. 1. The antimutagenic effects of water extracts(A) and ethanol extracts(B) from *Epimedium koreanum* Nakai against B(a)P induced *Salmonella typhimurium* TA98.

(◆ : KE9405, ■ : KE9408, ▲ : KE9412).

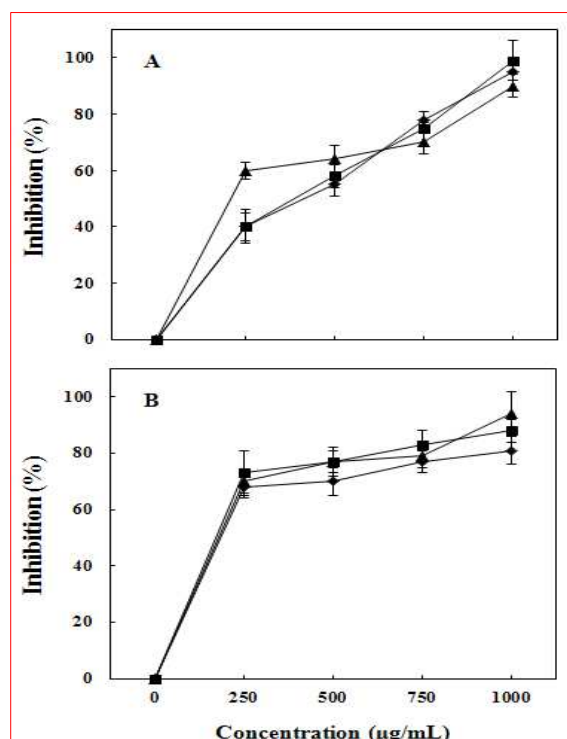


Fig. 3. The antimutagenic effects of water extracts(A) and ethanol extracts(B) from *Epimedium koreanum* Nakai against 4NQO induces *Salmonella typhimurium* TA98.

(◆ : KE9405, ■ : KE9408, ▲ : KE9412).

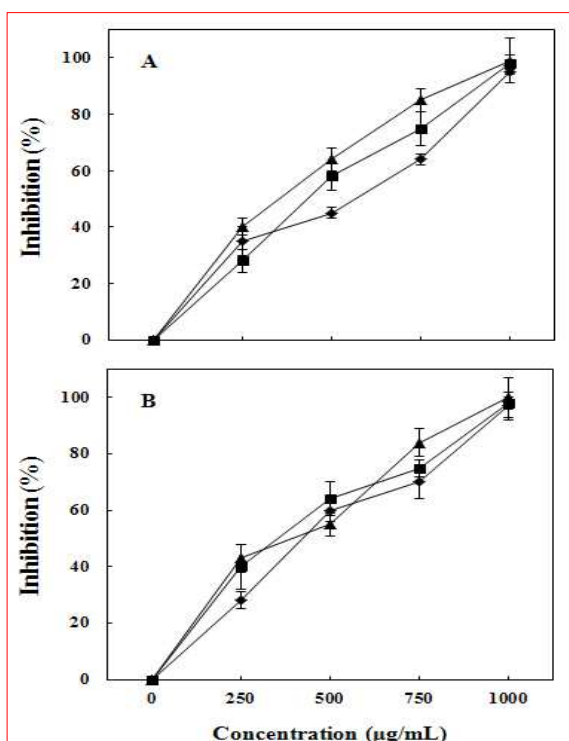


Fig. 2. The antimutagenic effects of water extracts(A) and ethanol extracts(B) from *Epimedium koreanum* Nakai against B(a)P induced *Salmonella typhimurium* TA100.

(◆ : KE9405, ■ : KE9408, ▲ : KE9412).

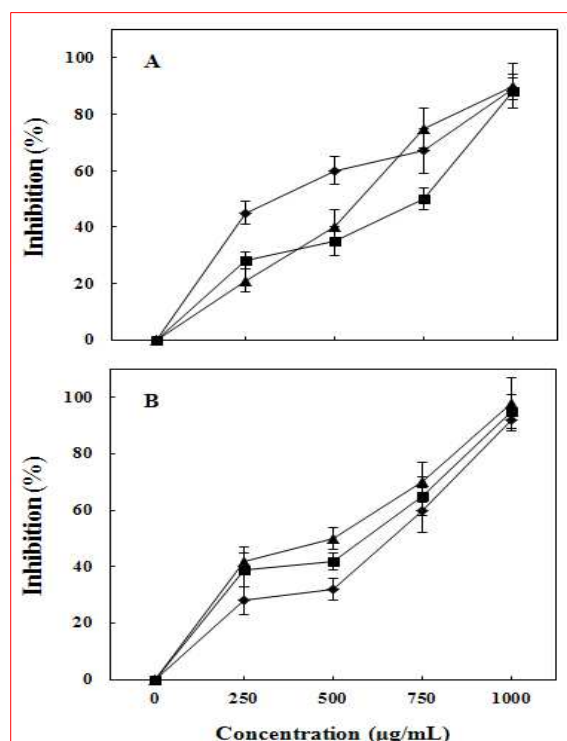


Fig. 4. The antimutagenic effects of water extracts(A) and ethanol extracts(B) from *Epimedium koreanum* Nakai against 4NQO induced *Salmonella typhimurium* TA100.

(◆ : KE9405, ■ : KE9408, ▲ : KE9412).

에탄올 추출물에서는 시료농도 750 $\mu\text{L/mL}$ 에서 KE9405, KE9408, KE9412 모두 70% 이상의 억제율을 보였고, 1000 $\mu\text{L/mL}$ 에서는 각 시료 모두 95%이상의 높은 억제율을 나타내었다(Fig. 2B). 열수 추출물과 에탄올 추출물 모두 시료농도가 증가함에 따라 억제율(%)도 증가하였으며 열수 추출물과 에탄올 추출물의 항돌연변이 효과를 비교해 보았을 때 항돌연변이 효과는 두 추출물 사이에서 별다른 차이를 보이지 않았다. 지금까지 세균시험계를 사용하여 삼지구엽초의 항돌연변이 효과를 연구한 보문은 전무한 실정이며, Ames test를 사용한 본 저자의 연구에 의해 처음으로 삼지구엽초의 돌연변이 억제효과를 강하게 나타내는 항돌연변이 물질이 icariin이라는 것을 확인할 수 있었다. 삼지구엽초 추출물로 강력한 발암물질인 4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO)를 사용하여 각각의 농도에 따른 항돌연변이원성 억제효과를 검토하였다. *S. typhimurium* TA98에 대한 열수 추출물과 에탄올 추출물의 항돌연변이원성은 Fig. 3에 나타내었다. 열수 추출물에서는 시료농도 750 $\mu\text{L/mL}$ 에서 KE9408과 KE9412에서 70%의 돌연변이 억제효과를 나타냈으며, 1000 $\mu\text{L/mL}$ 에서는 모두 85% 이상의 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3A). 에탄올 추출물에서는 시료농도 500 $\mu\text{L/mL}$ 에서 KE9405, KE9408, KE9412 모두 항돌연변이 억제율이 65% 이상을 나타내었고, 시료농도 1000 $\mu\text{L/mL}$ 에서는 KE9405, KE9408, KE9412 모두에서 80% 이상의 억제효과를 보이고 있으며 열수 추출물과 에탄올 추출물 모두, 시료농도가 증가할수록 돌연변이 억제효과도 높은 것으로 나타났었다(Fig. 3B). *S. typhimurium* TA100에 대한 열수 추출물과 에탄올 추출물의 항돌연변이원성은 Fig. 4에 나타내었다. 열수 추출물과 에탄올 추출물 모두 시료 농도 1000 $\mu\text{L/mL}$ 에서 돌연변이 저해율이 85%이상으로 나타났으며(Fig. 4), 열수 추출물보다 에탄올 추출물의 돌연변이 억제 효과가 더 좋게 나타났다.

삼지구엽초의 항돌연변이원성을 알아본 결과, B(a)P나 4NQO에서 전반적으로 TA98과 TA100 균주 모두에서 항돌연변이원성 활성이 높았다. 따라서 삼지구엽초 추출물의 icariin은 간접변이원의 활성화에 관여하는 최종 변이원 물질로 전환하는 역할을 하리라 추정되는 항변이원 물질 이외에도 직접변이원이 직접 DNA에 결합하여 유전적 변이원을 일으키는 것을 차단하는 작용을 하는 항변이원성 물질인 것으로 사료된다. Lee (19)는 냉이, 민들레, 수리취, 질경이 등 11종의 산채류 생즙에 대하여 돌연변이 억제율을 조사한 결과, 부추, 민들레, 냉이, 수리취, 씀바귀, 삼지구엽초 그리고 질경이가 B(a)P, 4NQO에 의해 유발된 변이원성에 대해 억제활성이 가장 컸다고 보고하였으며, Ito 등(20)은 양파, 가지, 호박 그리고 양배추의 생즙 및 가열즙이 7,12-dimethylbenzo(a)anthracene (DMBA)에 의해 유발된 돌연변이원성을 억제하는 활성을 갖고 있으며 이것은 양파나 가지에 존재하는 SH 화합물이 glutathione transferase의 활성을

증가시키기 때문이라고 보고하였다(21). Tognolini 등(22)은 삼지구엽초(*Epimedium koreanum* Nakai)는 icariin, epimedeside A 및 quercetin 등과 같은 생리활성 물질은 함유하고 있다고 보고한 바 있는데, 삼지구엽초가 나타내는 항돌연변이 효과는 주요성분인 icariin에서 기인하는 것으로 사료되어진다. 이전에 발표된 연구결과에 의하면, icariin 뿐만 아니라, epimedeside 계열 및 quercetin이 세포계 및 동물실험에서 항돌연변이 효과를 나타낸다고 보고되어 있다(23-27). 또한 다른 많은 연구결과에서 이들 화합물이 항산화효과를 유발 할 수 있다는 연구결과도 보고되어 있다(28-31). 따라서, 본 연구에서 삼지구엽초는 *S. typhimurium* strain TA98 및 TA100에 대한 돌연변이를 유발하지 않으며, 이러한 Ames test 결과 안전한 식품소재라 할 수 있다. 아울러 삼지구엽초가 항돌연변이능을 가지는 것으로 보아 이러한 안전성과 건강기능성을 활용한 식품소재로서 효용 가치가 높을 것으로 사료된다.

MTT assay에 의한 면역활성

인간의 면역체계에서 중요한 역할을 하는 면역세포인 B cell과 T cell에 대하여 면역증진 효과를 확인하기 위하여 면역세포의 생육 촉진 효과를 생육도를 통하여 측정하였으며, 열수 추출물과 에탄올에 의한 추출물의 B cell (Ramos)의 생육촉진 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 열수 추출물의 경우 시료농도 1000 $\mu\text{L/mL}$ 에서 KE9408 1.3배, KE9412 1.2배, KE9405 1.0배의 순으로 생육촉진 활성을 나타냈으며(Fig. 5A), 에탄올 추출물에서는 열수 추출물과 달리 KE9412 1.17배, KE9408 1.1배, KE9405 1.05배의 순으로 icariin 함량이 많을수록 생육촉진도 높게 나타났다(Fig. 5B). T cell (Jurkat)에 대한 열수 추출물과 에탄올 추출물의 생육촉진은 Fig. 6에 나타내었다. 열수 추출물의 생육촉진 활성은 KE9405, KE9408, KE9412의 순으로 대조군과 비교하여 각각 1.84배, 1.6배, 1.53배의 활성을 나타내었고(Fig. 6A), 에탄올 추출물의 생육촉진은 열수 추출물의 생육촉진과 반대로 KE9412 1.74배, KE9408 1.52배, KE9405 1.4배의 순으로 나타났으며(Fig. 6B), 에탄올 추출물보다 열수 추출물의 생육촉진활성이 더 높게 나타났다. B cell과 T cell의 생육 활성도를 배양 시간별로 8일 동안 생 세포수를 측정된 결과는 Fig. 7과 Fig. 8에 나타내었다. Icariin 함량에 따른 삼지구엽초의 생 세포수를 측정된 결과 B cell과 T cell 모두에서 KE9405는 4일째, KE9408은 5일째, KE9412는 4일째 생육이 최대로 나타났다(Fig. 7-8). 열수 추출물은 B cell과 T cell 모두에서 KE9405가 대조군에 비해 각각 2.27배, 1.72배의 활성을 나타내었고, 에탄올 추출물은 KE9408에서 B cell과 T cell에서 각각 1.65배, 1.34배를 나타내었다(Fig. 7-8). 생육촉진 실험과 생육활성 실험에서 에탄올 추출물보다 열수 추출물의 활성이 더 높게 측정되었으며, 이는 삼지구엽초에 포함된 면역활성 기능이 있는 유용성분 물질인

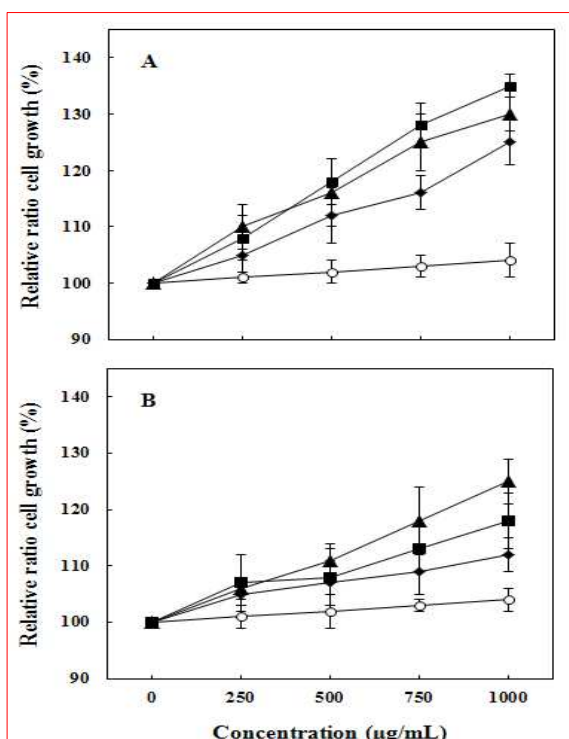


Fig. 5. The effect of the water extracts(A) and ethanol extracts(B) from *Epimedium koreanum* Nakai on the growth of human B cell (Rhamos).

(○ : Control, ◆ : KE9405, ■ : KE9408, ▲ : KE9412).

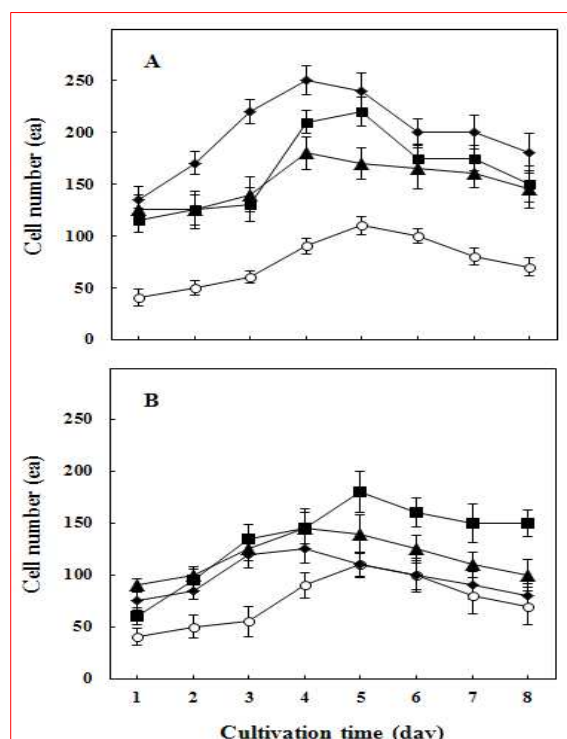


Fig. 7. The cell growth of human B cell (Rhamos) cell line of water extracts(A) and ethanol extracts(B) (500 µg/mL) from *Epimedium koreanum* Nakai.

(○ : Control, ◆ : KE9405, ■ : KE9408, ▲ : KE9412).

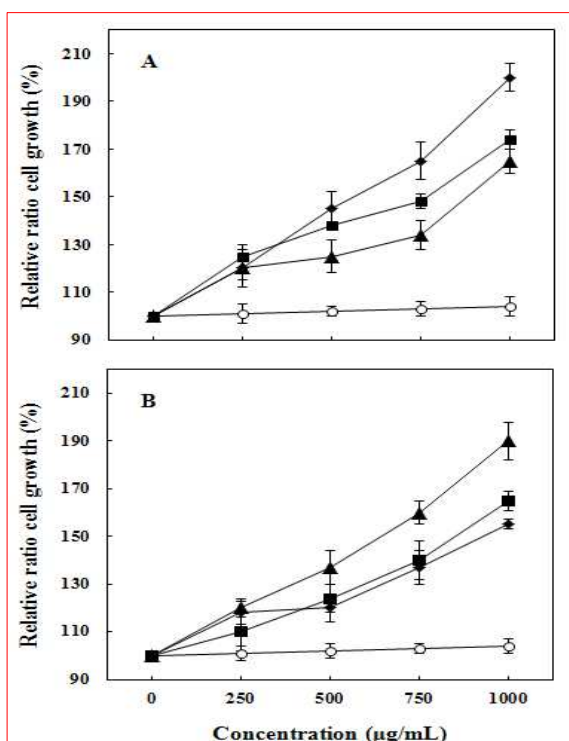


Fig. 6. The effect of the water extracts(A) and ethanol extracts(B) from *Epimedium koreanum* Nakai on the growth of human T cell (Jurkat).

(○ : Control, ◆ : KE9405, ■ : KE9408, ▲ : KE9412).

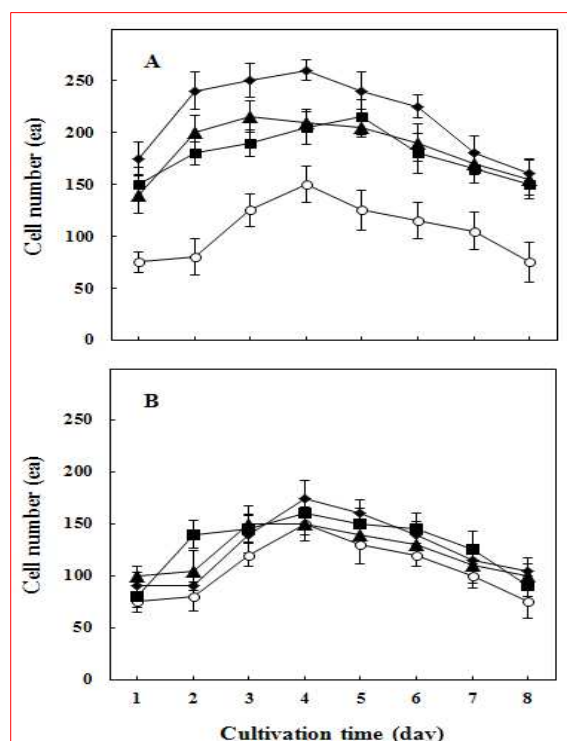


Fig. 8. The cell growth of human T cell (Jurkat) cell line of water extracts(A) and ethanol extracts(B) (500 µg/mL) from *Epimedium koreanum* Nakai.

(○ : Control, ◆ : KE9405, ■ : KE9408, ▲ : KE9412).

icariin이 높은 온도에서 나오는 수용성 물질로 사료되어진다. 또한 한약재로 사용되는 물질들의 면역활성과 삼지구엽초 추출물을 비교해 보면 대조구에 비해 B cell과 T cell에서 Kim 등(32)은 씌바귀 열수 추출물과 에탄올 추출물의 면역활성이 각각 1.5배, 1.2배, Hwang 등(33)는 참취 뿌리의 열수 추출물과 에탄올 추출물의 면역활성이 각각 1.3배, 1.1배라고 하였고, Ahn 등(34)은 숙지황 열수 추출물과 에탄올 추출물의 면역활성이 각각 1.9배, 1.3배, Park 등(35)은 가시오가피 열수 추출물과 에탄올 추출물의 면역활성이 각각 1.7배, 1.4배라고 보고하였으나, 본 연구의 시료인 삼지구엽초 추출물의 열수 추출물과 에탄올 추출물의 면역활성이 이들보다 높은 것으로 나타났다. 이러한 면역증진활성의 확인은 삼지구엽초의 향후 식품산업에 있어서의 면역증강 효능을 가진 삼지구엽초의 건강 기능성식품 개발에 매우 중요한 자료가 될 수 있으며, 약용식물의 부가가치를 좀더 높이고, 이에 따른 수요증대에도 기여할 것으로 사료되어진다.

요 약

예로부터 삼지구엽초는(*Epimedium koreanum* Nakai)는 한방에서 강장, 강정, 이뇨 등의 약재로 이용되어 왔다. 본 연구에서는, 삼지구엽초의 주성분인 icariin의 함량에 따른 항돌연변이 및 면역활성을 탐색하여 향후 기능성 식품소재로서 활용하고자 하였다. Ames test 결과, icariin 함량에 따른 삼지구엽초 추출물은 TA98 및 TA100 균주 모두에서 집락수가 음성대조군에 비하여 농도 변화에 따른 집락수의 큰 변화를 나타내지 않으므로 돌연변이원성이 없는 것으로 나타났다. 간접변이균인 B(a)P 항돌연변이 실험에서는 열수 및 에탄올 추출물이 각각 80% 그리고 90% 이상을 그리고, 직접변이균인 4NQO 항돌연변이균에서는 70% 이상으로 icariin 함량이 많은 순인 KE9412, KE9408, KE9405 순으로 항돌연변이 억제효과를 각각 나타내었다. 인간면역세포인 B와 T 세포를 이용한 면역활성 실험결과, 열수 추출물에서는 icariin 함량이 적은 KE9405가 1.8배로 가장 높은 활성을 나타냈으나, 에탄올 추출물에서는 열수 추출물과는 반대로 icariin 함량이 많은 KE9412가 1.74배로 가장 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과로 인하여, 삼지구엽초는 항돌연변이능과 면역활성 효능을 가지고 있으므로, 건강 기능성 식품 소재로의 효용 가치가 높을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Noh JH, Kim YJ, Kim SW, Lee JH, Lee HY (2003a) Comparison of biological activities of *Epimedium*

koreanum produced in Korea and China. Kor J Med Crop Sci, 11, 195-200

2. Noh JH, Kim YJ, Choi KJ, Kim SW, Kim SK, Kim JH (2003b) Characteristics of seedling and rhizome propagation in *Epimedium koreanum* Nakai. Kor J Med Crop Sci, 11, 155-160

3. Kang SS, Shin KH, Chung SG, Cho EH (1998) Flavonoids from *Epimedium koreanum* Kor J Pharmacogn, 19, 93-98

4. Xu SC, Xu BJ, Wang MT (1987) Isolation and identification of icariin and icariside I. Chin Pharm Bull, 22, 129-132

5. Fukai T, Nomura T (1988) Seven prenylated flavonol glycosides from two *epimedium* species. Phytochem, 27, 259-266

6. Mizuno M, Hanioka S, Suzuki N, Iinuma M, Tanaka T, Liu XS, Min ZD (1987) Flavonol glycosides from *epimedium sagittatum*. Phytochem, 226, 861-863

7. Sun P, Zhao Ye W, Pei J, Wang Z, Chen Y, Ogihara Y, Takeda T (1995) Studies on the constituents of *Epimedium koreanum*. Chem Pharm Bull, 43, 703-704

8. Kang SS, Shin KH, Chung SG, Cho EH (1988) Flavonoids from *Epimedium koreanum* Kor J Pharmacogn, 21, 93-96

9. Lee MK, Choi YJ, Sung SH, Shin DI, Kim JW, Kim YC (1995) Antihepatotoxic activity of icariin, a major constituent of *Epimedium koreanum*. Planta Med, 61, 523-526

10. Xu SC, Wang ZX, Wu LJ, Wang NB, Chen YJ (1982) Isolation and identification of icariin and epimedeside A. Chin Tard Herb Drug, 13 9-15

11. Park BJ, Choi SY, Chang KJ, Cho DH, Heo K, Park CH (1997) Vegetation and environment in nature habit of *Asterscaber* and *Epimedium koreanum* around Chunchon. Kor J Crio Sci, 6, 51-56

12. Park KY, Choi BR, Yi ES, Kim SJK, Park CH (1998) Habit environment of *Epimedium koreanum* Nakai. Kor J Nutr, 27, 311-322

13. Shin, KH, Lim SS, Ahn Sd, Kim SK, Park KY (1996) Difference in components of *Epimedium koreanum* in compliance with seasons and places of collection. Kor J Med Crop Sci, 4, 321-328

14. Gies J (1996) Antioxidants tools for preventing liquid oxidation. Food Tech, 50, 73-76

15. Kang CS, Choi BR, Park KY, Ahn SD (1997) Establishment of growth environment and mass propagation system development for *Epimedium Koreanum* Kor J Pharmacogn, 30, 378-381

16. Ames BN, Maron DM (1983) Revised methods for the

- Salmonella typhimurium* mutagenicity test. Mutation Res, 113, 173-215
17. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay. Cancer Res, 48, 589-601
 18. Carmichael J, De Graff WG, Gazder AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of the tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res, 47, 936-942
 19. Lee JH (1989) Studies on the demutagenic effect of the edible mountain herb juices. MS Thesis. Kangwon National University, Gangwon, Korea.
 20. Ito Y, Maeda S, Sugiyama T (1986) Suppression of 7,12-dimethylbenzo(a)anthracene-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells by vegetable juices. Mutat Res, 172, 55-60
 21. Han KS, Ham SS, Jeong EH, Lee HK (1992) Antimutagenic effects of the edible mountain herb juices against Trp-P-1 and 2-AF. Kor J Food Hyg, 7, 161-168
 22. Tognolini M, Barrocelli E, Ballabeni V, Bruni R, Bianchi A, Chivarini M, Impicciatore M (2006) Comparative screening of plant essential oils. Life Sci, 78, 1419-1432
 23. Gardeli C, Vassilikil P, Athanasios M, Kiboutis T, Komaitis M (2008) Essential oil composition of *Epimedium koreanum* Nakai and evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. Food Chem, 107, 1120-1130
 24. Grabmann J, Hipeli S, Spitzenberger R, Elstner EF (2005) The icariin from the oil of *Epimedium koreanum* Nakai in concert with tocopherol and carotene effectively prevents oxidation of LDL. Phytomedicine, 12, 416-423
 25. Ng TB, Liu F, Lu Y, Cheng CHK, Wang Z (2003) Antioxidant activity of compounds from the medicinal herb *Epimedium koreanum* Nakai. Comp Biochem Phys, 136, 109-115
 26. Singh HP, Mital S, Kaur S, Batish DR, Kohli RK (2009) Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Epimedium koreanum* Nakai. Food Chem, 114, 642-645
 27. Tepe B, Sihoglu-Tepe A, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A (2007) Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Epimedium koreanum* Nakai. Food Chem, 103, 766-770.
 28. Fragoso V, Fett-Neto AG (2008) Antioxidant and antimutagenic properties of the icariin of *Epimedium koreanum* Nakai. Toxicol, 22, 559-566
 29. Marin-Martinez R, Veloz-Gare R, Veloz-Rodriguez R, Guzman-Maldonado SH, Loarca-Pina G, Cardador-Martinez A, Guevara-Olvera L, Miranda-Lopez R, Torres-Pacheco I, Perez CPE, Herrera-Hernandez G, Villasenor-Ortega F, Gonzalez-Chavira M, Guevara-Gonzalez RG (2009) Antimutagenic and antioxidant activities of *Epimedium koreanum* Nakai recovered from tannery wastewaters. Bioresource Technol, 100, 434-439
 30. Rocha-Guzm NE, Herzog A, Gonzalez-Laredo RF, Ibarra-Perez FJ, Zambra-Galv G, Gallegos-Infante JA (2007) Antioxidant and antimutagenic acitivity of phenolic compounds in 3 different colour group of common *Epimedium koreanum* Nakai. Food Chem, 103, 521-527
 31. Shon MY, Choi SD, Kahng GG, Nam SH, Sung NJ (2004) Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethylacetate extracts from *Epimedium koreanum* Nakai. Food Chem Toxicol, 42, 659-666
 32. Kim MJ, Kim JS, Kang WH, Jeong DM (2002) Effect on antimutagenic and cancer cell growth inhibition of *Lxeris dentata* Nakai. Kor J Med Crop Sci, 10, 139-143
 33. Hwang HS, Ham SS (1999) Antimutagenic and cytotoxic effects of aster acaber root ethanol extract. Kor J Food Sci Technol, 31, 1065-1070
 34. Ahn BY, Lee KS, Maeng IK, Song GS, Choi DS (1998) Bioantimutagenic effects of water extract from *Rehmannia glutinosa* Liboschitz in SOS chromotest. Kor J Food Sci Technol, 30, 439-445
 35. Park MH, Kang SM, Jung HY, Hong SG (2003) Protecting effects of vitamin E against immobilization stress-induced oxidative damage in rat brain. Kor Nutr, 36, 570-576