

## Inhibitory Effect of Extracts of *Platycodon grandiflorum* (the *Ballon Flower*) on Oxidation and Nitric Oxide Production

Joo Ri Jang, Seong Yeon Hwang and Sun-Young Lim<sup>†</sup>

Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

### 도라지 부탄올 추출물의 항산화 및 nitric oxide 생성 저해 효과

장주리 · 황성연 · 임선영<sup>†</sup>

한국해양대학교 해양환경생명과학부

#### Abstract

We explored the effect of extracts of dried *Platycodon grandiflorum* on production of reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH) and nitric oxide (NO). To determine antioxidant activity in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress, DCFH-DA (dichlorodihydrofluorescein diacetate) assay was employed. Acetone/methylene chloride (A+M) and methanolic (MeOH) extracts of *P. grandiflorum* reduced intracellular ROS levels. Of the various tested fractions, *n*-BuOH fraction showed the highest protective effect in terms of lipid peroxide production. Total GSH levels were measured after treatment of HT1080 cells with the A+M and MeOH extracts, and other solvent fractions, at various concentration. The A+M extracts and 85% (v/v) aqueous MeOH fraction significantly increased GSH levels ( $p < 0.05$ ). When lipopolysaccharide (LPS)-induced NO production was evaluated, all tested crude extracts, and fractions thereof, significantly reduced NO production ( $p < 0.05$ ), and the *n*-BuOH and 85% (v/v) aqueous MeOH fractions (at 0.05 mg/mL) showed the strongest inhibitory effects. The results showed that the *n*-BuOH fraction inhibited both cellular oxidation and NO production, and this fraction may thus contain valuable active compounds.

Key words : *platycodon grandiflorum*, antioxidant, reactive oxygen species, glutathione, nitric oxide

#### 서 론

도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 한국, 일본 및 중국의 산간지방에서 널리 자생하며, 한방에서 약재로 사용되기도 하고, 일반식용으로도 널리 이용되고 있는 산채 식품으로서 triterpenoid계 사포닌, 당질 및 섬유질을 함유하고 있다(1, 2). 이러한 사포닌은 동물실험에서 진해, 거담작용, 중추 신경 억제작용, 급성 만성염, 항궤양 및 위액분비 억제작용, 혈관을 확장하여 혈압을 낮추는 혈당강하작용, 콜레스테롤 대사 개선작용, 항산화 및 항암효과 등이 있는 것으로 밝혀져 있으며, 생약재로서 도라지가 배합되어 있는 한방 처방수는 동의보감에 287건, 방약합편에 49건이 수록되어 있을 정도로 다양한 약리작용을 갖고 있다(3-8). 최근 도라지의 여러 가지 약리효과를 검증한 결과로 도라지의 소비량이

증가하면서 재배면적이 확대되고 있으며, 특히 도라지를 20년 이상 장기 재배하는 방법이 개발됨에 따라 20년근 이상의 도라지 즉, 다년생 도라지에 대한 각종 연구들이 활발히 진행되고 있다(9, 10). 현재 도라지의 경우 분말, 청, 즙, 환의 가공식품형태로 시중에 유통되고 있으며 분말 형태가 활용도가 높고, 소비자들이 많이 찾는 경향이 있어 본 연구에서도 도라지 분말을 이용하여 실험하였다. 본 연구에서 도라지를 분말화 하기 위해 사용된 저온진공건조기(11)은 건조과정 중 산소가 거의 차단되어 건조과정 중에 일어날 수 있는 부패와 변질을 방지할 수 있을 뿐만 아니라 동결 및 열풍건조에 비하여 건조시간이 3-4배 빠르기 때문에 그만큼 생산성도 높아지는 장점이 있다.

현재 노인 인구가 증가하면서 노화를 포함한 각종 성인병 발생의 원인이 되고 있는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 관심이 높아지고 있다. 활성산소종은 산소 라디칼 및 이것으로부터 파생된 여러 가지 산소화합물

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail : sylim@hhu.ac.kr,  
Phone : 82-51-410-4757, Fax : 82-51-404-4750

을 통칭하는 것으로 생체 내에서 산소는 그 화학적 성질로 인하여 환원되어 유리 라디칼(free radical)인 superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ )과 같은 oxygen radical 뿐만 아니라 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), singlet oxygen ( $^1O_2$ )과 같은 몇 종류의 non-radical, 그리고 그 외에 피부에 이차적으로 생성된 것( $ROO\cdot$ ,  $RO\cdot$ ,  $NO\cdot$ ,  $HOCl$  등)을 말한다. 이들 활성산소종에 의한 산화적 스트레스는 체내에서 세포막 손상, DNA 변성, 지질 산화, 단백질 분해 등을 초래하여, 뇌혈관 질환, 암 및 심혈관계 질환 등과 같은 만성질환들의 발생 위험을 증가시킨다(12, 13). 하지만 생체 내에서는 계속해서 생기는 이러한 활성산소종들을 제거하는 항산화 효소인 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), Mn superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase,  $\gamma$ -glutamyl-cystein synthetase, human glutathione-S-transferase, glucose-6-phosphate-dehydrogenase 및 metallothioneins (MT-1A, MT-2A)와 비효소적 항산화제인 tocopherol, ascorbic acid, carotenoid, flavonoid들로 구성된 항산화 방어망을 통해 활성산소종의 생성과 제거 사이에서 세포 기능을 유지하고 있다(14-16).

산화질소(Nitric oxide, NO)는 세포사이의 작용을 매개하는 물질로 대식세포나 간세포에서 면역적인 자극에 의해 생성된다. 이는 항암 및 항미생물작용, 혈관 확장에 의한 혈액순환 개선 및 성기능 장애개선 등의 기능을 가진다(17, 18). 그러나 급격한 운동이나 스트레스를 비롯한 여러 가지 환경적 요인에 의하여 과도하게 생성된 NO는 poly (ADP-ribose) synthetase를 활성화시켜서 세포 내의 NAD를 고갈시켜 세포를 죽게 하거나(18), 리보뉴클레오티드 환원 효소(ribonucleotide reductase, RNR)의 tyrosyl radical과 반응함으로써 효소의 활성을 억제하여 디옥시리보뉴클레오티드(deoxyribonucleotide)를 고갈시켜 DNA의 합성을 억제한다(19). 또한 핵산의 염기를 탈아미노화(deamination)시켜 DNA를 파괴하거나 돌연변이를 유발할 수 있으며(20), superoxide radical과 반응하여 peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ )를 형성하여 조직손상을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다(21). 이에 따라 과잉의 활성산소종의 제거 및 생체 내 항산화 방어 시스템의 증진에 대한 관심이 높아지고 있으며, 약물이 아닌 천연성분에서 그 효능을 찾는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 따라서 본 연구에서는 저온진공건조법으로 도라지를 건조하고, 분말화한 후 유기용매로 추출하여 도라지의 추출물과 분획물들에 의한 세포 내 활성산소종 및 glutathione (GSH)를 측정하여 항산화효과를 검토하고 NO 생성 저해 효과를 알아보려고 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용된 도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 부

산 엄궁 농산물 시장에서 구입하여 저온진공건조기 (STVD-50, SANYA, Busan, Korea)를 이용하여 상당포화 온도 15~25°C, 절대압력 15~40 mmHg에서 24시간 건조시켜 도라지 분말(60 mesh)을 제조하였다.

### 추출 및 분획

건조된 도라지 분말(200 g)은 실험 사용 전까지 -70°C의 deep freezer (NF-400SF, Nihon Freezer, Tokyo, Japan)에 냉동 보관되었다가 유기용매 추출을 위하여 acetone:methylene chloride를 1:1 비율로 첨가하여 24시간 방치 한 후 추출하였다. 이 과정을 2회 반복하여 얻은 여액은 40°C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하여 acetone/methylene chloride 추출물(A+M) (2.13 g)을 얻었다. A+M 용매로 추출되지 않은 성분을 methanol 용매로 추출하고자 남은 잔사에 A+M 용매와 동량의 methanol을 부어 위와 동일한 방법으로 2회 반복한 후 농축하여 methanol 추출물(MeOH) (11.57 g)을 얻었다. 두 용매로부터 최대 수득한 추출물을 혼합하여 다시 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 n-hexane (0.76 g), 85% aq. MeOH (0.19 g), n-butanol (n-BuOH) (4.98 g), water (4.19 g) 분획물을 얻었다. 실험에는 각각의 추출물들을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 세포배지로 필요한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

### 세포 배양

한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 인체 섬유육종세포(HT1080) 및 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 분양받아 본 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였다. HT1080 세포와 RAW 264.7 세포는 100 units/mL의 penicillin-streptomycin (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT, USA)가 함유된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (MCO-15AC, SANYO Electric Biomedical Co, Tokyo, Japan)에서 배양하였다. 배양 중인 세포를 일주일에 2번 새로운 배지로 바꿔주었다. 일주일 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA)로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 cell culture flask에 10 mL씩 일정한 수로 분할하여 주입하고, 6~7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

### 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species) 측정

세포 내 활성산소종은 HT1080 세포를 이용하여 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay (22)로 측정하였다. DCFH-DA (Sigma, St. Louis, MO, USA)

는 세포 내 활성산소종과 반응하여 형광물질을 만들어 내는 것으로 이 시약을 세포 속에 넣어 발생하는 형광을 측정함으로써 세포 내의 활성산소종을 측정할 수 있다. 세포를 96-well cell culture plate에 분주한 후 24시간 배양하고, PBS로 씻은 후 20  $\mu$ M DCFH-DA을 각 well에 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 20분간 pre-incubation하였다. 각 well에 시료를 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 배양한 후, DCFH-DA을 없애고 세포는 다시 PBS로 씻은 후 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 excitation 488 nm, emission 530 nm에서 microplate reader (VICTOR3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)로 측정하였다. 대조군들 (blank군과 control군)은 시료 대신 PBS를 처리하며, control군은 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리를 하고, blank군은 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 대신 PBS를 처리하여 측정하였다.

**GSH 측정**

세포내에 축적된 GSH 함량은 HT1080 세포를 이용하여 thiol-staining reagent인 monobromobimane (mBBr)로 측정하였다(23). 세포는 96-well cell culture plate에 well 당 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/mL에서 30분간 배양하였다. 다시 각 well은 PBS로 씻은 후 40  $\mu$ M mBBr를 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 30분간 반응시킨 후 시료처리에 의한 GSH 함량의 변화를 시간별로 excitation 360 nm, emission 465 nm에서 microplate reader (VICTOR3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)로 측정하였다.

**NO 측정**

NO reduction assay (24)는 대식세포의 중요한 기능 중의 하나인 식세포 작용(phagocytosis)과 관련된 간접적인 활성 측정의 한 방법으로 대식세포가 그 활동을 얼마나 활발하게 하고 있는지를 알아보는 방법이다. 반응원리는 1-Naphthylendiamine, sulfanilamide 그리고 NO<sub>2</sub>가 반응하여 Azo coupling을 이루는데 이 두 개의 고리 형태가 570nm의 파장에서 최대의 흡광도 값을 나타내며 이 값을 측정하여 간접적으로 NO의 생성량을 정량하는 것이다. RAW 264.7 세포를 96-well cell culture plate에 well 당 2 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/mL가 되도록 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 MEM 배지로 교체한 후 준비된 시료를 1시간 동안 전처리하고, NO 생성을 유도하기 위해 lipopolysaccharide (LPS) (1  $\mu$ g/mL = 1 ppm)를 처리한 후, 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 이후 생성된 NO의 양은 Griess 시약(0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine : 1% sulfanilamide = 1:1)을 이용하여 microplate reader (VICTOR3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. sodium nitrate를 사용하여 측정된 흡광도로 표준곡선을 작성하여 NO의 농도별 흡광도를 얻었으며, 표준곡선을 실험결과에 적용하여

생성된 NO의 함량을 정량하였다.

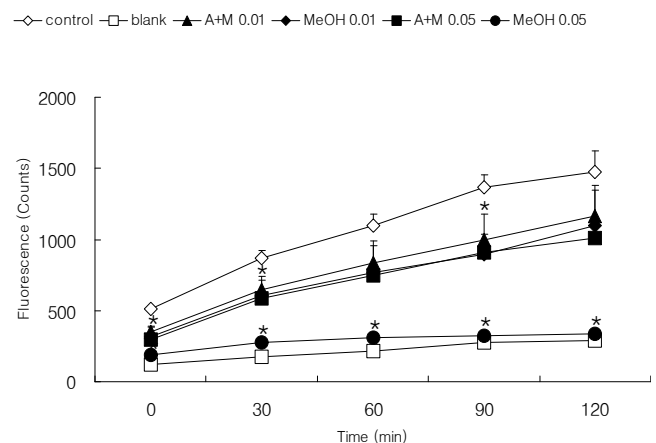
**통계분석**

실험은 3회 반복 실험하여 Mean  $\pm$  SEM (Standard Error of Mean)으로 나타내었고, 분석된 실험 데이터는 대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 자료로부터 t-test를 실시하여 유의성을 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**세포 내 활성산소종(Reactive oxygen species) 생성 억제효과**

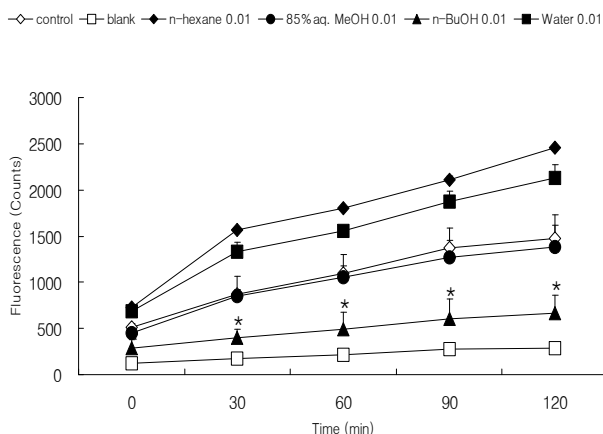
활성산소종 형성과 관련된 실험에는 인체 섬유육종세포인 HT1080가 사용되고 있으며(25), 본 연구에서도 HT1080 세포를 이용하여 DCFH-DA assay를 통해 건조 도라지의 활성산소종 억제효과를 알아보려고 하였다. Fig. 1은 건조 도라지 A+M 및 MeOH 추출물을 농도별로 HT1080 세포에 처리하였을 때 나타난 결과로 첨가농도 0.01 및 0.05 mg/mL에서 A+M 및 MeOH 추출물 모두 측정시간 120분 동안 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만을 처리한 control군에 비해 세포 내 활성산소종을 크게 억제시켰으며, MeOH 추출물에 의한 항산화 효과가 높게 나타났다(p<0.05). Fig. 2는 건조 도라지 추출물을 n-hexane, 85% aq. MeOH, n-BuOH 및 water로 다시 추출하여 얻어진 각 분획물들에 의한 HT1080 세포 증식 억제 효과를 나타낸 것으로 n-BuOH 분획물을 첨가농도 0.01 mg/mL로 처리했을 때 높은 항산화 활성을 보였으며 (p<0.05), 다른 분획물들의 항산화 효과는 낮았다. 따라서



**Fig. 1. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried *Platycodon grandiflorum* on levels of reactive oxygen species in HT1080 cells.**

A+M 0.01, acetone with methylene chloride extract 0.01 mg/mL; MeOH 0.01, methanol extract 0.01 mg/mL; A+M 0.05, acetone with methylene chloride extract 0.05 mg/mL; MeOH 0.05, methanol extract 0.05 mg/mL. All values are means $\pm$ SEM, n=3. \*p<0.05, significant effect between the control and each extract.

세포 내 활성산소종 감소에 의한 항산화 효과는 MeOH 추출물과 n-BuOH 분획물에서 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. Lee 등(25)은 ROS 신호경로를 통한 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 활성화의 조절을 도라지로부터 유래된 사포닌이 matrixmetalloproteinase (MMP) 활성화와 HT-1080 세포 침입억제를 살펴본 결과, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (PMA)에 의해 유도된 ROS 생성이 장생도라지 사포닌의 첨가로 어느 정도 감소되었으며, 이러한 ROS 생성 억제는 NF- $\kappa$ B 활성이 줄어드는 것과 관계가 있을 것이라고 보고하였다.



**Fig. 2.** Inhibitory effect of solvent fractions from dried *Platycodon grandiflorum* on levels of reactive oxygen species in HT1080 cells.

n-hexane 0.01, n-hexane fraction 0.01 mg/mL; 85% aq. MeOH 0.01, 85% aqueous methanol fraction 0.01 mg/mL; n-BuOH 0.01, n-butanol fraction 0.01 mg/mL; Water 0.01, water fraction 0.01 mg/mL.

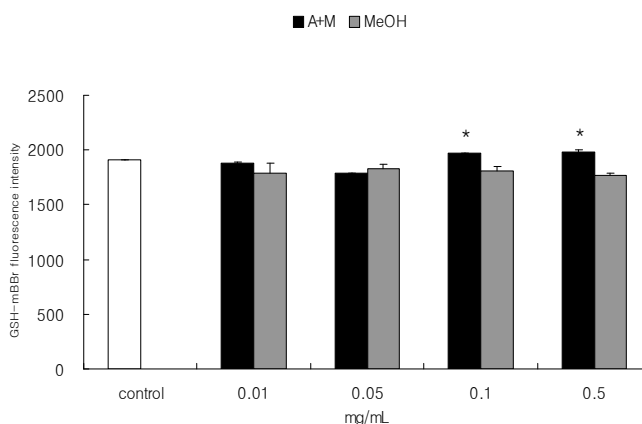
All values are means $\pm$ SEM, n=3.

\*p<0.05, significant effect between the control and each extract.

### GSH 농도 변화

건조 도라지 추출물이 세포 내의 GSH 함량에 미치는 영향을 측정하기 위하여 thiol-staining reagent인 mBBr을 이용하여 측정하였다. Fig. 3은 A+M 및 MeOH 추출물을 0.01, 0.05, 0.1 및 0.5 mg/mL의 농도에서 측정하였으며, 120분 동안 30분 간격으로 측정하였다. 측정시간 120분 일 때, A+M 추출물(0.1과 0.5 mg/mL 첨가농도)은 GSH 함량을 유의적으로 증가하였으나(p<0.05), MeOH 추출물에 의한 효과는 없었다. 각 분획물 중에서 85% aq. MeOH은 첨가농도 0.5 mg/mL에서 시료를 처리하지 않은 control 보다 GSH 함량이 유의적으로 증가하였다(Fig. 4)(p<0.05). Jeong 과 Shim (26)은 도라지 잎과 줄기의 추출물 및 분획물로 DPPH radical 소거활성과 환원력으로 항산화 효과를 살펴본 결과, 잎과 줄기의 부탄올 분획물에서 높은 DPPH radical 소거활성과 환원력을 나타내었으며, 줄기의 부탄올 분획물에서 가장 높은 DPPH radical 소거활성과 환원력을 나타내었다고 보고하였다. Kang 등(27)에 의하면 불포화 인지질 liposome에 도라지의 용매별 분획물을 가하고 산화제 benzoyl peroxide를 가한 후 항산화 활성을 비교한 결과

도라지 에틸에테르 및 에틸아세테이트 분획물은  $\alpha$ -tocopherol의 경우 보다 훨씬 낮은 산화지수를 나타내어 두 분획물들에 의한 강력한 항산화 활성이 있음을 시사하였고 비타민 C 첨가에 의한 항산화 상승효과도 확인하였다고 보고하였다.



**Fig. 3.** Effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried *Platycodon grandiflorum* on GSH levels in HT1080 cells.

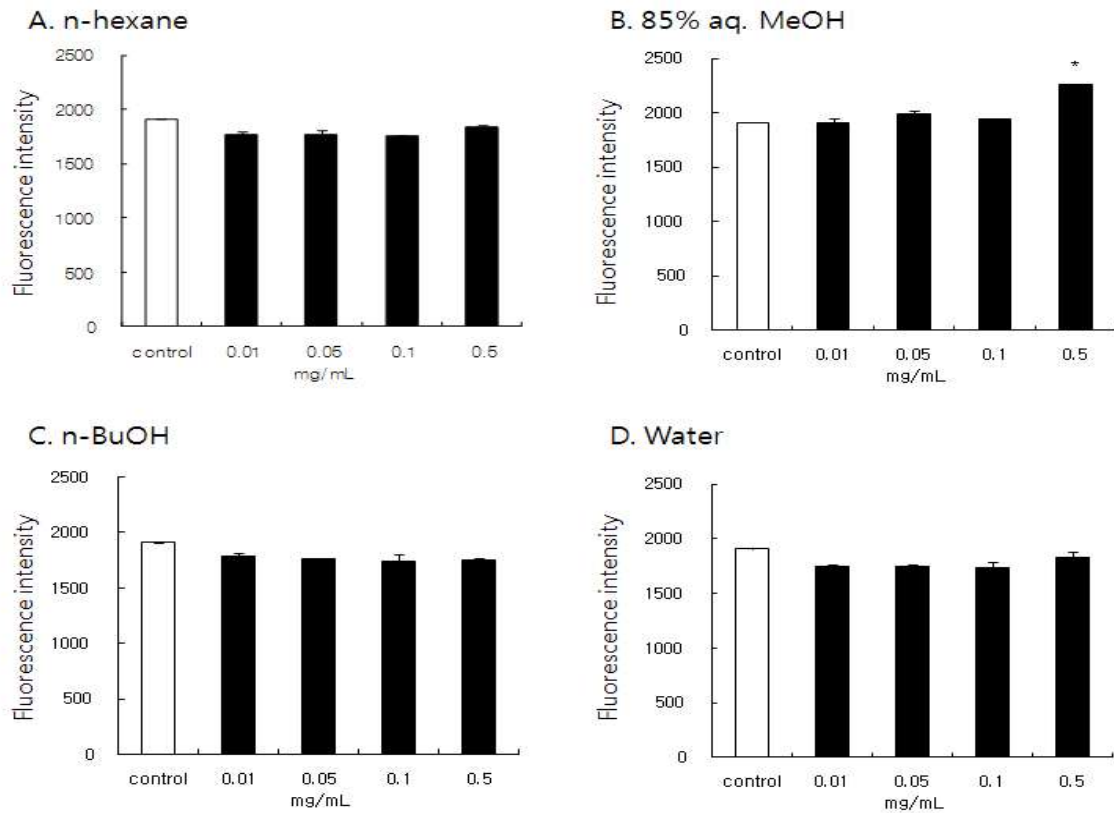
A+M, acetone with methylene chloride extract; MeOH, methanol extract.

All values are means $\pm$ SEM, n=3.

\*p<0.05, significant effect between the control and each extract.

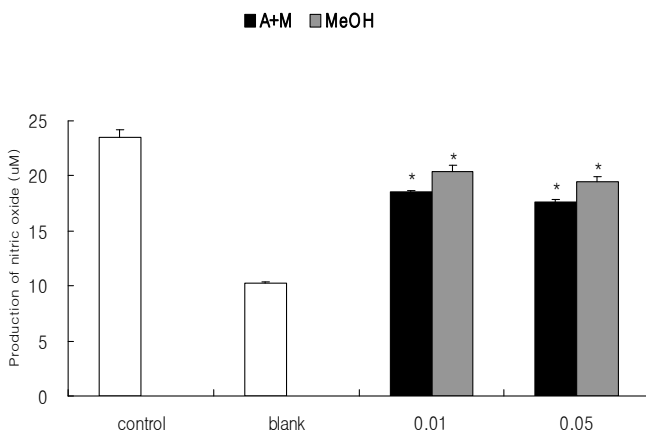
### NO 생성 저해 효과

NO의 생성량은 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 LPS 자극으로 유도된 NO의 함량을 측정하는 것으로 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 농도에서 건조 도라지 추출물과 분획물을 처리하여 배양한 후, 세포 배양액에 Griess 시약을 반응시켜 확인하였다. 시료는 0.05 및 0.01 mg/mL의 농도로 처리하였으며, 대조군으로는 시료대신 PBS를 사용하여 LPS를 처리 한 control과 시료 및 LPS를 처리하지 않은 blank를 사용하였다. LPS를 처리한 control은 NO의 생성량이 높게 나타났으며, LPS를 처리하지 않은 blank는 NO의 생성량이 상대적으로 매우 낮게 나타났다. NO 생성 저해 효과를 확인한 결과, A+M 및 MeOH 추출물은 0.01 및 0.05 mg/mL의 농도에서 NO 생성을 유의적으로 억제하였으며(p<0.05), MeOH 추출물과 비교했을 때 A+M 추출물에 의한 NO 생성 저해 효과가 높았다(Fig. 5). 각 분획물들은 모두 control보다 낮은 NO 생성량을 나타내었으며, 특히 85% aq. MeOH 및 n-BuOH 분획물은 0.05 mg/mL 농도에서 blank에 가까운 NO 생성 억제율을 나타냈다(Fig. 6)(p<0.05). Wang 등(28)은 도라지 뿌리로부터 분리된 platycodin D와 D3로 NO의 생성을 살펴본 결과, 이들은 농도의존적으로 NO의 생성을 저해하였으며, platycodin D의 경우 IC<sub>50</sub> 값은 약 15  $\mu$ M, platycodin D3의 경우 IC<sub>50</sub> 값은 약 55  $\mu$ M로 나타났다고 보고하였다. 또한 24시간동안 총 7번(0, 2, 4, 6, 8, 16 및 24시간) 간격으로 NO 생성 저해를 살펴본 결과, 8시간까지 NO의 생성을 저해하였다고 보고하였다. Kim



**Fig. 4.** Effect of solvent fractions from dried *Platycodon grandiflorum* on GSH levels in HT1080 cells.

n-hexane, n-hexane fraction; 85% aq. MeOH, 85% aqueous methanol fraction; n-BuOH, n-butanol fraction; Water, water fraction. All values are means±SEM, n=3. \*p<0.05, significant effect between the control and each fraction.

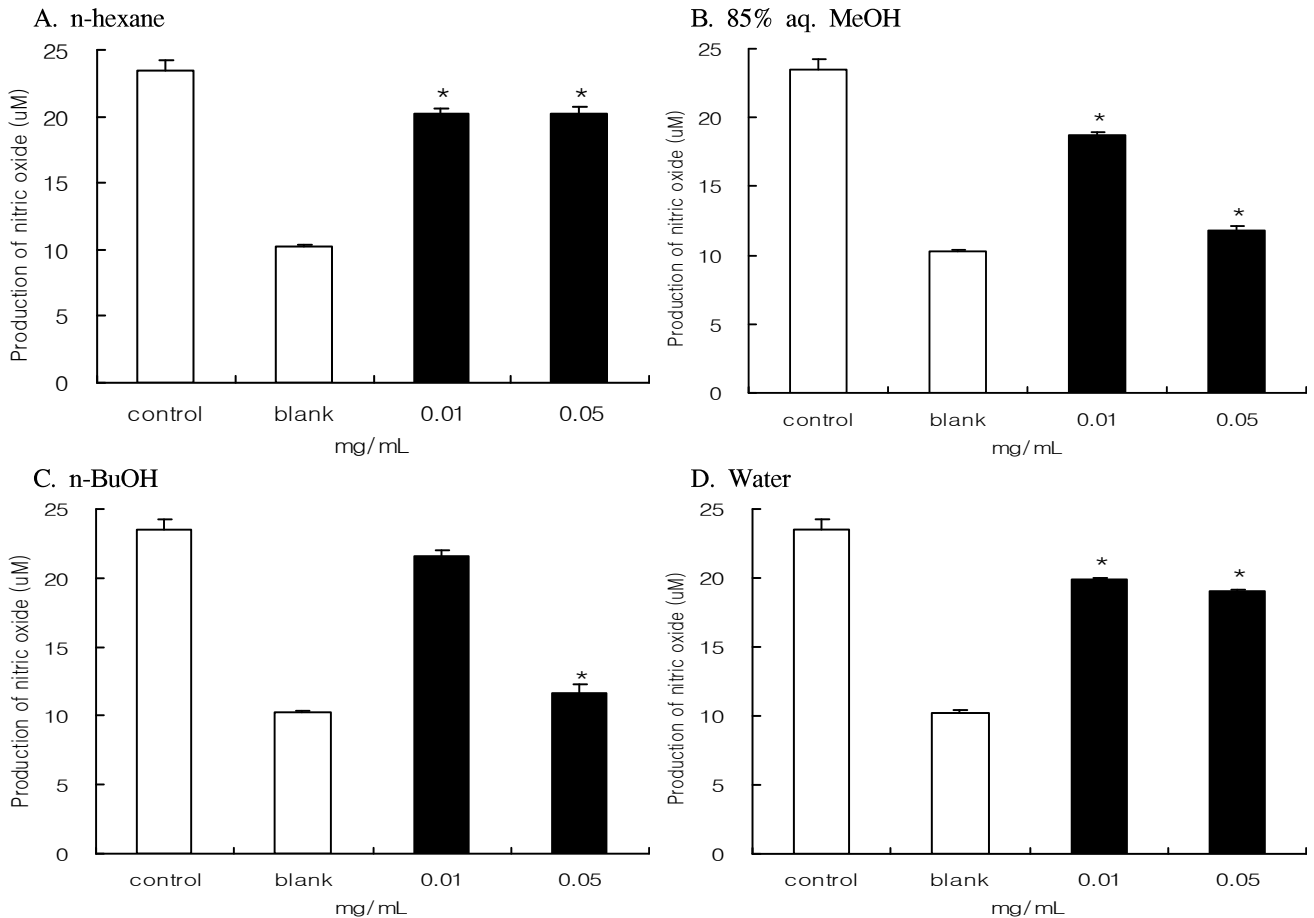


**Fig. 5.** Inhibitory effects of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried *Platycodon grandiflorum* on production of nitric oxide (NO).

A+M, acetone with methylene chloride extract; MeOH, methanol extract. All values are means±SEM, n=3. \*p<0.05, significant effect between the control and each fraction.

등(29)에 의하면 HepG2 세포에서 더덕 및 도라지 에틸아세테이트 분획물로 sodium nitroprusside (SNP)에 의해 유도된

산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과를 살펴본 결과, 이들 추출물 처리가 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하였고 저농도에서는 두 추출물이 유사한 결과를 나타내었으나 고농도에서는 도라지보다는 더덕이 더 효과적으로 세포 사멸을 억제하였다고 보고하였다. 또한 항산화 시스템 발현에 미치는 더덕과 도라지 에틸아세테이트 분획물의 영향을 RT-PCR로 알아본 결과 catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 그리고 metallothionein (MT)-1A mRNA 수준이 더덕 에틸아세테이트 분획물 처리 후 증가하였고, Mn superoxide dismutase, catalase, G6PD, MT-1A와 MT-2A mRNA 수준은 도라지 에틸아세테이트 분획물 처리 후 증가하였다고 보고하였다. 이상의 연구 결과로부터 n-BuOH 분획물에 의한 세포 내 활성 산소종 생성 억제 효과 및 NO 생성 억제효과가 우수하였으므로 이 분획물에 건조 도라지의 생리활성 물질인 사포닌을 비롯한 아미노산, 섬유소 및 indole 화합물이 함유되어 있을 것으로 기대되며 향후 주요 활성물질 분리 및 이에 의한 생리활성 연구가 진행될 필요가 있다.



**Fig. 6. Inhibitory effect of solvent fractions from dried *Platycodon grandiflorum* on production of nitric oxide (NO).**

n-hexane, n-hexane fraction; 85% aq. MeOH, 85% aqueous methanol fraction; n-BuOH, n-butanol fraction; Water, water fraction.

All values are means±SEM, n=3.

\*p<0.05, significant effect between the control and each fraction.

## 요 약

본 연구에서는 도라지 분말을 유기용매로 추출한 후 도라지의 추출물과 분획물들에 의한 세포 내 활성산소종 및 glutathione (GSH)를 측정하여 항산화효과를 검토하였고 NO 생성 저해 효과를 알아보았다. 세포 내 활성산소종 생성 억제 실험에서 건조 도라지의 A+M 및 MeOH 추출물과 추출물을 n-hexane, 85% aq. MeOH, n-BuOH, water로 다시 추출하여 얻어진 각각의 분획물들을 농도별로 HT1080 세포에 처리하였을 때 A+M과 MeOH 추출물 모두 측정시간 120분 동안 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만을 처리한 control군에 비해 세포 내 활성산소종을 크게 억제시켰으며, MeOH 추출물에 의한 항산화 효과가 더 높게 나타났다. 또한, 각 분획물들 중 n-BuOH 분획물이 다른 분획물들에 비해 우수한 항산화 활성을 보였다. GSH 농도 측정 실험에서 A+M 및 85% aq. MeOH 분획물을 처리했을 때 GSH 함량이 증가하였다. NO 생성 저해 실험에서는 A+M 및 MeOH 추출물이 0.01 및 0.05 mg/mL의 농도에서 NO 생성을 억제하는 것으로

나타났으며, A+M 추출물에 의한 저해 효과가 높았다. 각 분획물들은 모두 control보다 낮은 NO 생성량을 나타내었으며, 특히 85% aq. MeOH 및 n-BuOH 분획물은 0.05 mg/mL 농도에서 blank에 가까운 NO 생성 억제율을 나타냈다. 이상의 연구결과로부터 n-BuOH 분획물에 의한 세포 내 활성산소종 생성 억제 효과 및 NO 생성 저해 효과가 우수함을 알 수 있었으며, 향후 분획물의 분리 정제를 통한 새로운 기능성 물질의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Lim KH (1971) A medicinal Phytology (The details). Dong Myoung Sa, Seoul, p 281
2. Tada A, Kaneiwa Y, Shoji J, Shibata S (1975) Studies on the saponins of the root of *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle. I. Isolation and the structure of platycodin-D. Chem Pharm Bull, 23, 2965-2972
3. Akiyama T, Tanaka O, Shibata S (1972) Chemical studies on the oriental plant drugs. XXX. saponins of the roots

- of *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle. (1). Isolation of the saponin and the stereochemistry of polygalactic acid. Chem Pharm Bull, 20, 1945-1951
4. Hong MW (1975) Statistical analyses of Platycodi radix prescriptions. Korean J Pharmacog, 19, 177-188
  5. Kim KS, Osamu E, Shinji I, Hiroshige I (1995) Effects of *Platycodon grandiflorum* feeding on serum and liver lipid concentrations in rats with diet-induced hyperlipidemia. J Nutr Sci Vitaminol, 41, 485-491
  6. Lee EB (1975) Pharmacological activities of crude platycodin. J Pharm Soc Korean, 19, 164-176
  7. Lee JY, Hwang WI, Lim ST (2004) Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. J Ethnopharmacol, 93, 409-415
  8. Lee SI (1981) Chinese pharmaceutics. Soo Seo Won, Seoul, p 129
  9. Kim YS, Lee BE, Kim KJ, Lee YT, Cho KB, Chung YC (1998) Antitumor and immunomodulatory activities of the *P. grandiflorum* cultivated for more than 20 years. Yakhak Hoeji, 42, 382-387
  10. Shon MY, Seo JK, Kim HJ, Sung NJ (2001) Chemical compositions and physiological activities of Doraji (*Platycodon grandiflorum*). J Korean Soc Food Sci Nutr, 30, 717-720
  11. Kim KK, Sung BY, Jung HS, Choi SY, Moon SB (2000) A study on the thermal characteristics of the large low temperature vacuum dryer for biological drying. J Korean Soc Marine Engineers, 24, 427-434
  12. Biesalski HK (2002) Free radical theory of aging. Curr Opin Clin Nutr, 5, 5-10
  13. Yu BP (1996) Aging and oxidative stress: Modulation by dietary restriction. Free Radical Bio Med, 21, 651-668
  14. Block G, Langseth L (1994) Antioxidant vitamins and disease prevention. Food Technol, 48, 80-84
  15. Hatano T (1995) Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols. Nat Med 49, 357-363
  16. Pryor WA (1984) Free radicals in biology. Academic Press. VI., p 371
  17. Nathan CF, Hibbs HB Jr (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Curr Opin Immunol, 3, 65-70
  18. Lee BH, Baik DS, Yun SU, Shin JM, Kim JH, Yun SY, Kim BH, Kim SB, Shin J E, Song IH (2007) Peripheral nitric oxide activity in patients with Liver cirrhosis. The Korean Journal of Medicine, 73, 251-257
  19. Zhang J, Dawson NL, Dawson TM, Snyder SH (1994) Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in Neurotoxicity. Sci, 263, 687-689
  20. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1992) DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA, 89, 3030-3034
  21. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA. 87, 1620-1624
  22. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2', 7'-Dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol, 5, 227-231
  23. Poot M, Verkerk A, Koster JF, Jongkind JF (1986) *De novo* synthesis of glutathione in human fibroblasts during *in vitro* ageing and in some metabolic diseases as measured by a flow cytometric method. Biochem Biophys Acta, 883, 580-584
  24. Green LC, Wagner DA, Logowski GJ, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem, 126, 131-138
  25. Lee KJ, Hwang SJ, Choi JH, Jeong HG (2008) Saponins derived from the roots of *Platycodon grandiflorum* inhibit HT-1080 cell invasion and MMPs activities: Regulation of NF- $\kappa$ B activation via ROS signal pathway. Cancer Letters, 268, 233-243
  26. Jeong CH, Shim KH (2006) Chemical composition and antioxidative activities of *Platycodon grandiflorum* leaves and stems. J Korean Soc Food Sci Nutr, 35, 511-515
  27. Kang BY, Kim M, Bae SJ (2002) Enhancement of antioxidation effect of *Platycodon grandiflorum* with vitamin C on the DLPC liposomes. J Korean Soc Food Sci Nutr, 31, 506-510
  28. Wang C, Levis GBS, Lee EB, Levis WR, Lee DW, Kim BS, Park SY, Park E (2004) Platycodin D and D3 isolated from the root of *Platycodon grandiflorum* modulate the production of nitric oxide and secretion of TNF- $\alpha$  in activated RAW 264.7 cells. Int Immunopharmacol, 4, 1039-1049
  29. Kim SH, Choi JJ, Oh, HT, Chung MJ, Cui CB, Ham SS (2008) Cytoprotective effect by antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction in human HepG2 cells. Korean J Food Sci Technol, 40, 696-701