

## 산화적 손상에 대한 꾸지뽕나무 잎, 열매 및 줄기 추출물의 간세포 보호효과

김옥경<sup>1</sup> · 호진녕<sup>1</sup> · 남다은<sup>1</sup> · 진우진<sup>2</sup> · 황권택<sup>3</sup> · 강정은<sup>4</sup> · 채옥순<sup>4</sup> · 이정민<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 의학영양학과, <sup>2</sup>전남대학교 식품영양학과

<sup>3</sup>남부대학교 식품영양학과, <sup>4</sup>(주)바람마지

<sup>5</sup>경희대학교 임상영양연구소

### Hepatoprotective Effect of *Curdrania tricuspidata* Extracts against Oxidative Damage

Ok Kyung Kim<sup>1</sup>, Jin-Nyoung Ho<sup>1</sup>, Da-Eun Nam<sup>1</sup>, Woojin Jun<sup>2</sup>, Kwon-Tack Hwang<sup>3</sup>,  
Jung Eun Kang<sup>4</sup>, Ok Soon Chae<sup>4</sup>, and Jeongmin Lee<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Gyeonggi-do 446-701, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Food and Nutrition, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea

<sup>4</sup>Barammaji, Gangwon-do 219-832, Korea

<sup>5</sup>Research Institute of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

#### Abstract

We investigated the antioxidant and hepatoprotective effects of extracts from the leaves, stems, and fruit of *Curdrania tricuspidata* (CT) against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or ethanol-induced oxidative damage. The total polyphenol and flavonoid content was the highest in the 80% ethanol extracts from the leaves of the plant (CTL80). Also, the radical scavenging activity of DPPH and ABTS in the CTL80 was significantly higher than that of the non-treated control. To determine the hepatoprotective effects of CT in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ethanol-induced oxidative damage, cell viability was measured using an XTT assay. Pre-treatment of CTL80 significantly increased cell viability compared with the non-treated control cells by 71.21% and 80.40%, respectively. The data suggests that CTL80 exhibits hepatoprotective antioxidant effects. Therefore, CTL80 may be considered a potential agent to control H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or ethanol-induced liver damage.

**Key words:** *Curdrania tricuspidata*, antioxidative activity, hepatoprotective effect, oxidative stress

#### 서 론

1.

간은 인체에서 가장 큰 기관으로 유해한 약물, 독성물질, 화학물질 등으로부터 신체를 보호하는 역할을 하며, 과량의 독성 물질, 만성적인 알코올 섭취 및 감염에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress)는 간질환의 주된 원인으로 알려져 있다(1-4).

인체는 호흡과정을 통해 끊임없이 산소를 필요로 하는데 호흡과정에서 흡인한 산소 중 일부(2~3%)가 활성산소종(reactive oxygen species)이라는 유독한 물질로 전환되며, 이러한 활성산소종은 다른 분자와 결합하여 자유 라디칼(free radical: O<sup>•2-</sup>, OH<sup>•</sup>)과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등을 생성하게 된다(5,6). 활성산소종은 분자 구조적으로 매우 불안정하기 때문에 세포내 DNA, RNA와 같은 핵산물질을 손상시키거나 세포막의 불포화지방산과 결합하여 지질과산화물을 유발하여 산화적 손상을 일으키게 되며, 자유기에 의한 지질과산화 반응은

간세포의 산화적 손상 기전 중 가장 잘 알려져 있다. 특히 산화적 스트레스는 돌연변이, 당뇨병, 노화, 간섬유화 등의 각종 질환발병과도 직접적인 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(7,8).

또한 알코올로 유도되는 CYP2E1 경유 산화반응은 간손상의 병인으로 가장 주목받고 있으며, 이 과정에서 발생하는 활성산소의 생성과 항산화 기전의 감소는 간손상의 주된 원인으로 알려져 있다(2,9). 섭취된 알코올은 알코올탈수소효소, cytochrome P450 2E1(CYP2E1) 및 catalase에 의해 분해되어 아세트알데히드로 대사되며, 과량의 알코올 대사에서 과도하게 생성되는 아세트알데히드는 acetaldehyde-protein 부산물과 지질과산화물의 생성을 유발시켜 간독성에 관여한다. 또한 알코올 대사에 의해 유도되는 CYP2E1, p450 reductase, NADPH oxidase, aldehyde oxidase, xanthine oxidase 등은 생체 내 활성산소종을 유발시키고, 과량의 알코올 대사에서 이러한 효소들은 다량의 자유 라디칼을

\*Corresponding author. E-mail: jlee2007@khu.ac.kr  
Phone: 82-31-201-3779, Fax: 82-31-204-8119

생성함으로써 생체 내에서 산화적 스트레스를 유발하게 되어 알코올성 간손상의 주된 원인이 된다(10-12).

꾸지뽕나무(*Curdrania tricuspidata* Bureau)는 뽕나무과(Molaceae)에 속하는 낙엽활엽 소교목으로 우리나라, 일본, 중국 등지에 자생하는 식물이며, 줄기에는 가시가 있고 10월경 붉은 열매를 맺는 특징이 있다(13,14). 뿌리는 황색을 띄어 염료로 사용되며, 수피는 제지에, 근피는 약용으로 사용된다(13). 또한 꾸지뽕나무 잎은 습진, 폐결핵, 타박상, 급성 관절염 등의 치료에 사용되며 줄기는 주로 부인병 치료에, 열매는 청열과 양혈을 다스리는데 이용되고 있다(13,15). 최근 꾸지뽕나무의 생리활성 작용으로 항염증, 항산화, 항암, 항당뇨, 항균 활성 등이 보고됨에 따라 전라남북도를 중심으로 재배면적이 급속히 늘어나고 있으며(14), 우리나라에서는 민간요법으로 꾸지뽕나무를 다려서 마시면 간암치료에 효과적인 것으로 알려져 있다(16,17).

따라서 본 연구에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 알코올로 산화적 스트레스를 유도한 간세포에서 꾸지뽕나무의 각 부위별, 용매별 추출물의 항산화 활성 및 세포 보호효과를 측정함으로써 산화적 스트레스에 의한 간 손상 개선 소재로의 이용 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에서 사용된 꾸지뽕나무 잎, 열매 및 줄기는 영농법인 고성 꾸지뽕에서 제공받았으며, 이물질 제거한 후 동결건조기로 건조하여 분말화하였다. 분말시료 50 g에 1 L의 용매(10% 에탄올, 80% 에탄올, 증류수)를 각각 가하여 250°C에서 3시간 동안 reflux하여 추출하였다. 각각의 추출물은 여과지(Whatman filter paper No. 6)로 여과한 후, 회전진공농축기로 감압농축 하여 동결건조 한 다음 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

### 시약

세포배양에 사용된 minimum essential medium(MEM), IMDM(Iscoves Modified Dulbecco's Medium), fetal bovine serum(FBS) 및 antibiotics는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, XTT-phenazine methosulfate(PMS)와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 모든 시약 및 용매는 일급 또는 특급 이상의 등급을 사용하였다.

### 총 폴리페놀 함량

각 부위별, 용매별 꾸지뽕나무 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 법(18)을 약간 변형시켜 측정하였다. 시험관에 꾸지뽕나무 추출물 1 mg, 증류수 9 mL을 넣은 후 Folin-Ciocalteu 시약을 1 mL 가하여 잘 혼합하였다. 실온에서 5분간 반응시킨 다음 7% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 7 mL을 첨가하여 잘 혼합

하여 실온에서 90분간 발색시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준검량곡선은 gallic acid를 사용하여 작성하였다.

### 총 플라보노이드 함량

각 부위별, 용매별 꾸지뽕나무 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Nieva 등의 방법(4)을 변형하여 측정하였다. 꾸지뽕나무 추출물 1 mg에 증류수 4 mL을 넣은 후 5% NaNO<sub>2</sub> 용액 0.3 mL을 첨가하여 잘 혼합하였다. 실온에서 5분간 반응시킨 후 AlCl<sub>3</sub> 용액 0.3 mL과 1 M NaOH 2 mL, 증류수 2.4 mL을 첨가하여 microplate reader(VersaMax™ Tunable microplate reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 catechin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

### DPPH 라디칼 소거능

꾸지뽕나무 추출물의 전자공여능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)의 환원력을 이용하여 측정하였다(19). 꾸지뽕나무 추출물 50 µL에 100 µM DPPH 용액 950 µL를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식으로 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (\%)} = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$

### ABTS 라디칼(ABTS<sup>+</sup>) 소거능

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS) radical-scavenging 활성은 Re 등(20)의 방법을 변형하여 측정하였다. 100 mM potassium phosphate buffer 용액(pH 7.4)에 7 mM ABTS(Bio Basic INC., Markham, Ontario, Canada)와 2.5 mM potassium persulfate을 82:1로 용해시켜 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 용액을 만들었으며, 96-well plate 각 well에 제조된 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 용액 390 µL과 꾸지뽕나무 추출물 10 µL를 넣어 잘 혼합하여 실온에 30분간 방치한 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거능은 아래의 식으로 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{라디칼 소거능 (\%)} = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$

### 세포배양

본 실험에 사용된 인간 간암세포주 HepG2는 ATCC(American type culture collection)에서 구입하였으며, 10% FBS와 penicillin(100 units/mL), streptomycin(100 g/mL)이 함유된 MEM 배지를 사용하여 배양하였고, HepG2/2E1 세포는 HepG2 세포에 CYP2E1을 transfection시켜 만들었으며, 20% FBS와 0.5%(v/v) streptomycin(50 g/mL), pen-

icillin(50 units/mL)을 첨가한 IMDM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humid air로 조절된 배양기에서 배양하였다.

**꾸지뽕나무 추출물의 세포 독성**

HepG2 세포에 대한 각 부위별, 용매별 꾸지뽕나무 추출물의 세포 독성은 XTT assay로 측정하였다(21). HepG2 세포는 5×10<sup>4</sup> cells/24-well로 분주하여 20시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 5일 동안 각각의 꾸지뽕나무 추출물을 처리하였다. 5일 후, XTT-phenazine methosulfate(PMS) 용액(1 mg XTT-10 µg PMS/mL of IMDM without phenol free) 250 µL을 첨가하여 37°C에서 2시간 배양한 다음 생성된 formazan을 microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 따른 세포 생존율 측정**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 따른 꾸지뽕나무 추출물의 간세포 보호효과는 XTT assay를 이용하여 측정하였다. HepG2 세포는 5×10<sup>4</sup> cells/24-well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 phosphate-buffered saline(PBS)로 2회 세척한 다음 꾸지뽕나무 추출물(100 µg/mL) 1 mL을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 산화적 스트레스를 일으키기 위하여 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 후, 2시간 동안 배양한 다음 XTT-PMS 용액을 넣고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 세포생존율은 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

**알코올 처리에 따른 세포 생존율 측정**

HepG2/2E1 세포를 5×10<sup>4</sup>cells/24-well로 분주하여 20시간 동안 배양하고, 3% FBS를 함유한 배지로 교환하여 꾸지뽕나무 추출물(100 µg/mL)을 처리하고 1시간 후 300 mM 알코올을 처리하여 24시간 배양하였다. 5일간 같은 방법으로 세포에 꾸지뽕나무 추출물과 알코올을 처리한 후 XTT-PMS 용액을 넣고 2시간 동안 반응시켰다. 생성된 formazan을 microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정 후, 세포생존율은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

**통계처리**

실험결과는 SAS package(Statistical Analysis System, version 9.1, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)를 이용하여 평균±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성은 p<0.05 수준에서 Student t-test와 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량**

꾸지뽕나무의 부위별, 용매별 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 1에 나타내었다. 총 폴리페놀은 꾸지뽕 잎 80% 에탄올 추출물(CTL80)이

**Table 1. Total phenol and flavonoid contents of extracts from leaves, stems, and fruits of *Cudrania tricuspidata***

Samples <sup>1)</sup>	Polyphenol content (mg/g)	Flavonoid content (mg/g)
CTL0	6.88±0.07 <sup>2)</sup>	4.99±0.22
CTL10	8.22±0.12	6.23±0.13
CTL80	13.18±0.62	9.73±0.13
CTS0	5.16±0.25	1.71±0.08
CTS10	5.90±0.43	2.42±0.14
CTS80	7.49±0.44	3.87±0.25
CTF0	1.09±0.01	0.30±0.04
CTF10	1.02±0.01	0.19±0.02
CTF80	1.27±0.01	0.45±0.05

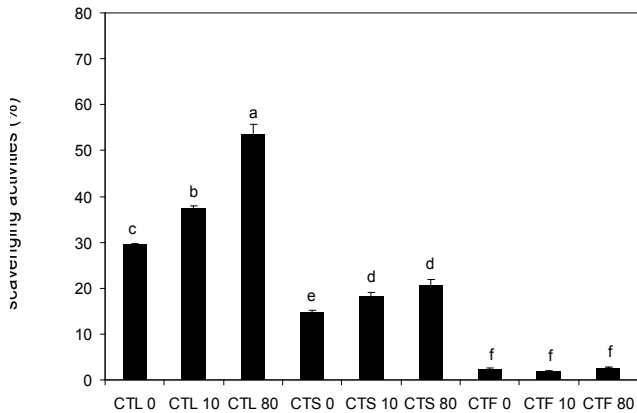
<sup>1)</sup>CTL0: water extract of *Cudrania tricuspidata* leaves, CTL10: 10% ethanol extract of *Cudrania tricuspidata* leaves, CTL80: 80% ethanol extract of *Cudrania tricuspidata* leaves, CTS0: water extract of *Cudrania tricuspidata* stems, CTS10: 10% ethanol extract of *Cudrania tricuspidata* stems, CTS80: 80% ethanol extract of *Cudrania tricuspidata* stems, CTF0: water extract of *Cudrania tricuspidata* fruits, CTF10: 10% ethanol extract of *Cudrania tricuspidata* fruits, CTF80: 80% ethanol extract of *Cudrania tricuspidata* fruits.

<sup>2)</sup>The results were presented mean±SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3).

13.18%로 가장 높게 나타났으며, 꾸지뽕 잎 10% 에탄올 추출물(CTL10), 꾸지뽕 줄기 80% 에탄올 추출물(CTS80) 순으로 높게 나타났다. Lee 등(22)이 보고한 꾸지뽕나무 80% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 잎>근피>뿌리>줄기>가시 순으로 잎의 총 폴리페놀 함량이 가장 높았던 본 연구 결과와 일치하였다. 총 플라보노이드 함량 또한 총 폴리페놀 함량과 유사한 경향을 나타내어 CTL80이 9.73%로 가장 높게 나타났으며, CTL10, 꾸지뽕 잎 물 추출물(CTL0) 순으로 높게 나타났다. 시료의 부위별에 따라 꾸지뽕 잎과 줄기가 많은 양의 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있었으며, 꾸지뽕 열매는 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 유의적으로 낮게 나타났다. 용매에 따른 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 80% 에탄올>10% 에탄올>물 추출물 순으로 나타났다.

**전자공여능**

DPPH는 안정적인 자유 라디칼로 cysteine, glutathione과 같은 함유황아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine 등에 의해 환원되어 보라색의 DPPH가 무색의 diphenylpicrylhydrazine으로 탈색되면서 흡광도가 변하는 원리로 분석되며, 항산화물질의 항산화능 측정에 유용한 방법이다(6,23). 꾸지뽕나무 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 CTL80이 53.6%로 가장 높게 나타났으며, CTL10, CTL0 순이었다(Fig. 1). 줄기와 열매 추출물은 잎 추출물에 비해 유의적으로 낮은 전자공여능을 나타내었다. 본 실험 결과는 Choi 등(14)이 보고한 꾸지뽕나무 열매는 다른 부위에 비해 DPPH 라디칼 소거능이 떨어지는 경향이 있다는 이전 연구 결과와 일치하며, Lee 등(22) 또한 꾸지뽕나무 80% 에탄올 추출물의 DPPH 소거능이 앞에서 가장 높고 근피>뿌리>가시>줄기 순이라고 보고한 바 있다. Kang 등(24)은 DPPH 라디칼

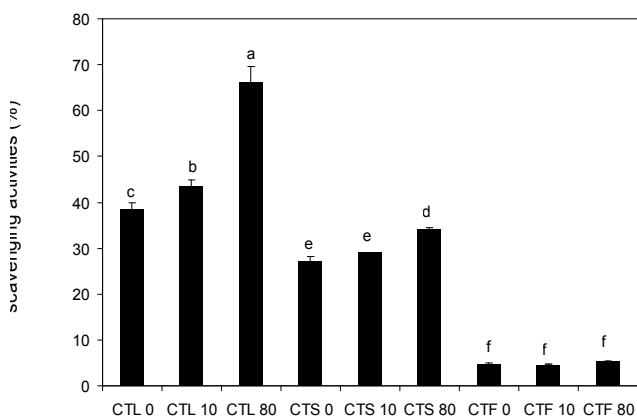


**Fig. 1.** DPPH radical scavenging activity of extracts from leaves, stems, and fruits of *Cudrania tricuspidata*. The results were presented mean $\pm$ SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3). Different letters show a significantly difference at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

소거능이 폴리페놀과 플라보노이드 화합물 함량에 기인한다고 보고하였으며, Chon(25)에 의해 DPPH 소거능을 보이는 잎의 성분이 dihydroquercetin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside 등 8종으로 동정된바 있다. 따라서 본 연구결과에서 꾸지뽕나무 잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 가장 높았던 것은 잎 추출물의 높은 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량에 기인하는 것으로 추정된다.

#### ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거능은 ABTS 용액과 과산화칼륨과의 반응에 의해 생성된 ABTS 라디칼이 추출물의 항산화물질과 반응하여 라디칼 특유의 청록색이 탈색되어 흡광도의 변화를 나타내므로 이를 분석하여 추출물의 항산화능력을 측정할 수 있다. ABTS 라디칼 소거능 측정방법은 DPPH assay와 마찬가지로 인위적으로 라디칼을 제거하는 작용기작으로 DPPH 라디칼 소거능과 유의적인 상관성을 보이는 것



**Fig. 2.** ABTS radical scavenging activity of extracts from leaves, stems, and fruits of *Cudrania tricuspidata*. The results were presented mean $\pm$ SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3). Different letters show a significantly difference at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

으로 알려져 있다(26). 꾸지뽕나무 각 부위별, 용매별 추출물의 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. ABTS 라디칼 소거활성은 DPPH 전자공여능 실험결과와 유사하게 잎 추출물의 ABTS 라디칼 소거능이 가장 높았으며, CTL80(66.06%), CTL10(43.58%), CTL0(38.32%) 순이었다. 꾸지뽕나무 부위별로는 잎>줄기>열매 순으로 ABTS 라디칼 소거능이 높았고, 추출 용매별로는 잎과 줄기에서 80% 에탄올>10% 에탄올>물 순으로 높게 나타났다.

#### 세포 생존율

꾸지뽕나무 추출물의 인간 간암 세포주 HepG2에 대한 세포 독성을 알아보기 위하여 XTT assay를 실시하였다. HepG2 세포에 대한 꾸지뽕나무의 부위별, 용매별 추출물의 세포 생존율은 Fig. 3에 나타내었다. CTL0와 CTL10은 모든 농도(0~500  $\mu$ g/mL)에서 세포독성이 나타나지 않았으나, CTL80은 250과 500  $\mu$ g/mL 농도에서 유의적으로 세포생존율이 감소하였다. 꾸지뽕 잎과 마찬가지로 꾸지뽕 줄기 또한 물(CTS0)과 10% 에탄올 추출물(CTS10)에서는 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았으나, CTS80 500  $\mu$ g/mL에서는 유의적으로 낮은 세포생존율을 보여 세포독성이 나타났다. 그러나 꾸지뽕 열매 추출물은 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. 이상의 결과를 토대로 추후 실험에는 모든 부위와 추출용매에서 세포독성이 나타나지 않은 100  $\mu$ g/mL 농도를 사용하였다.

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 처리에 따른 세포 생존율

본 연구에서는 꾸지뽕나무 추출물의 간세포 보호효과를 알아보기 위하여 HepG2 세포에 활성산소의 일종인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 400  $\mu$ M 농도로 처리하여 산화적 손상을 일으킨 후 산화적 손상에 대한 세포독성을 XTT assay로 측정하였다. 그 결과 400  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 처리한 무처리 대조군은 대조군에 비하여 유의적으로 세포생존율이 감소되어 세포독성을 나타내었다(Fig. 4). 이는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 자유 라디칼들이 세포소기관의 지질과산화나 DNA의 돌연변이를 유발함으로써 세포독성을 나타냈다는 Loft 등(27)의 보고와 일치하는 것으로 XTT assay가 주로 세포소기관과 밀접한 관련이 있음과 연관시켜 볼 때 아마도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화적 손상이 세포소기관의 효소활성을 억제함으로써 세포손상을 초래하였을 것으로 생각된다. 반면 CTL80의 전처리는 71.21%의 세포생존율을 보여 가장 높은 간세포 보호효과를 나타내었으나, 꾸지뽕 줄기와 잎 및 10% 에탄올과 물을 사용한 꾸지뽕나무 추출물은 무처리 대조군보다 유의적으로 낮거나 유사한 세포생존율을 나타내어 세포보호효과가 없는 것으로 생각된다. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 가장 많아 항산화활성이 높았던 CTL80이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도되는 산화적 손상으로부터 간세포 보호효과를 나타낸 것으로 사료된다.

#### 알코올 처리에 따른 세포 생존율

CYP2E1은 알코올에 의해 유도되며 알코올 산화계(etha-

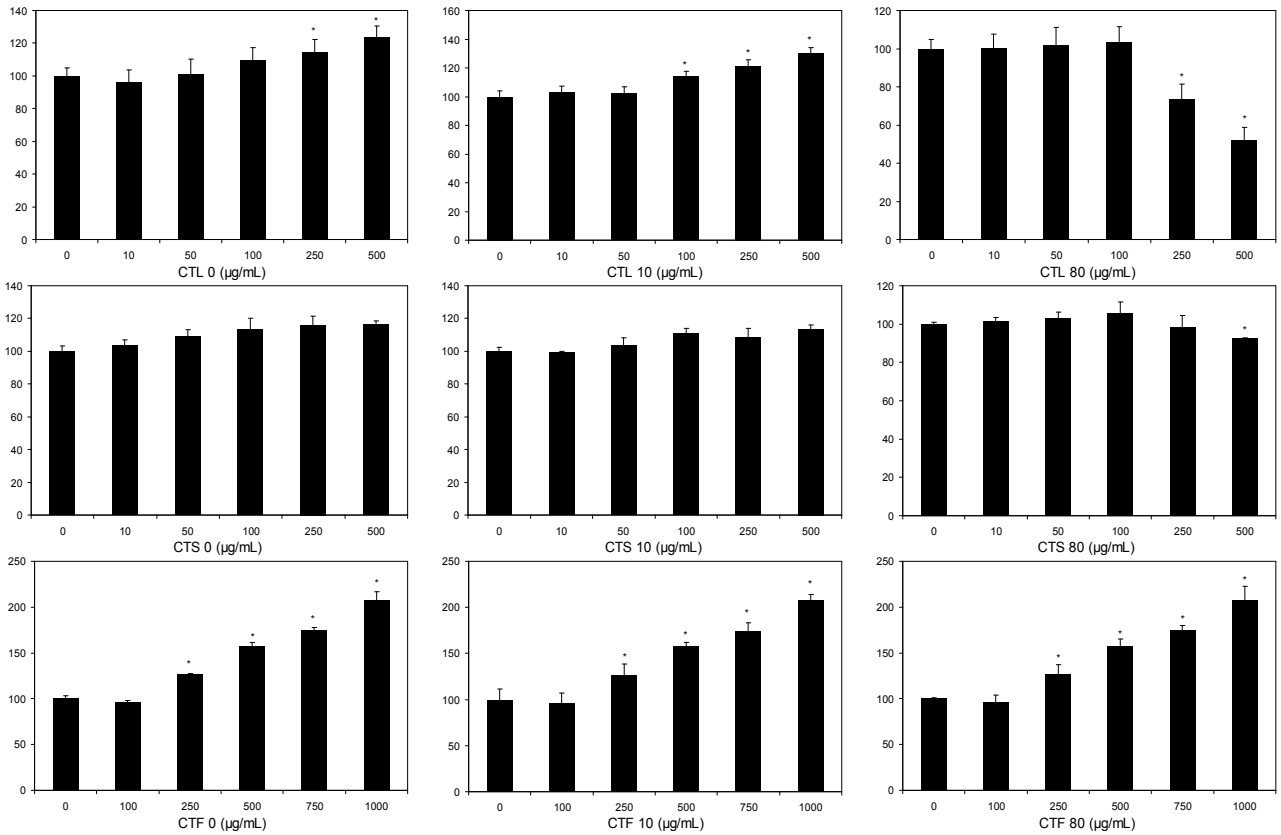


Fig. 3. Effects of extracts from leaves, stems, and fruits of *Cudrania tricuspidata* on cell viability in HepG2. The results were presented mean±SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3). \*p<0.05.

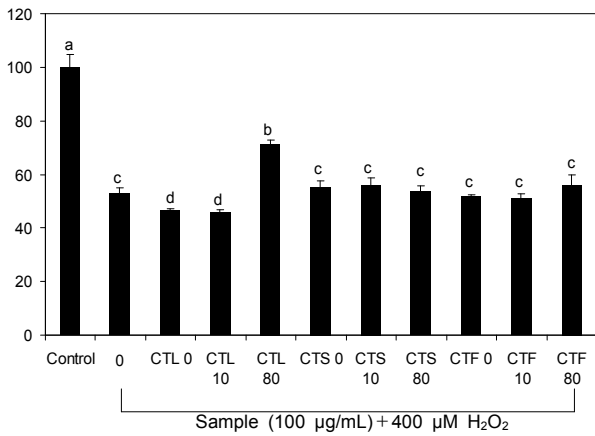


Fig. 4. Effects of extracts from leaves, stems, and fruits of *Cudrania tricuspidata* on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in HepG2. The results were presented mean±SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3). Control: non-treated control, 0:400 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Different letters show a significantly difference at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

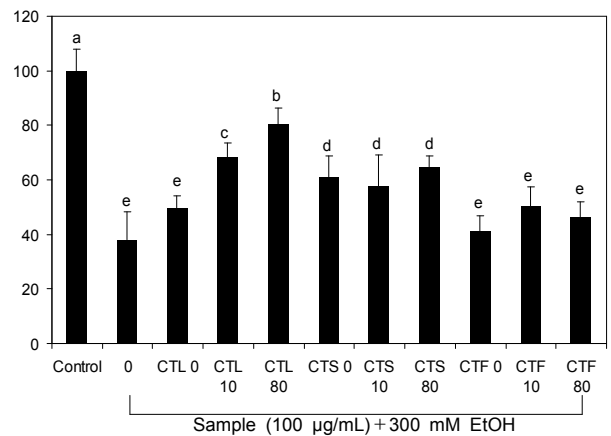


Fig. 5. Effects of extracts from leaves, stems, and fruits of *Cudrania tricuspidata* on ethanol-induced oxidative damage in HepG2/2E1. The results were presented mean±SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3). Control: non-treated control, 0:300 mM EtOH. Different letters show a significantly difference at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

nol-oxidizing system)의 주된 구성성분으로 알려져 있다. 특히 CYP2E1에 의해 유도되는 알코올 산화과정 중 간 손상의 주된 원인은 CYP2E1에 의해 생성되는 O<sup>·</sup>2와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 같은 다량의 활성산소종이며, 이러한 활성산소종은 세포막 지질 과산화와 세포독성을 초래하게 된다(28,29).

이에 본 연구에서는 HepG2/2E1 세포에 300 mM 알코올을 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 후 꾸지뽕나무 추출물의 간세포 보호효과를 XTT assay로 측정하였다(Fig. 5). 그 결과 CTL80이 80.40%로 가장 높은 세포생존율을 나타내었으며, CTL10(68.3%), CTS80(64.9%) 순으로 높은 간세포

보호효과를 나타내었다. 이러한 꾸지뽕나무 추출물의 간세포 보호효과는 HepG2/2E1 세포에서 알코올이 대사되는 동안 생성된 자유라디칼이 꾸지뽕나무 추출물에 의해 scavenging 되었기 때문인 것으로 생각된다(30). 그러나 항산화 활성이 낮게 나타났던 꾸지뽕 잎 물 추출물과 열매 추출물은 알코올에 의한 간 손상에 대한 보호효과가 나타나지 않았다.

이상의 결과로 볼 때 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 가장 높아 DPPH와 ABTS assay에 의한 라디칼 소거능이 뛰어날 뿐만 아니라 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 알코올로 유도한 산화적 손상에 대한 세포 보호효과가 가장 우수하였던 꾸지뽕 잎 80% 에탄올 추출물은 간세포 보호효과를 갖는 기능성 소재로의 이용 가능성이 높을 것으로 사료된다. 특히 꾸지뽕나무 잎은 나무의 생존과 관계되는 줄기와 비교할 때 자원 이용의 효율성이 높아 꾸지뽕나무의 이용가치를 더욱 높일 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 산화적 스트레스에 의한 간 손상 개선 소재 개발을 위하여 꾸지뽕나무 각 부위별(잎, 줄기, 열매), 용매별(80% 에탄올, 10% 에탄올, 물) 추출물의 항산화 활성 및 간세포 보호효과를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량은 꾸지뽕 잎 80% 에탄올 추출물에서 가장 높게 나타났으며, 부위별로는 잎>줄기>열매 순이었고, 추출용매별로는 80% 에탄올>10% 에탄올>물 추출물 순으로 나타났다. DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능 또한 잎 80% 에탄올 추출물이 가장 높았으며, HepG2 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 손상에 대해서는 꾸지뽕 잎 80% 에탄올 추출물만 유의적으로 높은 세포보호활성을 나타내었으며, HepG2/2E1 세포에서 알코올로 유도된 산화적 손상에 대한 각 부위별, 용매별 추출물의 간세포보호효과 또한 꾸지뽕 잎 80% 에탄올 추출물이 가장 높게 나타났다. 부위별로는 잎>줄기>열매 순이었고, 추출 용매별로는 꾸지뽕 잎의 경우 80% 에탄올>10% 에탄올>물 순이었고, 줄기와 열매의 경우는 용매별로 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이상의 결과로부터 꾸지뽕나무 잎 추출물은 우수한 항산화활성을 가질 뿐만 아니라 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 알코올로 유도된 간 손상으로 부터 간세포 보호활성을 보임을 확인하였다. 이에 꾸지뽕나무 잎 추출물은 산화적 스트레스에 의한 간 손상으로 부터 간세포 보호효과를 갖는 기능성 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 문 헌

- Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. 2009. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol* 83: 519-548.
- Caro AA, Cederbaum AI. 2004. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 44: 27-42.
- An CS, Jin HL, Jeon YH, Bak JP, Kim JD, Yoon JH, Lim BO. 2010. Immunoregulatory effects of water extracts of *Inonotus obliquus* in carbon tetrachloride-induced liver damage animal model. *Korean J Medicinal Crop Sci* 18: 1-8.
- Nieva MM, Sanpietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
- Papa S, Skulachev VP. 1997. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 174: 305-319.
- Cho SH, Choi YJ, Rho CW, Choi CY, Kim DS, Cho SH. 2008. Reactive oxygen species and cytotoxicity of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) sap. *Korean J Food Preserv* 15: 105-110.
- Reddy BS, Reddy RK, Reddy BP, Ramakrishna S, Diwan PV. 2008. Potential in vitro antioxidant and protective effects of *Soymida febrifuga* on ethanol induced oxidative damage in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol* 46: 3429-3442.
- Wallace DC. 1992. Mitochondria genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 256: 628-632.
- Mari M, Cederbaum AI. 2001. Induction of catalase, alpha, and microsomal glutathione S-transferase in CYP2E1 overexpressing HepG2 cells and protection against short-term oxidative stress. *Hepatology* 33: 652-661.
- You Y, Jung KY, Lee YH, Jun W, Lee BY. 2009. Hepatoprotective effects of *Hovenia dulcis* fruit on ethanol-induced liver damage in vitro and in vivo. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 154-159.
- Cederbaum AI. 2006. CYP2E1—biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. *Mt Sinai J Med* 73: 657-672.
- Lu Y, Cederbaum AI. 2008. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med* 44: 723-738.
- Kim JY, Chung JH, Hwang I, Kwan YS, Chai JK, Lee KH, Han TH, Moon JH. 2009. Quantification of quercetin and kaempferol contents in different parts of *Cudrania tricuspidata* and their processed foods. *Kor J Hort Sci Technol* 27: 489-496.
- Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Kim DH, Ryu J. 2009. Antioxidant activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to harvesting parts and time. *Korean J Med Crop Sci* 17: 115-120.
- Joo HY, Lim KT. 2009. Protective effect of glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* on liver in CCl<sub>4</sub>-treated A/J mice. *Korean J Food Sci Technol* 41: 93-99.
- Kim HJ, Cha JY, Choi MR, Cho YS. 2000. Antioxidative activities of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43: 148-152.
- Park JC, Choi JS, Choi JW. 1995. Effects of the fractions from the leaves, fruits, stems and roots of *Cudrania tricuspidata* and flavonoids on lipid peroxidation. *Kor J Pharmacogn* 26: 377-384.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 152-178.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
- Lim YM, Kim BR, Hong KY. 2008. Antioxidant effect of *Crataegi Fructus* extract on the oxidative stress of reactive

- oxygen species in cultured human skin fibroblasts. *Kor J Ori Physiol Pathol* 22: 115-119.
22. Lee JS, Han GC, Han GP, Nobuyuki K. 2007. The anti-oxidant activity and total polyphenol content of *Cudrania tricuspidata*. *J East Asian Soc Dietary Life* 17: 696-702.
23. Sanchez-Moreno C. 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int* 8: 121-137.
24. Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27: 978-984.
25. Chon IJ. 2003. Anti-oxidant compounds of *Cudrania tricuspidata* leaves. *Master Thesis*. Chungang University, Seoul, Korea.
26. Lee YM, Bae JH, Jung HY, Kim JH, Park DS. 2011. Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean edible wild plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 29-36.
27. Loft S, Astrup A, Buemann B, Poulsen HE. 1994. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J* 8: 534-537.
28. Lee SS, Buters JT, Pineau T, Fernandez-Salguero P. 1996. Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *J Biol Chem* 271: 12063-12067.
29. Lee YH, Lee J, Im EJ, Jun W, Cho HY. 2009. Modulation of ethanol-induced P450 enzyme activities and antioxidants in mice by *Hordeum vulgare* extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1347-1352.
30. Kahraman A, Çakar H, Köken T. 2011. The protective effect of quercetin on long-term alcohol consumption-induced oxidative stress. *Mol Biol Rep* (Epub).

(2011년 10월 14일 접수; 2011년 11월 21일 채택)