

환삼덩굴 메탄올 추출물의 *in vitro* 항산화 및 항암 활성

이연리* · 김기연** · 이상훈 · 김민영 · 박혜진 · 정현상

*대전보건대학 식품영양과, **대전보건대학 전통조리과, 충북대학교 식품공학과

Antioxidant and Antitumor Activities of Methanolic Extracts from *Humulus japonicus*

Youn Ri Lee*, Ki-Youn Kim**, Sang Hoon Lee, Min Young Kim, Hye Jin Park and Heon Sang Jeong

*Dept. of Food and Nutrition, Daejeon Health Sciences College, Daejeon 300-711, Korea

**Dept. of Traditional Cookery, Daejeon Health Sciences College, Daejeon 300-711, Korea

Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract

To evaluate the antioxidant and potential of *Humulus japonicus*, total polyphenol and flavonoid content, radical scavenging activities, and antitumor activities were measured. The total polyphenol and flavonoid contents of the methanol extracts from *Humulus japonicus* were 30.13±1.13 and 13.61±0.49 mg gallic acid equivalent/g extract, respectively. DPPH radical and hydroxyl radical scavenging activities of methanol extracts of *Humulus japonicus* were 60% and 35%, respectively. The *Humulus japonicus* higher activities of anticancer activities on liver cancer cell lines compared to other cancer cell lines.

Key words: *Humulus japonicus*, polyphenol, antioxidant activity, antitumor activity

서 론

최근 경제성장과 식생활의 변화에 따라 각종 성인병 및 만성질환이 지속적으로 증가하고 있으며, 건강 지향적으로 변화함에 따라 소비자들은 항균 및 항산화 효과를 가지고 있는 웰빙(well-bing)형 기능성식품에 관심이 집중되고 있다(Min 등 2010). 이에 따라 천연물을 대상으로 한 연구가 활발히 수행되면서 항균, 항산화, 항암, 면역력 강화 등 천연물의 기능성과 천연물에 함유되어 있는 2차 대사산물의 생리활성 효과에 대한 연구가 주요 관심사가 되고 있다(Park & Kim 1992). 따라서 단순한 식품으로서가 아니라 생체에 영향을 미치는 효과와 기능으로서의 생체방어, 생체리듬조절 및 질병의 회복과 노화억제 등 생명활동에 대한 식품의 생리조절 능력을 가진 기능성식품에 관심이 집중되고 있다(Yoon 등 2005).

활성산소는 노화, 암, 관절염 등에 직 간접적으로 생체 장애를 일으키는 원인으로 알려져 있다(Reiter RT 1995). 활성산

소를 조절할 수 있는 항산화제는 superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase 등의 효소 계열의 예방적 항산화제(Duh 등 1999)와 phenolic 화합물, tocopherol류, ascorbic acid, carotenoid, glutathione, 아미노산 등의 천연항산화제가 있으며(Osborn & Akoh 2003), 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole(BHA)와 butylated hydroxy toluene(BHT) 등은 안전성에 대하여 논란이 제기되어, 현재에는 허용대상 식품이나 사용량이 법적으로 엄격히 규제되어 있다(Yen & Hsieh 1998). 이처럼 천연으로부터 산화반응 및 radical의 반응성을 억제할 수 있는 항산화물질을 찾는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 일부는 상품화되고 있다.

환삼덩굴(*Humulus japonicus*)은 삼과에 속하는 1년초로서, 7~8월에 개화하는 자웅이주의 식물이며, 우리나라 전역과 동아시아지역에 주로 분포하고 있다. 약리작용으로는 혈압강하작용, 이뇨작용, 항균작용들이 알려져 있다(Park 등 2000). 환삼덩굴에 관한 연구로는 환삼덩굴의 항산화성(Park 등 1994)

*Corresponding author: Heon Sang Jeong, Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea. Tel: +82-43-261-2570, Fax: +82-43-271-4412, E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr

과 식용유지의 항산화 및 항돌연변이에 대한 효과(Park 등 1995)에 대하여 보고한 바 있다. 따라서 본 연구는 식물자원으로 풍부하게 존재하는 환삼덩굴을 메탄올로 추출하여 다양한 항산화 활성 및 항암활성을 측정하여 기능성소재로서의 이용가능성을 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 시료는 2010년에 한국식물추출물은행에서 환삼덩굴메탄올 추출물을 분양을 받아서 사용하였고, 시약은 Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), 2-deoxyribose, TCA(trichloroacetic acid), TBA(tribromoacetic acid) 등은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

2. 환삼덩굴 메탄올 추출물의 항산화성분 함량 측정

추출물에 대한 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원된 결과, 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다(Dewanto 등 2002). 추출물 50 μ l에 2% Na_2CO_3 용액 1 ml를 가한 후 3분간 방치하여 50% Folin-Ciocalteu reagent 50 μ l를 가하였다. 30분 후, 반응액의 흡광도 값을 750 nm에서 측정하였고, 표준물질인 gallic acid를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 시료 g 중의 mg gallic acid equivalent(GAE, dry basis)로 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 추출물 250 μ l에 증류수 1 ml와 5% NaNO_2 75 μ l를 첨가한 다음, 5분 후 10% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 150 μ l를 가하여 6분간 방치하고 1 N NaOH 500 μ l를 가하였다. 11분 후, 반응액의 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였다(Jia 등 1999). 표준물질인 gallic acid를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 시료 g 중의 mg gallic acid equivalent(GAE, dry basis)로 나타내었다.

3. 환삼덩굴 메탄올 추출물의 radical 소거활성 측정

DPPH radical 소거활성은 Blois MS(1958)의 방법을 변형하여 측정하였다. 추출물 0.2 ml에 0.2 mM DPPH 용액(99.9% ethanol에 용해) 0.8 ml를 가한 후, vortex mixer로 10초간 진탕하고 30분 후에 분광광도계(UV-1650PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyl radical 소거활성은 Halliwell 등(1987)의 방법에 의거하여 10 nM $\text{FeSO}_4 \cdot \text{EDTA}$ 200 μ l, 10 mM 2-deoxyribose 200 μ l, 0.1M 인산완충액 1.39 ml에 추출물 10 μ l를 넣고 10 mM H_2O_2 200 μ l 용액으로 radical 생성을 유도하여 37°C에서 4시간 반응하

였다. 2.8% TCA로 반응을 정지시키고 0.8% TBA 용액을 첨가하여 10분간 끓여 발색한 뒤 반응액을 냉각하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 메탄올 추출물의 *in vitro* 항암활성 측정

본 실험에서 사용한 암세포는 인체 대장암세포(HCT-116), 폐암세포(A-549), 위암세포(AGS) 및 간암세포(Hep-G2)를 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 사용하였다. 각각의 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)와 100 U/ml penicillin G, 50 μ g/ml streptomycin을 첨가한 RPMI-1640(Gibco Co., NY, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였으며, 세포 밀도가 높아지면 5분간 trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양을 실시하였다. 환삼덩굴 메탄올 추출물의 암세포주 증식에 미치는 영향은 Ishiyama 등(1996)의 방법에 따라 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay로 실험하였다. 즉, 1×10^5 cell/well 농도로 96 well plate에 100 μ l씩 분주한 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양 후, 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지에 일정 농도로 희석된 추출물 100 μ l를 첨가하여 다시 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 2 mg/ml 농도의 MTT시약을 well당 10 μ l씩 분주한 다음 37°C, 5% CO_2 배양기에서 4시간 배양한 후 MTT시약이 포함된 배지를 제거하고, dimethyl sulfoxide(DMSO) 100 μ l를 가한 다음 상온에서 발색시키고, ELISA microplate reader (ELx 808, BioTek Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 암세포증식 억제율은 다음의 식에 따라 생존율로 표시하였다.

생존율(대조구의 %) =

$$\text{시료처리구의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도} \times 100$$

5. 통계처리

실험 결과는 평균값과 표준편차로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS(statistical package for social sciences, version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 one-way ANOVA 분석을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 환삼덩굴의 항산화성분

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 물질로 다양한 구조와 분자량을 가지며, 페놀성 화합물의 phenolic hydroxyl기가 단백질과 같은 거대분자와의 결합을 통해 항산화, 항암 및 항균 등의 생리기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Choi 등

Table 1. Total polyphenol and flavonoid contents of methanol extracts from *Humulus japonicus*

Sample	Content(mg gallic acid equivalent/g)	
	Total polyphenol	Total flavonoid
<i>Humulus japonicus</i>	30.13±1.13 ¹⁾	13.61±0.49

¹⁾ The values represent mean±S.D.

2003). 환삼덩굴의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량은 각각 30.13, 13.61 mg/g으로 나타났다(Table 1). Lee 등(2012)은 황국과 백국 메탄올 추출물에서 총 폴리페놀 함량이 각각 5.09, 1.57 g/100 g 나타내었다. Jung 등(2007)은 약용식물인 진피, 매자나무 뿌리, 매자나무 줄기, 상백피, 석곡, 석창포, 취나물, 텍사, 호장근을 대상으로 총 폴리페놀 함량을 조사한 결과, 각각 86.7, 254.9, 436.2, 234.0, 104.9, 249.1, 655.0, 76.2, 725.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 함량을 나타내었다. Lee 등(2011)은 복분자, 산수유, 울금의 총 폴리페놀 함량은 각각 16.30, 0.94, 21.10 mg/g 함량을 나타내었다. Lee 등(2012)은 황기와 몽고황기에서 플라보노이드 함량은 각각 11.3, 13.3 mg/g 함량을 나타내었다. Lee 등(2011)은 국내산 산채류의 메탄올 추출물의 폴리페놀 함량을 보면 산부추(8.2 mg/g), 잔대(10.9 mg/g), 더덕(12.4 mg/g), 멸가치(21.5 mg/g), 그리고 개시호(25.7 mg/g) 돌단풍이(270.1 mg/g), 기린초(194.1 mg/g), 광대싸리(184.1 mg/g), 까치수영(166.0 mg/g), 송이풀(151.6 mg/g), 짚신나물(114.0 mg/g)의 폴리페놀 함량이 평가되었다. 식물류의 생리활성은 free radical의 소거를 특징으로 하는 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물의 함량에 의존적이므로, 대부분의 식물류는 이들 물질의 함량에 따라 항산화활성이 증가하는 경향을 보인다(Jung 등 2004). 한약재나 약용식물류를 이용한 항산화 활성의 검정 결과, 대부분의 식물류에서 항산화능이 확인되었으며(Nam & Kang 2000; Jung 등 2004), 활성은 시료 중의 총 페놀 및 플라보노이드류에 의존적이거나, 그 양이나 성분이 식물의 종류에 따라 매우 상이한 것으로 보고되어 있다(Kim 등 2004).

2. 환삼덩굴 메탄올 추출물의 항산화 활성평가

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay는 빠르고 간단하게 이용할 수 있는 측정법으로, 식물이나 식품 추출물 또는 단일 화합물의 항산화능을 측정하기 위해 널리 사용되는 방법이다(Shi 등 2009). 환삼덩굴 메탄올 추출물의 DPPH radical 소거능의 결과는 2 mg/ml에서 60%의 소거능을 보였다(Table 2). Kim 등(2006)은 해조류 메탄올 추출물 7종의 DPPH radical 소거능(6 mg/ml) 결과, 팽이 모자반(*Sargassum horneri*)은 83%로 가장 높았고, 참김(*Porphyra tenera*)에서 32%로 가장 낮게 나타났다. Jo 등(2011)은 6년근 인삼뿌리를 부위별로 나눈 주근, 세근 DPPH radical 소거능의 IC₅₀% 값은 각각 13.8, 7.08

Table 2. Radical scavenging activity of methanol extracts from *Humulus japonicus*

Sample	Conc. (mg/ml)	Inhibition rate(%)		IC ₅₀ ³⁾ (mg/ml)	
		DPPH	OH	DPPH	OH
<i>Humulus japonicus</i>	0.1	5.01±2.28 ^{1),a2)}	5.33±0.54 ^a	4.64	5.18
	0.5	19.29±2.61 ^b	16.81±1.38 ^b		
	1	38.87±0.42 ^c	30.30±0.31 ^c		
	2	60.09±1.64 ^d	35.60±0.21 ^c		
L-Ascorbic acid				0.04	0.07

¹⁾ The values represent mean±S.D.

²⁾ Values followed by different letters are significantly different at $p<0.05$.

³⁾ Inhibitory activity was expressed as the mean 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by the interpolation of concentration inhibition curve.

mg/ml로 나타났다.

Hydroxyl radical은 생물체에서 형성되는 극히 민감한 free radical로서 세포에 손상을 주어 질병을 일으키는 것으로 알려져 있으며(Bloknina 등 2003), DNA의 파괴, 돌연변이 및 세포독성 등에 영향을 주고 불포화지방산에서 지질과산화의 진행을 촉진하는 물질 중에 하나로 보고하였다(Hochstein & Atallah 1988). 환삼덩굴 메탄올 추출물의 hydroxyl radical 소거능은 2 mg/ml에서 35%로 높은 활성을 나타내지는 않았다. Kim 등(2006)은 해조류 메탄올 추출물 7종의 hydroxyl radical 소거능(6 mg/ml) 결과, 팽이 모자반(*Sargassum horneri*)은 87%로 가장 높았고, 홍조지누아리(*Grateloupia filicina*)는 35%로 가장 낮은 결과를 보였다.

3. 환삼덩굴 메탄올 추출물의 *in vitro* 항암 활성평가

환삼덩굴 메탄올 추출물의 인체 대장암세포(HCT-116), 폐암세포(A-549), 위암세포(AGS) 및 간암세포(Hep-G2) 증식에 미치는 영향을 살펴본 결과가 Fig. 1과 같다. 특히 간암세포주에서 0.5 mg/ml에서 50% 암 성장억제율이 높게 나타났다. 하지만 다른 암세포에서는 억제효과를 나타내지 않았다. Do (2005) 등은 간암세포의 경우 정향, 지유, 호장근에서 각각 69, 50, 45% 암세포성장억제를 나타내었다. Lee 등(1999)은 국화인 에키네시아 꽃봉우리, 잎줄기 및 뿌리의 메탄올 추출물이 간암, 폐암, 인간유래 백혈암 및 마우스 백혈암 등 4종의 암세포주에 대하여 강한 억제 활성을 나타내었다고 보고하였다. 이상의 결과를 종합해 보면, 환삼덩굴이 특히 간암세포에서 항암활성이 높게 나타나서 항암활성의 물질을 분리하고 특성을 규명하기 위한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것 같다.

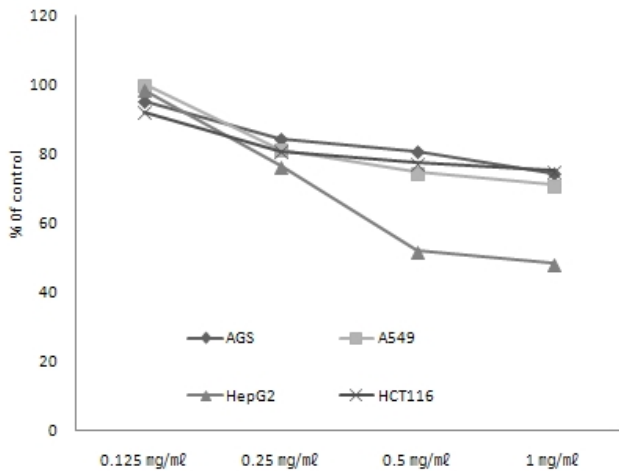


Fig. 1. Comparison of anticancer activities for AGS, A-549, Hep-G2 and HCT-116 cells after treatment with 0.125, 0.25, 0.5 and 1 mg/ml methanol extracts of *Humulus japonicus* for 24 hr using MTT assay.

요약 및 결론

천연식물 자원으로 풍부하게 존재하는 환삼덩굴의 기능성 소재로서의 가능성을 알아보기 위하여 환삼덩굴 메탄올 추출물에 대한 항산화활성 및 *in vitro* 항암활성을 측정하였다. 환삼덩굴 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 30.13 및 13.61 mg/g으로 나타났다. 환삼덩굴 메탄올 추출물에 대한 DPPH radical 및 hydroxyl radical 소거활성을 농도 의존적으로 비례하는 경향을 보였으며, IC₅₀% 측정한 각각 4.64, 5.18의 소거활성을 보였다. 환삼덩굴 메탄올 추출물에 대한 *in vitro* 항암활성을 측정한 결과, 간암세포주의 0.5 mg/ml 농도에서 50% 암세포 성장억제를 보였지만, 다른 암세포에서는 억제효과를 나타내지 않았다.

참고문헌

- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26:1199-1203
- Bloknina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann Bot* 91:179-194
- Choi Y, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee J. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32:723-727
- Dewanto V, Xianzhong W, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 4959-4964
- Do JR, Kim KJ, Jo Jh, Kim YM, Kim BS, Kim HK, Lim SD, Lee SW. 2005. Antimicrobial, anti-hypertensive and anticancer activities of medicinal herbs. *Korean J Food Sci Technol* 37:206-213
- Duh PD, Tu YY, Yen GC. 1999. Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur(*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensm Wiss Technol* 32:269-277
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. 1987. The deoxyribose method: A simple test tube assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 165:215-219
- Hochstein P, Atallah AS. 1988. The nature of oxidant and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mutation Res* 202:363-375
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno KA. 1996. Combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium-salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19: 1518-1520
- Jia Z, Tang M, Wu J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and they scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64:555-559
- Jo JE, Kim KH, Kim MS, Choi JE, Byun MW, Yook HS. 2011. Antioxidant activity from different root parts of 6-year-old *Panax ginseng* C.A. Meyer(Yun-poong). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:493-499
- Jung HK, Kim YJ, Park BK, Park SC, Jeong YS, Hong JH. 2007. Antioxidative and anti-microbial activities of medicinal plant extracts for screening phyto-biotic material. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36:1235-1240
- Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baek NI. 2004. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47:135-140
- Kim BM, Jun JY, Park YB, Jeong IH. 2006. Antioxidative activity of methanol extracts from seaweed. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35:1097-1101
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36:333-338
- Lee HJ, Kim MJ, Park JH, Park EJ. 2012. Antioxidative and antigenotoxic activity of white and yellow *Chrysanthemum morifolium* Ramat extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:289-294

- Lee KJ, Park MH, Park YH, Lim SH, Kim KH, Kim YG, Ahn YS, Kim HY. 2011. Antioxidant activity and nitric oxide production of ethanol extracts from *Astragali membranaceus* Bunge and *A. membranaceus* Bunge var. *mongholicus* Hisiao. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:1793-1796
- Lee SH, Kim A, Lee JH, Kim MH, Lee BS, Jee YT, Bin JH, Ha JM. 2011. Effects of minerals added to medicinal plant extracts on alcohol-induced oxidative stress and alcohol metabolism in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:393-400
- Lee SJ, Chung HY, Lee IK, Yoo ID. 1999. Isolation and identification of flavonoids from ethanol extracts of *Artemisia vulgaris* and their antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 31:815-822
- 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
- Min DR, Park SY, Chin KB. 2010. Evaluation of anti-oxidative antimicrobial activity of garlic stem and red cabbage, and their application to pork patties during refrigerated storage. *Kor J Food Sci Ani Resour* 30:291-297
- Nam SH, Kang MY. 2000. Screening of antioxidative activity of hot-water extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43:141-147
- Osborn-Barnes HT, Akoh CC. 2003. Effect of α -tocopherol, β -carotene, and isoflavones on lipid oxidation of structured lipid-based emulsions. *J Agric Food Chem* 51:6856-6860
- Park SW, Chung SK, Park JC. 2000. Active oxygen scavenging activity of leteolin-7-O- β -D-glucoside isolated from *Humulus japonicus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29:106-110
- Park SW, Kim SH, Chung SK. 1995. Antimutagenic effects and isolation of flavonoids from *Humulus japonicus*. *Kor J Food Sci Technol* 29:897-901
- Park SW, Woo CJ, Chung SK, Chung KT. 1994. Antimicrobial and antioxidative activities of solvent fraction from *Humulus japonicus*. *Kor J Food Sci Technol* 26:464-470
- Park SY, Kim JW. 1992. Screening and isolation of the anti-tumor agents from medicinal plants (I). *Korean J Pharmacogn* 23:264-267
- Reiter RJ. 1995. Oxidative process and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J* 9:526-533
- Shi J, Gong J, Liu J, Wu X, Zhang Y. 2009. Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. *LWT-Food Sci Technol* 42:477-482
- Yen GC, Hsieh CL. 1998. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong(*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in vitro*. *J Agric Food Chem* 46:3431-3436
- Yoon KY, Lee SH, Shin SR. 2005. Antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Sarcodon aspratus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34:942-947

접 수 : 2012년 4월 17일
 최종수정 : 2012년 6월 1일
 채 택 : 2012년 6월 1일