

## Antioxidant and anticancer properties of hot water and ethanol extracts from the roots of *Smilax china* L.

Ye Jin Kim<sup>1</sup>, Dae-Yeul Son<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Deagu 702-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Herbal Food Science, Daegu Haany University, Gyeonsan 712-715, Korea

### 발계(*Smilax china* L.) 열수 및 에탄올 추출물의 항산화 및 항암활성

김예진<sup>1</sup> · 손대열<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>대구한의대학교 한방식품약리학과

#### Abstract

The biological activities of *Smilax china* L. rhizome (SCR), hot water (SCRW) and 70% ethanol extract (SCRE) were analyzed. The total phenolic contents of SCRW and SCRE were 51.7 and 100.5 mg/g, respectively. The measured flavonoid content of SCRW (61.7 µg/g) was almost double that of SCRE (31.7 µg/g). SCRE (IC<sub>50</sub>=42.4 µg/mL) exhibited stronger antioxidant activity in the DPPH system than the positive control α-tocopherol (71.3 µg/mL) or butylated hydroxy anisole (53.8 µg/mL) did. SCRE (IC<sub>50</sub>=50.3 µg/mL) also showed stronger ABTS radical scavenging activity, as did α-tocopherol (67.1 µg/mL). The SOD-like activity and Tyrosinase inhibition activity of SCRW and SCRE showed almost the same pattern. The best SOD-like activity and tyrosinase inhibition activity were measured as 24.9% and 20.3% in SCRW at 1,000 µg/mL, respectively. The cytotoxic effects of the SCR extracts were analyzed via MTT assay on human cancer and normal cells. SCRW and SCRE did not show cytotoxicity up to the concentration of 1,000 µg/mL against the normal human cell line HEK293. Against human breast cancer cells (MCF-7), SCRW inhibited MCF-7 growth (by 27.6%) better than the anticancer drug cyclophosphamide (15.5%) at 1,000 µg/mL. SCRE (1,000 µg/mL) inhibited the growth of human lung cancer cells A549 (37.6%) and human stomach cancer cells AGS (53.6%) more effectively than did SCRW (21.0% and 35.4%) or CPA (22.2% and 31.7%). These results suggest the potential use of SCRE and SCRW as an excellent antioxidant and antiproliferative substance, respectively.

Key words : anticancer, antioxidant, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, polyphenol, *Smilax china* L.

#### 서 론

인간의 생체 내에서 필요한 에너지 공급을 위해 끊임없이 일어나는 생화학적 반응 과정에서 발생하는 superoxide radical, hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical 같은 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 불안정하고 매우 강력한 산화력을 가지고 있기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화적 스트레스를 유발하게 되어 지질과산화물 유도하고 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 암을 비롯한 다양한 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다(1). 특히, 암은 전 세계적으로 가장 널리 퍼져있는 질병으로 발생율도

해마다 증가하는 추세이며, 현재까지 많이 사용되어지고 있는 암 치료방법인 방사선 및 합성화학약품은 강한 독성을 보여 인체에 심각한 부작용을 일으키는 것으로 보고되어, 합성의약품에 비해 독성 및 부작용이 적고 활성산소를 제어 하면서 항암활성이 높은 천연 자원에 대한 관심이 높아지고 있다. 인체 내에서는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등과 같은 항산화 효소가 존재하지만 나이가 들어감에 따라 점차 감소하게 되므로 외부로부터의 항산화제 섭취가 반드시 필요하다. 기존에 사용되고 있는 천연 항산화제로써 tocopherol(vitamin E), ascorbic acid (AsA; vitamin C) 및 polyphenol 등이 있으며, 합성 항산화제는 butylated hydroxyanisole(BHA)과 butylated hydroxytoluene (BHT) 등이 있다. 그러나 이들은 이용 상의 한계 및 합성

\*Corresponding author. E-mail : dyson@dhu.ac.kr  
Phone : 82-53-819-1434, Fax : 82-53-819-1272

항산화제의 독성 등의 문제로 식품에서의 이용이 제한되고 있어 최근에는 인체에 안전하며 항산화 활성이 높은 천연물로부터 항산화제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(2).

청미래덩굴(*Smilax china* L. rhizome; SCR)은 백합과에 속하는 덩굴성 관목으로 중국에서는 나무줄기를 섭취해 왔고, 한국에서는 풍미와 항균작용을 이용하여 망개떡 포장에 사용하였다(3). SCR은 한국에서는 발계, 중국에서는 Ba-Oia라고 불리며 민간요법으로 알콜 중독 및 대장성 궤양 등의 치료에 사용된다. 청미래덩굴에 대한 연구로는 청미래덩굴 추출물의 항염증 및 유방암에 대한 항암작용, tyrosinase 저해활성과 아질산염 소거능에 대한 보고가 있다(4-9). SCR에서 분리된 flavonoid glycoside는 Hela 세포에서 G2/M phase를 정지시켜 세포 사멸을 유도하며(10), SCR 메탄올 추출물과 분리된 flavonoid quercetin이 백혈구 유주에 항염증 효과가 있음이 보고되었다(11). 지금까지 이루어진 청미래덩굴에 대한 연구는 대부분 메탄올 추출물에 집중되어 있다.

본 연구에서는 SCR를 독성이 없는 물과 식품 추출에 많이 사용되는 주정(70% 에탄올)을 용매로 사용하여 획득된 추출물의 항산화 및 인체 유래 유방암 세포(MCF-7), 폐암세포(A549), 위암세포(AGS)에 대한 항암 활성을 측정하여, 발계 추출물의 기능성 식품으로써의 이용 가치를 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료조제

발계(*Smilax china* L. rhizome; SCR)는 2010년 동양허브사에서 구입하였고, 흐르는 물에 깨끗이 세정한 뒤, 자연 건조하여 추출에 사용하였다. 열수 추출물은 시료 무게의 10배 증류수를 가한 뒤에 100°C의 조건에서 3시간 동안 추출하였다. 70% 에탄올 추출물은 시료 무게의 10배 용매를 가하여 실온에서 교반하면서 24시간 동안 추출하였고, 같은 작업을 3번 반복하였다. 얻어진 추출액은 Whatman 1을 이용하여 여과하였고 회전감압농축기(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용해 농축한 후, -20°C 냉동고에서 보관하여 시료로 사용하였다.

### 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

추출물에 대한 시료의 페놀 함량은 Folin-Dennis법(12)에 따라 분광광도계를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 각각의 시료를 dimethylsulfoxide(DMSO)에 일정농도로 녹인 후 0.5 mL씩 test tube에 취하여 증류수 7 mL를 첨가하고 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL를 넣고 1분간 혼합하였다. 여기에 탄산나트륨 포화용액

1 mL를 넣은 후 혼합하여 실온에서 1시간 방치 후 760 nm에서 UV/VIS spectrophotometer(Optizen, Daejeon, Korea)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량을 정량하기 위해 표준물질 tannic acid를 DMSO에 녹여 일정한 농도별로 조제하고 시료와 동일한 방법으로 실험하여 검량선을 작성하고 각 추출물의 총 페놀 함량을 측정하였다.

총 flavonoid 함량은 추출물 0.5 mL에 에탄올(95%) 4.3 mL, 10% 염화알루미늄용액 0.1 mL, 1 M 초산칼륨용액 0.1 mL을 혼합한 후 충분히 교반하고 실온에서 40분간 방치하였다. 그 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 하여 0~120 µg/mL 농도 범위에서 얻어진 표준 검량선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

### 자유 라디칼 소거활성(항산화 활성)

자유 라디칼 소거활성은 α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용하여 측정하였다. 각 농도별 추출물 0.1 mL에 2×10<sup>-4</sup> M DPPH 용액 0.1 mL를 가하고 10초간 혼합한 뒤 상온에서 60분간 방치 후 525 nm에서 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였다. DPPH 자유 라디칼 소거능은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타냈다.

2,2'-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid(ABTS)을 이용한 총 항산화력 측정은 ABTS를 7 mM 농도로 증류수에 용해한 다음 2.4 mM의 potassium persulfate를 가하여 ABTS 자유 라디칼을 생성시켜 실온의 암소에서 12~16시간 동안 방치 후 사용하였다. Radical이 생성된 ABTS 용액을 99% ethanol로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.70±0.02가 되도록 조정하였다. 소거능은 ABTS 용액 100 µL와 시료 100 µL를 혼합하여 6분간 반응 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{free radical scavenging activity (\%)} = \{1 - (A_{\text{test}} - A_{\text{Blank}} / B_{\text{control}})\} \times 100$$

A<sub>test</sub>: 시료 첨가구의 흡광도

A<sub>Blank</sub>: Blank의 흡광도

B<sub>control</sub>: 시료 무첨가구의 흡광도

### Superoxide dismutase(SOD)유사 활성

일정농도의 시료 0.2 mL에 Tris-HCl buffer(50 mM Tris(hydroxymethyl) aminomethane + 10 mM EDTA, pH 8.5) 3 mL, 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시키고 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였으며, SOD 유사활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성능(\%)} = \{1 - (A_{\text{test}} - A_{\text{Blank}} / B_{\text{control}})\} \times 100$$

$A_{\text{test}}$ : 시료 첨가구의 흡광도

$A_{\text{Blank}}$ : Blank의 흡광도

$B_{\text{control}}$ : 시료 무첨가구의 흡광도

### Tyrosinase 저해 활성

시료의 tyrosinase 저해 활성을 측정하기 위해 96 well plate에 시료 추출액 20  $\mu\text{L}$ , 0.1M phosphate buffer(pH 6.5) 120  $\mu\text{L}$ , 1.5 mM L-tyrosine액 40  $\mu\text{L}$ 를 순서대로 넣고 mushroom tyrosinase(2000U/mL)액 40  $\mu\text{L}$ 를 혼합한 후 37°C 배양기에서 10분 동안 반응시켰다. ELISA reader기(Tecan Sunrise, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포주 및 세포 생육 배지

본 실험에서 사용한 암 세포주는 인체유래 폐암 세포주인 A549(lung carcinoma, human), 유방암 세포주인 MCF-7 (breast adenocarcinoma, human), 위암 세포주인 AGS (stomach adenocarcinoma, human)를 사용하였고, 정상 세포주는 인체유래 신장 세포인 HEK293을 사용하였다. 각각의 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)와 100 U/mL penicillin G, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin을 첨가한 RPMI 1640과 DMEM, EMEM medium을 사용하여 5%  $\text{CO}_2$ , 37°C 조건 배양기에서 배양하였다.

### in vitro 에서 정상세포에 대한 독성 및 암세포 성장 억제

추출물의 정상세포 및 암세포에 대한 독성은 Young 등(13)의 방법에 따라 MTT assay로 확인하였다. 각 세포주(HEK293, A549, MCF-7, AGS, in 10% FBS)를 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well 분주하고 24시간 동안 배양(37°C, 5%  $\text{CO}_2$ )한 후, 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지에 각각의 시료를 최종농도 100, 500, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 well당 20  $\mu\text{L}$ 의 MTT solution(1 mg/mL)을 첨가하여 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후 MTT시약이 포함된 배지를 제거하고 DMSO 100  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 상온에서 발색시키고 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{세포생존율 (\%)} = (A_{\text{test}}/B_{\text{control}}) \times 100$$

$A_{\text{test}}$ : 시료 첨가구의 흡광도

$B_{\text{control}}$ : 시료 무첨가구의 흡광도

### 통계처리

모든 데이터는 3회 반복 측정하였으며, means $\pm$ SD로 표시하였다. 또한 추출물에서 얻어진 결과에 대한 통계분석은 SPSS (Ver. 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였으며, 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of

variance (ANOVA)를 시행하여 유의성이 있는 경우, 신뢰구간  $p < 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 추출 수율, 총 플라보노이드 및 폴리페놀 함량 측정

발계의 생리활성을 검증하기 위해 물과 70% 에탄올을 용매로 사용하여 열수 추출물(SCRW)과 70% 에탄올 추출물(SCRE)을 획득한 결과(Table 1), SCRW가 SCRE에 비하여 2배 이상 높은 추출 수율을 보였다.

**Table 1. Yield, total flavonoid and polyphenol contents of *Smilax china* L.**

Sample	Extraction method	Yield (% w/w)	TFC <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ QAE <sup>3)</sup> )	TPC <sup>2)</sup> (mg/g TAE <sup>4)</sup> )
Smilax china L. rhizome (SCR)	Hot water (SCRW)	35.3	61.7	51.7
	70% ethanol (SCRE)	15.2	31.7	100.5

<sup>1)</sup>TFC; Total flavonoid contents.

<sup>2)</sup>TPC; Total polyphenol contents.

<sup>3)</sup>OAE; quercetin.

<sup>4)</sup>TAE; tannic acid.

추출물에 포함된 총 플라보노이드 함량(TFC)은 SCRW에서 61.7  $\mu\text{g}/\text{g}$ 으로 높게 나타난 반면 총 폴리페놀 함량(TPC)은 SCRW(51.7 mg/g)보다 SCRE(100.5 mg/g)에서 높게 측정되었다(Table 1). 발계 열수 및 70% 에탄올 추출물의 TFC 및 TPC 함량을 확인한 결과 추출 용매에 따라 함량이 다르게 나타남을 확인하였다.

발계의 TFC를 측정한 결과는, Lee 등(14)의 연구에서 에탄올보다 열수에서 TFC가 높게 나타난 보고와 유사한 결과를 보였고, TPC의 경우에는 열수 추출물(SCRW)보다 에탄올 추출물(SCRE)에서 2배 이상의 높은 함량이 나타나, 열수 보다 에탄올에서 더 높은 TPC를 보였던 Park 등(15)의 연구 결과와 유사함을 확인 할 수 있었다. 결과적으로, TFC의 경우는 열수추출에서, TPC는 에탄올을 이용한 추출이 용이함을 확인하였다. 특별히 항산화 활성이 우수하다고 알려진 폴리페놀의 경우에는 에탄올, 메탄올, 아세톤과 같은 용매에서 효과적으로 추출됨이 보고되어져 있다(16).

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차대사산물의 하나로 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소 단백질과 같은 거대 분자들과 결합하는 성질이 있기 때문에 항돌연변이, 콜레스테롤 저하작용, 항암 및 항산화작용 등의 다양한 생리활성 기능을 가지며, tocopherols, ascorbic acid, carotenoids, flavonoids, 및 tannins 등이 페놀류에 속하는 대표적인 물질들이다(17). 또한, 플라보노이드는 항산화 작용, 순환기계 질환의 예방, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 지질저하 작용, 면역증강작용, 모세혈관강화 작용

등이 보고된 바 있다(18-20). 오미자 추출물에서 TPC 함량 (515.5 mg/100 g)을 보고한 연구(21)와 비교해 볼 때, SCRW와 SCRE는 10배 이상의 높은 TPC 함량이 확인되어 발계의 각 추출물들의 우수한 항산화 활성이 예측되었다.

#### 자유 라디칼 소거활성(항산화 활성)

항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 free radical 소거 작용은 활성라디칼에 전자를 공여하여 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 이용되고 있다. 천연물이 가지는 자유 라디칼 소거활성을 측정하기 위해 널리 사용되는 대표적 방법은 DPPH와 ABTS system이다(22).

DPPH에 대한 자유 라디칼 소거활성을 IC<sub>50</sub>값으로 확인한 결과, SCRW(72.9 µg/mL)와 SCRE(42.4 µg/mL)는 양성 대조군으로 사용된 ascorbic acid(AsA; 4.2 µg/mL)보다 낮은 활성을 보였지만, SCRE는 또 다른 양성 대조군인 알파 토코페롤(71.3 µg/mL)과 BHA(53.8 µg/mL)보다 높은 활성을 보였다. 알파 토코페롤은 비타민 E로써 비타민C(AsA)와 같이 천연 항산화제이며, BHA는 식품산업에서 식품 보존제로 널리 사용되고 있는 합성 항산화제이다.

Kim 등(23)은 페놀성 화합물이 자유 라디칼(DPPH<sup>+</sup>,

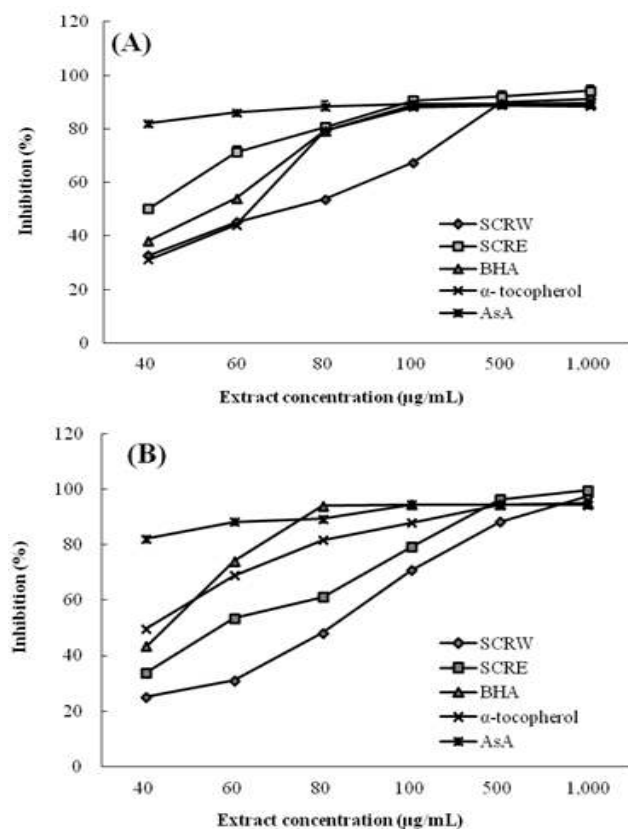


Fig. 1. DPPH and ABTS radical inhibition effects(%) of *Smilax china*

(A) DPPH radical scavenging activity, (B) ABTS radical scavenging activity. Refer to the legend in Table 2.

ABTS<sup>+</sup>)에 대해 뛰어난 소거활성을 가지며, 페놀성 화합물의 함량에 비례하여 높은 항산화 활성을 있음을 보고하였고, 본 연구결과에서도 높은 TPC가 확인되었던 SCRE가 SCRW보다 높은 자유 라디칼 소거활성을 보여 항산화 활성이 뛰어난함을 확인 할 수 있었다. SCRW, SCRE는 농도 의존적으로 자유 라디칼 소거활성이 증가하였고, 특히 1,000 µg/mL 농도에서는 대조군(BHA, 알파 토코페롤, AsA)보다 높은 활성을 보였다(Fig. 1). 발계 추출물에 대한 ABTS 자유 라디칼 소거활성을 측정된 결과를 파프리카(182.8 µg/mL)와 치자나무(150.0 µg/mL) 추출물의 활성과 비교해 볼 때 SCRW와 SCRE는 2배 이상의 높은 ABTS 자유 라디칼 소거활성이 있음을 확인하였다(24,25).

#### Superoxide dismutase(SOD) 유사활성

SOD는 ROS(Reactive oxygen species, 활성 산소종)에 대한 항산화 효소의 일종으로 세포와 조직에 강한 독성을 갖는 superoxide radical anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)을 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 O<sub>2</sub>로 전환시켜 주어 세포를 보호하는 물질로서 퇴행성 뇌질환, 심혈관계 질환 등 각종 질병과 관련이 있는 것으로 보고되어 있다(26). SOD 유사활성 물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 주로 phytochemical에 속하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 향후 항산화 효과가 높은 기능성 소재의 이용이 가능할 것으로 판단된다.

발계 추출물의 SOD 유사활성을 측정된 결과, SCRW가 SCRE보다 높은 활성이 확인되었다(Fig. 2). SCRE는 12~16.4%, SCRW는 15.9~24.9%의 SOD 유사활성이 확인되었고, 100~500 µg/mL 농도에서는 추출 용매 차이(SCRE, SCRW)에 따른 유의적인 차이는 없었다. 반면 1,000 µg/mL 농도에서는 SCRW가 24.9%의 활성을 보여 비교적 높은 SOD 유사활성이 있음을 확인할 수 있었다(p<0.05). 대조군

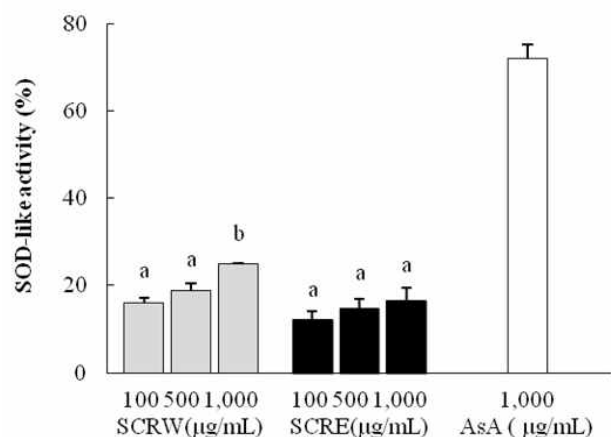


Fig. 2. SOD like activities of *Smilax china* extracts.

Each value was compared with control ascorbic acid (AsA) at p < 0.05 by ANOVA test.

Refer to the legend in Table 2.

으로 사용된 AsA(72~75%)보다 낮은 수준이었으나, Lee 등의 쪽갓 스테롤 배당체 추출물(26%), Kim 등의 백지 추출물(14%), 황기(23%) 추출물의 결과와 비교하면 본 연구결과는 이들 추출물과 유사하거나 더 높은 SOD 유사 활성을 나타내는 것으로 확인할 수 있었다(27-29).

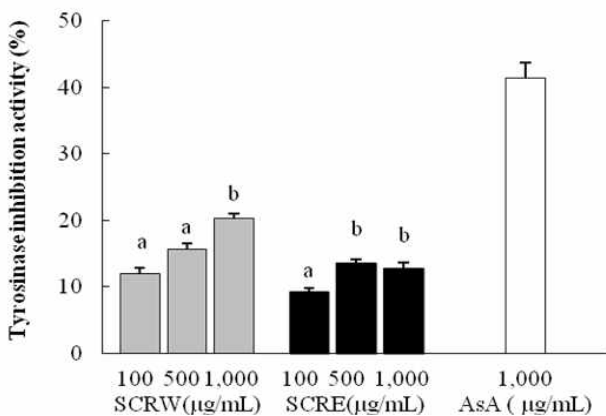
**Table 2. IC<sub>50</sub> value of DPPH and ABTS radical scavenging activities from *Smilax china***

Extract	DPPH radical scavenging activity IC <sub>50</sub> (μg/mL) <sup>1)</sup>	ABTS radical scavenging activity IC <sub>50</sub> (μg/mL)
SCRW	72.9±1.88	81.6±0.21
SCRE	42.4±3.53	50.3±2.40
BHA	53.8±1.18	49.5±0.24
α-Tocopherol	71.3±3.23	67.1±1.30
AsA	4.2±0.14	2.8±0.20

Mean values ± standard deviation from triplicate separated experiments are shown. SCRW: *Smilax china* L. rhizome hot water extract. SCRE: *Smilax china* L. rhizome 70% ethanol extract. Butylated hydroxyanisole (BHA), α-tocopherol and ascorbic acid (AsA) are used as positive control.  
<sup>1)</sup>Values were compared with control at p <0.05 by ANOVA test.  
<sup>2)</sup>IC<sub>50</sub> represents the concentration of a sample required for 50% inhibition of the DPPH radical.

**Tyrosinase 저해 활성**

Tyrosinase 저해활성에서는 SCRW(12.0~20.3%)가 SCRE(9.2~12.8%)보다 높은 저해 활성을 보였고(Fig. 3), Park과 Chang(30)의 결과에서도 열수 추출물이 에탄올 추출물에 비해 높은 tyrosinase 저해 활성이 있음을 보고하여, 본 연구결과와 유사함을 확인할 수 있었다. 만형자의 추출 용매에 따른 tyrosinase 저해활성 측정 결과에서도 열수 > 물 > 에탄올 추출물 순으로 저해 활성이 있음이 보고되었다(31).



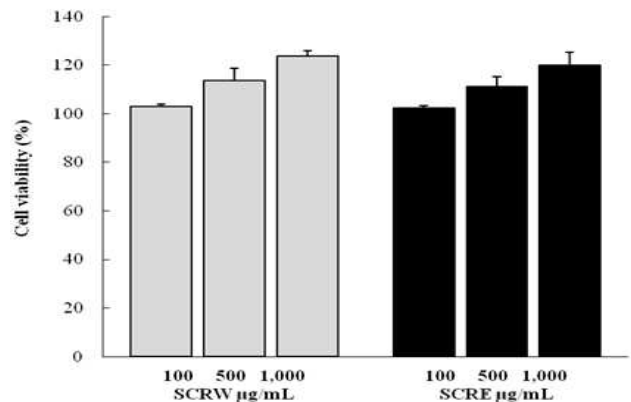
**Fig. 3. Tyrosinase inhibition activity of *Smilax china* L. rhizome extracts.**

Each value was compared with control ascorbic acid (AsA) at p <0.05 by ANOVA test. Refer to the legend in Table 2.

100, 500 μg/mL 농도에서 SCRW는 각각 11.9% 와 15.7%의 저해 활성을 보였고, 1,000 μg/mL 농도에서는 20.3%의 가장 높은 저해 활성을 보였고(p<0.05). SCRE는 농도에 따른 저해 활성의 차이는 없었으며, 500~1,000 μg/mL농도에서 12% 이상의 tyrosinase 저해 활성을 나타냈다. SCRW 과 SCRE는 대조군인 AsA보다는 비교적 낮은 저해 활성을 보였지만, 겨우살이 100% 에탄올 추출물(32)보다 높은 저해 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었으며, 발계의 천연물 기능성 소재로서의 가치를 확인할 수 있었다.

**정상세포 및 인체유래 암세포에 대한 세포독성**

발계 열수 및 에탄올 추출물(SCRW, SCRE)의 정상세포에 대한 독성을 측정하기 위해 인체 신장유래 정상세포 (HEK 293)를 사용하였고, 시료는 항산화 실험과 동일한 농도(100~1,000 μg/mL)로 실험을 진행하였다. 그 결과, SREW와 SCRE는 조사된 모든 농도에서 100% 이상의 높은 세포 생존율이 확인되어 조사된 농도에 정상세포에 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 4).



**Fig. 4. Cytotoxicity of *Smilax china* extracts on human normal cell line HEK 293**

Refer to the legend in Table 2.

전 세계적으로 암으로 인한 사망률이 증가하고 있으며, 유방암, 폐암, 위암은 한국인에게도 가장 흔히 발병하는 암이다. 때문에 본 실험에서는 인체에서 유래된 유방암 세포(MCF-7), 폐암 세포(A549)와 위암 세포(AGS)를 사용하여 SCRW와 SCRE가 각각의 암세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 세포 독성을 측정하였다. 데이터 분석은 세포만 처리한 control 군과 시료 처리군을 백분율로 비교하였다(Fig. 5).

인체 유래 유방암 세포 MCF-7의 생존율에 미치는 영향을 살펴본 결과, SCRW(11.9~27.6%)와 SCRE(0.4~21.2%)는 양성 대조를 위해 사용된 항암약제 cyclophosphamide (CPA; 9.6~15.5%)와 유사하거나 혹은 더 높은 세포 생존 저해 효과를 보였다. 특히 SCRW의 경우 100 μg/mL 농도에서도 CPA 1,000 μg/mL 농도(15.5%)에서 측정된 성장저해

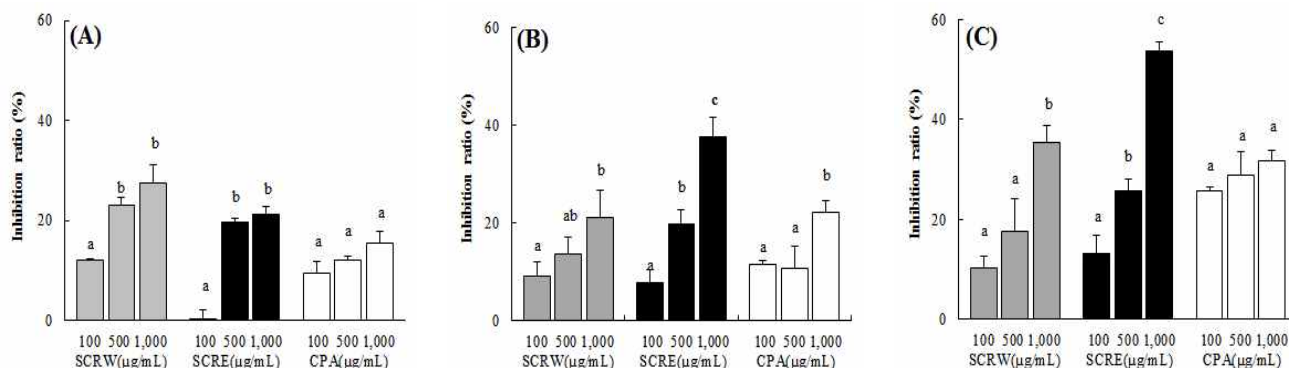


Fig. 5. Inhibition ratio of growth of human cancer cell by addition of *Smilax china* extracts.

(A) human breast cancer cells (MCF-7), (B) human lung cancer cells (A549), (C) human stomach cancer cells (AGS). Anticancer drug cyclophosphamide (CPA) was used as positive control.

Each value was compared with control at  $p < 0.05$  by ANOVA test.

Refer to the legend in Table 2.

효과와 유사한 저해효과가 확인되었다. 500, 1,000 µg/mL 농도에서는 CPA보다 대략 2배 더 높은 MCF-7 성장 저해율을 보여 발계 열수추출물이 유방암 세포에 뛰어난 항암 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 5 A).

인체유래 폐암세포(A549)의 성장저해 효과를 살펴보면, SCRW는 CPA와 유사한 세포성장 저해 효과를 보였고, SCRE는 농도 의존적으로 세포 성장을 억제하였다. SCRE 100 µg/mL 농도에서는 같은 농도의 CPA와 유사한 저해 활성을 보였고, 500 µg/mL (19.8%)와 1,000 µg/mL (38.5%) 농도에서는 CPA(500 µg/mL ; 10.6%, 1,000 µg/mL ; 22.2%)보다 2배 이상의 높은 세포성장 저해 효과를 나타내, 발계 에탄올 추출물이 항암제 CPA보다 우수한 A549 성장 저해 효과가 있음을 확인하였다.

위암세포(AGS)에 대한 성장저해 효과는 폐암세포(A549)에서처럼 에탄올 추출물(SCRE; 13.2~53.6%)이 열수 추출물(SCRW; 10.3~35.4%)보다 더 높은 성장 저해 효과를 나타냈다. 500 µg/mL 농도로 처리한 결과, SCRE와 SCRW는 각각 24.7%, 17.7%로 AGS 성장을 저해하였다. SCRE는 농도 의존적으로 AGS 성장을 억제하였으며 1,000 µg/mL 농도에서는 53.6%로 가장 높은 성장 저해 효과를 나타냈으며, 같은 농도에서 CPA(31.7%)보다 더 높은 성장저해 효과를 확인할 수 있었다. 본 연구 결과를 통해 여지초 추출물(43.4%)과 미더덕 효소가수분해물(31.6~31.9%)에서 확인된 AGS 성장 저해효과보다 발계 에탄올 추출물이 더 효과적으로 위암세포 성장을 억제함을 확인하였다(33,34).

조사된 최고농도(1,000 µg/mL)에서의 각각의 암세포들에 대한 항암 효과를 살펴본 결과, 유방암세포(MCF-7)의 경우, SCRW(27.6%)가 SCRE(21.6%)보다 높은 MCF-7 성장 저해 효과를 보였다. 반면 폐암세포(A549)와 위암세포(AGS)에서는 SCRE가 SCRW보다 높은 세포성장 저해 효과를 나타냈고, 각각의 암세포에 대해 38.5%와 53.6%의 유의적으로 높은 저해 효과를 확인하였다( $p < 0.05$ ).

본 연구 결과를 통해 암세포 종류에 따라 발계 열수 또는 에탄올 추출물의 효과가 다른 것을 확인할 수 있었다. 즉, 유방암 세포(MCF-7)에 대한 성장저해 효과는 발계 열수 추출물이 에탄올 추출물보다 더 효과적이며, 폐암 세포(A549)와 위암 세포(AGS)에 대한 성장저해 효과는 에탄올 추출물이 더 효과적임을 확인하였다. 특히, 발계 추출물은 위암 세포의 성장을 가장 효과적으로 저해하여, 앞으로 기능성 소재로서의 개발 가치가 기대된다.

## 요 약

식품 연구에서 흔히 사용되는 물과 주정(70% 에탄올)을 사용하여 추출된 발계(SCR)의 열수 추출물(SCRW)과 에탄올 추출물(SCRW)의 총 플라보노이드 및 폴리페놀 함량, 항산화 활성, 항암활성을 측정하였다. SCRW와 SCRE는 DPPH(SCRW; 72.9%, SCRE; 42.4%)와 ABTS(SCRW; 81.6%, SCRE; 50.3%) 자유 라디칼을 효과적으로 소거하였으며, 양성 대조군인 BHA(53.8% DPPH, 49.5% ABTS)보다 더 높은 소거활성을 나타냈다. 또한 인체 유래 신장 정상세포(HEK293)에 대해서는 높은 생존율을 나타내 독성이 없음을 확인한 반면, 인체 유래의 암세포(유방암세포; MCF-7, 폐암세포; A549, 위암세포; AGS)에 대해서는 대조군으로 사용된 항암제 CPA와 유사하거나 더 높은 세포성장 억제 효과가 확인되었다. 특히 SCRE는 AGS에 대하여 1,000 µg/mL 농도에서 53.6%로 탁월한 위암 세포 성장저해 효과를 나타냈다. 본 연구 결과를 통해, 발계 추출물의 높은 항산화 및 항암 활성이 확인되어 약리활성에 대한 기초 연구 자료로 제시할 수 있을 것으로 사료되며, 기능성 소재로서의 이용 가치를 높일 수 있을 것으로 판단된다.

### 감사의 글

본 연구는 2012년도 대구한의대학교 기린연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### References

1. Tepe B, Sokmen A (2007) Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum subspecies* from Turkish flora. *Bioresour Technol*, 98, 3076-3079
2. Lee SK, Jiang CK, Jeong KJ, Park DK, Paik HD, Yoon YC (2008) Antioxidant effects of *Cheonggukjang* containing *Plellinus linteus* extract. *Food Sci Biotechnol*, 17, 85-89
3. Jeon JR, Jin T, Kim J, Park JR (2006) Chemical composition of *Smilax china* leaves and quality characteristics of rice cakes prepared with its water extract. *Food Science Biotechnol*, 15, 606-611
4. Shu XS, Gao ZH, Yang XL (2006) Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Smilax china* L. aqueous extract. *J Ethnopharmacol*, 103, 327-332
5. Bo S, Hongzhu G, Yajun C, Min Y, Jian H, Dean G (2007) Steroidal saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities. *Phytochem*, 68, 623 - 630
6. Khan I, Nisar M, Ebad F, Nadeem S, Saeed M, Khan H, Samiullah, Khuda F, Karim N, Ahmad Z (2009) Anti-inflammatory activities of Sieboldogenin from *Smilax china* Linn.: experimental and computational studies. *J Ethnopharmacol*, 121, 175-7
7. Wu LS, Wang XJ, Wang H, Yang HW, Jia AQ, Ding QA (2010) Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in *Smilax china* L. *J Ethnopharmacol*, 130, 460-464
8. Jin TY, Park JR, Kim JH (2004) Electron donating abilities nitrite scavenging effects antimicrobial activities of *Smilax china* leaf. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 33, 621-625
9. Liang C, Lim JH, Kim SH, Kim DS (2012) Dioscin: a synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of *Smilax china*. *Food Chem*, 134, 1146-8
10. Xu W, Liu JW, Li CL, Wu HZ, Liu YW (2008) Kaempferol-7-O-beta -D-glucoside (KG) isolated from *Smilax china* L. rhizome induces G(2)/M phase arrest and apoptosis on HeLa cells in a p53-independent manner. *Cancer Lett*, 264, 229-240
11. Vijayalakshmi A, Ravichandiran V, Malarkodi V, Nirmala S, Jayakumari S (2012) Screening of flavonoid “quercetin” from the rhizome of *Smilax china* Linn. for anti-psoriatic activity. *Asian Pac J Trop Biomed*, 269-275
12. Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem*, 12, 239-249
13. Young, FM, Phungtamdet W, Sanderson BJS (2005) Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicol In Vitro*, 19, 1051-1059
14. Lee SG, Choi SW, Lee EJ, Kim PJ (2011) Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from Korean traditional medicinal prescriptions. *Korean J Food Sci Technol*, 43, 624-632
15. Park YS (2002) Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of medicinal herb extracts. *J East Asian Soc Dietary Life*, 12, 23-31
16. Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Sineiro J, Nunez MJ (2005) Effect of solvent, temperature, and solvent-to solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J Agric Food Chem*, 53, 2111-2117
17. Whang HJ, Han WS, Yoon KR (2001) Quantitative analysis of total phenolic content in apple. *Analyt Sci Technol*, 14, 377-383
18. Tsao R (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246
19. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C (2004) Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? *Free Radic Biol Med*, 36, 838-849
20. Sohn HY, Ryu HY, Jang YJ, Jang HS, Park YM, Kim SY (2008) Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of aerial part of *Saxifraga stolonifera*. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 36, 195-200
21. Kwon HJ, Park CS (2008) Biological activities of extracts from *Omija*. *Korean J Food Preserv*, 15, 587-592
22. Yi O, Jovel EM, Towers NGH, Wahbe TR, Cho D (2007) Antioxidant and antimicrobial activities of native *Rosa* sp. from British Columbia Canada. *Int J Food Sci Nutr*, 58, 178-189
23. Kim NW, Lee YS, Yoon HG (2010) The physiological activities of ripe fruit of *Poncirus trifoliata*. *Korean J Food Preserv*, 17, 698-705
24. Kim SN, Kim JS, Ahn JY, Ha TY, Rhee HC (2011) Comparison of phytochemical and antioxidant activities in different color stages and varieties of paprika harvested in Korea. *Korean J Food Sci Technol*, 43, 564-569

25. Lee HS, Yang HJ, Park MJ (2011) Antioxidative activities and components of *Gardenia jasminoides*. Korean J Food Sci Technol, 43, 51-57
26. Harman D (1956) A theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol 11, 298-307
27. Lee HS, Cho MJ, Park MJ (2007) Nitrite scavenging ability and SOD-Like activity of a sterol glucoside from *Chrysanthemum coronarium* L. var. spatiosum. Korean J Food Sci Technol, 39, 77-82
28. Kim NW, Joo EY (2008) Polyphenol contents and antioxidant activity of extracts from *Angelica dahurica* root after different conditions of microwave-assisted extraction. Korean J Food Preserv, 15, 133-138
29. Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM (2004) Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. Korean J Med Crop Sci, 12, 191-202
30. Park YH, Chang SK (1997) Screening of inhibitory effect of edible mushrooms on tyrosinase and isolation of active component. J Food Hyg Safety, 12, 195-199
31. Lee YS, Chio BD, Joo EY, Shin SR, Kim NW (2009) Antioxidative activities and tyrosinase inhibition ability in various extracts of the *Vitex rotundifolia* seed. Korean J Food Preserv, 16, 101-108
32. Kim HK, Lee HJ, Do JR, Kwon JH (2010) Antioxidant effects of *Viscum album* L. extraction conditions. Korean J Soc Food Sci Nutr, 39, 14-19
33. Park EM, Bae MJ, Ye EJ, Kim SJ, Kim JM, Yee ST (2007) The effects of plebeiae herba (*Salvia plebeian* R. Br) on the anticancer (*in vitro*) and activation of immune cells. J Korean Soc Food Sci Nutr, 36, 377-382
34. Jumeri, Kim SM (2011) Antioxidant and anticancer activities of enzymatic hydrolysates of solitary tunicate (*Styela clava*). Food Sci Biotechnol, 24, 1075-1085

---

(접수 2013년 7월 2일 수정 2013년 8월 14일 채택 2013년 9월 13일)