

Physiological activities of *Lespedeza cuneata* extracts

Hye-Mi Park, Joo-Heon Hong*

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

야관문 추출물의 생리 활성

박혜미 · 홍주헌*

대구가톨릭대학교 식품공학전공

Abstract

This study was conducted to examine the physiological activities of *Lespedeza cuneata* extracts. The extraction yield of 50% ethanol extract (17.60%) was higher than that of hot water extract (12.60%). The total phenolic and total flavonoid contents of the 50% ethanol extract were 242.26 mg/g and 160.73 mg/g, respectively. The DPPH radical scavenging activities of the hot water and 50% ethanol extracts were 92.07% and 96.38%, respectively. The superoxide radical scavenging activities of hot water and 50% ethanol extracts on 250~1,000 µg/mL were 54.89~85.68% and 44.50~94.46%, respectively. The tyrosinase inhibition activity of the 50% ethanol extract at 1,000 µg/mL (63.31%) was the highest. The nitrite scavenging activity of the 50% ethanol extract was higher than that of the hot water extract. The nitric oxide production of 50% ethanol extract (7.15~20.61 µM) improved with an increase in the treatment concentration. The hot water and 50% ethanol extracts at 1,000 µg/mL inhibited the proliferation of the cancer cell lines A549, HeLa, Hep3B, and Sarcoma180. These results suggest that the 50% ethanol *Lespedeza cuneata* extracts may be useful as a functional food material in the food industry.

Key words : *Lespedeza cuneata*, antioxidant activities, nitric oxide production, anticancer

서 론

최근 생활환경과 식생활의 변화 등으로 영양과잉이나 불균형에서 오는 비만, 당뇨병, 고혈압, 동맥경화 등과 같은 성인병이 증가되고 생활수준이 향상됨에 따라 건강에 대한 관심이 커지면서 식생활의 중요성이 강조되고 있다(1). 성인병의 주된 원인인 활성산소와 free radical은 외부로부터 지속적인 자극과 에너지 생성을 위한 산화과정에서 상당량 발생하게 된다(2). 인체에서는 이에 대한 방어기전으로 산화억제물질을 생성하여 산화물의 대부분을 소멸시키지만, 환경오염, 스트레스, 불규칙적인 식습관, 약물, 유전적 요인 등에 의해 항산화 방어계와 균형이 깨어지면서 산화물질이 세포막 파괴, DNA 변성, 세포 노화 등을 초래하게 된다(3). 이러한 체내 산화적 스트레스는 혈관이나 조직의 손상으로

염증을 유도함으로써 생활습관병, 동맥경화, 암 등 다양한 질병의 원인이 되기도 한다(4). 생체는 이러한 체내 및 체외의 자극에 대해서 자신을 보호하고, 방어하기 위하여 면역세포의 증식이나 활성화에 의해 항원이나 활성 산소종으로부터 숙주를 보호하는 방어체계를 가지고 있다. 하지만 산화적 스트레스의 강도가 클 경우 생체의 이러한 방어 기작만으로는 충분한 역할을 기대하기 어려우므로 생체 내 산화작용을 효율적으로 예방하기 위해서는 지속적인 항산화물질의 섭취가 필요하다(5,6).

항산화 활성을 지닌 소재들은 염증성 질환에도 효과를 보이는데(7), 면역세포의 nitric oxide synthase에서 생성되며, 외부의 자극에 의해 유전자 수준에서 발현되는 nitric oxide의 경우 세포 활성화 물질 및 reactive oxygen intermediates에 의해 유발된 세포독성을 최소화시킴으로써 항산화와 더불어 면역 활성 발현에도 관여함이 알려져 있다(8). 항산화 활성이 우수한 물질은 생체 내에서 과도한 외부 자극으로부터의 안정화에 기여함으로써 체내 과산화 작용에 의한 염증의 유발 및 이에 따른 면역체계의 활성화 조절

*Corresponding author. E-mail : jhhong@cu.ac.kr
Phone : 82-53-850-3218, Fax : 82-53-850-3218
Copyright © Korean Journal of Food Preservation. All rights reserved.

에도 관여할 것으로 추정된다. 이렇게 노화와 성인병 질환의 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 학설이 인정됨에 따라 이를 조절할 수 있는 물질로 알려진 항산화제의 개발 연구도 활발히 진행되고 있다(9). 활성산소를 제거하기 위하여 동양의학과 민간에서는 치료 및 예방의 목적으로 사용되고 있는 각종 생약이나 약용식물을 대상으로 천연항산화제에 대한 연구가 이루어지고 있으며(10-12), 최근에는 식용 가능한 작물을 대상으로 항산화 활성이 높고, 인체에 무해한 성분을 찾으려는 시도가 활발히 진행되고 있다(13).

야관문(*Lespedeza cuneata*)은 콩과의 여러 해살이 식물로 비수리, 삼엽초 등의 여러 가지 이름으로 불리며, 우리나라와 일본, 중국, 대만 등지에 분포하고 있다. 황폐지의 지피물 조성과 지력증진 식물로 널리 이용되는 혼한 식물이지만 예로부터 민간에서는 음위증이나 유정, 기침, 천식 등의 치료에 효능이 있는 약제로 사용되어 왔으며, 야관문의 생리활성 물질로는 pinitol, flavonoid, phenol 성분, tannin 및 β -sitosterol을 함유하며, flavonoid 중에서도 quercetin, kaempferol, vitexin, orientin 등이 보고되고 있다(14). 현재 야관문 분획 및 추출물을 이용한 항균, 항노화 및 항산화 기능성 소재로서의 가능성에 대한 연구가 이루어져 있으며(15,16), 피부미백 소재로의 가능성(17), 자외선 노출에 의한 피부 광노화 개선 효과(18,19) 및 창상치유 효과(20,21)에 대한 연구가 보고되고 있다. 또한 야관문 추출물의 동물실험을 통한 혈당 강하 효과와 포도당 독성에 대한 세포보호 효과에 대해서도 보고된 바 있다(22). 이와 같이 야관문은 다양한 생리활성 물질을 함유하여 항균, 항산화 및 피부미백효과에 대해 일부 연구가 이루어졌으나 체계적인 생리활성검증에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있는 야관문 추출물의 기능성식품 소재로의 활용가능성을 확인하고자 항산화 활성, tyrosinase 저해활성, nitric oxide 생성량 및 암세포 생육 저해활성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 야관문(*Lespedeza cuneata*)은 국내산으로 경상북도 경산시 소재의 (주)소리소로부터 제공받아 이용하였다. 야관문은 50°C에서 24시간 열풍 건조하여 분쇄기(FM-909W, Hanil Co., Sejong, Korea)로 분쇄하여 -20°C 이하의 암소에 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다.

추출물의 제조

10 g의 야관문 분말에 증류수 및 50% 에탄올을 고형분 대비 20배 첨가하여 증류수 첨가구는 100°C에서, 50% 에탄올 첨가구는 80°C에서 4시간 동안 환류냉각추출기(CA-1112,

Eyela Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 추출하였다. 추출물은 불순물을 제거하기 위하여 여과지(No.1, Whatman international Ltd., Leicestershire, England)를 이용하여 여과시켰다. 여과된 용액은 감압농축기(N-1N, Eyela Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 감압농축한 다음, 동결건조(FreeZone 2.5, Labconco Co., Kansas, MO, USA)하여 -70°C 이하의 암소에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

추출수율, 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량

추출수율은 각각의 추출물을 동결건조 시켜서 건물 중량을 구한 다음 추출물 조제에 사용한 원료 건물량에 대한 백분율로 나타내었다. 총 페놀 함량 측정은 Folin-Denis법(23)에 따라 시료 1 mL에 1 N Folin Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 1 mL를 첨가하고 충분히 혼합하여 반응 시킨 후 20% Na_2CO_3 1 mL를 첨가하고 실온의 암소에서 30분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co., Uppsala, Sweden)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 tannic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

총 플라보노이드 함량 측정은 Jia 등(24)의 방법에 따라 시료 1 mL에 5% NaNO_2 150 μL 를 혼합하여 실온에서 6분간 반응 시킨 다음 10% AlCl_3 300 μL 와 혼합하여 다시 실온에서 5분간 반응 시킨 후 1 N NaOH 1 mL와 혼합한 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 rutin(Sigma-Aldrich Co.)을 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical 소거활성 측정(25)은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich Co.)의 환원력을 이용하여 측정하였다. 즉, 시료 0.5 mL에 4×10^{-4} M DPPH용액(99.9% ethyl alcohol에 용해) 5 mL를 혼합하여 실온에서 15분간 반응 시킨 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

DPPH radical scavenging activity(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

Superoxide radical 소거활성 측정

Superoxide radical 소거활성 측정은 Nishikimi 등(26)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료 500 μL 에 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.5) 100 μL , 100 μM phenazine

methosulfate(PMS, Sigma-Aldrich Co.) 200 μ L를 혼합하여 반응시킨 후 500 μ M nitro blue tetrazolium(NBT, Sigma-Aldrich Co.) 200 μ L 및 500 μ M β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH, Sigma-Aldrich Co.) 400 μ L를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide radical 소거활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{Superoxide radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성은 Kameyama 등(27)의 방법을 응용하여 96 well plate에 시료 100 μ L, 0.175 M phosphate buffer(pH 6.8) 40 μ L, 5 mM 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA, Sigma-Aldrich Co.) 40 μ L를 순서대로 넣고 mushroom tyrosinase(2,000 U/mL, Sigma-Aldrich Co.) 20 μ L를 첨가하여 37°C 배양기에서 10분간 반응시킨 다음 생성된 DOPA chrome을 microplate reader(UVM-340, ASYS Co., Eugendorf, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{Tyrosinase inhibition activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

아질산염 소거활성 측정

아질산염 소거활성은 Gray와 Dugan(28)의 방법을 이용하여 1 mM 아질산나트륨 용액 1 mL에 시료 2 mL를 가하고 여기에 0.1 N HCl(pH 1.2) 및 citric acid 완충 용액(pH 3.0, 4.2, 6.0)을 7 mL 가하여 반응 용액의 pH를 각각 1.2, 3.0, 4.2 및 6.0으로 달리하여 반응 용액의 부피를 10 mL로 하였다. 이를 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 반응액을 1 mL씩 취하고 여기에 2% acetic acid 5 mL, griess reagent(Sigma-Aldrich Co.) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합시켜 15분간 실온에서 반응시킨 다음 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 아질산염 소거활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{Nitrite scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

세포주 배양

마우스 대식 세포주(RAW264.7), 인간 폐암 세포주(A549), 인간 자궁경부암 세포주(HeLa), 인간 간암 세포주(Hep3B) 및 마우스 복수암 세포주(Sarcoma180)는 한국 세포주 은행에서 분양받아 실험에 사용하였다. RAW264.7, Hep3B 세포주는 DMEM배지를 이용하였으며, A549, HeLa, Sarcoma180 세포주는 RPMI 1640배지를 이용하여 10% fetal bovine serum, 2% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator(MCO-18AIC, SANYO Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan)에서 배양하였다.

Nitric oxide 생성량 측정

배양된 세포주를 2.0×10⁴ cell/well로 96 well plate에 각각 100 μ L씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하고 증류수로 녹인 추출물, 대조군인 증류수와 양성 대조군인 lipopolysaccharide(LPS, 100 ng/mL, Sigma-Aldrich Co.)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액 50 μ L에 동량의 griess reagent(Sigma-Aldrich Co.)를 혼합하여 10분간 암반응시킨 후 microplate reader(UVM-340, ASYS Co.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitric oxide의 함량은 sodium nitrite (Sigma-Aldrich Co.)을 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

암세포 생육 저해활성 측정

배양된 세포주를 2×10⁴ cell/well로 96 well plate에 첨가하여 24시간 배양하고 증류수에 녹인 추출물 시료와 대조군인 증류수를 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 PBS 완충용액에 녹인 MTT 용액(5 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.)을 각 well에 10 μ L씩 첨가하고 다시 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양종료 후 생성된 formazan결정이 흐트러지지 않게 배양액을 완전히 제거한 후 각각의 well에 100 μ L씩 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하고 실온에서 10분간 반응시켜 formazan결정을 완전히 용해한 다음 microplate reader (UVM-340, ASYS Co.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하여 상대적인 세포생존율로 나타내었다.

통계처리

실험결과는 3회 반복실험의 평균±표준편차로 나타내었고 SPSS(19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였으며, 각 측정 평균값의 유의성(p<0.05)은 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

추출수율, 총 페놀, 총 플라보노이드 함량 및 DPPH radical 소거활성

야관문 추출물의 추출수율, 총 페놀, 총 플라보노이드 함량 및 DPPH radical 소거활성은 Table 1과 같다. 추출수율은 50% 에탄올 추출물에서 17.60%로 열수추출물 12.60%보다 높은 수율을 나타내었다. 총 페놀 함량은 50% 에탄올 추출물에서 242.26 mg/g 및 열수추출물에서 228.08 mg/g으로 나타나 50% 에탄올 추출물에서 상대적으로 높은 함량을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 열수 추출 및 50% 에탄올 추출물에서 각각 121.14 mg/g 및 160.73 mg/g으로 총 페놀 함량과 유사한 경향을 나타내었다. Cho 등(17)은 80% 메탄올로 추출한 야관문의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 조사한 결과 199.4 mg/g 및 60.4 mg/g로 보고하였으며, Jung 등(18)은 야관문 60% 에탄올 추출물의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량이 각각 134.98 mg/g 및 16.20 mg/g으로 보고하여 본 연구 결과와 비교해 낮은 함량을 보였으나 이는 추출 용매조건이 상이한 영향으로 여겨진다.

DPPH radical 소거활성은 시료처리농도 1,000 µg/mL에서 열수추출물은 92.07% 및 50% 에탄올 추출물은 96.38%로 나타나 50% 에탄올 추출조건인 항산화 활성이 더 높았다. 이러한 결과는 Kim과 Hong(29)의 반응표면분석법을 이용한 야관문 추출조건에서 추출온도보다는 에탄올 농도에 크게 영향을 받고 있다는 보고와 같은 경향을 나타내었으며, 최대값을 나타내는 에탄올 농도가 40~60%로 나타나 본 연구의 50% 에탄올과 유사한 경향이였다.

Superoxide radical 소거활성 및 Tyrosinase 저해활성

야관문 추출물의 superoxide radical 소거활성 및 tyrosinase 저해활성은 Fig. 1과 같다. Superoxide radical 소거활성을 분석한 결과 250 µg/mL에서 1,000 µg/mL으로 농도가 증가함에 따라 열수추출물의 경우 54.89~85.68%로 나타났으며 50% 에탄올 추출물은 44.50~94.46%를 나타내었다. 모든 구간에서 시료 처리 농도가 증가함에 따라 superoxide radical 소거활성이 증가하였다. 특히 50% 에탄올 추출물 1,000 µg/mL의 농도에서 소거활성이 94.46%로 나타나 양성대조군으로 사용한 catechin(97.40%)과 유사한 활성을 나타내어 야관문의 superoxide radical 소거활성이 우수함을 확인하였다. Jung(18)은 60% 에탄올로 추출한 야관문의

superoxide radical 소거활성을 조사한 결과 50~1,000 µg/mL의 농도에서 30.87~87.49%의 활성을 나타내어 농도 의존적으로 증가한다고 보고하여 본 연구와 유사한 활성을 나타내었다. 본 실험에서 사용되어진 야관문은 superoxide radical 소거활성이 우수하여 항산화 소재로서 활용이 가능할 것으로 판단된다.

Tyrosinase 저해활성을 분석한 결과 250~1,000 µg/mL 농도에서 열수추출물이 38.85~46.25%로 낮은 활성을 나타내었으며, 50% 에탄올 추출물에서 39.96~63.31%로 상대적으로

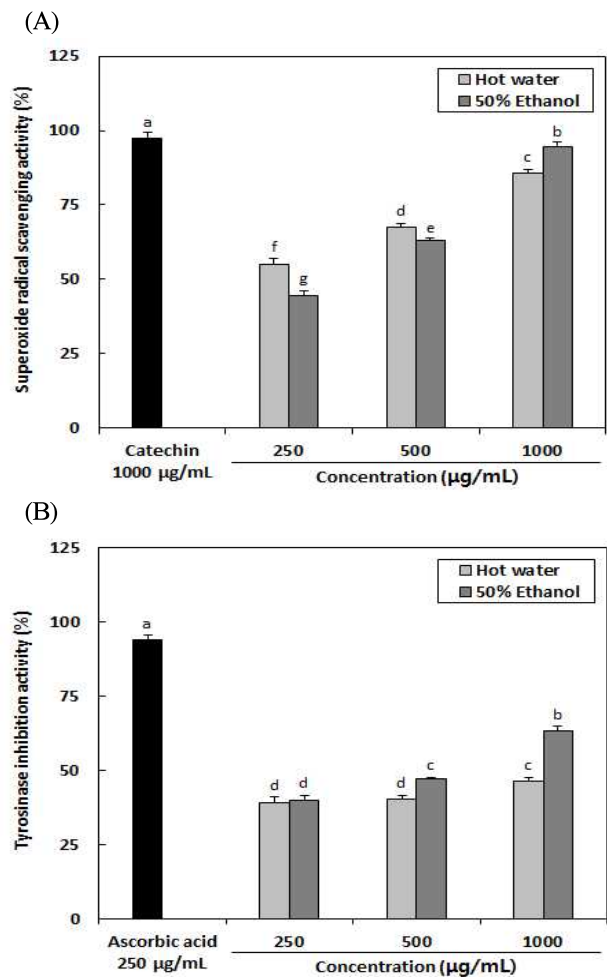


Fig. 1. Superoxide radical scavenging activity (A) and tyrosinase inhibition activity (B) of *Lespedeza cuneata* extracts.

Means±SD (n=3) with different letters above a bar are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

Table 1. Extraction yield, total phenolic, total flavonoid contents and DPPH radical scavenging activity of *Lespedeza cuneata* extracts

Extraction solvent	Yield (%)	Total phenolic (tannic acid mg/g)	Total flavonoid (rutin mg/g)	DPPH radical scavenging activity (%)
Hot water	12.6±0.11	228.08±5.48	121.14±2.66	92.07±0.24
50% Ethanol	17.6±0.19	242.26±2.01	160.73±5.59	96.38±0.10

All values are means±SD (n=3).

로 높은 활성을 나타내었다. 열수추출물 및 50% 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 tyrosinase 저해활성이 증가됨을 확인하였다. Lee 등(15)은 야관문 50% 에탄올 추출물 중 ethyl acetate 분획 및 aglycone 분획의 tyrosinase 저해활성을 조사한 결과 IC₅₀이 104.83 µg/mL 및 27.55 µg/mL로 비교 물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의 저해활성에 비해서 높은 활성을 나타내었다고 보고하였다.

아질산염 소거활성

아질산염은 식품이나 의약품 및 잔류 농약 등에 존재하는 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성한다. 이러한 amine류를 함유하고 있는 식품을 섭취하였을 때, 니트로화 반응으로 발암물질인 nitrosamine이 생성될 가능성이 매우 높고 특히 산성조건에서 쉽게 발생하는 것으로 알려져 있다(30,31). 야관문 추출물의 아질산염 소거활성은 1,000 µg/mL 농도에서 측정하였으며, 결과는 Table 2와 같다. 50% 에탄올 추출시 아질산염 소거활성이 열수추출물에 비해 높게 나타났으며, pH에 따라 산성에 가까울수록 아질산염 소거활성이 높게 나타났다. 특히 pH 1.2 조건에서 열수추출물 및 50% 에탄올 추출물 각각 95.59% 및 98.67%로 유의적으로 높게 나타났으며, pH 3.0, pH 4.2 및 pH 6.0순이었다. 이는 페놀성 물질이 아질산염의 니트로화 반응을 억제한다는 Cooney 등(32)의 연구 결과와 일치하였다. 야관문은 낮은 산성조건인 pH 1.2에서 아질산염 소거활성이 높아 식품의 발암물질 생성억제에 효과가 있는 것으로 판단된다.

Table 2. Nitrite scavenging activity of *Lespedeza cuneata* extracts

Extraction solvent	Nitrite scavenging activity (%)			
	pH 1.2	pH 3.0	pH 4.2	pH 6.0
Hot water	95.59±2.31 ^{a1)}	59.89±2.05 ^b	4.82±1.21 ^c	3.83±0.64 ^c
50% Ethanol	98.67±1.98 ^a	60.70±1.90 ^b	10.20±0.43 ^c	8.94±2.13 ^c

¹⁾Means±SD (n=3) within each row (a-c) followed by the same letter are not significantly different (p<0.05).

Nitric oxide 생성량

대식세포에서 생성되는 nitric oxide는 면역계에서 종양세포나 세포내 감염된 미생물에 대한 방어작용을 하는 중요한 신호전달 물질로, nitric oxide synthetase의 작용에 의해 L-arginine이 L-citruline으로 변화되는 과정에서 생성되어 비특이적 숙주방어기작 대식작용, 세균 및 암세포의 증식억제 활성이 증명된 바 있다(33). 야관문 추출물의 nitric oxide 생성량은 Fig. 2와 같다. Nitric oxide 생성량을 측정한 결과 250 µg/mL에서 1,000 µg/mL로 농도가 증가함에 따라 열수추출물의 경우 1.43~16.21 µM로 낮은 함량을 나타내었으며, 50% 에탄올 추출물에서 7.15~20.61 µM로 유의적으로 높은 함량을 나타내었다. 모든 구간에서 시료 처리 농도가 증가함에 따라 nitric oxide 생성량이 증가하였으며 열수 추출물보다

50% 에탄올 추출물에서 높은 함량을 나타내었다. 특히 50% 에탄올 1,000 µg/mL 농도에서는 nitric oxide 생성량이 20.61 µM로 nitric oxide 생성을 유도하는 물질인 lipopolysaccharide (LPS)를 1 µg/mL 처리하였을 때 생성된 함량(19.97 µM)보다 유의적으로 높은 함량을 나타내었다. 이는 Eun(34)의 보고서 야관문 50% 에탄올 추출물을 대식세포에 처리한 결과 LPS와 γ-IFN을 처리하였을 때 nitric oxide 생성량이 현저히 증가하였으며, 추출물의 농도가 증가함에 따라 증가하였다는 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 야관문 추출물은 대식세포를 스스로 활성화시킴으로써 nitric oxide 생성을 증가시켜 외부 항원으로부터 자극받지 않아도 체내에서 면역반응이 일어나는 초기에 생체 방어에 유리한 작용을 해서 면역 기능을 높일 것으로 생각된다.

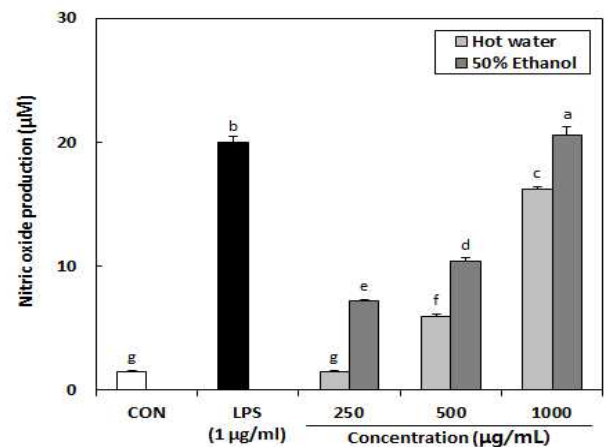


Fig. 2. Nitric oxide production in RAW264.7 cell of *Lespedeza cuneata* extracts.

Means±SD (n=3) with different letters above a bar are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

암세포생육 저해활성

야관문 추출물의 암세포생육 저해활성은 Fig. 3과 같다. 열수 및 50% 에탄올 추출물은 각각 1,000 µg/mL 농도로 하여 인간 폐암 세포주(A549), 인간 자궁경부암 세포주(HeLa), 인간 간암 세포주(Hep3B) 및 마우스 복수암 세포주(sarcoma180)에 MTT assay로 암세포생육 저해활성을 측정하였다. 야관문 열수 추출물 및 50% 에탄올 추출물 모두 암세포생육 저해활성이 나타났으며, 열수추출물의 경우 A549, HeLa, Hep3B 및 sarcoma180에서 각각 58.57%, 72.40%, 51.77% 및 54.29%로 높은 생육 저해활성을 나타내었다. 50% 에탄올 추출물의 경우 A549, HeLa, Hep3B 및 sarcoma180에서 각각 52.52%, 74.82%, 60.65% 및 57.78%로 나타났으며 열수추출물과 비교하여 HeLa, Hep3B 및 sarcoma180에서 더 높은 생육 저해활성을 나타내었다. 특히 모든 추출물이 HeLa에서 높은 저해활성을 나타내어 야관문 추출물의 인간 자궁경부암 세포주에 대한 항암활성 효과가 매우 높게 나타남을 확인하였다. 따라서 야관문 추

출물은 nitric oxide 생성량이 증가하면서 암세포 생육 저해 활성을 나타내어 Choi 등(35)의 노루궁뎅이버섯 자실체 추출물이 sarcoma180에 대해 항암효과와 mouse의 면역활성을 증강시켰다는 연구결과와 유사하였으며, 암세포에 직접적으로 작용하여 암세포를 사멸시키기 보다는 면역을 활성화하여 암세포의 증식을 억제하여 항암효과를 나타내는 것으로 판단된다.

따라서 야관문 추출물은 항산화성 생리활성물질 함유를 통해 tyrosinase 저해활성을 나타낼 뿐만 아니라 아질산염 소거활성이 높고, 대식세포를 활성화시킴으로써 암세포생육 저해활성에 효과가 있는 것으로 판단되어 기능성식품 소재로의 이용가능성을 확인하였다.

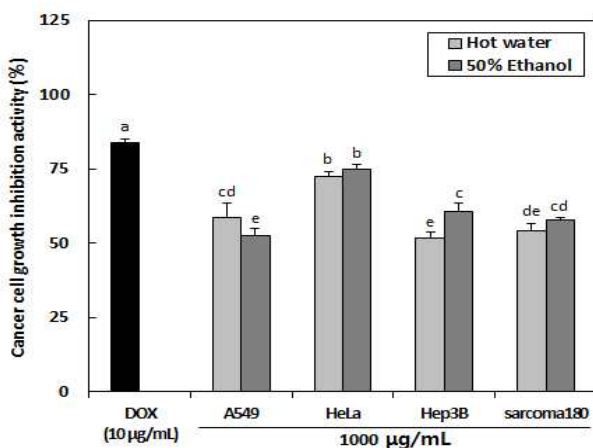


Fig. 3. Cancer cell growth inhibition activities in A549, HeLa, Hep3B, sarcoma180 cell of *Lespedeza cuneata* extracts.

Means±SD (n=3) with different letters above a bar are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

요 약

본 연구에서는 유용성분을 함유하고 있는 야관문을 기능성 소재로 활용하고자 열수 및 50% 에탄올을 사용하여 추출물을 제조한 후 야관문 추출물의 생리 활성을 조사하였다. 추출수율은 50% 에탄올 추출물에서 17.60%로 열수추출물 12.60%보다 높은 수율을 나타내었다. 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 50% 에탄올 추출물에서 각각 242.26 mg/g 및 160.73 mg/g으로 높은 함량을 나타내었다. DPPH radical 소거활성은 열수추출물에서 92.07% 및 50% 에탄올 추출물에서 96.38%로 나타나 50% 에탄올 추출조건이 높았다. Superoxide radical 소거활성 및 tyrosinase 저해활성은 50% 에탄올 추출물 1,000 µg/mL에서 각각 94.46% 및 63.31%로 높은 활성을 나타내었다. 아질산염 소거활성은 50% 에탄올 추출시 높게 나타났으며, pH에 따라 산성에 가까울수록 아질산염 소거활성이 높게 나타났다. Nitric oxide 생성량은 50% 에탄올 추출 250~1,000 µg/mL에서

7.15~20.61 µM로 유의적으로 높은 활성을 나타내었으며 시료 농도에 따라 농도 의존적으로 증가하였다. 인간 폐암 세포주(A549), 인간 자궁경부암 세포주(HeLa), 인간 간암 세포주(Hep3B) 및 마우스 복수암 세포주(sarcoma180)에 대한 암세포 생육 저해활성을 측정된 결과, 열수 추출물 및 50% 에탄올 추출물 모두 암세포생육 저해활성을 보여주었으며, 특히 HeLa에서 상대적으로 높은 항암활성을 나타내었다. 따라서, 야관문 50% 에탄올 추출물은 향후 기능성 식품 소재 개발에 있어 산업적으로 활용 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2013학년도 대구가톨릭대학교 연구비 지원에 의하여 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

References

- Ha TY (2006) Development of functional food materials for healthy life. Korean J Crop Sci, 51, 26-39
- Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B (1991) Oxygen free radicals and human disease. J R Soc Promo Health, 111, 172-177
- Reiter RJ (1995) Oxidative process and antioxidative defense mechanism in the aging brain. FASEB J, 9, 526-533
- Kim JM, Shin YK, Kim BO, Kim JK, Lee SH, Kim YS (2012) Effect of *Artemisia capillaris* extracts on antioxidant activity and allergic dermatitis. J Life Sci, 22, 958-963
- Kang WS, Park EJ, Yoon KR (1998) Antioxidant property of turmeric (*Curcuma rhizoma*) ethanol extract. Korean J Food Sci Technol, 30, 266-271
- Rim YS, Park YM, Park MS, Kim KY, Kim MJ, Choi YH (2000) Screening of antioxidants and antimicrobial activity in native plants. Korean J Medicinal Crop Sci, 8, 342-350
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. P Natl Acad Sci USA, 90, 7915-7922
- Cho EK, Song HJ, Cho HE, Choi IS, Choi YJ (2010) Development of functional beverage (SanYa) from fermented medical plants and evaluation of its physiological activities. J Life Sci, 20, 82-89
- Lee HB, Kim HJ, Chong MS, Cho HE, Choi YH, Lim KS, Lee KN (2008) Physiological activity of extracts

- from mixed culture of medical herbs and mycelia of *Tricholoma matsutake* and *Cordyceps militaris* by fermentation. Korean J Herbiol, 23, 1 - 8
10. Lodovici M, Guglielmi F, Meoni M, Dolara P (2001) Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. Food Chem Toxicol, 39, 1205-1210
 11. Kim SH, Choi HJ, Oh HT, Chung MJ, Cui CB, Ham SS (2008) Cytoprotective effect by antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethylacetate fraction in human HepG2 cells. Korean J Food Sci Technol, 40, 696-701
 12. Park SY, Kim JW (1992) Screening and isolation of the antitumor agents from medicinal plants (I). Korean J Pharmacogn, 23, 264-267
 13. Stella SP, Ferrarezi AC, dos Santos KO, Monteiro M (2011) Antioxidant activity of commercial ready-to-drink orange juice and nectar. J Food Sci, 76, 392-397
 14. Numata A, Hokimoto K, Yamaguchi H (1980) C-Glycosylflavones in *Lespedeza cuneata*. Chem Pharm Bull, 28, 964-965
 15. Lee HJ, Lim GN, Park MA, Park SN (2011) Antibacterial and antioxidative activity of *Lespedeza cuneata* G. don extracts. Korean J Microbiol Biotechnol, 39, 63-69
 16. Kim SJ, Kim DW (2007) Antioxidative activity of hot water and ethanol extracts of *Lespedeza cuneata* seeds. Korean J Food Preserv, 14, 332-335
 17. Cho EJ, Ju HM, Jeong CH, Eom SH, Heo HJ, Kim DO (2011) Effect of phenolic extract of dry leaves of *Lespedeza cuneata* G. don on antioxidant capacity and tyrosinase inhibition. Korean J Hort Sci Technol, 29, 358-365
 18. Jung HK, Choi MO, Kim BJ, Jo SK, Jeong YS (2014) Improving the efficacy of *Lespedeza cuneata* ethanol extract on ultraviolet-induced photoaging. Korean J Food Preserv, 21, 264-275
 19. Kim HJ, Kim KS, Kim DI (2012) Inhibitory effects of *Lespedeza cuneata* ethanol extract on ultraviolet- induced photo aging. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 1540-1545
 20. Jung HK, Kim KS, Jung YS (2014) Wound healing effects of *Lespedeza cuneata* extract. J Korean Soc Food Sci Nutr, 43, 374-380
 21. Kim DI, Kim HJ (2014) Regeneration effects of *Lespedeza cuneata* ethanol extract on experimental open wound in rat. J Korean Soc Food Sci Nutr, 43, 516-521
 22. Choi JS, Cho CS, Kim CJ (2010) Cytoprotective effect of *Lespedeza cuneata* extract on glucose toxicity. J Korean Oriental Med, 31, 79-100
 23. Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Viticult, 16, 144-158
 24. Jia Z, Tang M, Wu J (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effect on superoxide radicals. Food Chem, 64, 555-559
 25. Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200
 26. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochem Biophys Res Commun, 46, 849-854
 27. Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishiyama S, Urabe K, Hearing VJ (1993) Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPachrome tautomerase (TRP2), and a melanogenic inhibitor. J Invest Dermatol, 100, 126-131
 28. Gray JJ, Dugan LR (1975) Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. J Food Sci, 40, 981-984
 29. Kim DI, Hong JH (2012) Optimization of ethanol extraction conditions for functional components from *Lespedeza cuneata* using response surface methodology. Korean J Food Cookery Sci, 28, 275-283
 30. Park WM, Kim GH, Hyeon JW (1995) New synthetic medium for growth of mycelium of *Pleurotus* species. Korean J Mycol, 23, 275-283
 31. Leaf CD, Vecchio AJ, Roe DA, Hotchkiss JH (1987) Influence of ascorbic acid dose on N-nitrosoproline formation in humans. Carcinogenesis, 8, 791-795
 32. Cooney RV, Ross PD, Bartolini GL (1986) N-nitrosation and N-nitration of morpholine by nitrogen dioxide : Inhibition by ascorbate, glutathione and α -tocopherol. Cancer Lett, 32, 83-90
 33. Kim HS, Kang JS (2008) Preparation and characteristics of bread by medicinal herb composites with immunostimulating activity. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 109-116
 34. Eun JS (2011) Effect of *Lespedeza cuneata* G. don on the activity of murine immune cells. Korean J Oriental Physiol Pathol, 25, 837-842
 35. Choi YI, Lee JS, Lee UY, Lee TS (2010) Immunostimulating and antitumor effects on mouse sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Hericium erinaceus*. J Life Sci, 20, 623-631