

## 산국대 추출물의 항산화 활성 및 간세포 보호 효과

김연숙<sup>1</sup> · 황진우<sup>1</sup> · 박표집<sup>1</sup> · 정재현<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>건국대학교 생명공학과

<sup>2</sup>한국교통대학교 식품공학과

### Antioxidant Activity and Protective Effects of Extracts from *Chrysanthemum boreale* on *t*-BHP Induced Oxidative Stress in Chang Cells

Yon-Suk Kim<sup>1</sup>, Jin-Woo Hwang<sup>1</sup>, Pyo-Jam Park<sup>1</sup>, and Jae-Hyun Jeong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biotechnology, Konkuk University, Chungbuk 380-701, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Food and Biotechnology, Korea National University of Transportation, Chungbuk 380-702, Korea

**ABSTRACT** The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity and protective effect of extracts from the stems and leaves of *Chrysanthemum boreale* (CBSL) on *t*-BHP induced oxidative stress in human liver cells (Chang cells). Antioxidant activities in the extracts were determined for various radical scavenging activities including ferric reducing antioxidant power, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity, and oxygen radical absorbance capacity (ORAC). CBSL showed a very good scavenging effect of DPPH radical (IC<sub>50</sub> 0.009±0.002 mg/mL), alkyl radical (IC<sub>50</sub> 0.004±0.001 mg/mL), and hydroxyl radical (IC<sub>50</sub> 6.742±0.152 mg/mL). CBSL also showed a strong antioxidant effect in the ORAC assay. In the MTT assay on human liver cells (Chang cells), the extracts showed protective effects by increasing cell viability, decreasing ROS, and restoring mitochondria membrane potential upon *t*-BHP induced oxidative stress. Our findings suggest that CBSL extracts are a potential therapeutic with protective antioxidant effects upon oxidative stress.

**Key words:** antioxidant activity, *t*-BHP, *Chrysanthemum boreale* L., oxidative stress

## 서 론

산소는 호흡을 통해 에너지를 생성하는 생명체에게 생명 유지에 절대적으로 필요한 물질이지만, 화학물질이나 공해 등과 같은 물리·화학적 요인이나 생체 내 대사과정의 불균형으로 인하여 생성되는 부산물로 hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide 등과 같은 반응성이 강한 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)으로 전환된다. 이러한 활성산소가 생체 내에서 과도하게 발생되면 강한 산화력으로 인하여 생체막의 지질을 산화시키고 단백질의 변성을 일으켜 DNA 손상을 입혀 세포나 조직의 손상을 초래함으로써 세포노화, 동맥경화, 당뇨병, 뇌졸중 및 암과 같은 질병을 일으킨다. 그러므로 생체 내의 활성산소의 생성을 막는 것은 질병 예방에 중요한 역할을 한다. 따라서 많은 연구자들이 보조적인 항산화제의 복용으로 생체 내 활성산소의 불균형을 조절하려는 연구를 계속해 왔으며, 특히 폴리페놀과 플라보노이드 같은 식물 유래의 천연 항산화 물질에 관한 연구를 통하여 안정성을 확보하고자 노력해왔다.

본 연구에 사용한 산국대는 국화과 국화속에 속하는 산국의 줄기와 잎의 총칭이며, 산국은 다년생으로 한국, 중국 북부, 일본에 분포한다. 키는 약 60~150 cm 정도 자라며 뿌리 줄기는 길게 뻗고 줄기는 모여 나고 곧추선다. 흰털이 나고 가지가 많이 갈라지며 뿌리에 달린 잎은 꽃이 필 때 마른다. 줄기에 달린 잎은 어긋나고 긴 타원형의 달걀 모양이며 길이 5~7 cm, 나비 4~7 cm이다. 깃털로 깊게 갈라지고 가장자리에 날카로운 톱니가 있으며 잎자루는 길이 1~2 cm이다. 꽃은 9~10월에 노란색으로 피는데, 두화(頭花)는 지름 1.5 cm 정도로서 가지와 줄기 끝에 산형(傘形) 비슷하게 달린다 (1). 산국 꽃은 진정·해독·소종 등의 효능이 있어 한방에서 두풍과 제풍, 열청혈, 해독 등에 사용되어 왔으며(2,3), 식품으로 소비되는 형태는 국화차 및 국화주가 주를 이루고 있고 어린순은 나물로도 먹는다.

산국 꽃의 성분 연구로는 essential oil(4)과 배당체, sesquiterpenoids 그리고 chrysanthemin 등이 있으며(5), 정유 성분으로는 camphor, cis-chrysanthenol, α-thujone, 1,8-cineole, α-pinene, β-caryophyllene, germacrene, camphene, umbellulone 및 β-pinene 등이 보고되어 있다 (2). Kang 등(6)은 일부 항암 효과가 있다고 보고된 hand-elin을 분리하였으며, Han(7)은 DPPH 라디칼 소거 활성을 갖는 apigenin과 linarin을 분리하여 보고한 바 있다. 산국

Received 11 September 2013; Accepted 23 December 2013

\*Corresponding author.

E-mail: jhjeong@ut.ac.kr, Phone: +82-43-820-5248

꽃의 효능에 대하여 Jang 등(8)은 꽃에서 분리한 sesquiterpene lactone은 인체암세포주인 UACC62, HCT15, UO-31, PC3 및 A549 cell에 비교적 강한 세포 독성이 나타나는 것으로 보고하였다. Nam과 Yang(9)은 꽃에서 분리된 일부 성분이 L1210, K562, A549 세포에 항암 효과가 나타나는 것으로 보고하였다. Jang 등(10)은 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*에 항균작용이 나타나는 것으로 보고하였으며, Nam과 Yang(11)은 산국 꽃의 chloroform 분획물이 감국 꽃보다 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 강한 항균력이 있다고 보고하였다. You 등(12)은 산국 꽃 추출물 및 분획물이 항염 활성이 있음을 보고하였다.

이처럼 산국에 관한 연구는 산국 꽃을 이용한 여러 가지 생리활성에 관한 연구가 대부분이며, 산국의 잎이나 줄기에 관한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 산국의 줄기와 잎(산국대) 추출물의 항산화 활성 및 t-BHP로 유도한 산화스트레스로부터 세포 보호능을 측정하여 산국대의 항산화 소재 개발을 위한 기초자료로 사용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 추출

본 실험에 사용한 산국대는 2012년 9월 충북 괴산지역의 야산에서 채취한 야생산국의 잎과 줄기만을 읍지에서 건조하여 마쇄 후 사용하였다. Folin-Ciocalteu's reagent, ferrous chloride(FeCl<sub>2</sub>), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), potassium persulfate, 2,4,6-tripyridyl-S-triazine(TPTZ), linoleic acid는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 그 외에 사용된 시약은 특급 및 일급을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 시료 추출은 산국대 건조 분말 시료 100 g을 3차 증류수 1 L를 첨가하여 95°C에서 90분 동안 추출하였다. 추출물은 여과지(No. 41, Whatman, Maidstone, England)로 잔재물을 제거한 후 rotary vacuum evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고 동결건조 하여 냉동보관 하면서 실험에 사용하였다.

### 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(13)을 약간 변형하여, 추출물 1.0 mL에 1.0 N Folin-Ciocalteu 시약 및 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 각 1.0 mL씩 차례로 가한 다음 실온에서 30분 정치한 후 분광광도계(SECOMAM, Ales, France)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 0~200 µg/mL의 농도로 제조한 후 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 페놀 함량을 산출하였고 gallic acid

equivalents(mg GAE/g extract)로 나타내었다.

### 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(14)의 방법에 따라 추출물 0.5 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL 및 1.0 M potassium acetate 0.1 mL, ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 정치한 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin(Sigma-Aldrich Co.)을 표준물질로 하여 0~1 mg/mL의 농도 범위에서 얻어진 표준 검량선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

### 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 DPPH radical 소거능 측정

라디칼 소거능 측정은 Lee 등(15)의 방법에 따라 메탄올에 용해시킨 60 µM DPPH 60 µL와 농도별로 준비한 시료 60 µL를 섞은 후 10초간 강하게 교반하여 2분간 실온에서 반응시킨 후 capillary tube에 옮겨 ESR spectrometer (Jeol Co., Ltd., Tokyo, Japan)에서 측정하였으며, 그 측정 조건은 central field: 3,475 G, modulation frequency: 100 kHz, modulation amplitude: 2 G, microwave power: 5 mW, gain: 6.3×10<sup>5</sup>, temperature: 298 K였다.

### 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 alkyl radical 소거능 측정

20 µL의 PBS, 20 µL의 농도별 시료, 20 µL의 40 mM AAPH, 20 µL의 40 mM 4-POBN을 차례로 첨가하여 10초간 강하게 교반한 후 37°C 항온 수조에서 30분간 반응시킨 다음, capillary tube로 옮겨 ESR spectrometer로 alkyl radical 발생량을 측정하였다. 이때 측정 조건은 central field: 3,475 G, modulation frequency: 100 kHz, modulation amplitude: 2 G, microwave power: 10 mW, gain: 6.3×10<sup>5</sup>, temperature: 298 K였다.

### 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 hydroxyl radical 소거능 측정

농도별 시료 0.2 mL에 0.3 M의 DMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) 0.2 mL, 10 mM의 FeSO<sub>4</sub> 0.2 mL 및 10 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 mL를 차례로 첨가한 후 10초간 강하게 교반한 다음 2.5분간 실온에서 반응시키고 반응 혼합물을 capillary tube로 옮겨 ESR spectrometer에서 하이드록실 라디칼 발생량을 측정하였다. 이때 측정 조건은 central field: 3,475 G, modulation frequency: 100 kHz, modulation amplitude: 2 G, microwave power: 1 mW, gain: 6.3×10<sup>5</sup>, 온도: 298 K였다.

### ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력 측정

ABTS 라디칼을 이용한 항산화능의 측정은 potassium

persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 유리 라디칼이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로, Park과 Kim (16)의 방법에 따라 7 mM ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 암실에서 12~16시간 동안 반응시켰다. 이를 414 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정된 후 3.0 mL를 취하여 추출물 1.0 mL를 가한 다음 실온에서 10분간 반응시켜 414 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### FRAP(ferric reducing antioxidant power)를 이용한 총 항산화력 측정

FRAP 측정은 Benzie와 Strain(17)의 방법을 사용하였다. 즉 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ 및 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP 시약을 제조하였다. 이어서 고형분 함유량이 1~5 mg 되도록 희석한 시료액 0.15 mL와 3.0 mL의 FRAP 시약을 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O를 표준물질로 하여 mM FeSO<sub>4</sub> eq./mg extract로 표시하였다.

### Oxygen radical absorbance capacity(ORAC) 측정

산국대 추출물의 항산화 활성을 peroxy radical의 생성과 소멸에 의한 fluorescent의 감소율로 측정하였다. 과산화 라디칼의 생성을 위해 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH)를 사용하였고, 항산화 활성 비교 표준액으로 20 µM trolox를 사용하였다. Fluorescent 표준용액은 Ou 등(18)의 방법에 따라 fluorescein sodium salt(Sigma-Aldrich Co.)를 75 mM phosphate buffer에 가하여 78 nM 농도로 제조하였다. 항산화 활성의 측정은 산국대 추출물과 표준용액 50 µL에 fluorescent 표준용액 50 µL를 가하고, 과산화 라디칼 유발물질인 AAPH를 인산완충액에 가해 221 mM로 희석한 후 25 µL를 가하여 반응시킨 후, spectrofluorometer(SpectraMax M2/M2e, Silicon Valley, CA, USA)를 사용하여 excitation 485 nm, emission 538 nm에서 2시간 동안 5분마다 형광을 측정하였다. ORAC는 trolox를 이용하여 산출하였는데 그 식은 다음과 같다.

$$\text{ORAC } (\mu\text{M TE}) = \frac{C_{\text{trolox}} \cdot (\text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}})}{C_{\text{sample}} \cdot (\text{AUC}_{\text{trolox}} - \text{AUC}_{\text{blank}})}$$

$C_{\text{trolox}}$ 는 trolox의 농도(20 µM),  $C_{\text{sample}}$ 은 샘플의 농도(g/L)이며 AUC(area under curve) 계산식은 다음과 같다.

$$\text{AUC} = 1 + f_5/f_0 + f_{10}/f_0 + \dots + f_{n+5}/f_0$$

### DNA strand break assay

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 DNA damage에 대한 산국대 추출물의 보호 효과를 살펴보기 위하여 0.5 µg pBR 322 DNA에 3

µL 0.8 mM FeSO<sub>4</sub>, 4 µL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 농도별 산국대 추출물 2 µL를 넣고 증류수로 전체 반응액을 13 µL로 하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Loading buffer 2 µL를 넣고 0.8% agarose gel에서 100 V로 전기영동한 후 gel은 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator로 관찰하였으며, gel documentation system(NEXTEP, Seoul, Korea)을 이용하여 촬영하였다.

### 세포 배양

정상 간세포(human liver cells, Chang)를 불활성화한 10% fetal bovine serum(FBS)과 1.0% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM) 배지에서 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

### 세포 독성 측정 및 t-BHP에 의한 세포의 손상으로부터 간세포 보호 효과 측정

세포 독성 및 간세포 보호 효과는 MTT[3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich Co.] 환원 방법을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다(19). Chang 세포를 48-well plates에 7×10<sup>3</sup> cells/well 농도로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 각 시료를 최종 농도(0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/mL)가 되도록 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액(5.0 mg/mL)을 가하고 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에 떨어져 나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. DMSO를 200 µL 분주하여 20분 동안 혼합한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

t-BHP에 의한 산화적 손상에 대한 산국대 추출물의 세포 보호 효과를 관찰하기 위하여, Chang 세포를 48-well plates에 7×10<sup>3</sup> cells/mL 농도로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 각 시료를 최종 농도(0, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL)가 되도록 세포에 한 시간 전처리한 후 t-BHP(최종 농도 80 µM)를 첨가하고 24시간 더 배양하였다. 이후 MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

### 세포내 활성 산소종(ROS) 소거능

활성산소와 반응하여 형광을 발산하는 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate(DCF-DA)를 이용하여 세포내에서 발생하는 활성산소의 정도를 형광측정기로 측정하였다. 96 well black plate에 2×10<sup>4</sup>개의 Chang 세포를 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, 시료를 1시간 전처리하였다. 200 µM t-BHP를 30분 처리한 다음 DCF-DA를 최종 농도 10 µM가 되도록 넣고 37°C에서 30분간 더 배양하였다. PBS로 3회 세척한 후 fluorospectrometer(SpectraMax M2/M2e)를 이용하여(excitation 485 nm, emission 538 nm) 측정하였다(20).

**Mitochondrial membrane potential(MMP, Δψm) 측정**

6 well plate에 1×10<sup>5</sup>개의 Chang 세포를 분주한 후 24 시간 배양하였다. 시료를 1시간 전처리하고 t-BHP(80 μM)를 24시간 처리한 후 10 μM rhodamine 123(Sigma-Aldrich Co.)을 처리하여 30분 동안 37°C에서 반응시켰다. 반응시킨 세포를 1,500 rpm으로 원심분리 하여 상층액을 버리고 세포들만 모은 다음 1 mL의 차가운 PBS로 세척하고 원심분리한 후, 300 μL의 PBS를 첨가하여 FACS Calibur flow cytometer(Becton&Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 MMP의 변화 정도를 분석하였다.

**통계분석**

각 군 간의 유의성의 검증은 GraphPad Prism 5.0 version(San Diego, CA, USA)을 이용하여 One-way ANOVA 중 Tukey test로 검증하여 P값이 0.05 미만을 유의한 것으로 간주하였다.

**결과 및 고찰**

**수율, 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량**

페놀성 화합물은 인체 내의 radical을 제거하여 산화 방지 효과가 있으며 또한 항암, 항염증 및 항알레르기 등 다양한 생리활성 효과가 있음이 알려져 있다. 따라서 산국대 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드의 함량을 측정할 결과를 Table 1에 나타내었다. Woo 등(21)은 *Dendranthema*속의 산국, 감국 및 울릉국화의 꽃과 잎줄기 추출물에서 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과 꽃에 페놀성 물질이 많았다고 보고하였다. 그러나 잎줄기 추출물은 꽃보다 수확량이 많으므로 꽃보다 경제적인 소재로 활용이 될 수 있을 것으로 판단된다. 산국대 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과 4.41±0.04 mg GAE eq./g extract, 4.75±0.03 mg CE eq./g extract를 각각 나타내었다.

**Table 1.** Extraction yields, total polyphenol and total flavonoid contents of CBSL extracts

Sample	Extraction yields (% w/w)	Total polyphenol (mg GAE/g extract)	Total flavonoid (mg CE/g extract)
CBSL	20.4%	4.41±0.04 <sup>1)</sup>	4.75±0.03

GAE, gallic acid equivalents; CE, catechin equivalents.

<sup>1)</sup>Values represent means±SD (n=4).

**ESR을 이용한 라디칼 소거 활성**

DPPH 라디칼은 보라색의 비교적 안정한 프리 라디칼로서 다양한 천연물로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 산국대 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 IC<sub>50</sub> 값이 0.009±0.002 mg/mL로 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었다(Table 2).

산국대 추출물의 alkyl 라디칼 소거능은 IC<sub>50</sub> 값이 0.004±0.001 mg/mL로 알킬 라디칼 소거능이 천연 항산화제로 사용하고 있는 비타민 C보다도 높은 활성을 보여주었다. Hydroxyl 라디칼 소거 활성은 Table 2와 같이 산국대 추출물은 IC<sub>50</sub> 값이 6.742±0.152 mg/mL로 대조군인 비타민 C(0.021±0.002 mg/mL)보다는 낮은 hydroxyl 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 이상의 결과로 산국대 추출물은 hydroxyl 라디칼 소거능은 다소 낮았지만, 높은 DPPH 라디칼 및 alkyl 라디칼 소거 활성을 나타내었다. Woo 등(22)은 국화의 잎줄기가 총 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량이 높고 라디칼 소거 활성이 우수하며 지질과산화 억제활성도가 우수하여, 꽃이 지고 남은 잎줄기를 이용하여 다양한 항산화 기능성 제품을 개발할 수 있을 것으로 판단하였다. 이와 비슷한 결과로 산국대 추출물 또한 DPPH 라디칼 및 alkyl 라디칼의 높은 소거 활성을 확인하였기에 이를 이용한 항산화 활성을 지닌 소재로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

**ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력**

산국대 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성을 평가한 결과 Table 3에 나타낸 것처럼 1 mg/mL의 농도에서 0.470 mM trolox eq./mg extract를 나타내었다. 산국대 추출물은 농도 의존적으로 ABTS 라디칼 소거능이 높게 나타났으며 (data not shown), 양성대조군으로 사용된 BHT와 비교하여 낮은 활성을 보였다. 그러나 Choi 등(23)은 산수유, 복분자, 음양곽, 우슬, 현삼 등 14종의 생약 추출물은 50 mg/mL 농도에서 90% 이상의 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었다

**Table 3.** ABTS radical scavenging, FRAP activity and ORAC of CBSL extracts

Sample	TEAC (mM Trolox eq./mg extract)	FRAP (mM FeSO <sub>4</sub> eq./mg extract)	ORAC (μM TE)
CBSL	0.470±0.022 <sup>1)</sup>	1.017±0.015	94.34±1.52
BHT	1.461±0.023	1.284±0.167	60.02±2.31

TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity; FRAP, ferric reducing antioxidant power; ORAC, oxygen radical absorbance capacity.

<sup>1)</sup>Values represent means±SD (n=4).

**Table 2.** DPPH, alkyl and hydroxyl radical scavenging activity of the CBSL extracts measured by an ESR spectrophotometer

Sample	DPPH radical scavenging activity (IC <sub>50</sub> mg/mL)	Alkyl radical scavenging activity (IC <sub>50</sub> mg/mL)	Hydroxyl radical scavenging activity (IC <sub>50</sub> mg/mL)
CBSL	0.009±0.002 <sup>1)</sup>	0.004±0.001	6.742±0.152
Vitamin C	0.003±0.001	0.011±0.003	0.021±0.002

<sup>1)</sup>Values represent means±SD (n=4).

고 보고하였는데, 이와 비교할 때 산국대 추출물이 높은 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타내고 있음을 확인하였다.

### FRAP를 이용한 총 항산화력

FRAP법은 전자공여 능력을 통해 시료의 항산화 활성을 검증하기 위해 많이 사용하는 방법 중 하나이다. 낮은 pH에서 환원제에 의해 3가 철이 2가 철로 환원되는 원리를 기초로 고안되어진 방법이고 흡광도가 증가할수록 항산화 활성이 높음을 의미한다. 산국대 추출물의 FRAP법을 이용한 총 항산화력 평가 결과  $1.017 \pm 0.015$  mM FeSO<sub>4</sub> eq./mg extract로 높은 항산화 활성을 보였으며 양성 대조군으로 사용한 BHT와 거의 비슷한 활성을 나타내었다(Table 3). Kim 등(24)은 FRAP assay를 이용하여 늙은 호박을 잎, 과육, 과피와 씨로 부위별 항산화력을 측정된 결과 그중 잎이 가장 높은 환원력을 나타내었다고 보고하였다. 이는 폴리페놀의 함량과 항산화력이 밀접한 관련이 있음을 확인하였으며, 높은 폴리페놀 함량을 가지고 있는 산국대 추출물 또한 이와 유사한 경향을 나타내는 것으로 판단된다.

### Oxygen radical absorbance capacity(ORAC)에 의한 항산화 활성 측정

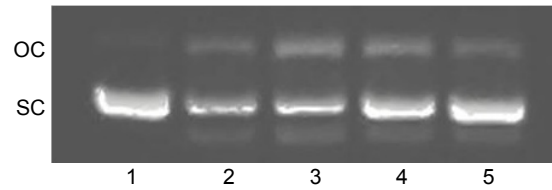
Kim과 Kim(25)은 ORAC assay는 수소전자의 전달을 기본으로 하여 radical chain reaction의 가장 핵심적인 단계인 수소전자 전달과 관련하여 AAPH에 의해 생성된 free radical에 대한 항산화 물질의 소거능력, 즉 radical chain breaking antioxidant capacity를 측정함으로써 식품 내 존재하는 hydrophobic 성분과 hydrophilic 성분 모두에 반응하기 때문에 응용범위가 넓다는 장점을 가지고 있다고 하였다. ORAC assay를 측정한 결과 산국대 추출물의 항산화 활성은 Table 3에서 보는 바와 같이  $94.34 \pm 1.52$  μM TE로 대조군으로 사용한 BHT( $60.02 \pm 2.31$  μM TE)보다 높은 활성을 나타내었다. Hwang 등(26)은 감귤 추출물의 페놀성 화합물 함량과 ORAC 간의 상관계수를 분석한 결과 0.884로 밀접한 관계가 있다고 보고하였다. 산국대 추출물 또한 페놀성 화합물에 의해 높은 항산화 활성이 나타내는 것으로 판단된다.

### DNA strand break assay

전기영동을 이용하여 농도별 산국대 추출물이 hydroxyl radical에 의해 유도된 DNA strand break에 미치는 영향을 Fig. 1에 나타내었다. Plasmid DNA에 hydroxyl radical을 유도하였을 때 supercoiled form이 open circular form으로 DNA의 손상이 있음을 확인하였다. 그러나 plasmid DNA에 유도한 hydroxyl radical과 함께 산국대 추출물을 처리하였을 때 농도 의존적으로 DNA 손상이 억제되었다.

### 세포 생존율

*t*-BHP로 유도한 산화스트레스로부터 산국대 추출물의



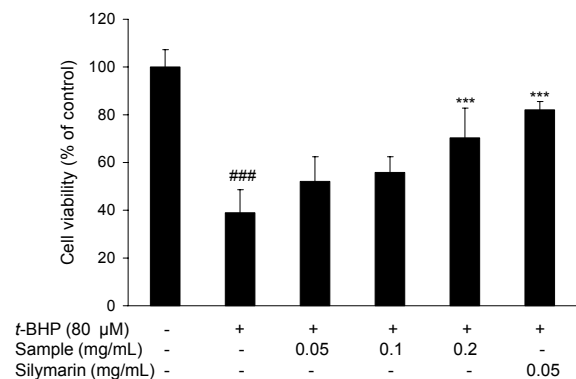
**Fig. 1.** Agarose gel electrophoretic pattern of plasmid DNA strand break by OH generated from a Fenton reaction in the presence of CBSL extracts. An amount of 0.5 μg of pBR 322 DNA was incubated at 37°C for 1 hr in 2 mM FeSO<sub>4</sub> and 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with following additive combinations. Lane 1, no addition (plasmid DNA control); Lane 2, FeSO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DNA damage control); Lanes 3~5, FeSO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of CBSL extracts concentrations of 0.1, 0.5, and 1.0 mg/mL respectively. OC, open circular DNA band; SC, supercoiled DNA band.

간세포 보호능에 미치는 영향을 MTT assay로 측정하였다. 산국대 추출물을 농도별로 처리한 결과 0.2 mg/mL 농도 이하에서는 세포 독성을 전혀 나타내지 않았다(data not shown). Chang 세포는 80 μM *t*-BHP를 24시간 처리하였을 때 세포 생존율이 40%로 낮아졌다. 그러나 산국대 추출물을 농도별(0.05, 0.1, 0.2 mg/mL)로 한 시간 전처리했을 때 농도 의존적으로 생존율이 53.0%, 57.0%, 71.8%로 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 2).

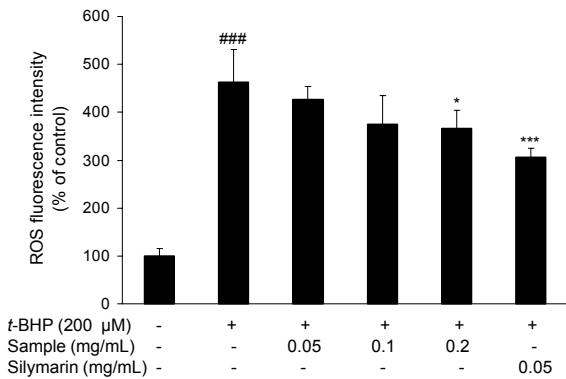
특히 산국대 추출물 0.2 mg/mL 농도로 전처리했을 때 *t*-BHP로 유도한 세포 손상으로부터 약 30% 정도 세포 생존율이 증가함을 나타내었으며, 이는 인간 정상 간세포주인 Chang 세포에서 *t*-BHP로 유도한 세포 손상을 보호하는 것으로 판단된다.

### 세포내 활성산소종(ROS) 소거능

정상 간세포에 200 μM *t*-BHP 처리에 의해 생성된 활성산소종은 control군 대비 대조군에서는 약 460% 증가를 나타냈지만, 산국대 추출물을 처리한 경우 농도 의존적으로



**Fig. 2.** Protective effect of CBSL extracts on *t*-BHP induced oxidative damage in Chang cells. Cells were pre-treated with various concentrations of extracts from HTL leaves for 1 hr, and then were treated with *t*-BHP (80 μM) for 24 hr. Data were represented as mean±SD (n=4). ###P<0.001 versus control, \*\*\*P<0.001 versus *t*-BHP are significantly different as analyzed by One way ANOVA followed by Tukey's test.



**Fig. 3.** Changes of intracellular ROS generated by *t*-BHP treatment in Chang cells. The extracts from CBSL were treated with various concentrations in Chang cells for 1 hr prior to 200 μM *t*-BHP treatment for 30 min. Data were represented as mean±SD (n=4). <sup>###</sup>*P*< 0.001 versus control, <sup>\*</sup>*P*<0.05 and <sup>\*\*\*</sup>*P*<0.001 versus *t*-BHP are significantly different as analyzed by One way ANOVA followed by Tukey's test.

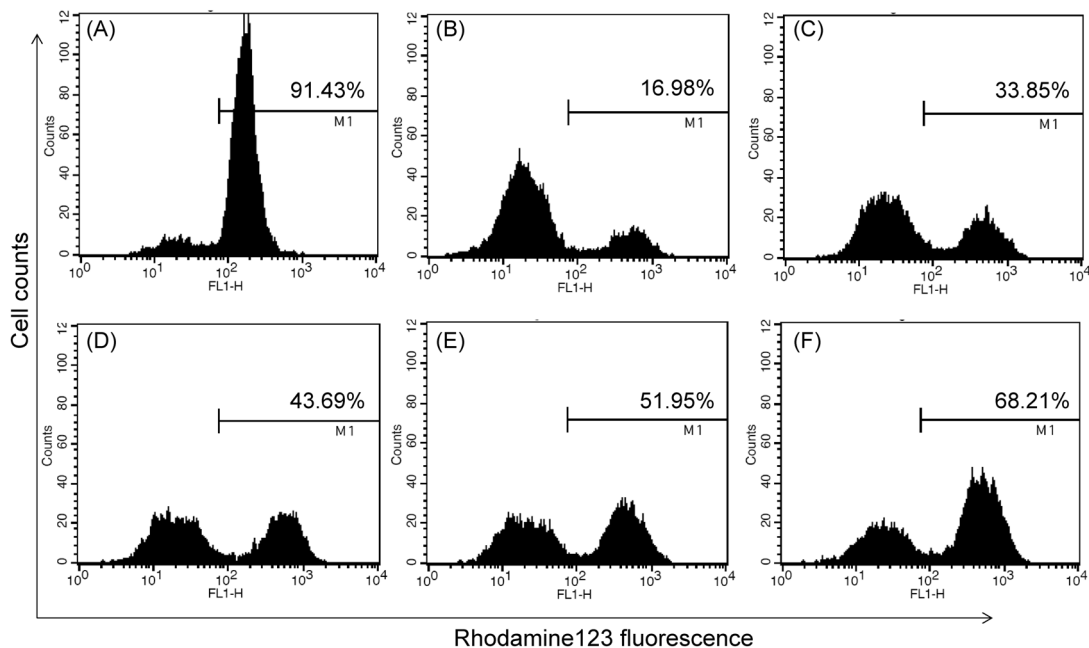
세포내 활성산소종 수준이 감소하는 것을 확인하였다. 특히 산국대 추출물을 0.2 mg/mL 처리했을 때 활성산소종이 360%로 대조군에 비해 약 22% 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 3). 따라서 *t*-BHP 처리로 인해 발생하는 세포내 활성산소종의 증가를 산국대 추출물이 감소시킴으로써 간세포 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

**Mitochondrial membrane potential(MMP, Δψm) 측정**  
미토콘드리아는 세포의 에너지 화폐인 ATP의 대부분을

생산한다. 그래서 미토콘드리아가 손상되면 ATP 감소뿐 아니라 세포의 사멸을 유발한다. 따라서 *t*-BHP를 처리하여 산화스트레스를 주었을 때 정상군에 비해 MMP의 손실이 현저하게 증가되는 것을 확인하였다. 산국대 추출물을 한 시간 전 처리하였을 때, 농도 의존적으로 MMP 손실이 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이것은 산국대 추출물이 산화적 스트레스로부터 간세포를 효과적으로 보호하는 것으로 판단된다.

**요 약**

본 연구는 산국대 추출물의 항산화 활성을 탐색하고자 산국대 추출물에 포함된 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, 전자스핀공명기기를 이용한 DPPH, alkyl 라디칼 소거능, ABTS를 이용한 라디칼 소거 활성, FRAP를 이용한 총 항산화능 및 ORAC를 측정하였다. 또한 세포 독성 및 간세포 보호 효능 실험을 수행하였다. 산국대 추출물의 총 플라보노이드 함량은 4.41±0.04 mg GAE/g, 총 폴리페놀 함량은 4.75±0.03 mg CE/g으로 나타났다. Hydroxyl 소거 활성은 대조군으로 사용한 비타민 C보다 낮았지만, DPPH 라디칼 소거능이나 alkyl 라디칼 소거능은 비타민 C와 비슷하거나 오히려 더 높은 활성을 나타내었다. 또한 ABTS를 이용한 라디칼 소거 활성과 FRAP를 이용한 총 항산화능 측정을 통한 항산화 활성을 평가한 결과에서도 산국대 추출물이 항산화 효과를 가지고 있음이 확인되었다. 게다가 DNA strand break 평가에서 산국대 추출물이 농도 의존적인 DNA 보호



**Fig. 4.** Effect of CBSL extracts on mitochondrial membrane potential in Chang cells. After treatment CBSL extract prior to *t*-BHP treatment for 24 hr, Chang cells were incubated with rhodamine 123 for 30 min, and then immediately subjected to flow cytometric analysis. (A) Control, (B) *t*-BHP (80 μM), (C) *t*-BHP (80 μM)+sample (0.05 mg/mL), (D) *t*-BHP (80 μM)+sample (0.1 mg/mL), (E) *t*-BHP (80 μM)+sample (0.2 mg/mL), (F) *t*-BHP (80 μM)+silymarin (0.05 mg).

효과를 가지고 있음을 보여주었다. 세포 독성을 살펴보기 위하여 정상 간세포(human liver cells, Chang cells)를 이용하여 MTT assay를 수행한 결과 세포의 생존율은 0.2 mg/mL의 농도까지는 전혀 독성을 나타내지 않았고, 간세포 보호 효능 실험에서는 샘플을 한 시간 동안 전처리했을 때 *t*-BHP로 유도한 산화적 스트레스에 대해 농도 의존적으로 생존율이 증가하는 것을 확인하였다. 세포내 활성산소종을 측정된 결과와 미토콘드리아 막 전위차를 측정된 결과에서 산화적 스트레스에 대한 간세포 보호 효과를 나타내었다. 이는 산국대 추출물이 가진 항산화 활성이 세포내 활성산소종의 소거를 통한 산화스트레스를 억제하여 세포를 보호하는 효과가 있는 것으로 판단된다. 이상의 결과로 기존 산국에 관한 연구는 꽃에 관한 연구가 주를 이루고 있고 줄기와 잎에 관한 연구가 부족한 실정하기에, 산국대를 기능성 소재로 활용할 때 기초자료로 활용할 뿐 아니라 꽃보다 수확량이 많으므로 경제적인 소재활용이 될 수 있을 것으로 판단된다.

### 감사의 글

이 논문은 2013년도 한국교통대학교 교내학술연구비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Ko KS. 1991. *Korean Animals and Plants Guides*. Academy books, Seoul, Korea. p 149.
- Hong CU. 2002. Essential oil composition of *Chrysanthemum boreale* and *Chrysanthemum indicum*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 45: 108-113.
- Jang DS, Park KH, Lee JR, Ha TJ, Park YB, Nam SH, Yang MS. 1999. Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Hemisteptia lyrata*, *Chrysanthemum zawadskii* and *Chrysanthemum boreale*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42: 176-179.
- Shin SH, Choi YI. 1986. Analysis of essential oil from *Chrysanthemum sibiricum* and the comparison with essential oils from some *Chrysanthemum* spp. *Korean J Pharmacogn* 13: 153-156.
- Lee TB. 2003. *Illustrated flora of Korea*. Hyangmoon, Seoul, Korea. p 379.
- Kang SS, Kim JS, Son KH, Lee CO, Kim YH. 1996. Isolation of handelin from *Chrysanthemum boreale*. *Arch Pharmacol Res* 19: 406-410.
- Han WS. 2003. Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Chrysanthemum boreale* Makino. *Korean J Medicinal Crop Sci* 11: 1-4.
- Jang DS, Park KH, Ko HL, Lee HS, Kwon BM, Yang MS. 1999. Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from several compositae plants. Part 3. Inhibitory activity on nitric oxide release and ACAT. *Korean J Pharmacogn* 30: 74-78.
- Nam SH, Yang MS. 1995. Isolation of cytotoxic substances from *Chrysanthemum boreale* M. *Agric Chem Biotechnol* 38: 273-277.
- Jang DS, Park KH, Yang MS. 1998. Germacranolides from flowers of *Chrysanthemum boreale* Makino. *Korean J Pharmacogn* 29: 67-70.
- Nam SH, Yang MS. 1995. Antibacterial activities of extracts from *Chrysanthemum boreale* M. *Agric Chem Biotechnol* 38: 269-272.
- You K, Bang C, Lee K, Ham I, Choi HY. 2011. Anti-inflammatory effects of *Chrysanthemum boreale* flower. *Korean J Herbology* 26: 31-37.
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-968.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
- Lee SJ, Kim EK, Hwang JW, Oh HJ, Yang SI, Lee SJ, Jeon BT, Kim SK, Park PJ. 2009. Free radical scavenging activity of  $\beta$ -chitooligosaccharides. *J Chitin Chitosan* 14: 24-28.
- Park MK, Kim CH. 2009. Extraction of polyphenols from apple peel using cellulase and pectinase and estimation of antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 535-540.
- Benzie IF, Strain JJ. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299: 15-27.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619-4626.
- Je JY, Park PJ, Kim EK, Ahn CB. 2009. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of *Bambusae caulis* in liquamen. *Food Chem* 113: 932-935.
- Zeng KW, Wang XM, Ko HS, Yang HO. 2010. Neuroprotective effect of modified Wu-Zi-Yan-Zong granule, a traditional Chinese herbal medicine, on  $\text{CoCl}_2$ -induced PC12 cells. *J Ethnopharmacol* 130: 13-18.
- Woo JH, Shin SL, Lee CH. 2010. Antioxidant effect of 80% ethanol extracts obtained from three *Dendranthema* species. *Korean J Plant Res* 23: 47-53.
- Woo JH, Shin SL, Jeong HS, Lee CH. 2010. Antioxidant effect of extracts obtained from three *Chrysanthemum* species. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 631-636.
- Choi SS, Yim DS, Lee S. 2009. Radical scavenging activities and protective effects against oxidative damage DNA of extracts from medicinal plants with known osteoprotective effects. *Korean J Pharmacogn* 40: 143-149.
- Kim MJ, Hong CO, Nam MH, Lee KW. 2011. Antioxidant effects and physiological activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) extract from different aerial parts. *Korean J Food Sci Technol* 43: 195-199.
- Kim SH, Kim YM. 2007. Determination of the antioxidant capacity of Korean ginseng using an ORAC Assay. *J East Asian Soc Dietary Life* 17: 393-401.
- Hwang JH, Park KY, OH YS, Lim SB. 2013. Phenolic compound content and antioxidant activity of citrus peels. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 153-160.