

통통마디 지상부 분획의 산화방지 활성, 활성산소종 생성과 세포독성 조절작용

강스미 · 홍정일*

서울여자대학교 자연과학대학 식품응용시스템학부

Antioxidant activities, production of reactive oxygen species, and cytotoxic properties of fractions from aerial parts of glasswort (*Salicornia herbacea* L.)

Smee Kang and Jungil Hong*

Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University

Abstract Glasswort (*Salicornia herbacea* L.) is an edible halophyte that grows in salt marshes. In the present study, anti- and pro-oxidant activities and cytotoxic properties of glasswort were investigated. Solvent fractions, including fractions of hexane, ethylether (Fr.E), ethylacetate (Fr.EA), butanol and water, were prepared from a 70% methanol extract of glasswort aerial parts. Fr.EA contained the highest levels of total polyphenols and flavonoids, showing the strongest scavenging activities against DPPH and ABTS radicals, and nitrite. In addition Fr.EA showed the most potent cytotoxic effects on HCT-116 colon cancer cells and INT-407 normal intestinal cells, followed by Fr.E. Most fractions also decreased the level of reactive oxygen species in the treated cells, but generated H₂O₂ in the medium. The cytotoxic activity of Fr.EA was more pronounced in the presence of ascorbic acid or N-acetylcysteine. These results indicate that the fractions from aerial parts of glasswort exhibit both anti- and pro-oxidant activities, and these activities modulate cytotoxic properties.

Keywords: glasswort, antioxidant, reactive oxygen species, pro-oxidant, cytotoxicity

서 론

최근 현대인의 식습관 등의 변화로 인해 야기되는 각종 만성 질환이 사회적 문제로 대두되고 있고, 이러한 질환 예방과 건강 증진을 목적으로 한 건강기능식품의 개발 및 소비가 보편화되면서 새로운 기능성 소재로써 염생식물의 이용이 제시되고 있다(1). 염분이 있는 땅에 서식하는 식물을 염생식물이라 하며 우리나라에는 통통마디, 해홍나물, 나문재 등 총 16과 40여종이 보고되고 있다(2). 이중 식용이 가능한 염생식물은 통통마디, 칠면초, 해송 등 10여 종이 있으며 다양한 생리활성 기능을 가지는 식물자원으로 주목 받고 있다(3-4).

명아주과에 속하는 통통마디(*Salicornia herbacea* L.)는 함초라고도 불리는데, 우리나라에서는 서남해안 지역의 염전 주변과 민물과 바닷물이 섞이는 갯벌이 주 서식지이며, 제주도, 울릉도 등 도서지역에서도 발견된다(5). 통통마디는 식용뿐만 아니라 각종 민간치료요법에도 사용되어 왔으며, 이의 잠재적인 가치에 대한 관심이 고조됨에 따라 유용 기능성 성분 및 생리활성 평가에 대

한 연구가 활발하게 진행되고 있다(6-9). 염생식물인 통통마디는 다른 식물에 비해 다량의 염분을 함유하고 있을 뿐만 아니라 마그네슘, 요오드, 칼륨 등 90여종의 무기질을 풍부하게 함유하고 있으며, 특히 다량의 칼슘을 함유하는 것으로 보고되었다(6,7). 통통마디가 함유하고 있는 전체 지방산의 50% 가량이 필수 지방산인 리놀렌산이며, 총 아미노산 중 필수 아미노산이 40% 이상을 차지할 뿐만 아니라, 줄기는 알긴산 등의 식이섬유소를 다량 함유하는 것으로 나타났다(8-9).

통통마디에서 분리한 폴리페놀성 물질인 isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside와 3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoyl quinic acid은 지방질 과산화를 억제하고 자유 라디칼을 소거함으로써 산화방지 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 간암 및 대장암 세포의 성장을 억제하는 항암 효과도 보고되었다(10-12). 동물 실험을 통한 보고에 의하면 스트렙토조토신에 의한 당뇨유발 쥐 모델에서 통통마디의 투여에 의해 혈당이 강하되고 당뇨에 의한 체중 감소현상을 억제 되는 등 항당뇨 효과와 당뇨에 의한 합병증이 감소되는 것으로 나타났으며, 동맥경화와 고지혈증을 예방하는데도 효과가 있다고 보고되었다(13-15). 또한 통통마디 추출물의 면역세포활성 조절효과(16,17), 통통마디 종자에 대한 생리활성 평가(18) 및 담수에서 재배한 통통마디의 기능성에 대한 연구(19)도 진행된 바 있다.

지금까지의 연구 결과를 바탕으로 통통마디가 다양한 생리활성을 나타내는 식물 자원으로 주목 받고 있으나 아직도 연구결과가 충분히 체계적으로 축적되지 못한 상황이다. 특히 통통마디 추출물에 대한 극성별 분획의 항산화적 특성, 산화방지 효과를

*Corresponding author: Jungil Hong, Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 01797, Korea
Tel 82-2-970-5639
Fax: 82-2-970-5977
E-mail: hjil@swu.ac.kr
Received June 6, 2016; revised July 13, 2016;
accepted July 13, 2016

나타내는 폴리페놀성 물질이 가지는 산화촉진 효과 및 이러한 활성이 세포독성에 미치는 영향에 대해서는 지금까지 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 통통마디 지상부의 70% 메탄올추출물로부터 극성에 따른 분획을 얻은 후, 각 추출물 분획에 대한 라디칼 소거능, 지방질 과산화 억제 효과와 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성을 통한 산화촉진활성을 조사하였으며, 정상장관계 세포와 대장암 세포에 대한 각 분획의 독성을 평가하고 이에 미치는 산화촉진 활성의 영향을 평가하여 궁극적으로 통통마디의 식품기능성 소재로서 이용가능성 확대를 위한 기본정보를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료, 시약 및 세포주

통통마디는 대신함초(Sinan, Korea)로부터 8월에 수확한 것을 구입하였다. 폴린-시오칼토페놀(Folin-Ciocalteu's phenol) 시약은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였고, AlCl₃은 Junsei (Tokyo, Japan)에서, 1,1-diphenyl-2-picryldrazyl (DPPH), 2,2'-azobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic-acid) (ABTS) 및 N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED)는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 대장암 세포주인 HCT-116와 정상 장관계 세포인 INT-407는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받았으며, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Amresco (Solon, OH, USA)에서 구입하였다. 이외에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 이용하였다.

통통마디 지상부 추출물의 분획

수세한 통통마디 지상부를 -80°C 초저온냉동고에서 냉동한 후, 동결건조기(Labconco Co., Kansas city, MO, USA)를 이용하여 건조시키고, 분말 형태로 만들어 dry keeper (Sanplatec Corp., Osaka, Japan)에 저장하였다. 통통마디 분말 250 g에 70% 메탄올 1.7 L를 첨가하여 60°C로 가열 교반하면서 2시간씩 2회 침출시켰다. 본 통통마디 지상부 침출액을 Whatman No.2 paper를 사용하여 여과한 후, 회전식 감압 농축기(EYELA N-1000; Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 메탄올을 제거 하였다. 남은 물 층에 동량의 헥세인(hexane)을 첨가하여 3회 추출하였고 이행된 층을 농축 건조하여 헥세인 분획(Fr.H)을 얻었다. 분획 여두에 동일한 방법으로 에틸에테르(ethyl ether), 아세트산에틸(ethyl acetate), 부탄올(butanol)을 이용하여 순서대로 분획을 실시하여 각각 Fr.E, Fr.EA, Fr.B 분획물을 제조하였다. 마지막에 남은 물 층을 동결건조하여 물 분획(Fr.W)을 얻었다. 각 분획은 200 mg/mL 농도로 다 이메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO)에 녹여 aliquot을 만들었고 -80°C 초저온냉동고(Ilshin Lab., Yangju, Korea)에 저장하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량 측정을 위하여 각 분획시료 80 µL에 50% 폴린-시오칼토페놀 시약 20 µL를 가한 후 상온에서 3분간 반응시켰다. 이 반응액에 2% Na₂CO₃ 100 µL를 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후, 마이크로플레이트 판독기(Spectra Max 250; Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다(20). 총 플라보노이드 함량은 Lee 등의 방법(21)을 응용하여 측정하였다. 각 분획 시료 50 µL에 5% NaNO₂ 30 µL를 가하여 5분간 상온에 방치한 후, 60 µL의 AlCl₃를 첨가

하여 6분간 반응 시켰다. 이후 4% NaOH 100 µL를 첨가하여 11분간 반응 시킨 다음 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 농도를 달린 탄닌산 및 카테킨으로 표준검량곡선을 작성하여 시료 내 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 각각 계산하였다.

산화방지 활성 측정

DPPH 라디칼 소거활성은 Blois의 방법(22)에 의하여 측정하였다. 각 분획 시료 100 µL와 600 µM DPPH 메탄올 용액 100 µL를 혼합하여 상온의 암소에서 30분간 반응 시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거 활성은 Jara and Fulgencio의 방법(23)을 변형하여 측정하였다. 10 mM ABTS와 10 mM 과황산포타슘(potassium persulfate)을 7.4:2.6의 비율로 혼합한 후, 37°C 암소에서 24시간 방치하여 ABTS 라디칼을 형성시켰다. 이 용액을 인산완충소금물(phosphate buffered saline, PBS)와 적정비율로 희석한 후, 시료 50 µL에 희석한 ABTS 라디칼 solution을 150 µL 가하여 상온의 암소에서 30분간 반응시키고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산이온(nitrite) 소거 활성은 Gray and Dugan의 방법(24)을 변형하여 측정하였다. 시료 50 µL에 100 µM NaNO₂ 100 µL를 가하여 37°C의 암소에서 1시간 반응 시킨 후, 5% H₃PO₄로 희석한 1% sulfanilamide를 첨가하여 암소에서 5분간 반응시켰다. 이후 0.1% NED 50 µL를 첨가하고 10분 후, 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 소거능은 시료 비침가구의 흡광도에 대한 시료 첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 환산하여 나타내었다.

지방질 과산화물 생성 억제 효과 및 Ferrous (Fe²⁺) 이온 소거 활성

통통마디 분획에 의한 지방질 과산화물 생성 억제 효과는 Ambati 등의 방법(25)을 응용하여 측정하였다. 각 분획 시료 400 µL에 0.8% sodium dodecyl sulfate로 희석한 0.4% 리놀레산을 500 µL 첨가하고 100 µM ascorbic acid 및 10 µM FeSO₄를 가하여 총 반응 부피가 1 mL이 되게 하였다. 이를 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 1 M 트라이클로로아세트산(trichloroacetic acid)과 0.8% 싸이오바비투르산(thiobarbituric acid, TBA) 125 µL 및 에탄올에 희석한 5% 뷰틸하이드록시톨루엔(buthylated hydroxytoluene, BHT) 20 µL를 가한 후, 100°C에서 1시간 발색시키고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 분획의 Fe²⁺ 소거 활성은 80 µM FeCl₂ 용액 100 µL에 각 분획 시료 50 µL를 가하여 10분간 반응시키고 1 mM ferrozine 용액 50 µL를 첨가하여 다시 10분간 반응시킨 후, 550 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다(26).

세포 내 ROS 수준 및 과산화수소(H₂O₂) 생성량 측정

세포 내 ROS 수준은 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)를 이용하여 측정하였다(27). 즉 96 well plate에 INT-407 세포를 1.5×10⁴/well 접종하여 24시간 배양한 후, 통통마디 분획을 배양액에 녹여 90분간 처리하였다. 처리 분획을 제거 후 PBS에 용해한 20 µM DCFH-DA를 첨가하여 30분간 반응시켰고, DMSO로 세포를 용해하여 세포 내의 활성산소종과 DCF (2',7'-dichlorofluorescein)의 반응에 의한 형광을 Excitation 485, Emission. 535 nm에서 측정하였다. 각 분획으로부터 생성된 H₂O₂량은 ferrous oxidation xylenol orange (FOX) 분석법을 이용하여 측정하였다(28). 세포에 90분간 분획을 처리한 상기 배양액, 또는 농도를 달린 각 분획을 PBS에 희석하여 37°C에서 30분간 반응시킨 시료 40 µL에 100 µM xylenol orange와 200 mM 소비톨(D-sorbitol) 및 500 µM ammonium ferrous sulfate를 포함하는 FOX 용액

160 μL 을 첨가하였다. 이 혼합액을 암소에서 45분간 반응 시킨 후, 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포배양 및 세포 독성 평가

대장암 세포주인 HCT-116와 정상 장관계 세포인 INT-407는 10% 송아지태아혈청(fetal bovine serum, FBS)와 항생제(100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin)가 첨가된 RPMI 1640과 MEM 배지(Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA)를 각각 사용하여 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하였다. 세포독성은 MTT를 이용하여 측정하였는데 96 well plate의 well당 1.5×10^4 세포를 접종하여 24시간 배양한 후, 각 분획 또는 H₂O₂가 포함된 serum free 배지로 교체하여 24시간 처리하였다. 이후 0.5 mg/mL MTT 용액을 well당 100 μL 씩 1-2시간 처리하여 생성된 MTT formazan을 DMSO에 용해시키고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 측정값은 3회 이상 분석하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 각 실험군별 유의차 분석은 Student's *t*-test 또는 One-way ANOVA와 Tukey's HSD test를 실시하여 95% 또는 99%의 유의 수준에서 검정하였다.

Table 1. Chemical characteristics of the fractions from the aerial part of glasswort

Fractions	Yield (%)	Total polyphenols ¹⁾ ($\mu\text{g}/\text{mg}$ solids)	Total flavonoids ²⁾ ($\mu\text{g}/\text{mg}$ solids)
Fr.H	5.58 ³⁾	87.95 \pm 3.29 ^{c4)}	104.11 \pm 1.86 ^e
Fr.E	1.39	73.80 \pm 0.14 ^d	51.43 \pm 2.94 ^d
Fr.EA	1.05	224.37 \pm 1.82 ^a	383.24 \pm 10.15 ^a
Fr.B	4.49	153.60 \pm 2.51 ^b	207.15 \pm 6.46 ^b
Fr.W	87.48	12.74 \pm 0.14 ^e	14.33 \pm 0.65 ^e

¹⁾Microgram of contents/mg of fraction based on tannic acid as a standard

²⁾Microgram of contents/mg of fraction based on catechin as a standard

³⁾Percent yield based on weight of 70% MeOH extracts (w/w)

⁴⁾Different letters in same column indicate a significant difference ($p < 0.05$) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test

결과 및 고찰

추출물의 분획 및 화학적 특성

통통마디 지상부 70% 메탄올 추출물의 분획 별 추출수를 및 활성성분의 함량을 Table 1에 나타내었다. 통통마디 지상부 추출

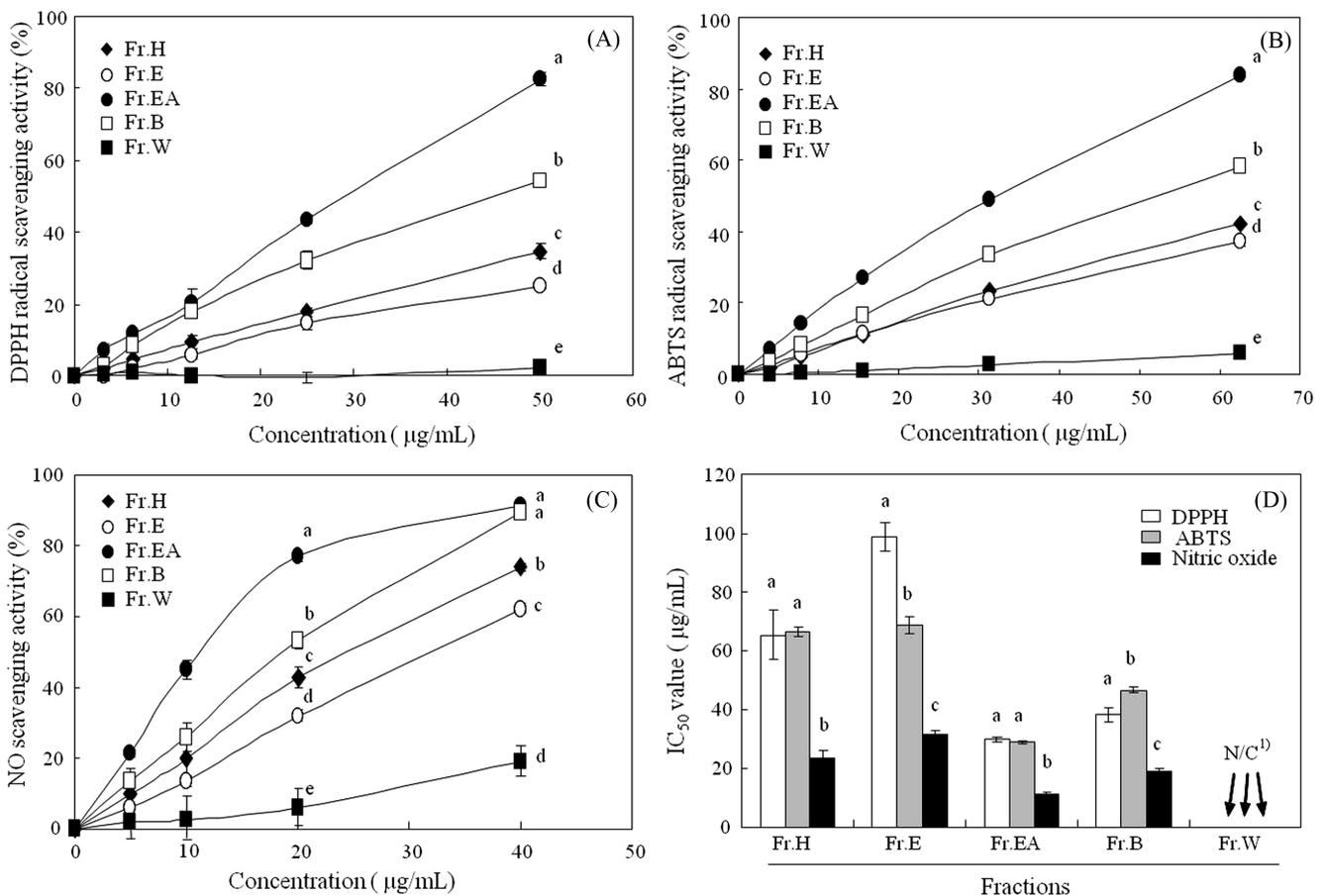


Fig. 1. Scavenging effects of the fractions from aerial part of glasswort on DPPH (A), ABTS (B) radicals, and nitrite (C) and their IC₅₀ values (D). Each value represents the mean \pm SD ($n=4$). Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test. ¹⁾Not calculated.

수율은 각각 5.58, 1.39, 1.05, 4.49% (w/w)로 나타났으며, Fr.W는 87.48% (w/w)로 현저히 높은 수율을 나타내었다. 이는 통통마디 줄기의 50-70%에 달한다고 보고된 알긴산 등의 식이섬유와 염생 식물로서 추출물 중 대부분의 염류가 물 분획에 잔류하여 나타난 현상으로 생각된다(8-9). 통통마디 지상부 각 분획 별 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 탄닌산과 카테킨을 표준물질로 계산하여 Table 1에 나타내었다. 통통마디 70% 메탄올 추출물의 분획 별 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 Fr.EA>Fr.B>Fr.H>Fr.E>Fr.W 순으로 나타났다. 분획 중 Fr.EA에서 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 가장 높게 나타났으며 mg당 224.4, 383.2 µg을 함유량을 나타내었다. 이에 반해 Fr.W는 mg당 12.7 µg와 14.3 µg의 폴리페놀과 플라보노이드를 함유함으로써 분획 중 가장 낮은 함유량을 나타내었다. 본 시료에서 플라보노이드 성분의 함량이 이를 포괄하는 폴리페놀 물질의 함량보다 더 높은 것으로 나타났는데, Kim 등(29)을 비롯한 많은 연구에서도 식물 추출물 중에 폴리페놀보다 많은 양의 플라보노이드가 함유된 것으로 보고하였으며 이는 플라보노이드 정량 표준물질로 사용된 카테킨이 비교적 낮은 반응성을 나타내기 때문으로 판단된다.

DPPH, ABTS 라디칼 및 아질산이온 소거 효과

통통마디 지상부 추출물의 분획 별 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과, Fr.EA>Fr.B>Fr.H>Fr.E>Fr.W 순의 활성을 나타내었다 (Fig. 1A). 분획 중 Fr.EA는 50 µg/mL농도에서 83%의 라디칼을 소거하여 DPPH 라디칼에 대한 강한 소거 활성을 나타내었고, Fr.B, Fr.H, Fr.E는 DPPH 라디칼에 대해 동일한 농도에서 각각 54, 35, 및 25%의 소거 활성을 나타내었다. ABTS 라디칼 소거능을 측정된 결과, DPPH 라디칼 소거능과 유사한 활성순서를 나타내었다(Fig. 1B). 각 분획은 농도 의존적으로 ABTS 라디칼을 소거하였으며, Fr.EA는 62.5 µg/mL에서 84%의 라디칼을 소거하는 것으로 나타났다. 아질산이온에 대한 소거 활성도 Fr.EA가 가장 높은 활성을 나타내었고, 20 µg/mL 농도에서도 약 80%의 아질산이온을 소거하여 그 이상의 농도에서 활성이 포화되는 현상을 보였다(Fig. 1C). 각 소거활성에 대한 IC₅₀를 계산하여 비교한 결과, 가장 높은 활성을 나타낸 Fr.EA의 DPPH와 ABTS 라디칼에 대한 IC₅₀는 각각 29.84 및 28.83 µg/mL로 나타났으며 특히 아질산이온에 대해서는 10 µg/mL 이내의 강한 활성을 나타내었다 (Fig. 1D). 본 실험계에서 항산화제인 ascorbic acid의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거에 대한 IC₅₀는 각각 47.9와 31.7 µg/mL로 나타났으며(data not shown), 따라서 Fr.EA는 ascorbic acid 보다 비교적 강한 radical 소거 활성을 지니는 것으로 생각된다. 한편 Fr.W를 제외한 모든 분획에서도 DPPH와 ABTS 라디칼에 대한 소거활성 보다 아질산이온에 대한 소거활성이 유의적으로 높게 나타났다.

일반적으로 폴리페놀 물질 및 플라보노이드 화합물은 DPPH 라디칼을 비롯한 각종 라디칼에 뛰어난 소거작용을 나타낸다고 알려졌다(30). 본 결과는 각 분획의 폴리페놀류 및 플라보노이드 물질의 함량과 비교적 일관된 경향을 나타내어 통통마디 지상부 분획의 산화방지 활성은 대부분 각 분획이 함유한 폴리페놀 및 플라보노이드성 물질로부터 기인한 것으로 판단된다.

지방질 과산화 억제 효과

통통마디 지상부 추출물 분획의 지방질과산화 억제효과를 Fenton 반응에 의해 유발된 리놀레산 산화반응계에서 분석하였다. 그 결과 모든 분획이 1 mg/mL 농도에서 유의적으로 지방질과산화를 억제하였으며, Fr.B와 Fr.EA가 가장 높은 활성을 나타내어, 약

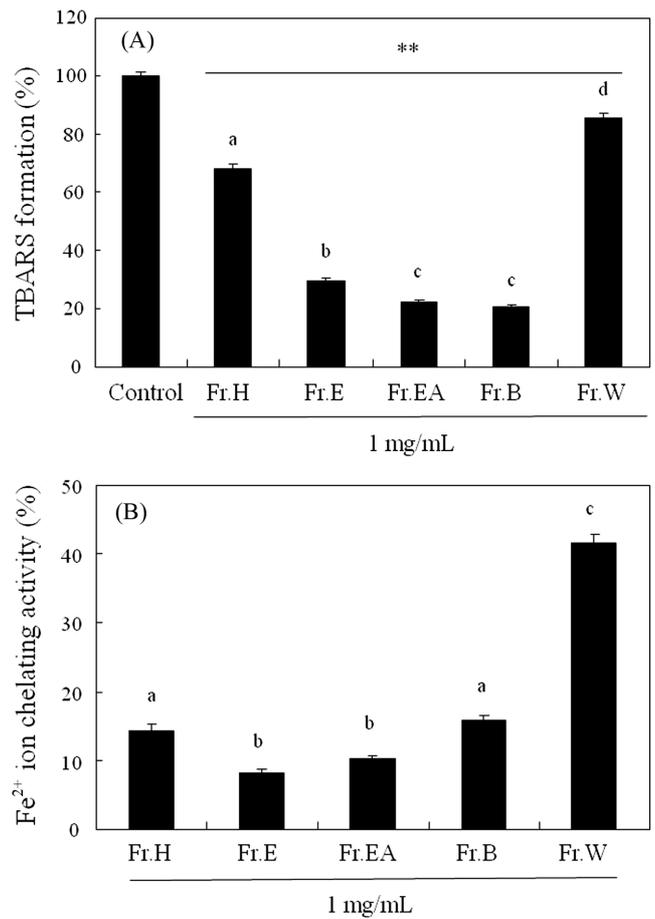


Fig. 2. Effects of the fractions from aerial parts of glasswort on lipid peroxidation (A) and their Fe²⁺ ion chelating activity (B). Each value represents the mean±SD (n=4). ** significantly different from control according to Student's *t*-test (***p*<0.01). Different letters indicate a significant difference (*p*<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test.

80%의 리놀레산의 산화물질인 TBA 반응물질(TBARS)의 생성 억제활성을 보였다(Fig. 2A). Fr.E와 Fr.H도 동일한 농도에서 TBARS의 형성을 각각 71, 32% 억제하였고, 각종 라디칼에 대해 거의 소거활성을 나타내지 못했던 Fr.W도 유의적인 지방질과산화 억제활성을 보였다.

본 반응계에서는 Fe²⁺ ion에 의해 지속적으로 발생하는 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical)이 지방질의 산화를 유발하므로, Fe²⁺와 같은 금속이온의 소거활성이 지방질과산화 억제반응의 주요 기작으로 작용할 수 있다. 통통마디 지상부 각 분획의 Fe²⁺에 대한 소거활성을 측정된 결과, 모든 분획이 Fe²⁺ 소거활성을 가짐을 확인하였고 Fr.W>Fr.B>Fr.H>Fr.EA>Fr.E 순의 활성을 나타내었다(Fig. 2B). 각종 라디칼에 있어 거의 소거활성을 나타내지 못했던 Fr.W는 1 mg/mL 농도에서 free Fe²⁺를 42% 감소시킴으로써 가장 높은 소거활성을 나타내었는데, 따라서 본 과산화지질 형성 반응계에서 나타난 Fr.W의 억제활성은 주로 Fe²⁺에 대한 소거활성에 근거한 것으로 판단된다. 일반적으로 산화방지효과는 라디칼 소거활성 및 금속이온 킬레이트 효과 등의 다양한 기작을 통해 나타날 수 있으며, 라디칼 소거활성과는 달리 Fe²⁺ 킬레이트 효과는 폴리페놀 물질과 상관관계가 낮은 것으로 보고된 바 있다(31). 따라서 통통마디 지상부 추출물에 의한 전체적인 산화방

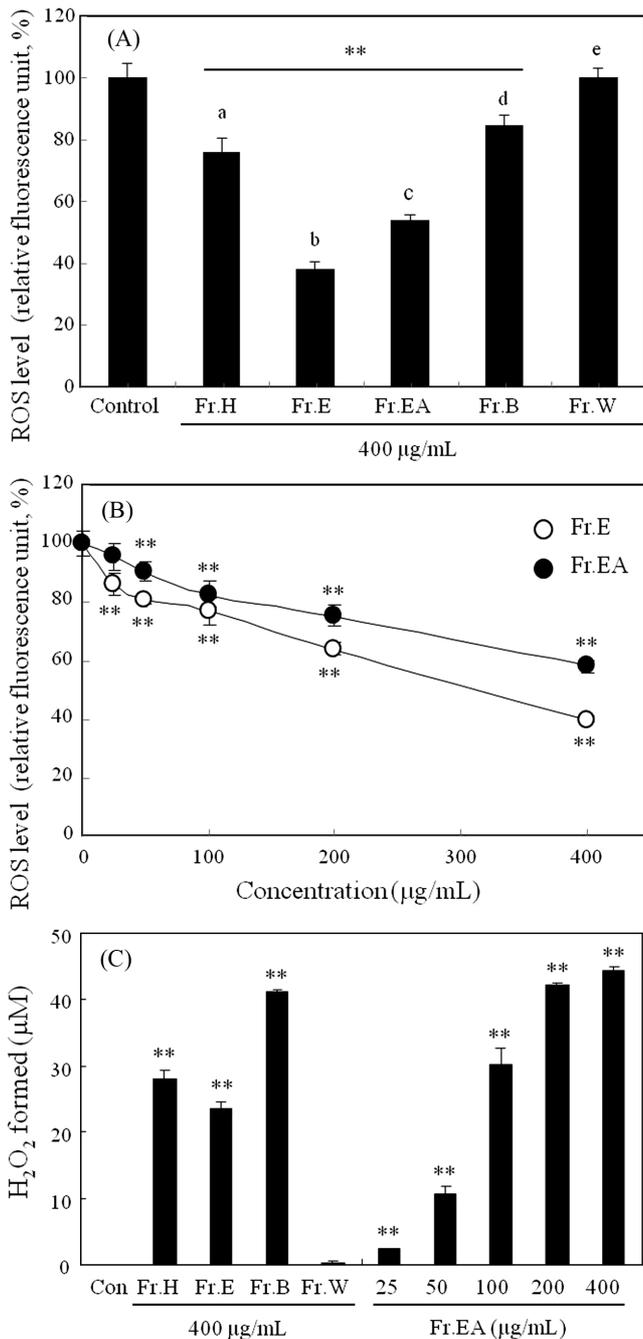


Fig. 3. Effects of the fractions from aerial parts of glasswort on intracellular ROS and H₂O₂ levels in medium. INT-407 cells were treated with each fraction at 400 µg/mL for 90 min and intracellular ROS levels were analyzed using DCFH-DA (A). Concentration-dependent effect of Fr.E and Fr.EA on ROS level in cells were analyzed (B). H₂O₂ level of each medium collected were also analyzed by FOX assay (C). Each value represents the mean±SD (n=5-8). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test (in A). Double stars are significantly different from control according to Student's *t*-test (** $p<0.01$).

지 활성은 폴리페놀 성분들의 라디칼 소거 및 금속이온 킬레이트 효과를 담당하는 각종 성분 등의 다양한 활성이 복합적으로 작용하여 나타날 것으로 생각된다.

세포 내 산화방지 효과 및 배양액에서의 ROS 생성능

통통마디 지상부 분획이 세포 내에서 나타내는 산화방지 효과를 조사하기 위하여 각 분획을 처리한 세포 내 ROS 수준을 분석하였다. DCFH-DA는 세포 투과성 물질로 세포 내로 이동하여 에스테르가수분해효소(esterase)에 의해 비형광성 분자인 DCFH로 전환된 후, 세포 내의 ROS에 의해 형광성 DCF로 전환된다. 산소에 노출된 세포에서는 정상적인 호흡 및 성장과정 중에 필연적으로 ROS가 발생하는데, 통통마디 분획은 이러한 세포 내 ROS 수준을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 각 통통마디 분획을 400 µg/mL 농도로 처리하였을 때 Fr.E는 대조군에 비해 DCF의 형광값을 60% 감소시켰으므로 통통마디 분획 중 가장 높은 세포내 산화방지 효과를 나타내었다(Fig. 3A). 가장 강한 라디칼 소거활성을 보인 Fr.EA의 경우도 대조군에 비해 세포 내 ROS를 46% 감소하였으며, Fr.H와 Fr.B도 유의적인 세포 내 ROS 수준 감소를 유도하였다(Fig. 3A). Fr.E와 Fr.EA는 처리한 세포에서 농도 의존적인 ROS 수준 감소를 유도하였으며, 각각 25와 50 µg/mL 농도에서도 유의적인 감소효과를 나타내었다(Fig. 3B). 하지만 Fr.W를 제외한 각 분획은 세포 배양액 중에서 상당한 수준의 H₂O₂를 비롯한 ROS를 생성하였으며, Fr.EA에 의해 가장 많은 양이 생성되었다(Fig. 3C). 이상의 결과는 각 통통마디 분획이 세포 내로 이행되어 세포 내에서는 ROS를 제거하는 산화방지 효과를 발휘하지만, 세포 외부의 배양액 환경에서는 오히려 ROS를 생성하여 산화촉진 작용을 할 수 있다는 것을 의미한다.

세포 독성 효과 및 ROS의 영향

통통마디 지상부 추출물 분획을 대장암 세포주인 HCT-116와 정상장관계 세포주인 INT-407에 처리하여 세포 독성을 평가하였다. 각 분획을 400 µg/mL 농도로 처리하였을 때 Fr.E, Fr.EA는 HCT-116, INT-407에 대해 80%의 유사한 정도로 세포생존을 저해한 반면, Fr.H와 Fr.B는 이에 비해 낮은 독성을 나타내었고 INT-407 정상세포주에 더 높은 독성을 나타내었다(Fig. 4A). 강한 세포독성을 보인 Fr.E와 Fr.EA는 농도 의존적인 세포사멸유도 효과를 나타내었다(Fig. 4B,C). 이 중 Fr.EA가 더 강한 활성을 보이면서 HCT-116와 INT-407에 대해 각각 138 µg/mL와 211 µg/mL의 IC₅₀를 나타내었고, 정상장관계 세포인 INT-407보다 대장암 세포인 HCT-116에 대해 더 강한 독성 효과를 보이는 것으로 나타났다(Fig. 4D).

통통마디 분획 중 산화방지활성이 뛰어나고 폴리페놀성 물질의 함량이 높은 Fr.EA에 의해 강한 세포독성이 발현되었으며, 따라서 분획 중에 존재하는 페놀성 물질이 세포독성의 주요한 유효물질로 판단된다. 폴리페놀 물질들은 환경에 따라 ROS를 생성하는 산화촉진효과를 나타낼 수 있으며, 본 연구에서도 통통마디 분획에 의한 세포배양액에서의 ROS 생성을 확인한 바 있다(Fig. 3C). Fig. 3C에 나타난 통통마디분획의 ROS 생성능이 세포 의존성을 띄는지 확인하기 위해 cell free system에서도 ROS 생성능을 분석하였다. 그 결과, 세포가 없는 PBS 환경에서도 Fr.W를 제외한 모든 분획에서 농도의존적으로 H₂O₂를 생성하였으며 가장 강력한 세포독성을 나타낸 Fr.EA가 가장 많은 양의 과산화수소(H₂O₂)를 생성하는 것으로 나타났다(Fig. 5A). 다양한 폴리페놀 성분의 경우 이들의 산화에 의해 생성되는 ROS가 세포독성의 주요 원인으로 작용할 수 있다고 보고된 바 있다(32). 따라서 세포 배양액에서 Fr.EA에 의해 생성되는 ROS가 세포독성에 미치는 영향을 파악하기 위해 INT-407세포에 Fr.EA와 농도를 달리한 항산화제 ascorbic acid 또는 *N*-acetylcysteine을 같이 처리하여 독성변화의 추이를 살펴보았다. 흥미롭게도 1 mM ascorbic acid 또는 2 mM *N*-acetylcysteine에 의한 세포독성은 나타나지 않았으나, 각

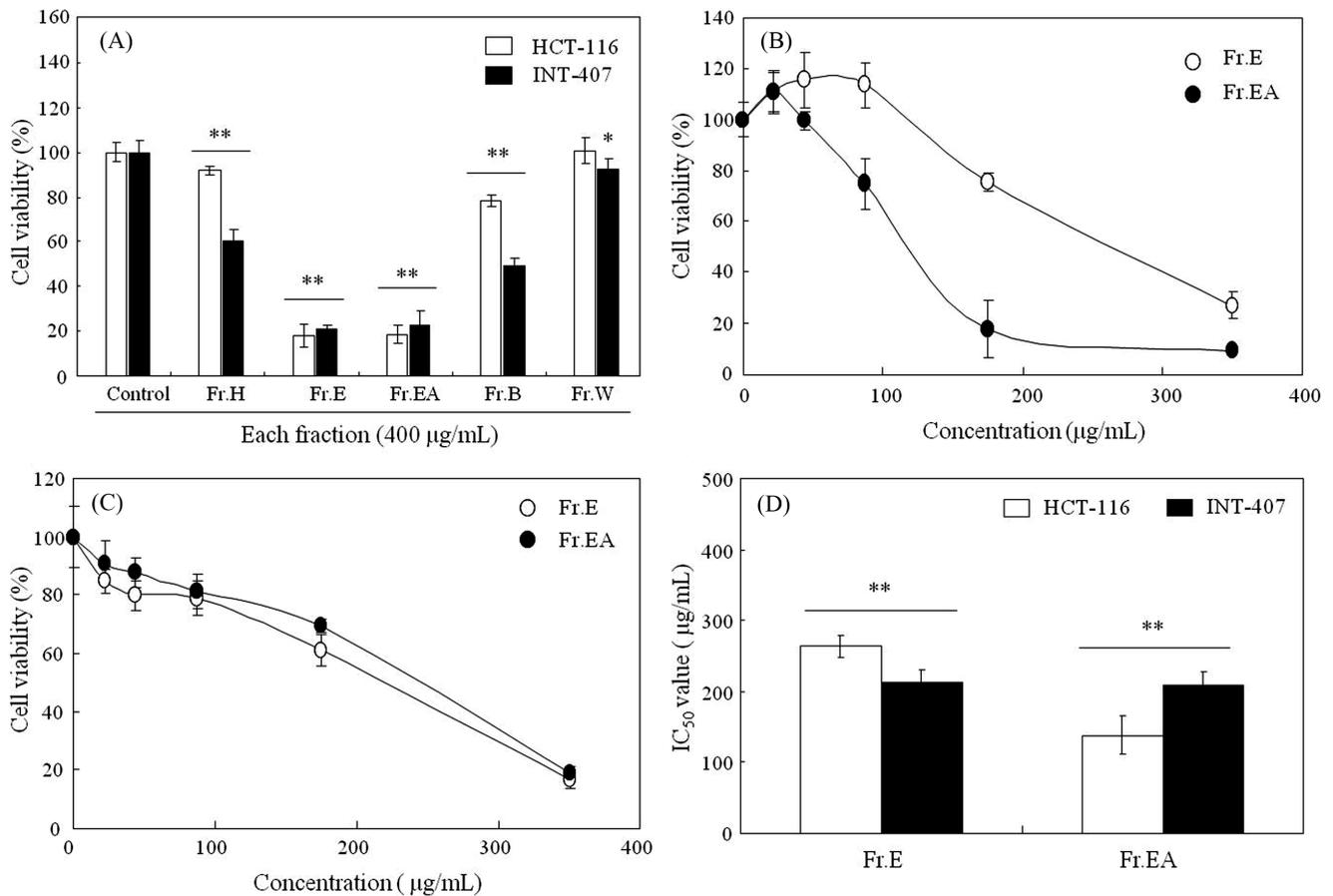


Fig. 4. Effects of the fractions from aerial parts of glasswort on growth of colon cancer and normal intestinal cells. Cells were treated with each fraction at 400 µg/mL for 24 h (A). Concentration-dependent cytotoxic effect of Fr.E and Fr.EA on HCT-116 human colon cancer cells (B) and INT-407 normal intestinal cells (C) were analyzed. The IC₅₀ value of each fraction for different cell lines were also calculated (D). Each value represents the mean±SD (n=3). Stars are significantly different between effects on HCT-116 and INT-407 cells (A and D) or from control (in B and C) according to Student's *t*-test (**p*<0.05; ***p*<0.01).

항산화제와 Fr.EA를 함께 처리한 군에서 세포독성이 유의적으로 증가하였으며 1 mM ascorbic acid 및 2 mM *N*-acetylcysteine 존재 시 각각 25.8 및 11.2% Fr.EA의 독성이 증가하는 현상을 나타내었다(Fig. 5B). 본 결과는 Fr.EA에 의해 배양액 중에 생성된 ROS가 세포독성보다는 세포의 성장을 유도하는데 작용하였기 때문으로 보인다. 본 결과는 과량의 ROS는 세포독성을 유발하나 저농도 수준의 ROS에 의해 세포 성장이 촉진될 수 있다는 기존 보고와 일치하며(33), 200 µg/mL Fr.EA에 의해 생성되는 수준의 ROS는 세포독성의 유발 보다는 세포성장을 촉진하여 오히려 독성발현 효과에 대한 길항작용을 하는 것으로 판단된다. 결론적으로 통통마디 분획중의 폴리페놀 성분들은 세포배양액 중에서 ROS를 생성하여 세포의 성장을 일부 촉진하는 반면, 세포 내부의 환경에서 ROS를 제거하는 산화방지 효과를 나타내어 세포의 성장 및 사멸의 조절에 관여할 수 있을 것으로 판단된다.

이상의 결과에서 통통마디 지상부 분획 특히 폴리페놀류와 플라보노이드 화합물을 다량 함유한 중간 극성 분획들이 각종 라디칼에 대한 강한 소거활성과 함께 지방질 과산화 억제 활성 및 세포독성 유도효과를 나타내었으며, 이들 분획은 ROS를 생성하는 산화촉진 효과도 같이 나타남을 확인하였다. 향후 이러한 기능성과 관련된 유효성분의 단리, 동정 및 보다 면밀한 관련 기작의 연구를 통하여 염생식물 통통마디의 식품 기능성 소재로서 활용방향의 다양화와 이용성이 더욱 확대되어야 할 것으로

보인다.

요약

본 연구에서는 통통마디 지상부를 70% 메탄올로 추출한 후, 이에 대해 용매분획하여 얻은 Fr.H, Fr.E, Fr.EA, Fr.B, 및 Fr.W, 5 분획의 산화방지 효과, ROS 생성효과, 세포독성 효과 및 관련 기작에 대한 기능성을 검토하였다. 이 중 Fr.EA가 가장 높은 폴리페놀 및 플라보노이드 성분 함량을 나타내었으며 Fr.B가 이어서 높은 함량을 보였다. Fr.EA는 DPPH와 ABTS 라디칼 및 아질산이온의 소거에 있어서도 다른 분획들보다 유의적으로 높은 활성을 나타내었으며, 특히 아질산이온의 소거에 가장 뛰어난 활성을 보였다. 리놀레산 지질과산화 시스템에서는 Fr.EA와 Fr.B가 강한 산화억제 활성을 나타내었으며, 이들의 라디칼 소거능은 물론 Fe²⁺에 대한 킬레이트 효과가 지방질산화에 대한 억제기작으로 작용하는 것으로 생각된다. Fr.EA 및 Fr.E가 HCT-116 대장암 세포 및 INT-407 정상장관계 세포에 대해 높은 세포독성을 유발하였으며, 특히 Fr.EA는 HCT-116 대장암 세포에 대해 정상 장관계세포보다 유의적으로 강한 세포독성을 나타내었다. 통통마디 지상부 분획들은 세포 내에서는 ROS를 감소시키는 산화방지효과를 나타낸 반면 배양액 중에서는 H₂O₂를 생성하는 산화촉진 효과도 나타내었으며, Fr.EA와 항산화제인 ascorbic acid 및 *N*-acetylcysteine

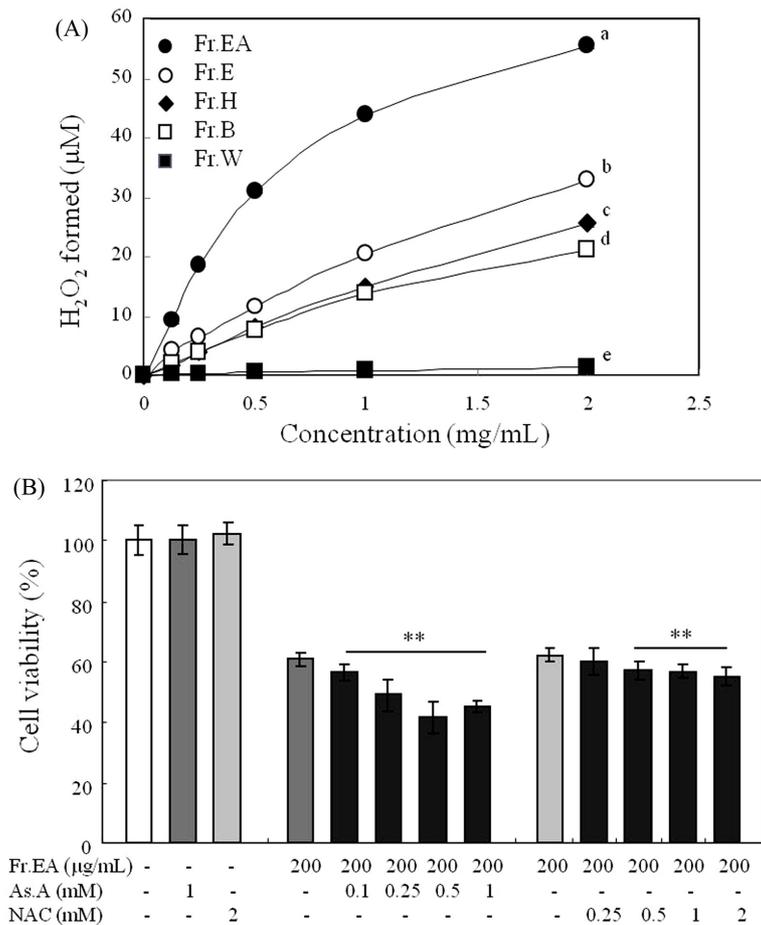


Fig. 5. Generation of reactive oxygen species from fractions of glasswort and their roles in regulating cell growth. H₂O₂ levels generated from each fraction of glasswort were analyzed using FOX assay (A). Effects of Fr.EA with or without ascorbic acid or *N*-acetylcysteine on INT-407 cell growth was also analyzed (B). Each value represents the mean±SD (n=4 in A or 8 in B). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test (in A). Double stars are significantly different from control according to Student's *t*-test ($**p<0.01$) (in B). As.A, ascorbic acid; NAC, *N*-acetylcysteine

을 같이 세포에 처리하였을 때 세포 독성이 유의적으로 증가하는 현상을 나타내었다. 본 연구에서는 통통마디 지상부 분획의 산화방지 및 산화촉진 효과와 세포독성 효과를 보고하였으며, 향후 지속적인 연구를 통해 기능성 소재로서의 통통마디의 이용성 확대가 지속될 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원(Grant No. 109147-03-1-SB020)과 2016년 서울여자대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Rhee, MH, Park HJ, Cho JY. *Salicornia herbacea*: Botanical, chemical and pharmacological review of halophyte marsh plant. *J. Med. Plants Res.* 3: 548-555 (2009)
- Lim CW, Park HY, Kim YK, Lee DS, Song KC. Contents of inorganic metals from halophyte and shellfish living in the beach sediment. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50: 121-126 (2007)
- Lee JT, Jeong YS, An BJ. Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials. *Kor. J. Herbol.* 17: 51-60 (2002)
- Kim JB, Choe SM, Choe KH, Lim SH, Chai SJ. Functional components of halophyte: Antioxidant substances in *Salicornia herbacea* L. *J. Fish. Mar. Sci. Edu.* 19: 197-205 (2007)
- Shin KS, Boo HO, Jeon MW, Ko JY. Chemical components of native plant, *Salicornia herbacea* L. *Korean J. Plant Res.* 15: 216-220 (2002)
- Cha JY, Jeong JJ, Kim YT, Seo WS, Yang JS, Kim JS, Lee YS. Detection of chemical characteristics in hamcho (*Salicornia herbacea* L.) according to harvest periods. *J. Life Sci.* 16: 683-690 (2006)
- Im SA, Kim GW, Lee CK. Immunomodulatory activity of *Salicornia herbacea* L. components. *Nat. Prod. Sci.* 9: 273-277 (2003)
- Min JG, Lee DS, Kim TJ, Park DI. Chemical composition of *Salicornia herbacea* L. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 7: 105-107 (2002)
- Han SK, Kim SM. Antioxidative effect of *Salicornia herbacea* L. grown in closed sea beach. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 207-210 (2003)
- Park SH, Kim KS. Isolation and identification of antioxidant flavonoids from *Salicornia herbacea* L. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47: 120-123 (2004)
- Chung YC, Chun HK, Yang JY, Kim JY, Han EH, Kho YH. Tungtungmadic acid, a novel antioxidant, from *Salicornia herbacea*. *Arch. Pharm. Res.* 28: 1122-1126 (2005)
- Ryu DS, Kim SH, Lee DS. Anti-proliferative effect of polysac-

- charides from *Salicornia herbacea* on inductions of G2/M arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *J. Microbiol. Biotech.* 19: 1482-1489 (2009)
13. Bang MA, Kim HA, Cho YJ. Hypoglycemic and antioxidant effect of dietary hamcho powder in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 840-846 (2002)
 14. Cha JY, Jeon BS, Kim BK, Kang HY, Cho YS. Physiological effect of hamcho yogurt on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Life Sci.* 15: 619-625 (2005)
 15. Park SH, Ko SK, Choi JG, Chung SH. *Salicornia herbacea* prevents high fat diet-induced hyperglycemia and hyperlipidemia in ICR mice. *Arch. Pharm. Res.* 29: 256-264 (2006)
 16. Ryu DS, Kim SH, Lee DS. Immunomodulating activity of *Salicornia herbacea* extract. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 36: 135-141 (2008)
 17. Choi YM, Kang S, Hong J. Modulation of the inflammatory process and interaction of THP-1 monocytes with intestinal epithelial cells by glasswort (*Salicornia herbacea* L.) extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 48: 378-383 (2016)
 18. Kang S, Kim DR, Lee BH, Kim MR, Chiang MH, Hong J. Antioxidant properties and cytotoxic effects of fractions from glasswort (*Salicornia herbacea*) seed extracts on human intestinal cells. *Food Sci. Biotechnol.* 20: 115-122 (2011)
 19. Kang S, Kim MR, Chiang MH, Hong J. Evaluation and comparison of functional properties of freshwater-cultivated glasswort (*Salicornia herbacea* L.) with naturally-grown glasswort. *Food Sci. Biotechnol.* 24: 2245-2250 (2015)
 20. Park KA, Choi YM, Kang S, Kim MR, Hong J. Effects of proteins on the reactivity of various phenolic compounds with the Folin-Ciocalteu reagent. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 299-305 (2015)
 21. Lee NH, Hong J, Kim JY, Chang MH. Antioxidant properties and protective effects of *Imula britannica* var. *chinensis* regel on oxidative stress-induced neuronal cell damage. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: 87-92 (2009)
 22. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1203 (1958)
 23. Jara PJ, Fulgencio SC. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res. Int.* 39: 791-800 (2006)
 24. Gray JI, Dugan LR. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.* 40: 981-984 (1975)
 25. Ambati RR, Ravi S, Vallikannan B, Gokare AR. Antioxidant activity of *Botryococcus braunii* extract elucidated *in vitro* models. *J. Agr. Food Chem.* 54: 4593-4599 (2006)
 26. Oktay M, Gülçin İ, Küfrevioğlu Öİ. Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensm. -Wiss. Technol.* 36: 263-271 (2003)
 27. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Bio. Med.* 27: 612-616 (1999)
 28. Winterbourn CC, Metodiewa D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radical Bio. Med.* 27: 322-328 (1999)
 29. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 333-338 (2004)
 30. Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, Garcia-Parilla MC. Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71: 230-235 (2007)
 31. Graf E, Eaton JW. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical Bio. Med.* 8: 61-69 (1990)
 32. Roos B, Duthie GG. Role of dietary pro-oxidants in the maintenance of health and resilience to oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.* 59: 1229-1248 (2015)
 33. Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337: 1-13 (2004)