

제주 자생 다정큼나무 및 참가시나무의 항산화 효과

김혜란¹ · 박규남¹ · 정보경¹ · 윤원종² · 정용환² · 장경수^{1,†}

¹부산가톨릭대학교 임상병리학과, ²제주테크노파크 생물종다양성연구소
(2016년 2월 4일 접수; 2016년 3월 10일 수정; 2016년 3월 10일 채택)

Antioxidative Effects of *Rhaphiolepis indica* and *Quercus salicina* from Jeju

Hye-Ran Kim¹ · Gyu-Nam Park¹ · Bo-Kyoung Jung¹ · Weon-Jong Yoon²
Yong-Hwan Jung² · Kyung-Soo Chang^{1,†}

¹Department of Clinical Laboratory Science, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea

²Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark, Jeju 699-121, Korea

(Received February 4, 2016; Revised March 10, 2016; Accepted March 10, 2016)

요약 : 본 연구에서는 제주 천연 물질인 다정큼나무와 참가시나무 잎 추출물에서 항산화 효과를 확인하였다. 두 추출물에 대한 항산화 효과 및 세포독성 효과를 농도별, 시간별로 비교 분석한 바, 다정큼나무와 참가시나무 추출물에서 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다. 다정큼나무와 참가시나무 추출물의 5 mg/mL 농도에서 89.93%, 92.41%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내어 다정큼나무보다 참가시나무 추출물에서 더 높은 항산화 효과를 확인하였다. 총 페놀 함량은 다정큼나무 추출물에서는 65.20 mg GAE/g, 참가시나무 추출물에서는 85.20 mg GAE/g 으로 참가시나무에서 더 높은 총 페놀 함량을 나타내며 DPPH 라디칼 소거능과 상관성 있는 결과를 확인하였다. 산화적 스트레스에 의한 간세포(HepG2) 및 폐세포(A549) 보호효과는 두 가지 추출물 모두 약 10%의 세포 보호능을 나타내며 다소 낮은 효과를 나타내었다. 추출물의 폐세포에 대한 독성율은 100 µg/mL 이하의 농도에서 독성을 나타내지 않았다. 본 연구 결과는 다정큼나무 및 참가시나무 추출물을 이용한 항산화 물질 개발을 위한 기초자료로 활용될 것이다.

주제어 : 다정큼나무, 참가시나무, 항산화

[†]Corresponding author
(E-mail: kschang@cup.ac.kr)

Abstract : In this study, the extracts from the leaves of *Rhaphiolepis indica*(*R. indica*) and *Quercus salicina*(*Q. salicina*) confirmed antioxidative effects. The antioxidative and cytotoxic effects of the two extracts were analyzed according to varied concentrations and time. The extracts of *R. indica* and *Q. salicina* showed dose-dependent DPPH radical scavenging activities. The extracts of *R. indica* and *Q. salicina* at concentrations of 5 mg/mL showed DPPH radical scavenging activities at 89.93 and 92.41%. Therefore, *Q. salicina* were confirmed to have higher antioxidative effects than *R. indica*. Total phenolic contents were 65.20 mg GAE/g for *R. indica* and 85.20 mg GAE/g for *Q. salicina*. The result that *Q. salicina* have higher total phenolic contents than *R. indica* suggested a correlation between total phenolic contents and DPPH radical scavenging activity. The cell protective effects of HepG2 and A549 cells under oxidative stress, both the extracts showed relatively low cell protective effects at around 10%. The Cytotoxic effects of A549 Cells did not show cytotoxicity at concentrations of 100 µg/mL or below. The results of this study are likely to be used as basic data to develop antioxidants using the extract of *R. indica* and *Q. salicina*.

Keywords : *Rhaphiolepis indica*, *Quercus salicina*, antioxidative

1. 서론

활성산소종과 같은 자유 라디칼은 하나 또는 하나 이상의 홀 전자를 가지는 것을 말하며, 그들은 정상적인 세포에서 신진대사의 생산물로서 지속적으로 생성된다[1]. 최근 특정 오염 물질, 유기용매, 농약, 담배 연기 등과 같은 외부요인 또는 인체의 내부요인으로 인해 superoxide anion, hydroxyl radical, hydrogen peroxide (H₂O₂)를 포함하는 활성산소종이 과잉 생성되며 [2], 이들은 지질과산화물을 유발하여 세포막 손상 및 세포의 항산화 레벨을 감소시켜 세포에서의 항산화 작용의 방어와 산화적 생산 사이의 불균형을 초래하여 인간의 건강에 많은 문제를 일으킨다[3,4].

체내에는 이러한 산화적 손상에 의한 질병을 방지하기 위해 Superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx)와 같은 항산화 효소 방어시스템을 가지고 있지만, 과도한 자유 라디칼 생산으로 인한 산화적 스트레스에 의해 구조적 및 기능적으로 변형이 일어난다[5,6]. 산화적 스트레스는 만성 신경 퇴행성 질환 및 다양한 질병의 주요 위험 인자이다[7]. 항산화제는 자유라디칼에 의한 산화적 손상으로 부터 세포를 보호 할 수 있다[8]. 그러나 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT), propylgallate (PG)는 동물실험에서 간 손상 및 암 발생을 유도

하는 것으로 부작용에 대한 문제점이 밝혀졌다 [9].

여러 약용 식물은 다양한 질병을 치료하기 위해 고대부터 사용되어 왔으며, 일반적으로 야채, 과일, 허브, 그리고 다른 식물에서 발견되는 생리 활성 천연화합물은 항산화, 동맥 경화, 항돌연변이 및 혈관 신생 억제활동에 효과를 나타내고 있다[10,11]. 이러한 활성 성분들은 다양한 임상 질병의 치료에 사용되고 있으며 사회에 이점으로 제공되고 있다[12]. 한국의 제주도에는 7800여 종 이상의 다양한 자생 식물이 분포하고 있으며, 이러한 천연 식물을 이용한 연구가 많이 진행되고 있다[13].

본 연구에 앞서 제주도에 자생하는 600여 종의 식물자원의 추출물을 이용하여 항산화 효과를 스크린한 결과, 다정큼나무(*Rhaphiolepis indica*)와 참가시나무(*Quercus salicina*) 잎 추출물에서 항산화 효과를 확인하였다. 그리하여 항산화 효과가 있는 다정큼나무와 참가시나무 추출물을 이용하여 항산화 효과를 비교하고 세포 독성에 대하여 연구하였다. 다정큼나무는 장미과(Rosaceae)에 속하는 상록 관목으로, 장미과는 경제적으로 중요한 과일나무인 딸기, 사과, 살구, 체리, 복숭아, 배, 자두 등과 같은 과일 작물을 포함한 3000개 이상의 종을 가진다[14]. 다정큼나무에 대한 연구로는 다정큼나무의 뿌리로부터 얻은 Triterpenoids, Biphenyls, Dibenzofurans의 항염증 효과[15,16]에 대한 연구 외에는 생리학적 효과에 대한 연구

가 이루어져 있지 않아 생리 활성에 대한 연구가 필요하다. 참가시나무는 참나무과(Fagaceae)에 속하는 제주 관목 식물로서 설사, 이질, 피부염 및 출혈의 치료를 위해 사용되었다[17]. 참가시나무에 대한 연구로는 참가시나무의 활성물질을 이용한 항산화 효과[18]에 대한 연구가 일부 보고되었다. 본 연구에서는 연구가 미비한 제주 상록 관목인 다정큼나무와 참가시나무를 이용하여 DPPH 라디칼 소거능 및 총 페놀 함량으로 물질 자체의 항산화 효과를 밝히고 항산화 관련 효소를 생산하는 간세포 및 폐세포에 추출물을 처리한 후, H₂O₂에 의한 산화적 스트레스로부터 세포 보호효과를 농도별로 측정하였으며, 간세포와 폐세포를 이용하여 세포 독성을 나타내는지에 농도별, 시간별로 측정하여 천연 물질을 이용한 천연 항산화제 개발을 위한 기초자료로 활용하고자 본 실험을 수행하였다.

2. 실험

2.1 추출물 제조

제주도에 자생하고 있는 다정큼나무(*Rhaphiolepis indica*) 잎을 2006년 3월경에 채집하였고, 참가시나무(*Quercus salicina*) 잎은 2006년 2월경에 채집하였다. 채집한 시료는 증류수로 2~3회 수세한 뒤 물기를 제거한 후 2주 동안 음건하였으며, 마쇄기로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다. Ethanol(EtOH)을 이용하여 10 mg/mL 농도로 용해하여 추출물을 실험에 사용하였고, 양성 대조군으로 Quercetin(Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였다.

2.2 DPPH 라디칼 소거능 측정

추출물의 전자 공여능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)의 환원력을 이용하여 측정하였다[19]. 각각의 용매에 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 mg/mL 로 희석한 추출물을 준비하여 96 well plate에 10 μ L 분주하고 200 μ M DPPH(Sigma-Aldrich, USA)를 190 μ L를 가한 후, 37°C에서 30분 동안 반응시킨다. 550 nm에서 Biotrak II Plate reader(Amersham Life Science, UK)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 모든 측정값은 3번 반복 실험하여 측정된 평균값과 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었다.

2.3 총 페놀 함량 측정

추출물의 총 페놀 함량 측정은 Folin-Denis method를 사용하였다[20]. 1 mg/mL 추출물(50 μ L), DW(1.65 mL), 100 μ L Folin-Denis reagent를 혼합하여 5분 뒤 1 N Na₂CO₃ 200 μ L를 추가하여 2시간 동안 실온에서 반응시킨다. 그리고 750 nm에서 Spectronic Genesys 5(Milton Roy Company, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 사용하였으며 시료와 동일한 방법으로 분석 후 얻은 표준곡선으로부터 추출물의 총 페놀 함량 값을 gallic acid equivalents per gram Extracts sample(mg GAE/g)로 나타내었다. 모든 측정값은 3번 반복 실험하여 측정된 평균값과 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었다.

2.4 세포 배양

본 실험에 사용한 세포주는 human liver carcinoma cell line인 HepG2와 human lung carcinoma cell line인 A549로 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 세포 배양용 배지로는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Hyclone, USA)를 사용하였으며, 0.1mM non-essential amino acids(GIBCO, USA), 10% fetal bovine serum(Hyclone, USA)과 항생제인 penicillin-streptomycin(GIBCO, USA)을 첨가하여 사용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2번씩 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA(GIBCO, USA)로 부착된 세포를 분리하여 cell culture flask에서 계대 배양하면서 실험하였다.

2.5 H₂O₂ 산화적 스트레스에 대한 세포

보호효과

H₂O₂처리에 따른 다정큼나무 및 참가시나무 추출물의 세포 보호효과를 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay로 확인하였다[21]. HepG2와 A549를 배양 후, 1 X 10⁵개/mL 농도로 조정하여 96 well에 100 μ L 분주 후 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양한다. 추출물을 해당 세포에 0.1, 1, 10, 100, 200 μ g/mL 농도 별로 100 μ L 분주 후 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양한다. 100 mM H₂O₂를 준비하여 H₂O₂ 처리군에만 20 μ L 분주 후 24시간 배양한다. 5 mg/mL MTT용액(Ambresco,

USA)을 준비하여 20 μ L 분주하고 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양한다. 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 200 μ L 분주한 뒤 560 nm에서 Biotrak II Plate reader(Amersham Life Science, UK)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 모든 측정값은 3번 반복 실험하여 측정된 평균값과 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었다.

2.6 세포 독성효과

MTT assay를 통해 HepG2와 A549에 대한 다정큼나무 및 참가시나무 추출물의 세포 독성효과를 확인하였다. 세포를 1 X 10⁵개/mL 농도로 조정하여 96 well에 100 μ L 분주 후 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양한다. 각각의 물질을 해당 세포에 1, 10, 100, 200 μ g/mL 농도 별로 100 μ L 분주 후 37°C, 5% CO₂에서 48시간 및 72시간 배양한다. 5 mg/mL 농도인 MTT 용액(Ambresco, USA)을 준비하여 20 μ L 분주하여, 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양한다. 배지를 제거하고 DMSO를 200 μ L 분주한 뒤 560 nm에서 Biotrak II Plate reader(Amersham Life Science, UK)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 모든 측정값은 3번 반복 실험하여 측정된 평균값과 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 DPPH 라디칼 소거능

다정큼나무와 참가시나무 잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 농도별로 측정된 결과, 두 추출물 모두 농도 의존적으로 항산화 효과를 나타내었다(Fig. 1). 다정큼나무 추출물 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 mg/mL 농도에서 3.10, 6.06, 16.10, 25.40, 89.93%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었으며, 참가시나무 추출물은 농도별로 6.63, 10.09, 23.15, 45.59, 92.41%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다. 참가시나무 추출물은 다정큼나무 추출물보다 모든 농도에서 높은 항산화 효과를 나타내었다. 대조군으로 사용한 quercetin은 농도별로 15.51, 35.51, 83.14, 85.33, 86.72%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내어, 최대농도인 5 mg/mL에서는 quercetin보다 참가시나무 및 다정큼나무 추출물에서 다소 높은 DPPH 라디칼 소거능 나타내었다. 천연 추출물에 포함된 항산화물질은 자유 라디칼로 유도된 산화적 스트레스에 보호할

뿐만 아니라 합성 항산화제의 부작용을 극복할 수 있다[22]. 그러므로 천연 식물은 산화를 억제하는 중요한 원천이며 기능성 식품첨가제 및 치료약 개발에 이용되고 있다. 자유라디칼은 수소원자를 공격할 수 있는 화합물에 의해 소거될 수 있어 DPPH 라디칼 소거능 시험을 통해 항산화 효과에 대한 연구가 많이 되고 있다[23]. 참갈고리풀(*Bonnemaisonia hamifera*) 추출물 200 μ g/mL에서 18%의 DPPH 라디칼 소거능을 확인하였으며[24], 이는 다정큼나무 추출물 500 μ g/mL에서 16%의 DPPH 라디칼 소거능과 유사한 효과를 보였다.

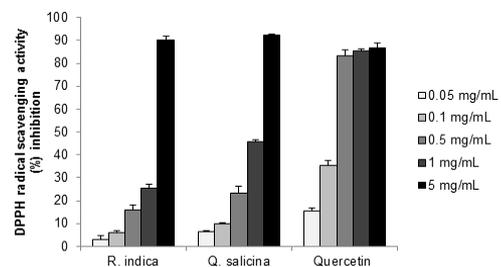


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of *R. indica*, *Q. salicina* and Quercetin. Both the extracts of *R. indica* and *Q. salicina* were confirmed to have dose-dependent antioxidative effects. In addition, at a concentration of 5 mg/mL, the extract of *R. indica* and *Q. salicina* showed a higher level of activity than quercetin used as the control group.

3.2 총 페놀 함량

DPPH 라디칼 소거능이 총 페놀 함량과 연관성이 있는지 알아보기 위해 추출물의 총 페놀 함량을 측정하였다. 다정큼나무, 참가시나무 추출물의 총 페놀 함량은 gallic acid를 기준물질로 측정하였으며, 다정큼나무와 참가시나무 추출물의 총 페놀 함량은 각각 65.20 mg GAE/g과 85.20 mg GAE/g으로 참가시나무 추출물이 다정큼나무 추출물보다 높은 총 페놀 함량을 나타내었다(Table 1). 이에 DPPH 라디칼 소거능이 총 페놀 함량과 연관성 있음이 확인되었다. 천연 식물이 항산화제로서 필수적인 역할을 하는 페놀 함량이 다양한 식물에서 밝혀졌으며 guava(*Psidium*

Guayaba L.), mango(*Mangifera indica* L.), barbados cherry(*Malpighia glabra* L.)의 총 페놀 함량은 24.15, 44.18, 49.21 mg GAE/g 으로 [25], 다정큼나무와 참가시나무 추출물에서 더 높은 총 페놀 함량을 확인하였다.

Table 1. Total Phenolic Content of *R. indica* and *Q. salicina*.

Extract	Total Phenolic Content (mg GAE/g)
<i>R. indica</i>	65.20 ± 1.74
<i>Q. salicina</i>	85.20 ± 2.00

Total phenolic content were measured using gallic acid as a reference material. *Q. salicina* showed a larger phenolic content than *R. indica*.

3.3 산화적 스트레스에 따른 간세포 보호효과

간세포에서 두 추출물의 산화적 스트레스에 대한 항산화효과를 측정하기 위해, HepG2에 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유발한 후 다정큼나무와 참가시나무 추출물의 세포 보호효과를 측정하였다. 다정큼나무 추출물의 0.1, 1, 10 µg/mL 에서는 세포 보호효과를 확인 할 수 없었고, 100 µg/mL 에서는 26.20%, 200 µg/mL 에서는 30.26%의 세포 생존율을 나타내었으며, H₂O₂만 처리한 세포 생존율과 비교하였을 때, 약 10%의 세포 보호효과를 확인하였다. 참가시나무 추출물은 0.1, 1, 10 µg/mL 농도에서는 세포 보호효과를 확인 할 수 없었고 100 µg/mL 에서는 27.01%, 200 µg/mL 에서는 31.98%의 세포 생존율을 나타내었으며, H₂O₂만 처리한 세포의 생존율과 비교하였을 때, 약 10%의 세포 보호효과를 확인하였다(Fig. 2). 산화적 스트레스에 따른 간세포에서의 세포 보호효과를 확인한 결과, 다정큼나무와 참가시나무 추출물 모두 약 10%의 세포 보호능을 보이며, 큰 차이는 없었다. quercetin 양성 대조군에서는 0.1 µg/mL 농도에서 세포 보호능을 확인 할 수 없었지만, 1, 10, 100, 200, µg/mL 농도에서 20.87, 23.04, 55.47, 91.06%의 농도의존성으로 높은 생존율을 나타내었으며 H₂O₂만 처리한 세포 생존율과 비교하였을 때, 100, 200 µg/mL 농도에서 약 38, 74%의 세포 보호능을 확인하였다.

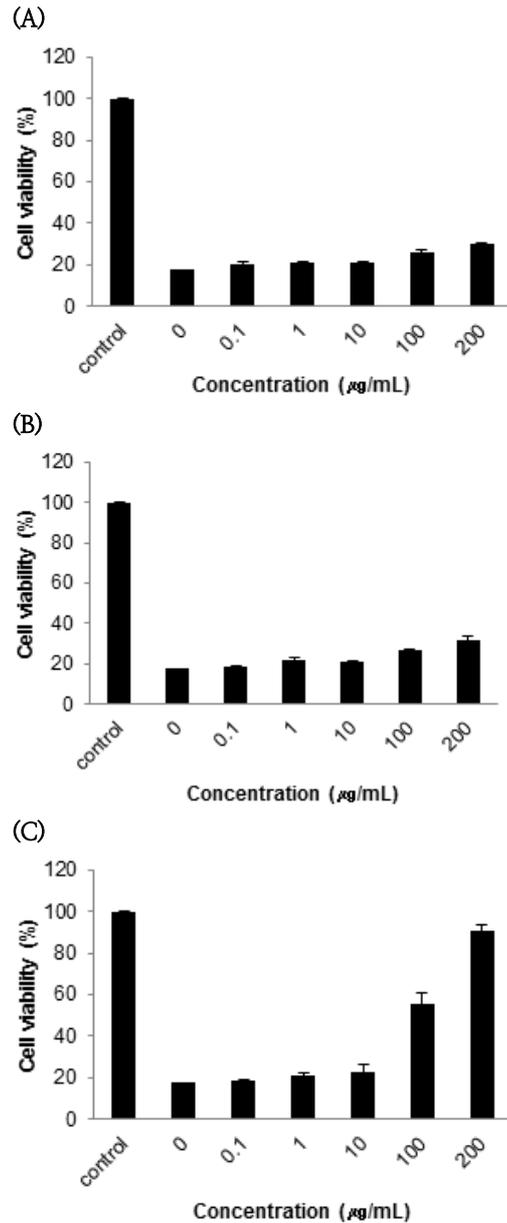


Fig. 2. Cell protective effects on HepG2 cell line (A)*R. indica*, (B)*Q. salicina*, (C)Quercetin. Both the extracts of *R. indica* and *Q. salicina* showed around 10% of cell protective effects. Quercetin used as the control group exhibited dose-dependent cell protective effects due to oxidative stress.

3.4 산화적 스트레스에 따른 폐세포 보호효과

폐세포에서 두 추출물의 산화적 스트레스에 대한 항산화효과를 측정하기 위해, A549에 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유발한 후 다정큼나무와 참가시나무 추출물의 세포 보호효과를 측정하였다. 다정큼나무 추출물의 0.1, 1, 10 µg/mL에서는 세포 보호효과를 확인 할 수 없었고, 100 µg/mL에서는 24.75%, 200 µg/mL에서는 28.36%의 세포 생존율을 나타내었으며, H₂O₂만 처리한 세포 생존율과 비교하였을 때, 약 10%의 세포 보호효과를 확인하였다. 참가시나무 추출물은 0.1, 1, 10 µg/mL농도에서는 세포 보호효과를 확인 할 수 없었고 100 µg/mL에서는 21.59%, 200 µg/mL에서는 23.58%의 세포 생존율을 나타내었으며, H₂O₂만 처리한 세포 생존율과 비교하였을 때, 약 10% 미만의 세포 보호효과를 확

인하였다(Fig. 3). 산화적 스트레스에 따른 폐세포에서의 세포 보호효과를 확인한 결과, 다정큼나무와 참가시나무 추출물 모두 미비한 효과를 나타내며, 큰 차이는 없었다. quercetin 양성 대조군에서는 0.1, 1, 10 µg/mL 농도에서 세포 보호능을 확인 할 수 없었지만, 100, 200 µg/mL 농도에서 54.20, 81.48%의 농도의존성으로 높은 생존율을 나타내었으며 H₂O₂를 처리한 세포 생존율과 비교하였을 때, 100, 200 µg/mL 농도에서 약 37, 64%의 세포 보호능을 확인하였다.

3.5 간세포를 이용한 세포 독성효과

간세포에서 다정큼나무와 참가시나무 추출물의 농도별 세포 독성효과를 측정하기 위해 HepG2를 이용하여 두 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 및 72시간 동안 세포 독성을 측정하였다.

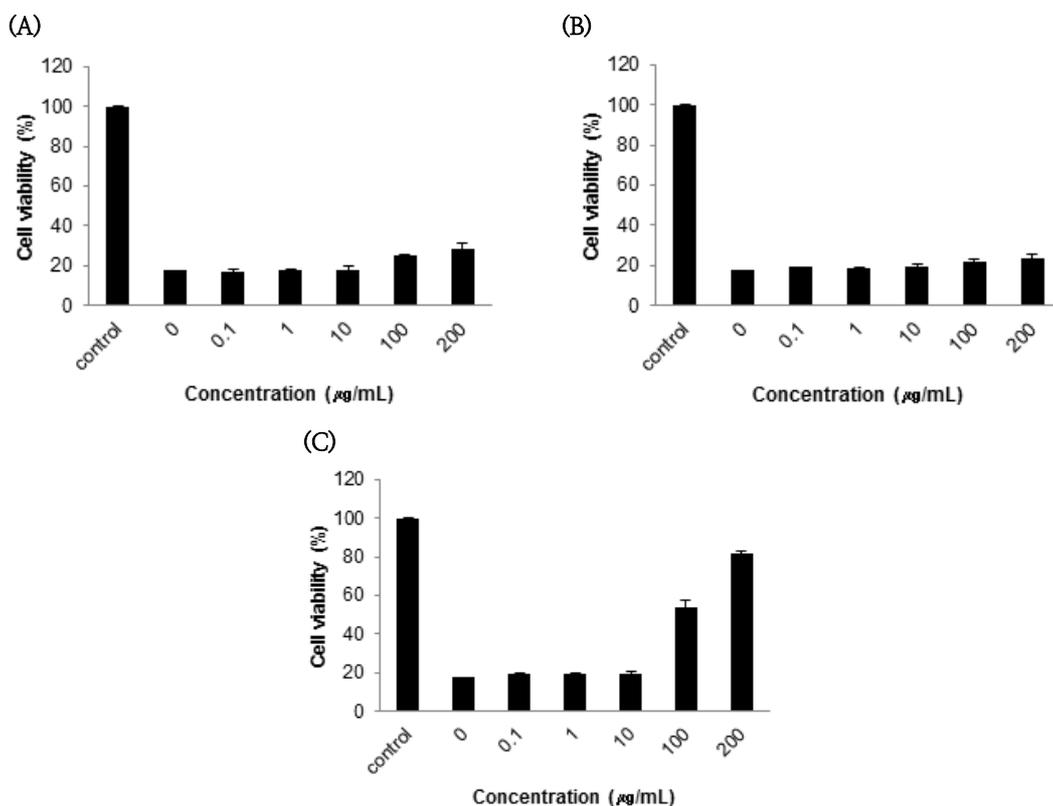


Fig. 3. Cell protective effects on A549 cell line (A)*R. indica*, (B)*Q. salicina*, (C)Quercetin. Both the extracts of *R. indica* and *Q. salicina* showed around less than 10% of cell protective effects, and quercetin used as the control group exhibited dose-dependent cell protective effects due to oxidative stress.

간세포에서 다정큼나무 추출물은 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 48시간 동안 세포 독성을 확인 할 수 없었고 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 89.70%의 세포 생존율로 약 10%의 세포 독성을 나타내었으며, 72시간 동안 처리 시 다정큼나무 추출물은 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 세포 독성을 확인 할 수 없었고 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 47.59, 38.57%의 세포 생존율로 간세포에서 세포 독성효과는 약 52, 61% 이었다. 참가시나무 추출물은 간세포에서 48시간 처리 시 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 세포 독성을 확인 할 수 없었고 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 90% 이상의 생존율로 약 10% 미만의 세포 독성을 나타내었으며, 72시간 처리 시 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 세포 독성을 확인 할 수 없었고 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 71.91, 37.67%의 세포 생존율을 나타내 세포 독성효과는 약 28, 62%이였다(Fig. 4).

3.6 폐세포를 이용한 세포 독성효과

폐세포에서 다정큼나무와 참가시나무 추출물의 농도별 세포 독성효과를 측정하기 위해 A549를 이용하여 두 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 및 72시간 동안 세포 독성을 측정하였다. 폐세포에서 다정큼나무 추출물은 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 48시간 동안 세포 독성을 확인 할 수 없

었고 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 93.50%의 세포 생존율로 약 7%의 세포 독성을 나타내었으며, 72시간 동안 처리 시 다정큼나무 추출물은 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 세포 독성을 확인 할 수 없었고 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 31.44%의 세포 생존율로 폐세포에서 세포 독성효과는 약 68% 이었다. 참가시나무 추출물은 폐세포에서 48시간 처리 시 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 세포 독성을 확인 할 수 없었고 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 약 93.7%의 생존율로 약 7%의 세포독성을 나타내었으며, 72시간 처리 시 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 세포 독성을 확인 할 수 없었고 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 23.31%의 세포 생존율을 나타내 세포 독성율은 약 77%이였다(Fig.5). 세포에 따른 다정큼나무와 참가시나무 추출물의 세포 독성 차이는 확인 할 수 없었지만, 간세포보다 폐세포에서 두 가지 추출물 모두 세포 생존율이 높은 것으로 보아 간세포가 다정큼나무와 참가시나무 추출물에서는 세포 독성이 더 높음이 확인되었다. 쇠비름 (*Portulaca oleracea*) 추출물을 이용한 간세포와 폐세포에서의 세포 독성효과는 간세포에서는 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 73%, 폐세포에서 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 82%의 세포 생존율로 다정큼나무와 참가시나무 보다 낮은 세포 독성을 나타내었으며, Al-Sheddi 등의 연구에서 폐세포에 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

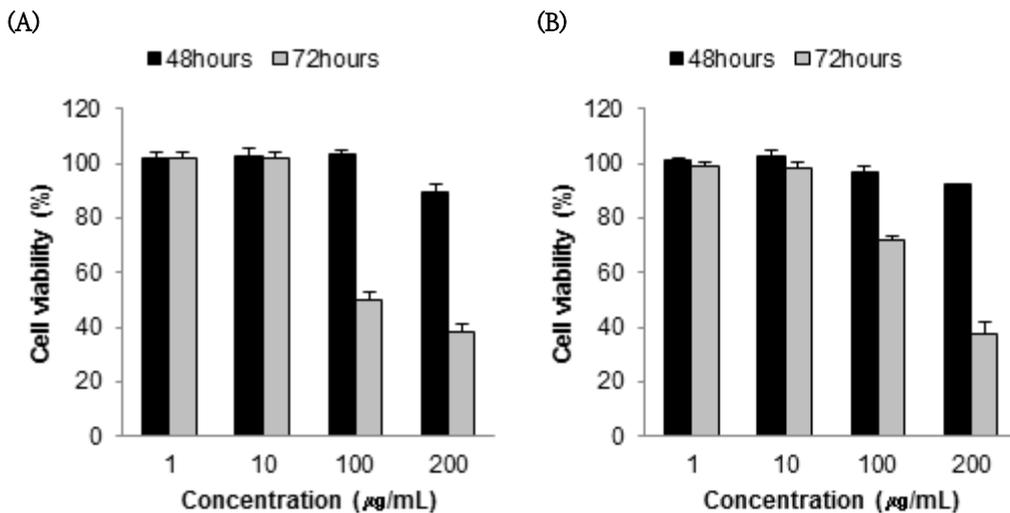


Fig. 4. Cytotoxic effects on HepG2 cell line (A)*R. indica*, (B)*Q. salicina*. Both the extracts of *R. indica* and *Q. salicina* showed around 10% of cytotoxicity in hepatocytes treated for 48hours at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and around 60% of cytotoxicity in hepatocytes treated for 72hours at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

이하의 농도에서 세포 독성을 관찰하지 못한 점은 본 연구 결과와 유사하였다[26].

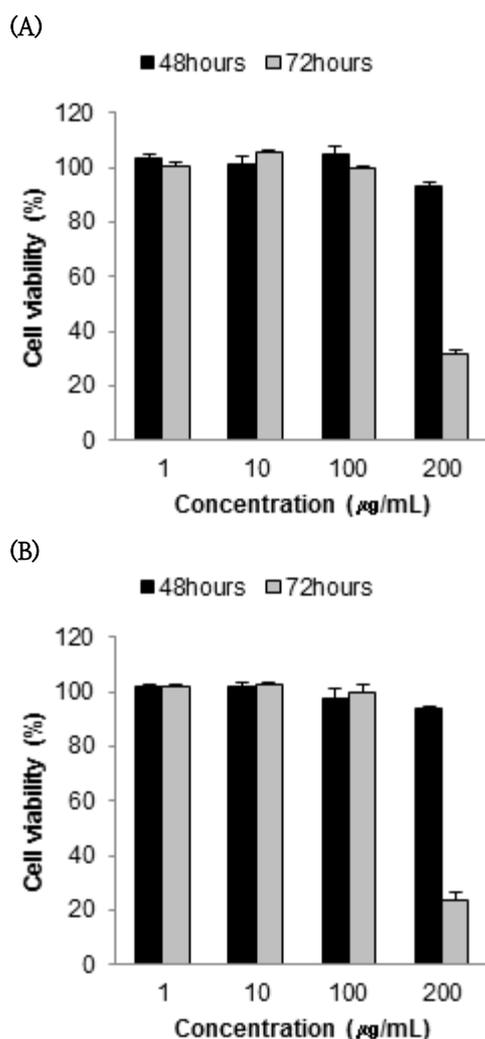


Fig. 5. Cytotoxic effects on A549 cell line (A) *R. indica*, (B) *Q. salicina*. Both the extracts of *R. indica* and *Q. salicina* did not show cytotoxicity in pneumocytes treated for 48 and 72hours at 100 µg/mL or less, and exhibited around 70% of cytotoxicity in pneumocytes treated for 72hours at 200 µg/mL.

4. 결론

본 연구에서는 제주 자생식물인 다정큼나무와 참가시나무 잎 추출물을 이용하여 항산화 효과 및 세포 독성효과를 확인하였다. 다정큼나무와 참가시나무 추출물에서 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능이 증가 하는 것을 확인하였고, 총 페놀 함량과 연관성 있는 결과를 나타내었다. 그러나 간세포와 폐세포에 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유발 하였을 때에 대한 세포 보호 효과는 미비하였다. 이는 사용한 다정큼나무와 참가시나무 추출물이 추출물 자체를 이용한 것으로 추출물의 분획을 이용한 실험 시 더 높은 항산화 효과가 관찰 될 것으로 예상된다. 또한 간세포 및 폐세포를 이용한 세포 독성시험에서는 다정큼나무와 참가시나무 모두 폐세포에 대한 독성보다 간세포에 대한 세포 독성이 높게 확인되었다. 본 연구 결과는 다정큼나무 및 참가시나무의 항산화 물질 개발을 위한 기초자료로 활용될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 Brain Busan 21 사업의 지원으로 수행되었다.

References

1. N. A. Shah, M.R. Khan, K. Naz and M. A. Khan, Antioxidant potential, DNA protection, and HPLC-DAD analysis of neglected medicinal *Jurinea dolomiaea* roots, *Biomed Res Int.*, **2014**, 726241 (2014).
2. Y. J. Lee, D. B. Kim, J. S. Lee, J. H. Cho, B. K. Kim, H. S. Choi, B. Y. Lee and O. H. Lee, Antioxidant activity and anti-adipogenic effects of wild herbs mainly cultivated in Korea. *Molecules*, **18(10)**, 12937-12950(2013).
3. S. Tobwala, W. Fan, C. J. Hines, W. R. Folk and N. Ercal, Antioxidant potential of *Sutherlandia frutescens* and its protective effects against oxidative stress in various

- cell cultures. *BMC Complement Altern Med.*, **14**, 271(2012).
4. P. B. Rakhunde, S. Saher and S. A. Ali, Neuroprotective effect of *Feronia limonia* on ischemia reperfusion induced brain injury in rats. *Indian J Pharmacol.*, **46(6)**, 617–621(2014).
 5. T. Debnath, S. R. Park, D. H. Kim, J. E. Jo and B. O. Lim, Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of *Inonotus obliquus* and germinated brown rice extracts, *Molecules*. **18**, 9293–9304(2013).
 6. C. T. Kumarappan, E. Thilagam and S. C. Mandal, Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*, *Saudi J Biol Sci.*, **19(3)**, 349–355(2012).
 7. B. Shen, J. Truong, R. Helliwell, S. Govindaraghavan and N. J. Sucher, An in vitro study of neuroprotective properties of traditional Chinese herbal medicines thought to promote healthy ageing and longevity. *BMC Complement Altern Med.*, **13**, 373(2013).
 8. K. Sowndhararajan and S. C. Kang, Evaluation of in vitro free radical scavenging potential of *Streptomyces* sp. AM-S1 culture filtrate. *Saudi J Biol Sci.*, **20(3)**, 227–233(2013).
 9. T. Chipiti, M. A. Ibrahim, N. A. Koorbanally and M. S. Islam, In vitro antioxidant activities of leaf and root extracts of *Albizia antunesiana* harms. *Acta Pol Pharm.*, **70(6)**, 1035–1043(2013).
 10. N. Sharma, K. W. Samarakoon, R. Gyawali, Y. H. Park, S. J. Lee, S. J. Oh, T. H. Lee and D. K. Jeong, Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of *Euphorbia hirta* ethanolic extract. *Molecules*. **19(9)**, 14567–14581(2014).
 11. H. Ghaffari, B. J. Ghassam, S. Chandra Nayaka, K. Ramachandra Kini and H. S. Prakash, Antioxidant and neuroprotective activities of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. against oxidative stress-induced neurotoxicity, *Cell Mol Neurobiol.*, **34(3)**, 323–331(2014).
 12. C. Pádua Bda, J. V. Rossoni Júnior, C. L. Magalhães, M. M. Chaves, M. E. Silva, M. L. Pedrosa, G. H. de Souza, G. C. Brandão, I. V. Rodrigues, W. G. Lima and D. C. Costa, Protective effect of *Baccharis trimera* extract on acute hepatic injury in a model of inflammation induced by acetaminophen. *Mediators Inflamm.*, **2014**, 196598(2014).
 13. J. Y. Moon, E. Y. Yim, G. Song, N. Lee and C. G. Hyun, Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants, *EurAsia J. BioSci.*, **4**, 41–53 (2010).
 14. L. Fan, M. Y. Zhang, Q. Z. Liu, L. T. Li, Y. Song, L. F. Wang, S. L. Zhang and J. Wu, Transferability of Newly Developed Pear SSR Markers to Other Rosaceae Species. *Plant Mol Biol Report.*, **31**, 1271–1282(2013).
 15. C. H. Lin, H. S. Chang, H. R. Liao, I. S. Chen and I. L. Tsai, Triterpenoids from the Roots of *Rhaphiolepis indica* var. tashiroi and Their Anti-Inflammatory Activity. *Int J Mol Sci.* **14(5)**, 8890–8898 (2013).
 16. C. H. Lin, H. S. Chang, C. H. Liao, T. H. Ou, I. S. Chen and I. L. Tsai, Anti-inflammatory Biphenyls and Dibenzofurans from *Rhaphiolepis indica*. *J Nat Prod.*, **73(10)**, 1628–1631(2010).
 17. J. L. Song, X. Zhao and Q. Wang, Protective effects of *Quercus salicina* on alloxan-induced oxidative stress in HIT-T15 pancreatic β cells. *Exp Ther Med.*, **5(3)**, 947–951(2013).
 18. J. I. Kim, H. H. Kim, S. Kim, K. T. Lee, I. H. Ham and W. K. Whang, Antioxidative compounds from *Quercus salicina* Blume stem. *Arch Pharm Res.* **31(3)**, 274–278(2008).
 19. S. M. Lee, M. K. Na, R. B. An, B. S. Min and H. K. Lee, Antioxidant activity of two phloroglucinol derivatives from

- Dryopteris crassirhizoma*. *Biol Pharm Bull*, **26(9)**, 1354-1356(2003).
20. Ateea A. Bellail, Omayma E. Shaltout, Mohammed M. Youssef and Ahmed M. A. El Gamal, Effect of Home-Cooking Methods on Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) Cultivars Grown in Egypt. *Food Nutr Sci*, **3**, 490-499(2012).
21. H. J. Jo, Y. S. Shin, G. N. Park and K. S. Chang, Analysis of anti-oxidant activity of medicinal plants according to the extracted parts, *Journal of Medicinal Plants Research*, **6(13)**, 4615-4624(2012).
22. L. Subedi, S. Timalseña, P. Duwadi, R. Thapa, A. Paudel and K. Parajuli, Antioxidant activity and phenol and flavonoid contents of eight medicinal plants from Western Nepal. *J Tradit Chin Med*, **34(5)**, 584-590(2014).
23. S. Mohan, K. Thiagarajan, R. Chandrasekaran and J. Arul, In vitro protection of biological macromolecules against oxidative stress and in vivo toxicity evaluation of *Acacia nilotica* (L.) and ethyl gallate in rats. *BMC Complement Altern Med*, **14**, 257(2014).
24. S. S. Kim, J. Y. Kim, N. H. Lee and C. G. Hyun, Antibacterial and anti-inflammatory effects of Jeju medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J Gen Appl Microbiol*, **54(2)**, 101-106 (2008).
25. K. L. Araújo, M. Magnani, J. A. Nascimento, A. L. Souza, P. S. Epaminondas, A. L. Souza, N. Queiroz and A. G. Souza, Antioxidant activity of co-products from guava, mango and barbados cherry produced in the Brazilian northeast. *Molecules*, **19(3)**, 3110-3119 (2014).
26. E. S. Al-Sheddi, N. N. Farshori, M. M. Al-Oqail, J. Musarrat, A. A. Al-Khedhairi and M. A. Siddiqui, *Portulaca oleracea* Seed Oil Exerts Cytotoxic Effects on Human Liver Cancer (HepG2) and Human Lung Cancer (A-549) Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev*, **16(8)**, 3383-3387 (2015).