

# 백작약(*Paeonia japonica*)의 항산화, 트롬빈 저해, 암전이 억제 및 암세포사멸 평가

김준호<sup>1</sup>, 김은정<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>상지대학교 정밀화학신소재학과, <sup>2</sup>상지대학교 임상병리학과

## Evaluation of Anti-oxidative, Anti-thrombin, Anti-invasive and Pro-apoptotic Activities of *Paeonia japonica*

Jun-Ho Kim<sup>1</sup> and Eun-Jung Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Fine Chemistry and New Materials, Sangji University, Wonju 26339, Korea

<sup>2</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, Sangji University, Wonju 26339, Korea

**Abstract** - *Paeonia japonica* is a perennial flowering plant used in traditional medicine therapy. The purpose of this study was to investigate the effect of water extract and solvent fractions obtained from *P. japonica* on anti-oxidative, anti-thrombin, anti-invasive and pro-apoptotic activities in YD-10B cells, human oral squamous carcinoma cell line. Water fraction revealed the highest extraction yield at 11.44% (w/w). Anti-oxidative activity was the highest in ethyl acetate fraction (85.13%). In the thrombin inhibitory activity test, ethyl fraction was the highest, with a value of 87.54%. Release and activation of MMP-2/pro-MMP-2 ratio in thrombin-treated YD-10B cells were significantly inhibited in the ethyl acetate fraction. At a concentration of 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , water extract and solvent fractions of *P. japonica* inhibited cell proliferation in YD-10B cells except water fraction. Pro-apoptotic effect on human oral squamous carcinoma cell using the Bax/Bcl-2 ratio analysis was higher in water extract than other fractions. These findings suggest that the ethyl acetate fraction of *P. japonica* potentiates a promising antioxidant, anti-thrombin and anti-invasive agents.

**Key words** - Anti-oxidative activity, Anti-thrombin activity, Anti-invasive activity, *Paeonia japonica*, Pro-apoptotic activity

### 서 언

현대인들은 환경오염, 스트레스, 운동부족 및 고령화로 인해 다양한 성인병에 노출되어 있다. 특히 종양은 한국인의 사망 원인으로 가장 큰 비율을 차지하고 있으며, 이를 극복하기 위해서는 치료와 함께 예방하는 것이 최선책이다. 현재까지 암 연구는 치료제 개발에 집중되어 왔지만, 최근 예방에 많은 관심이 증가하면서 암 예방 물질을 개발하기 위해, 부작용이 심한 기존 항암제를 대체할 수 있는 천연물의 생리활성 물질에 대한 관심이 증가되고 있다(Chen *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015; Jang *et al.*, 1997).

악성 종양의 원인 중 하나로 알려진 활성산소(Reactive oxygen species)는 대사과정과 면역과정 중에 생성되어 정상세포에 작용하여 암이나 노화세포로 발전시키는 것으로 알려져 있다. 이 활성산소에 수소를 제공하여 안정한 물질로 변화시키고, 자신은 안정한 라디칼 구조를 형성할 수 있는 물질이라면 우수한 항산화물질로서 암의 예방 물질로 이용될 수 있을 것이다. 이 같이 인체의 활성산소 양을 줄일 수 있는 항산화물질이 약용 식물과 버섯으로부터 발표되고 있다(Hong *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2017). 식물의 2차 대사 산물 중에는 다양한 약리효과를 나타내는 물질들이 알려지고 있으며, 식용 가능한 약용식물에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 한약재의 재료로 사용되고 있는 약용식물은 다양한 종류의 생리활성을 나타내는 천연물질을 함유하고 있는 것으로 새로운 치료제와 예방물질의 개발에 중

\*교신저자: jung0724@sangji.ac.kr

Tel. +82-33-738-7683

© 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회지에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

은 재료로 사용될 수 있을 것이다(Lee *et al.*, 2000).

암 침윤과 전이는 암세포에서 분비되는 기질 금속단백분해효소(Matrix metalloproteinases, MMPs)들의 활성을 통해 진행된다. 대표적인 기질 금속단백분해효소로는 MMP-2 (gelatinase A)와 MMP-9 (gelatinase B)이다. 이 중 MMP-2는 pro-MMP-2인 latent 형태로 합성되며, MT1-MMP에 의해 잘려 활성화된다고 알려져 왔으나, 최근에는 thrombin, factor Xa 등에 의해 서도 활성화된다는 보고도 있다(Koo *et al.*, 2009).

백작약(*P. japonica*)은 작약과(*Paeoniaceae*)의 작약속(*Paeonia*)에 속하는 다년생식물이며, 오랫동안 동양에서 한약 재료 사용되어 왔다(Kim and Shin, 2003). 백작약의 주요한 유효성분으로서 paeoniflorin에 대한 생리활성 연구가 많이 보고 되어오고 있으나 Jeong *et al.* (2003)은 백작약 에틸아세테이트와 물분획물에서 gallic acid와 catechin 성분이 강한 산화적 스트레스 억제 효과를 나타냄을 보고하였으며, 백작약의 조다당 분획물 처리로 대식세포의 nitric oxide (NO) 및 암세포성장 억제에 관여하는 사이토카인들의 높은 생성과 함께 마우스 림프종 세포주의 생존이 억제됨이 보고되었다(Park *et al.*, 2003). 백작약 에탄올 추출물에 의해 파골세포의 분화와 생성이 억제 되는 효과가 보고되었으며(Park *et al.*, 2015), 항진균(Seong, 2006), 간독성보호(Ko *et al.*, 2016)의 높은 효과도 알려져 있다. 백작약의 다양한 생리활성이 알려져 있지만 항암효과에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 극성이 큰 물을 추출용매로 백작약의 다양한 유효성분들을 추출하고자 하였으며, 또한 백작약의 물 추출물 및 유기용매 분획물에서 항산화, 트롬빈억제 효과와 종양형성과 종양전이 능력이 우수하다고 이미 밝혀진 인간구강암세포주를 사용하여 암세포 사멸 및 암전이 억제 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용한 백작약(*P. japonica*)은 경북 영천에서 생산한 것을 제천약초시장에서 구입하여 사용하였다. 생리활성 측정기에 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Thrombin (Sigma-Aldrich), Fibrinogen (Sigma-Aldrich), H-D-phenyl-alanine-L-pipecolyl-L-arginine-paranitroaniline dihydrochloride (Chromogenix S-2238; Chromogenix, Orangeburg, NY, USA)을 사용하였고 나머지 시약도 모두 일등급을 사용하였다.

### 백작약 물 추출물과 유기용매 분획물 조제

백작약의 일정량에 20배의 증류수를 가하고 환류, 냉각시키면서 3시간 동안 가열 추출 후 aspirator를 이용하여 감압여과(Whatman, No. 1)하고 동결 건조한 다음 물 추출물 시료로 사용하였다. 유기용매 분획물은 위의 Whatman No.1 여과지로 여과하여 얻은 여과액을 같은 부피의 헥산(hexane), 클로로포름( $\text{CHCl}_3$ ), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol)로 3번씩 추출 후 각각의 추출물을 농축시키고, 마지막에 남은 물을 동결 건조하여 물 분획물을 얻었다. 실험에 사용한 물 추출물과 분획물 시료는 50% Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich)와 증류수에 10 mg/ml로 준비하였다.

### 세포배양

YD-10B 세포, human oral squamous carcinoma cells는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank [KCLB], Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 세포는 RPMI-1640 (Gibco-BRL, Life technologies Inc., Grand Island, New York, USA)배지에 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL), 1% penicillin/streptomycin (Gibco-BRL)을 첨가하여 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  조건의 배양기에서 계대배양 하였다.

### 세포독성 측정

백작약 추출물에 따른 세포독성을 조사하기 위해 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 이용하여 측정하였다. YD-10B 세포를 96-well plate에 well (200  $\mu\text{l}$ )당  $2 \times 10^4$ 개의 수로 seeding하고 12시간 동안 배양한 후, 추출물 농도를 0, 30, 60, 120, 및 240  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 처리하였다. 그리고 추가적으로 37°C 배양기에서 24시간 그리고 48시간 동안 반응시킨 후, CCK-8 용액을 세포배양액에 10  $\mu\text{l}/\text{well}$ 을 첨가하고 1시간 동안 37°C 배양기에서 반응하였다. 반응 후, microplate reader (Molecular Devices, Sunnydale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 전자공여능 측정

Blois (1958) 및 Kim *et al.* (1997)의 방법에 따라 준비한 백작약 물 추출물이나 유기용매 분획물 적정 희석액 0.4 ml를 시험관에 넣고,  $1 \times 10^{-4}$  M의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)-ethanol 용액 5.6 ml를 가하여 6 ml이 되도록 하였다. 이 혼합액을 4분간 반응시키고 다시 여과한 다음, 총 반응시간이 10분이 되면 525 nm에서 흡광도를 측정하였다(UV-1201; Shimadzu).

전자공여능은 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{전자공여능} = [1 - (\text{Optical Density (O.D.)}_{\text{시료}} / \text{O.D.}_{\text{증류수}})] \times 100$$

### 트롬빈 저해활성 측정

트롬빈 저해 활성은 Doljak *et al.* (2001)의 방법을 이용하여 측정하였다. 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 150 mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin을 포함하는 HBSA (Hank's Hepes buffer containing BSA) 완충용액 (pH 7.5) 40  $\mu$ l에 트롬빈 용액(0.5 NIH units/ml) 50  $\mu$ l를 첨가한 후 혼합하였다. 준비한 백작약 물 추출물이나 유기용매 분획물(10 mg/ml) 10  $\mu$ l를 첨가하고 실온에서 15 분간 incubation 후, H-D-phenylalanine-L-pipecolyl-L-arginine-paranitro aniline dihydrochloride를 이용하여 준비한 기질 용액(0.5 mM) 50  $\mu$ l을 가하고 5분 동안 incubation시킨 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다(UV-1601PC; Shimadzu, Kyoto, Japan). 트롬빈 활성 저해율은 다음 식에 의해 산출하였으며, 사용한 흡광도는 대조구의 흡광도를 제외한 수치를 이용하였다.

$$\text{저해율(\%)} = [1 - (\text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{시료 무첨가구의 흡광도})] \times 100$$

### Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

세포로부터 TRIzol 시약(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 1  $\mu$ g의 RNA를 가지고 ReverTra ACE PCR RT Master Mix Kit (TOYOBO Co., Osaka, Japan)을 이용하여 PCR를 수행하였다. 본 실험에서는 Bcl-2, Bax 및 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers (Table 1)을 사용하였고, Housekeeping 유전자인 GAPDH 유전자를 internal control로 사용하였다. 증폭된 PCR 생성물은 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에 전기영동 하여 UV light상에서 확인하였다.

Table 1. Primers for RT-PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	PCR product size (bp)
Bcl-2	F: GGTGCCACCTGTGGTCCACCTG R: CTTCAGTTGTGGCCAGATAGG	60	459
Bax	F: ATGGACGGTCCGGGGAGCAGC R: CCCAGTTGAAGTTGCCGTCAG	60	323
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGT R: GAAGATGGTGATGGGATTTC	58	226

### Gelatin Zymography

40  $\mu$ g/ml 농도의 백작약 추출물 및 분획물과 2.5 Unit 농도의 Thrombin을 단독 또는 동시에 처리된 혈청 없는 배지에서 YD-10B ( $5 \times 10^5$ ) 세포를 24시간 동안 배양한 후, 배지를 모아 Centriprep YM-10 (Millipore, Billerica, MA, USA)을 사용하여 농축하였다. 20  $\mu$ g 농도의 농축된 단백질은 non-reducing sample buffer (0.5 M Tris-Cl pH 6.8, 5% SDS, 20% glycerol, 1% bromphenol blue)와 함께 혼합하여 0.1% gelatin이 포함된 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 전기영동 하였다. 전기영동 후, washing buffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5% Triton X-100, 1.0 uM ZnCl<sub>2</sub>)로 SDS를 제거하고 incubation buffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>)로 37°C에서 18시간 동안 반응하였다. Gel은 Coomassie Brilliant Blue (7% glacial acetic acid, 40% methanol, 0.25% coomassie blue)로 1시간 동안 염색한 후, destaining solution (7% glacial acetic acid, 40% methanol)으로 탈색하여 white band를 확인 하였다.

### 통계 분석

항산화 및 트롬빈억제 효과 분석은 Instat™ statistical software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)를 사용하여 분산분석(ANOVA)를 실시하였다. 세포독성효과, RT-PCR 그리고 gelatinase 활성 분석은 Student's *t*-test를 실시하였다. 실험결과는 3회 반복 실험을 통하여 mean  $\pm$  SD로 나타내었으며, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 유의한 결과를 얻었다( $p < 0.05$ ).

## 결과 및 고찰

### 용매별 분획물의 수득율

백작약 300 g을 열수추출 후 여과한 용액을 동결 건조한 결과

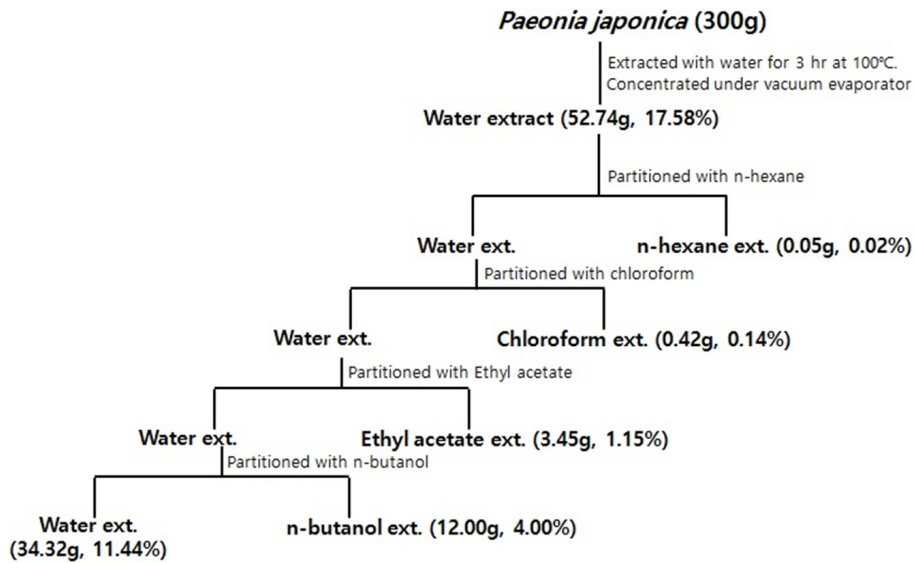


Fig. 1. The fraction yields of *P. japonica* extract. Fraction yields were described as the percent of dry substance of fractions based on the dry substance *P. japonica*. The percentage yield of water extract was 17.58% (w/w).

52.74 g의 물 추출물을 얻었다. 또한 이 여과한 용액을 다양한 종류의 유기용매를 이용하여 추출한 분획물의 수득율을 측정하였다. 그 결과 헥산 분획물이 0.02%, 클로로포름 분획물 0.14%, 에틸아세테이트 분획물 1.15%, 부탄올 분획물 4.00%, 물 분획물 11.44%로 물 분획물의 수득율이 가장 높았다(Fig. 1).

### 항산화 효과

항산화 활성을 알아보기 위하여 DPPH radical 소거능력을 이용하여 백작약 물 추출물과 유기용매 분획물의 활성산소 제거능력을 측정하였다. 백작약 물 추출물 및 유기용매 분획물들의 시료 농도는 0.66 mg/ml로, 헥산, 클로로포름, 물 분획물 및 물 추출물에서 6.12%, 12.23%, 13.67% 및 18.63%로 낮은 항산화 활성을 보였으며, 부탄올 분획물이 40.01%의 항산화 활성을 나타내었고, 에틸아세테이트 분획물이 85.13%의 가장 높은 활성을 나타냈다(Fig. 2). 이는 100 µg/ml 농도의 백작약 에틸아세테이트 분획물에서 92% 이상의 DPPH라디칼 소거활성을 나타내는 것으로 이미 보고된 Jeong *et al.* (2003)의 연구 결과를 뒷받침하고 있다.

### 트롬빈 저해활성

트롬빈(thrombin)은 혈액응고과정에서 가장 중요한 필수효소이다. 이 트롬빈의 작용에 의해 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 혈전이 형성된다. 혈관계 질환의 주 원인 중 하나로 알려진

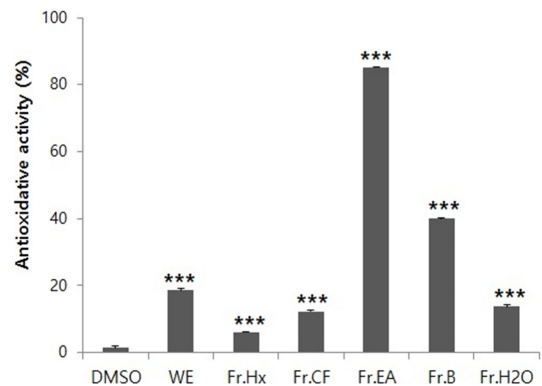


Fig. 2. Anti-oxidative activities of water extract and solvent fractions obtained from a *P. japonica* by DPPH assay (F-value 21405.09; \*\*\* $p < 0.001$ ). WE: water extract, Fr.Hx: Hexane fraction, Fr.CF: Chloroform fraction, Fr.EA: Ethyl acetate fraction, Fr.B: Butanol fraction, Fr.H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O fraction.

혈전의 형성을 억제하기 위해 부작용이 적은 약용식물로부터 트롬빈저해제를 개발하기 위한 연구들이 진행되고 있다(Kim *et al.*, 2001; Freedman *et al.*, 2005). 본 연구에서는 백작약 물 추출물과 유기용매 분획물들의 thrombin 저해 활성을 측정하여 혈관계 질환의 예방 물질로 사용 가능한지 조사하였다. 그 결과 에틸아세테이트 분획물이 87.54%의 가장 높은 저해활성을 나타냈으며, 부탄올 분획물은 80.58%의 트롬빈 저해활성을 나타냈다(Fig. 3). 이는 Kim *et al.* (2008)의 에틸아세테이트 분획

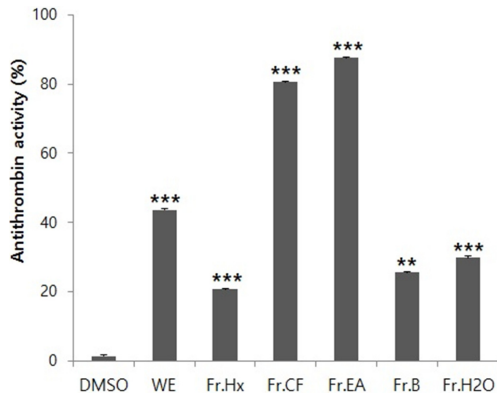


Fig. 3. Thrombin inhibitory activities of water extract and solvent fractions obtained from a *P. japonica* (F-value 2678.26;  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ). WE: water extract, Fr.Hx: Hexane fraction, Fr.CF: Chloroform fraction, Fr.EA: Ethyl acetate fraction, Fr.B: Butanol fraction, Fr. H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O fraction.

물과 부탄올 분획물에서 항트롬빈 효과가 높은 것으로 보고된 결과와 유사함을 보였다.

### 세포독성 조사

YD-10B 세포에서 백작약 물 추출물과 유기용매 분획물을 0, 30, 60, 120 및 240  $\mu\text{g/ml}$ 의 다양한 농도로 함께 처리하여 24, 48시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 조사하였다. 30 그리고 60  $\mu\text{g/ml}$  농도로 48시간 동안 처리한 후 대조군과 비교한 결과, 물 추출물에서는 96.78% 그리고 88.44%, hexan 분획물은 81.59% 그리고 76.84%, 클로로포름 분획물은 84.71% 그리고 70.82%, 에틸아세테이트 분획물은 80.84% 그리고 53.90%, 부탄올 분획물은 86.27% 그리고 75.26% 그리고 물 분획물은 96.84% 그리고 95.24%의 생존율을 보였다. 이와 같은 결과를 통해 백작약 추출물 및 모든 분획물은 60  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지는 에틸아세테이

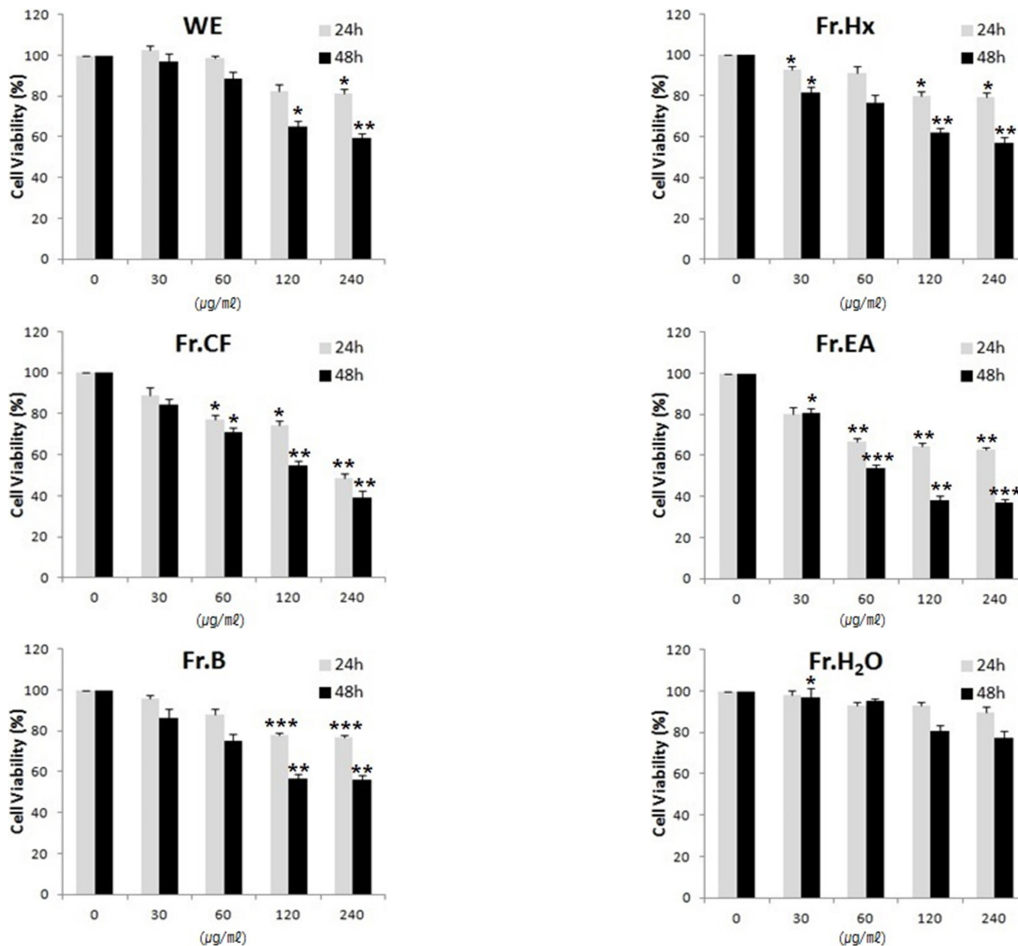


Fig. 4. *In vitro* cytotoxicity effects of water extract and solvent fractions obtained from a *P. japonica* in YD-10B cells. YD-10B cells were treated with solvent fractions obtained from *P. japonica* at different concentrations for 24h and 48 h. Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ). WE: Water extract. Fr.Hx: Hexane fraction. Fr.CF: Chloroform fraction. EA: Ethyl acetate fraction. Fr.B: Butanol fraction. Fr.H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O fraction.

트 분획물을 제외하고는 거의 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 또한 120  $\mu\text{g/ml}$  고농도로 48시간동안 처리한 결과에서는, 물 추출물 64.92%, hexan 분획물 62.24%, 클로로포름 분획물 55.03%, 에틸아세테이트 분획물 38.23%, 부탄올 분획물 56.64% 그리고 물 분획물 80.73%의 생존율을 보여 물 분획물을 제외하고는 대부분 추출 분획물들에서 구강암세포 증식억제활성을 나타냈다(Fig. 4).

### MMP-2와 MMP-9의 발현 및 활성을 통한 암전이 억제 효과

본 연구에서는 백작약 추출물 및 분획물들의 YD-10B 인간구강암세포에서 암 침윤 및 MMPs 활성 증가에 미치는 효과를 조사하였다. 이를 위하여 40  $\mu\text{g/ml}$  농도의 백작약 추출물 및 분획물과 2.5 unit 농도의 thrombin을 단독 또는 동시에 처리하여 YD-10B세포를 혈청 없는 배지에서 배양하였다. 그리고 24시간 동안 배양한 후, 배지의 상층액은 gelatin zymography법을 통해 MMP-2/pro-MMP-2 및 MMP-9 단백질의 활성을 분석하였다. 그 결과는 Fig. 5에서 나타난 것처럼 thrombin를 단독 처리한 세포에서는 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해 MMP-9의

변화는 없었지만 MMP-2/pro-MMP-2 단백질 활성이 뚜렷하게 증가하였다. 그리고 thrombin과 백작약 추출물 및 분획물을 동시 처리한 세포에서는 에틸아세테이트 분획물이 thrombin에 의해 유도된 MMP-2/pro-MMP-2 단백질 활성이 가장 뚜렷하게 억제하였다.

### Bax와 Bcl-2의 발현을 통한 암세포 사멸 효과

Apoptosis에 대한 회피는 암의 가장 큰 특징이다. 세포사멸은 프로그래밍된 세포죽음의 한 형태로, 정상적으로 개체의 발생과 기능을 조절하는데 관여하며, 이 과정의 조절이상은 암을 비롯한 다양한 질환을 일으킨다. 세포사멸을 조절하는 몇 가지 단백질들 중에서 가장 대표적인 유전자로 pro-apoptotic한 세포사멸을 유도하는 Bax와 세포사멸을 억제하는 anti-apoptotic한 기능을 나타내는 Bcl-2가 가장 대표적인 유전자들이다(Zang *et al.*, 2000; Mohan S *et al.*, 2012; Yip and Reed, 2008). 그러므로 본 연구에서는 YD-10B세포에서 백작약 추출물 및 분획물들에 의한 Bax와 Bcl-2 유전자들의 발현을 조사하고 Bax/Bcl-2 ratio를 통해 구강암세포 사멸 효과를 조사하였다. 그 결과, 120

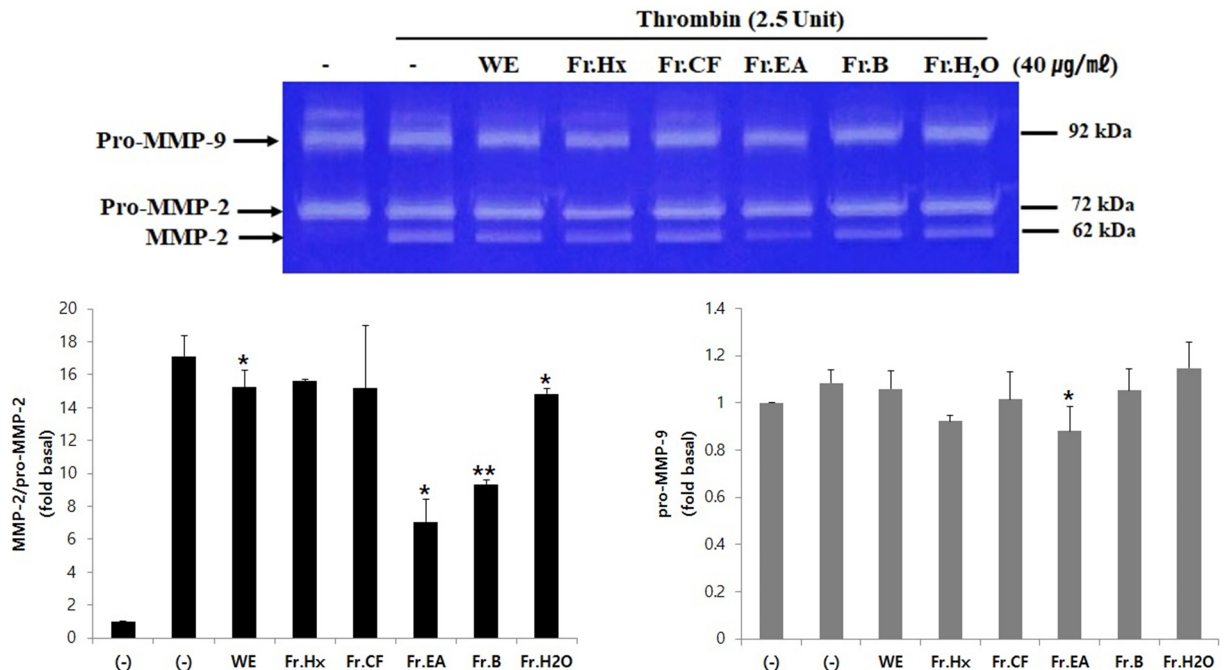


Fig. 5. MMP-2/9 activity of water extract and solvent fractions obtained from a *P. japonica* in thrombin-treated YD-10B cells. YD-10B cells were treated with the indicated concentration (40  $\mu\text{g/ml}$ ) of solvent fractions obtained from a *P. japonica* 2 h prior to thrombin (2.5  $\mu\text{M}$ ) stimulation. 24 h later, activities of MMP-2/9 protein in the conditioned media were determined by gelatin zymography. The relative invasion activity of MMP-2/9 protein were analyzed the band intensity using a GelQuant.NET program (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). WE: Water extract. Fr.Hx: Hexane fraction. Fr.CF: Chloroform fraction. EA: Ethyl acetate fraction. Fr.B: Butanol fraction. Fr.H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O fraction.



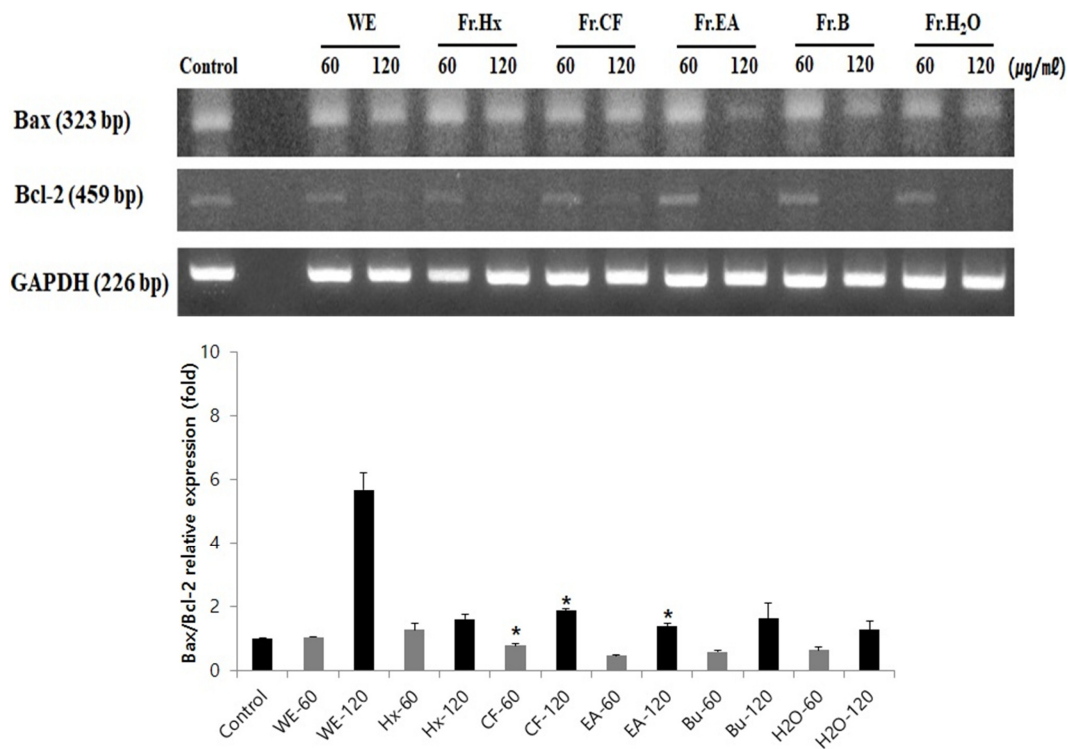


Fig. 6. Bax/Bcl-2 relative expression of water extract and solvent fractions obtained from a *P. japonica* in YD-10B cells. YD-10B cells were treated with the indicated concentration (60, 120  $\mu\text{g/ml}$ ) of solvent fractions obtained from a *P. japonica* for 48h. The levels of Bax and Bcl-2 mRNA expressions were determined by RT-PCR. GAPDH were used as the internal control. The relative expressions of Bax/Bcl-2 mRNA were analyzed the band intensity using a GelQuant.NET program (\* $p < 0.05$ ). WE: Water extract. Fr.Hx: Hexane fraction. Fr.CF: Chloroform fraction. EA: Ethyl acetate fraction. Fr.B: Butanol fraction. Fr.H<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O fraction.

$\mu\text{g/ml}$  농도로 48시간 처리했을 때 물 추출물이 대조군에 비해 5배 이상 가장 높은 세포사멸 효과를 보였다(Fig. 6).

## 적 요

백작약 물 추출물과 유기용매 분획물들의 항산화 활성, 트롬빈 억제 및 구강암세포주에서의 암전이 억제 및 암세포 사멸능을 확인하였다. 에틸아세테이트 분획물이 85.13%의 높은 항산화 활성과 87.54%의 높은 트롬빈저해 효과를 나타냈으며, 또한 구강암세포주에서도 트롬빈 처리에 의해 활성화된 MMP-2/pro-MMP-2이 높은 암전이 억제 활성을 나타냈다. 그리고 구강암세포주에 대한 세포사멸 효과는 물 추출물이 5배 이상의 높은 능력을 보였다. 이와 같은 연구 결과를 바탕으로 백작약 에틸아세테이트 분획물은 새로운 항산화제, 트롬빈억제제 및 암전이억제제의 개발을 위한 우수한 천연물 소재 후보 물질로서의 가능성을 제시하고 있다.

## References

- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26:1199-1200.
- Chen, Y.H., J.Y. Wang, B.S. Pan, Y.F. Mu, M.S. Lai, E.C. So, T.S. Wong and B.M. Huang. 2013. Cordycepin enhances cisplatin apoptotic effect through caspase/MAPK pathways in human head and neck tumor cells. *Oncotargets Ther.* 6:983-998.
- Doljak, B., M. Stegnar, U. Urleb, S. Kreft, A. Umek, M. Ciglaric, B. Strukelj and T. Popovic. 2001. Screening for selective thrombin inhibitors in mushrooms. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 12:123-128.
- Hong, K.H., B.Y. Kim and H.K. Kim. 2004. Analysis of nutritional components in *Pleurotus ferulea*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36(4):563-567 (in Korean).
- Jang, M., L. Cai, G.O. Udeani, K.V. Slowing, C.F. Thomas, C.W. Beecher, H.H Fong, N.R. Farnsworth, A.D. Kinghorn.

- R.G. Mehta, R.C. Moon and J.M. Pezzuto. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:218-220.
- Jeong, I.Y., J.S. Lee, H. Oh, U. Jung, H.R. Park and A.K. Jo. 2003. Inhibitory effect of hot-water extract of *Paeonia japonica* on oxidative stress and identification of its active components. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32:739-744.
- Kim, K.H., H.J. Lee, Y.S. Jang, D.K. Kim, B.S. Shim, K.H. Cho, S.G. Ko, K.S. Ahn and S.H. Kim. 2008. Blockade of glycoprotein IIb/IIIa mediates the antithrombotic activity of butanol fraction of *Actinostemma lobatum* Maxim. *J. Ethnopharmacol.* 116:431-438.
- Kim, M.Y., B.Y. Yoon and K.S. Ko. 2015. Study on cosmeceutical activities of *Paeonia japonica* extracts. *J. Kor. Soc. Beauty Cultural Arts* 4:23-30.
- Kim, S.M., J.H. Park, H.O. Boo, S.G. Song and H.Y. Park. 2017. *In vitro* composition of biological activities of solvent fraction extracts from *orostachys japonicas*. *Korean J. Plant Res.* 30:133-143.
- Kim, T.J. and J.Y. Shin. 2003. Korean oriental medicine keeping with our herbal. 1<sup>st</sup> ed. Seoul:Liyou. pp. 154-157.
- Kim, Y.J., C.K. Kim and Y.J. Kwon. 1997. Isolation of anti-oxidative components of *Perillae semen*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29:38-43.
- Ko, H.L., E.H. Jung, D.H. Jung, J.K. Kim, S.K. Ku, Y.W. Kim, S.C. Kim, R. Zhao, C.W. Lee and I.J. Cho. 2016. *Paeonia japonica* root extract protects hepatocytes against oxidative stress through inhibition of AMPK-mediated GSK3 $\beta$ . *J. Funct. Foods.* 20:303-316.
- Koo, B.H., M.Y. Park, O.H. Jeon and D.S. Kim. 2009. Regulatory mechanism of matrix metalloproteinase-2 enzymatic activity by factor Xa and thrombin. *J. Biol. Chem.* 284:23375-23385.
- Lee, H.N., H.Y. Jang, H.J. Kim, S.A. Shin, G.S. Choo, B.K. Park, B.S. Kim and J.Y. Jung. 2015. Induction of apoptosis by piceatannol in YD-15 human oral cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44:975-982.
- Lee, J.M., S.H. Kim and H.M. Kim. 2000. Use of oriental herbs as medicinal food. *Food Industry and Nutrition* 5:50-56.
- Mohan, S., S.I. Abdelwahab, B. Kamalidehghan, S. Syam, K.S. May, N.S.M. Harmal, N. Shafiqiyaz, A.H.A. Hadi, N.M. Hashim and M. Rahmani. 2012. Involvement of NF-kB and Bcl-2/Bax signaling pathways in apoptosis of MCF-7 cells induced by a xanthine compound pyranocycloartobioxanthine A. *Phytomedicine* 19:1007-1025.
- Oh, H., H.R. Park, I.Y. Jeong, S.H. Kim and S.K. Jo. 2002. Protective effects of *Paeonia japonica* against radiation-induced damage. *J. Korea Asso. Radiat. Prot.* 27:181-188.
- Park, B., G.H. Park, D.R. Gu, W. Ko, Y.C. Kim and S.H. Lee. 2015. Inhibitory effect of *Paeoniae Radix Alba* ethanol extract on osteoclast differentiation and formation. *J. Physiol. & Pathol. Korean Med.* 29:51-57.
- Park, H.R., U. Jung, I.Y. Jeong, S.T. Yee and S.K. Jo. 2003. Inhibition of tumor growth through macrophage activation by polysaccharide fraction from *Paeonia japonica* (PJ-P). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32:149-154.
- Seong, I. 2006. Antifungal activity of the extract from *Paeonia japonica* against *candida albicans*. *Korean J. Med. Mycol.* 11:19-26.
- Yip, K.W. and J.C. Reed. 2008. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 27:6398-6406.
- Yun, Y.P., J.H. Do, S.R. Ko, S.Y. Ryu, J.H. Kim, H.C. Song, Y.D. Park, K.S. Ahn and S.H. Kim. 2001. Effects of Korean red ginseng and its mixed prescription on the high molecular weight dextran-induced blood stasis in rats and human platelet aggregation. *J. Ethnopharmacol.* 77:259-264.
- Vitseva, O., S. Varghese, S. Chakrabarti, J.D. Folts and J.E. Freedman. 2005. Grape seed and skin extracts inhibit platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 46:445-451.
- Zang, L., J. Tu, B.H. Park, K.W. Kinzler and B. Vogelstein. 2000. Roles of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 290:989-992.

(Received 18 August 2017 ; Revised 28 October 2017 ; Accepted 20 November 2017)