

Biological Activity of *Oenothera Biennis* Seed Extracts

Hyun-Dong Cho¹, Du-Hyun Kim², Min-Geun Kim², Yong-Suk Lee³ and Kwon-Il Seo^{3*}

¹Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

²Department of Life Resources Industry, Dong-A University, Busan 49315, Korea

³Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 49315, Korea

Received May 29, 2018 / Revised July 19, 2018 / Accepted September 14, 2018

In the current study, comparisons of *Oenothera Biennis* seed extracts with water, ethanol, methanol, and 70% ethanol in their total polyphenolics contents, anti-oxidant, anti-neurotoxicity, anti-cancer, and immune-modulatory activities were investigated. Compared with other extracts, those concentrations of total phenolics and flavonoids were the highest in MeOH extract (31.90 mg GAE/g and 20.66 mg QE/g). The radical scavenging and reducing power activities were dose-dependently increased by treatment of *O. Biennis* seed water, EtOH, MeOH, and 70% EtOH extracts. Furthermore, pretreatment of water, EtOH, and MeOH extracts significantly reduced glutamate-induced cytotoxicity in HT22 hippocampal neuron cells. In the case of cancer cells, MeOH extracts showed lower IC₅₀ values in HepG2 (74.21 µg/ml), A549 (188.24 µg/ml), MCF-7 (186.42 µg/ml), and B16 (101.80 µg/ml) than other extracts, where those water (101.96 µg/ml) and EtOH (788.39 µg/ml) extracts showed the lowest IC₅₀ activity in HT-29 and PC-3 cells, respectively. *O. Biennis* seed extracts did not show any cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages at the concentration of 1-10 µg/ml, whereas 70% EtOH extract dose-dependently enhanced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. Overall, we evaluated that various bioactive potentials of *O. Biennis* seed extracts which would relate with phenolic compounds abundance, thus these can be useful to future developments as functional food ingredients and natural medicines.

Key words : Anti-cancer, anti-neurotoxicity, anti-oxidant, immune-modulatory activity, *Oenothera Biennis* seed extracts

서 론

최근 한국 경제는 1인당 국민소득 3만불 달성을 바라보고 있을 정도로 급격한 경제성장이 이루어 졌으며 이로 인한 환경오염, 고령화 및 서구화된 식생활 등의 문제점으로 인해 다양한 만성질환의 발병이 증가하고 있는 추세이다. 특히, 암, 신경질환, 당뇨, 비만, 고혈압, 동맥경화와 같은 고위험성 만성질환들은 체내 과도하게 생성된 활성산소에 의한 산화적 스트레스가 주요한 발병원인으로 알려져 있다[32]. 인체 내에서 에너지 생산의 부산물로 생성된 활성산소는 체내 항산화 기전에 의해 대부분이 소멸되지만 신경계에서 제거되지 못한 활성산소종으로 인한 산화적 스트레스는 신경손상을 유발하여 뇌졸중, 간질, 알츠하이머병, 파킨슨병 등과 같은 신경질환을 유발한다[6, 9]. 또한, 과도한 활성산소의 축적은 정상세포 및 DNA

손상을 유발하고 감염, 노화, 유전자 돌연변이 등을 거쳐 정상세포를 암세포로 변화시킬 수 있다[21, 24, 33]. 이때 대식세포의 산화질소(nitric oxide, NO) 생성은 nuclear factor (NF)-κB 경로의 활성화를 통해 면역 활성을 증진시키고 산화적 손상에 의한 인체 암세포의 증식과 발전을 억제하는데 도움을 줄 수 있는 것으로 알려져 있다[35].

활성산소종(reactive oxygen species)에 의한 체내 산화적 손상을 억제하기 위해 식품학적 측면에서 다양한 항산화 물질에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 대표적인 식품 내 천연 항산화 물질로 폴리페놀류, 플라보노이드류, 토코페롤, 비타민 및 셀레늄 등을 들 수 있으며, 그 중 다양한 구조와 분자량을 가진 폴리페놀 화합물은 천연물에 널리 분포하는 2차 대사산물로써 플라보노이드류(flavonoids), 페놀산류(phenolic acids), 리그난류(lignans), 스틸벤류(stilbenes) 등을 포함하며 대부분 단백질, 효소단백질 또는 기타 거대분자와 결합하는 반응성 하이드록실기(hydroxyl group)를 갖는 방향족 고리구조를 가진다. 최근 연구에 따르면 식물체 내 다양한 폴리페놀 화합물이 암, 당뇨, 심혈관계 질환, 뇌졸중, 알츠하이머 등과 같은 만성질환의 예방과 억제에 관련이 있는 것으로 확인되었다[8, 28]. 이외에도 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) 등과 같은 합성 항산화제도 상업용 식품첨가물로 사용되어 왔지만 안전성에 대한 문제로

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7565, Fax : +82-51-200-6536

E-mail : kseo@dau.ac.kr

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.

합성 항산화제의 사용량이 법적 규제되고 있는 실정이며, 독성이 적고 효능이 우수한 토코페롤류와 같은 천연 항산화제는 추출비용이 비싸다는 단점이 있다[19, 27]. 따라서 천연물 의약품이나 기능성 식품소재로서 개발가능성이 높은 천연물 소재의 항산화 활성 및 생리활성 탐색에 대한 관심이 꾸준히 증가하고 있다.

식용 가능한 식물의 종자는 식량수급이라는 식품으로서의 가치 외에 민간요법으로 질병 예방 및 치료목적으로 사용되고 있으며 약리학적 효능을 검증하기 위한 연구도 다방면으로 진행되고 있다[20]. 많은 연구에서 식물체 내 다양한 물질들이 항산화, 항암 및 항염증 등과 같은 다양한 생리활성 효능을 나타낸다고 보고하였다[8, 14, 18, 28]. 또한, Gan 등[10]에 의하면 식용으로 널리 이용하는 종자와 새싹 채소에서 뛰어난 항산화 효능 및 풍부한 폴리페놀 함량을 보였으며 기능성 식품자원으로서 영양학적, 약리학적 가치가 높다고 보고하였다. 달맞이꽃(*Oenothera biennis*)은 2년생 초본식물로 남아메리카가 원산지이며 현재 귀화식물로 전국의 산, 들에서 서식을 하고 있다[22]. 달맞이꽃 추출물에는 tannin, 당류 및 다가불포화 지방산과 kaempferol 유사체, quercetin 유사체, ellagic acid, methyl gallate, catechin, gallic acid 및 galloylglucose 등과 같은 폴리페놀 성분이 함유되어 있는 것으로 보고되었다[11, 16, 30]. 한방에서는 대소초라 하여 주로 잎이나 뿌리를 해열 및 소염제로 사용을 하고 있으며 종자의 경우 기름을 짜서 약용 및 식용으로 사용하고 있다[35]. 식품의약품안전처에 식용 가능한 식품 소재로 등재된 달맞이꽃 종자는 오메가6 지방산의 일종인 감마리놀렌산(γ -linolenic acid), 리놀산(linoleic acid) 및 올레익산(oleic acid) 등 불포화지방산뿐만 아니라 플라보노이드류, 폴리페놀화합물이 다량으로 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[13, 34]. 하지만 달맞이꽃 종자 추출물의 생리활성 효능에 대한 기초자료는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 추출 용매를 달리한 달맞이꽃 종자 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 분석하고 항산화, 신경세포 보호, 항암 및 대식세포 면역 활성에 대한 효능을 비교하였으며 이를 기능성 식품소재 및 가공품 개발을 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

달맞이꽃 종자 추출물의 제조

실험에 사용된 달맞이꽃 종자는 2018년 1월 국립수목원에서 분양 받았으며 4°C에서 냉장보관 후 추출 당일 건조 및 분쇄한 분말을 사용하였다. 추출물 제조는 종자분말 2 g에 20 배(w/v)중량의 추출용매(40 ml)와 혼합하여 10시간씩 2회 실온에서 추출하였으며, 추출용매는 물(water), 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 70% 에탄올(70% EtOH)을 사용하였다. 추출용액은 여과 후 감압 농축을 통해 건조하였으며 건조된 시료

는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma chemical Co., MO, USA)를 이용하여 100 mg/ml의 농도로 stock solution을 각각 만들어 희석하여 사용하였다. 추출 수율은 물, 에탄올, 메탄올 및 70% 에탄올 추출물 각각 5.37%, 19.28%, 17.36%, 8.90%로 확인되었다.

추출물 내 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다[31]. 증류수 45 μ l에 1,000 μ g/ml로 희석시킨 달맞이꽃 종자 추출물 5 μ l을 넣고 2 N Folin-Ciocalteu 시약(Sigma chemical, Co., St Louis, MO, USA) 5 μ l를 넣은 후 5분간 반응시키고 7% Na₂CO₃ (Junsei Chemical, Co., Ltd, Japan) 100 μ l를 가하여 1시간 동안 암소에서 반응시켰다. 흡광도 측정은 760 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였으며, gallic acid (Sigma chemical Co., St Louis, MO, USA)를 희석하여 검량선을 만들어, 이를 바탕으로 추출물 내 총 폴리페놀 함량을 분석하였다.

추출물 내 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Graham의 방법을 변형하여 측정하였다[12]. 1,000 μ g/ml로 희석시킨 달맞이꽃 종자 추출물 20 μ l에 10% diethylene glycol (Sigma chemical Co., St Louis, MO, USA) 200 μ l와 1 N NaOH (Daejung Chemical Co, Ltd, Korea) 20 μ l를 넣고 혼합한다. 그 후 37°C에서 1시간 반응을 시키고 흡광도 측정은 420 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였으며, quercetin (Sigma chemical Co., St Louis, MO, USA)를 희석하여 검량선을 만들어, 추출물 내 총 플라보노이드 함량을 분석하였다.

DPPH 라디칼 소거능을 통한 항산화 활성 측정

DPPH 분자는 자주색을 띠는 질소 중심의 자유라디칼로서, 라디칼 전자의 비 편재화에 의해 안정화된 상태로 존재한다. 에탄올에 용해된 DPPH 분자는 517 nm에서 최대 흡광도를 나타내며 시료와 혼합 시 시료의 수소원자 공여정도에 따라서 열은 황색으로 변화되는 것으로 알려져 있다[25]. DPPH radical 소거활성은 Blois 방법을 변형하여 사용하였다[3]. α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazine (DPPH)의 환원성을 이용한 것으로 250, 500, 1,000 μ g/ml로 희석시킨 달맞이꽃 종자 추출물 40 μ l에 DPPH 200 μ l를 처리하였으며, 양성 대조군(positive control)인 0.1% dibutylated hydroxytoluene (BHT)와 0.1% α -tocopherol 용액에도 추출물과 동일하게 DPPH를 처리한 후 30분간 암소에서 반응시켰다. 517 nm에 UV/Vis-spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 대조군은 추출물 대신 에탄올을 첨가하여 대조군에 대한 흡광도의 감소비율을 나타냈다.

$$\text{Hydrogen donating activity(\%)} = \frac{((1 - \text{Sample O.D.}) / \text{Control O.D.}) \times 100}$$

ABTS^{•+} radical 소거능을 통한 항산화 활성 측정

ABTS^{•+} radical 소거능은 Biglari 등의 방법을 변형하여 측정 하였다[2]. 7.4 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)는 2.6 mM의 potassium peroxodisulfate와 혼합한 후 23°C의 암소에서 16시간 동안 반응시켰다. ABTS 용액의 농도는 732 nm에서 흡광도 측정값이 0.700±0.03 정도가 되도록 희석하였다. 250, 500, 1,000 µg/ml로 희석시킨 달맞이꽃 종자 추출물 100 µl과 ABTS 용액 3.9 ml을 혼합한 후 23°C에서 6분간 암소에서 반응시키고 732 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan)로 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 0.1% BHT와 0.1% α-tocopherol을 사용하였다. ABTS radical 소거능은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Scavenging activity(\%)} = \frac{((\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}) / \text{Control O.D.}) \times 100}$$

환원력 측정을 통한 항산화 활성 측정

시료의 환원력은 Yildirim 등의 방법을 변형하여 측정하였다[36]. 250, 500, 1,000 µg/ml로 희석시킨 달맞이꽃 종자 추출물 50 µl에 phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) 250 µl과 potassium ferricyanide (1%, w/v) 250 µl를 첨가하여 섞은 후, 50°C로 유지하면서 20분간 반응시켰다. 반응액에 250 µl의 trichloroacetic acid (10%, w/v)를 첨가한 후 10,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상층액의 250 µl를 well plate에 담고 250 µl 증류수와 50 µl의 FeCl₃ (0.1%, w/v)을 첨가하여 700 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan)로 흡광도를 측정하였다.

세포 배양 및 조건

본 실험에 사용한 세포는 한국 세포주은행(KCLB)에서 분양 받은 HepG2 (human liver cancer cell), The Global Bioscience Center (ATCC)에서 분양 받은 MCF-7 (human breast cancer cell), A549 (human lung cancer cell), B16 (mouse melanoma cell), HT-29 (human colon cancer cells), PC-3 (human prostate cancer cell) 및 RAW 264.7 (mouse macrophage), 전남 천연자원연구원에서 배양 받은 HT-22 (mouse hippocampal neuronal cell)를 사용하였다. HepG2, MCF-7, A549, B16, HT-29, PC-3 및 HT-22 세포는 100 unit/ml의 Antibiotic Antimycotic (GIBCO®/ Invitrogen™, Gran Island, NY, USA)와 10% Fetal Bovine Serum (FBS)가 첨가된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하여 실험에 사용하였으며, MCF-7, A549 및 RAW 264.7 세포는 100 unit/ml의 Antibiotic Antimycotic과 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640

(GIBCO®/ Invitrogen™, Gran Island, NY, USA)을 사용하여 위와 같은 조건에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 달맞이꽃 종자 추출물의 신경세포 손상 보호효과를 알아보기 위해 HT-22 세포를, 암세포 증식억제 효능을 판단하기 위해 HepG2, MCF-7, A549, B16, HT-29 및 PC-3 세포를, 대식세포 면역 활성을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포를 사용하였다.

신경세포 보호효과

신경세포 보호효과 측정은 HT-22를 2×10⁴ cells/ml가 되도록 희석하여 96 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하고 25, 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 희석한 달맞이꽃 종자 추출물을 90분간 처리 후 6 mM의 glutamic acid (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 12시간 처리하였으며 양성대조군(positive control)은 glutamic acid만을 사용하였다. 이후 SRB법을 이용하여 달맞이꽃 종자 추출물의 HT-22 신경세포 보호효과를 측정하였다.

암세포 증식 억제능 측정

암세포 증식 억제능은 HepG2, MCF-7, A549, B16, HT-29와 PC-3 세포를 사용하였으며, sulforhodamine B (SRB, Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)법을 이용하여 측정하였다. 생존 세포 내의 단백질 총량을 흡광도로 나타내어 세포 증식 억제능을 확인하는 방법으로 Trichloroacetic acid (TCA, Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 의해 생존 세포만 well plate에 부착되며 이 세포의 단백질 내 염기성 아미노산 잔기가 SRB와 결합하여 마지막에 처리하는 Tris buffer (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 녹아 나와 흡광도를 나타낸다[23]. 암세포 증식 억제능은 세포를 2×10⁴ cells/ml가 되도록 희석하여 48 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 250, 500 µg/ml로 희석시킨 달맞이꽃 종자 추출물을 첨가하고 24시간 동안 반응시켰다. 24시간 후 12% TCA를 넣어 4°C에서 1시간 동안 세포를 고정시키고 well을 증류수로 세척한 후 0.4% SRB 용액을 첨가하여 암소에서 1시간 동안 염색 하였다. 염색 종료 후 1% acetic acid (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)로 세척하고 10 mM Tris buffer를 첨가 하여 SRB를 녹였다. Tris buffer에 세포가 잘 섞이도록 피펫팅을 한 후 상층액을 96 well plate에 옮겨 UV/Vis-spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide 생성량 측정을 통한 대식세포 면역활성 평가

NO (nitric oxide) 생성량 측정은 RAW 264.7를 2×10⁴ cells/ml가 되도록 희석하여 96 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하고 1 µg/ml의 Lipopolysaccharide (LPS)와 2.5, 5, 10 µg/ml로 희석한 달맞이꽃 종자 추출물을 12시간 동안 처리하였으며 양성대조군

(positive control)으로 100 ng/ml의 LPS를 사용하였다. 이후 상등액 50 µl을 획득한 뒤 동량의 Griess (Sigma chemical Co. St. Louis, MO, USA) 시약을 첨가하고 암소에서 15분간 반응시킨 후 UV/Vis-spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 농도는 sodium nitrite (NaNO₂, Sigma chemical Co. St. Louis, MO, USA)를 사용하여 얻은 검량선을 기준으로 정량하였다.

통계처리

실험결과는 3 반복에 대한 평균 및 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's *t*-test를 실시하여 유의성 여부를 판정하였다(* *p*<0.05, ** *p*<0.01, *** *p*<0.001).

결과 및 고찰

달맞이꽃 종자 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

달맞이꽃 종자 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 Table 1과 같다. 달맞이꽃 종자 물, 에탄올, 메탄올 및 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 28.45, 23.39, 31.90 및 7.63 mg GAE/g이고 총 플라보노이드 함량은 13.83, 17.16, 20.66 및 2.77 mg QE/g으로 나타났다. Jo 등[17]에 의하면 아마란스 종자 추출물의 총 폴리페놀 함량이 약 1.69-4.23 mg GAE/g이라고 확인되었고 Park 등[26]은 쪽 종자 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 11.08 mg GAE/g이라고 보고하였다. 이러한 선행연구 결과와 비교하였을 때 달맞이꽃 종자 추출물은 폴리페놀 함량이 높은 것으로 알려진 쪽 종자 메탄올 추출물에 비해 상당히 많은 폴리페놀을 함유하고 있는 것으로 판단된다. 따라서 달맞이꽃 종자 물, 에탄올 및 메탄올 추출물의 높은 폴리페놀 함량은 항산화 활성과도 유사한 경향을 나타내었기에 달맞이꽃 종자 추출물의 항산화 활성은 종자 내 폴리페놀 화합물의 함량과 관련이 있을 것으로 판단된다.

Table 1. Total polyphenol and flavonoid content of *O. Biennis* extracts

	Total polyphenol contents (mg GAE/g)	Total flavonoid contents (mg QE/g)
Water	28.45±2.23	13.83±1.07
EtOH	23.39±2.38	17.16±0.98
MeOH	31.90±2.09	20.66±2.21
70% EtOH	7.63±1.09	2.77±1.13

The total polyphenol contents are expressed as mean ± SD of triplicate determinations; mg GAE/g, mg of gallic acid equivalents in 1 g of extract; mg QE/g, mg of quercetin equivalents in 1 g of extract

달맞이꽃 종자 추출물의 항산화 활성

ABTS는 짙은 청록색의 라디칼로서 항산화 능력이 있는 시료와 반응하여 옅은 푸른색으로 변화하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 추출용매 별 달맞이꽃 종자 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성을 측정한 결과, 1,000 µg/ml의 농도에서 물, 에탄올, 메탄올 및 70% 에탄올 추출물의 소거활성은 각각 77.6%, 72.4%, 84.6% 및 36.6%를 나타내었다(Fig. 1A). 이는 대조구인 0.1% BHT군(72.5%) 및 0.1% α-tocopherol군(60.1%)과 비교하여 높은 수치를 보였으며 메탄올 추출물에서 다른 추출물과 비교하여 약 15-48% 높은 라디칼 소거능을 확인하였다.

추출용매 별 달맞이꽃 종자 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타낸 결과는 Fig. 1B와 같다. 합성 항산화제인 0.1% BHT를 처리했을 때 약 87.2%의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었으며, 달맞이꽃 종자 추출물 또한 농도의존적인 라디칼 소거율의 증가를 보였다. 특히, 250 및 500 µg/ml의 농도의 물, 에탄올 및 메탄올 추출물군은 70% 에탄올 추출물과 비교하여 약 20-28% 가량 높은 라디칼 소거능을 나타내었다. 이를 통해 달맞이꽃 물, 에탄올 및 메탄올 추출물이 70% 에탄올 추출물보다 수소라디칼 제거 활성이 높은 것으로 판단된다. ABTS 라디칼 소거활성이 DPPH 라디칼 소거활성과 비교하여 비교적 낮은 수치를 나타내는 것은 라디칼의 종류에 따라 기질의 결합정도 및 소거기작의 차이점 등에 기인한 것으로 판단된다[29].

금속이온인자(Fe²⁺ 등)에 대한 킬레이트 활성을 의미하는 환원력 측정을 통해 달맞이꽃 종자 추출물의 항산화 활성을 알아본 결과는 Fig. 1C와 같다. 달맞이꽃 종자 메탄올 추출물은 250 및 500 µg/ml의 농도에서 각각 52.5% 및 75.4%의 환원력 활성을 나타내었으며 이는 다른 추출물과 비교하여 약 39-43% 높은 것으로 확인되었다. 달맞이꽃 종자는 1,000 µg/ml의 농도에서 물, 에탄올 및 메탄올 추출물이 유사한 환원력 활성을 보였으나 70% 에탄올 추출물은 가장 낮은 항산화 활성을 기록하였다.

본 연구에서 달맞이꽃 종자 물, 에탄올 및 메탄올 추출물의 높은 항산화 활성은 종자의 다양한 생리활성 효과와 관련이 있을 것으로 전망하며 천연 항산화제 및 기능성 식품 개발에 대한 높은 잠재력을 보일 것으로 기대된다.

달맞이꽃 종자 추출물의 마우스 해마 신경세포 보호에 미치는 영향

척추동물의 신경계에서 대표적인 흥분성 신경전달물질로 작용하는 글루탐산은 체내 다양한 상호작용을 통해 활성산소종을 생성하고 뇌졸중, 간질, 알츠하이머병, 파킨슨병 등의 질환에 관여하는 것으로 알려져 있다[6, 9]. SRB 분석법을 통해 달맞이꽃 종자 추출물의 전처리가 글루탐산에 의한 신경세포 손상 억제에 미치는 영향을 알아보았다. Fig. 2에서 보는 바와

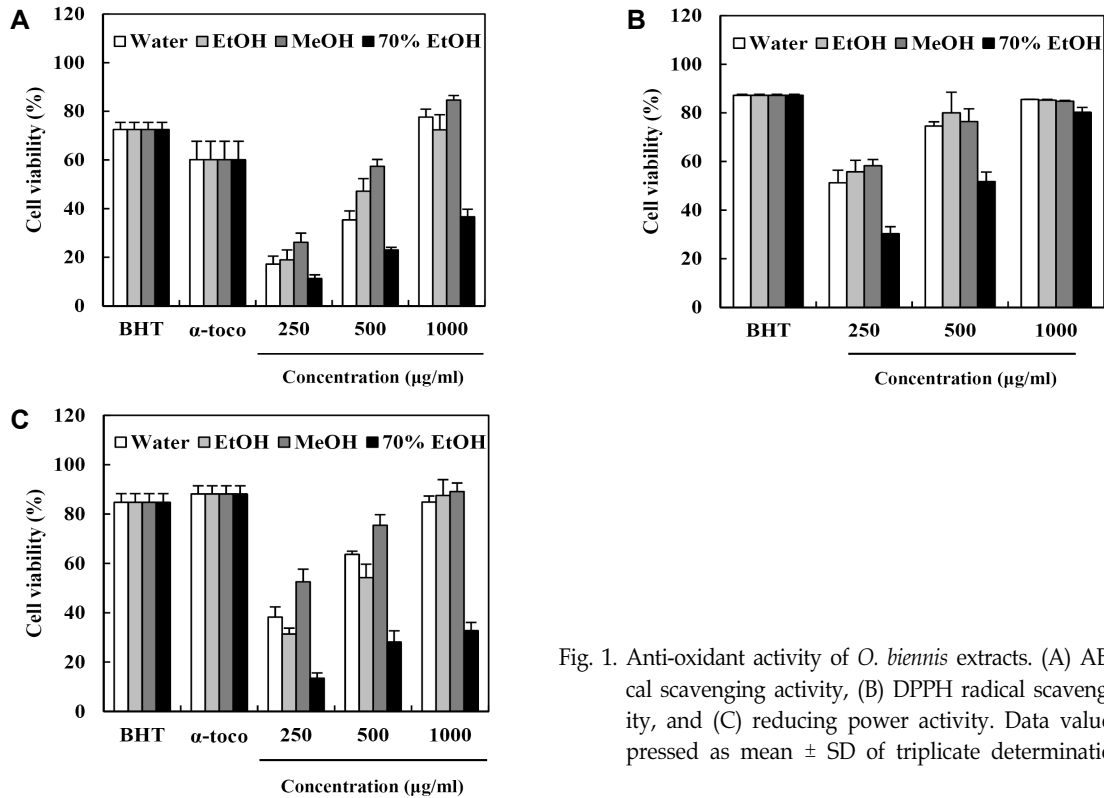


Fig. 1. Anti-oxidant activity of *O. biennis* extracts. (A) ABTS+ radical scavenging activity, (B) DPPH radical scavenging activity, and (C) reducing power activity. Data values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations.

같이 6 mM의 글루탐산 단독 처리군은 대조군에 비해 약 60% 가량 세포생존율이 감소하였으나 달맞이꽃 종자 물, 에탄올 및 메탄올 추출물을 전처리한 후 글루탐산을 처리했던 군에서는 유의적으로 세포생존율이 증가하는 것이 확인되었다. 메탄

올 추출물을 25 및 50 µg/ml의 농도로 처리했을 때 각각 75.72% 및 74.79%의 세포생존율을 나타내어 신경세포 보호효과가 다른 추출물에 비해 우수하였으나 100-200 µg/ml 농도의 달맞이꽃 종자 추출물 처리는 오히려 신경세포 생존율을 감소시켰다. 달맞이꽃 종자 70% 에탄올 추출물은 글루탐산 단독 처리군과 비교하여 유의적인 신경세포 보호효과를 보이지 않았다. 이전 연구에 의하면 글루탐산에 의한 신경세포 사멸은 폴리페놀이 풍부한 약용식물이나 종자 추출물에 의해 감소될 수 있으며 마우스 공간지각능력 향상에도 영향을 미치는 것으로 보고되었다[1, 15]. 따라서 폴리페놀이 풍부한 달맞이꽃 물, 에탄올 및 메탄올 추출물은 글루탐산에 의해 유도되는 신경세포 손상을 감소시킴으로써 세포 생존율을 증가시키는 것으로 확인되었으며 이는 풍부한 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 관련이 있을 것으로 사료된다.

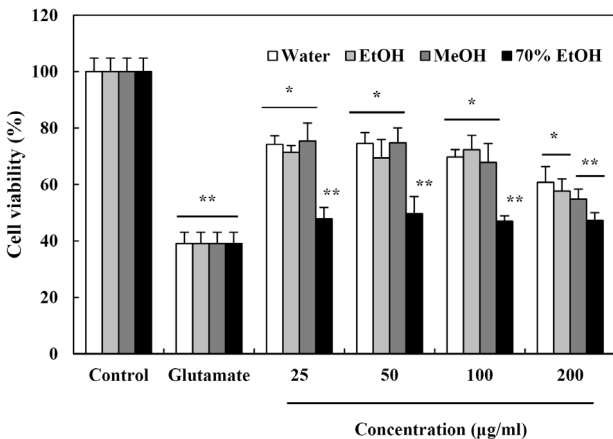


Fig. 2. Effect of *O. biennis* extract treatment on glutamate-induced oxidative neurotoxicity in HT-22 hippocampal neuron cells. HT-22 cells were pretreated with the indicated concentrations of *O. Biennis* extracts for 90 min, and then treated with 5 mM of glutamate for 12 hr. Cell viability was determined by SRB assay. Data values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by student *t*-test.

달맞이꽃 종자 추출물의 암세포 성장 억제효과

정상조직에 대하여 활성산소, 자외선, 발암물질 등과 같은 세포독성인자의 축적과 자극이 지속되면 정상세포 및 DNA 손상이 유발되고 감염, 노화, 유전자 돌연변이 등으로 인해 세포사멸이 차단됨에 따라 정상세포는 암세포로 변화된다[21, 24]. 최근 연구에서 일상적으로 섭취하는 폴리페놀류나 기능성 식품류에 의해 다양한 암종의 발생위험을 감소시킬 수 있다는 결과가 보고되었기에 본 연구에서는 달맞이꽃 종자 추출물의 인체 암세포 성장 억제 효과에 대해 알아보았다. 달맞이

Table 2. Cytotoxic activity (IC₅₀ values) of *O. Biennis* extracts against HepG2, A549, MCF-7, HT-29, PC-3 and B16 cell lines

	IC ₅₀ (µg/ml)			
	Water	EtOH	MeOH	70% EtOH
HepG2	80.63±3.31	85.01±4.01	74.21±5.23	125.47±6.75
A549	250.23±5.55	192.81±5.04	188.24±3.67	587.39±12.28
MCF-7	252.46±8.34	202.45±7.11	186.42±5.28	266.19±11.09
HT-29	101.96±2.51	128.87±5.13	356.57±4.73	154.12±6.01
PC-3	1,000>	788.39±10.23	1,000>	1,000>
B16	660.81±13.40	114.16±4.58	101.80±5.44	121.69±4.68

The IC₅₀ values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations; IC₅₀, 50% inhibitory concentrations.

꽃 종자 추출물을 다양한 암세포에 24시간 동안 처리하였을 때 74.21-788.39 µg/ml의 농도에서 세포 생존율을 50% 가량 감소시키는 것으로 확인되었다(Table 2). HepG2 (인체 간암), A549 (인체 폐암), MCF-7 (인체 유방암) 및 B16 (마우스 흑색 종 피부암) 세포에서 달맞이꽃 종자 메탄올 추출물의 IC₅₀ 농도 값은 각각 74.21, 188.24, 186.42 및 101.80 µg/ml로 다른 추출물과 비교하여 가장 높은 암세포 성장 억제 활성을 나타내었으며 다음으로 에탄올 및 물 추출물이 높은 암세포 성장 억제효능을 보였다. HT-29 인체 대장암 세포에서는 달맞이꽃 종자 물 추출물이 101.96 µg/ml의 IC₅₀ 농도로 가장 높은 세포 독성을 나타내었으며 다음으로 에탄올 및 70% 에탄올이 높은 대장암 세포 성장 억제효능을 보였다. 반면 PC-3 인체 전립선 암 세포는 달맞이꽃 종자 에탄올 추출물에서 788.39 µg/ml의 IC₅₀ 농도를 나타내었으며 나머지 추출물들은 모두 1,000 µg/ml을 초과하는 IC₅₀ 농도 값을 보이는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 항산화활성 및 폴리페놀 함량이 높았던 달맞이꽃 종자 물, 에탄올 및 메탄올 추출물이 다양한 암세포에서 대체로 우수한 항암활성을 나타내었으며 이를 통해 달맞이꽃 종자 추출물의 풍부한 항산화 활성 및 폴리페놀 함량이 암세포 증식억제효능과 관련이 있는 것으로 판단된다.

달맞이꽃 종자 추출물의 대식세포 면역활성 효과

인체는 암을 비롯한 다양한 질병 상황에서 면역체계의 활성을 통해 방어기능을 유지하는데 특히, 면역세포 내 소량의 산화질소(nitric oxide, NO)의 생성은 nuclear factor (NF)-κB경로의 활성화를 유도하여 면역작용을 촉진하는 기능을 가진다 [35]. 다양한 면역세포 중 선천면역계와 관련된 대식세포는 생체 내 이물질, 노폐물 및 돌연변이 세포 등을 포식하여 제거하는 것으로 알려져 있다[4]. 본 연구에서 달맞이꽃 종자 추출물의 처리가 대식세포 내 NO 생성 및 면역세포 활성화에 미치는 영향을 알아보았다(Fig. 3). 달맞이꽃 종자 추출물을 농도별(1, 2.5, 5, 10 및 20 µg/ml)로 처리하였을 때 10 µg/ml의 농도까지 마우스 대식세포인 RAW 264.7의 세포 생존율에 유의한 영향을 보이지 않았다(Fig. 3A). 본 결과를 바탕으로 2.5-10 µg/ml의 달맞이꽃 종자 추출물을 대식세포에 12시간 동안 처리하였을 때 70% 에탄올 추출물에서 농도 의존적으로 NO 생성량이

증가하는 것으로 확인되었으며, 에탄올 및 메탄올 추출물에서는 다소 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 3B). 이는 물, 에탄올 및 메탄올 추출물이 우수한 암세포 증식억제 효능 및 폴리페놀 함량을 보였던 결과와 일치하지 않는 것으로 확인되었다. 이전 연구에서 블랙베리 와인의 다당류가 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 대식세포의 면

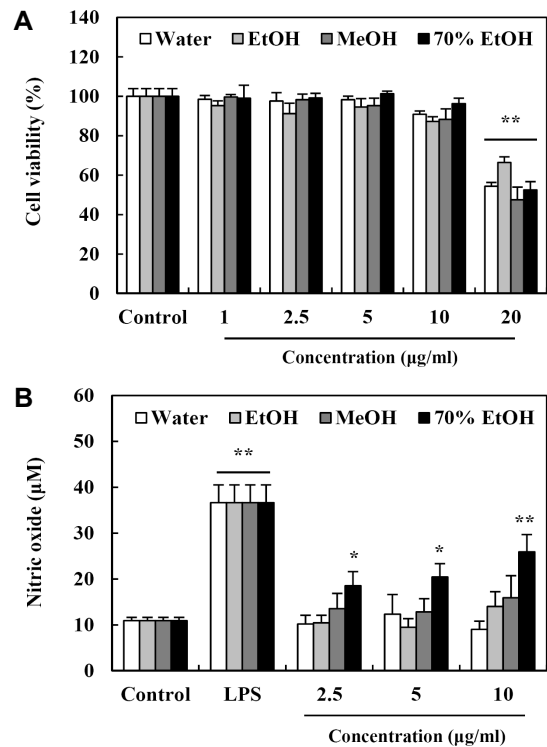


Fig. 3. Nitric oxide (NO) production activity of *O. Biennis* seed extracts in RAW 264.7 macrophage cells. *O. Biennis* seed extracts were treated at 1-20 µg/ml in RAW 264.7 cells, and lipopolysaccharide (LPS) was also treated at 100 ng/ml in RAW 264.7 cells for inducing NO production. (A) After 24 hr, cell proliferation was determined by SRB assay. (B) After 12 hr, NO production was evaluated by griess reagent. Data values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at **p*<0.05 and ***p*<0.01 by student *t*-test.

역 활성을 유도하는 것으로 보고되었으며[7], 식품유래 생리활성 펩타이드 또한 대식세포 내 NO 생성을 통해 면역증강 효능이 있는 것으로 알려져 있다[5]. 따라서 달맞이꽃 종자 추출물의 면역활성 효과는 70% 에탄올 추출물에서 가장 우수하였으며, 이는 폴리페놀 이외의 다양한 생리활성 성분에 의해 유도되는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2017년 동아대학교 연구비 지원에 의해 이루어졌습니다.

References

- Ahn, S. M., Kim, Y. R., Kim, H. N., Choi, Y. W., Lee, J. W., Kim, C. M., Baek, J. U., Shin, H. K. and Choi, B. T. 2015. Neuroprotection and spatial memory enhancement of four herbal mixture extract in HT22 hippocampal cells and a mouse model of focal cerebral ischemia. *BMC Complement Altern. Med.* **15**, doi: 10.1186/s12906-015-0741-1.
- Biglari, F., Aikarkhi, A. M. F. and Easa, A. M. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chem.* **107**, 1636-1641.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant activity determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Byun, E. B., Jang, B. S., Sung, N. Y. and Byun, E. H. 2016. Immunomodulatory activity of crude polysaccharide separated from *Cudrania tricuspidata* leaf. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **45**, 1099-1106.
- Chalamaiah, M., Yu, W. and Wu, J. 2018. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chem.* **245**, 205-222.
- Choi, D. W. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623-634.
- Cordeiro Caillot, A. R., de Lacerda Bezerra, I., Palhares, L. C. G. F., Santana-Filho, A. P., Chavante, S. F. and Sasaki, G. L. 2018. Structural characterization of blackberry wine polysaccharides and immunomodulatory effects on LPC-activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem.* **257**, 143-149.
- Costa, C., Tsatsakis, A., Mamoulakis, C., Teodoro, M., Briguglio, G., Carusao, E., Tsoukalas, D., Margina, D., Dardiotis, E., Kouretas, D. and Fenga, C. 2017. Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food Chem. Toxicol.* **110**, 286-299.
- Fukui, M., Song, J. H., Choi, J., Choi, H. J. and Zhu, B. T. 2009. Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Eur. J. Pharmacol.* **617**, 1-11.
- Gan, R. Y., Lui, W. Y., Wu, K., Chan, C. L., Dai, S. H., Sui, Z. Q. and Corke, H. 2017. Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. *Trends Food Sci. Technol.* **59**, 1-14.
- Granica, S., Czerwińska, M. E., Piwowarski, J. P., Ziaja, M. and Kiss, A. K. 2013. Chemical composition, antioxidative and anti-inflammatory activity of extracts prepared from aerial parts of *Oenothera biennis* L. and *Oenothera paradoxa* Hudziok obtained after seeds cultivation. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 801-810.
- Gragaham, H. D. 1992. Modified prussian blue assay for total phenolic compound. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 801-805.
- Hwang, S. W., Park, M. H., Shim, H. K. and Bae, M. J. 1994. Studies on the composition of lipid amino acid and dietary fiber from functional food source. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **23**, 647-653.
- Igarashi, M. and Miyazawa, T. 2000. Do conjugated eicosapentaenoic acid and conjugated docosahexaenoic acid induce apoptosis via lipid peroxidation in cultured human tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 649-656.
- Jamarkattel-Pandit, N., Pandit, N. R., Kim, M. Y., Park, S. H., Kim, K. S., Choi, H., Kim, H. and Bu, Y. 2010. Neuroprotective effect of defatted sesame seeds extract against *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage. *Planta. Med.* **76**, 20-26.
- Jang, J. K. 2003. Wild plants. Nexus books company, Seoul.
- Jo, C. H., Reed, S. C., Simpson, M. J. and Millington, K. J. 2004. The healthy benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.* **17**, 449-459.
- Kageyama, K., Yamada, R., Otani, S., Onoyama, Y., Yano, I., Yamaguchi, W., Yamaguchi, Y., Kogawa, H., Nagao, N. and Miwa, N. 2000. Cytotoxicity of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in tumor cells and the dependence on binding to serum proteins and incorporation into intracellular lipids. *Oncol. Rep.* **7**, 79-83.
- Kalt, W. 2005. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidant. *J. Food Sci.* **70**, 11-19.
- Kang, N. S. and Sohn, E. H. 2010. Immunomodulatory effects of fructus and semen from *Rosa rugosa* on macrophages. *Kor. J. Plant Res.* **23**, 399-405.
- Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P. and Koul, H. K. 2009. Role of Oxidative Stress in Prostate Cancer. *Cancer Lett.* **282**, 125-136.
- Kim, T. J. 2009. Korean plant edition. Yearim company, Seoul.
- Lee, S. M., Choi, H. K. and Yu, G. H. 2003. Effect of bisphenol A, nonylphenol, pentachlorophenol on the proliferation of MCF-7 and PC-3 cells. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 424-428.
- Liu, C., Zhu, Y., Lou, W., Nadiminty, N., Chen, X., Zhou, Q., Shi, X. B., White, R. W. and Gao, A. C. 2013. Functional p53 determines Docetaxel sensitivity in prostate cancer cells. *Prostate* **73**, 418-427.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* **26**, 211-219.
- Park, Y. J., Cheon, G. Y., Song, H. W., Shin, C. S., Ku, Y. G., Kang, N. R. and Heo, B. G. 2016. Mineral composition and physiological activities of methanol extract from the seeds of *Persicaria tinctoria*. *Kor. J. Plant Res.* **29**, 32-38.

27. Perron, N. R. and Brumaghim, J. L. 2009. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.* **53**, 75-100.
28. Probst, Y., Guan, V. and Kent, K. 2018. A systematic review of food composition tools used for determining dietary polyphenol intake in estimated intake studies. *Food Chem.* **238**, 146-152.
29. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
30. Ruxton, C. H., Reed, S. C., Simpson, M. J. and Millington, K. J. 2004. The healthy benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.* **17**, 449-459.
31. Slinkard, K. and Singleton, V. L. 1997. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.* **28**, 49-55.
32. Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., Yongvanit, P., Kawanishi, S. and Murata, M. 2014. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 193-217.
33. Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**, 1005-1029.
34. Varro, E. T., Lynn, R. B. and James, E. R. 1988. Pharmacognosy 9th edition, Lea and Febiger, Philadelphia, USA, p 471.
35. Wink, D. A., Hines, H. B., Cheng, R. Y., Switzer, C. H., Flores-Santana, W., Vitek, M. P., Ridnour, L. A. and Colton, C. A. 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 873-891.
36. Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A. A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex of aerobic life. *Biochem. Symp.* **61**, 1-34.

초록 : 달맞이꽃 종자 추출물의 생리활성

조현동¹ · 김두현² · 김민근² · 이용석³ · 서권일^{3*}

(¹경북대학교 식품공학부 식품생물공학전공, ²동아대학교 생명자원산업학과, ³동아대학교 생명공학과)

본 연구에서는 달맞이꽃 종자 물, 에탄올, 메탄올 및 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, 항산화, 신경세포 손상 억제, 항암, 대식세포 면역조절 활성 및 에 대하여 비교하였다. 달맞이꽃 종자 추출물 중 메탄올 추출물에서 각각 31.90 mg GAE/g 및 20.66 mg QE/g의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 나타내었으며 나머지 추출물과 비교하여 가장 활성이 높았다. 라디칼 소거능 및 환원력 활성은 달맞이꽃 종자 추출물의 처리에 따라 농도의존적으로 증가하였다. 또한 물, 에탄올 및 메탄올 추출물을 25-100 µg/ml의 농도로 전처리 하였을 때 글루탐산에 의해 유도되는 신경세포 손상 효과를 감소시키는 것으로 확인되었다. 암세포의 경우 메탄올 추출물이 간암, 폐암, 유방암 및 흑색종 피부암의 세포 생존율을 효과적으로 감소시켜 낮은 IC₅₀ 값을 보였으며 대장암과 전립선암에서는 물 추출물과 에탄올 추출물이 가장 낮은 IC₅₀ 값을 나타내었다. 또한, 달맞이꽃 종자 70% 에탄올 추출물은 RAW 264.7 마우스 대식세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 농도에서 유의적으로 산화질소(nitric oxide, NO)의 생성을 통해 대식세포의 면역활성을 유도하였다. 따라서, 달맞이꽃 종자 추출물은 풍부한 폴리페놀 함량과 다양한 생리활성 효능을 나타내며 이를 통해 달맞이꽃 종자 추출물을 기능성 식품 원료 및 천연물 의약품으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.