ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2019** Vol. 29. No. 3. 337~344 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2019.29.3.337

Free Radical Scavenging, Cytotoxic Effects, and Flavonoid Content of Fractions from Leaves of *Lycopus lucidus* Turcz.

Eun Na[1], Jung Woo Lee[2] and Sun Young Lim[2]*

[1]*Ocean Science and Technology School, Korea Maritime and Ocean University, Busan 606-791, Korea*
[2]*Division of Marine Bioscience, Korea Maritime and Ocean University, Busan 606-791, Korea*

Received October 9, 2018 /Revised January 8, 2019 /Accepted January 8, 2019

The free radical scavenging, cytotoxic effects, and flavonoid content of fractions from Lycopus lucidus Turcz leaves were here investigated. The flavonoid contents of 85% methanol (MeOH) and *n*-butanol (BuOH) fractions of the leaves were 41.5 mg/g and 77.2 mg/g, respectively. In DPPH and ABTs+ assays, 85% MeOH and *n*-BuOH fractions from the *L. lucidus* Turcz leaves had a greater scavenging effect ($p<0.05$). The *n*-BuOH fraction (0.5 mg/ml concentration) had scavenging effects of 88% and 92% in the DPPH and ABTs+ assays, respectively ($p<0.05$). Cell viability tests showed that treatment with *L. lucidus* Turcz leaf fractions caused cytotoxicity in the growth of AGS, HT-29, and HT-1080 cancer cells. Of the different fractions, the 85% MeOH sample displayed the highest cytotoxic activity; the IC_{50} values of this fraction against AGS, HT-1080, and HT-29 cancer cells were 0.03 mg/ml, 0.14 mg/ml, and 0.16 mg/ml, respectively. These biological results indicate that the *n*-BuOH fraction was more effective in anti-oxidant activity while the 85% MeOH fraction was stronger in cytotoxic effects, and they suggest that these two fractions from *L. lucidus* Turcz leaves may contain valuable bioactive compounds, such as flavonoids.

Key words : Antioxidant, cytotoxicity, flavonoids, *Lycopus lucidus* Turcz. leaves

서 론

최근 건강과 대체의학에 대한 관심 증대와 더불어 합성 약품의 부작용에 대한 우려 또한 증가하고 있다. 이와 함께 식물 유래 천연물의 수요가 꾸준히 증가하고 있는데, 이는 식물로부터 가공 공정의 발달과 함께 기능성식품 개발 및 천연물 수요가 가속화하고 있기 때문이다. 우리나라를 비롯하여 동양권에서는 오랫동안 질병치료와 예방 목적으로 약초가 사용되어 왔으며 이러한 전통적인 한약재는 식물의 2차 대사산물로 강력한 생리활성을 가지고 있는 대표적인 천연물 재료라 할 수 있다[17]. 따라서 한약재를 비롯하여 천연물의 다양한 생리활성에 대한 연구들이 보고되었으며 천연유래 생리활성 물질의 효능에 대한 관심 또한 증가하고 있다. 특히 식물들 중에 함유되어 있는 페놀화합물은 항염증, 간독성 완화, 항종양, 동맥경화 방지, 항돌연변이 및 항암, 항혈전, 항균활성, 항당뇨, 관절예방 등과 건강에 유익한 여러 가지 생리활성이 보고되었다[3, 23, 25, 29, 33]. 식물 내의 유효한 성분은 식품내의 성분과 공존할 경우 상승효과를 나타내어 우리의 면역시스템 중 보체계의 활성화 및 여러가지 사이토카인의 활성화 등의 질병에 대한 생체방어시스템의 증강에 유효하며 인체의 생체 항상성을 유지하는데 도움이 된다고 보고되었다[14].

택란(*Lycopus lucidus* Turcz)은 꿀풀과(Labiatae) 쉽싸리속(Lycopus)에 속하는 다년생 초본으로 중국과 한국에 널리 분포하고 있다. 택란의 생리활성에 관한 연구로는 택란 구성성분의 항산화 효과[20, 26, 31], 항암 효과[8, 21]및 항염증 효과[19]가 보고되어 있다. Kim 등[10]은 택란 에탄올 추출물이 Runt- related transcription factor (Runx)-2-matrix metalloprotease (MMP)-9 체계를 저해하면서 결장암의 전이와 침윤을 감소시켰다고 보고하였고 Lee 등[16]은 택란으로부터 protocatechuic acid, caffecic acid, rutin 및 rosmarinic acid를 분리 동정하였으며 택란 에탄올 추출물은 비알코올성 지방간에 의한 비만과 대사성 질환에 대해 보호효과가 있다고 보고하였다. 이들은 택란 잎에 대한 연구로 Lee 등[18]은 택란 잎으로부터 pentacyclic triterpenes 류인 ursolic acid, oleanolica-cid및 betulinic acid를 분리하였고 이들 화합물들의 생리활성을 비교한 결과 betulinic acid가 acyl-coA-cholesterol acyltransferase (ACAT)- 1과 ACAT-2의 활성을 강력히 저해했다고 보고하였다. 또한 택란 잎 유래 betulinic acid는 항증식 효과, 항HIV 및 항염증 효과와 면역조절 기능이 있다고 보고되었다[27, 34, 35]. Yang 등[32]은 택란 잎으로부터 α-galacto-oligosaccharides 다당류를 분리하였고 이들 다당류는 면역관련 세포의 활성을 증진시켜 면역시스템을 개선시켰다고 보고하

***Corresponding author**
Tel : +82-10-4781-7549, Fax : +82-51-404-4750
E-mail : sylim@kmou.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.

였다. 따라서 본 연구에서는 택란 잎에 대한 다양한 생리활성을 규명하기 위하여 택란 잎을 극성이 다른 용매로 분획하여 분획물의 플라보노이드 함량을 측정하고 택란 잎 분획물에 의한 라디칼 소거활성과 세포독성 효과를 규명하여 향후 이를 이용한 식품개발을 위한 기초자료를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출과 분획

본 실험에 사용된 건조 택란 잎은 미산약초농장(경상북도 대구광역시)으로부터 구입하여 사용하였다. 건조 택란(200 g) 잎을 용매 극성에 따라 분획하여 *n*-Hexane (1.73 g), 85% aq. MeOH (5.18 g), *n*-butanol (*n*-BuOH) (3.83 g) 및 water (8.52 g) 분획물들을 얻었다[12]. 세포 실험에는 각각의 분획물들을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 배지로 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 DMSO의 최종농도는 0.1% 이하가 되도록 하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

시료 중 총 플라보노이드(flavonoid) 함량은 Chae 등[1]의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 시료는 용매별 추출물 1 mg을 MeOH 1 ml에 녹여 시험관에 취하고 10 ml의 diethylene glycol을 가하여 잘 혼합한 후 1N NaOH 1 ml 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 후 UV-visible spectrometer (X-ma 3000, Human corporation, Seoul, Korea)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질은 rutin (Sigma-Aldrich Co., St. louis, MO, USA)을 사용하여 표준곡선에 의해서 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거활성

시료의 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryhydrazyl) 라디칼 소거활성 측정[2]을 위해 먼저 각 추출물을MeOH로 농도별로 희석하여 사용하였다. DPPH 2 mg을 ethanol 15 ml에 녹여 DPPH 원액을 조제하였다. DPPH 용액 1.2 ml에 DMSO 0.5 ml와 EtOH를 3 ml를 혼합하여 DPPH 희석액을 사용하였다. DPPH 희석액의 흡광도가 0.94～0.97이 되도록 하여 실험에 사용하였다. 시료 0.1 ml와 DPPH 희석액 0.9 ml를 섞은 후 10분 후 UV- visible spectrometer (X-ma 3000, Human corporation, Seoul, Korea)로 518 nm에서 측정하였다. 이때 대조군은 천연항산화제인 L-ascorbic acid와 합성항산화제인 butylated hydroxyltoluene (BHT)를 사용하였다. 택란 잎의 DPPH 라디칼 소거활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{EDA (electron donating ability) (\%)} = \frac{\text{대조군 흡광도-실험군 흡광도}}{\text{대조군의흡광도}} \times 100$$

ABTs+ 라디칼 소거활성

택란 잎에 대한 ABTs+ (2.2′-Azino-bis(3-ethylbenothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation) 라디칼 소거활성은 Re 등[24]의 방법으로 측정하였다. 7 mM의 ABTs+와 2.45 mM의 potassuim persulfate를 첨가하여 radical생성을 위해 암소에서 16시간 방치한 후, 734 nm에서 흡광도가 0.68~0.72가 되도록 EtOH로 희석하였다. ABTs+ 희석액 0.98 ml와 추출물 0.02 ml를 혼합하여 암소에서 10분간 방치 후 UV- visible spectrometer (X-ma 3000, Human corporation, Seoul, Korea) 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 천연항산화제인 L-ascorbic acid와 합성항산화제인 BHT를 사용하였다. 시료의 ABTs+ 라디칼 소거활성은 DPPH 소거활성의 식에 따라 계산하였다.

GSH 측정

세포 내에 축적된 GSH 함량은 HT1080 세포를 이용하여 thiol-staining reagent인 monobromobimane (mBBr)로 측정하였다[22]. 세포는 96-well cell culture plate에 well 당 5×10^4 cells/ml에서 30분간 배양하였다. 다시 각 well은 PBS로 씻은 후 40 μM mBBr를 처리하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 30분간 반응시킨 후 시료처리에 의한 GSH 함량의 변화를 시간별로 excitation 360 nm, emission 465 nm에서 microplate reader (VICTOR3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)로 측정하였다.

MTT assay

배양된 세포(AGS 인체 위암세포, HT-29 인체 결장암 세포, HT-1080 인체 섬유종 세포)는 96 well cell culture plate에 5×10^4 cells/ml이 되도록 100 μl씩 분주하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양한 후 배지는 제거한 뒤 각 시료를 배지로 희석하여 각 well당 100 μl씩 첨가하고, 대조군에는 시료대신 PBS를 100 μl씩 첨가하였다. 이 plate를 다시 37℃, 5% CO_2 incubator에서 48시간 배양하였다. 배양 후 MTT assay [5]를3-(4,5-dimethylthiazole)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약 5 mg을 PBS 1 ml로 녹인 후, 10% FBS가 함유된 배지 9 ml와 희석하여 100 μl를 첨가하고 3~4시간 동안 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양종료 후 생성된 formazan 결정을 가라앉힌 후 각 well에 형성된 결정이 흐트러지지 않도록 주의하면서 반응 후 남은 MTT가 처리된 배지를 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 formazan 결정을 용해시키기 위하여 DMSO를 100 μl씩 분주하여 5~10분간 반응시켜 microplate reader (VICTOR3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해서 환원된 양을 나타내며, 따라서 각 well에 존재하는 세포의 생존수와 비례한다.

Table 1. Contents of total flavonoids of fractions from *L. lucidus* Turcz. leaves

Samples[1)]	Total flavonoid contents (mg/g)[2)]
n-Hexane	13.7±0.01[c3)]
85% MeOH	41.5±0.00[b]
n-BuOH	77.2±0.01[a]
Water	2.59±0.00[d]

[1)]*L. lucidus* Turcz. *n*-Hexane fraction with *n*-hexane; *L. lucidus* Turcz. 85% MeOH fraction with 85% aqueous methanol; *L. lucidus* Turcz. *n*-BuOH fraction with *n*-butanol; *L. lucidus* Turcz. water fraction with water

[2)]mg rutin equivalent/g dry weight

[3)]Values are expressed as mean±SD. Values in the same column with different letters are significantly different at $p<0.05$ using Tukey's test.

통계분석

실험결과는 Mean ± SEM (Standard Error of Mean)으로 나타내었다. 분석된 실험 데이터는 대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 자료로부터 one-way ANOVA를 실시하여 유의성을 검증하였고 사후검증은 Tukey's test를 실시하였다.

결과 및 고찰

총 플라보노이드 함량

택란 잎의 용매별 분획물의 총 플라보노이드 함량은 Table 1에 나타내었다. 택란 잎 85% MeOH 및 *n*-BuOH 분획물들의 총 플라보노이드 함량은 각각 41.5±0.00 mg/g 및 77.2±0.01 mg/g으로 *n*-BuOH 분획물의 총 플라보노이드 함량이 가장 높았음을 알 수 있었다. Song 등[26]은 택란의 잎, 줄기, 뿌리의 물 추출물의 항산화 효과를 비교한 결과 택란 잎의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 가장 높았다고 보고하였다.

DPPH 라디칼 소거활성

택란 잎 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성은 활성산소를 제거할 수 있는 능력인 EDA (electron donating ability, %)로 Table 2에 나타내었다. 각 분획물을 각각 0.05, 0.1, 0.25 및 0.5 mg/ml의 농도로 대조군(L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였다. 택란 잎 *n*-BuOH 분획물의 활성산소 소거능이 가장 우수하였고 다음으로 85% aq. MeOH 분획물에 의한 소거활성이 높았다($p<0.05$). 각 분획물들의 IC_{50}값은 *n*-Hexane 9.76 mg/ml, 85% aq. MeOH 0.50 mg/ml, *n*-BuOH 0.03 mg/ml 및 water 0.78 mg/ml로 나타났다. 이는 앞서 *n*-BuOH의 높은 총 플라보노이드 함량과 연관 있는 것으로 여겨진다. Song 등[26]은 택란의 부위별 물 추출물을 100 g/ml 농도에서 DPPH을 측정한 결과 잎> 뿌리> 줄기 순으로 뿌리나 줄기보다 잎에서 약 5.6배 이상 가장 높은 전자공여능을 나타내었다고 보고하였다. Fialova 등[6]은 *L. europaeus* 잎의 물 추출물은 DPPH, ABTs+ 및 환원력 측정에서 높은 라디칼 소거활성을 나타내었고 주요 페놀성 화합물은 rosmarinic acid와 luteolin-7-O-glucuronide 이었다고 보고하였다.

ABTs+ 라디칼 소거활성

택란 잎 분획물의 ABTs+ 라디칼 소거활성도 DPPH 라디칼 소거활성과 마찬가지로 전자공여능인 EDA로 Table 3에 나타내었다. 각 용매별 분획물을 각각 0.05, 0.1, 0.25 및 0.5 mg/ml의 농도로 대조군(L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였다. 택란 잎 분획물들을 합성항산화제인 BHT와 천연항산화제인 L-ascorbic acid 비교하였을 때 첨가농도 0.5 mg/ml 농도에서 경우 각각 93.0% 및 92.8%이었고, 85% aq. MeOH 및 *n*-BuOH 분획물에 의한 소거활성은 89.3% 및 92.1% 이며 대조군과 유사한 값을 나타내었다($p<0.05$). 각 분획물들의 IC_{50}값은 *n*-Hexane 0.96 mg/ml, 85% aq. MeOH 0.16 mg/ml, *n*-BuOH 0.01 mg/ml 및 water 0.31 mg/ml로 나타났다. 이는 앞서 *n*-BuOH과 85% aq. MeOH의 높은 총 플라보노이드 함량과 연관 있는 것으로 여겨진다.

자유라디칼을 소거할 수 있는 화합물 또는 과산화물 생성 억제 물질과 같은 항산화제들은 활성산소로 인한 산화적 손상으로부터 세포를 보호함으로써 산화스트레스에 의하여 유발

Table 2. DPPH radical scavenging effect of fractions from *L. lucidus* Turcz. leaves

Samples[1)]	concentrations (mg/ml)			
	0.05	0.1	0.25	0.5
n-Hexane	11.4±0.00[f2)]	12.4±0.00[f]	12.7±0.00[f]	12.9±0.00[f]
85% MeOH	16.5±0.00[d]	21.7±0.00[d]	31.7±0.01[d]	49.7±0.02[d]
n-BuOH	70.9±0.02[b]	86.7±0.01[b]	88.7±0.00[b]	87.7±0.00[c]
Water	12.6±0.00[e]	15.6±0.00[e]	22.7±0.00[e]	32.3±0.01[e]
L-ascorbic acid	91.4±0.00[a]	91.4±0.00[a]	91.6±0.00[a]	91.6±0.00[a]
BHT	61.1±0.00[c]	63.2±0.00[c]	86.1±0.00[c]	88.5±0.00[b]

[1)]*L. lucidus* Turcz. *n*-Hexane fraction with *n*-hexane; *L. lucidus* Turcz. 85% MeOH with 85% aqueous methanol; *L. lucidus* Turcz. *n*-BuOH fraction with *n*-butanol; *L. lucidus* Turcz. water fraction with water

[2)]Values are expressed as mean±SD. Values in the same column with different letters are significantly different at $p<0.05$ using Tukey's test.

Table 3. ABTs+ radical scavenging effect of fractions from *L. lucidus* Turcz. leaves

Samples[1)]	concentrations (mg/ml)			
	0.05	0.1	0.25	0.5
n-Hexane	10.7±0.00[f2)]	15.5±0.00[e]	23.1±0.01[e]	28.7±0.00[f]
85% MeOH	34.0±0.02[d]	47.6±0.02[c]	70.6±0.02[c]	89.3±0.02[d]
n-BuOH	92.2±0.00[c]	92.4±0.00[b]	92.2±0.00[b]	92.1±0.00[c]
Water	13.6±0.00[e]	23.4±0.00[d]	42.3±0.01[d]	76.9±0.04[e]
L-ascorbic acid	93.0±0.00[b]	92.8±0.00[a]	93.1±0.00[a]	92.8±0.00[b]
BHT	92.9±0.00[a]	92.8±0.00[a]	93.1±0.00[a]	93.0±0.00[a]

[1)]*L. lucidus* Turcz. *n*-Hexane fraction with *n*-hexane; *L. lucidus* Turcz. 85% MeOH fraction with 85% aqueous methanol; *L. lucidus* Turcz. *n*-BuOH fraction with *n*-butanol; *L. lucidus* Turcz. water fraction with water

[2)]Values are expressed as mean ± SD. Values in the same column with different letters are significantly different at $p<0.05$ using Tukey's test.

되는 질병의 예방 또는 치료 효과를 가진다[9]. 본 연구에서 사용된 DPPH와 ABTs+ 라디칼 소거능 활성 측정방법은 대표적인 항산화 측정방법으로 이는 항산화능을 지닌 페놀성 물질 함량이 높을수록 소거활성이 증가되므로 free radical 물질인 DPPH와 ABTs+의 소거활성과 유의적인 상관관계를 갖는 것으로 알려져 있다[9]. Song 등[26]은 택란 잎, 줄기, 뿌리의 물 추출물의 항산화 효과를 비교한 결과 택란 잎의 항산화 활성(DPPH, ABTs+ Fe^{2+} chelating, hydroxyl radical, SOD)과 아질산염 소거활성이 가장 높았고 이는 택란 잎의 높은 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 관련성이 높다고 보고하였다. Lu 등[20]의 연구결과에서도 택란의 총 페놀함량과 FRAP 및 TEAC 활성 사이에 유의적 양의 상관관계가 있다고 보고하였다.

GSH 농도 변화

택란 잎 분획물들이 세포 내의 GSH 함량에 미치는 영향을 측정하기 위하여 thiol-stanining reagent인 mBBr을 이용하여 측정하였다. Fig. 1은 택란 잎 분획물들 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 및 0.5 mg/ml의 농도에서 측정하였으며, 120분 동안 30분 간격으로 측정하였다. 측정시간 120분 일 때, 모든 분획물들의 GSH 함량은 유의적으로 증가하였고($p<0.05$), 85% MeOH 분획물에 의한 상승효과가 가장 높았다. Lee 등[15]은 초석잠 뿌리 분획물들의 GSH 함량에 미치는 영향을 살펴 본 결과 모든

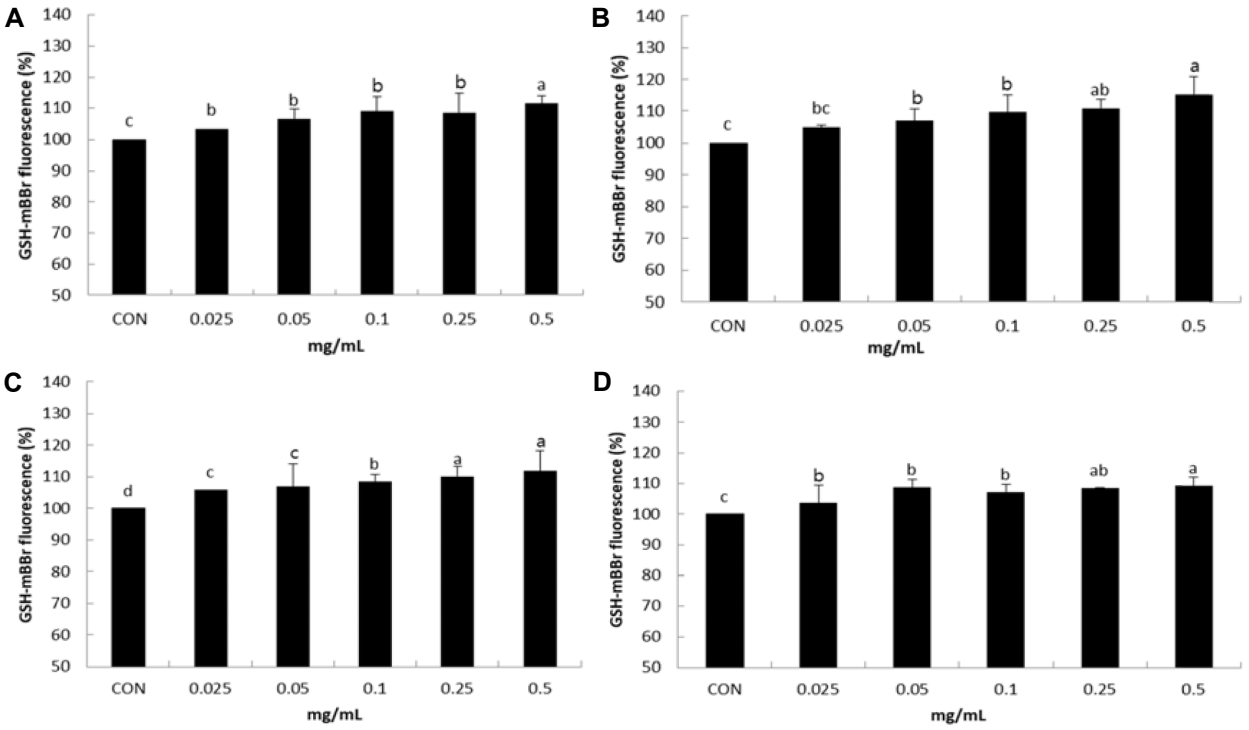

Fig. 1. Effect of fractions from *L. lucidus* Turcz. Leaves on GSH levels in HT1080 cells.[1)] A, *L. lucidus* Turcz. *n*-hexane fraction with *n*-Hexane; B, *L. lucidus* Turcz. 85% MeOH fraction with 85% aqueous methanol; C, *L. lucidus* Turcz. *n*-BuOH fraction with *n*-butanol; D, *L. lucidus* Turcz. water fraction with water.

분획물들은 GSH 함량을 상승시켰고 분획물들 중 *n*-hexane 분획물에 의한 상승효과가 가장 높았다고 보고하였다. 택란 잎 추출물 및 분획물들에 의한 DPPH 및 ABTs+ radical 소거 활성에 관한 연구는 보고되어 있으나 GSH 농도 변화에 대한 연구는 상대적으로 미미하다.

세포독성 효과

택란 잎을 용매 극성에 따라 분획하여 얻어진 *n*-hexane, 85% MeOH, *n*-BuOH 및 water 분획물들에 의한 인체 암세포에 대한 세포독성 효과를 MTT assay를 시행하여 알아보았다. 택란 잎 *n*-Hexane, 85% MeOH, *n*-BuOH 및 water 분획물들은 첨가농도 0.25 mg/ml의 농도에서 AGS 암세포에 대한 세포독성 효과는 각각 89%, 90%, 32% 및 57%로 나타났다(p<0.05) (Fig. 2). 택란 잎 분획물들 중에서는 *n*-Hexane 및 85% MeOH 분획물들에 의한 세포독성 효과가 가장 높게 나타났다. Fig. 3는 택란 잎 추출물로부터 얻어진 각 분획물들을 농도별로 HT-29 암세포에 대한 세포독성 효과를 나타낸 것으로 AGS 암세포와 유사하게 85% MeOH, *n*-Hexane, water 및 *n*-BuOH 분획물 순으로 세포독성 효과가 높았다. 택란 잎 분획물들의 IC_{50} 값을 나타낸 것으로 *n*-Hexane, 85% MeOH, *n*-BuOH 및 water 분획물들의 AGS 암세포에 대한 IC_{50} 값은 각각 0.18, 0.03, 0.62 및 0.12 mg/ml이었고 HT-29 암세포에 대한 IC_{50} 값은 각각 0.26, 0.16, 0.60 및 1.14 mg/ml이었다. Fig. 4는 택란 잎 추출물로부터 얻어진 각 분획물들을 농도별로 HT-1080 암세포에 대한 효과를 나타낸 것으로 0.25 mg/ml의 첨가농도에서 85% MeOH 분획물은 88% 저해율을 나타내어 분획물들 중 가장 높은 세포독성 효과를 나타내었다. HT-1080 암세포에서 택란 잎 *n*-Hexane, 85% MeOH, *n*-BuOH 및 water 분획물들의 IC_{50} 값은 각각 0.34, 0.14, 0.48, 및 1.05 mg/ml 이었다. 따라서 택란 잎 분획물의 세포독성 효과는 85% MeOH 분획물에 의한 활성이 가장 높았음을 알 수 있었고 앞서 *n*-BuOH 분획물 다음으로 높은 함량의 총 플라보노이드를 나타내었다. Park 등[21]은 택란 MeOH 추출물이 DNA 손상을 유발하고 세포주기 조절 관련 신호전달 과정을 통해 인간 폐암세포인 A549의 G1 arrest를 유도하여 세포의 증식을 억제하였다고 보고하였다. 또한 Kim 등[8]은 택란 추출물이 유방암 세포 MCF-7의 apoptosis를 유도하여 성장을 저해했다고 보고하였다. 그러나 택란 잎 추출물에 의한 세포독성에 대한 연구는 잘 알려져 있지 않다. Malik와 Yuldashev 등[13]은 택란 잎으로부터 플라보노이드, triterpenes 및 탄닌류 등을 분리하였다. 택란 잎의 주요 triterpene 중의 하나인 betulinic acid가 tumor necrosis factor에 의해 유도된 apoptosis 과정을 통해 Caco 2 인체 결장암세포와 H1299 인체 폐암세포의 증식을 억제시켰고 발암물질에 의한 NF-kB 활성을 저해시켜 항암효과를 나타내었다고 보고되었다[24]. Hwang 등[7]도 terpernes류가 Lu1 인체 폐암, Col2 인체 결장암 및 KB 인체 구강암세포들의 증식에 대해 세포독성을 나타내었다고 보고하였다. Kim 등[11]은 플라보노이드 중 quercetin은 MAPK 신호전달 과정을

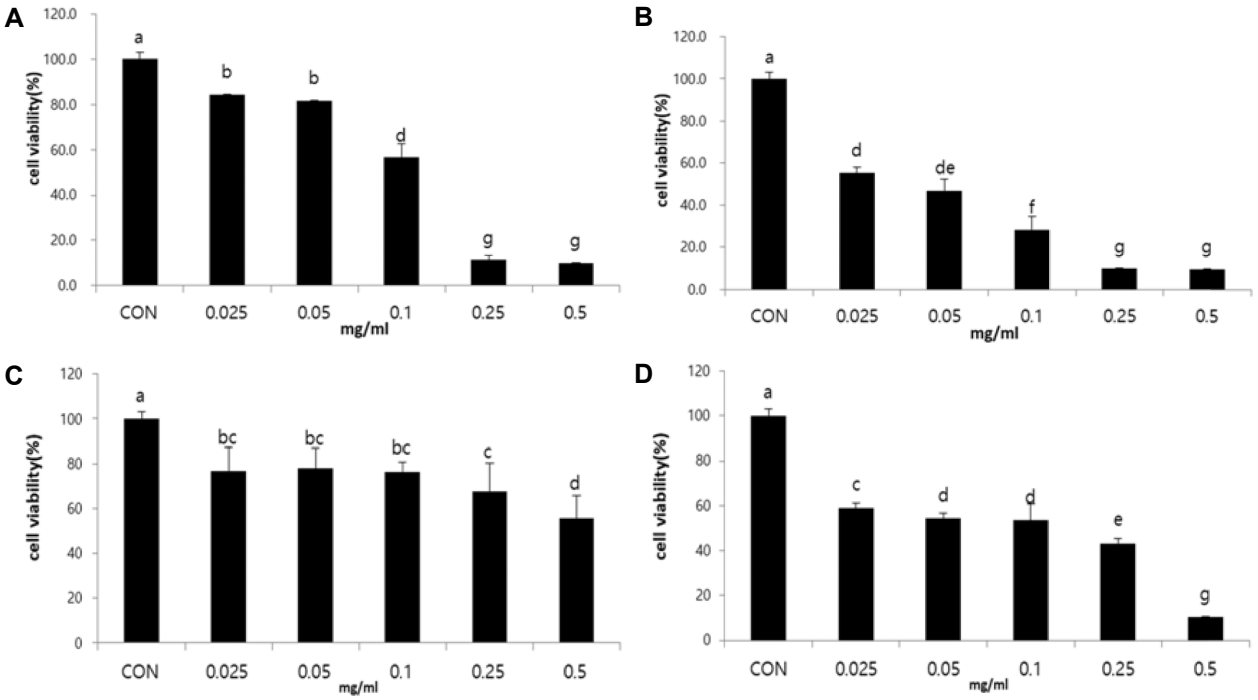

Fig. 2. Effect of fractions from *L. lucidus* Turcz. Leaves on the cell viability of AGS gastric cancer cells.[1)] A, *L. lucidus* Turcz. *n*-hexane fraction with *n*-Hexane; B, *L. lucidus* Turcz. 85% MeOH fraction with 85% aqueous methanol; C, *L. lucidus* Turcz. *n*-BuOH fraction with *n*-butanol; D, *L. lucidus* Turcz. water fraction with water.

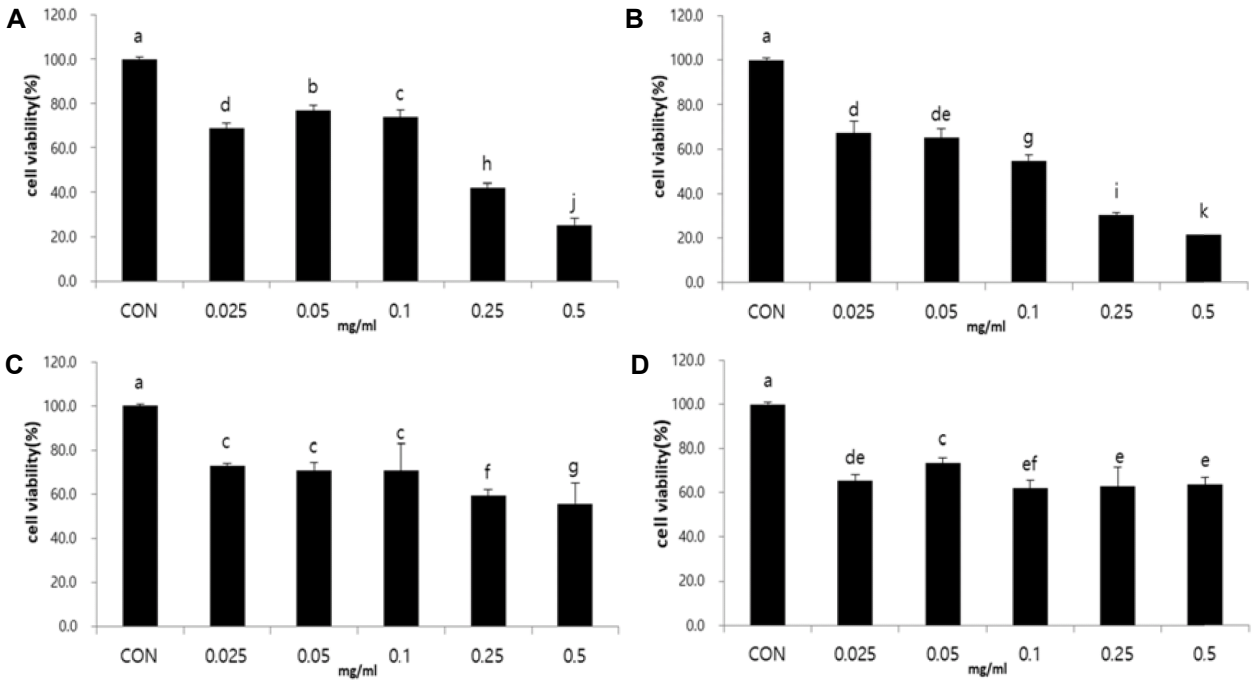

Fig. 3. Effect of fractions from *L. lucidus* Turcz. Leaves on the cell viability of HT-29 human colon cancer cells.[1)] A, *L. lucidus* Turcz. *n*-hexane fraction with *n*-Hexane; B, *L. lucidus* Turcz. 85% MeOH fraction with 85% aqueous methanol; C, *L. lucidus* Turcz. *n*-BuOH fraction with *n*-butanol; D, *L. lucidus* Turcz. water fraction with water

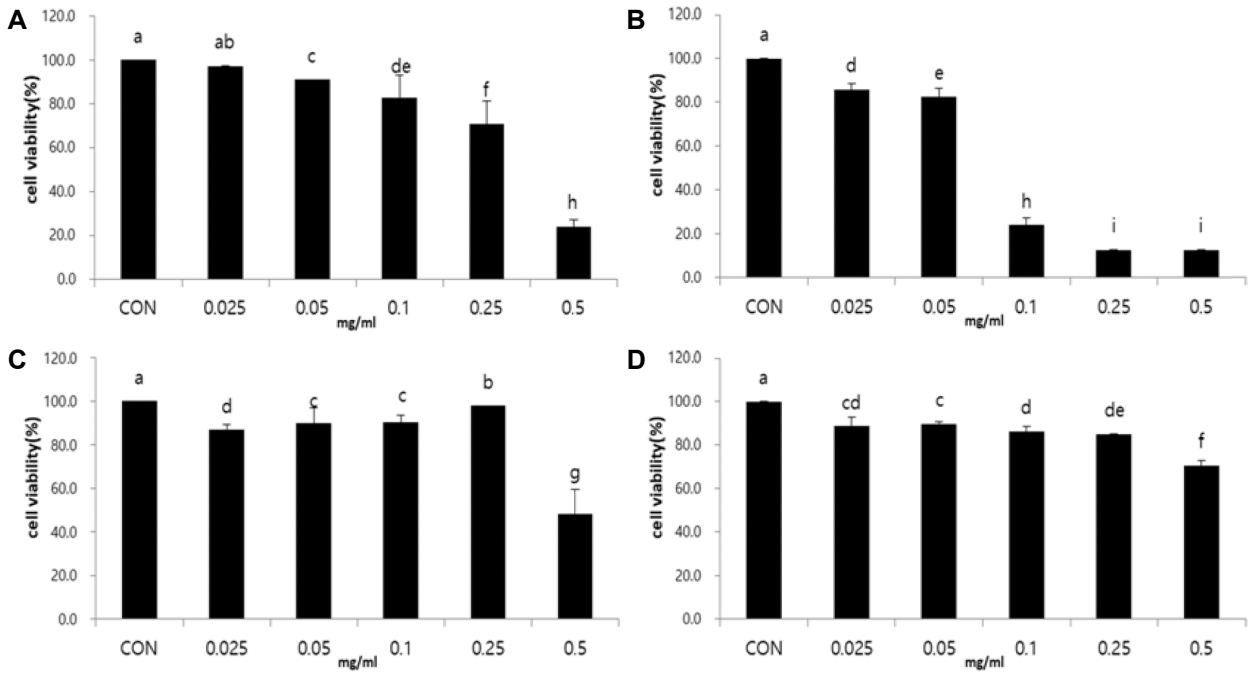

Fig. 4. Effect of fractions from *L. lucidus* Turcz. Leaves on the cell viability of HT-1080 human fibrosarcoma cells.[1)] A, *L. lucidus* Turcz. *n*-hexane fraction with *n*-Hexane; B, *L. lucidus* Turcz. 85% MeOH fraction with 85% aqueous methanol; C, *L. lucidus* Turcz. *n*-BuOH fraction with *n*-butanol; D, *L. lucidus* Turcz. water fraction with water

통해 AGS 위암세포의 apoptosis을 유도하여 세포독성을 나타내었다고 보고하였다. 또한 Daskiewicz 등[4]은 42종 플라보노이드를 조사한 결과 이들 플라보노이드는 caspase 활성을 증가시켜 HT-29 결장암세포의 apoptosis를 유도하여 증식을 억제시켰다고 보고하였다. 따라서 꾸준한 플라보노이드 섭취는 위암 및 결장암 위험 억제와 매우 밀접한 관련이 있다고

보고되었다[28, 30]. 본 연구 결과로부터 다양한 생리활성이 보고되어 있는 택란 뿌리 이외에도 택란 잎 분획물은 높은 함량의 플라보노이드를 함유하였고 이는 높은 자유 라디칼 소거활성과 암세포 독성효과와 관련성이 높음을 알 수 있었다. 택란 잎 *n*-BuOH 분획물은 자유라디칼 소거활성에 효과적이었고 *n*-Hexane와 85% aq. MeOH 분획물들은 높은 세포독성 효과를 나타내었다. 따라서 택란 잎은 플라보노이드 이외에도 지용성 생리활성물질을 함유하고 있는 것으로 사료되고 여기에 대해서는 향후 생리활성 물질 분리 및 정제 연구가 필요하다. 본 연구는 택란 잎 추출물을 이용한 식품개발을 위한 초기 예비실험으로 향후 기초 자료를 제시하고자 한다.

감사의 글

본 과제(결과물)은 2018년 한국해양대학교 해외파견연구지원사업을 지원받아 수행된 연구결과입니다.

References

1. Chae, S. K., Kang, G. S., Ma, S. J., Bang, K. W., Oh, M. M. and Oh, S. H. 2002. *Standard food analysis*. Jigu publishing Co. Paju, Korea p 381-382.
2. Chen, H. H., Muranmoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokihara, K. 1995. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragment found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 49-53.
3. Cook, N. C. and Samman, S. 1996. Flavonodis-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* **7**, 66-76.
4. Dastiewicz, J. B., Depeint, F., Viornery, L., Bayet, C., Comte-Sarrazin, G., Comte, G., Gee, J. M., Johnson, I. T., Ndjoko, K., Hostettmann, K. and Barron, D. 2005. Effects of flavonoids on cell proliferation and caspase Activation in a Human colonic cell line HT29: An SAR study. *J. Med. Chem.* **48**, 2790-2804.
5. Denizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival.Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.*J. Immunol. Methods* **89**, 271-277.
6. Fialova, S., Slobodnikova, L., Veizerova, L. and Grancai, D. 2015. *Lycopus europaeus*: Phenolic fingerprint, antioxidant activity and antimicrobial effect on clinical *Staphylococus aureus* strains. *Nat. Prod. Res.* **29**, 2271-2274.
7. Hwang, B. Y., Chai, H. B., Kardono, L. B. S., Riswan, S., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M. and Kinghorn, A. D. 2003. Cytotoxicity triterpenes from the twigs of *Celtis philippinensis*. *Phytochemistry* **62**, 197-201.
8. Kim, D. Y. and Ghil, S. H. 2009. Effect of *Lycopus lucidus* Trucz. on cell growth of human breast cancer cells, MCF-7.*J. Exo. Biomed. Sci.* **15,** 147-152.
9. Kim J. W., Moon, B. S., Park, Y. M., Ryoo, I. J., Nguyen, T. C., Yoo, I. D. and Kim, J. P. 2005. Structures and antioxidant activity of diketopiperazines isolated from the mushroom *Sarcodon aspratus*. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 93-97.
10. Kim, K. Y., Oh, T. W., Ma, J. J. and Park, K. I. 2018. Ethanol extract of *Lycopus Lucidus* Turcz. ex Benth inhibits metastasis by downregulation of Runx-2 in mouse colon cancer cells. *Evidence-Based Complementary Alter. Med.* doi.org/10.1155/2018/9513290.
11. Kim, M. C., Lee, H. J., Lim, B., Ha, K. T., Kim, S. Y. So, I. and Kim, B. J. 2014. Quercetin induces apoptosis by inhibiting MAPKs and TRPM7 channels in AGS cells. *Inter. J. Mol. Med.* **33**, 1657-1663.
12. Kong, C. S., Um, Y. R., Lee, J. I., Kim, Y. A., Lee, J. S. and Seo, Y. W. 2008. Inhibition effect of extracts and its solvent fractions isolated from *Limonium tetragonum* on the growth of human cancer cells. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **23,** 177-182.
13. Malik, A. and Yuldashev, P. 2002. Flavonoids of *Lycopus lucidus*. *Chem. Nat. Comp.* **38**, 104-105.
14. Lee, J. M., Lee, S. H. and Kim, H. M. 2000. Use of oriental herbs as medical food. *Food Industry Nutr.* **5**, 50-56.
15. Lee, J. W., Wu, W. and Lim, S. Y. 2018. Effect of extracts from *Stachys sieboldii* Miq. on cellular reactive oxygen species and glutathione production and genomic DNA oxidation. *Asian Pacific J. Tropical Biomed.* **8**, 485-489.
16. Lee, M. R., Yang, H. J., Park, K. I. and Ma, J. Y. 2019. *Lycopus lucidus* Turz. Ex Benth. Attenuates free fatty acid-induced steatosis in HepG2 cells and non-alcoholic fatty liver disease in high-fat diet-induced obese mice. *Phytomed.* **55**, 14-22.
17. Lee, S. O., Lee, H., J., Yu, M. H., Im, H., G. and Lee, I. S. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullinginsland. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37**, 233-240.
18. Lee, W. S., Im, K. R., Park, Y. D., Sung N. D. and Jeong, T. S. 2006. Human ACAT-1 and ACAT-2 inhibitory activities of pentacyclic triterpenes from the leaves of *Lycopus lucidus* Turcz. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 382-384.
19. Lee, Y. J., Kang, D. G., Kim, J. S. and Lee, H. S. 2008. *Lycopus lucidus* inhibits high glucose-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial. *Vascul. Pharmacol.* **48,** 38-46.
20. Lu, Y. H., Huang, J. H., Li, Y., Ma, T., Sang, P., Wang, W. and Gao, C. 2015. Variation in nutritional compositions, antioxidant activity and microstructure of *Lycopus lucidus* root at different harvest times. *Food Chem.* **183,** 91-100.
21. Park, H. J., Jin, S., Oh, Y. N., Yun, S. G., Lee, J. Y., Kwon, H. J. and Kim, B. W. 2013. Induction of G1 arrest by methanol extract of *Lycopus lucidus*in human lung adenocarcinoma A549 cells. *J. Life Sci.* **23**, 1109-1117.
22. Poot, M., Verkerk, A., Koster, J. F. and Jongkind, J. F. 1986. *De novo* synthesis of glutathione in human fibroblasts during *in vitro* ageing and in some metabolic diseases as measured by a flow cytometric method. *Biochim. Biophys. Acta* **883**, 580-584.
23. Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G. J. E. and Komaitis, M. 2004. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek

aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem.* **95**, 664-671.
24. 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.
25. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. 1997. Antixoxidant properties of phenolic compounds. *Trend Plant Sci.* **2**, 152-159.
26. Song, Y. J., Chang, J. P. and Yoo, J. H. 2016. Antioxidant activities of water extracts from different parts of *Lycopus lucidus*Turcz. ex Benth. *Kor. J. Herbaol.* **31**, 21-28.
27. Takada, Y. and Aggarwal, B. B. 2003. Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF-kappa B activation through inhibition of 1 kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metallopopretease-9. *J. Immunol.* **171**, 3278-3286.
28. Theodoratou, E., Kyle, J., Cetnarskyj, R., Farrington, S. M., Tenesa, A., Barnetson, R., Porteous, M., Dunlop, M. and Campbell, H. 2007. Dietary flavonoids and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Bomarkers Prev.* **16**, 684-693.
29. Tsao, R. and Deng, Z. 2004. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemiclas. *J. Chromatogr. B* **812**, 85-99.
30. Xu, M., Chen, Y. M., Huang, J., Fang, Y. J., Huang, W. Q., Yan, B., Lu, M. S., Pan Z. Z. and Zhang, G. X. 2016. Flavonoid intake from vegetables and fruits is inversely associated with colorectal with colorectal cancer risk: a case-control study in China. *Br. J. Nutr.* **116**, 1275-1287.
31. Yang, M. O. 2017. Antioxidant properties of hot water extract of *Lycopus lucidus* Turcz Tubers. *Kor. J. Community Living Sci.* **28,** 103-113.
32. Yang, X., Lv, Y., Tian, L. and Zhao, Y. Composition and systemic immune activity of the polysaccharides from an herbal tea (*Lycopus lucidus*Turcz.). *J. Agric. Food Chem.* **58**, 6075-6080.
33. Yoshimoto, M., Oluno, S., Yamaguchi, M. and Yamakawa, O. 2001. Antimutagenicity of deacylatedanthocyanis in purple sweet potato. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 1652-1655.
34. Yoon, J. J., Lee, Y. J., Kim, J. S., Kang, D. G. and Lee, H. S. 2010. Protective role of betulinic acid on TNF-α-induced cell adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophy. Res. Com.* **391**, 96-101.
35. Yun, Y., Han, S., Park, E., Yim, D., Lee, S., Lee, C. K., Cho, K. and Kim, K. 2003. Immunomodulatory activity of betulinic acid by producing pro-inflammatory cytokines and activation of macrophages. *Arch. Pharm. Res.* **26,** 1087-1095.

초록 : 택란 잎 추출물의 라디칼 소거활성과 세포독성효과 및 플라보노이드 함량

나 은[1] · 이정우[2] · 임선영[2]*
([1]한국해양대학교 해양과학기술전문대학원, [2]한국해양대학교 해양생명과학부)

본 연구에서는 택란 잎에 대한 다양한 생리활성을 규명하기 위하여 택란 잎을 극성이 다른 용매로 분획하여 분획물의 플라보노이드 함량을 측정하고 택란 잎 분획물에 의한 라디칼 소거활성과 세포독성 효과를 규명하고자 하였다. 택란 잎 85% MeOH 및 *n*-BuOH분획물들의 총 플라보노이드 함량은 각각 41.5±0.00 mg/g 및 77.2±0.01 mg/g으로 *n*-BuOH 분획물의 총 플라보노이드 함량이 가장 높았음을 알 수 있었다. DPPH assay에서 택란 잎 *n*-BuOH 분획물의 활성산소 소거능이 가장 우수하였고 다음으로 85% MeOH 분획물에 의한 소거활성이 높았다 (p<0.05). 각 분획물들의 IC_{50}값은 *n*-Hexane 9.76 mg/ml, 85% MeOH 0.50 mg/ml, *n*-BuOH 0.03 mg/ml 및 water 0.78 mg/ml로 나타났다. 또한 택란 잎 85% aq. MeOH 및 *n*-BuOH 분획물들에 의한 ABTs+소거활성은 각각 89.3% 및 92.1%이었으며 대조군인BHT와 L-ascorbic acid와 유사한 값을 나타내었다(p<0.05). ABTs+ assay에서 각 분획물들의 IC_{50}값은 *n*-Hexane 0.96 mg/ml, 85% MeOH 0.16 mg/ml, *n*-BuOH 0.01 mg/ml 및 water 0.31 mg/ml로 나타났다. 택란 잎 *n*-Hexane, 85% MeOH, *n*-BuOH 및 water 분획물들은 농도의존적으로 암세포들에 대한 세포독성 효과를 나타내었으며 분획물들 중 특히 *n*-Hexane과 85% MeOH 분획물들에 의한 세포독성 효과가 가장 높았다. AGS 암세포에 대한 택란 잎 *n*-Hexane, 85% MeOH, *n*-BuOH 및 water 분획물들의 IC_{50} 값은 각각 0.18, 0.03, 0.62 및 0.12 mg/ml이었고 HT-29 암세포에 대한 IC_{50} 값은 각각 0.26, 0.16, 0.60 및 1.14 mg/ml이었다. HT-1080 암세포에서 택란 잎*n*-Hexane, 85% MeOH, *n*-BuOH 및 water 분획물들의 IC_{50} 값은 각각 0.34, 0.14, 0.48, 및 1.05 mg/ml이었다. 따라서 본 연구결과로부터 택란 잎 *n*-BuOH 분획물은 자유라디칼 소거활성에 효과적이었고 *n*-Hexane과 85% MeOH 분획물들은 높은 세포독성 효과를 나타내었으며 향후 택란 잎을 이용한 식품개발을 위한 기초자료를 제시하고자 한다.