

Comparison of Antioxidant, Cytotoxicity and Flavonoid Content of *Stachys sieboldii* Miq. vs. *Lycopus lucidus* Turcz. Leaf Extracts

Eun Na¹, Jung Woo Lee² and Sun Young Lim^{2*}

¹Ocean Science and Technology School, Korea Maritime & Ocean University, Busan 49112, Korea

²Division of Marine Bioscience, Korea Maritime & Ocean University, Busan 49112, Korea

Received October 13, 2019 / Revised December 16, 2019 / Accepted December 20, 2019

In this study, the antioxidant and cytotoxic effects and the flavonoid contents of leaf extracts from *Stachys sieboldii* Miq. and *Lycopus lucidus* Turcz. were compared. The flavonoid contents of the acetone + methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts of *L. lucidus* Turcz. leaves were 55.7 and 233.2 mg/g, respectively. In a DPPH assay, A+M and MeOH extracts from *L. lucidus* Turcz leaves had a greater scavenging effect than those of *S. sieboldii* Miq. leaves ($p < 0.05$). In an ABTS assay, MeOH extracts from *S. sieboldii* Miq. and *L. lucidus* Turcz (0.5 mg/ml concentration) leaves had scavenging effects of 85% and 91%, respectively ($p < 0.05$), suggesting that both of the MeOH extracts had greater scavenging effects than both A+M extracts. In a 120 min ROS production assay, all tested extracts decreased the cellular ROS production induced by H₂O₂ compared to that produced by exposure to the extract-free control. The MeOH extract from *L. lucidus* Turcz leaves had a greater inhibitory effect on cellular ROS production ($p < 0.05$). Treatment with A+M and MeOH extracts from both *S. sieboldii* Miq. and *L. lucidus* Turcz. leaves showed a dose-dependent increased cytotoxicity against the growth of AGS, HT-29 cancer cells, and HT-1080 ($p < 0.05$). Both A+M extracts had a greater inhibitory effect on the growth of all cancer cells than both MeOH extracts. These results suggest that the MeOH extract of *L. lucidus* Turcz. leaves is effective in scavenging free radicals and inhibiting cellular oxidation, while the A+M extract inhibits proliferation of three types of cancer cell.

Key words : Antioxidant, flavonoids, *Lycopus lucidus* Turcz., reactive oxygen species, *Stachys sieboldii* Miq.

서 론

약초를 포함하는 식물은 잎, 꽃, 뿌리, 줄기 및 열매 등에서 독특한 향과 맛이 있어 부유별로 나물이나 향신료로 개발되어 이용되어 왔다. 식물에 함유되어 있는 주요 성분들은 탄수화물, 단백질, 지방, 무기질(칼륨, 칼슘), 비타민 등과 특수 성분인 사포닌, 탄닌, 알카로이드, 정유, 배당체, 테르펜과 수지, 펙틴 등이 알려져 있다[30]. 천연식물 소재 중 국내에서 자생되거나 재배되는 산채 및 나물류는 인체에 미치는 독성 및 돌연변이성 영향이 거의 없는 반면, 항산화, 항염, 항암, 혈전용해능 등 다양한 활성이 있어 천연 식물유래 건강기능성 식품 및 식품소재로 개발되고 있다[13].

초석잠(*Stachys sieboldii* Miq.) 및 택란(*Lycopus lucidus* Turcz) 뿌리는 일본과 중국에서는 뇌경색과 노인성치매 예방에 효과

적이며 또한 기억력 증진과 장을 강화하는 효과가 있어 장수 채로 알려져 있다[27]. 또한 초석잠 및 택란 뿌리 추출물에 의한 항산화 효과[2, 10, 17, 22, 29, 32], 항암[11, 24] 및 항염증[19] 효과가 보고되어 있다. 그러나 초석잠 및 택란 잎의 생리활성에 관한 연구는 미미한 실정이다. Lee 등[18]은 택란 잎으로부터 pentacyclic triterpenes 류인 ursolic acid, oleanolic acid 및 betulinic acid를 분리하였고 이들 화합물들의 생리활성을 비교한 결과 betulinic acid가 acyl-coA-cholesterol acyltransferase (ACAT)-1과 ACAT-2의 활성을 강력히 저해했다고 보고하였다. Yang 등[33]은 택란 잎으로부터 α -galactooligosaccharides 다당류를 분리하였고 이들 다당류는 면역관련 세포의 활성을 증진시켜 면역시스템을 개선시켰다고 보고하였다. 그러나 초석잠 잎 추출물에 의한 생리활성 연구는 거의 없는 실정이다. 체내에서 분자상 산소는 생물에 중요한 것이나 전자를 받아 반응성 높은 유리 라디칼이 되며 슈퍼옥사이드 라디칼 및 히드록시라디칼이 되어 조직 손상의 원인이 된다. 세포내 활성산소 라디칼 증가와 암을 포함한 여러 가지 만성 질환 발병과의 연관성이 높은 것으로 보고되었다. 생체 내 항산화 시스템이 조절할 수 없을 정도로 과잉의 활성산소 라디칼은 DNA손상, 돌연변이 및 변질된 유전자 발현 등을 일으켜 발암을 유발할 수가 있다[9]. 따라서 본 연구에서는 초석잠 및 택란

*Corresponding author

Tel : +82-51-410-4757, 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.

잎에 대한 다양한 생리활성을 규명하기 위하여 두 종의 잎 추출물에 의한 라디칼 소거활성을 검토하여 플라보노이드 함량과의 상관관계를 알아보았고 인체암세포에 대한 세포독성 효과를 규명하여 향후 이를 이용한 기능성 식품 개발을 위한 기초자료를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 초석잠 잎과 택란 잎은 미산약초농장(경상북도 대구광역시)에서 건조된 초석잠 및 택란 잎을 구입하여 사용하였다.

추출

건조 초석잠 잎(200 g)과 택란 잎(200 g)을 분쇄한 후 acetone:methylene chloride를 1:1 혼합용매에 시료가 충분히 잠기도록 하여 24시간 침치한 후 추출하였다. 이 과정을 2회 반복하여 얻은 여액은 40℃ 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (N-1000, EYELA Co., Tokyo, Japan)로 농축하여 acetone/methylene chloride (A+M) 추출물(초석잠 잎 A+M 추출물 1.1 g, 택란 잎 A+M 추출물 5.1 g)을 얻었다. A+M 용매로 추출되지 않은 성분은 methanol (MeOH)로 추출하고자 남은 잔사에 A+M과 동량의 MeOH을 첨가하여 위와 동일한 방법으로 2회 반복한 후 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다(초석잠 잎 MeOH 추출물 2.5 g, 택란 잎 MeOH 추출물 11.4 g)[1]. 따라서 본 실험에 사용된 시료는 4종 추출물들, *S. sieboldii* Miq. 잎 A+M, *S. sieboldii* Miq. 잎 MeOH, *L. lucidus* Turcz. 잎 A+M 그리고 *L. lucidus* Turcz. 잎 MeOH 추출물이다. 실험에는 각각의 추출물들을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

시료 중 총 플라보노이드(flavonoid) 함량은 Chae 등[3]의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 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 반응시켰다. 반응이 끝난 후 UV-visible spectrometer (Helios beta, Thermo Electron Co., Rochester, NY, USA)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질은 rutin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성

시료의 DPPH 라디칼 소거활성 측정[4]을 위해 먼저 각 추출물을 MeOH로 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 spectrophotometer (Helios beta, Thermo Electron Co., Rochester, NY, USA)로 518 nm에서 측정하였다. 이때 대조군은 천연항산화제인 L-ascorbic acid와 합성항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT)를 사용하였다. 시료의 DPPH 라디칼 소거활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

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

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation (ABTS+) 라디칼 소거활성

초석잠 잎 및 택란 잎 추출물에 대한 ABTS+ 라디칼 소거활성은 Re 등[25]의 방법으로 측정하였다. 7 mM의 ABTS+와 2.45 mM의 potassium persulfate를 첨가하여 radical생성을 위해 암소에서 16시간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도가 0.68~0.72 가 되도록 EtOH로 희석하였다. ABTS+ 희석액 0.98 ml와 추출물 0.02 ml를 혼합하여 암소에서 10분간 반응시킨 후 UV-visible spectrophotometer 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 천연항산화제인 L-ascorbic acid와 합성항산화제인 BHT를 사용하였다. 시료의 ABTS+ 라디칼 소거활성은 DPPH 소거활성의 식에 따라 계산하였다.

세포 내 활성산소종(reactive oxygen species) 생성 억제 효과

한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 인체 섬유종세포(HT-1080)를 분양받아 본 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였다. HT-1080 세포는 100 units/ml의 penicillin-streptomycin (Gibco Co., Grand Island, NY, USA)과 10% Fetal bovine serum (FBS, Corning cellgro, Manassas, Virginia, USA)이 함유된 Roswell Park Mineral Institute (RPMI) 1640 (Lonza, Walkersville, Virginia, USA) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Electric Biomedical Co., Ltd., Tokyo, Japan)에서 배양하면서 배양 중인 세포를 일주일에 2번 새로운 배지로 바꾸주었다. 일주일 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA (Gibco, Co.)로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 집적된 세포에 배지를 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 cell culture flask에 10 ml씩 일정한 수로 분할하여 주입하고, 6일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 세포 내 활성산소종은 DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) assay [15]로 측정하였다. DCFH-DA는 세포 내 활성산소종과 반응하여 형광물질(Dichlorofluorescein, DCF)을 만들어 내는

것으로 이 시약을 세포 속에 넣어 발생하는 형광을 측정함으로써 세포 내의 활성산소종을 측정할 수 있다. 세포를 96 well cell culture plate에 분주한 후 24시간 배양하고, PB로 씻은 후 20 μ M DCFH-DA을 각 well에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 20분간 pre-incubation하였다. 각 well에 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양한 후, DCFH-DA을 없애고 세포는 다시 PBS로 씻은 후 500 μ M H₂O₂를 처리하여 시간 별로 DCF fluorescence를 excitation 488 nm, emission 530 nm에서 microplate reader (VICTOR3, Perkin Elmer, Co., Waltham, MA, USA)로 측정하였다. 대조군들(blank군과 control군)은 시료 대신 PBS를 처리하며, control군은 500 μ M H₂O₂를 처리를 하고, blank군은 500 μ M H₂O₂대신 PBS를 처리하여 측정하였다.

MTT assay

배양된 세포(AGS 인체 위암세포, HT-29인체 결장암 세포, HT-1080 인체 섬유종 세포)는 96 well cell culture plate에 5×10⁴ cells/ml이 되도록 100 μ l씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 배지는 제거한 뒤 각 시료를 배지로 희석하여 각 well당 100 μ l씩 첨가하고, 대조군에는 시료대신 PBS를 100 μ l씩 첨가하였다. 이 plate를 다시 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 배양 후 MTT assay [6]를 위하여 3-(4,5-dimethylthiazole)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)시약 5 mg을 PBS 1 ml로 녹인 후, 10% FBS가 함유된 배지 9 ml와 희석하여 100 μ l를 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 μ l씩 분주하여 5~10분간 반응시켜 microplate reader (VICTOR3, Perkin Elmer, Co., Waltham, MA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해서 환원된 양을 나타내며, 따라서 각 well에 존재하는 세포의 생존수와 비례한다.

통계분석

실험결과는 Mean \pm SD (Standard deviation)으로 나타내었다. 분석된 실험 데이터는 대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 자료로부터 one-way ANOVA를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였고 사후검증은 Tukey's test를 실시하여 각 군들간의 유의성은 알파벳으로 표시하였다(SAS program v.9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

결과 및 고찰

총 플라보노이드 함량

Table 1. Contents of total flavonoids of extracts from *Stachys sieboldii* Miq. and *L. lucidus* Turcz. leaves

Samples ¹⁾	Total flavonoid contents (mg/g) ²⁾
<i>S. sieboldii</i> Miq. A+M	7.59 \pm 0.19 ^{c3)}
<i>S. sieboldii</i> Miq. MeOH	9.44 \pm 0.19 ^c
<i>L. lucidus</i> Turcz. A+M	55.74 \pm 2.04 ^b
<i>L. lucidus</i> Turcz. MeOH	119.63 \pm 7.78 ^a

¹⁾*S. sieboldii* Miq. A+M, extract with acetone+methylene chloride; *S. sieboldii* Miq. MeOH, extract with methanol; *L. lucidus* Turcz A+M, extract with acetone+methylene chloride; *L. lucidus* Turcz MeOH, extract with methanol

²⁾mg rutin equivalent/g dry weight

³⁾Values are expressed as mean \pm SD. Values in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$ using Turkey's test.

초석잠 및 택란 잎 추출물들의 총 플라보노이드 함량은 Table 1에 나타내었다. 택란 잎 A+M 및 MeOH 추출물들의 총 플라보노이드 함량은 각각 55.74 \pm 2.04 mg/g 및 119.63 \pm 7.78 mg/g으로 택란 잎 MeOH 추출물의 총 플라보노이드 함량이 가장 높았음을 알 수 있었다. Song 등[29]은 택란의 잎, 줄기, 뿌리의 물 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 비교한 결과 택란 잎 추출물에서 가장 높게 나타났다고 보고하였다. 선행연구에서 초석잠 및 택란 뿌리 A+M 및 MeOH 추출물들의 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과 택란 뿌리 A+M 추출물에서 가장 높았다[20].

초석잠 및 택란 잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성

초석잠 및 택란 잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 활성산소를 제거할 수 있는 능력인 EDA (electron donating ability, %)로 Table 1에 나타내었다. 4종 추출물들을 각각 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 및 0.5 mg/ml의 농도로 대조군(L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였다. 먼저 4종 추출물들과 비교했을 때 택란 잎 MeOH 추출물의 활성산소 소거능이 가장 우수하였다 ($p < 0.05$). 4종 추출물들의 IC₅₀값은 초석잠 잎 A+M 0.72 mg/ml, 초석잠 잎 MeOH 1.69 mg/ml, 택란 잎 A+M 1.74 mg/ml 및 택란 잎 MeOH 0.06 mg/ml로 나타났다. 이는 앞서 택란 잎 MeOH 추출물의 높은 총 플라보노이드와 연관 있는 것으로 여겨진다. Jeon과 Park [10]은 초기 DPPH 라디칼의 50%를 소거하는데 필요한 농도(IC₅₀)는 초석잠 뿌리 추출물과 양성 대조군인 BHT, ascorbic acid, α -tocopherol이 각각 1.42와 0.35, 0.28, 0.44 mg/ml로 나타났다고 보고하였다. Song 등[29]은 택란의 부위별 물 추출물을 100 g/ml 농도에서 DPPH를 측정된 결과 잎 > 뿌리 > 줄기 순으로 뿌리나 줄기보다 잎 추출물에서 약 5.6배 이상 높은 전자공여능을 나타내었다고 보고하였다. Lee와 Lim [20]은 초석잠 및 택란 뿌리 추출물들을 비교한 결과 택란 뿌리 A+M 추출물에 의한 DPPH 소거능이

Table 2. DPPH radical scavenging effect of extracts from *Stachys sieboldii* Miq. and *Lycopus lucidus* Turcz. leaves

Samples ¹⁾	Concentrations (mg/ml)			
	0.05	0.1	0.25	0.5
<i>S. sieboldii</i> Miq. A+M	13.2±0.21 ^{e2)}	15.5±0.17 ^e	18.0±0.21 ^e	22.0±0.28 ^f
<i>S. sieboldii</i> Miq. MeOH	12.3±0.31 ^f	14.9±0.10 ^e	19.1±0.07 ^d	27.1±0.21 ^e
<i>L. lucidus</i> Turcz. A+M	16.2±0.23 ^d	22.0±0.45 ^d	33.4±0.40 ^c	51.6±2.35 ^d
<i>L. lucidus</i> Turcz. MeOH	47.2±0.31 ^c	83.1±0.64 ^b	86.7±0.03 ^b	85.5±0.06 ^c
L-ascorbic acid	99.7±0.00 ^a	99.8±0.03 ^a	99.8±0.00 ^a	99.8±0.00 ^a
BHT	54.7±0.03 ^b	69.8±0.10 ^c	87.1±0.03 ^b	91.5±0.07 ^b

¹⁾*S. sieboldii* Miq. A+M, extract with acetone + methylene chloride; *S. sieboldii* Miq. MeOH, extract with methanol; *L. lucidus* Turcz. A+M, extract with acetone+methylene chloride; *L. lucidus* Turcz. MeOH, extract with methanol

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

Table 3. ABTS radical scavenging effect of extracts from *Stachys sieboldii* Miq. and *Lycopus lucidus* Turcz. leaves

Samples ¹⁾	Concentrations (mg/ml)			
	0.05	0.1	0.25	0.5
<i>S. sieboldii</i> Miq. A+M	7.6±0.00 ^{e2)}	9.7±0.00 ^d	13.05±0.01 ^d	13.6±0.01 ^c
<i>S. sieboldii</i> Miq. MeOH	24.5±0.00 ^d	39.9±0.01 ^c	65.3±0.01 ^c	85.33±0.00 ^b
<i>L. lucidus</i> Turcz. A+M	38.6±0.01 ^c	53.6±0.01 ^b	82.0±0.01 ^b	85.40±0.00 ^b
<i>L. lucidus</i> Turcz. MeOH	85.3±0.02 ^b	91.3±0.01 ^a	91.8±0.00 ^a	91.67±0.00 ^a
L-ascorbic acid	93.0±0.00 ^a	92.8±0.00 ^a	93.1±0.00 ^a	92.8±0.00 ^a
BHT	92.9±0.00 ^a	92.8±0.00 ^a	93.1±0.00 ^a	93.0±0.00 ^a

¹⁾*S. sieboldii* Miq. A+M, extract with acetone+methylene chloride; *S. sieboldii* Miq. MeOH, extract with methanol; *L. lucidus* Turcz. A+M, extract with acetone+methylene chloride; *L. lucidus* Turcz. MeOH, extract with methanol

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

우수하였다고 보고하였다. Lee 등[16]은 남천들깨 및 보라들깨 잎 분획물들에 의한 DPPH 소거활성을 비교한 결과 보라들깨 잎 추출물로부터 얻어진 부탄올 분획물에 의한 소거활성이 높았다고 보고하였다.

초석잠 및 택란 잎 추출물의 ABTS+ 라디칼 소거활성

초석잠 및 택란 잎 추출물의 ABTS+ 라디칼 소거활성도 DPPH 라디칼 소거활성과 마찬가지로 전자공여능인 EDA로 Table 3에 나타내었다. 4종 추출물들을 각각 0.05, 0.1, 0.25 및 0.5 mg/ml의 농도로 대조군(L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였다. DPPH 결과와 유사하게 A+M 추출물과 비교했을 때 MeOH 추출물에 의한 소거활성이 더 높았으며 초석잠 잎 추출물보다 택란 잎 추출물에 의한 라디칼 소거 활성이 더 높았다($p < 0.05$). 첨가농도 0.25 및 0.5 mg/ml 농도에서 초석잠 잎 MeOH 추출물은 각각 65.3 및 85.3%의 소거능을 나타내었으며 택란 잎 MeOH 추출물은 각각 91% 이상으로 양성대조군인 BHT 및 L-ascorbic acid 값과 유사하게 나타내었다. 4종 추출물들의 IC₅₀값은 초석잠 잎 A+M은 0.08 mg/ml, 초석잠 잎 MeOH은 0.24 mg/ml, 택란 잎 A+M은 0.10 mg/ml 및 택란 잎 MeOH은 0.03 mg/ml로 나타났다. 반면 초석잠 및 택란

뿌리 추출물들에 의한 항산화 효과를 비교한 경우 초석잠 및 택란 뿌리 A+M 추출물들에 의한 소거능이 초석잠 및 택란 뿌리 MeOH 추출물들보다 높았다고 보고되었다[20]. 초석잠 및 택란 잎 플라보노이드 함량과 항산화 활성간의 상관관계를 분석한 결과 DPPH 소거능 및 ABTS 소거능간에 각각 0.936 및 0.943으로 나타났다. 선행연구결과부터 초석잠 및 택란 뿌리 플라보노이드 함량과 항산화 활성간의 상관관계를 분석한 결과 DPPH 소거능 및 ABTS 소거능간에 각각 0.843 및 0.934으로 나타났다. 택란 뿌리 추출물의 항산화 활성은 아질산염 소거능, ABTS 라디칼 소거능, Xanthine oxidase 저해 활성, DPPH 라디칼 소거능 순으로 효율성이 있는 것으로 확인되었고 건조 택란 추출물과 비교했을 때 볏은 택란 추출물에 의한 항산화 활성이 유의적으로 높은 수치를 나타내었다고 보고되었다[32]. Kim 등[13]은 곤달비 잎 에틸아세테이트 분획물에 의한 ABTS 라디칼 소거활성이 가장 높았고 이는 곤달비 잎 에틸아세테이트 분획물에 가장 높은 폴리페놀 함량과 관련이 있다고 보고했다. Fialova 등[7]은 *L. europaeus* 잎으로부터 rosmarinic acid를 포함하는 극성 페놀성 화합물 10종을 동정하였으며 잎 추출물은 강한 항균작용과 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성 또한 우수하였다고 보고하였다.

초석잠 및 택란 잎 추출물의 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species) 생성 억제효과

초석잠 및 택란 잎의 A+M 및 MeOH 추출물을 0.05 및 0.025 mg/ml의 농도로 인체 섬유육종세포(HT-1080)에 처리하여 세포 내 활성 산소종을 측정된 결과 두 추출물들 모두 측정시간 120분이 지남에 따라 높은 세포 내 활성산소종 억제 효과를 나타내었다(Fig. 1). 초석잠 잎 추출물들의 경우, A+M 추출물에 의한 세포 내 활성산소종 감소효과가 높았고 0.05 mg/ml 농도에서 대조군과 비교하여 높은 억제효과를 나타내었다($p < 0.05$). 반면 택란 잎 추출물의 경우, MeOH 추출물이 A+M 추출물과 비교했을 때 높은 활성산소종 생성 억제효과를 나타내었다($p < 0.05$). 선행연구에서 초석잠 및 택란 뿌리 추출물들에 의한 활성산소종 생성 억제효과를 비교한 경우 택란 A+M 추출물에 의한 생성 억제효과가 가장 높았음을 살펴 보았다[20]. 초석잠 뿌리 추출물의 에틸아세테이트 분획물은 α -tocopherol, BHT, butylated hydroxyanisole (BHA)와 같은 항산화제에 비해서 과산화지질 형성 억제능, 아질산염 소거능, 전자공여능이 우수한 항산화 활성을 갖는다고 보고되었다[8]. 그러나 초석잠 잎 추출물에 의한 항산화 활성에 대한 연구는 잘 알려져 있지 않다. Song 등[29]은 택란의 잎, 줄기 뿌리의 물 추출물의 항산화 효과를 비교한 결과 택란 잎의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 가장 높았고 이는 택란 잎의 높은 항산화 활성(DPPH, ABTS, Fe^{2+} chelating, hydroxyl radical, SOD)과 높은 아질산염 소거활성과 관련성이 있다고 보고하였다. 택란의 페놀성 화합물은 rosmarinic acid, rosmarinic acid, ethyl rosmarinic acid와 flavonoids, luteolin, luteolin-7-O-glucuronide methyl ester으로 알려져 있고 이들 성분의 항산화 작용이 보고되어 있다[28]. Lu 등[22]의 연구결과에서도 택란

의 총 페놀함량과 FRAP 및 TEAC 활성 사이에 유의적 양의 상관관계가 있다고 보고하였다. Lin 등[21]은 택란 다당류 식이 첨가는 마우스 혈청과 간 SOD과 glutathione peroxidase의 활성을 증가시켰고 과산화물 함량을 감소시켰다고 보고하였다. 이상의 결과들부터 택란 MeOH 추출물의 플라보노이드 함량이 높았으며 이는 택란 MeOH 추출물의 우수한 항산화 효과와도 연관성이 있음을 시사한다. 본 연구는 다양한 생리 활성이 보고되어 있는 초석잠과 택란 잎 추출물을 이용한 식품 개발을 위한 초기 예비실험으로 향후 기초 자료를 제시하고자 한다.

초석잠 및 택란 잎 추출물의 세포독성 효과

초석잠 및 택란 잎 추출물들에 의한 인체 암세포에 대한 세포독성 저해효과를 MTT assay를 시행하여 알아보았다. 초석잠 잎 A+M 및 MeOH 추출물들은 첨가농도 0.5 mg/ml의 농도에서 AGS 암세포에 대한 세포독성 효과는 각각 85%로 나타났다($p < 0.05$)(Fig. 2). 택란 잎 A+M 및 MeOH 추출물들은 첨가농도 0.5 mg/ml의 농도에서 AGS 암세포에 대한 세포독성 효과는 각각 90% 및 72%로 나타났다($p < 0.05$)(Fig. 2). Fig. 3은 초석잠 및 택란 잎 추출물들에 의한 HT-29 암세포에 대한 세포독성 저해효과를 나타낸 것이다. 택란 잎 A+M, 초석잠 잎 A+M, 택란 잎 MeOH 및 초석잠 잎 MeOH 추출물 순으로 HT-29 암세포에 대한 세포독성 효과가 높았다. 초석잠 잎 A+M 및 MeOH, 택란 잎 A+M 및 MeOH 추출물들의 AGS 암세포에 대한 IC_{50} 값은 각각 0.03, 0.14, 0.07 및 1.19 mg/ml 이었고 HT-29 암세포에 대한 IC_{50} 값은 각각 0.52, 1.03, 0.07 및 0.52 mg/ml 이었다. Fig. 4는 초석잠 및 택란 잎 추출물들을 HT-1080 암세포에 대한 세포독성 저해효과를 나타낸 것으로

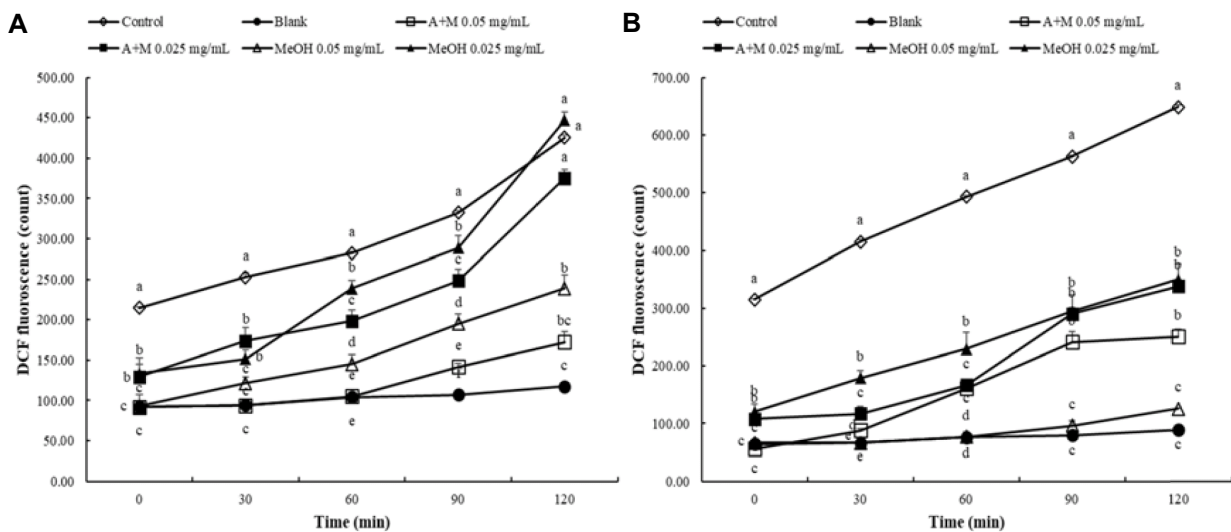


Fig. 1. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from *S. sieboldii* Miq. (A) and *L. lucidus* Turcz. (B) leaves on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells. Values are expressed as mean±SD. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ using Turkey's test.

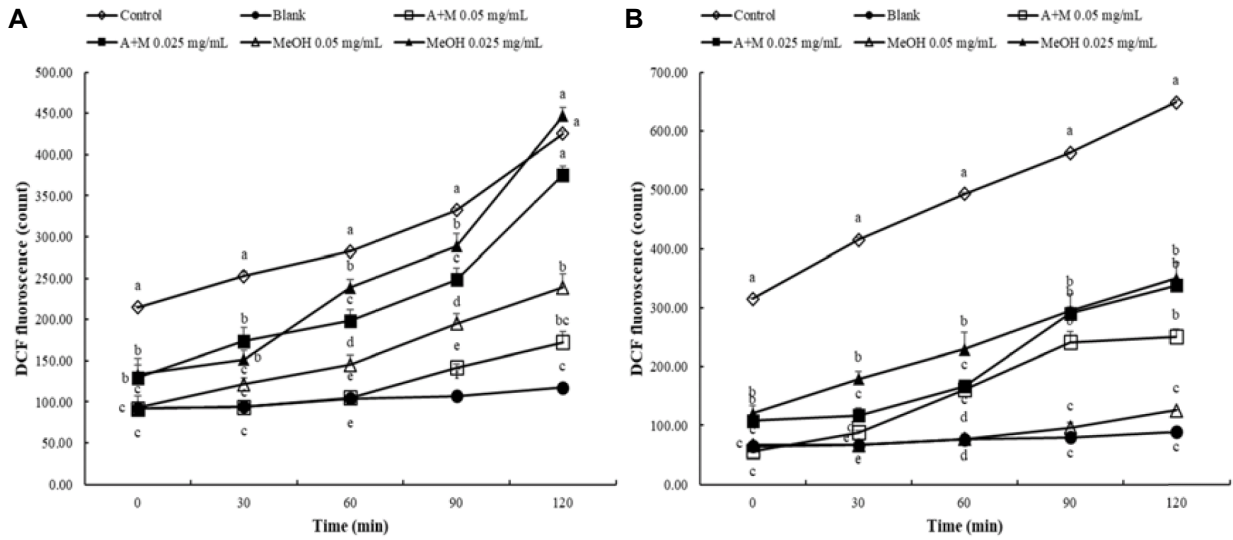


Fig. 2. Effect of acetone/methylene chloride (A+M, A) and methanol (MeOH, B) extracts from *S. sieboldii* Miq. and *L. lucidus* Turcz. leaves on the cell viability of AGS human gastric cancer cells. Values are expressed as mean \pm SD. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ using Turkey's test.

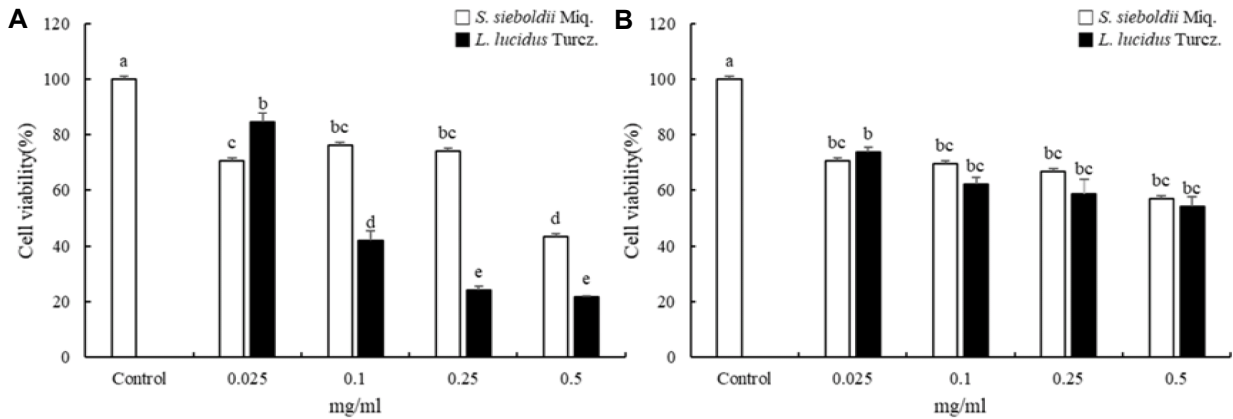


Fig. 3. Effect of acetone/methylene chloride (A+M, A) and methanol (MeOH, B) extracts from *S. sieboldii* Miq. and *L. lucidus* Turcz. leaves on the cell viability of HT-29 human colon cancer cells. Values are expressed as mean \pm SD. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ using Turkey's test.

택란 잎 A+M 추출물(0.5 mg/ml의 첨가농도)은 85% 저해율을 나타내어 4종 추출물들 중 가장 높은 세포독성 저해효과를 나타내었다. HT-1080 암세포에서 초석잡 잎 A+M 및 MeOH, 택란 잎 A+M 및 MeOH 추출물들의 IC₅₀ 값은 각각 0.11, 0.49, 0.06 및 0.24 mg/ml 이었다. 따라서 인체 암세포들에 대한 세포독성 저해효과는 택란 잎 A+M 추출물에 의한 활성이 가장 높았음을 알 수 있었고 이는 택란 잎 A+M 추출물의 MeOH 추출물 다음으로 높은 함량의 총 플라보노이드과 관련이 있는 것으로 사료된다. Kokhdan 등[14]은 *S. pilifera* 메탄올 추출물, alkaloid와 terpenoid 분획물은 nuclear factor- κ B (NF- κ B), nitric oxide 및 caspase-8과 caspase-9의 활성을 저해하면서 apoptosis를 유도하여 HT-29 결장암 세포에 대해 강한 세포독성을 나타내었다고 보고하였다. Rencuzogullari 등[26]은 *S.*

petrokosmos 잎 추출물은 항유전자 독성 효과가 있다고 보고하였다. Park 등[24]은 택란 메탄올 추출물이 DNA 손상을 유발하고 세포주기 조절 관련 신호전달 과정을 통해 인간 폐암 세포인 A549의 G1 arrest를 유도하여 세포의 증식을 억제하였다고 보고하였다. 그러나 초석잡 및 택란 잎 추출물에 의한 세포독성에 대한 연구는 잘 알려져 있지 않다. Malik와 Yuldashv 등[23]은 택란 잎으로부터 플라보노이드, triterpenes 및 탄닌류 등을 분리하였다. Daskiewicz 등[5]은 42종 플라보노이드를 조사한 결과 이들 플라보노이드는 caspase 활성을 증가시켜 HT-29 결장암 세포의 apoptosis를 유도하여 증식을 억제시켰다고 보고하였다. 따라서 꾸준한 플라보노이드 섭취는 위암 및 결장암 위험 억제와 매우 밀접한 관련이 있다고 보고되었다[12, 31]. 본 연구 결과로부터 다양한 생리활성이

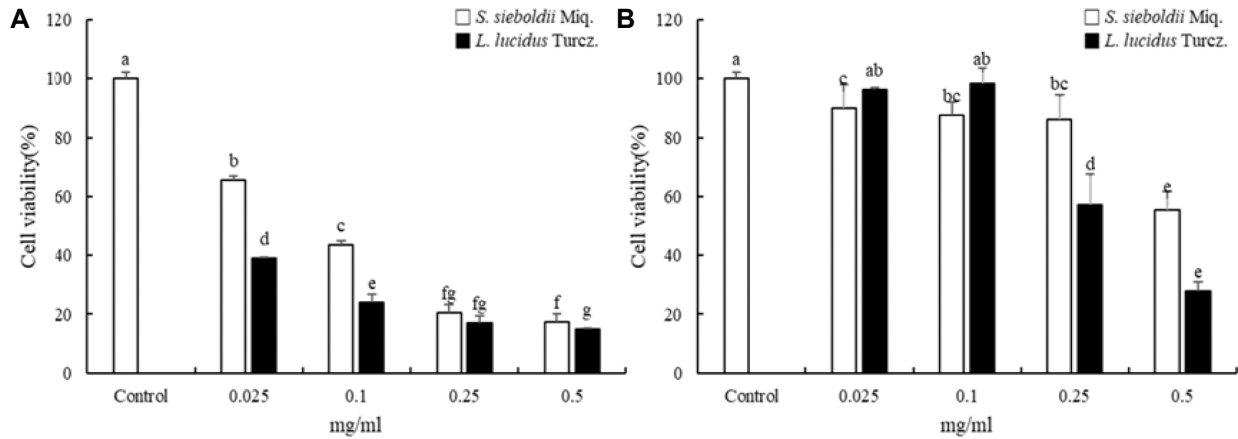


Fig. 4. Effect of acetone/methylene chloride (A+M, A) and methanol (MeOH, B) extracts from *S. sieboldii* Miq. and *L. lucidus* Turcz. leaves on the cell viability of HT-1080 human fibrosarcoma cells. Values are expressed as mean \pm SD. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ using Turkey's test.

보고되어 있는 초석잠 및 택란 뿌리 이외에도 초석잠 및 택란 잎 추출물들은 높은 함량의 플라보노이드를 함유하였고 이는 높은 자유 라디칼 소거활성과 암세포 독성효과와 관련성이 높음을 알 수 있었다. 따라서 초석잠 및 택란 잎은 플라보노이드 이외에도 지용성 생리활성물질을 함유하고 있는 것으로 사료되고 여기에 대해서는 향후 생리활성 물질 분리 및 정제 연구가 필요하다.

감사의 글

본 과제(결과물)은 2017년 대한민국 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2017R1A2B4005915)의 연구결과입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Bae, J. H., Jang, J. R. and Lim, S. Y. 2014. Production of glutathione and reactive oxygen species in cell line HT-1080 treated with chub mackerel (*Scomber japonicus*) extracts. *Philipp. Agric. Sci.* **97**, 180-184.
- Baek, H. S., Na, Y. S., Kim, D. H., Lee, C. H., Ryu, B. H. and Song, S. K. 2004. Antioxidant Activities of *Stachys sieboldii* MIQ. Roots. *J. Life Sci.* **14**, 1-7.
- 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.
- Choi, I. Y., Song, Y. J. and Lee, W. H. 2010. DPPH radical scavenging effect and antimicrobial activities of some herbal

- extracts. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **28**, 871-876.
- 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.
- Denizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **89**, 271-277.
- Fialova, S., Slobodnikova, L., Veizerova, L. and Grancai, D. 2015. *Lycopus europaeus*: phenolic fingerprint, antioxidant activity and antimicrobial effect on clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Natural Product Res.* doi.org/10.1080/14746419.2015.1010086.
- Feng, K. F., Chen, W., Sun, L., Liu, J., Zhao, Y., Li, L., Wang, Y. and Zhang, W. 2015. Optimization extraction, preliminary characterization and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from *Stachys sieboldii* Miq. Tubers. *Carbohydr. Polym.* **125**, 45-52.
- Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A. G. and Panayiotidis, M. I. 2008. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett.* **266**, 6-11.
- Jeon, K. S. and Park, S. I. 2015. Antioxidative properties of Chinese Artichoke (*Stachys sieboldii* Miq) added white bread. *Kor. J. Culinary Res.* **21**, 120-132.
- 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.
- 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.
- Kim, K. H., Kim, N. Y., Kim, Han, I. A. and Yook, H. S. 2012. Study on antioxidant effects of fractional extracts from *Ligularia sencephala* leaves. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**,

- 1220-1225.
14. Kokhdan, E. P., Sadeghi, H., Ghafoori, H., Sadeghi, H., Danaei, N., Javadian, H. and Aghamaali, M. R. 2018. Cytotoxic effect of methanolic extract, alkaloid and terpenoid fractions of *Stachys pilifera* against HT-29 cell line. *Res. Pharm. Sci.* **13**, 404-412.
 15. LeBel, C. P., Ischiropoulos, H. and Bondy, S. C. 1992. Evaluation of the probe 2', 7'-Dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 227-231.
 16. Lee, J. I., Jin, C., Ryu, J. H. and Cho, J. 2008. Antioxidant and neuroprotective effects of *Perilla frutescens* var. *japonica* leaves. *Yakhak Hoeji* **52**, 117-124.
 17. 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.
 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. Lee, J. W. and Lim, S. Y. 2018. Comparison of flavonoid content and antioxidant effect of extracts from *Stachys sieboldii* Miq. and *Lycopus lucidus* Turcz. *J. Life Sci.* **28**, 841-848.
 21. Lin, C. R., Zuo, S. Y., Xiong, W. and Chen, G. Y. 2012. Antioxidation effects of *Lycopus lucidus* polysaccharides on aged mice induced D-galactose. *Medicinal Plants* **3**, 53-55.
 22. 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* Turcz. root at different harvest times. *Food Chem.* **183**, 91-100.
 23. Malik, A. and Yuldashev, P. 2002. Flavonoids of *Lycopus lucidus*. *Chem. Nat. Comp.* **38**, 104-105.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Rencuzogullari, E., Yildiz, A. M. and Buyukleyla, M. 2012. The genotoxic and anti-genotoxic effects of *Stachys petroskosmos* leaf extract in human lymphocytes using microsomal fractions. *Cytotechnology* **64**, 83-94.
 27. Ryu, B. H. and Kim, S. O. 2004. Effects of methanol extract of *Stachys sieboldii* Miq. on acetylcholine esterase and monoamine oxidase in rat brain. *Kor. J. Food Nutr.* **17**, 347-355.
 28. Slusarczyk, S., Hajnos, M., Skalicka-Wozniak, K. and Matkowski, A. 2009. Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. *Food Chem.* **113**, 134-138.
 29. 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. Herbology* **31**, 21-28.
 30. Sun, W. S., Roh, J. S., Oh, S. U., Lee, J. L., Oh, W. T. and Kim, J. H. 1999. Screening of antioxidants from Indonesian medical plants. *Food Sci. Biotechnol.* **8**, 93-96.
 31. 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 cancer risk: a case-control study in China. *Br. J. Nutr.* **116**, 1275-1287.
 32. Yang, M. O. 2017. Antioxidant properties of hot water extract of *Lycopus lucidus* Turcz. Tubers. *Kor. J. Community Living Sci.* **28**, 103-113.
 33. Yang, X., Lv, Y., Tian, L. and Zhao, Y. 2010. Composition and systemic immune activity of the polysaccharides from an herbal tea (*Lycopus lucidus* Turcz.). *J. Agric. Food Chem.* **58**, 6075-6080.

초록 : 초석잠 및 택란 잎 추출물의 항산화 및 세포독성 활성과 총 플라보노이드 함량 비교

나은¹ · 이정우² · 임선영^{2*}

(¹한국해양대학교 해양과학기술전문대학원, ²한국해양대학교 해양생명과학부)

택란 잎 A+M 및 MeOH 추출물의 총 플라보노이드 함량은 각각 55.7±2.04 및 119.6±7.78 mg/g으로 택란 잎 MeOH 추출물의 총 플라보노이드 함량이 높았고 초석잠 잎 추출물들보다 높았다. 4종 추출물들과 비교했을 때 택란 A+M 추출물은 다른 추출물과 비교했을 때 DPPH 소거능이 우수하였다. ABTS 라디칼 소거활성에서도 초석잠 및 택란 잎 MeOH 추출물은 0.5 mg/ml 농도에서 각각 85 및 91%의 라디칼 소거능을 나타내었으며 합성항산화제인 BHT와 L-ascorbic acid와 유사한 소거활성을 나타내었다. 이러한 항산화 활성은 앞서 택란 잎 MeOH 추출물의 높은 총 플라보노이드 함량과 연관성이 있는 것으로 여겨진다. 초석잠 및 택란 잎 A+M 및 MeOH 추출물을 0.05 및 0.025 mg/ml의 농도로 인체 섬유육종세포(HT-1080)에 처리하여 세포 내 활성산소종을 측정할 결과 두 추출물들 모두 측정시간 120분이 지남에 따라 높은 세포 내 활성산소종 생성 억제효과를 나타내었다. 초석잠 잎의 경우 A+M 추출물에 의한 활성산소종 억제효과가 높았고 반면 택란 잎 MeOH 추출물은 0.05 mg/ml 농도에서 대조군과 비교하여 높은 억제효과를 나타내었다. 인체 암세포들(AGS, HT-29 및 HT-10180)에 대한 세포독성 효과를 측정할 결과 4종 추출물들 중 택란 잎 A+M 추출물에 의한 세포독성 효과가 가장 높았다. 본 연구 결과들로부터 라디칼 소거 활성에서 택란 잎 MeOH 추출물에 의한 항산화 효과가 높았으며 암세포에 대한 세포독성 효과는 택란 잎 A+M 추출물에서 가장 높은 활성을 확인하였다. 따라서 이는 택란 잎 A+M 및 MeOH 추출물들에 함유된 높은 함량의 총 플라보노이드와도 연관성이 있음을 나타낸다.