



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2014년 8월
박사학위논문

귀전우 및 줄풀 에탄올추출물의
생리활성 및 항암효과

조선대학교 대학원

보완대체학과

오 평 일

귀전우 및 줄풀 에탄올추출물의
생리활성 및 항암효과

The Biological Activity and Anticancer Effect of Ethanol
Extracts from *Euonymus Alatus* and *Zizania Latifolia*

2014년 8월 일

조선대학교 대학원

보완대체의학과

오 평 일

귀전우 및 줄풀 에탄올추출물의
생리활성 및 항암효과

지도교수 이 미 자

이 논문을 보완대체의학 박사학위 신청논문으로 제출함

2014년 4월

조선대학교 대학원

보완대체의학과

오 평 일

오평일의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	기근홍	인
위원	조선대학교	교수	박상학	인
위원	전남대학교	교수	이지신	인
위원	조선대학교	교수	안영준	인
위원	조선대학교	교수	이미자	인

2014년 6월

조선대학교 대학원

목 차

표목차	iii
도목차	iv
ABSTRACT	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 시약	7
2. 시료추출	7
3. 총 폴리페놀 함량측정	8
4. 총 플라보노이드 함량 측정	8
5. DPPH 라디칼 소거능	8
6. ABTS 라디칼 소거능	9
7. 세포배양	9
8. 세포생존율	9
9. Western blot 분석	10
10. 형광현미경 관찰	10
11. 통계분석	11
III. 결과	12
1. 추출수율	12
2. 총 폴리페놀 함량 측정	12
3. 총 플라보노이드 함량 측정	12

4. DPPH 라디칼 소거능	13
5. ABTS 라디칼 소거능	15
6. 추출물의 24시간 처리시 항암효능	17
7. 추출물의 48시간 처리시 항암효능	19
8. 추출물의 72시간 처리시 항암효능	21
9. Western blot 분석	24
10. 형광현미경 관찰	25
IV. 고찰	27
V. 결론	30
VI. 참고문헌	31
VII. 감사의 글	37

표 목 차

Table 1. Phenolic and flavonoid contents of extracts	12
Table 2. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of the extracts at different time periods	23

도목차

Fig. 1 Pictures of <i>Euonymus alatus</i> and <i>Zizania latifolia</i>	3
Fig. 2 DPPH radical scavenging activity of extracts.....	14
Fig. 3 ABTS radical scavenging activity of extracts.....	16
Fig. 4. The effect of anticancer activity from <i>Zizania latifolia</i> , <i>Euonymus alatus</i> extracts on cancer cells (AGS, HeLa, HepG2, MCF-7) for 24 hr.....	18
Fig. 5. The effect of anticancer activity from <i>Zizania latifolia</i> , <i>Euonymus alatus</i> extracts on cancer cells (AGS, HeLa, HepG2, MCF-7) for 48 hr.	20
Fig. 6. The effect of anticancer activity from <i>Zizania latifolia</i> , <i>Euonymus alatus</i> extracts on cancer cells(AGS, HeLa, HepG2, MCF-7) for 72 hr.	22
Fig. 7. The <i>Euonymus alatus</i> extracts induced changes in the expression levels of apoptotic proteins.	24
Fig. 8. The stomach cancer (AGS) cells treated with <i>Euonymus alatus</i> (10, 50, 100 µg/mL) extract for 24 hr.	26

ABSTRACT

The Biological Activity and Anticancer Effect of Ethanol Extracts from *Euonymus Alatus* and *Zizania Latifolia*

OH, Pyung Il

Advisor : Prof. Lee, Mi Ja, M.D., Ph.D

Department of Complementary and Alternative Medicine,
Graduate School of Chosun University

In the middle of searching the potential treatment drugs of stomach cancer which is one of the main cancers in Korea, this study was designed the following research to find out the effects of *Euonymus alatus* and *Zizania latifolia* applied to a variety of a folk remedy. This study was confirmed phenolic and flavonoid contents, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activity to check the biological active and observed 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, Western blot and fluorescent microscope after experimenting with extracts from *Euonymus alatus* and *Zizania latifolia* in four kinds of cancer cells (AGS, Hela, HepG2, and MCF-7) to check anticancer activity.

An extraction rate of *Zizania latifolia* extracts ($7.3 \pm 0.1\%$) was twice higher than that of *Euonymus alatus* extracts ($3.5 \pm 0.3\%$), but phenolic contents in *Euonymus alatus* extracts (277.4 ± 7.8 GAE mg/g) was measured higher than in *Zizania latifolia* extracts (25.2 ± 0.4 GAE mg/g). Also in flavonoid contents, *Euonymus alatus* extracts (13.1 ± 1.1 QE mg/g) was measured higher than in *Zizania latifolia* extracts (6.5 ± 0.7 QE mg/g). *Euonymus alatus* extracts was measured higher than *Zizania latifolia* extracts in antioxidants scavenging DPPH

and ABTS radical, which is considered to contribute to phenolic and flavonoid contents. *Euonymus alatus* extracts revealed higher antioxidants than different extracts in an existing report, previewing the possibility to develop into natural antioxidants.

As a result of confirming anticancer activity of extracts from *Zizania latifolia* extracts and *Euonymus alatus*, *Zizania latifolia* extracts didn't have anticancer activity but *Euonymus alatus* extracts showed anticancer activity that peculiarly reduced only cancer cells, decreasing the survival rate of cancer cells. There was the highest anticancer activity in AGS, followed by HeLa, HepG2, and MCF-7. Also when experimenting with them for 48 hr. or 72 hr., they showed anticancer activity that isn't tolerant of cancer cells, resulting in constant decrease on cell survival.

As a result of conducting Western blot after disposing of *Euonymus alatus* extracts from AGS, Bax, pro-apoptotic factor, was increased and Bcl-2, anti-apoptotic factor, was decreased, which made intrinsic apoptosis occur and caspase-3 activated.

Based on these results, *Euonymus alatus* ethanol extracts showed the possibility of effective anticancer drugs. Also these results can be an opportunity to develop *Euonymus alatus* anticancer drugs. Thus it can be concluded that *Euonymus alatus* extracts can be used in developing medicine for anticancer drugs.

Key words : *Zizania latifolia*, *Euonymus alatus*, AGS, DPPH, ABTS, HeLa, HepG2, MCF-7, Caspase-3

I. 서론

우리나라는 전통적인 의학인 한의학에 관한 기성 한의서들이 다수 존재하며, 질병의 증상에 따른 다양한 약재들의 임상시험 결과에 관한 내용이 세부적으로 서술되어 있다. 현대인들의 생활습관 변화로 암, 성인병이 증가함에 따라 천연소재를 활용한 질병치료에 관심이 증가하고 있다.

귀전우(*Euonymus alatus*)는 낙엽관목인 화살나무의 가지에 코르크층이 이상발달로 생긴 익상돌기를 수피와 같이 채취하여 건조한 것으로 우리나라 전 지역에 자생하며(Fig. 1), 날개는 8.0~12 mm 정도로 회갈색~회황색을 띄며 맛은 약간 쓰다. 한의학에서는 行氣, 活血, 消積의 효능이 있어 氣血의 순환을 조절하고 통증을 경감시키고, 어혈을 제거하므로 각종 종양을 치료하는 약제로 사용되어져 왔다(1-4). 귀전우의 성분은 evonine, evonymine, alatamine, quercetin 등이 알려져 있다(5). 약리작용으로는 혈당강하작용, 장관수축작용 및 항암 작용 등이 알려져 있다(6).



Euonymus alatus

Zizania latifolia

Fig. 1. Pictures of *Euonymus alatus* and *Zizania latifolia*.

줄풀(*Zizania latifolia*)은 벼과에 속한 다년생 초본으로 키는 1~2 m쯤 자라며, 진흙 속에 굽고 짧은 뿌리가 옆으로 뻗으면서 자란다(Fig. 1). 중의학사전에서는 그 뿌리를 菰根, 열매를 菰米라 하여 消渴이나 利尿劑로 사용하였으며(7), 민간에서는 고혈압, 관절염, 변비, 피부병 등에 이용하거나, 흉년이 들었을 때 식량으로 쓰기도 하였다(8). 최근에는 신경세포에 산화적 손상을 유발시켜 줄풀 뿌리 추출물을 처리하여 세포생존율, DNA 분절 및 세포자멸사(apoptosis)와 관련된 유전자들의 활성을 분석한 결과 유의한 결과를 얻었다는 보고(9)가 있으며, 고장초와 발효 고장초가 각각 신체적 지구력의 향상과 항피로 효과를 가진다는 연구결과가 보고되었다(10).

2011년 우리나라 전체인구(50,111,483명) 45명 중 1명이 암치료를 받고 있거나 암 치료 후 생존하고 있는데, 특히 65세 이상 연령 군에서는 13명중 1명으로 이중 남자는 9명당 1명, 여자는 18명당 1명이 암 환자이거나 암 치료 후 생존하고 있는 것으로 나타났다. 남자는 위암이 가장 많이 발생하고 다음이 대장암, 폐암, 간암, 전립선암 순, 여자는 갑상선암, 유방암, 대장암, 위암, 폐암 순이다. 암 진단 후 5년 이상 생존한 암 환자는 전체 암 환자의 37.6%이며 위암은 69.4%로 높은 생존율을 보였으나, 간암 28.6%, 폐암 20.7%, 췌장암 8.7%로 낮은 생존율을 보인다. 암 발생 증가의 주요 원인은 인구고령화, 암 진단 기술 발달, 조기검진 활성화 및 서구형 식생활과 신체활동의 감소 등 생활습관의 변화 등으로 추정된다(11). 위암을 일으키는 위험요인은 흡연, 아질산염이 풍부한 음식과 야채, 헬리코박터 파일로리균 등이 보고되고 있다(12). 많은 환자들에서 암이 진행된 이후 발견되고, 수술 시행 후 항암치료나 방사선 치료를 시도 하지만 부작용 또한 적지 않아서 만족할 만한 치료 결과를 얻지 못하고 있다(13).

세포자멸사는 내인성 경로(intrinsic pathway) 또는 외인성 경로(extrinsic pathway)를 통해 일어나며 death receptor 관련 인자들, Bcl-2 및 세포자멸사 억제 인자들(Inhibitors of apoptosis, IAP), 그리고 카스파아제(caspase) 등의 유전자들에 의해 조절된다(14-20). 내인성 경로는 미토콘드리아 경로(mitochondrial pathway)라고도 불리며 미토콘드리아 외막에 존재하는 Bcl-2 family가 중요한 역할을 한다(15, 17). Bcl-2 family는 Bcl-2, Bcl-xL 등 세포자멸사를 억제하는 인자와 Bax, Bak, Bad 및 Bid 등 세포자멸사를 유발하는 인자로 나뉘며 이들은 이합체(dimer) 상태로 결합되어 미토콘드리아 외막에서 균형을 이루고 있다. 하지만 외부 자극에

의해 균형이 깨지면 미토콘드리아의 막전위가 변화되어 미토콘드리아 내에 존재하는 시토크롬 c (cytochrome c)와 같은 세포자멸사 유발인자들이 세포질로 방출된다. 이 시토크롬 c는 apoptosis activating factor-1 (Apaf-1), caspase-9과 함께 세포질에서 apoptosome 복합체를 형성하는데, 이 apoptosome은 비활성상태로 존재하고 있는 caspase-3를 활성화시키게 된다(16, 19). 또 다른 경로로 알려진 외인성 경로는 미토콘드리아와 비의존적 과정으로 death receptor pathway라고 불리며 tumor necrosis factor (TNF) family의 death receptor들의 활성화에 의해 일어난다(21). 세포막에 존재하는 DR4, DR5나 TNF receptor super family에 속하는 Fas, TNF 수용체(TNFR-1)에 TRAIL, FasL, TNF- α 와 같은 apoptotic ligand가 결합하게 되면 Fas-associated death domain (FADD) 또는 TNF receptor-associated death domain (TRADD)와 procaspase-8이 death-inducing signaling complex (DISC)를 형성하게 되어 caspase-8이 활성화 되어 세포자멸사를 유발하게 된다(22-26).

세포자멸사 유발에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려진 caspase들은 cysteine protease로 알려져 있다. 일반적으로 비활성전구체 상태로 존재하지만 세포자멸사 신호를 받게 되면 기질 특이적으로 aspartate 잔기를 절단되어 활성을 가지게 된다. Caspase는 크게 caspase-2, -8, -9 및 -10과 같은 class I 이나 caspase-3, -6 그리고 -7과 같은 class II 두 가지로 나눌 수 있다. Class I에 속하는 caspase들은 특이적인 분자들과 상호작용하게 되어 신호적 복합체(DISC)로 연결되고, 이러한 다양한 신호전달을 통해 class II에 속하는 caspase들을 활성화시켜 세포질에 존재하는 단백질의 분해를 유발한다(26-27).

본 연구에서는 우리나라 주요 암 중 하나인 위암의 치료 가능성 약물을 탐색하던 중 민간요법 등에 다양하게 응용되고 있는 귀전우와 줄풀의 효과를 알기 위하여 귀전우와 줄풀의 에탄올 추출물이 항산화 효능과 항암효능 및 그 작용기전을 확인하여 신약개발의 기초자료로 제공하고자 하였다. 이를 위하여 총 폴리페놀 함량측정, 총 플라보노이드 함량측정, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능, ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 라디칼 소거능 등을 확인하였고 항암효능을 확인하기 위해 4종의 암세포인 위암세포(AGS), 자궁경부암세포(HeLa), 간암세포(HepG2), 유방암세포(MCF-7)에 줄풀과 귀전우 추출물을 처리하여 세포생존율(MTT assay) 측정, Western blot, 형광현미경 관찰 등

을 하였다. 또한 caspases의 활성화가 세포자멸사를 유발하는지 알아보기 위해 귀전우와 줄포 추출물들이 암세포의 Bcl-2, Bax, caspases-3의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

줄फल과 귀전우는 (주)세화당(Sehwadang, Gwangju, Republic of Korea)에서 2013년 10월에 구입하여 사용하였으며 항산화실험에 관련된 Folin-Denis reagent, Gallic acid, quercetin, DPPH, ABTS는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

세포배양을 위한 RPMI-1640, minimum essential medium (MEM), fetal bovine serum (FBS)과 antibiotic-antimycotic reagent는 GIBCO-BRL (Grand Island, NY, USA)에서, dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich로부터, Western blot 분석을 위한 β -actin, Bcl-2, Bax, caspase-3 항체는 Santa Cruz Biotech Inc (Santa Cruz, CA, USA)에서, AGS(위암세포), HeLa(자궁경부암세포), HepG2(간암세포), MCF-7(유방암세포), Vero(신장세포)는 한국세포주은행에서, BCA Protein Assay는 Thermo Fisher Scientific Inc.에서, WEST-ZOL은 iNtRON Biotechnology (Seongnam, Republic of Korea)사에서 구입하여 사용하였다.

2. 시료추출

건조된 줄फल과 귀전우를 25 mesh로 분쇄하여 사용하였다. 각 시료 5 g을 80% 에탄올에 침지하고 상온에서 3시간동안 150 rpm으로 Orbital shaker (VS-201D, Vision Scientific Co.)에서 교반하며 추출하였다. 추출물은 Whatman paper No. 2로 filter하고 에탄올을 증발시키기 위해 진공회전증발농축기(N-1000S-W, Tokyo Rikakikai Co.)를 이용하여 감압 농축하였다. 각 시료는 50 mL conical tube에 넣어 초저온냉장고(MDF-794, Sanyo Electric Co.)에서 24시간동안 동결하여 동결건조기(PVTFD10R, Ilshin Lab Co.)로 분말화 하였다. 각 시료는 무게를 측정하여 추출수율(%)를 계산(28)하였으며, 차후 실험에 시료로 사용하였다.

3. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법에 의해 측정하였다. 1 mg/mL 농도에 추출물 25 μ L에 10배 희석시킨 Folin-Denis reagent를 0.5 mL 첨가하였다. 상온에서 5분 반응 후 0.5 mL에 7.5% Na_2CO_3 를 첨가하고 90분 동안 반응시켰다. UV-vis spectrophotometer를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 이용하여 총 페놀 함량을 당량(equivalent, GAE mg/g dw) 하였다.

4. 총 플라보노이드 함량 측정

시료 속에 함유된 총 플라보노이드 함량은 Jia 등(29)의 방법을 일부 변경하여 측정하였으며 시료의 추출은 총 페놀 함량의 전처리와 동일한 방법으로 하였다. 추출물 0.1 mL에 10% aluminum nitrate 20 μ L와 1M potassium acetate 20 μ L를 혼합하고 80% ethanol 860 μ L를 첨가하여 상온에서 40분간 반응하여 405 nm에 흡광도로 측정하였다. 표준물질로 quercetin을 이용하여 건조 시료 중량 당 mg quercetin equivalent (QE mg/g dw)로 나타내었다.

5. DPPH 라디칼 소거능

항산화 활성측정법 중 하나인 DPPH 법에 의한 자유라디칼 소거능은 Blois의 방법(30)을 참고하여 측정하였다. 농도별로 제조한 각 시료용액 10 μ L에 0.4 mM의 DPPH 용액 990 μ L을 첨가하였다. 실온에서 30분간 반응시킨 후 남아 있는 DPPH의 양을 측정하기 위해서 517 nm에 흡광도로 측정하였다. 소거능에 의한 항산화활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타냈으며 다음의 식에 의해 구하였다.

Free radical scavenging activity (%) = (Absorbance of control - Absorbance of sample) \div Absorbance of control \times 100

6. ABTS 라디칼 소거능

시료의 총 항산화활성은 ABTS cation radical decolorization assay 방법(31)에 따라 측정하였다. 7 mM ABTS에 2.45 mM potassium persulphate를 준비하여 하루 동안 암소에 방치하여 $ABTS^+$ 을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.700 ± 0.020 가 되도록 희석하여 사용하였다. 추출물 10 μ L와 ABTS 용액 90 μ L를 첨가한 후 분광광도계를 이용하여 734 nm에서 측정하였다.

$ABTS \text{ radical scavenging activity}(\%) = (\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}) \div \text{Absorbance of control} \times 100$

7. 세포배양

본 연구에서 사용한 AGS, MCF-7, Vero 세포주는 RPMI-1640에서 배양하였으며, HeLa, HepG2 세포주는 minimum essential medium (MEM)에서 배양하였다. 세포배지는 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic reagent를 첨가하여 사용하였으며 5% CO₂ 배양기에서 37°C로 배양하였다. 실험을 위해 계대할 때는 세포를 1×10^5 cell/mL로 분주하여 실험하였다.

8. 세포 생존율

세포에 대한 독성 측정은 MTT 측정법(32-35)으로 확인하였다. 이 방법은 세포의 미토콘드리아 내 효소인 succinate-dehydrogenase에 의해 MTT가 formazan으로 전환되는데, 세포의 성장이 멈추거나 세포가 죽으면 formazan의 생성이 감소되는 점을 이용한 것이다. 추출물과 FBS에 간섭을 줄이기 위해 시료 처리할 때에는 0.5% FBS로 낮추어 사용하였으며, 추출물은 10, 50 및 100 μ g/mL의 농도로 사용하였다. 96 well plate에 1×10^5 cells/mL로 100 μ L씩 분주하여 16시간 동안 배양한 후, 시료 추출물을 배지에 10, 50 및 100 μ g/mL 농도로 처리하였다. 이를 24시간, 48시간, 72시간 배양한 다음 0.5 mg/mL의 MTT가 첨가된 배지로 교체하여 4시간 동안 배양하였다. 이때 형성된 formazan은 150 μ L DMSO로 녹여 ELISA reader로

540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료 무처리군에 대비하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

9. Western blot 분석

세포를 1×10^5 cell/mL의 농도로 100 mm dish에 분주하여 16시간 배양한 후 시료를 농도별(10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 24시간, 48시간, 72시간 배양하였다. 시료처리가 끝난 dish는 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척한 다음 100 μL radio-immunoprecipitation assay (RIPA, Sigma-Aldrich Co.) buffer (150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL[®] CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 50 mM Tris, pH 8.0)를 첨가하여 세포를 용해한 후 13,000 rpm으로 15분 동안 원심 분리하여 상층액을 새로운 EP-tube로 옮겼다. 상층액은 BCA kit를 사용하여 단백질을 정량하고 단백질 20 μg 을 10.5% SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 하였다. PAGE에서 분리된 단백질은 PVDF membrane으로 transfer (100V, 90min)한 후 5% skim milk (in PBS-T)로 1시간동안 상온에서 background blocking하였다. 1차 항체인 anti-caspase-3, anti-Bcl-2, anti-Bax와 anti- β -actin은 1:1,000으로 5% skim milk (in PBS-T)에 희석하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 반응시킨 후 0.5% skim milk (in PBS-T)로 15분간 3회 세척하고 2차 항체인 anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat를 1:1,000의 비율로 0.5% skim milk (in PBS-T)에 희석하여 처리한 뒤 1시간동안 상온에서 부착시켰다. 다시 0.5% skim milk (in PBS-T)로 15분간 3회 세척하고 암실에서 PVDF membrane에 WEST-ZOL을 처리하여 발광시켜 X-ray 필름에 감광하고 LAS-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 현상하였다.

10. 형광현미경 관찰

위암 세포 AGS에 귀전우 추출물을 처리하여 caspase-3의 발현 위치 확인 및 형태학적 분석을 위해 8-well chamber에 1×10^5 cell/mL의 농도로 분주하여 5% CO₂가 든 37 $^{\circ}\text{C}$ 배양기에서 16시간 동안 배양시켰다. 귀전우 추출물을 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하여 24시간 배양 한 후 PBS로 3회 세척하였다. 세포를 고정하기 위해 4% paraformaldehyde로 30분간 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 고정하였다. 다시 PBS로 3회 세척하고

1차 항체 anti-caspase-3를 1:250으로 희석하여 처리하고 4℃에서 1시간동안 염색하였다. 다시 PBS로 3회 세척하고 2차 항체인 anti-goat conjugated tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)를 1:250으로 희석하여 1시간동안 처리하였다. 다시 PBS로 3회 세척한 후 2 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)를 처리하여 핵 염색을 하여 형광현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 세포를 관찰하였다.

11. 통계분석

본 연구의 모든 실험은 세 번 이상 반복하였으며, 얻어진 결과는 SigmaPlot 2000을 사용하여 분산분석 하였으며, 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료의 분석결과에 대해 유의성 검정을 위해 SPSS (Version 16.0) 프로그램을 이용한 one-way ANOVA를 수행하였다.

III. 결과

1. 추출수율

5 g에 줄풀과 귀전우를 80% 에탄올로 상온에서 150 rpm으로 교반하면서 추출한 추출물은 각각 0.365 ± 0.005 g과 0.175 ± 0.015 g으로 측정되었다. 이는 결과적으로 7.3 \pm 0.1%와 3.5 \pm 0.3%에 추출수율을 확인하였다(Table 1).

2. 총 폴리페놀 함량 측정

추출물에 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과, 줄풀은 25.2 \pm 0.4 GAE mg/g으로 검출되었으며 귀전우는 277.4 \pm 7.8 GAE mg/g로 검출되어 귀전우에서 추출율이 더 높았다(Table 1).

3. 총 플라보노이드 함량 측정

추출물에 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과, 줄풀은 6.5 \pm 0.7 QE mg/g으로 검출되었으며 귀전우는 13.1 \pm 1.1 QE mg/g로 검출되어 귀전우에서 추출율이 더 높았다(Table 1).

Table 1. Phenolic and flavonoid contents of extracts of *Zizania latifolia* and *Euonymus alatus*.

Extracts	Yield (%)	Total polyphenol (GAE mg/g)	Total flavonoid (QE mg/g)
<i>Zizania latifolia</i>	7.3 \pm 0.1	25.2 \pm 0.4	6.5 \pm 0.7
<i>Euonymus alatus</i>	3.5 \pm 0.3	277.4 \pm 7.8	13.1 \pm 1.1

Each value represents the mean \pm SD of three determinations. GAE, Gallic acid equivalents; QE, quercetin equivalents.

4. DPPH 라디칼 소거능

DPPH에 의한 전자공여능은 수소나 전자를 받아 환원될 때 보라색이 탈색되어지는 원리를 이용한다. 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 탐색하기 위해 많이 이용되고 있으며, 비교적 짧은 시간 내에 항산화능을 측정할 수 있어 널리 사용되고 있는 방법이다(36).

줄풀과 귀전우의 추출물(10, 50, 100, 300, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 자유라디칼 소거능을 확인한 결과(Fig. 2), 줄풀은 모든 농도에서 소거능이 없었으나 귀전우는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $7.0\pm 0.4\%$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $10.0\pm 0.6\%$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $15.8\pm 0.4\%$, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $32.7\pm 0.2\%$ 그리고 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $47.7\pm 2.3\%$ 로 추출물 농도에 의존적으로 소거능이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 귀전우 추출물은 동일한 농도에 식품용 산화방지제인 butylated hydroxytoluene (BHT)보다 높은 소거 활성을 보였다.

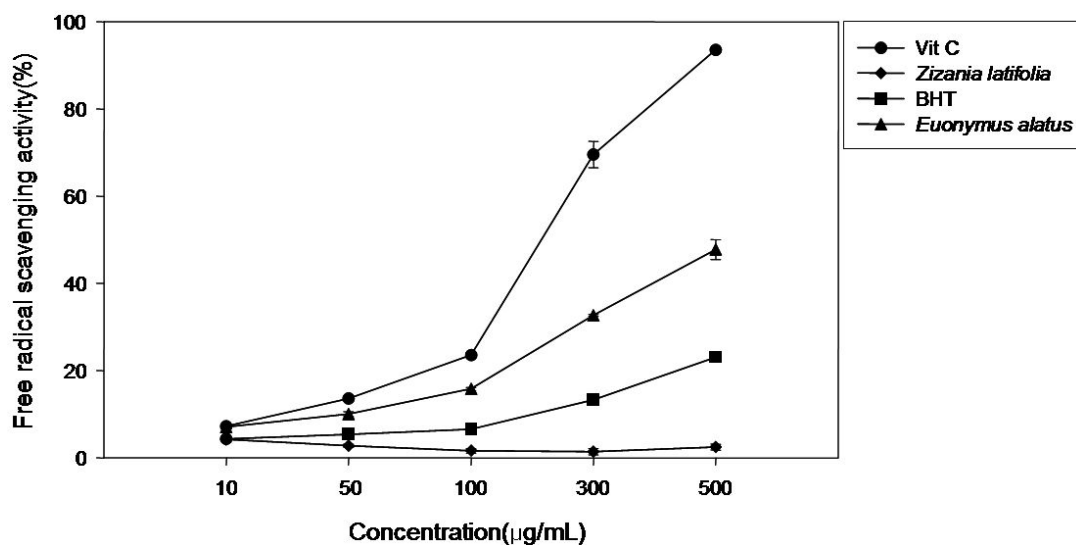


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of extracts. Ascorbic acid was used as positive control. Each value represents the mean±SD of three determinations.

5. ABTS 라디칼 소거능

ABTS 법은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS+이 시료 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 탈색되는 것을 이용한 항산화능 측정 방법으로 DPPH assay의 경우 자유라디칼을 소거하는 반면, ABTS는 양이온 라디칼을 제거하는 차이를 가지고 두 기질과 반응물과의 결합 정도가 달라져 라디칼 제거 능력의 차이를 보인다(37).

줄풀과 귀전우의 추출물을 10, 50, 100, 300, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 첨가하여 ABTS 라디칼 소거활성을 확인한 결과(Fig. 3), 줄풀은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $0.9\pm 0.6\%$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $2.3\pm 0.6\%$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $3.2\pm 0.2\%$, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $11.3\pm 1.3\%$ 그리고 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $16.9\pm 1.0\%$ 에 소거 활성을 보였으며 귀전우는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $12.5\pm 1.8\%$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $29.4\pm 1.0\%$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $46.5\pm 3.9\%$, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $71.8\pm 0.2\%$ 그리고 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $72.2\pm 0.7\%$ 로 확인되었다. 두 추출물 모두 추출물 농도에 의존적으로 소거능이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 귀전우 추출물의 경우 DPPH 소거활성과 동일하게 BHT 보다는 높은 소거능을 보였다.

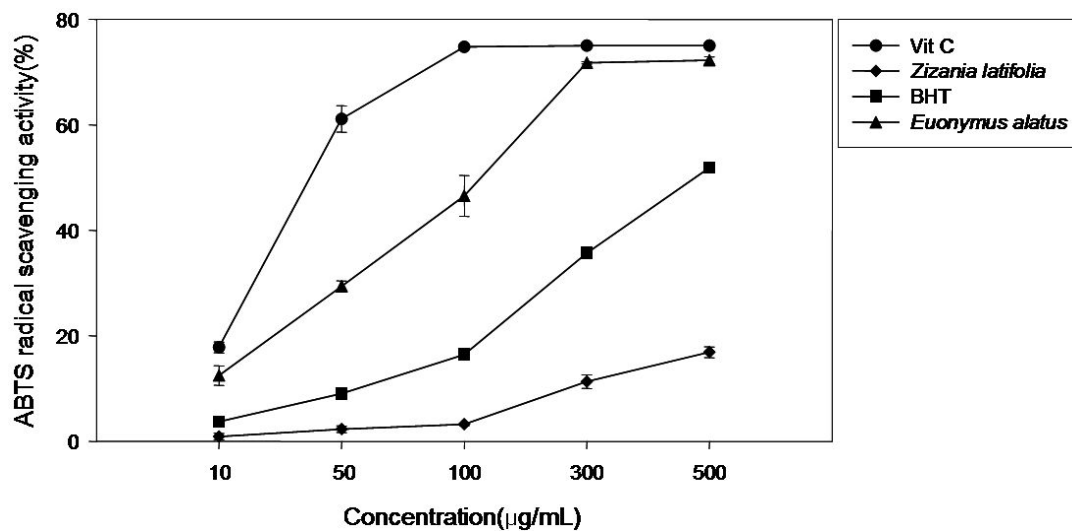


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of extracts. Ascorbic acid was used as positive control. Each value represents the mean \pm SD of three determinations.

6. 추출물의 24시간 처리시 항암효능

줄फल과 귀전우 추출물이 위암세포인 AGS, 자궁경부암세포인 HeLa, 간암세포인 HepG2, 유방암세포인 MCF-7에 대한 항암효능을 확인하기 위해 시료를 농도별(10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24 시간 처리 후 MTT assay법으로 항암 활성을 측정하였다 (Fig. 4). 또한 일반세포에 대한 독성도 확인하기 위해 신장세포인 Vero에 동일한 농도로 처리하여 시료의 독성도 확인하였다.

위암세포(AGS)에서는 줄फल이 항암효능이 없었으나 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 귀전우에서는 세포생존율이 21.8%로 감소하였으며 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 것에서는 8.4%로 높은 항암효능을 보였다(Fig. 4A). 자궁경부암세포(HeLa)에서는 줄फल이 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리하였을 때 101.0%, 78.1% 67.8%로 확인되었으며 귀전우의 경우 85.3%, 11.7%, 10.0%로 확인되었다(Fig. 4B). 간암세포(HepG2)에서는 줄फल의 경우 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하였을 때 96.8%, 96.7%, 83.7%로 확인되었고 귀전우의 경우 동일한 농도에서 73.9%, 59.7%, 48.3%로 확인되어 위암이나 자궁경부암 세포의 항암효능보다는 낮게 확인되었다(Fig. 4C). 유방암세포(MCF-7)에서는 줄फल의 경우 94.2%, 88.1%, 84.1%로 확인되었고 귀전우의 경우 99.5%, 99.1%, 76.1%로 측정되어 암세포 중에서는 유방암세포에서 가장 낮은 항암효능을 보였고 위암세포와 자궁경부암세포에서 높은 항암효능이 나타났다(Fig. 4D). 또한, 일반 신장세포(Vero)에서는 줄फल과 귀전우 모두 독성은 없음을 확인하였다(Fig. 4E).

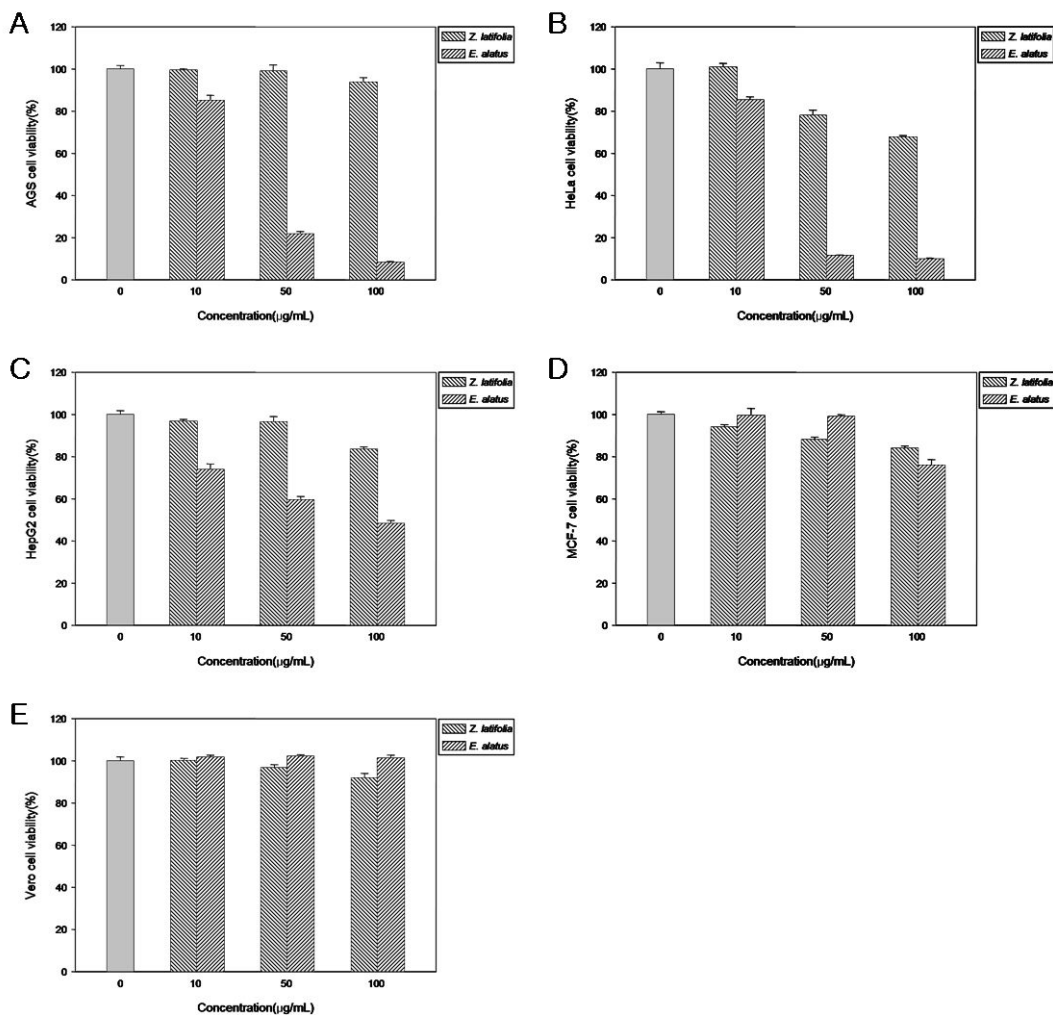


Fig. 4. The effect of anticancer activity from *Zizania latifolia*, *Euonymus alatus* extracts on cancer cells (AGS, HeLa, HepG2, MCF-7) for 24 hr. Cells were seeded at 1×10^5 cell/mL and treated with extracts for 24 hr at the indicated concentrations. Cell viability was measured by MTT assay. Each bar indicates the mean \pm SD of determinations, n=3. Statistical analysis was performed by the one-way ANOVA ($p < 0.05$).

7. 추출물 48시간 처리시 항암효능

줄फल과 귀전우 추출물을 농도별(10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리 후 48시간 반응하여 MTT assay법으로 항암 활성을 측정하였다(Fig. 5). 또한 신장세포인 Vero에 동일한 농도로 처리하여 시료의 독성도 확인하였다.

줄फल 추출물은 위암세포에 대한 항암세포 억제 효능이 없었지만, 귀전우 추출물은 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에 따라 63.7%, 10.8%, 6.7%로 탁월하였다(Fig. 5A). 자궁경부암세포에 항암효능 역시 줄फल 추출물은 효능을 보이지 않아 24시간 경과 후 약제내성이 생긴 것으로 판단되지만, 귀전우 추출물에서는 86.2%, 7.2%, 6.0%로 지속적인 항암효능을 나타냈다(Fig. 5B). 간암세포에서 항암효능은 줄फल 추출물이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 79.2%로 미비했으나, 귀전우 추출물에서는 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 68.0%, 46.3%, 38.6%로 농도에 비례하게 세포 생존율이 감소되었다(Fig. 5C). 유방암세포에서는 줄फल 추출물과 귀전우 추출물 모두 미비한 항암효능을 보였으나 줄फल 추출물보다는 귀전우 추출물이 더 높은 항암효능을 보였다(Fig. 5D). 추출물에 대한 독성을 확인한 일반 신장세포에서는 줄फल과 귀전우 모두 독성은 없음을 확인하였다(Fig. 5E).

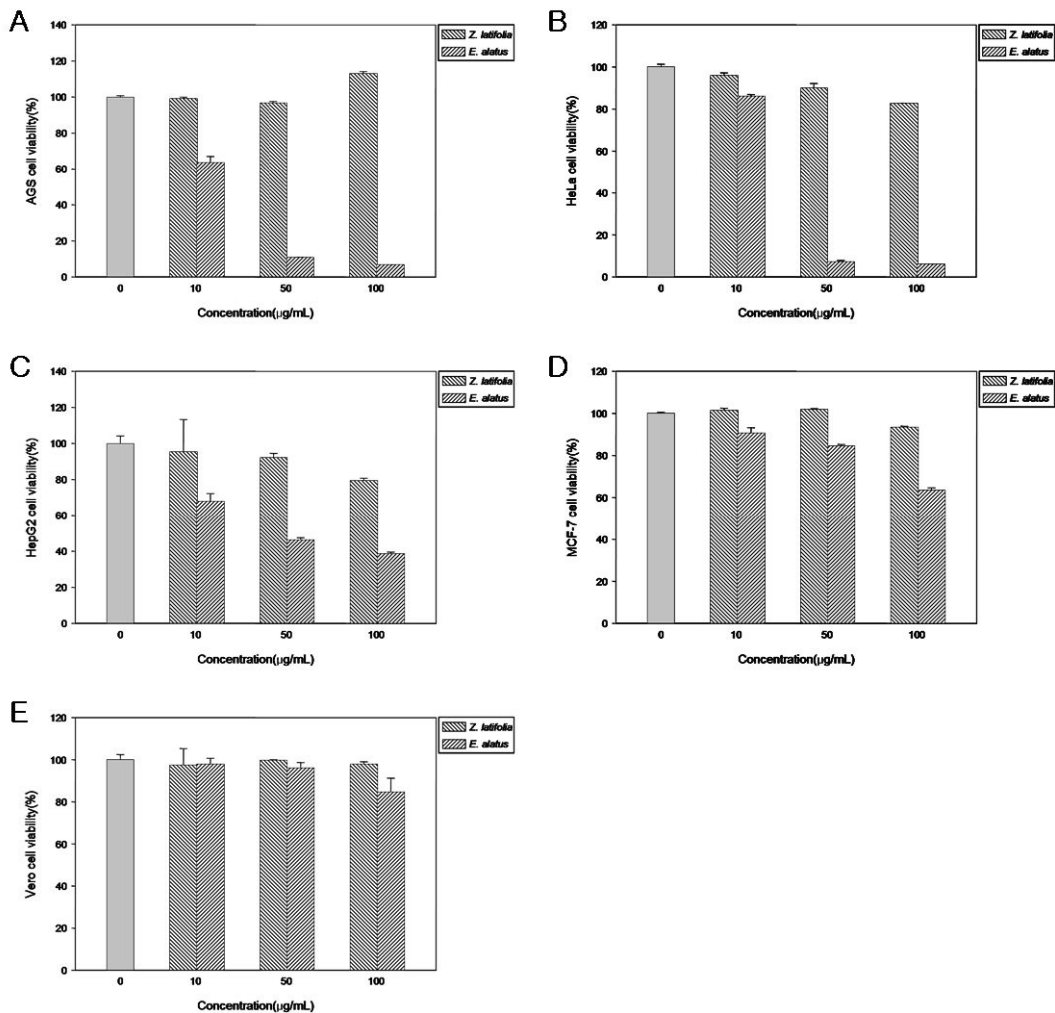


Fig. 5. The effect of anticancer activity from *Zizania latifolia*, *Euonymus alatus* extracts on cancer cells (AGS, HeLa, HepG2, MCF-7) for 48 hr. Cells were seeded at 1×10^5 cell/mL and treated with extracts for 48 hr at the indicated concentrations. Cell viability was measured by MTT assay. Each bar indicates the mean \pm SD of determinations, n=3. Statistical analysis was performed by the one-way ANOVA ($p < 0.05$).

8. 추출물 72시간 처리시 항암효능

줄फल과 귀전우 추출물을 농도별(10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하여 72시간 반응한 후 MTT assay법으로 세포 생존율을 확인하였다(Fig. 6). 또한 일반 신장세포인 Vero에 같은 시간동안, 동일한 농도로 처리하여 시료의 독성을 일반 세포에서 확인하였다.

줄फल 추출물은 위암세포에 대해서 세포 생존율이 변화가 크지 않아 항암 효능이 낮았지만, 귀전우 추출물은 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에 따라 66.7%, 18.7%, 7.5%로 장시간 처리되어도 세포 증식이 꾸준히 억제되어 탁월한 항암효능을 나타냈다(Fig. 6A). 자궁경부암세포에서는 줄फल 추출물에서 세포 생존율이 변화가 없어 24시간 처리 이후로 내성을 지녀 시료 무처리군 정도의 세포 생존율을 나타냈지만, 귀전우 추출물의 경우 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에 따라 91.2%, 5.2%, 7.0%로 나타났다(Fig. 6B). 간암세포에서는 줄फल 추출물이 내성을 지녀 세포증식이 급격히 증가하여 시료 무처리군 보다 더 높은 세포생존율을 보였으며 귀전우 추출물에서는 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에 따라 96.4%, 20.7%, 18.9%로 지속적인 항암효능을 보였다(Fig. 6C). 유방암세포에서는 줄फल 추출물이 약한 항암효능을 보이지만 귀전우 추출물에서는 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에 따라 90.9%, 62.8%, 33.9%로 농도에 의존적으로 항암효능을 나타냈다(Fig. 6D). 추출물에 대한 독성을 확인한 일반 신장세포에서는 줄फल과 귀전우 모두 약간에 독성은 있었다(Fig. 6E).

줄फल과 귀전우 추출물이 MTT assay를 통하여 시간에 따른 암세포 성장을 50% 억제하는 농도(inhibitory concentration 50%, IC_{50})는 Table 2와 같다.

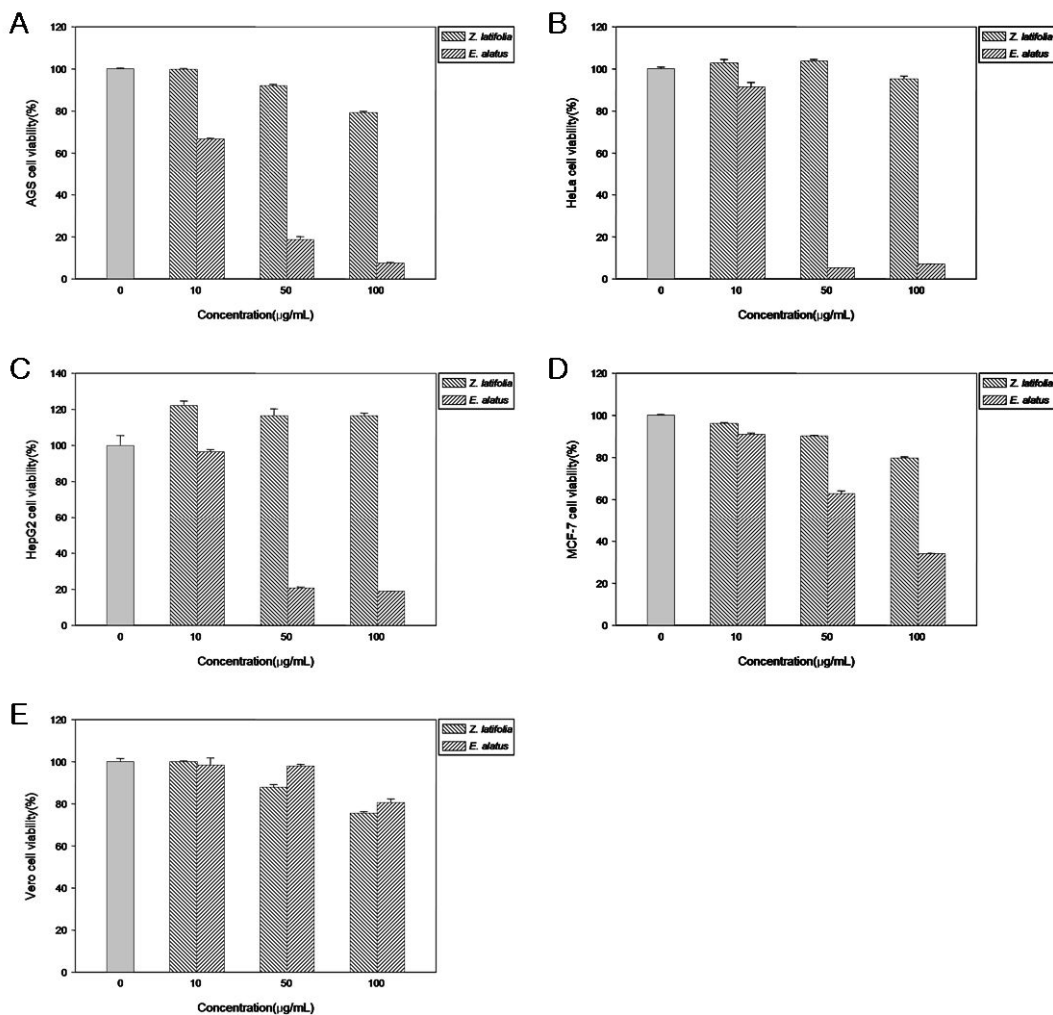


Fig. 6. The effect of anticancer activity from *Zizania latifolia*, *Euonymus alatus* extracts on cancer cells (AGS, HeLa, HepG2, MCF-7) for 72 hr. Cells were seeded at 1×10^5 cell/mL and treated with extracts for 72 hr at the indicated concentrations. Cell viability was measured by MTT assay. Each bar indicates the mean \pm SD of determinations, n=3. Statistical analysis was performed by the one-way ANOVA ($p < 0.05$).

Table 2. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of the extracts at different time periods

(단위 : $\mu\text{g/mL}$)

Extracts	Time	AGS	HeLa	HepG2	MCF-7
<i>Zizania latifolia</i>	24 hr	324.3 \pm 4.7	215.0 \pm 3.0	288.9 \pm 4.4	411.7 \pm 1.5
	48 hr	338.7 \pm 1.7	267.2 \pm 0.5	264.6 \pm 4.9	315.6 \pm 2.8
	72 hr	263.3 \pm 2.0	297.7 \pm 2.9	364.9 \pm 2.7	264.3 \pm 1.8
<i>Euonymus alatus</i>	24 hr	32.2 \pm 1.0	29.2 \pm 0.4	92.7 \pm 6.7	260.0 \pm 9.6
	48 hr	20.2 \pm 2.0	28.3 \pm 0.3	42.8 \pm 2.1	202.5 \pm 7.3
	72 hr	23.9 \pm 0.4	29.1 \pm 0.6	34.5 \pm 0.4	72.1 \pm 1.3

9. Western blot 분석

위암세포에 귀전우 추출물을 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도별로 24시간 처리하고 RIFA buffer를 이용하여 단백질을 얻었다. 이 단백질을 정량하여 20 μg 을 Western blot하였다. 1차 항체로는 세포자멸사와 관련되어 있는 Bcl-2, Bax, caspase-3 발현량을 확인하였다. 그 결과 anti-apoptotic factor인 Bcl-2의 발현은 감소되고 pro-apoptotic factor인 Bax의 발현은 증가하여 최종적으로 caspase-3로부터 절단된 caspase-3가 증가함으로 세포자멸사가 일어나 항암효과가 일어난 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 7).

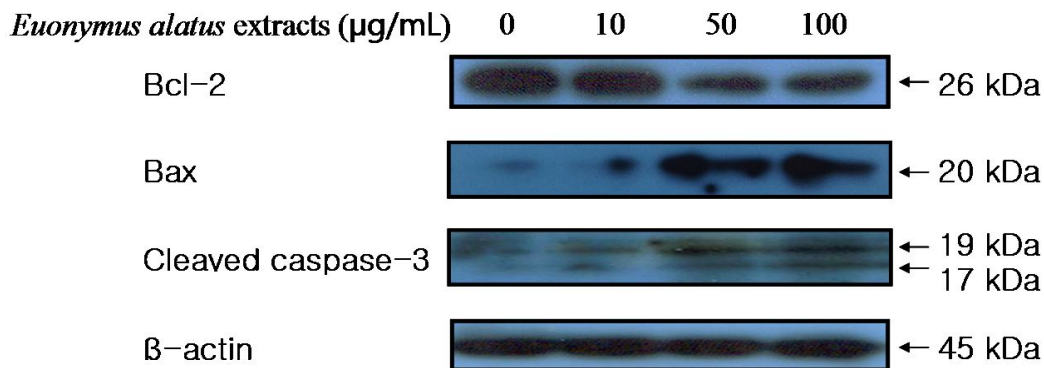


Fig. 7. The *Euonymus alatus* extracts induced changes in the expression levels of apoptotic proteins. Cells were seeded at 1×10^5 cell/mL and treated with *Euonymus alatus* extracts for 24 hr at the indicated concentrations. Cells were treated with *Euonymus alatus* extracts for 24 hr, and samples were taken and subjected to Western blot assay.

10. 형광현미경 관찰

위암세포인 AGS에 귀전우 추출물을 24시간동안 처리하여 세포자멸사 경로와 관련된 단백질인 caspase-3를 형광 염색하여 확인하였다. 형광항체로는 TRITC가 결합된 2차 항체를 사용하였으며, 핵의 위치를 확인하기 위해 DAPI로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 추출물 무처리 군과 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 귀전우 추출물 처리 군에서는 caspase-3가 염색되지 않았지만 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 군에서는 세포질에서 caspase-3가 염색이 되었으며 암세포수가 확연히 감소되었다. 또한 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 군에서는 caspase-3가 핵 주변에서 염색되었다. 이는 귀전우 추출물에 의해 세포자멸사가 일어나 세포질에 존재하던 caspase-3가 활성형인 cleaved caspase-3가 되어 핵 주변에서 염색되어 관찰되었다(Fig. 8).

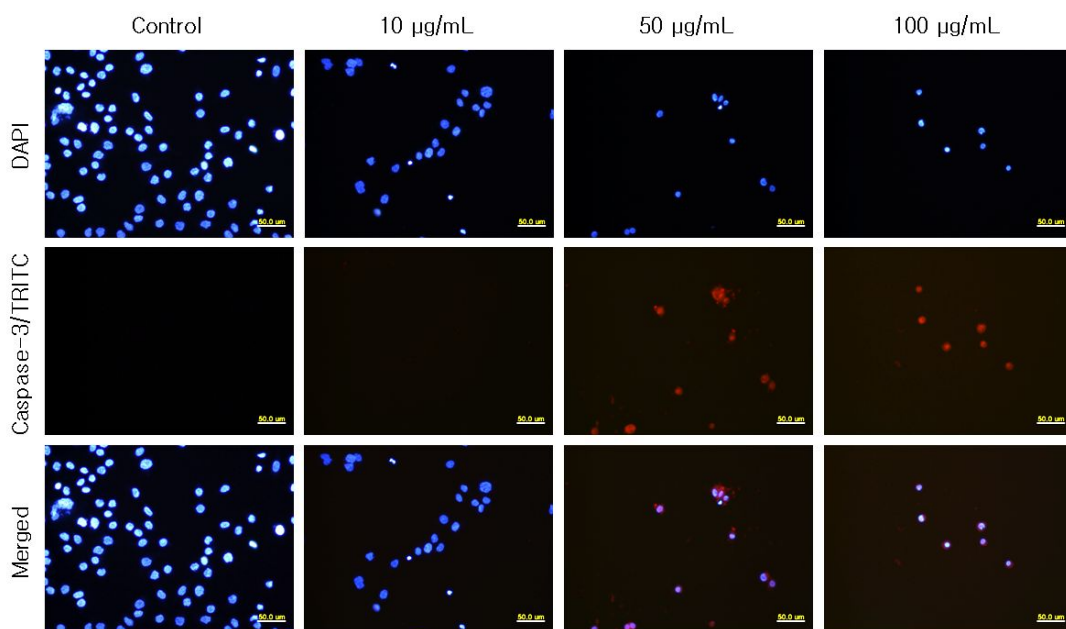


Fig. 8. The stomach cancer (AGS) cells treated with *Euonymus alatus* (10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) extract for 24 hr. Morphological apoptosis was determined by staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), caspase-3. *Euonymus alatus* extracts induce these apoptotic features. Each image is representative of three experiments. Pictures were taken using a fluorescent microscope and photographed at 100 X magnification.

IV. 고찰

본 연구에서는 줄풀과 귀전우의 에탄올 추출물이 항산화 효능과 항암효능 및 그 작용기전에 대해 확인하였다. 항산화 효능을 확인하기 위해 총 폴리페놀 함량측정, 총 플라보노이드 함량측정, DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능 등을 확인하였고 항암효능을 확인하기 위해 4종의 암세포인 위암세포(AGS), 자궁경부암세포(HeLa), 간암세포(HepG2), 유방암세포(MCF-7)에 줄풀과 귀전우 추출물을 처리하여 세포생존율(MTT assay) 측정, Western blot, 형광현미경 관찰 등을 하였다.

추출 단계에서 추출수율은 줄풀 추출물(7.3±0.1%)이 귀전우 추출물(3.5±0.3%) 보다 2배정도 높았다. 하지만 총 폴리페놀 함량에서 줄풀 추출물(25.2±0.4 GAE mg/g)보다 귀전우 추출물(277.4±7.8 GAE mg/g)이 11배가량 높은 함량을 나타냈다. 총 폴리페놀은 식물에 다량 포함되어 있으며 산화방지와 항산화 효능이 있다고 알려져 있다(38). 이 귀전우 추출물은 기존에 보고(39,40)되어 있는 케나프(27.9 mg/g dw), 비수리(228.9 mg/g dw), 비쭉(228.45 mg/g), 양파(187.67 mg/g), 보리(183.33 mg/g), 오이(171.94 mg/g), 참나무 겨우살이(46.76 mg/g), 속새(67.28 mg/g), 산딸나무(70.39 mg/g), 각시 등글레(83.59 mg/g), 골담초(88.19 mg/g)보다 높은 폴리페놀 함량을 보여 기존에 보고된 식물 추출물보다 높은 항산화 효능이 있을 것으로 확인되었다. 또한 총 플라보노이드 함량에서도 줄풀 추출물(6.5±0.7 QE mg/g)보다 귀전우 추출물(13.1±1.1 QE mg/g)이 2배가량 높은 함량을 보였다. 이 플라보노이드는 항산화 효능(41), 항암효능(42-44), 심혈관계 질환(45, 46) 및 항박테리아(47)에 효능이 있다고 알려져 있다. 기존에 보고(40)되어 있는 어성초(1.40 mg/g), 쥐오리쭈름(6.40 mg/g) 보다 귀전우 추출물이 높은 함량을 보여 항암효능 및 다양한 효능이 있을 것을 확인되었다.

항산화 효능을 확인하기 위해 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 확인한 결과, 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량과 동일하게 줄풀 보다는 귀전우가 높게 나왔다. 줄풀의 경우 DPPH, ABTS 라디칼 소거능이 거의 없었으나 귀전우의 경우 식용 항산화제인 BHT보다 2배가량 높은 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 보였다. 이러한 결과는, 귀전우 추출물이 기존에 보고된 담쟁이덩굴 추출물보다 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며(48), 돌미나리 보다 높은 ABTS 라디칼 소거능을

보였다(49). 또한 청고추 추출물과 할라피뇨 추출물 보다 높은 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 보였다(50).

따라서 본 항산화 관련 연구 결과들은 귀전우 에탄올 추출물의 강력한 항산화 효과를 나타내 보이고 있으며, 이러한 효능들은 적어도 자유라디칼의 산화 억제와 높은 총페놀 함량에 기인하는 것으로 생각된다. 또한 향후 귀전우 추출물의 천연 항산화제로의 개발 가능성을 시사하고 있다.

줄풀 추출물과 귀전우 추출물을 정상세포에 독성이 없었던 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 암세포에 처리하였을 때 줄풀 추출물에서는 특별한 항암효능은 보이지 않았지만 귀전우 추출물은 24시간, 48시간, 72시간 처리하였을 때 지속적인 암세포 생존율을 감소시켜 암세포만을 특이적으로 생존율을 감소시키는 항암효능을 나타냈다. 귀전우 추출물을 24시간동안 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 위암세포(AGS)에 세포생존율이 85.2%, 21.8%, 8.4%로 농도에 의존적으로 세포생존율이 감소됨이 확인되었다. 이 귀전우 추출물은 자궁경부암세포(HeLa)에서는 85.3%, 11.7%, 10.0%로 확인되었으며 간암세포(HepG2)에서는 73.9%, 59.7%, 48.3%로 확인되어 위암세포나 자궁경부암세포에 항암효능보다는 낮게 확인되었다. 유방암세포(MCF-7)에서는 99.5%, 99.1%, 76.1%로 측정되어 암세포 중에서는 유방암세포에서 가장 낮은 항암효능을 보였다. 결과적으로 귀전우 추출물의 항암효능은 위암(IC_{50} 32.2 μg), 자궁경부암(IC_{50} 29.2 μg)에서 높게 나타났으며 간암세포(IC_{50} 92.7 μg)에서는 일반적인 항암효능이고 유방암세포에서는 항암효능이 없었다(Table 2).

48시간동안 처리하였을 때 귀전우 추출물은 위암세포에서는 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 따라 세포생존율이 63.7%, 10.8%, 6.7%로 추출물 농도에 의존적으로 감소되었다. 자궁경부암에서는 귀전우 추출물에 의해 86.2%, 7.2%, 6.0%으로 감소되었으며, 간암세포에서 항암효능은 줄풀 추출물이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 79.2%로 미비했으나, 귀전우 추출물에서는 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 68.0%, 46.3%, 38.6%로 시료처리 농도가 높아질수록 세포 생존율이 감소되었다. 유방암세포에서는 줄풀 추출물과 귀전우 추출물 모두 미비한 항암효능을 보였으나 줄풀 추출물보다는 귀전우 추출물이 더 높은 항암효능을 보였다.

귀전우 추출물을 72시간동안 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 위암세포에 세포생존율은 66.7%, 18.7%, 7.5%로 추출물 농도에 의존적으로 감소되었다. 자궁경부암세포에서는 줄풀 추출물에서 세포 생존율이 변화가 없었지만 귀전우 추

출물의 경우 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에 따라 91.2%, 5.2%, 7.0%로 나타났다. 간암 세포에서는 귀전우 추출물에서는 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에 따라 96.4%, 20.7%, 18.9%로 지속적인 항암효능을 보였다. 유방암세포에서는 귀전우 추출물에서 농도에 따라 90.9%, 62.8%, 33.9%로 농도에 의존적으로 항암효능을 나타냈다. 귀전우 추출물은 유방암세포를 제외하고 위암, 자궁경부암, 간암에서 높은 항암효능을 나타냈다. 그중에서도 위암세포에서는 경과 시간에 따라 꾸준한 항암효능을 보였다.

이와 같은 귀전우 추출물의 항암효능 결과는, 위암세포(AGS)에서는 항암효능이 있다고 알려져 있는 아기콩 추출물 보다 월등히 높게 세포 생존율을 감소시켰으며 (50), 풋고추, 청량고추 및 할라피노 추출물보다 월등히 높은 유방암세포(MCF-7)에 항암효능을 보였다(51).

위암세포에 귀전우 추출물을 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도별로 24시간 처리하고 RIFA buffer로 단백질을 얻어 Western blot한 결과, Bcl-2의 발현을 감소시키고 bax의 발현을 증가시켰다. 이러한 Bcl-2 family의 발현은 미토콘드리아의 기능과 관련되어 있는데, 귀전우 추출물은 미토콘드리아에 손상을 주어 ATP 합성에 지장을 주는 것이 확인되었다. 이는 caspase-3를 활성화시켜 세포자멸사를 유발하여 세포생존율에도 영향을 주었다. 이러한 현상은 농도 의존적으로 일어났으며 세포생존율에도 영향을 미친 것으로 확인되었다.

위암세포인 AGS에 귀전우 추출물을 24시간동안 처리하여 세포자멸사 경로에 관련된 caspase-3를 형광 염색하여 확인한 결과, 추출물 무처리 군과 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 귀전우 추출물 처리 군에서는 세포자멸사가 유발되지 않아 caspase-3가 염색되지 않았지만 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 군에서는 세포질에서 caspase-3가 염색이 되었으며 암세포수가 확연히 감소되었다. 또한 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 군에서는 caspase-3가 핵 주변에서 염색되었다. 이는 귀전우 추출물에 의해 세포자멸사가 일어나 세포질에 존재하던 caspase-3가 활성화형인 cleaved caspase-3가 되어 핵 주변에서 염색된 것으로 관찰되었다. 이러한 cleaved caspase-3는 핵내에 PARP를 활성화하여 세포자멸사를 일으키는 것으로 알려져 있으며 이로 인해 항암효능이 나타난 것으로 보인다.

V. 결론

본 연구에서는 줄풀과 귀전우의 에탄올 추출물에 항산화 효능과 항암효능 및 그 작용기전을 확인하고자 하였다. 항산화 효능을 확인하기 위해 총 폴리페놀 함량측정, 총 플라보노이드 함량측정, DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능 등을 확인하였고 항암효능을 확인하기 위해 4종의 암세포인 위암세포(AGS), 자궁경부암세포(HeLa), 간암세포(HepG2), 유방암세포(MCF-7)에 줄풀과 귀전우 추출물을 처리하여 세포생존율(MTT assay) 측정, Western blot, 형광현미경 관찰 등을 하였다.

그 결과 폴리페놀 함량은 줄풀 추출물보다 귀전우 추출물이 높게 측정되었으며, 플라보노이드 함량에서도 줄풀 추출물보다 귀전우 추출물이 높게 측정되었다. DPPH와 ABTS 라디칼을 소거하는 항산화 효능에서도 줄풀 추출물보다 귀전우 추출물이 높게 측정되었는데 이는 폴리페놀과 플라보노이드 함량에 기인하는 것으로 판단되었다. 이에 귀전우 추출물이 기존 보고된 여러 추출물보다 높은 항산화력을 보여 천연 항산화제로의 개발 가능성을 시사하였다. 또한 줄풀 추출물에서는 항암효능이 없었으나 귀전우 추출물에서는 농도 의존적으로 암세포의 증식을 강하게 억제시키는 항암효능을 나타냈다. 항암효능은 위암, 자궁경부암, 간암, 유방암 순으로 항암효능이 높게 나타났다. 48시간, 72시간 처리하였을 때 세포생존율이 지속적으로 감소하여 암세포에 내성이 생기지 않는 항암효능을 보였다. 또한 귀전우 추출물에 의해 일어나는 위암세포의 증식억제 및 형태적 변화는 세포자멸사와 밀접한 관련성이 있음을 알 수 있었다.

그러므로 이러한 결과는 귀전우 에탄올 추출물이 효과적인 항암제로서의 가능성 제시하며, 본 연구로 인해 귀전우의 항암제 개발의 계기가 될 수 있을 것이며 앞으로 귀전우 추출물을 이용한 항암제 개발을 위한 임상연구가 필요할 것이라 판단된다.

VI . 참고문헌

1. Change HM and p.p.But, Danshen. In: H.-M. Chang and P. But Editors, Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica World Scientific, Singapore. 1986 255-68.
2. Kim CH. Inhibitory effect of *Euonymus alatus* on cervical cancer growth. Korean journal of Obstetrics and Gynecology. 2003 8:28-36.
3. Cha BY, Park CJ, Lee DG, Lee YC, Kim DW, Kim JD, Seo WG, Moon SK and CH Kim. Inhibitory effect of methanol extract from *Euonymus alatus* on matrix metalloproteinase-9. Journal of Ethnopharmacology. 2003 85:163-167.
4. Huang KC. The Pharmacology of Chinese herbs. CRC Press, Boca Raton. 1993 103-107.
5. Eun JS, Park SH, Kweon J, Kim YA, Kang SY, Oh CH, Jeon H. Cytotoxicity of Petroleum Ether Extract of *Euonymus alatus*. Department of Pharmacy. 1995 253-258.
6. Lee JH, Kim HK, Ha TY. Antitumor effect of winged *Euonymus* against chemically induced and malignant cell lines. Korean journal of pharmacognosy. 1994 25:356.
7. Kim CM, Shin MK, Ahn DK, Lee KS. An unabridged dictionary of Chinese drug. Jungdam, 2004 239-240.
8. Choi JG. Our grass·flower·tree to become a medicine 2. Hanmoonhwa, 2011 141-147.
9. Park WH and Cha YY. Inhibiton effect of *Zizania latifolia* on apoptosis induced by H₂O₂ in Neuro2A cell. Korean journal of oriental physiology & Pathology. 2005 19:1062-1067.
10. Song YH. Anti-fatigue effect of *Zizania caudiflora* (Turczaninow) Nakai the forced swimming test in ICR mice. Master Thesis Graduate school of Kyung-Hee university, Seoul, 2009.
11. Central cancer registration center, Statistical registration of Nat'l cancer.

2011. Seoul, Ministry of welfare and health, 2011; 1-13.
12. Howson, C P, Hiyama, T. and Wynder, E.L. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol. Rev.* 1986 8:1-27.
 13. Yamada T: *Textbook of gastroenterology* 3rd ed, Philadelphia, Lippincott Williams and wilkins. 1999 1500-1520.
 14. Chen S, Fu L, Raja SM, Yue P, Khuri FR, Sun SY. Dissecting the roles of DR4, DR5 and c-FLIP in the regulation of geranylgeranyltransferase I inhibition-mediated augmentation of TRAIL-induced apoptosis. *Molecular Cancer.* 2010 9:23-37.
 15. Colussi PA and Kumar S. Targeted disruption of caspase genes in mice: what they tell us about the functions of individual caspases in apoptosis. *Immunology and cell biology.* 1999 77:58-63.
 16. Hsu HF, Hounq JY, Kuo CF, Tsao N, Wu YC. Glossogin, a novel phenylpropanoid from *Glossogyne tenuifolia*, induced apoptosis in A549 lung cancer cells. *Food and chemical toxicology.* 2008 46:3785-3791.
 17. Kim GM, Lee AR, Lee KW, Park JY, Chun J, Cha J, Song YS, Kim JH. Characterization of a 27 kDa fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 isolated from cheonggukjang. *Journal of microbiology and biotechnology.* 2009 19:997-1004.
 18. Moon DO, Kim MO, Choi YH, Kim ND, Chang JH, Kim GY. Bcl-2 overexpression attenuates SP600125-induced apoptosis in human leukemia U937 cells. *Cancer letters.* 2008 264:316-325.
 19. Park C, Hyun SK, Shin WJ, Chung KT, Choi BT, Kwon HJ, Hwang HJ, Kim BW, Park DI, Lee WH, Choi YH. Esculetin induces apoptosis through caspase-3 activation in human leukemia U937 cells. *Journal of life science.* 2009 19:249-255.
 20. Yeruva L, Pierre KJ, Elegbede A, Wang RC, Carper SW. Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. *Cancer letters.* 2007 257:216-226.
 21. He W, Zhang MF, Ye J, Jiang TT, Fang X, Song Y. Cordycepin induces

- apoptosis by enhancing JNK and p38 kinase activity and increasing the protein expression of Bcl-2 pro-apoptotic molecules. *Journal of Zhejiang University. Science. B.* 2010 11:654-660.
22. Huang J, Wu L, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Reactive oxygen species mediate oridonin-induced HepG2 apoptosis through p53, MAPK, and mitochondrial signaling pathways. *Journal of pharmacological sciences.* 2008 107:370-379.
 23. Ying M, Tu C, Ying H, Hu Y, He Q, Yang B. MSFTZ, a flavanone derivative, induces human hepatoma cell apoptosis via a reactive oxygen species- and caspase-dependent mitochondrial pathway. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2008 325:758-765.
 24. Seo SB, Hur JG, Kim MJ, Lee JW, Kim HB, Bae JH, Kim DW, Kang CD, Kim SH. TRAIL sensitize MDR cells to MDR-related drugs by down-regulation of P-glycoprotein through inhibition of DNA-PKcs/Akt/GSK-3beta pathway and activation of caspases. *Molecular cancer.* 2010 9:199-213.
 25. Carlisi D, Lauricella M, D'Anneo A, Emanuele S, Angileri L, Di Fazio P, Santulli A, Vento R, Tesoriere G. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid sensitises human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by TRAIL-DISC activation. *European journal of cancer.* 2009 45:2425-2438.
 26. Shankar S, Chen Q, Ganapathy S, Singh KP, Srivastava RK. Diallyl trisulfide increases the effectiveness of TRAIL and inhibits prostate cancer growth in an orthotopic model: molecular mechanisms. *Molecular cancer therapeutics.* 2008 7:2328-2338.
 27. Wang C, Chen T, Zhang N, Yang M, Li B, Lü X, Cao X, Ling C. Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting I κ B kinase-NF κ B. *The Journal of biological*

- chemistry. 2009 284:3804-3813.
28. Zhang S, Bi H, and Liu C. Extraction of bio-active components from *Rhodiola sachalinensis* under ultrahigh hydrostatic pressure. *Separation and Purification Technology*. 2007 5:277-282.
 29. Jia Z, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and they scavenging effects on super-oxide radicals. *Food Chemistry*. 1999 64: 555-559.
 30. Blois M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958 26:1199-1744.
 31. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology And Medicine*. 1999 26:1231-1237.
 32. Barranco SC, Townsend CM Jr, Casartelli C, Macik BG, Burger NL, Boerwinkle WR, Gourley WK. Establishment and characterization of an *in vitro* model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer research*. 1983 43:1703-1709.
 33. Piontek M and Hengels KJ. Effect of calcium-modifying agents on the growth of human gastric carcinoma cells *in vitro*. *Anticancer research*. 1992 12:1559-1563.
 34. Piontek M. and Hengels KJ. Effect Evidence for gastrin receptors to mediate stimulatory and for CCK receptors to mediate inhibitory effects on growth of human gastric cancer cells. *Gastroenterology*. 1992 102(A388)
 35. Nilius M, Bode G, Büchler M, Malfertheiner P. Adhesion of *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli* to human and bovine surface mucus cells *in vitro*. *European journal of clinical investigation*. 1994 24:454-459.
 36. Que F, Mao L, Zhu C, Xie G. Antioxidant properties of Chineses yellow wine, its concentrate and volatiles. *LWT - Food science and technology*. 2006 39:111-117.
 37. Li H, Choi YM, Lee JS, Park JS, Yeon KS, Han CS. Drying and antioxidant

- characteristics of the shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom in a conveyer-type far-infrared dryer. *Journal of the Korean society of food science and nutrition*. 2007 36:250-254.
38. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie*. 2011 50:586-621.
 39. Ryu SW, Jin CW, Lee HS, Lee JY, Sapkota K, Lee BG, Yu CY, Lee MK, Kim MJ, Cho DH. Changes in Total Polyphenol, Total Flavonoid Contents and Antioxidant Activities of *Hibiscus cannabinus* L. *Korean journal of medicinal crop science*. 2006 14:307-310.
 40. Kim EJ, Choi JY, Yul M, Kim MY, Lee S, Lee BH. Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants. *Korean journal of food science and technology*. 2012 44:337-342.
 41. Bagchi M, Milnes M, Williams C, Balmoori J, Ye X, Stohs S, Bagchi D. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal injury in rats, and the protective ability of a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Nutrition research*. 1999 19:1189-1199.
 42. Romagnolo DF and Selmin OI. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *Journal of nutrition in gerontology and geriatrics*. 2012 31:206-238.
 43. Gonzalez CA, Sala N, Rokkas T. Gastric cancer: epidemiologic aspects. *Helicobacter*. 2013 18:34-38.
 44. Woo HD and Kim J. Dietary flavonoid intake and smoking-related cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013 8:e75604.
 45. Higdon J, Drake V, Frei B. Non-Antioxidant Roles for Dietary Flavonoids: Reviewing the relevance to cancer and cardiovascular diseases. *Nutraceuticals world*. Retrieved 2009 March 1
 46. Van Dam RM, Naidoo N, Landberg R. Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases. *Current opinion*

- in lipidology. 2013 24:25-33.
47. Cushnie TP and Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*. 2011 38:99-107.
 48. Cho EK and Choi YJ. Antioxidant, Antidiabetic, and Anti-Inflammatory Effects of Extracts and Fractions from *Parthenocissus tricuspidata* Stems. *Journal of life science*. 2013 23:399-405.
 49. Hwang SJ, Park SJ, Kim JD. Component Analysis and Antioxidant Activity of *Oenanthe javanica* Extracts. *Korean journal of food science and technology*. 2013 45:227-234.
 50. Kim SR, Lee HH, Kim MJ, Seo MJ, Hong SH, Choi YH, Kang BW, Park JU, Joo WH, Rhu EJ, Jeong YK. Induction of apoptosis by ethanol extracts of fermented agabeans in AGS human gastric carcinoma cells. *Journal of life science*. 2010 20:1872-1881.
 51. Yoon HJ, Lee S, Hwang IK. Effects of green pepper (*Capsicum annuum* var.) on antioxidant activity and induction of apoptosis in human breast cancer cell lines. *Korean journal of food science and technology*. 2012 44:750-758.

VII. 감사의 글

박사 논문이 완성되어지는 과정을 따뜻한 관심으로 지켜봐 주신 모든 분들께 감사드리며, 이제 시작이라는 생각으로 더욱더 열심히 학문에 정진할 것을 약속드리겠습니다.

저의 박사 학위 논문이 잘 마무리 될 수 있도록 항상 격려와 지도, 애정 어린 관심으로 이끌어 주신 이미자 지도교수님께 특별히 깊은 감사를 드립니다. 바쁘신 가운데도 열성으로 제 논문을 심사해 주신 기근홍 교수님, 박상학 교수님, 이미자 교수님, 안영준 교수님, 전남대학교 이지신 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

또한 학위 과정동안 열정적으로 지도해 주신 서재홍 총장님, 문경래 교수님, 김종중 교수님, 박상학 교수님, 박종 교수님, 양남웅 교수님, 소금영 교수님, 유진철 교수님, 류소연 교수님, 김복희 교수님께도 이 자리를 빌어 진심으로 감사드립니다.

박사과정을 함께한 1기 동기생 유지호 박사님, 홍순안 박사님, 홍승희 박사님, 이한춘 박사님이 함께해 오늘 여기까지 오지 않았나 싶습니다. 모두 수고 하셨습니다. 그리고 논문 완성에 격려와 정성을 다해 도와주신 서경순 박사님에게도 고마운 마음을 전합니다.

항상 기도와 성원을 보내주신 아버지, 어머니와 장인, 장모님, 동생인 오창일, 오정애, 서승관, 김지연, 홍현창, 김근영님에게 다시 한번 감사를 드립니다. 그리고 나의 친구들 박병준, 장원호, 채동수에게도 함께 해서 고맙다는 말을 전합니다.

마지막으로 이 논문을 쓰기까지 바쁜 남편을 내조하느라 힘들었을 나의 사랑하는 아내 김평순과 나를 꼭 빼어 닮은 아들 동현, 사랑스럽고 예쁜 나의 딸 나현이에게 이 논문을 바칩니다.