

발풀고사리 물 추출물의 항산화 및 항암 활성 연구

조 유 진*, 김 현 우*, 백 효 은*, 김 현 석*, 조 건 응*,
박 세 이*, 오 찬 진*, 오 득 실*, 김 진†

*전라남도 산림자원연구소

†광주보건대학교 간호학과

A study on the antioxidant and anticancer activities of *Dicranopteris pedeta* aqueous extract

Eugene Cho*, Hyoun-Woo Kim*, Hyo-Eun Baek*, Hyeon-Seok Kim*, Geon-Ung Jo*,
Se-I Park*, Chan-Jin Oh*, Deuk-Sil Oh*, Jin Kim†

*Forest Resources Research Institute, Naju-si, Jeollanam-do, Korea

†Department of Nursing, Gwangju Health University, Gwangju, Korea

(Received : Jan. 24, 2020, Revised : Feb. 07, 2020, Accepted : Mar. 30, 2020)

Abstract : Ten species belonging to the genus *Dicranopteris* are distributed throughout the world and *Dicranopteris pedeta* (Houtt.) Nakaike is distributed in Korea. In this study, the antioxidant and anticancer activities of *Dicranopteris pedeta* aqueous extract was explored. Antioxidant activity of *Dicranopteris pedeta* aqueous extract was revealed with a range of 38% to 74% in the DPPH radicals test. The total polyphenols and flavonoids contents of aqueous extract were 92.5 ± 8.68 mg GAE/g and 28.04 ± 4.08 mg QE/g, respectively. Protocatechuic acid, gentisic acid, rutin, vanillic acid, hesperidin, oxyresveratrol, quercetin, and naringenin were detected by HPLC. Cytotoxicity test was conducted using MTT assay in normal cells 293T, cancer cells of YD-10B and HeLa. In the cytotoxicity test, aqueous extract did not show toxicity to normal cells but inhibited cancer cell proliferation. These results suggest that aqueous extracts of *Dicranopteris pedeta* could potentially be developed as a functional cosmetics or anticancer agents.

Keyword : *Dicranopteris pedeta*, aqueous extract, antioxidant, anticancer

1. 서론

식물은 전통 의학 시스템에서 수천년 동안 사용되어 왔고, 많은 다른 문화에서도 광범위하게 기록되어 있다. 이러한 식물 기반 시스템은 전 세계인의 약 80%가 건강 관리를 위한 전통 의약품으로 이용하고 있다[1].

약용 식물은 항균 활성을 갖는 화합물을 가지고 있고, 합성 항생제보다 부작용이 적기 때문에 대안적인 항균제의 공급원이 될 수 있다[2]. 식물 추출물은 생물학적 활성을 갖는 페놀 유도체를 함유하고 있으며, 항균 및 항산화 특성을 갖는 것으로 알려져 있다[3, 4]. 폴리페놀에 대해서 항암, 항간독성, 항염증, 항궤양, 항바이러스, 항알레르기 및 혈관 확장 등 생리 및 약리학적 작용이 보고되었다[5, 6]. 폴리페놀은 식물의 이차 대사 산물이며, 항산화제로서 산화성 손상으로부터 세포를 보호함으로써 산화 스트레스와 연관된 다양한 질환의 위험을 줄일 수 있다[13].

양치식물은 전통 의학에서 널리 사용되었으며, 일반적인 용도는 피부, 상처, 열, 기침, 항균, 항바이러스, 항암 등에 이용되었다[7, 8]. 또한, 양치식물의 다양

† Corresponding Author

성명 : 김진

소속 : 광주보건대학교 간호학과

주소 : 광주광역시 광산구 북문대로 419번길 73

전화 : 062-958-7620

E-mail : jkim01@ghu.ac.kr

한 종이 의약 및 식품으로서 중요한 경제적 유용성이 있다고 주장되었다[9]. 밧풀고사리의 한 종류인 *Dicranopteris linearis*는 열대와 아열대에 가장 넓게 분포되어 있고, 풀고사리과에 속하는 양치식물들 중 하나이며, 항암, 항산화, 항균, 간보호, 항통각, 해열에 효과가 있다[10, 11].

산화스트레스는 암, 노화, 퇴행성 신경질환, 심혈관 질환 등 여러 질병의 발생에 기여한다. 항산화는 자유 라디칼을 소거하여, 표적의 산화적 손상을 지연시키거나 방지 또는 제거함으로써 세포 손상 및 세포 사멸을 억제할 수 있다[12, 13]. 이러한 맥락에서, 풍부한 항산화 식품 섭취는 산화스트레스와 관련된 질환 발생을 억제할 수 있기에 항산화 물질이 풍부한 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[14, 15].

암은 가장 위협적인 질환으로 발생 원인이 정확히 밝혀지지 않고 있으며, 암 발생자 수는 해마다 증가하고 있다. 우리나라의 경우 2016년 기준 암발생률이 남자의 경우 위암, 대장암, 전립선암, 갑상선암, 간암이 호발하였으며, 여자의 경우 갑상선암, 유방암, 대장암, 위암, 자궁경부암이 호발한 것으로 보고되었다[16]. 암을 치료하는데 있어 화학 요법 약물의 발전에도 불구하고, 정상적인 조직에 대한 독성 및 부작용, 약물 저항성은 임상에 적용하여 사용하는데 주요 장애물로 남아있다[17]. 따라서 부작용이 적고 효율적인 항암제가 필요하며 식물은 유망한 공급원이 될 수 있다[18].

국가표준식품목록 (<http://www.nature.go.kr/kpni/index.do>)에 따르면 밧풀고사리속에 속하는 *Dicranopteris pedata* (Houtt.) Nakaike는 한국에 분포하고 있으나 생리활성에 대한 과학적인 연구가 진행된 바가 없다. 이러한 이유로 본 연구는 산화스트레스를 억제하고 성공적인 암 치료를 위해서 항암 기능이 있는 안전한 천연물질로서 *Dicranopteris pedata* (Houtt.) Nakaike 추출물의 이용 가능성 연구 및 활용을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

2. 실험방법

2.1 실험재료 및 시약

실험에 사용한 밧풀고사리 (*Dicranopteris pedata* (Houtt.) Nakaike)는 보길도에서 채취한 후 음건하여 사용하였다. Folin-Ciocalteu's phenol reagent (F9252), quercetin (Q4951), gallic acid (398225), DPPH (2,2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl, D9132), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, M5655)는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), sodium carbonate (7541-4405)는 DAEJUNG (Gyeonggi-do, Korea), potassium acetate는 DUKSAN (Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2.2 추출방법

추출은 Dionex™ ASETM 350 Accelerated Solvent

Extractor를 이용하여 온도는 70 °C, 가열시간 5분, 반응시간 15분, 1순환 조건으로 증류수를 이용하여 추출하였다. 물 추출물을 AEDP로 명명하였다. 추출물은 원심분리기를 이용하여 원심분리하여 부유물을 침전시킨 후 상층액을 0.45 μm 주사기 필터를 이용하여 여과 후 농축하여 실험에 사용하였다.

2.3 DPPH 라디칼 소거능 측정

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼에 대한 소거능을 Blois의 방법[21]을 변형하여 측정하였다. 추출물을 0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μg/mL로 희석하여 준비한 후 96-well plate의 well당 0.1 mL를 넣고 1 mM DPPH 0.1 mL를 넣은 후 실온에서 30분 동안 암반응한 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하였다 (OASYS UVM 340, biochrom, chambridge, England). 추출물을 넣지 않은 대조군과 비교하여 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 구하였다.

2.4 총 폴리페놀 · 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-ciocalteu 방법 [20]을 변형하여 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 사용하였고, 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μg/mL로 희석하여 준비하였다. 96-well plate에 희석된 gallic acid와 1 mg/mL의 추출물을 well당 각각 0.1 mL를 넣고 0.1 mL 0.04 N Folin-Ciocalteu's reagent 와 0.1 mL 1% Na₂CO₃를 더한 후 1시간 동안 암반응시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다 (OASYS UVM 340, Biochrom, Chambridge, England). 총 폴리페놀 함량은 표준물질인 gallic acid로부터 얻은 검량곡선을 이용하여 구하였다.

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등 [19]의 방법을 변형하여 측정하였다. 표준물질로 quercetin을 사용하였고, 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μg/mL로 희석하여 준비하였다. 96-well plate에 희석된 quercetin과 1 mg/mL의 추출물을 well당 각각 20 μL를 넣고 5 μL 10% aluminum nitrate와 5 μL 1 M potassium acetate를 더한 후 270 μL ethanol을 더하여 혼합하고 실온에서 40분 동안 암반응시킨 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다 (OASYS UVM 340, Biochrom, Chambridge, England). 총 플라보노이드 함량은 표준물질인 quercetin을 이용하여 얻은 검량곡선으로부터 구하였다.

2.5 HPLC를 이용한 폴리페놀 분석

추출물에 포함된 폴리페놀을 정량분석하기 위하여 Agilent 1200 series HPLC (Agilent Technologies, CA, USA)를 이용하였다. 표준물질로 gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, rutin, vanillic acid, hesperidin, p-coumaric acid, oxyresveratrol, vanillin, quercetin, naringenin, kaempferol, chrysin, biochanin A, chlorogenic acid, 4-hydroxy benzoic acid 및, ferulic acid를 사용하였다. Column 은 YMC-Pack ODS-AM (250×4.6 mm I.D. 5 μm,

12 nm, YMC CO., Japan)을 사용하였고, mobile phase는 물에 0.1% acetic acid (solvent A)와 acetonitrile에 0.1% acetic acid (solvent B)를 사용하였고, 온도는 40°C, UV detector의 파장은 254 nm, flow rate는 1.0 mL/min로 하여 분석하였다[Table 1].

2.6 세포배양

본 연구에 사용된 사람 배아 신장 세포주 293T와 사람 자궁암 세포주 HeLa은 DMEM 배지에, 사람 구강암 세포주 YD-10B는 RPMI1640 배지에 10% fetal bovine serum과 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였고 37 °C, 5% CO₂ 조건의 가스인큐베이터에서 배양하였다.

2.7 세포독성 측정

24-well plate에 well당 1×10⁵개의 세포를 분주한 다음 16시간 후 추출물을 0~800 µg/mL의 농도가 되도록 처리하여 24시간 동안 반응시켰다. MTT 용액(5 mg/mL)을 50 µL 더하고 4시간 후 상층액을 제거하고 isopropanol 300 µL를 넣어준 후 교반기에서 30분간 암반응시켰다. 생성된 formazan으로부터 용출된 용액 100 µL를 96-well plate에 옮긴 후 microplate reader (OASYS UVM 340, Biochrom, Chambridge, England)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8 통계처리

모든 결과는 SPSS 20 (SPSS, Chicago, IL, USA) program을 통해 Duncan's multiple range test로 통계적 유의성을 p < 0.05 수준에서 검증하였고, 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

Table1. Operating Conditions of HPLC for Determination of Polyphenols

Condition		
Column	YMC-Pack ODS-AM (250×4.6mm I.D. 5µm, 12nm)	
Column oven temp.	40°C	
Flow rate	1.0 mL/min	
Detector	UV 254 nm	
	A(H ₂ O)% 0.1% Acetic acid	B(ACN)% 0.1% Acetic acid
Time	0	20
	3	40
Mobile phase	5	50
Time table	12.8	70
	14.9	100
	16.7	100
	18.6	20
	20	20

3. 결과 및 고찰

3.1 항산화 활성

항산화 활성은 안정적인 DPPH 라디칼을 소거시키는 활성을 측정하는 방법으로 자색의 DPPH 라디칼에 전자를 공여함으로써 유리가 환원되어 색이 탈색되는 것을 이용하는 방법이다[22]. 발풀고사리 (*D. pedeta*)의 물 추출물 (AEDP)의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL에서 각각 38.98±3.05%, 54.05±1.75%, 70.25±0.70%, 73.43±0.89%, 74.74±0.08%, 74.12±1.23%로 활성이 나타나는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 AEDP도 Zakaria와 Rajesh [7, 23]가 보고한 *D. linearis*의 물 추출물과 같이 항산화 활성을 갖는다는 것을 알 수 있었다.

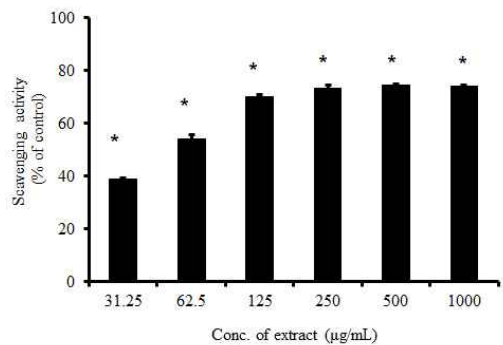


Figure 1. DPPH radical scavenging activity of aqueous extract from *Dicranopteris pedeta*. Data are expressed as the mean of triplicate independent experiments ± the standard deviations. (*p < 0.01)

3.2 폴리페놀 · 플라보노이드 함량

페놀 화합물은 식물들의 2차 대사산물이며 가장 넓게 존재하는 물질 그룹 중 하나이며, 식물계에서 8000개 이상의 페놀 구조가 확인되었다[24]. 하나 이상의 하이드록실 그룹을 갖는 방향족 고리를 가지고 있으며[25], 하이드록실기는 좋은 전자 공여체이기에 항산화 작용에 직접 기여할 수 있다[26]. AEDP가 함유하고 있는 총 폴리페놀과 총 플라보노이드를 측정하기 위해 표준물질로 gallic acid와 quercetin을 사용하였다. 그 결과 AEDP의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드는 92.5±8.68 mg GAE/g와 28.04±4.08 mg QE/g 함유하고 있었다(Table 2). 이 결과는 Rajesh [24]가 보고한 *D. linearis*의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 28.60±0.33 mg GAE/g, 8.50±0.29 mg QE/g 비해 AEDP의 함량이 매우 높은 것을 알 수 있었다.

Table 2. Total polyphenol and flavonoid contents of aqueous extract from *Dicranopteris pedeta*

Extract	Total polyphenol (mg GAE/g dry extract)	Total flavonoid (mg QE/g dry extract)
AEDP	92.5±8.68	28.04±4.08

Total polyphenol content and total flavonoid content were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/g dry extract and mg of quercetin equivalents (QE)/g dry extract, respectively. Each value represents the mean of triplicate independent experiments ± the standard deviations.

3.3 HPLC를 이용한 페놀성 화합물 분석

총 17종의 페놀성 화합물(gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, rutin, vanillic acid, hesperidin, p-coumaric acid, oxyresveratrol, vanillin, quercetin, naringenin, kaempferol, chrysin, biochanin A, chlorogenic acid, 4-hydroxy benzoic acid 및 ferulic acid)을 표준물질로 이용하여 정량분석하였다. 그 결과 이용된 17종의 페놀성 화합물 중 protocatechuic acid, gentisic acid, rutin, vanillic acid, hesperidin, oxyresveratrol, quercetin, naringenin 등 8종의 페놀성 화합물이 검출되었고, 그 중에서 hesperidin이 가장 높은 함량을 보였다 [Table 3].

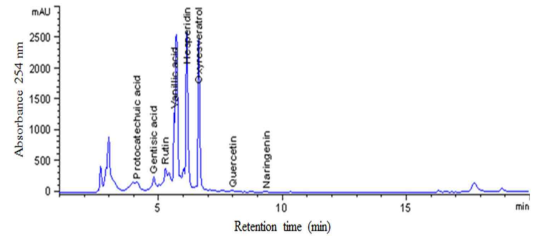
Table 3. Quantitative analysis of polyphenol contents using HPLC of aqueous extracts from *Dicranopteris pedeta*

Phenolic compounds	Concentration (mg/g of AEDP extract)
Gallic acid	N.D.
Protocatechuic acid	1.91
Gentisic acid	2.17
Rutin	0.94
Vanillic acid	8.76
Hesperidin	151.83
p-Coumaric acid	N.D.
Oxyresveratrol	8.63
Vanillin	N.D.
Quercetin	0.23
Naringenin	0.66
Kaempferol	N.D.
Chrysin	N.D.
Biochanin A	N.D.
Chlorogenic acid	N.D.
4-Hydroxy benzoic acid	N.D.
Ferulic acid	N.D.

N.D.: Not detected

*D. linearis*의 메탄올 추출물에서 HPLC 분석 결과 rutin과 quercitrin이 검출되었고 [27], MS spectroscopy 분석 결과 astragalol, dichotomain A

및 B, kaempferol 3-O-(2''-O-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside, 4-vinylphenol-1-O-(2-O-α-L-rhamnopyranosyl)-β-D-glucopyranoside, 4-vinylphenol-1-O-(4-O-α-L-rhamnopyranosyl)-β-D-glucopyranoside가 검출되었다는 보고는 있었지만 [28] *D. pedeta*의 추출물에서 이러한 결과는 본 연구를 통해 처음 보고되는 것이며, HPLC chromatogram에서는 검출된 표준물질 이외에도 여러 peak가 검출되는 것을 볼 수 있었다 [Fig. 2].

Figure 2. HPLC chromatogram of aqueous extracts from *Dicranopteris pedeta*.

3.4 정상세포에 대한 독성

AEDP의 세포독성을 측정하기 위해 인간 배아 신장 세포인 293T에서 MTT 분석을 수행한 결과 800 μg/mL의 농도까지 세포 증식을 억제하지 않고 오히려 약간 증가시키는 것을 확인할 수 있었다 [Fig. 3]. 따라서 다음 실험을 위해 세포에 독성이 없는 800 μg/mL의 농도까지 세포에 처리하여 실험을 수행하였다.

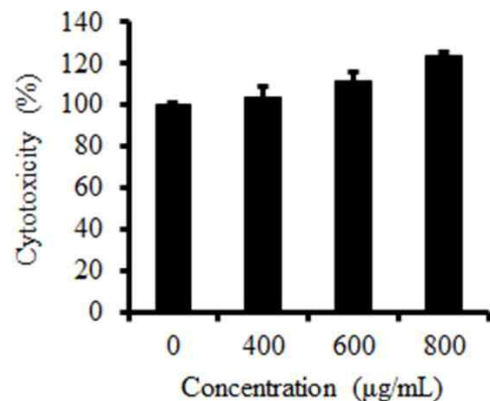


Figure 3. Effect of AEDP on cytotoxicity in human 293T cells. Cells were treated with the indicated doses of AEDP for 24 h. Data are expressed as the mean of triplicate independent experiments ± the standard deviations.

3.5 인간 유래 암세포 성장 억제

인간 유래 구강암 세포(YD-10B)와 자궁암 세포

(HeLa)를 이용하여 AEDP가 암세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT분석을 수행한 결과 구강암 세포인 YD-10B에서 400 µg/mL 농도에서 성장이 억제되어 800 µg/mL의 농도에서 50% 이하로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 자궁암 세포(HeLa)에서는 구강암 세포와는 달리 400 µg/mL 농도에서 50% 이하로 성장이 억제되는 것을 확인할 수 있었다 [Fig. 4]. Zakaria 등[7]의 보고에 의하면 *D. linearis* 물 추출물의 경우 자궁경부암 세포(HeLa)에서 100 µg/mL 농도일 때 약 20% 정도 성장을 억제하는 결과를 보여주었으며, 메탄올 추출물의 경우 같은 농도에서 50% 이하로 성장이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 실험에서 사용한 농도인 400 µg/mL일 경우 자궁경부암 세포(HeLa) 성장을 훨씬 억제할 수 있을 것으로 예상된다.

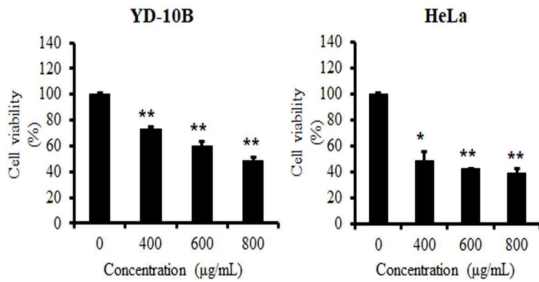


Figure 4. Cytotoxic effect of AEDP on human oral cancer and cervical cancer cells. Human oral cancer cell line (YD-10B) and cervical cancer cell line (HeLa) were treated with indicated doses of AEDP for 24h.

Data are expressed as the mean of triplicate independent experiments ± the standard deviations.

*p < 0.01, **p < 0.005 compared with control.

4. 결론

본 연구에서는 국내에 자생하는 발골고사리 (*Dicranopteris pedata* (Houtt.) Nakaike) 물 추출물의 항산화, 폴리페놀·플라보노이드, 페놀성 화합물, 및 항암 활성을 분석하였다. HPLC 분석을 통해 8종의 폴리페놀이 검출되었고 이 중 hesperidin의 함유량이 가장 높았다. 또한, 항산화 활성을 나타냈고, 구강암과 자궁암 세포 성장의 억제 활성을 갖으며 구강암에 비해 자궁암 세포의 성장 억제 활성이 더 높았다.

참고문헌

1. Yoo, Y. C., Lee, G. W. and Cho, Y. H., *J. Life Sci.*, 26(3), 338-345(2016).
2. Cheesman, M. J., Ilanko, A., Blonk, B. and Cock, I.

- E., *Pharmacogn. Rev.*, 11(22), 57-72(2017).
3. Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M. J., *Agric. Food Chem.*, 47(10), 3594-3962(1999).
4. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. *Trends Plant Sci.*, 2(4), 152-159(1997)
5. Haslam, E., *Polyphenols and herbal medicines. In Practical Polyphenols, from Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*, pp. 298-334, Cambridge University Press, U.K. (1998).
6. Bravo, L., *Nutr. Rev.*, 56(11), 317-333(1998).
7. Zakaria, Z. A., Mohamed, A. M., Jamil, N. S. Mohd., Rofee, M. S., Somchit, M. N., Zuraini, A., Arifah A. K. and Sulaiman, M. R., *Afr. J. Biotechnol.*, 10(2), 273-282(2011).
8. Wani, M. H., Shah, M. Y. and Naqshi, A. R., *Int. J. Bioassays*, 5.7, 4677-4685(2016).
9. Singh, H. B., *Pteridology in the New Millennium*, Chandra, S. and Srivastava, M. (eds.), pp. 421-446, Kluwer Academic Publishers, U.K. (2003).
10. Russell, A. E., Raich, J. W. and Vitousek, P. M., *J. Ecology*, 86(5), 765-779(1998).
11. López-Alarcón, C. and Denicola, A., *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10(2013).
12. Halliwell, B., *Lancet*, 344(8924), 721-724(1994).
13. Pandey, K. B. and Rizvi, S. I., *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2(5), 270-278(2009).
14. Prior, R. L., Wu, X. and Schaich, K., *J. Agric. Food Chem.*, 53(10), 4290-4302(2005).
15. Niki, E., *Free Radic. Biol. Med.*, 49(4), 503 - 515(2010).
16. Won, Y. J. *Annual report of cancer statistics in Korea in 2016*, National Cancer Center, Korea (2018).
17. Sak, K., *Chemother. Res. Pract.*, 2012, 282570(2012).
18. Fridlender, M., Kapulnik, Y. and Koltai, H., *Front Plant Sci.* 6, 799(2015).
19. Moreno, M. I., Isla, M. I., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A., *J Ethnopharmacol.*, 71(1-2), 109-114(2000).
20. Attard, E., *Cent. Eur. J. Biol.*, 8(1), 48-53(2013).
21. Blois, M. S., *Nature*, 181, 1199-1200(1958).
22. Thomas, M. J., *Nutrition*, 16(7-8), 716-718(2000).
23. Rajesh, K. D., Vasantha, S., Panneerselvam, A., Rajesh, N. V. and Jeyathilakan, N., *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 9, 220-225(2016).
24. Tsao, R., *Nutrients*, 2(12), 1231 - 1246(2010).
25. Tungmunthum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A. and Yangsabai, A., *Medicines*. 5(3), pii: E93(2018).
26. Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I. and El Hady, S., *Ann. Agric. Sci.* 58(2), 173 - 181(2013).
27. Kamisan, F. H., Yahya, F., Mamat, S. S., Kamarolzaman, M. F. F., Mohtarrudin, N., Kek, T. L., Salleh, M. Z., Hussain, M. K. and Zakaria Z. A., *BMC Complement Altern. Med.*, 14, 123(2014).

28. Ponnusamy, Y., Chear, N. J., Ramanathan, S. and Lai, C. S., *J. Ethnopharmacol.*, 168, 305-314(2015).