

과제구분	Code : LS0205	수행시기	전반기	연구기간	1999(1년차 완결)
연구과제명	민통선지역 삼지구엽초 소득화기술 개발 연구			과제책임자	강안석
세부과제명	삼지구엽초 생리활성기능 검증				
색인용어	삼지구엽초, 항산화기능, 면역활성기능, 간장기능, 혈압상승억제기능				
연구원별임무					
구분	소속	성명	전화번호	담당임무	
세부과제책임자	북부농업시험연구팀	김영진	(0353)458-4783	시험총괄수행	
공동연구자	"	김세원	"	시료조제 및 분석	
	강원대학교	이현용	(0361)250-6455	공동수행	

ABSTRACT

The biological activities of water, ethanol and 1:1(v/v) extracts from *Epimedium koreanum* Nakai were compared. 78% of antioxidative activity was measured by adding 1.0g/l of 1:1(v/v) extracts and the more concentration of extracts increase, the higher antioxidative activity was. 89% of Hep3B cell growth was inhibited by adding 1.0g/l of 1:1(v/v) extracts. It was also showed that 91% of A549 and 86% of MCF7 cell growth were inhibited by adding 1.0g/l of 1:1(v/v) extracts. And for screening immunomodulating activities, Jurkat(T-cell) was showed that the cell growth and viability were more increased and activated 254% by adding 1.0g/l of 1:1(v/v) extracts. The result of anti-mutagenicity of extracts of *E. koreanum* was lower. The enhancement of glutathione-S-transferase activity was increased 124% by adding 1.0g/l of 1:1(v/v) extracts. And 87% of hypoglycemic activity was measured by adding 1.0g/l of 1:1(v/v) extracts.

연구배경

삼지구엽초는 매자나무과 삼지구엽초속의 다년생 천근성 초본으로 우리나라에는 주로 경기, 강원 중북부지역 중심으로 자생하고 있다. 초장은 30cm 내외로 줄기의 가지가 세 개로 1가지에 3개의 잎이 달려 삼지(三枝)구엽(九葉)초라 하며 잎은 잎자루가 길고 난형이고 끝이 뾰족하며 밑부분이 심장형으로서 가장자리에 털같은 잔톱니가 있다.(김, 1996) 예로부터 삼지구엽초는 전초를 말린 것을 음양곽(淫洋藟)이라 하여 한방에서 강장, 강정, 거풍, 이뇨, 음위 등에 약재로 이용하여 왔다. 삼지구엽초의 주성분은 Icaritin으로서

(신등, 1996) 최근 국민소득의 향상과 더불어 건강에 대한 관심도가 고조되어 각종 건강 보조식품이 개발되면서 그 수요량이 증가하고 있는 실정이다. 그러나 삼지구엽초 유용성분의 기능은 국내에는 과학적으로 알려진 것이 없고 특히 국내산과 중국산의 생리활성에 대한 비교분석도 전혀 이루어져 있지 않고 있으며 다만 한방에서 약으로만 일부 사용되고 있으며 소량으로 식품에 첨가되는 것이 부분적으로 허락되어 있을 뿐으로 채취나 재배를 계획하는 농업인들에게는 수익면에서 그다지 도움을 주지 못하고 있다. 그러므로 삼지구엽초의 기능을 과학적인 기술로 확인하여 소비자에게 그 효능과 기능을 홍보할 필요가 있다 하겠다.

따라서 본 시험은 국내산, 중국산 삼지구엽초 경엽의 생리활성 기능을 사용 가능한 용매들을 이용하여 추출 용매를 다르게 하여 추출 용매에 따른 각 추출물들의 생리활성을 체계적으로 탐색하여 신소득 작목으로 개발 가능성이 높은 삼지구엽초의 기능성 식품 가치를 홍보함으로써 삼지구엽초 재배농가의 소득 향상과 국민 건강증진에 기여함을 목적으로 한다.

재료 및 방법

삼지구엽초의 경엽을 채취하여 음건한 후 시료 중량에 대해 10배의 증류수, ethanol 및 1:1(증류수 : ethanol, v/v) 용매로 12시간 동안 물 추출은 90℃, ethanol 추출은 60℃, 1:1추출은 70℃로 2회 열탕 추출하였다. 추출은 환류 냉각기를 연결시킨 flask에서 행하여졌고 각각의 추출물들은 뜨거운 상태에서 감압 여과한 후 농축, 동결건조하고 분말화하여 실험에 사용하였다.

항산화 활성은 $4.5 \times 10^{-3} \text{M}$ Linolenic acid 5ml에 시료를 각각 0.5ml를 첨가하여 50℃에서 산화반응을 실시한 후 반응액을 4일마다 경시적으로 1.1ml씩 test tube에 채취하여 TCA 1ml, TBA 2ml, BHT 0.1ml, SDS 1ml를 첨가하였다. 그리고 비등 수욕조에서 15분간 동안 가열하고 빙냉한후 빙초산 1ml, chlorform 2ml를 가하여 원심분리(2500rpm, 10분)하여 상등액을 532nm에서 흡광도를 측정하여 시료를 투여하지 않은 대조구와 비교하여 항산화 활성을 측정하였다(Koji등, 1997).

항암활성에 사용된 균주는 인간 유래의 간암세포(Hep3B), 폐암세포(A549), 유방암세포(MCF7)이며 정상세포는 간세포(WRL68)를 사용하였다. 실험에 사용된 기본 배지는 DMEM과 RPMI1640(GIBCO, USA)이며 FBS(GIBCO, USA) 10%(v/v)를 첨가해 37℃, 5% CO₂의 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 실험에 사용된 초기 세포수는 2×10^4 cells/ml로 조절하여 96 well tissue culture microplate에 100μl/well씩 접종하여 사용하였다. 세포생육도 측정은 SRB (sulforhodamine B)방법(Kata등, 1986 ; Kun and Sook, 1992)을 이용하였으며 세포의 성장률은 각 plate의 대조군과 비교하여 측정하였고, 세포독성은 MTT방법을 이용하였다.(Lee and Jee, 1996) 항돌연변이원성에 사용된 균주는

Bacillus subtilis PB1652 rec⁺와 PE1791 rec⁻이며 이 동결건조된 균주를 petridish상에 미리 준비하여둔 아가 배지상에 접종시킨 후 24-48시간 배양하였다. 배양이 완료되면 멸균된 TSB 액체 배지에 백금으로 취하여 37°C에서 24시간 배양하여 실험에 사용하였다. (Franca, 1995) 돌연변이원성은 아가 배지에 thin paper disk(8mm)를 올려놓은 다음 각각의 시료를 50, 100 μ g/paper disk의 양으로 투여하여 DNA 손상으로 세포의 생육이 억제되어져 생성된 clear zone의 지름을 측정하였고 대조구로는 강한 돌연변이 유발물질인 N-methyl -N-nitroso-guanidine(MNNG)을 이용하였다. 돌연변이원성을 확인한 후 thin paper disk에 MNNG(6 μ g/paper disk)와 각 추출물(3, 6 μ g/paper disk)을 혼합 투여하여 형성된 Inhibition zone을 비교하여 각 추출물이 MNNG의 돌연변이 원성을 얼마나 억제하는지를 rec⁺와 rec⁻균의 difference zone과 difference ratio로 나타내었다.

면역활성기능에 사용된 균주는 인간면역 세포인 T cell(Jurkat, TL-6)로서 생육촉진 정도를 측정하였다. 우선 활성화된 T cell의 농도를 2 \times 10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후에 20% FBS를 함유하는 RPMI 1640배지에서 배양하고 MTT 방법을 이용하여 T cell의 생육을 시료를 투여하지 않은 대조구와 비교하여 측정하였다(Lee and Jee, 1996)

GST의 활성 측정은 먼저 LOWRY법을 이용하여 시료의 단백질 함량을 측정한 후 각 추출물을 test tube에 농도별로 첨가한 후 37°C에서 5분동안 반응시킨 후 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene을 첨가하여 다시 37°C에서 2분동안 반응시키고 20% TCA를 가하여 반응을 종결하였다. 원심분리하여 상등액을 340nm에서 흡광도를 측정하고 시료를 투여하지 않은 대조구와 비교하여 단백질 함량에 따른 specific activity와 활성율을 계산하였다 (Habig and Pabst, 1974 ; Benson등, 1979 ; Kim and Park, 1994).

혈압조절기능은 ACE reagent one vial을 10ml의 증류수(37°C)에 녹여 effendorf tube에 1ml씩 담고 시료들을 0.1ml씩 첨가하고 ACE calibrator one vial을 1ml의 증류수에 녹여 각 effendorf tube에 첨가한 뒤 5분동안 37°C에서 반응시킨 후 340nm에서 흡광도를 측정하고 5분이 지난후 흡광도를 다시 측정하여 그 차를 ACE reagent(50 μ /l) 활성과 곱하여 ACE 활성율을 비교하였다.

혈당강화기능은 α -glucosidase와 PIPES buffer(10mM)을 섞은 10 μ l에 20mM maltose 40 μ l와 샘플 10 μ l을 넣어 반응액을 만들고 37°C에 20분간 반응시킨 다음, 1ml DNS 시약을 가해 100°C에서 10분간 반응시키고 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

본 실험에서 사용된 국내산, 중국산 삼지구엽초의 용매에 따른 추출수율을 보면 증류수1:에탄올(70°C)에서 국내산 삼지구엽초가 21.3%로 가장 높게 나타났고 전체적으로도 국내산 삼지구엽초의 수율이 다소 높게 나타났으나 유의적인 수준은 아니었다(표 1).

암, 면역기능 저하, 혈관계 질환, 노화의 발생이나 진행의 주요 촉진인자로 생체내에

존재하는 free radical과 관련되는 mechanism이 오래전부터 알려져 왔으며 항산화제는 체내의 free radical을 소거하기 때문에 그 결과로 질병예방의 효과가 있는 것으로 사료되고 있다. 따라서 항산화 활성의 측정은 암이나 노화의 진행을 억제할 수 있는 천연물질의 규명에 이용될 수 있다. 최근 국내에서는 천연물로부터 항산화활성 물질 개발에 대한 연구가 활발한데 권등(1997), 차와이(1998), 김등(1998)은 뽕나무 오디 추출물, 오배자, 고로쇠나무에서 각각 높은 항산화활성을 보고한 바 있다.

국내산과 중국산 삼지구엽초 각 추출물의 농도별 항산화활성 검색 결과 국내산 삼지구엽초의 1:1 추출물, 1.0g/l 농도에서 78%의 가장 높은 항산화활성을 나타내 중국산 삼지구엽초보다 우수하게 나타났으며 농도가 증가할수록 항산화활성이 증대되는 경향을 나타내(표 2) 김등(1992)이 음양곽 추출물 농도가 증가할수록 항산화 효과가 증대된다는 보고와 일치하였다. 또한 김등은 음양곽 methanol 추출물중의 유효 항산화성분은 tocopherol류와 flavonoid류로 추정하였다.

표 1. 용매종류별 삼지구엽초의 추출수율(%)

산지별	용매종류		
	증류수(90℃)	에탄올(60℃)	증류수1:에탄올1(70℃)
국내산	12.8	12.7	21.3
중국산	12.6	12.4	20.9

표 2. 삼지구엽초(국내산, 중국산) 추출물의 항산화활성(%)

추출물농도 (g/l)	국내산(%)			중국산(%)		
	증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1	증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1
0.2	33	38	42	27	25	31
0.4	37	46	55	32	37	42
0.6	42	56	64	45	44	54
0.8	59	63	75	51	52	66
1.0	67	70	78	59	63	71

면역 활성기능을 검색하기 위해 간암, 폐암, 유방암 세포주에 대한 생육억제 활성을 살펴보았을 때 각기 89, 91, 83%의 생육억제 활성을 나타냈다(표 3). 이러한 암세포 억제능이 단순히 모든 세포를 죽이는 것인지 암세포만을 선택적으로 죽이는지의 검토가 필요하여 사람의 정상 간세포(WRL68)를 사용하여 세포독성을 살펴보았다. 세포독성 검사

에서 추출물, 0.4g/l 이하의 농도로 투여시 정상세포의 생존율은 70% 이상으로 유지되어 정상세포에 대한 독성이 낮음을 확인하였다(표 4). 그러나 정등(1999)은 60종의 약용식물과 식용작물을 대상으로 함암제 개발을 위해 항종양활성의 생리활성기능 검정에서 검정콩과 쑥 등은 높은 활성억제력을 나타냈으나 음양곽등은 억제력이 낮았다고 보고하였다.

표 3. 삼지구엽초(국내산, 중국산) 추출물의 암세포들에 대한 생육 억제능

암세포	추출물농도 (g/l)	국내산(%)			중국산(%)		
		증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1	증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1
간암세포 (Hep3B)	0.2	34	48	39	38	43	41
	0.4	44	57	52	41	51	44
	0.6	59	69	65	53	63	63
	0.8	68	78	81	67	72	79
	1.0	72	84	89	69	79	83
폐암세포 (A549)	0.2	44	42	45	34	42	33
	0.4	49	53	61	42	43	47
	0.6	52	67	72	51	59	55
	0.8	63	81	88	62	74	73
	1.0	68	87	91	65	82	81
유방암세포 (MCF7)	0.2	42	37	36	36	33	31
	0.4	47	48	48	39	41	43
	0.6	54	56	69	47	54	51
	0.8	68	79	82	58	71	69
	1.0	71	84	86	62	73	75

표 4. 삼지구엽초(국내산, 중국산) 추출물의 정상 간세포(WRL68)에 대한 세포독성

추출물농도 (g/l)	국내산(%)			중국산(%)		
	증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1	증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1
0.2	13	7	18	17	19	23
0.4	17	23	29	28	31	29
0.6	24	42	34	32	38	34
0.8	36	51	41	37	43	39
1.0	41	53	44	42	48	47

일반적으로 돌연변이 억제물질들은 발암성분의 억제작용도 함께 가지고 있는 것으로

알려져 있는데 이는 암세포가 일종의 돌연변이 세포라는 것을 생각할 때 쉽게 이해가 가능하다. 항돌연변이원성 실험에서 국내산, 중국산 삼지구엽초 추출물들의 돌연변이원성은 없었으나 항돌연변이원성 또한 낮게 나타났다(표 5). 이러한 함암활성과 항돌연변이원성의 결과로 추출물의 감염에 대한 보호작용, 암 등 질환에 대한 면역반응을 확인한 결과 국내산 삼지구엽초의 증류수1:에탄올1 추출물, 1.0g/ℓ에서 254%의 높은 활성을 나타냈다(표 6).

표 5. 삼지구엽초(국내산, 중국산) 추출물의 항돌연변이원성

시료 및 추출방법	Inhibition halo diameter(cm)		Difference zone(cm)	Difference ratio (Sample/MNNG)	
	rec ⁺	rec ⁻			
국내산	증류수	1.2	2.8	1.6	0.94
	에탄올	1.1	2.6	1.5	0.82
	1:1	1.2	2.4	1.2	0.71
중국산	증류수	1.2	2.8	1.6	0.94
	에탄올	1.3	2.8	1.5	0.82
	1:1	1.2	2.7	1.5	0.82
MNNG(대조구)	1.2	2.9	1.7	1.0	

표 6. 삼지구엽초(국내산, 중국산) 추출물의 면역세포(TCell-Jurkat)에 대한 면역 증진능

추출물농도 (g/ℓ)	국내산(%)			중국산(%)		
	증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1	증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1
0.2	112	114	121	117	122	125
0.4	125	136	144	128	135	146
0.6	149	158	168	142	149	164
0.8	184	195	199	169	178	188
1.0	209	237	254	194	203	219

간장기능은 간의 주요 해독 기전인 GST(glutathione-S-transferase)에 대한 각 추출물이 미치는 영향을 검색하였다. GST는 reduced glutathione의 다양한 친전자체를 결합시키는 반응을 촉매하는데 발암원들은 대부분 친전자체이므로 GST의 측정은 발암물질을 해독하는 수단으로 중요하게 여겨진다. 국내산 삼지구엽초가 간기능 증진에서 중국산보다 높은 활성을 나타냈고 증류수1:에탄올1 추출물, 1.0g/ℓ에서 124%의 높은 활성을 나타냈다(표 7).

표 7. 삼지구엽초 추출물의 간기능 증진(glutathione-S-transferase : GST)에 대한 활성

추출물농도 (g/l)	국내산(%)			중국산(%)		
	증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1	증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1
0.2	76	74	89	64	67	78
0.4	84	78	95	77	76	80
0.6	89	86	103	82	89	95
0.8	92	98	116	91	94	102
1.0	96	107	124	98	104	113

※ 대조구 (삼지구엽초 추출물을 제외한 반응액)와 비교한 GST의 활성 수치임.

고혈압과 혈당 강하능 검색결과 국내산이 중국산보다 혈압상승 관련효소(ACE)와 혈당 상승 관련 효소(α -glucosidase)에 대한 활성 억제율이 증류수1:에탄올1 추출물, 1.0g/l 에서 각각 87%의 높은 활성 억제율을 나타냈다(표 8, 9).

표 8. 삼지구엽초 추출물의 ACE(angiotensin converting enzyme)에 대한 활성 억제율

추출물농도 (g/l)	국내산(%)			중국산(%)		
	증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1	증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1
0.2	64	67	70	64	66	67
0.4	68	71	71	68	68	70
0.6	70	73	78	72	73	73
0.8	76	82	86	73	79	82
1.0	77	84	87	75	82	83

표 9. 삼지구엽초 추출물의 α -glucosidase에 대한 활성 억제율

추출물농도 (g/l)	국내산(%)			중국산(%)		
	증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1	증류수	에탄올	증류수1 : 에탄올1
0.2	72	70	71	62	65	69
0.4	74	73	73	67	68	73
0.6	76	79	78	71	74	79
0.8	78	82	84	75	77	82
1.0	81	86	87	78	83	88

따라서 국내산 삼지구엽초는 중국산 삼지구엽초에 비해 항산화활성, 항암활성, 간기능 증진, 혈당강화 등에서 우수한 생리활성기능을 가지고 있고 특히 가장 우수한 생리활성기능을 가진 것으로 나타난 증류수1:에탄올1 추출물의 기능을 이용한다면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

삼지구엽초의 항산화기능은 국내산 삼지구엽초가 중국산보다 항산화 활성이 높게 나타났으며 증류수1:에탄올1 추출물, 1.0g/l에서 78%의 활성을 나타내 농도가 증가할수록 항산화 활성이 높아지는 경향을 나타냈다. 삼지구엽초 증류수1:에탄올1 추출물, 1.0g/l에서 간암, 폐암, 유방암 세포주에 대한 생육억제활성이 각기 89, 91, 86%로 나타났으며 추출물을 0.4g/l 이하의 농도로 투여시 정상세포의 생존율은 70% 이상으로 유지되어 세포독성이 낮았으며 국내산이 중국산보다 면역증진능이 높고 증류수1:에탄올1 추출물, 1.0g/l에서 254%의 활성을 나타냈다. 또한 삼지구엽초 추출물들의 돌연변이원성도 나타나지 않았으나 항돌연변이원성은 낮게 나타났다. 간장기능에서도 국내산이 중국산보다 간기능 증진에 대한 활성이 높고 1.0g/l에서 124%의 활성을 나타냈다. 고혈압 관련 인자의 작용에서 국내산이 중국산보다 혈압상승 관련 효소(ACE) 대한 활성 억제율이 높았고 혈당 및 당뇨작용에서 혈당상승 관련 효소(α -glucosidase)에 대한 활성 억제율이 높았다.

인 용 문 헌

- Benson, A. M., Y. N. Cha, and P. Talalay. 1979. Elevation of extrahepatic GST and epoxide hydrase activities by hydroxyanisole. *Cancer Res.* 39 : 2971 ~ 2977.
- 차배천, 이승배. 1998. 오배자의 항산화 및 자유라디칼 소거효과. *한국약용작물학회지* 6(3) : 181 ~ 187.
- Franca, Z. 1995. Studies on the insectidal activities of some new N-benzoyl-N'-srylureas. *Pestic. Sci.* 44 : 227 ~ 236.
- Habig, W. H. and J. M. Pabst. 1974. Glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* 22 : 7130 ~ 7139.
- 정일민, 김광호, 안종국, 안종석, 안순철. 1999. 국내 약용 및 식용식물중 항종양활성 식물탐색. *한국약용작물학회지* 7(1) : 37 ~ 44.
- Kata, T., T. Inoue, T. Ohta, and Y. Shrisu. 1986. Antimutagen and their modes of action. *In* D. H. Shankel *et al.* Plenum, New York 181 ~ 189.

- Kim, S. H. and E. S. Park. 1994. The study of prepared GE-132 on the hepatic glutathione-S-transferase activity in rat. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 23 : 581 ~ 586.
- 김성열, 김진환, 김승경. 1992. 음양곽 추출물의 항산화성분의 분리 및 성질. 한국식품과학회지 24(6) : 535 ~ 540.
- 김선여, 박광준, 이원주. 1998. 뽕나무 오디추출물의 항염증·항산화 작용에 대한 생리활성 검색. 한국약용작물학회지 6(3) : 204 ~ 209.
- Koji Tamagawa, Satoshi Iizuka, Sei Fukushima, Yoshimori Endo and Yoshihiro Komyama. 1997. Antioxidative activity of polyphenol extracts from Barley Bran. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi* 44(7) : 512 ~ 515.
- Kun, Y. P. and H. R. Sook. 1992. Inhibitory effect of green-yellow vegetables on the mutagenicity in salmonella assay system and on the growth of AZ-521 human gastric cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 21(2) : 149 ~ 153.
- 권용수, 김명조, 최용화, 곽상수. 1997. 고로쇠나무의 항산화물질 분리와 활성 비교. 한국약용작물학회지 5(4) : 302 ~ 306.
- Lee, G. Y. and U. K. Jee. 1996. Cytotoxicity, stability and antitumor activity of 5-fluorouracil prodrugs entrapped in liposomes. *Yakhak Hoeji* 40(5) : 522 ~ 531.
- 김태정. 1996. 한국의 자원식물. 서울대학교출판부 (1)p282.
- 신국현, 임순성, 안상득, 김승경, 박경열. 1996. 삼지구엽초의 채취시기 및 산지별 성분 차이. 한국약용작물학회지 4(4) : 16 ~ 21.

연구결과 활용

- 국내산 삼지구엽초의 생리활성기능 검정으로 효능의 우수성을 홍보하며 새로운 수요창출로 농가소득을 증대함.