

## 바위솔 추출물의 항산화활성 및 암세포 증식억제

김충현 · 박재호 · 임종국 · 이건주 · 정규영 · 정형진<sup>†</sup>

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부

## The activity of antioxidants and suppression of cancer cell proliferation in extracts of *Orostachys japonicus* A. Berger

Chung Hyun Kim, Jae Ho Park, Jong Kuk Lim, Kon Joo Lee, Gyu Young Chung and Hyung Jin Jeong<sup>†</sup>

School of Bioresources, College of natural science, Andong National University, Andong, 760-749, Korea

**ABSTRACT :** The antioxidative activities and biological properties in the EtOAc extracts and purified extracts of *Orostachys japonicus* were measured by assay of DPPH, xanthine/xanthine oxidase and mammalian cells(2-12). Scavenging of DPPH radical and inhibition of xanthine/xanthine oxidase of EtOAc extracts were showed the highest activity in the arable land and in September. The S-4 fraction showed the highest activity among the silica-gel column chromatography fractions. LH-4 fraction showed higher activity than the other fractions in assay of DPPH and xanthine/xanthine oxidase. Fatty acids and phenolic compounds were identified by GC/MS and main compounds were 1,2,3-benzenetriol, alpha-androsta-7,14-diene in LH-4 fraction. The activities of POD and SOD in samples harvested on different habitats were high such as arable land > intermountain > seashore. That of POD and SOD in crude extracts of late stage were higher than early stage. Isozyme bands of crude extracts sampled in all habitats and all growing stages showed two bands and the signal intensity showed strongly according to passage of growing stage. The purified extracts of LH-4 fraction showed excellent inhibition effect in proliferation of HL-60 cells and markedly suppressed colony formation in mouse fibroblast cells. Dose response between partially purified extracts(400ppm) and negative control did not produced statistically significant reduction in colony formation.

**Key words :** DPPH, Xanthine/xanthine oxidase, *Orostachys japonicus*, SOD, POD, Ras oncogene, Human HL-60 promyelocytic leukemia cell.

### 서 언

바위솔은 토양의 비옥도가 떨어지는 산지 또는 기와지붕 등에서 자생하는 CAM(crassulacean acid metabolism) 식물로서 돌나물과에 속하며 지붕, 담, 바위 등에서 자생하며, 개화기는 7-9월이고 결실기는 8-10월이다. 바위솔의 약리 작용은 토끼에게 1개월간 매일 유동 엑스를 점안했을 때 장

애가 없었고 결막염도 일으키지 않았으며 동공의 크기에 도 영향이 없었다고하며, 분류초약성에는 모든 부종 및 동통, 출혈을 치료한다고 한다(Kim et al., 1998). 민간에서는 토혈, 비출혈, 열독, 급성 무황달형 전염성 간염, 말라리아, 경풍, 방광결석, 임병, 습진, 폐렴 및 광견에 물렸을 때 등의 치료에 사용되고 주성분으로는 대량의 초산이 함유되어 있다고 알려져 있다.

<sup>†</sup> Corresponding author(phone): 054-820-5464, E-mail : jhj@andong.ac.kr  
Received 19 November 2002 / Accepted 19 February 2003

인체의 노화는 활성 산소에 의하여 결정되어진다는 보고이래(Harman, 1956), 노화에 대한 활성 산소의 역할에 대해 많은 연구가 이루어져있다(Beckman et al., 1998 ; Shigenga et al., 1994). 국소적으로 발생한 과잉의 프리라디칼이 충분히 소실되지 않으면 이들은 반응성이 높기 때문에 쉽사리 산화되는 생체성분, 예를 들면 지질이나 단백질, 핵산 등과 반응하여 다양한 생체상해를 일으키는 것으로 알려져 있다(Cavaliere et al., 1988). 프리라디칼이 세포에 손상을 일으키는 기전 중에 중요한 것으로는 체지방을 과산화시키는 것을 들 수 있는데 세포막을 형성하는 linoleic acid를 산화시켜 과산화지질로 변화시킴으로써 세포막의 구조가 파괴되어 유동성이나 투과성에 변화가 초래되고 세포막의 효소가 불활성화되어 결국 세포사를 일으킨다(Frankel, 1996). OH-(hydroxy radical) 기는 가장 반응성이 강하고 치명적인 프리라디칼종으로서 DNA 손상에 직접 영향을 미친다고 한다(Halliwell & Aruoma, 1991).

본 시험에서 조사된 xanthine oxidase는 염증, 아테로마성 동맥경화증, 암이나 노화와 같은 병리학적 과정속에서 야기되는 생체조직의 산화적 손상에 관여하는 프리라디칼로 중요한 생물학적 역할을 수행한다(Chang et al., 1994 ; Cos et al., 1998). Xanthine oxidase에 의하여 유도된 질병의 치료를 위하여 in-vitro 생물학적 검정시에 xanthine oxidase 억제력을 조사한다고 보고하였다(Goodman et al., 1990). 생체는 이러한 프리라디칼에 대한 방어기구로서 여러 가지 항산화효소를 갖고 있다. 대표적인 항산화효소에는 Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPX), Catalase (CAT), Methionine reductase, Ascorbate peroxidase, Glutathione-S-transferase 등이 있다(Alscher & Hess, 1993). 현재 이러한 항산화효소 이외에도 비타민 C, 비타민 E, ubiquinone(coenzyme Q), bilirubin, uric acid 등 여러 종류의 항산화물질의 중요성에 많은 관심이 집중되고 있다.

식물체내의 페놀화합물의 hydroxy group은 프리라디칼에게 수소원자나 전자를 공여하는 강력한 환원력을 가지고 있어, 이런 종류의 화합물이 세포의 산화적 손상을 보호하여 심장질환이나 암과 같은 질병의 진전을 막는다(Scott, 1997 ; Diplock, 1994). 최근에는 각종 생약이나 식용식물의 추출물들로부터 보다 안정하고 항산화력이 강한 천연약제를 개발하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 천연에서 얻을 수 있는 대부분의 항산화 물질들은 폴리페놀 및 후라보노이드 계통의 화합물로 알려져 있고 특히, 식물체내에는 대부분 페놀화합물로 보고되어져 있다(Choe & Yang, 1982).

따라서 본 연구는 자생약용작물로부터 안전하고 우수

한 항산화 및 항암 활성을 나타내는 자원을 탐색해 보고자, 항암효과를 가지고 있는 것으로 알려진 바위솔의 생육지별, 수확시기별 추출물로부터 효소 및 비효적 항산화 방어계를 조사하고, 정제된 추출물을 동물 암세포를 이용하여 항암활성을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

비효소 및 효소적 항산화 방어계를 조사하기위해 사용한 바위솔은 경북북부지역의 재배지(안동), 산(안동), 해안지역(영덕)에서 자생한 것을 2002년 6월부터 10월까지 매달 채취후, 세절하여 60℃에서 열풍 건조하여 사용하였고, 항산화 효소계 측정을 위하여서는 생체시료를 냉동(-20℃) 보관하여 사용하였다.

### 방 법

#### 1. 추출 및 분리

세절하여 열풍건조한 시료 2.0 kg에 70% 메탄올 2,000 ml을 가하여 7일간 침지시킨 후, 여과 농축한 메탄올 추출물을 감압농축기에서 450 ml까지 농축하였다. 농축액에 50 ml 증류수를 넣고 300 ml의 석유에테르로 3회 분획하여 수층을 취하였다. 수층을 50 ml까지 감압농축하여 증류수를 450 ml넣고 300 ml의 에틸아세테이트로 3회 분획한 후 에틸아세테이트층을 sodium sulfate anhydrous로 탈수시킨 후 농축하여 시료로 사용하였다.

#### 2. 활성물질의 정제

에틸아세테이트 분획물의 유효성분을 검색하기위해 에틸아세테이트 분획물(6 g)을 실리카겔(φ 3.5cm×50cm, 63~200 mesh, Merck) 컬럼 크로마토그래피에서 이동상을 CHCl<sub>3</sub> : MeOH (9 : 1, v/v)에서 CHCl<sub>3</sub> : MeOH (1 : 9, v/v)의 순서로 50 ml씩 분취하고 마지막으로 메탄올로 용출시켰다. 상기 분획물을 TLC 전개용매 CHCl<sub>3</sub> : MeOH : EtOAc (1 : 4 : 5, v/v)를 통해 5개의 subfraction으로 나눈 후 각 subfraction에 대한 DPPH, xanthine/xanthine oxidase 프리라디칼 억제활성을 비교하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 항산화 활성이 가장 높게 나타난 분획물을 sephadex<sup>TM</sup> LH-20 컬럼 크로마토그래피에서 메탄올을 이동상으로 사용하여 5 ml씩 분취하였다. 분취물을 TLC에서 전개용매 CHCl<sub>3</sub> : MeOH : EtOAc (2 : 3 : 5, v/v) 조건을 통해 5개의 소분획으로 나누어 각 분획물을 농축하여 HPLC용 메탄올에 녹인 후 0.2 μm disposable syringe filter(Adventec MCF)로 여과하여 GC/MS (Hewlett packard 6890/5973) 분석시료로 사용하였다.

### 3. DPPH 프리라디칼 소거활성

Cuvette 내에 농도별 측정시료와 300  $\mu$ M DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 용액을(515 nm에서 흡광도가 1.0이 되도록 용액을 희석) 넣고 37°C에서 30분간 반응 후 515 nm에서 대조구와 시료구와의 흡광도 차이를 측정하였다.

시료처리에 의한 억제율은 DMSO가 처리된 대조구와 비교하여 계산하였고 IC<sub>50</sub> 값은 50% DPPH 프리라디칼을 제어시키는 시료농도로 계산하였다.

### 4. Xanthine/xanthine oxidase 억제활성

Xanthine/xanthine oxidase 억제활성 측정은 Lee et al. (1998)의 실험 방법 중 xanthine oxidase를 0.2 unit으로 사용하여 측정하였다.

20  $\mu$ l xanthine oxidase용액(0.2 unit)이 포함된 100  $\mu$ l M xanthine용액(988  $\mu$ l)과 20  $\mu$ l DMSO는 실온에서 3분간 배양하고 295 nm UV에서 uric acid 생성량을 조사하였다.

### 5. 항산화 물질 동정

항산화 물질을 동정하기 위한 GC/MS (Hewlett Packard 6890/5973)는 Ultra-2 (Crosslinked 5% PH ME Siloxane, USA) 컬럼을 사용하여 Carrier gas는 순도 99.999%의 초고순도 헬륨(Union gas)를 분당 1 ml로 흘려주었다. 주입구와 검출기의 온도는 250°C로 설정하였고 주입방식은 splitless로 시료를 주입하였다. 온도프로그램은 최초 80°C에서 3분간 유지한 후 분당 3°C씩 250°C까지 상승시킨 다음 5분간 유지하여 총 분석시간은 65분이 소요되었다.

### 6. POD (Peroxidase) 활성

생체 1 g을 5 ml 0.05 M 인산 완충액(pH 7.8)과 함께 얼음 위에서 부드럽게 마쇄한 후, 4°C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 얻어진 상등액을 조효소액으로 사용하였다. POD 활성은 pyrogallol (Sigma, USA)을 기질로 사용하고 100  $\mu$ l 조효소액에 2.9 ml assay buffer를 첨가하여, 420 nm에서 20초간 상온에서 흡광도 변화를 측정하였다.

### 7. SOD (Superoxide dismutase) 활성

SOD활성은 xanthine oxidase와 cytochrome c를 이용한 McCord & Fridovich(1969)의 방법에 따라 측정하였다. 생체 1 g을 5 ml 0.05 M 인산 완충액(pH 7.8)과 함께 얼음위의 막자사발에서 마쇄한 후, 4°C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 조효소액으로

사용하였다. Xanthine/xanthine oxidase system을 superoxide radicals(O<sub>2</sub>·)의 공급원으로 이용하여 superoxide radicals에 의한 시토크롬 C의 환원속도를 550 nm에서 150초간 흡광도 변화를 측정하였다. SOD 활성 1 unit는 25°C에서 반응을 시작하여 150초간 550 nm에서 흡광도 변화를 조사하여 xanthine oxidase 활성이 50% 억제되는 것으로 정의하였다.

### 8. SOD의 동위효소패턴

SOD의 동위효소패턴은 Beauchamp & Fridovich(1971)의 방법에 준해서 수행하였다. SOD는 13% acrylamide gel에서 215 V에서 40분간 전기영동한 후 gel의 염색은 negative staining solution에서 30분간 암상태로 교반시켜 발색반응을 보았으며, 단백질 정량은 Bradford(1976) 방법에 준해서 실시하였다.

### 9. 정제물의 HL-60세포증식에 대한 억제효과

HL-60세포(Human promyelocytic leukemia cell)를 바위솔 추출물의 암세포 증식억제 활성측정에 사용하였다. HL-60 세포는 급성전골수성 암세포로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양조건과 10% fetal calf serum과 1% penicillin-streptomycin이 포함된 RPMI 1649 배지로 100 mm diameter culture dish에서 배양하였으며 3일간 배양후 실험에 사용하였다.

HL-60 세포의 증식에 대한 바위솔 추출물의 효과를 알아보기 위해 바위솔의 sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피로부터 분리한 LH-4 분획을 농도별로 처리하였다.

세포는 Coulter counter(Beckman coulter Z1)에서 3~5  $\mu$ m의 크기로 측정하여 각 well 1 ml당 5×10<sup>5</sup> 개씩 처리하였다. 처리세포는 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양조건에서 배양하였으며 세포의 수는 coulter counter에서 3~5  $\mu$ m 크기로 24시간 간격으로 측정하였다.

10. 종양세포의 콜로니 형성에 대한 추출물의 억제효과  
종양유발유전자가 전이된 2-12세포를 6 well plate에서 콜로니 형성억제 실험에 사용하였다. 본 세포주는 Ha-ras oncogene(valine mutation at codon 12)을 NIH 3T3 세포로 전환하여 만들어졌으며, Ben O de Lumen(UC at Berkeley)교수로부터 분양받았다. 2-12 세포배양 및 콜로니 형성억제정도는 Jeong et al. (2002)방법에 의하였다.

2-12 세포주는 5% CO<sub>2</sub>와 37°C에서 배양했으며 정기적으로 계대하였다. 배지는 10% calf serum이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)배지를 사용하였다. 각 well당 5% agar를 희석해서 0.6% base agar layer로 1 ml을 주입하고 상온에서 15분간 방치했다.

upper agar layer는 0.6% agar 550  $\mu$ l, growth medium 330  $\mu$ l, 1 M IPTG(Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside) 20  $\mu$ l 와 2-12 cells(40,000 cells/ml) 100  $\mu$ l을 조합해서 well 당 각 1 ml씩 주입했다. 세포는 14일간 CO<sub>2</sub> 항온배양기에서 배양했으며, 콜로니 형성관찰은 광학현미경(40배율)에서 실시하였다.

### 결과 및 고찰

#### 비효소적 항산화 활성

바위솔의 생육지별 EtOAc 추출물의 항산화 활성을 조사 해 본 결과, 전 생육지의 DPPH 프리라디칼 소거활성은 4.64-5.26 (IC<sub>50</sub>: $\mu$ g/ml)범위로 매우 높게 나타났고, xanthine/xanthine oxidase 억제활성도 6.07-10.32 (IC<sub>50</sub>: $\mu$ g/ml)로 높게 나타났다(Table 1). 생육기간 DPPH 프리라디칼 억제활성은 비슷하였고 xanthine/xanthine oxidase 억제활성은 재배지가 가장 높았으며 산, 바닷가 순으로 높았다. DPPH 프리라디칼 소거법은 항산화제가 안정한 DPPH 프리라디칼과 재반응하고 다시 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine로 변환되는 원리를 이용한 방법으로 다수의 식물추출물들의 항산화 활성을 검색하기 위한 bioassay-guided fractionation시에 이용되어진다(Cotelle *et al.*, 1996 ; Smith & Reeves, 1987 ; Lee, 1997). Xanthine oxidase는 uric acid 생성의 측정에 의하여 연구되어졌고(Chang *et al.*, 1994 ; Choe & Yang, 1982), 본 연구에서도 동일하게 uric acid의 양에 의하여 조사하는 방법을 강구하였다. 모든 호기적 진핵세포에서의 산소분자의 환원은 O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, -OH등의 독성이 높은 산소라디칼을 형성한다(Allen, 1995 ; Fridovich, 1986 ; Pitcher *et al.*, 1996). 생물들은 이런 독성으로부터 자신을 보호하기 위한 방어계를 가지며 ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene등의 비효소적 항산화물질은 산소 프리라디칼의 형성을 억제하는 작용을 한다(McCord & Fridovich, 1969 ; Fridovich, 1986). Xanthine oxidase 활성을 억제시키는 물질로 알려진 caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid와 같은 페놀화합물들은 쥐의 피부의 종양형성을 억제시키는 것으로 보고되어 있다(Huang *et al.*, 1998). 우수한 항산화제로 알려진 caffeic acid의 DPPH 프리라디칼과 xanthine/xanthine oxidase 억제값이 11.8(IC<sub>50</sub>: $\mu$ g/ml) 및 32.9(IC<sub>50</sub>: $\mu$ g/ml)로 각각 보고한 Lee *et al.* (1998)의 결과와 비교했을때, 정제되지 않은 바위솔 EtOAc 조추출물의 억제값이 7.87(IC<sub>50</sub>: $\mu$ g/ml)은 caffeic acid 보다 높아 정제된 바위솔 추출물은 강력한 항산화 및 항암제로서 가치가 있을 것으로 생각된다.

바위솔의 생육시기별 EtOAc 추출물의 항산화 활성을

조사해 본 결과, DPPH 활성 및 xanthine/xanthine oxidase 억제는 생육시기가 9월까지의 점차 높아졌고 그 이후는 8월과 비슷하였다(Table 2). 환경스트레스는 식물 내에서 존재하는 산소를 프리라디칼종으로 전환시켜 생체내의 대사과정의 장애를 유발함으로써 생산성의 감소를 초래한다(Allen, 1995 ; Runeckless & Krupa, 1994). 이러한 작용을 나타내는 프리라디칼종의 생육시기별 활성의 차이는 식물체의 생육상태, 생육년수, 시비방법 등 재배법에 따른 성분함량의 차이와 관련성이 있다고 한다(Hosoda and Noguchi, 1990).

따라서 생육시기에 따른 이들의 활성의 차이는 식물생육에 따른 환경 스트레스 및 생육 후기에 동화물질의 축적에 의하여 항산화 물질이 생성되었을 것으로 생각된다.

**Table 1.** Antioxidative activity of EtOAc fraction of *Orostachys japonicus* collected from different habitats

Habitat	Antioxidative activity	
	DPPH <sup>†</sup>	Xanthine/xanthine oxidase <sup>‡</sup>
Arable land	4.64	6.07
Intermountain	5.15	8.71
Seashore	5.26	10.32

<sup>†</sup>DPPH: DPPH free radical scavenging activity(IC<sub>50</sub>: $\mu$ g/ml)

<sup>‡</sup>Xanthine/xanthine oxidase: Inhibitory effect of xanthine/xanthine oxidase(IC<sub>50</sub>: $\mu$ g/ml)

**Table 2.** Antioxidative activities of EtOAc fraction of *Orostachys japonicus* collected from different growing stages

Growing stage	Antioxidative activity	
	DPPH <sup>†</sup>	Xanthine/xanthine oxidase <sup>‡</sup>
June	7.97	9.70
July	5.42	7.86
August	5.39	7.34
September	5.21	2.98
October	5.38	7.48

<sup>†</sup>: DPPH free radical scavenging activity(IC<sub>50</sub>: $\mu$ g/ml)

<sup>‡</sup>: Inhibitory effect of xanthine/xanthine oxidase(IC<sub>50</sub>: $\mu$ g/ml)

에틸아세테이트 추출물을 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 통해 5개의 소분획으로 분리하여 항산화 활성을 조사하고 그중 항산화 활성이 가장 높게 나타났던 S-4 분획물을 sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피에 의하여

5개의 소분획으로 정제 후, DPPH 및 xanthine oxidase 억제활성을 조사하였다(Table 3, 4). 컬럼 통과 후 DPPH 소거활성과 xanthine/xanthine oxidase 억제활성은 실리카겔 컬럼크로마토그래피에서 S-4분획이 5.02(IC<sub>50</sub>:µg/ml)와 6.18(IC<sub>50</sub>:µg/ml)로 가장 높았으며 LH-20 컬럼크로마토그래피에서 3.98(IC<sub>50</sub>:µg/ml)와 6.53(IC<sub>50</sub>:µg/ml)로 각각 가장 높았다. 특히 S-1 및 S-2 분획물은 매우 낮은 항산화활성을 나타내고 있어 실리카겔 컬럼크로마토그래피에 의한 항산화물질의 분리효과는 좋은 것으로 나타났으나

S-4 분획물의 LH-20 컬럼크로마토그래피를 통해 얻어진 각 분획의 활성을 측정한 결과, 실리카겔 컬럼크로마토그래피의 분획과 큰 활성차이를 나타내지 않아 LH-20 컬럼크로마토그래피의 정제효과는 크지 않았다. LH-4 분획물은 DPPH 프리라디칼과 xanthine/xanthine oxidase 억제가(IC<sub>50</sub>:µg/ml)가 각각 3.98과 6.53으로 항산화 활성이 매우 높아서 추후 항산제로서의 이용성면에서도 매우 가치가 있을 것으로 판단되었다.

**Table 3.** Antioxidative activities of silica-gel fractions eluted by using a silica-gel column chromatography in *Orostachys japonicus*

Number of fraction	Antioxidant activity		
	Recovery amount(g)	DPPH <sup>†</sup>	Xanthine/xanthine oxidase <sup>‡</sup>
S-1 <sup>§</sup>	0.558	ND <sup>¶</sup>	ND
S-2	0.858	21.69	7.22
S-3	1.454	5.35	7.45
S-4	2.258	5.02	6.18
S-5	0.764	5.99	10.00

<sup>†</sup>: DPPH free radical scavenging activity(IC<sub>50</sub>:µg/ml)  
<sup>‡</sup>: Xanthine/xanthine oxidase : Inhibitory effect of xanthine/xanthine oxidase(IC<sub>50</sub>:µg/ml)  
<sup>§</sup>: Fraction numbers of fractionates eluted by silica-gel column chromatography in ethyl acetate fraction  
<sup>¶</sup>: Not determined

**Table 4.** Antioxidative activities of LH-20 fractions fractionated by sephadex LH-20 column chromatography

Number of fraction	Antioxidant activity		
	Recovery amount(g)	DPPH <sup>†</sup>	Xanthine/xanthine oxidase <sup>‡</sup>
LH-1 <sup>§</sup>	0.023	151.14	ND <sup>¶</sup>
LH-2	0.189	32.33	235.14
LH-3	0.286	6.89	118.72
LH-4	0.358	3.98	6.53
LH-5	0.116	4.72	8.82

<sup>†</sup>: DPPH free radical scavenging activity(IC<sub>50</sub>:µg/ml)  
<sup>‡</sup>: Inhibitory effect of xanthine/xanthine oxidase(IC<sub>50</sub>:µg/ml)  
<sup>§</sup>: Fraction numbers of fractionates eluted by sephadex LH-20 column chromatography in S-4 fraction  
<sup>¶</sup>: Not determined

LH-20 컬럼크로마토그래피에 의하여 정제된 분획 중에서 DPPH 활성 및 xanthine oxidase 억제활성이 높았던 LH-4, LH-5 분획물을 GC/MS에 의하여 물질을 동정해 본 결과(Table 5), 페놀화합물인 1,2,3-Benzenetriol, Isoquinoline과 스테로이드계 페놀유도체인 alpha-Androsta-7,14-diene가 주 물질로 동정되었다. 비타민 C와 후라보노이드와의 상호 작용에 대한 연구보고에서 폴리페놀은 다른 항산화제와 상호작용을 하여 궁극적으로는 인간의 건강과 질병에 관여한다고 보고했다(szent Gyorgyi *et al.*, 1936). 페놀성 화합물은 과일이나 채소의 분해시와 녹차, 흑차 및 wine 등에서 주로 발견되는 화합물로서 세균, 알레르기 예방에 효과가 있는 것으로 보고되어 있으며 퇴행성 질병의 발병빈도를 저하시키고 인간의 건강증진을 위하여 천연 항산화물질로서 중요한 역할을 하는 것이 밝혀져 있다(Vijaya *et al.*, 1995 ; Ohmori *et al.*, 1995 ; Goldbohm *et al.*, 1996 ; Hertog, 1996 ; Hertog, 1996 ; Serafini *et al.*, 1996 ; Sadzuka *et al.*, 1996 ; Stoner & Mykhtar, 1995). 소나무 껍질 추출물내에는 procyanidins B1, B3, B7, caffeic acid, ferulic와 hydrobenzoic acid등의 폴리페놀화합물이 함유되어 있고, 이 성분들은 비타민 C 결핍, 상처, 피부과피등의 치유 효과가 있는 것으로 알려져 있고 프리라디칼을 감소시키는 것으로 알려져있다(Chandler *et al.*, 1979). Alpha-androsta-7,14-diene은 스테로이드계 물질로 이 화합물은 페놀유도체로 사료되며, 50세 이후의 노령층은 안드로겐, 에스트로겐과 같은 인자들의 불균형에 의해 전립선 비대증이나 전립선암의 비율이 증가하는데, 에스트로겐 생합성 조절제인 androsta 유도체가 유방암과 가슴 암세포에 대한 항종양 활성에서 탁월한 억제효과를 나타낸다고 보고되었다(Hong, 2000 ; Brodie, 1994 ; Nnne *et al.*, 2000). Benzenetriol은 대표적인 페놀화합물로 hydroxyl group의 결합위치에 따른 benzenediol과 benzenetriol의 효과구명에서 1,2,3-benzenetriol이 위조직에서 강력한 발암요소로 작용하는 N-nitroso 화합물을 지속적으로 감소시킨다고 한다(Enzo *et al.*, 1998). 상기의 연구보고들과 본 연구에 동정된 화합물을 비교해 볼 때 바위솔 추출물내에 존재하는 주된 활성성분들이 extracellular와

intracellular 프리라디칼종과 발암유발 요소로부터 주요 방어계로 작용 할것으로 판단되며, 1,2,3-benzenetriol과 alpha-androsta-7,14-diene은 추후 NMR(Nuclear Magnetic Resonance) 등에 의한 화합물의 구조적 특성 등의 연구가 필요한 것으로 생각된다.

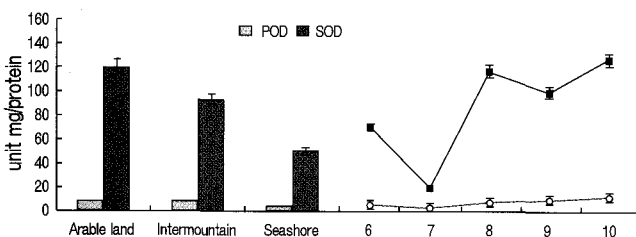
**Table 5.** The antioxidant compounds of elutes showed potential activity in fractions by using sephadex LH-20 column chromatography (Compound peak area/l.S.T.D peak area)

Compounds	LH-4	LH-5
Butanedioic acid	ND <sup>†</sup>	1.264
1,2,3-benzenetriol	2.064	1.557
Alpha-androsta-7,14-diene	12.270	5.568
Isoquinoline	ND	0.322
Octadecanoic acid	ND	0.415

<sup>†</sup> : Not determined

**효소적 항산화 활성**

생육시기 및 생육지별 바위솔 추출물이 효소적 항산화제인 SOD와 POD활성에 미치는 영향을 조사 해 본 결과, 생육지별 POD 및 SOD 활성은 비슷한 경향을 나타내었고, 특히 재배지에서 수확한 시료의 추출물이 야산에서 자생한 시료에 비하여 높았다(Fig. 1). 생육시기별 POD 및 SOD 활성은 수확시기가 늦을수록 높았다. 7월 수확물의 POD 및 SOD 활성은 다른시기에 비하여 낮았는데 이는 7월에 태풍, 장마등의 환경요인에 의하여 항산화 효소의 상대적 감소에 기인된 것으로 생각된다.

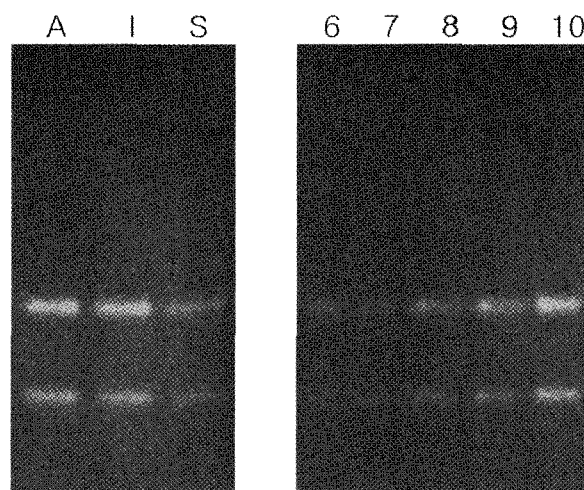


**Fig. 1.** POD and SOD activities of crude extracts collected on different habitats and growing stages(month) in *Orostachys japonicus*.

식물체의 생육지별 및 생육시기별 SOD 동위효소패턴을 조사 해 본 결과, SOD 동위효소의 수는 전 생육지, 전 생장시기에서 공히 2개의 밴드가 나타났으나, 그 세기는 생육지간에는 재배지에서, 생육시기간에는 수확시기가 늦을수록 높았다(Fig. 2).

효소계는 세포계에서 프리라디칼종을 제거 혹은 무독화

할 수 있으며 SOD와 POD와 같은 항산화 효소는 세포의 항산화 방어계의 주요 효소로서 생체내에서 SOD와 같은 효소들의 불균형은 세포내 기관이 활성 산소종의 공격을 받기 쉽게 받도록 만든다(Cerutti & Trump, 1991). SOD는 분포가 매우 명확히 알려져 있으며 산소를 소비하는 모든 생물체내에서 발견되었고 인체에서 다섯번째로 많은 단백질로 알려져 있다(Fridovich, 1986). 대부분의 생물체에서의 높은 O<sub>2</sub> 농도에서의 노출은 SOD 생성을 증가시킨다고 한다(Hassan, 1984).



**Fig. 2.** Isozyme patterns of SOD in crude extracts of different habitats and growing stages in *Orostachys japonicus*.

(A) Isozyme pattern in different habitats. A, I and S refer to Arable land, intermountain and seashore in habitats, respectively.

(B) Isozyme pattern in growing stages. The number(6-10) refers to sampling month in growing.

**항암활성**

- HL-60 세포증식 억제

바위솔 추출물의 전골수구성 암세포인 HL-60 세포에 대한 세포증식 억제효과를 측정하기 위해 3일 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양한 세포를 사용하여 Kang & Liang(1997)의 실험방법에 따라 LH-4 분획물 40, 80(ppm)을 처리한 후 억제율을 비교 해 본 결과, 배양기간별 세포의 증식억제율은 1일 경과후의 증식율이 40, 80(ppm)에서 control구에 비하여 각각 60.9, 52.48(%)로 급격히 낮아지는 반면, 2-4일 짜의 증가율은 51.85-46.14, 44.8-38.91로 비슷한 증가율을 나타내었다(Fig. 3). HL-60 세포에 대한 페놀계 물질의 억제활성에 대한

보고에 의하면 천연 후라보노이드인 quercetin의 HL-60 세포에 대한 증식억제효과에서 40 ppm의 4일째 증식억제율이 대조구에 비해 23.8%까지 억제한다고 보고되었으며 함께 종자내의 리그닌인 세사미놀의 항종양 활성에서 400 ppm의 농도에서 1일 후의 세포수는 대조구에 비해 높은 감소율을 나타내었다고 보고했다(Kang & Liang, 1997 ; Ryu & Lee, 1998 ; Fukuda *et al.*, 1986 ; Yamashita *et al.*, 1992).

따라서 LH-4 분획물내의 성분으로 동정된 alpha-androsta-7,14-diene과 1,2,3-benzenetriol은 각각 페놀 유도체와 페놀화합물로서 암세포의 증식을 탁월하게 억제시켜 함암제로서의 이용가치가 높을것으로 생각된다.

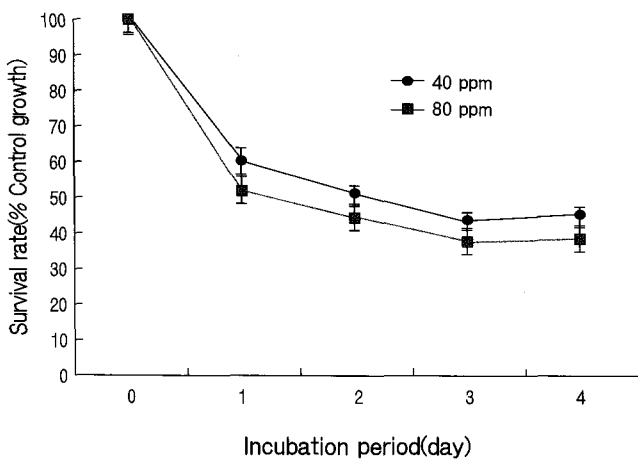


Fig. 3. Inhibitory effect of partially purified extracts from *Orostachys japonicus* in growth of HL-60 cells.

- 2-12 암세포의 콜로니형성에 대한 추출물의 억제효과  
2-12 colony assay는 독립부착 성장하며 종양유발유전자가 전이된 세포의 성장분석을 위한 단순하고 신속한 양

적도구로써 이용된다. 사람의 방광 암종양으로부터 클론한 Ha-ras는 operator와 결합한 *E.coli lac* 억제자를 가진 SV40 promotor에 의해 발현된다. 2-12로 지정된 세포주의 형질전환체는 isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG, from Sigma)의 유도에 의해 높은 Ha-ras 종양유전자와 독립부착성을 포함한 강력한 전이특성을 나타낸다(Liu *et al.*, 1992 ; Liu *et al.*, 1998). DPPH 및 xanthine/xanthine oxidase 활성이 매우 높은 LH-4 분획물을 농도별로 2-12 세포에 처리하여 콜로니 형성억제정도를 조사해본 결과, 100, 200, 300, 400(ppm) 처리시 모든 농도에서 종양유발유전자가 전이된 2-12 세포의 콜로니 형성을 억제시켰다 (Fig. 4, 5). IPTG를 넣지않은 negative control의 콜로니 형성은 매우 낮게 나타났으나 추출물을 넣지않고 IPTG로 유도된 positive control은 콜로니 형성이 높게 나타났다. 콜로니 형성이 positive와 모든 처리농도간에 유의차를 나타내었고, 처리 농도간에도 100과 200(ppm)은 300과 400(ppm) 간에 콜로니 형성에 유의차를 나타내었다.

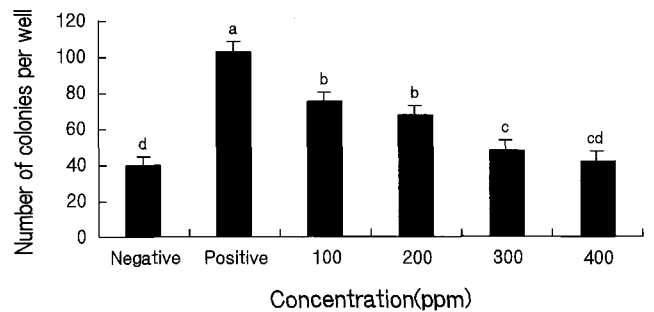


Fig. 4. Inhibitory effect of LH-4 fractionate on colony formation in IPTG-induced *ras* stably transformed 2-12cells. Treatment means ( $\pm$  standard errors) with similar letters are not significantly different from each other as analyzed by One Way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range Test.

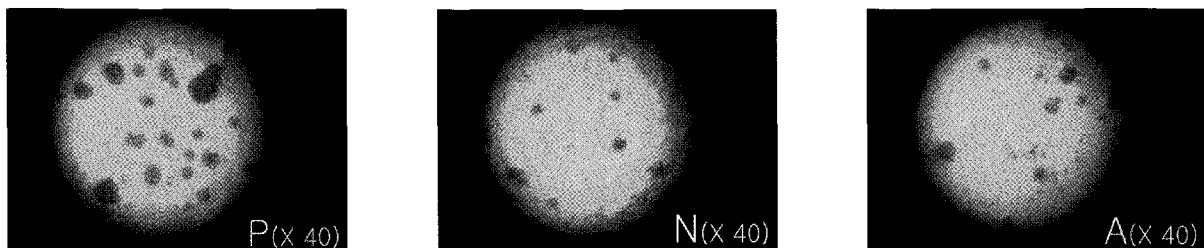


Fig. 5. Colony formation in IPTG-induced *ras* stably transformed 2-12cells.  
P : The positive control was treated with IPTG without eluates.  
N : The negative control was not treated with IPTG.  
A : Eluate(400ppm) purified was treated with IPTG.

따라서 바위솔의 정제된 추출물내에는 in vitro cell transformation을 억제시키는 물질이 존재하는것이 명확하다. 그러나 이들 물질이 암세포의 chromatin 결합 여부 및 저농도하에서의 암세포증식억제 등에 대한 연구는 추후 수행 할 예정이다.

## 적 요

바위솔의 추출물로부터 항산화 활성 및 동물 항암세포를 이용한 생물학적 특성을 조사 해 본 결과는 다음과 같다.

생육지별 DPPH 프리라디칼 소거 및 xanthine/xanthine oxidase 억제 활성비교에서 재배지에서 수확한 시료의 활성이 6.07(IC<sub>50</sub>: $\mu\text{g/ml}$ )로 가장 높았다. 생육시기별 DPPH 프리라디칼 소거 및 xanthine/xanthine oxidase 억제의 활성은 9월 수확물이 가장 활성이 높았다.

실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용한 항산화물질 분리결과에서 S-4 분획물의 DPPH와 xanthine oxidase 억제활성이 5.02(IC<sub>50</sub>: $\mu\text{g/ml}$ )와 6.18(IC<sub>50</sub>: $\mu\text{g/ml}$ )을 나타냄으로써 높은 분리효율을 보였다. 항산화활성이 가장 높았던 LH-4 분획물의 주요화합물은 GC/MS에 의하여 지방산, 폴리페놀화합물 및 페놀유도체로 동정되었으며 alpha-androsta-7,14-diene과 1,2,3-benzenetriol이 주 물질이었다.

POD 및 SOD 활성은 생육시간에 재배지, 산, 바닷가순으로, 생육시간에는 시기가 늦을수록 높게 나타났다. SOD 동위효소의 밴드수는 전 생육지, 전 생육시기에서 공히 2개의 밴드가 나타났으나, 그 세기는 재배지와 9월의 수확물이 가장 높은 활성을 나타내었다.

정제된 LH-4 분획물은 HL-60 세포의 종양증식을 억제시켰으며 종양유발유전자와 IPTG로 콜로니 형성을 유도한 암세포(2-12 cells)에서 분획물 400ppm 처리와 negative control 처리간의 colony 형성은 유의차가 없었다.

## LITERATURE CITED

Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 107 : 1049-1054.  
 Alscher RG, Hess JL (1993) Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton, 1-17.  
 Beauchamp C, Freidovich I (1971) Superoxide dismutase : Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 44 : 276-287.  
 Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78 : 547-581.  
 Szent-Gyorgyi A, Benthсанth A, Ruzsnyak S, (1936) Vitamin nature of flavones. *Nature*, 138 : 798.  
 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the

quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 72 : 248-254.  
 Brodie AM (1994) Aromatase inhibitor in the treatment of breast cancer. *J. steroid biochemistry and molecular biology*. Volume 49, Issue4-6, p 281-287.  
 Cavalieri EL, Rogan EG, Cremonesi P, Devanesan PD (1998) Radical cations as precursors in the metabolic formation of quinones from benzo[a]pyrene and 6-fluorobenzo[a]pyrene. Fluoro substitution as a probe for one-electron oxidation in aromatic substrates. *Biochemical Pharmacology*. Volume 37, Issue 11, p 2173-2182.  
 Cerutti PA, Trump BF (1991) Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells*, 3 : 1-7.  
 Chandler FR, Freeman L, Hooper SN (1979) Herbal remedies of the maritime indians. *J. Ethnopharmacol.* 1 : 49-68.  
 Chang WS, Chang YH, Lu FJ, Chiang HC (1994) Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. *Anticancer Res*, 14 : 501-506.  
 Choe SY, Yang KH (1982) Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene(BHT) and buthylated hydroxyanisole(BHA)(in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* 14 : 283-288.  
 Cos P, Yang L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Berghe DV (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxidase scavengers. *Journal of Natural Products*, 61 : 71-76.  
 Cotellet N, Bernier JL, Cateau JP, Pommery J, Wallet JC, Gaydou EM (1996) Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic. Biol. Med.* 20 : 35-43.  
 Diplock AT (1994) *Mol. Aspects Med.* 15 : 293-376.  
 Enzo S, Antonietta M, Giovanni B (1998) The effect of benzenediols and benzenetriols on the nitrosation of propranolol depends on the position of hydroxyl groups on the benzene ring. *Mutation Research*, Volume, 398, Issue 1-2, p. 75-82.  
 Frankel A, Mills GB (1996) Peptide and lipid growth factors decrease cis-diamminedichloroplatinum-induced cell death in human ovarian cancer cells. *Clinica Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, Volume 2, Issue 8, p 1307-1313.  
 Fridovich I (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247 : 1-11.  
 Fukuta YT, Osawa M, Namiki, Ozaki T (1985) Studies on antioxidative substances in sesame seed. *Agric. Biol. Chem.* 49 : 301-306.  
 Goldbohm RA, Hertog MG, Brant HA, Van Poppel G, Van der Brandt PA (1996) Consumption of black tea and cancer risk: a prospective cohort study. *J. Natl. Cancer Inst.* 88 : 93-100.  
 Goodman Gilman A, Wall TW, Nies AS, Taylor P (1990) *Pharmacological Basis of Therapeutics*, eighth ed, p 674-



- 681.
- Halliwell B, Aruoma OI** (1991) DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, Volume 281, Issues 1-2, p 9-19.
- Harman D** (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol*, 11 : 298-300.
- Hertog MG** (1996) Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proc. Nutr. Soc.* 55 : 385-397.
- Hassan HM** (1984) In *Free Radicals in Molecular Biology, Aging, and Disease*(D.Armstrong, R.S.Sohal, R.G.Cutler, and T.F. Slater, Eds.), Raven Press, New York, p 77.
- Hong SJ** (2000) Health potential of genistein against prostate diseases. *Proc. Intl'l Symp Soybean & Health*. p 11-25.
- Hosoda K, Noguchi M** (1990) Studies on the cultivation of *Bupleurum falcatum* L.(1), Effects of cultivation condition on the root growth and saponin contents. *Chem. Pharm. Bull.* 38(2) : 436.
- Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH** (1998) Inhibitory effect of curcumin, Chlorogenic acid, caffeic acid and Ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Cancer Res.* 48 : 5941-5946.
- Jeong HJ, Yi Lam, Lumen BO** (2002) Barley Lanasin suppress ras-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. *J. Agric. Food Chem.* 50 : 5903-5908.
- Kang TB, Liang NC** (1997) Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 Leukemia cells. *Biochemistry Pharmacology*, Volume 54, p 1013-1018.
- Kim CM, Shin KM, An KD, Lee SK** (1998) 중약대사전. 정담. (7) p 4042-4044.
- Lee SK** (1998) Evaluation of cancer chemopreventive activity mediated by antioxidants and modulators of tumor promotion. Phd thesis of university of illinois at Chicago. 52-54.
- Liu HS, Scoble H, Villaret DB, Lieberman MA, Stambrook PJ** (1992) *Cancer Res.* 52 : 983-989.
- Liu HS, Chen CY, Lee CH, Chou YI** (1998) *Br. J. Cancer* 77 : 1777-1786.
- McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (Hemocytin). *J. Biol. Chem.* 244 : 6049-6055.
- Nnnae IP, Long BJ, Ling YZ, Grigoryev DN, Brodie DM** (2000) anti-tumor effects and pharmacokinetic profile of 17-(5'-isoxazolyl)androsta-4,16-dien-3-one(L-39) in mice: an inhibitor of androgen synthesis. *British J. Cancer*, Volume 83, Issue 1, p 74-82.
- Ohmori Y, Ito M, Kishi M, Mizutani H, Katada T, Konishi H** (1995) Antiallergic constituents from oolong tea stem. *Biol. Pharm. Bull.* 18 : 683-686.
- Pitcher LH, Zilinskas BA** (1996) Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. *Plnt Physiol.* 110 : 583-588.
- Runeckless VC, Krupa SV** (1994) The impact of UV-B radiation and ozone on terrestrial vegetation. *Environ Pollut.* 83 : 191-213.
- Ryu SN, Lee BH** (1998) Antitumor activity of crude sesaminol in sesame seed. *Korean J. Crop. Sci.* 43(3) : 168-171.
- Sadzuka Y, Sugiyama A, Nozawa Y, Hirota S** (1996) The effects of theanine, as a novel biochemical modulator, on the antitumor activity of adriamycin. *Cancer Lett.* 105 : 203-209.
- Scott G** (1997) *Antioxidants in science, Technology, Medicine and Nutrition*, Albion, Chichester, UK.
- Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A** (1996). In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50 : 28-32.
- Shigenaga M, Hagen TM, Ames BN** (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 : 10771-10778.
- Smith RC, Reeves JC, Dage RC, Schnettler RA** (1987) Antioxidant properties of 2-imidazolones and 2-imidazolthiones. *Biochem. Pharmacol.* 36 : 1457-1460.
- Stoner GD, Mykhtar H** (1995) Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell. Bio. Chem.* 22 : 169-180.
- Kang TB, Liang NC** (1997) Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells.
- Vijaya K, Ananthan S, Nalini R** (1995) Antibacterial effect of theaflavin, Polyphenon 60(Camellia Sinensis) and Euphorbia hirta on Shigella spp. *J. Ethnopharmacol.* 49 : 115-118.
- Yamashita K, Nohara Y, Katayama K, Namiki M** (1992) Sesame seed ligands and  $\alpha$ -tocopherol act synergistically to produce vitamin E activity in rats. *Nutrient Metabolism* : 2440-2446.