

골질 보호 작용이 있는 수종 생약 추출액의 래디칼 소거능 및 DNA 보호 효과

최성숙 · 임동술 · 이숙연*
삼육대학교 약학대학

Radical Scavenging Activities and Protective Effects against Oxidative Damage to DNA of Extracts from Medicinal Plants with known Osteoprotective Effects

SungSook Choi, Dongsool Yim and Sookyeon Lee*
College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

Abstract – Among aging diseases, the most basic problem is a decrease in bone mineral density. Patients with osteoporosis are steadily increasing in the world. This study was investigated to show the relationship between osteoporotic effects and oxidative damage. Water extracts of 15 medicinal plants and ethanol extracts of 14 medicinal plants with known anti-osteoporotic effects, were tested for their radical scavenging activity using DPPH, ABTS, SRSA and FRAP assay. Water extract of *Cornus officinalis*, *Rubus coreanus* and ethanol extract of *Rubus coreanus*, *Viscum album var. coloratum*, *Cimicifuga heracleifolia* showed about 15-20 mg/g of total phenolic contents. Water extract of *Cornus officinalis*, *Rubus coreanus* and *Epimedium koreanum* showed high radical scavenging activity. Ethanol extract of *Drynaria fortunei*, *Cornus officinalis*, *Rubus coreanus*, *Gentiana scabra* and *Astragalus membranaceus* showed high radical scavenging activity. Water extract of *Drynaria fortunei*, *Cornus officinalis*, *Nelumbo nucifera*, *Epimedium koreanum*, and *Gentiana scabra* showed very strong protective effect against oxidative damage to DNA. These results suggest the correlation between anti-osteoporotic effects and antioxidative effects.

Key words – Osteoporosis, Medicinal plant, DPPH, ABTS, FRAP, SRSA, Oxidative damage, DNA

인체의 노화와 질병의 시작은 산화적 반응으로부터 비롯되며 그 중에서도 절대 노화의 근본적인 결과는 서서히 일어나는 골질의 감소라 생각된다. 이러한 산화적 반응과 골질의 감소와의 상관관계에 관심을 갖기 시작했으며 선진국에서는 골다공증으로 인한 pelvic fracture가 급증하여 사망의 원인이 되고 있는 실태이다.¹⁾ 호기적 호흡을 하는 생명체는 산소분자를 받아들여 미토콘드리아의 호흡작용, 면역세포에 의한 방어 작용 또는 외부의 자외선, 오존, 흡연 등의 각종 자극에 의해 활성산소종 (Reactive Oxygen Speices, ROS)을 생성한다. 이러한 활성 산소종으로는 O_2^- (superoxide anion), $HO \cdot$ (hydroxyl radical), 1O_2 (singlet oxygen), H_2O_2 (hydrogen peroxide), HOCl (hypochlorous acid) 등이 있다.²⁾ 활성산소는 생체 조직을 공격하여 세포를 산화, 손상시키는

주범이며 유해산소라고도 한다. 생체에는 정상적인 대사과정 중 지속적으로 생기는 이러한 활성산소종을 제거하는 항산화효소계 (예를 들어 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase) 와 여러 항산화물질 (vitamin C, vitamin E, glutathion, uric acid, bilirubin, carotene) 등이 존재함으로써 활성산소종의 생성과 제거사이에 균형을 갖추어 세포기능을 유지하고 있다.³⁾

하지만 활성산소종이 너무 많이 생성되거나 항산화시스템의 기능이 저하되는 상황에서 세포는 활성산소 종에 의해 유해 작용을 받는데 이를 산화적 스트레스 (oxidative stress)라고 한다. 활성산소는 세포나 세포소기관에 손상을 초래하기도 하며 생체 내 여러 단백질의 아미노산을 산화시켜 단백질의 기능 저하를 초래한다.^{4,5)} 또한 DNA에도 손상을 주는데 핵산 염기의 변형, 핵산 염기의 유리, 결합의 절단, 당의 산화 분해 등을 초래하여 돌연변이나 암의 원인이 되기도 한다. 우리 몸에서 발생하는 질환 중 약 90% 정

*교신저자 (E-mail): leesy45@syu.ac.kr
(Tel): 02-3399-1603

도가 활성산소와 관련이 있다고 알려져 있는데 그 중에 대표적인 것으로 암, 동맥경화, 당뇨병, 뇌졸중, 심근경색, 간염, 신장염, 아토피성 피부염, 파킨슨병 등이 있다.⁶⁻¹⁰⁾

한편 최근의 연구 결과에 따르면 산화적 스트레스와 뼈의 건강 악화의 연관성이 제기 되고 있다.¹¹⁾ 특히 뼈를 흡수하는 파골세포는 superoxide anion 및 hydrogen peroxide를 다량 생성하는 것으로 알려졌다.¹²⁾ 따라서 항산화물질이나 식품의 섭취에 의하여 산화적 스트레스 수준을 낮추고, 반응성 산소종을 제거한다면 뼈의 건강을 유지하는데 도움이 될 것으로 사료된다. 또 다른 연구 결과에 따르면 자몽의 polyphenol 성분¹³⁾ 이 자궁적출을 한 동물 모델에서 뼈의 손실을 예방하였다는 결과가 있으며 올리브유의 phenolic 화합물에 의한 뼈 손실의 감소 등의 보고가 있다.¹⁴⁾

이와 같이 산화적 스트레스가 노화를 비롯한 각종 질병의 중요한 원인으로 밝혀지면서 활성산소를 제거하는 항산화제에 대한 관심이 증가하고 있으며 따라서 우수한 항산화능력이 있는 천연물을 검색하고자 하는 노력이 진행되고 있다. 대부분의 식물유래 항산화능 물질들은 phenolic 및 flavonoid 계통의 화합물로 보고되어 있으며 특히 식물계에는 대부분 phenolic 화합물로 밝혀져 있다.¹⁵⁾

본 연구에서는 기존의 다양한 치료 목적으로 사용되는 생약 중 골질 보호 작용이 있는 것으로 보고된 골쇄보,¹⁶⁾ 보골지,¹⁷⁾ 산수유,¹⁸⁾ 복분자,¹⁹⁾ 음양곽,²⁰⁾ 두충,²¹⁾ 황기²²⁾를 포함한 15종의 생약을 대상으로 각종 래디칼 소거능을 실험하여 항산화능을 검색하였으며 산화적 손상의 biomarker인 DNA 손상에 대한 보호 작용을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물 조제 - 본 실험에 사용한 생약제는 (Table I) 경동시장에서 구입하여 깨끗이 세척 건조 후 세절하여 각각의 재료 50 g을 열수 추출 및 에탄올 추출 후 여과하였다. 이렇게 제조된 15종의 열수 추출액 및 14종의 ethanol 추출액을 최종 농도가 50 mg/ml 농도가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다.

시약 - Folin-Denis reagent, vitamin C, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), N,N-dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride, 2,4,6 tris-2-pyridyl-s-triazine (TPTZ), 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT) 등의 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며 그 외의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

총 페놀성 화합물 함량 측정 - 15가지 생약의 열수 추출액 및 ethanol 추출액의 총 phenol 성분의 함량을 Singleton and Rossi²³⁾ 등의 방법에 따라 tannic acid를 표준물질로 정량하였다. Folin-Denis reagent 0.1 ml와 생약추출액 0.1 ml

를 혼합하여 실온에서 3분간 반응시킨 후 2% Na₂CO₃ 0.1 ml을 가하고 다시 실온에서 1시간 반응하였다. 725 nm에서 흡광도를 측정하여 표준물질인 tannic acid의 농도에 기준하여 총 페놀성 화합물의 양으로 환산하였다.

DPPH 래디칼 소거활성에 의한 항산화능 검색 - 15종 생약의 열수 추출액 및 ethanol 추출액의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능을 Blois 등의 방법²⁴⁾을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 생약 추출액 20 µl와 0.2 mM DPPH 용액 80 µl을 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조물질로는 1 mM ascorbic acid (비타민 C)를 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 %로 표시하였다. 본 실험 후 래디칼 소거능이 우수한 약제를 대상으로 농도별로 실험하여 IC₅₀도 측정하였다.

ABTS⁺ 래디칼 소거활성에 의한 항산화능 검색 - 15가지 생약의 열수 추출액 및 ethanol 추출액의 2,2'-azinobis-3-ethyl benzo thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS⁺) radical 소거능을 Re²⁵⁾의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 7 mM ABTS (in water)와 2.45 mM K₂O₈S₂동량을 혼합 후 실온, 암소에서 16시간 방치하여 래디칼의 생성을 유도한 후 ABTS⁺ 래디칼 용액을 희석하여 734 nm에서 흡광도 값이 1.2~1.3 정도가 되도록 희석하여 사용하였다. 희석한 ABTS⁺ 래디칼 용액 980 µl와 생약 추출액 20 µl을 혼합하여 실온에서 15분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조물질로는 1 mM ascorbic acid를 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 %로 표시하였다. 실험을 통해 래디칼 소거능이 우수한 추출액을 대상으로 농도별로 실험하여 IC₅₀을 측정하였다.

Superoxide radical (Non-enzymatic system: NADH-PMS) 소거활성에 의한 항산화 효능검색 - superoxide radical은 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT)와 반응해서 560 nm에서 흡광도가 증가하며 따라서 SOD activity가 강하면 흡광도 값은 약하게 되는 원리에 기초하여 항산화능을 검색하는 방법이다.²⁶⁾ 생약 추출액 20 µl에 30 mM Tris-HCl (pH 8.0) 100 µl, 100 µM PMS 20 µl, 0.5 mM NADH 40 µl, 0.5 mM NBT 20 µl를 혼합하여 37°C에서 20분 방치 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조물질로는 1 mM ascorbic acid를 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 %로 표시하였다.

환원력 측정 - FRAP (Ferric Reducing/Antioxidants power) assay²⁷⁾는 Fe(III)을 Fe(II)로 환원하는 능력을 측정하여 항산화능을 측정하는 방법이다. 2,4,6 tris-2-pyridyl-s-triazine (TPTZ)이 Fe²⁺와 complex 형성하면 593 nm에서 흡광도가 증가하며 따라서 흡광도의 증가는 시험물질의 항산화능에 비례하게 된다. Reaction mixture [0.3M sod. acetate (pH 3.6) 25 ml, 10 mM TPTZ 2.5 ml, 20 mM FeCl₃

2.5 ml, H₂O 2.5 ml] 970 μ l와 생약 추출액 30 μ l를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. FeCl₂를 표준물질로 이용하여 작성한 표준곡선에 실험결과를 대입하여 환원된 Fe(II)의 양을 정량하여 각 생약 추출액의 항산화능을 검색하였다.

DNA의 산화적 손상유도 및 항산화물질에 의한 보호효과 - DNA의 산화적 손상을 유도하기 위하여 비타민 C (최종 농도 1 mM) 및 CuSO₄ (최종 농도 100 μ M) 를 혼합하여 hydroxyl radical 생성을 유도하였다.²⁸⁾ 위 반응액에 bovine blood DNA (10 μ g) 을 첨가 후 50 μ l의 생약 추출액을 첨가 하여 37°C에서 1시간 반응하였다. 대조군으로는 생약 추출액을 첨가하지 않은 군을 사용하였다. 반응액의 일부를 1% agarose gel 에서 전기영동 후 ethidium bromide 로 염색하여 DNA의 손상 정도를 비교하였다.

결과 및 고찰

총 페놀성 화합물의 함량 - 15종의 생약의 열수 추출액 및 에탄올 추출액을 대상으로 총 페놀성 화합물의 함량을 측정하였다. Folin-Denis reagent를 사용하였으며 tannic acid 를 표준물질로 하여 정량 후 총 페놀성 화합물의 양으로 환산하였다. 그 결과 Table I 및 Table II에서 보는 것처럼 생약의 종류에 따라 0.1~1.5 mg/ml 농도의 페놀성 화합물 함량을 나타내고 있다. 열수 추출액 중 산수유 (*Cornus*

officinalis)는 0.965 \pm 0.05 mg/ml, 복분자 (*Rubus coreanus*)는 1.393 \pm 0.05 mg/ml 농도로 15종의 열수 추출액 중 가장 높은 페놀성 화합물 함량을 보이고 있으며 에탄올 추출액의 경우 골쇄보 (*Drynaria fortunei*)의 경우 0.92 \pm 0.03 mg/ml, 복분자 (*Rubus coreanus*)가 1.02 \pm 0.07 mg/ml, 연자육 (*Nelumbo nucifera*) 은 0.95 \pm 0.05 mg/ml, 음양곽 (*Epimedium koreanum*) 은 0.97 \pm 0.06 mg/ml, 상기생 (*Viscum album var. coloratum*) 1.22 \pm 0.02 mg/ml, 승마 (*Cimicifuga heracleifolia*) 는 1.14 \pm 0.03 mg/ml 였다. 위 수치를 원료 약용식물 g당 mg 으로 환산하면 19~28 mg/g 으로 비교적 높은 페놀성 화합물 함량을 보여주고 있다.

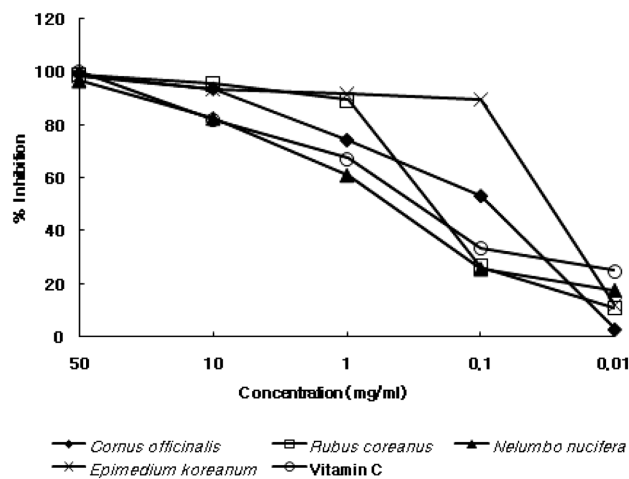
DPPH 래디칼 소거능 - Blois 등의 방법을 변형하여 DPPH 소거능을 측정하였다. DPPH는 생체내에 존재하는 래디칼은 아니지만 그 자체가 홀수 전자를 갖고 있어 517 nm 에서 강한 흡광도를 나타낸다. 따라서 항산화능이 있는 물질 (전자공여능)과 반응하게 되면 안정한 형태로 돌아가면서 흡광도 값이 감소한다. Table I 에 나타난 것처럼 15종의 열수추출액의 경우 50 mg/ml 농도의 추출액을 사용하였을 때 15종 모두에서 최소 50% 이상의 래디칼 소거능을 나타내었으며 특히, 산수유, 복분자 및 연자육의 열수 추출액의 IC₅₀은 0.1 mg/ml, 음양곽은 0.05 mg/ml 로서 매우 우수한 DPPH 래디칼 소거능을 나타내었다 (Fig. 1). 또한 에탄올 추출액의 경우 전체적으로 열수 추출액 보다 조금 낮은 DPPH 소거능을 보였지만 용담, 황기의 에탄올 추출액의 경

Table I. Summary of antioxidant activity of water extract of medicinal plants

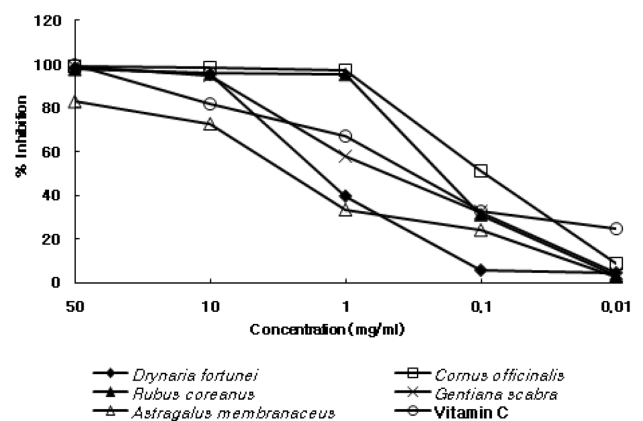
Sample	Total phenolic contents (equivalent to mg/ml of tannic acid)	DPPH (% inhibition)	ABTS (% inhibition)	FRAP (equivalent to mg/ml of Fe ²⁺)	SARS (% inhibition)
<i>Drynaria fortunei</i>	0.061 \pm 0.005	82.90 \pm 0.5	96.61 \pm 0.3	1.09 \pm 0.12	99.16 \pm 0.2
<i>Psoralea corylifolia</i>	0.195 \pm 0.01	66.21 \pm 0.7	95.42 \pm 0.3	0.79 \pm 0.03	95.8 \pm 0.3
<i>Cibotium barometz</i>	0.113 \pm 0.01	84.19 \pm 0.5	91.02 \pm 2.1	1.01 \pm 0.12	97.7 \pm 0.6
<i>Cornus officinalis</i>	0.965 \pm 0.06	99.06 \pm 0.02	98.62 \pm 0.2	1.16 \pm 0.14	82.1 \pm 1.2
<i>Rubus coreanus</i>	1.393 \pm 0.05	98.25 \pm 0.05	98.36 \pm 0.02	0.65 \pm 0.15	91.3 \pm 0.6
<i>Nelumbo nucifera</i>	0.186 \pm 0.02	98.31 \pm 0.05	98.64 \pm 0.4	0.118 \pm 0.03	98.8 \pm 0.1
<i>Epimedium koreanum</i>	0.458 \pm 0.02	98.26 \pm 0.06	99.89 \pm 0.02	1.12 \pm 0.7	99.6 \pm 0.1
<i>Eucommia ulmoides</i>	0.15 \pm 0.003	86.97 \pm 0.03	97.82 \pm 0.1	0.96 \pm 0.06	99.4 \pm 0.1
<i>Viscum album var. coloratum</i>	0.14 \pm 0.003	88.26 \pm 0.02	98.39 \pm 0.2	0.98 \pm 0.07	99.4 \pm 0.1
<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	0.164 \pm 0.02	73.95 \pm 0.6	95.04 \pm 1.2	1.03 \pm 0.3	99.2 \pm 0.3
<i>Achyranthes fauriei</i>	0.12 \pm 0.02	36.33 \pm 0.9	32.45 \pm 2.3	0.41 \pm 0.05	98.3 \pm 0.5
<i>Scrophularia buergeriana</i>	0.401 \pm 0.04	54.72 \pm 0.2	92.56 \pm 0.3	0.91 \pm 0.04	95.2 \pm 0.9
<i>Swertia japonica</i>	0.160 \pm 0.03	83.71 \pm 0.6	96.48 \pm 0.8	0.90 \pm 0.06	98.3 \pm 0.8
<i>Gentiana scabra</i>	0.56 \pm 0.06	87.82 \pm 0.4	92.56 \pm 0.7	0.48 \pm 0.02	99.5 \pm 0.2
<i>Astragalus membranaceus</i>	0.37 \pm 0.05	79.76 \pm 0.3	92.38 \pm 0.5	0.13 \pm 0.08	98.5 \pm 0.6
Vitamin C (1 mM)	-	97.8 \pm 0.6	96.78 \pm 0.8	1.23 \pm 0.7	97.5 \pm 0.5

Table II. Summary of antioxidant activity of ethanol extract of medicinal plants

Sample	Total phenolic contents (equivalent to mg/ml of tannic acid)	DPPH (% inhibition)	ABTS (% inhibition)	FRAP (equivalent to mg/ml of Fe ²⁺)	SARS (% inhibition)
<i>Drynaria fortunei</i>	0.92±0.03	89.15±0.5	99.19±0.3	1.16±0.12	94.2±0.2
<i>Cibotium barometz</i>	0.84±0.08	86.01±0.5	97.31±2.1	1.06±0.13	91.5±0.5
<i>Cornus officinalis</i>	0.56±0.02	85.61±0.2	98.89±0.2	1.09±0.14	93.1±0.7
<i>Rubus coreanus</i>	1.02±0.07	87.42±0.5	98.95±0.02	1.16±0.05	86.5±1.1
<i>Nelumbo nucifera</i>	0.95±0.05	69.62±0.7	99.78±0.4	1.13±0.15	95.2±0.9
<i>Epimedium koreanum</i>	0.97±0.06	22.71±2.1	98.39±0.02	1.12±0.03	90.2±0.6
<i>Eucommia ulmoides</i>	0.73±0.02	87.72±0.3	92.89±0.1	1.01±0.17	90.4±0.1
<i>Viscum album var. coloratum</i>	1.22±0.0.02	72.46±0.2	96.28±0.2	1.05±0.06	73.8±0.6
<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	1.14±0.03	56.25±0.6	83.82±1.2	1.05±0.07	89.2±1.5
<i>Achyranthes fauriei</i>	0.18±0.02	78.92±0.9	95.69±2.3	0.21±0.03	99.5±0.01
<i>Scrophularia buergeriana</i>	0.39±0.04	83.59±0.2	93.65±0.3	0.83±0.05	985.±0.1
<i>Rehmannia glutinosa</i>	0.67±0.02	67.78±0.6	95.24±0.8	1.12±0.14	90.2±0.2
<i>Gentiana scabra</i>	0.79±0.08	98.83±0.4	99.62±0.02	1.16±0.06	95.8±0.8
<i>Astragalus membranaceus</i>	0.73±0.02	83.31±0.3	98.34±0.5	1.12±0.08	86.4±0.8
Vitamin C (1 mM)	-	97.8±0.6	96.78±0.8	1.23±0.7	97.5±0.5

**Fig. 1.** Concentration dependent DPPH radical scavenging activity of 4 water extract of medicinal plants. Concentration of vitamin C were 100, 10, 1, 0.1 and 0.01 µg/ml, respectively.

우 98% 이상의 래디칼 소거능을 나타내었고 골쇄보, 보골지, 구척, 산수유, 음양곽 및 현삼 등이 80% 이상의 DPPH 래디칼 소거능을 나타내었다. 1 mM vitamin C의 IC₅₀은 0.3 µg/ml 인데 산수유 및 복분자의 IC₅₀은 각각 0.07 mg/ml 와 0.12 mg/ml 로서 매우 우수한 항산화 활성을 나타내었다 (Table II, Fig 2). 열수 추출액과 에탄올 추출액 모두

**Fig. 2.** Concentration dependent DPPH radical scavenging activity of 5 ethanol extract of medicinal plants. Concentration of vitamin C were 100, 10, 1, 0.1 and 0.01 µg/ml, respectively.

DPPH 래디칼 소거능이 우수한 생약으로는 산수유가 있으며, 열수 추출액, 에탄올 추출액 모두 총 페놀성 화합물의 함량과 래디칼 소거능 사이에는 강한 상관관계가 있는 것을 알 수 있었다.

ABTS 래디칼 소거능 - Re의 방법을 변형하여 7 mM ABTS (in water)와 2.45 mM K₂O₈S₂동량을 혼합 후 실온, 암소에서 16시간 방치하여 래디칼의 생성을 유도한 후,

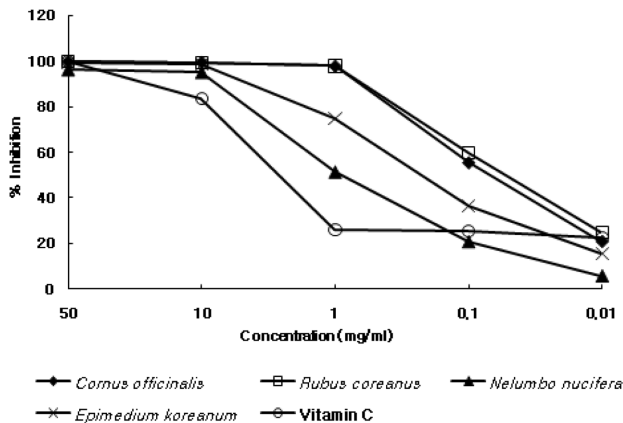


Fig. 3. Concentration dependent ABTS radical scavenging activity of 4 ethanol extract of medicinal plants. Concentration of vitamin C were 100, 10, 1, 0.1 and 0.01 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

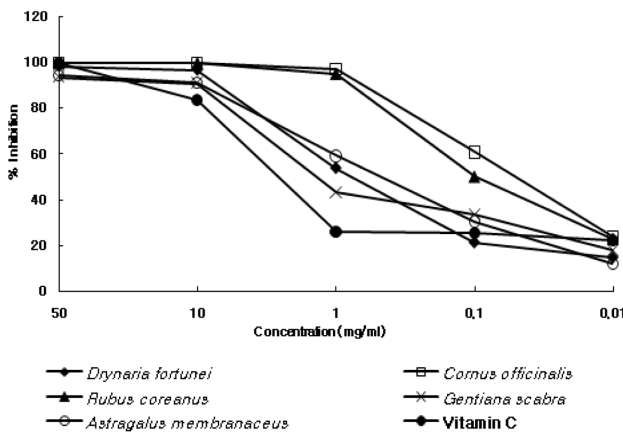


Fig. 4. Concentration dependent ABTS radical scavenging activity of 5 ethanol extract of medicinal plants. Concentration of vitamin C were 100, 10, 1, 0.1 and 0.01 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

ABTS⁺ 래디칼 소거능을 측정하였다. 그 결과 Table I에서 보는 것처럼 우슬을 제외한 14종의 생약 추출액이 모두 50 mg/ml 농도에서 90% 이상의 ABTS⁺ 래디칼 소거능을 나타냄을 알 수 있었으며 특히 음양곽 열수 추출액의 경우 IC₅₀ 값이 0.3 mg/ml, 산수유와 복분자는 0.07 mg/ml 이었다 (Fig. 3). 에탄올 추출액의 경우 Table II에서 보는 것처럼 50 mg/ml 농도에서 전체적으로 90% 이상의 래디칼 소거능을 나타내었으며 특히 산수유 및 복분자의 에탄올 추출액의 IC₅₀은 0.05 mg/ml 로서 비타민 C의 IC₅₀이 1 $\mu\text{g/ml}$ 인 것과 비교할 때 매우 우수한 항산화능을 나타내었다 (Fig. 4).

Superoxide 래디칼 소거능에 의한 항산화 효능 검색 - Superoxide radical은 NBT (4-nitroblue tetrazolium chloride)와 반응해서 560 nm에서 흡광도가 증가하는데 따라서 SOD activity가 강하면 흡광도 값은 약해지는 원리에 기초하여 항

산화능을 검색하는 방법이다. 본 실험 결과 Table I에서 보는 것처럼 50 mg/ml 농도의 열수 추출액의 경우 골쇄보, 연자육, 음양곽, 두충, 상기생, 승마, 우슬, 용담 및 당약 등이 98%이상의 superoxide 래디칼 소거능을 나타내어 1 mM 비타민 C와 유사한 항산화 작용을 나타내었다. 또한 에탄올 추출액의 경우 전반적인 소거능은 열수 추출액에 비하여 조금 낮았으나 그 중에서도 연자육, 우슬, 현삼 및 용담 등이 50 mg/ml 농도에서 95%이상의 소거능을 나타내었다. 특히 우슬의 경우 앞의 2가지 항산화 능에서는 다른 생약재에 비하여 뛰어난 래디칼 소거능을 나타내지 않았지만 superoxide 래디칼 소거능의 경우 열수 추출액이나 알골 추출액 모두 다른 생약재에 비하여 뛰어난 래디칼 소거능을 나타냄을 확인할 수가 있었다.

FRAP Assay 를 이용한 항산화 효능의 검색 - Fe(III)을 Fe(II)로 환원하는 능력을 측정하여 항산화능을 측정하는 방법인 FRAP assay 를 실시하여 항산화 효능을 검색하였다. TPTZ (2,4,6 tris-2-pyridyl-s-triazine)이 Fe²⁺와 complex를 형성하면 593 nm에서 흡광도가 증가하며 따라서 흡광도의 증가는 시험물질의 항산화능에 비례하게 된다. 실험결과 15종의 열수 추출액의 경우 골쇄보, 구척, 산수유, 연자육, 음양곽 및 승마 등이 Fe²⁺ 1 mg/ml에 해당하는 1 mM 비타민 C와 유사한 정도의 환원력을 나타내었다 (Table I). 에탄올 추출액의 경우 우슬과 현삼을 제외한 12종의 생약재가 1 mM 비타민 C와 유사한 Fe²⁺ 1 mg/ml 이상에 해당하는 환원력을 나타내었다 (Table II).

산화적 손상으로 부터 DNA보호 효과 - 각종 항산화능을 보유한 생약재의 DNA보호 효과를 확인하고자 열수 추출액을 사용하여 산화적 손상으로부터 DNA보호 효과를 관찰하였다. 비타민 C와 CuSO₄를 이용하여 래디칼 생성을 유도한 후, 이 조건에 DNA를 생약 추출액과 함께 일정시간 노출하였다. 양성 대조군은 아무런 처리를 하지 않은 정상적인 DNA를, 음성 대조군은 래디칼에만 노출시킨 DNA를 사용하였다. 그 후 1% agarose gel에서 전기영동하여 DNA의 손상 정도를 확인하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 것처럼 생약추출액을 첨가하지 않고 래디칼에만 노출시킨 경우에는 DNA의 손상으로 gel 상에서 smearing된 전기영동 양상을 나타내었다. 한편 골쇄보, 산수유, 연자, 음양곽, 용담의 추출액을 처리한 DNA의 경우 래디칼에 노출시키지 않은 양성 대조군의 DNA와 유사한 전기영동 양상을 보이고 있다. 즉 이들 생약 추출물의 경우 DNA의 산화적 손상으로부터 보호하는 작용이 매우 우수한 것을 알 수 있었다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때 골질 보호작용이 있는 것으로 알려진 골쇄보, 산수유, 복분자, 음양곽, 황기 및 용담의¹⁵⁻²¹⁾ 래디칼 소거능이 우수한 것으로 보아 이들 생약의 골질 보호 작용은 래디칼 소거능에 기인한 것으로 사료된다. 열수 추출액 중 산화적 손상으로부터 DNA 보호 작용

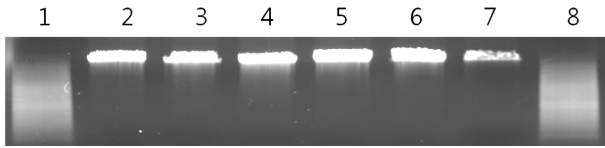


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of damaged DNA induced by Cu(II)-ascorbic acid and the protective effect of several medicinal plants. Lane 1 & 8, DNA exposed to Cu(II)(100 mM) and ascorbic acid 1 mM; lane, 2 undamaged DNA; lane, 3 DNA+Cu(II)+ascorbic acid+*Drynaria fortunei*; lane 4, DNA+Cu(II)+ascorbic acid+*Cornus officinalis*; lane, 5 DNA+ Cu(II)+ascorbic acid+*Nelumbo nucifera*; lane 6, DNA+Cu(II)+ascorbic acid+*Epimediium koreanum*; lane 7, DNA+Cu(II)+ascorbic acid+*Gentiana scabra*

이 우수한 생약 중 골쇄보, 산수유, 음양곽 등은 이미 골질 보호 작용이 알려져 있으나 그 외에도 본 실험을 통하여 DNA 보호 작용이 우수한 연자, 용담 등의 추출액에 대하여는 in vitro 및 in vivo 실험을 통해 골질 보호작용 등을 더 연구하여 볼 가치가 있는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 골질 보호 작용과 항산화작용의 상관관계의 유의성을 검색하기 위하여 골질 보호작용이 있는 것으로 보고되어 있는 15종의 생약을 선정하여 그들의 열수 추출액과 에탄올 추출액을 재료로 하여 각종 라디칼 소거능을 측정함으로써 그들의 항산화능을 비교하였다. 그 결과 복분자, 산수유, 연자 및 음양곽의 열수 추출액과 골쇄보, 산수유, 복분자, 용담 및 황기의 에탄올 추출액이 우수한 라디칼 소거능을 나타내었으며 라디칼 소거능과 페놀성 화합물의 함량 사이에는 비례관계가 성립하였다. 또한 15종 생약의 열수 추출액을 대상으로 산화적 손상으로 부터의 DNA 보호 효과를 실험한 결과 골쇄보, 산수유, 연자, 음양곽, 두충 및 용담 등이 우수한 DNA 보호 효과를 나타내었다. 이러한 결과를 통하여 골질보호능과 항산화능 사이에 상관관계가 있음을 제안한다.

사 사

본 연구는 2008학년도 삼육대학교 교내 학술연구비 지원에 의하여 진행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Seeman, E. (2008) Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength, *J. of Rheumatology* (Oxford), 47(suppl. 4) : iv2-8.

2. Badwey, J. A. and Karnovsky, M. L. (1980) Active oxygen species and the function of phagocytic leucocytes. *Ann. Intern. Med.* **93**: 480-485.

3. Babior, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* **109**: 33-44.

4. Farinati, F., Cardin, R., Degan, P., Rugge, M., Mario, F. D., Bonvicini, P. and Naccarato, R. (1998) Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* **42**: 351-356.

5. Cooke, M. S., Mistry, N., Wood, C., Herbert, K. E. and Lunec, J. (1997) Immunogenicity of DNA damaged by ROS implications for anti-DNA antibodies in lupus. *Free Rad. Biol. Med.* **22**: 151-159.

6. Darelly-Usmer, V. and Halliwell, B. (1996) Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm. Res.* **13**: 649-662.

7. Parthasarathy, S., Steinberg, D. and Witztum, J. L. (1992) The role of oxidized LDL in the pathogenesis of atherosclerosis. *Ann. Rev. Med.* **43**: 219-225.

8. Laurindo, F. R., da Luz, P. L., Uint, L., Rocha, T. F., Jaeger, R. G and Lopes, E. A. (1991) Evidence for superoxide radical dependent coronary artery vasospasm after angioplasty in intact dogs. *Circulation* **83**: 1705-1715.

9. Nakazono, K., Watanabe, N., Matsuno, K., Sasaki, J., Sato, T. and Inoue, M. (1991) Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10045-10048.

10. Palinski, W., Miller, E. and Witztum, J. L. (1995) Immunization of LDL receptor - deficient rabbits with homologous MDA modified LDL reduces atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 821-825.

11. Garrett, I. R., Boyce, B. F., Oretto, R. O., Bonewald, L., Poser, J. and Mundy GR. (1990) Oxygen derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* **85**: 632-639.

12. Lean, J. M., Jagger, C. J., Kirstein, B., Fuller, K. and Chambers, T. J. (2005) Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology* **146**: 728-735.

13. Deyhim, F., Mandadi, K., Patil, B. S. and Faraji, B. (2008) Grapefruit pulp increases antioxidant status and improves bone quality in orchidectomized rats. *Nutrition.* **24**(10): 1039-1044.

14. Puel, C., Mardon, J., Agalias, A., Davicco, M. J., Lebecque, P., Mazur, A., Horcajada, M. N., Skaltsounis, A. L. and Coxam, V. (2008) Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model. *J. Agric. Food Chem.* **56**(20): 9417-9422.

15. Cha, B. C., Lee, S. K., Lee, H. W., Lee, E., Choi, M. Y., Rhim, T. J. and Park, H. J. (1997) Antioxidant effect of domestic plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **28**: 15-20.

16. Wang, X. L., Wang, N. L., Zhang, Y., Gao, H., Pang, W. Y., Wong, M. S., Zhang, G., Qin, L. and Yao, X. S. (2008)

- Effects of eleven flavonoids from the osteoprotective fraction of *Drynaria fortunei* (KUNZE) J. SM. on osteoblastic proliferation using an osteoblast-like cell line. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo). **56**(1): 46-51.
17. Park, C. K., Lee, Y., Chang, E. J., Lee, M. H., Yoon, J. H., Ryu, J. H. and Kim, H. H. (2008) Bavachalcone inhibits osteoclast differentiation through suppression of NFATc1 induction by RANKL. *Biochem. Pharmacol.* **75**(11): 2175-2182.
 18. Jin, U. H., Kim, D. I., Lee, T. K., Lee, D. N., Kim, J. K., Lee, I. S. and Kim, C. H. (2006) Herbal formulation, Yukmijihang-tang-Jahage, regulates bone resorption by inhibition of phosphorylation mediated by tyrosine kinase Src and cyclooxygenase expression. *J. Ethnopharmacol.* **106**(3): 333-343.
 19. Do, S. H., Lee, J. W., Jeong, W. I., Chung, J. Y., Park, S. J., Hong, I. H., Jeon, S. K., Lee, I.S. and Jeong, K. S. (2008) Bone-protecting effect of *Rubus coreanus* by dual regulation of osteoblasts and osteoclasts. *Menopause.* **15**(4 Pt 1): 676-683.
 20. Zhang, D. W., Cheng, Y., Wang, N. L., Zhang, J. C., Yang, M. S. and Yao, X. S. (2008) Effects of total flavonoids and flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Phytomedicine.* **15**(1-2): 55-61.
 21. Zhang, R., Liu, Z. G., Li, C., Hu, S. J., Liu, L., Wang, J. P. and Mei, Q. B. Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) cortex extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats. *Bone.* 2008 Sep 16. [Epub ahead of print]
 22. Chiu, P. Y., Leung, H. Y., Siu, A. H., Poon, M. K., Dong, T.T., Tsim, K. W. and Ko, K. M. (2007) Dang-Gui Buxue Tang protects against oxidant injury by enhancing cellular glutathione in H9c2 cells: role of glutathione synthesis and regeneration. *Planta Med.* **72**(2): 134-141.
 23. Singleton, V. L. and Rossi, A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Viticult.* **16**: 144-158.
 24. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by use of a stable free radical. *Nature* **26**: 1199-1200.
 25. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying and improved ABTS radical action decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* **26**: 1231-1237.
 26. Liu, F., Ooi, V. E.C., and Chang, S. T. (1997) Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci.* **60**: 763-771
 27. Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**: 70-76.
 28. Rivero-Perez, M. D., Muniz, P. and Gonzalez-Sanjose, M. L. (2007) Antioxidant profile of red wine evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity and biomarkers of oxidative stress methodologies. *J. Agri. Food. Chem.* **55**: 5476-5483.

(2009년 6월 9일 접수)