

청미래덩굴 잎 및 뿌리 추출물의 항산화, α -Glucosidase 억제 및 항염증 활성비교*

김경곤^{1**} · 강윤환^{2**} · 김대중² · 김태우² · 최 면^{1,2§}

강원대학교 생명건강공학과,¹ 강원대학교 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터²

Comparison of antioxidant, α -glucosidase inhibition and anti-inflammatory activities of the leaf and root extracts of *Smilax china* L.*

Kim, Kyoung Kon^{1**} · Kang, Yun Hwan^{2**} · Kim, Dae Jung² · Kim, Tae Woo² · Choe, Myeon^{1,2§}

¹Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

²Well-being Bioproducts RIC, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

ABSTRACT

This study was conducted in order to compare the biological activities of leaf and root water extracts of *Smilax china* L. (SC) by measuring the total polyphenol and flavonoid contents, anti-oxidant activity, inhibitory effect on α -glucosidase, and anti-inflammatory gene expression. The total polyphenol and flavonoid contents of SC leaf (SCLE) and root (SCRE) water extracts were 127.93 mg GAE/g and 39.50 mg GAE/g and 41.99 mg QE/g and 1.25 mg QE/g, respectively. The anti-oxidative activities of SCLE and SCRE were measured using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging activity assay and reducing power assay. Both SCLE and SCRE scavenged radicals in a concentration-dependent manner, and SCLE showed stronger radical scavenging activity and reducing power than SCRE; however, both SCLE and SCRE exhibited lower activities than ascorbic acid. Compared to the anti-diabetic drug acarbose, which was used as a positive control, SCLE and SCRE exhibited low α -glucosidase inhibition activities; nevertheless, the activity of SCLE was 3.7 fold higher than that of SCRE. Finally, SCLE caused significantly decreased expression of the LPS-induced cytokines, iNOS, and COX-2 mRNA in RAW264.7 cells, indicating anti-inflammatory activity. These results indicate that SCLE might be a potential candidate as an anti-oxidant, anti-diabetic, and anti-inflammatory agent. (J Nutr Health 2013; 46(4): 315 ~ 323)

KEY WORDS: anti-oxidant activity, anti-inflammatory activity, anti-diabetic activity, α -glucosidase inhibition.

서 론

청미래덩굴은 우리나라뿐만 아니라 중국, 일본 등의 야산에 널리 분포하는 활엽덩굴성 관목으로 한의학에서 그 뿌리를 토복령이라 하여 위암, 식도암, 직장암, 식욕부진 등 소화기 질환에 민간요법으로 사용하였으며, 이노, 체력증강, 통풍, 류마티즘 등에도 효과가 있는 것으로 보고되었다.¹⁾ 그리고 청미래덩굴의 잎은 항균력과 항산화력에 대한 보고가 다수 있으며, 특히 추출물에서 α -tocopherol 수준의 항산화력을 갖는 kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside와 kaempferol-

3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside가 분리된 바 있어 그 활용 가치가 충분한 것으로 평가되고 있다.²⁾

최근 많은 연구논문을 통해 약용식물의 항산화효능이 알려졌으며, 이 항산화 활성은 폴리페놀과 플라보노이드에 의해 주로 나타나는 것이 밝혀졌다.^{3,4)} 이런 식물의 항산화 활성 물질은 인체 내에 존재하는 활성산소방어 효소인 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT), glutathione reductase 등이 과도한 스트레스에 노출되어 있는 현대인들의 인체 내에서 충분한 항산화 활성을 나타내지 못하는 것을 보완하고 활성산소종 (ROS)에 의한 면역력저하,^{5,6)} DNA 손상,^{7,8)} 장기 및 조직손상^{8,9)} 등을 치료 및 예

Received: Jul 15, 2013 / Revised: Jul 29, 2013 / Accepted: Aug 19, 2013

*This work was supported by grants of Well-being Bioproducts Regional Innovation Center project (B0009702).

**These authors contributed equally to this work.

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr

© 2013 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

방하는 효과를 나타낸다. 또한 천연항산화 활성 물질은 현대인들이 추가적인 항산화 효과를 확보하기 위해서 사용하는 합성 항산화제보다 독성 문제를 감소시킬 수 있어 천연항산화 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁰⁾ 한편, 이러한 항산화체계의 불안전성으로 유발되는 질병 중 당뇨병은 현대인에 있어서 가장 흔한 내분비계 장애질환으로 선진국을 중심으로 전세계적으로 발병하고 있다.¹¹⁾

당뇨는 지속적인 치료와 생활습관의 개선을 요구하기 때문에 환자의 삶의 질을 심각하게 떨어뜨리는 질환으로 최근 유병률이 급격하게 증가하고 있는 질병이다.¹¹⁾ 또한, 최근의 고령화 현상과 경제발전으로 인한 생활습관의 변화 및 운동부족은 당뇨병 환자 수를 급격하게 증가시켰으며, 당뇨병은 사회 및 의료비용이 가장 많이 들고 짐이 되는 만성 질병 중 하나가 되었다.¹²⁾

당뇨병은 췌장 β 세포의 파괴성 병변에 의해 인슐린이 결핍되어 생기는 제1형 당뇨병과 인슐린 분비 저하와 인슐린 저항성으로 인해 생기는 제2형 당뇨병으로 분류한다.^{13,14)} 최근연구에서 이런 췌장 β 세포의 기능장애가 산화적 스트레스에 의해 발생하는 것이 알려졌다.¹⁵⁾ 또한 당뇨에 의한 혈관질환 유발에 관련된 다양한 메커니즘이 연구되고 있지만 특히 주목 받고 있는 것은 oxidative stress에 의한 혈관내피의 기능장애이다. 고혈당은 혈관조직의 PKC 활성화를 유도하며 PKC에 의해 활성화된 NAD (P)H oxidase는 과산화물을 다량 생성하여 조직 내 oxidative stress를 증가시키고 그로인한 염증신호의 활성화는 내피조직의 기능장애, apoptosis 그리고 fibrosis를 유도하여 당뇨에 의한 혈관합병증을 유발한다.¹⁶⁾

당뇨의 치료는 약물치료와 함께 식이요법과 운동요법이 병행된다. 현재 시판되는 다양한 당뇨치료제는 크게 sulfonylurea, biguanide, meglitinide, thiazolidinedione 그리고 α -glucosidase inhibitor로 구분하며 각각 작용메커니즘, 안정성, 내약성 및 부작용이 다르다.¹³⁾ 그중 α -glucosidase inhibitor에는 acarbose, voglibose 및 miglitol이 판매되고 있으나 이들 제제를 장기 복용할 경우 일부 환자에서 복부팽만감, 구토, 설사 등 부작용이 나타날 수 있어 사용이 제한된다.^{17,18)} 이러한 부작용을 줄이고 장기복용이 가능하며 안전한 α -glucosidase inhibition 활성을 통한 혈당조절 효능의 천연물을 찾기 위해 지속적인 천연소재 탐색연구가 진행되고 있다.

염증반응은 상처 등에 세균의 침입으로 손상된 조직에 대한 국소적 방어기전이다. 염증반응이 일어나면 여러 가지 염증매개인자들이 분비되며 이로 인하여 통증, 발열, 홍반, 부종 및 기능 상실 등의 증상이 나타난다.^{19,20)} 대식세포는 염증반응에 관련되는 nitric oxide (NO), prostaglandin E_2 (PGE₂), 염증성 cytokine 등을 분비한다.²¹⁾ 그 중 iNOS는 염증자극에 의해 지

속적으로 대량 생산되어 염증반응에 기여하며²²⁾ 일반적으로 대식세포에서 염증성 cytokine 자극에 의해 유도되며, 특히 lipopolysaccharide (LPS) 또는 세균의 lipopeptide를 처리했을 때 급격히 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다.²³⁾ Cyclooxygenase (COX)는 prostaglandin을 합성하여 염증반응과 면역반응을 촉진한다.²⁴⁾ COX는 isoform인 COX-1과 COX-2가 있는데 COX-1은 정상상태에서 발현하여 위장관, 신장 등의 항상성 유지에 관여하며, COX-2는 염증이나 산화적 스트레스나 cytokine에 의하여 세포내 발현이 증가한다.²⁵⁾ 염증반응에서 발현이 증가되는 대표적인 pro-inflammatory cytokine은 interleukin (IL)-1 β , IL-6 등이 있으며, 대식세포 등은 이들을 분비하여 다양한 염증 반응을 매개하며 NO와 PGE₂생성을 유도한다.²⁶⁾

본 연구에서는 청미래덩굴의 생리화학적 유용성이 확인되었음에도 아직 다양한 생리활성에 대한 구체적인 연구결과가 미흡한 것을 확인한 바 청미래덩굴 잎 및 뿌리의 물추출물을 이용하여 항산화 활성, α -glucosidase 활성저해 효과 및 염증인자 발현 저해 효과를 확인함으로써 청미래덩굴의 neutralicals 소재로서의 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

시 료

실험에 이용된 청미래덩굴 잎과 뿌리는 경상남도 의령지역에서 채집하여 신흥목 교수 (동국대학교 한의과대학)에 의해 검수된 것을 사용하였으며, 건조 후 각각 마쇄한 뒤 무게 당 10 배의 증류수를 가하여 60°C에서 24시간 교반하면서 유효성분을 추출하고 filter paper로 여과한 다음 감압 농축 후 동결 건조 한 것을 시료로 사용하였다.

세포주 배양

RAW 264.7 대식세포 (Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line)는 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul)으로부터 분양 받아 사용하였다. RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Daegu)과 1% penicillin-streptomycin (PE-ST, Welgene, Daegu)이 첨가된 dulbecco's minimum essential medium (DMEM, Welgene, Daegu) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

세포독성 (Cell cytotoxicity) 측정

세포독성은 Chung 등이 사용한 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-di-phenyl-tetrazolium bromide (MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다.²⁷⁾ RAW264.7 대식세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/mL로 100 μ L씩 분주하고 24시간 동

안 배양한 후 FBS와 항생제가 첨가되지 않은 배지에 청미레 덩굴 잎과 뿌리를 농도별로 제조한 후 세포에 처리 후 24시간 동안 배양 하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 MTT시약 (5 mg/mL)을 넣고, 4시간 동안 배양한 후 상등액을 제거하였다. 각 well에 형성된 formazan에 DMSO 100 μ L를 첨가한 후 shaker를 이용하여 녹이고, 30분 후 UV/vis spectrophotometer를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 (Control)의 흡광도 값을 기준으로 세포독성을 비교하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's phenol 시약을 이용하여 측정하였다.²⁸⁾ 각 시료 0.2 mL과 증류수 4.8 mL, 50% Folin-Ciocalteu's phenol (Sigma, St Louis, Missouri, USA) 0.5 mL을 잘 혼합하여 3분간 반응시킨 후 1 mL의 10% Na₂CO₃를 첨가하여 1시간동안 반응시킨 다음 UV/vis spectrophotometer를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 화합물의 함량은 galic acid (Sigma, St Louis, Missouri, USA) 검량선에 의하여 산출하였다.

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법을 이용하여 측정하였다.²⁹⁾ 각 시료 0.5 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL, 80% ethanol 4.3 mL를 혼합하여 실온에서 40분간 반응 시킨 다음 UV/vis spectrophotometer를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 플라보노이드 화합물의 함량은 quercetin (Wako, Osaka, Japan) 검량선에 의하여 산출하였다.

DPPH, ABTS radical 소거능 및 환원력 측정

DPPH radical 소거능은 Blois 등의 방법을 변형하여 측정하였다.³⁰⁾ 증류수를 이용하여 농도별로 희석한 시료 0.2 mL에 0.15 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 0.6 mL를 첨가하여 암조건에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Negative control은 증류수를 넣어 측정하고, positive control은 ascorbic acid를 사용하여 다음 계산식에 의거하여 소거활성을 측정하였다.

DPPH radical 소거능 (%)

$$= 100 - [(absorbance\ value\ of\ sample / absorbance\ value\ of\ control) \times 100]$$

ABTS radical 소거능은 Re 등의 방법을 변형하여 측정하였다.³¹⁾ 7 mM의 ABTS와 140 mM의 potassium persulfate를 첨가하여 암소에서 24시간 방치한 후, 734 nm에서 흡광도가 0.7 ± 0.02 이 되도록 EtOH로 희석하였다. 희석된 ABTS 980 μ L와 농도별로 희석한 시료 20 μ L를 혼합하고, 상온에서 3분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

negative control은 증류수를 넣어 측정하고, positive control은 ascorbic acid를 사용하여 다음 계산식에 의거하여 소거활성을 측정하였다.

ABTS radical 소거능 (%)

$$= 100 - [(absorbance\ value\ of\ sample / absorbance\ value\ of\ control) \times 100]$$

환원력은 Arabshahi-Delouee와 Urooj의 방법을 변형하여 측정하였다.³²⁾ 시료 용액 0.5 mL에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 0.5 mL, 1% potassium ferricyanide 0.5 mL를 각각 혼합하여 50°C에서 20분 동안 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 2.5 mL을 가하였다. 위 반응액을 650 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 0.5 mL에 증류수 0.5 mL, 1% FeCl₃ 0.1 mL를 가하여 혼합한 반응액의 흡광도를 700 nm에서 측정하였다. 높은 흡광도가 강한 환원력을 나타낸다.

α -Glucosidase 활성억제능 측정

청미레덩굴 잎과 뿌리 물추출물의 α -glucosidase 활성억제능은 Ryu 등이 사용한 방법을 변형하여 측정하였다.³³⁾ 각 농도별 추출물 50 μ L에 2.5 mM p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (pNPG) 100 μ L를 첨가하고 0.02 units α -glucosidase 50 μ L를 첨가 후 37°C에서 반응시키고 0.1 M NaOH 100 μ L를 첨가하여 반응을 종결시켜 substrate인 pNPG로부터 유리되어 나오는 반응 생성물인 p-nitrophenol을 405 nm에서 측정하여 α -glucosidase 활성의 억제정도를 측정하였다. 실험의 대조군으로는 α -glucosidase 저해제로 알려진 acarbose (Sigma, St Louis, Missouri, USA)를 사용하였다. 실험은 농도 또는 시간에 따라 활성측정을 진행하였으며 다음 계산식에 의거하여 활성을 산출하였다.

$$\alpha\text{-glucosidase inhibition (\%)} = [1 - (C_{Abs} - S_{Abs}) / (C_{Abs} - B_{Abs})] \times 100$$

C_{Abs}: 대조구 흡광도

S_{Abs}: 시료 흡광도

B_{Abs}: 시료 무첨가구 흡광도

Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

청미레 잎 물추출물을 처리한 RAW 264.7 세포에서 배양액을 제거하고 QIAzol reagent (Qiagen, Germany)를 사용하여 total RNA를 분리 및 정량하였다. 정량된 RNA에 oilgo (dT) primer와 superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 template로 사용하여 IL-1 β , IL-6, iNOS, COX-2 유

Table 1. PCR primer sets used in the experiment

	Primer	Sequence (5'→3')	PCR product size
IL-1 β	Sense	GCACTACAGGCTCCGAGATGAA	145 bp
	Antisense	GTCGTGCTTGGTCTCCTTGT	
IL-6	Sense	CTGGGACTGATGCTGGTGACA	118 bp
	Antisense	GCCTCCGACTTGTGAAGTGGTA	
iNOS	Sense	GACCAGTATAAGGCAAGCACAA	735 bp
	Antisense	CTTGCTTTGACCCAGTAGC	
COX-2	Sense	GAGAGACTATCAAGATAGTGATC	859 bp
	Antisense	TGGTCAGTAGACTTTACAGCTC	
GAPDH	Sense	GTCGTGGAGTCTACTGGTGT	489 bp
	Antisense	GTCATCATACTTGGCAGGT	

전자 primer를 이용하여 polymerase chain reactin (PCR) 방법으로 증폭하였다. PCR산물은 ethodium bromide (EtBr)가 첨가된 1.2% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 확인하였다. PCR에 사용한 primer 염기서열은 아래 Table 1과 같다.

통계분석

모든 실험결과는 3회 이상 반복하여 Mean \pm SD로 나타내었다. 통계분석에 의한 유의성 검증은 Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 Student t-test one way를 이용하였다.

결 과

세포 생존율

청미래덩굴 잎과 뿌리 물추출물의 세포독성을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에 추출물을 0.1, 0.5, 1, 2 mg/mL 농도별로 처리하여 세포 생존율을 확인하였다 (Fig. 1). 소재를 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때 청미래 잎과 뿌리 물추출물은 2 mg/mL 농도까지 90% 이상의 세포 생존율을 보였고 통계적으로 유의성 있는 차이가 관찰되지 않아 독성이 없는 것으로 판단하였다. 또한 이러한 실험 결과를 바탕으로 본 연구에서 진행된 항산화활성과 α -glucosidase inhibition 효과 및 mRNA 발현실험을 세포에 무해한 1 mg/mL 이하의 농도에서 진행하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

청미래덩굴 잎과 뿌리 물추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 Fig. 2와 같다. 폴리페놀의 정량을 위해 galic acid (GA)를 이용하여 검량선 ($R^2 = 0.995$)을 작성하고 이에 따라 총 폴리페놀의 함량을 계산하였다. 청미래덩굴 잎 물추출물의 경우 127.93 ± 9.47 GAE mg/g, 뿌리 물추출물의 경우 39.50 ± 11.00 GAE mg/g의 함량을 확인할 수 있었다. 플라보노이드 함량은 quercetin (Q)을 이용하여 검량선 ($R^2 =$

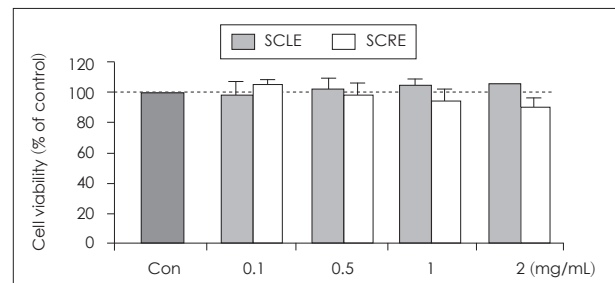


Fig. 1. Effects of water extract from *Smilax china* L. leaf and root on cell viability. Raw264.7 cells were cultured for 24 hr with various concentration of leaf and root extract. Cytotoxicity was determined by MTT assay. Results are presented as Mean \pm SD of three independent experiments. SCLC: *Smilax china* L. leaf extract, SCRE: *Smilax china* L. root extract.

0.999)을 작성하여 이에 따라 플라보노이드 함량을 산출하였다. 그 결과 잎 물추출물 41.99 ± 5.59 QE mg/g, 뿌리 물추출물 1.25 ± 1.31 QE mg/g의 함량을 확인할 수 있었다.

청미래덩굴 잎 및 뿌리 추출물의 항산화 활성

청미래덩굴 잎과 뿌리 물추출물의 항산화활성을 확인한 결과 Fig. 3, Table 2, 3과 같다. 잎과 뿌리의 DPPH radical 소거능은 잎 1 mg/mL에서 $68.67 \pm 0.95\%$, 0.5 mg/mL에서 $48.04 \pm 2.12\%$ 의 높은 소거능을 나타냈으나 뿌리는 1 mg/mL에서 $10.13 \pm 2.31\%$, 0.5 mg/mL에서 $7.41 \pm 2.15\%$ 의 매우 낮은 소거능을 나타내었다 (Fig. 3A). ABTS 라디칼 소거능에서도 잎은 1 mg/mL에서 $81.57 \pm 1.99\%$, 0.5 mg/mL에서 $46.84 \pm 1.12\%$ 의 높은 소거능을 나타냈으나 뿌리는 1 mg/mL에서 $14.58 \pm 0.58\%$, 0.5 mg/mL에서 $7.85 \pm 0.35\%$ 로 낮은 소거능을 나타내었다 (Fig. 3B). 잎과 뿌리의 radical 소거능에 대한 IC_{50} 을 계산한 결과 Table 2에 정리된 바와 같이 잎의 활성이 뿌리의 활성보다 약 10배가량 높은 것을 확인할 수 있었다. 환원력 측정에서도 Table 3에서 정리한 바와 같이 뿌리추출물은 물추출물과 비교하였을 때 20% 이하의 낮은 활성이 관찰되었다.

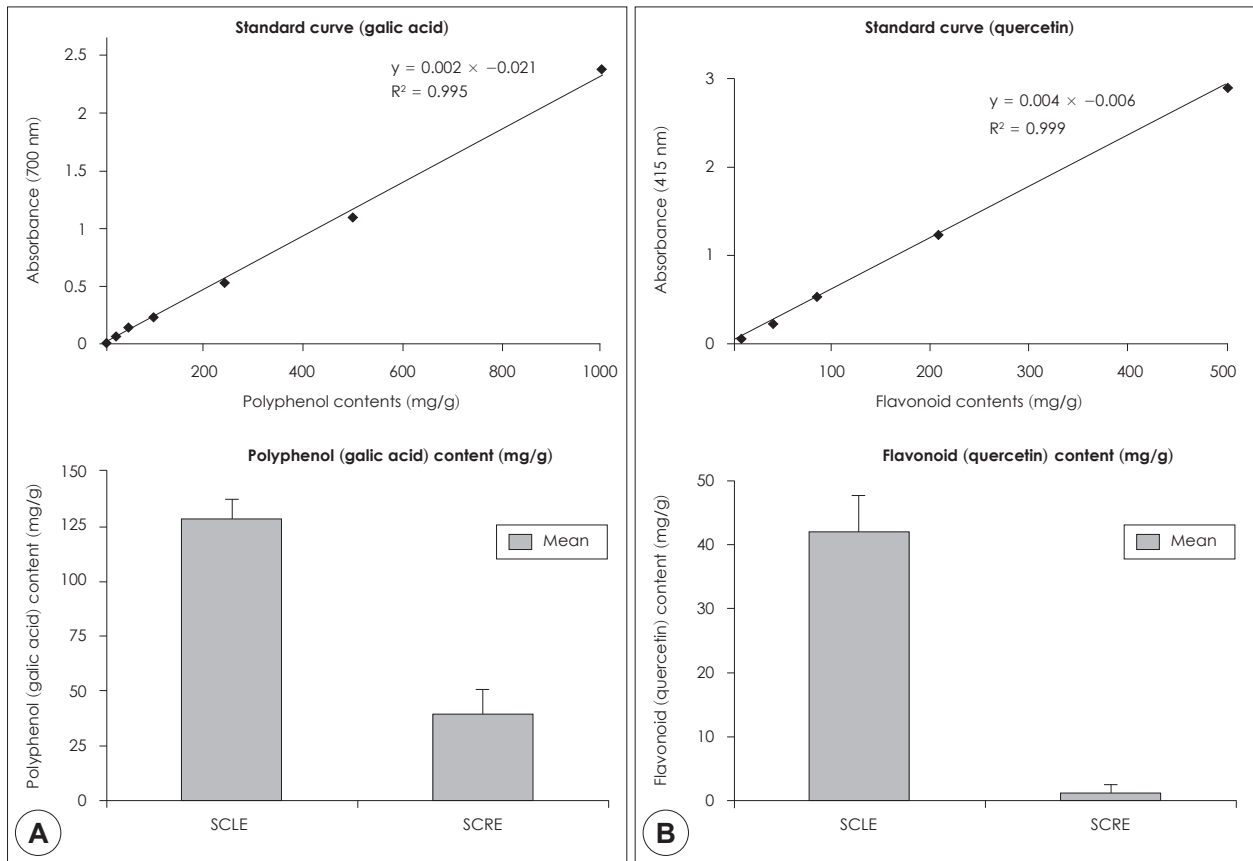


Fig. 2. Content of total polyphenol (A) and total flavonoid (B) of *Smilax china* L. leaf and root extract. As standard compounds gallic acid and quercetin, respectively, were used for measurement of polyphenol and flavonoid. Results are presented as Mean \pm SD of three independent experiments.

α -Glucosidase 활성억제 효능

청미래덩굴 잎과 뿌리 물추출물의 α -glucosidase 활성억제 실험결과는 Fig. 4와 같다. 농도에 따른 α -glucosidase 활성억제능을 측정된 결과 α -glucosidase 억제제로 시판중인 acarbose의 활성은 0.1 mg/mL에서 $28.82 \pm 3.00\%$, 0.25 mg/mL에서 $33.63 \pm 3.07\%$, 0.5 mg/mL에서 $41.00 \pm 1.40\%$, 1 mg/mL에서 $48.78 \pm 4.91\%$ 의 활성을 나타내었으며, 잎 추출물은 0.1 mg/mL에서 $9.42 \pm 6.31\%$, 0.25 mg/mL에서 $19.62 \pm 2.51\%$, 0.5 mg/mL에서 $25.35 \pm 1.54\%$, 1 mg/mL에서 $35.02 \pm 2.78\%$ 의 활성을 보였고, 뿌리 추출물은 0.1 mg/mL에서 $14.36 \pm 3.11\%$, 0.25 mg/mL에서 $15.9 \pm 0.59\%$, 0.5 mg/mL에서 $12.99 \pm 1.69\%$, 1 mg/mL에서 $9.26 \pm 3.47\%$ 의 활성을 확인하였다. 1 mg/mL을 기준으로 비교하였을 때 잎 추출물은 acarbose활성의 71.8%를 나타내고 뿌리 추출물은 19%의 활성을 나타내었다 (Fig. 4A).

시간에 따른 청미래덩굴 잎과 뿌리 추출물의 α -glucosidase 활성억제를 확인한 결과 잎 추출물은 10분에서 $15.33 \pm 5.51\%$, 20분에서 $22.74 \pm 5.23\%$, 30분에서 $25.84 \pm 4.13\%$, 40분에서 $28.33 \pm 3.33\%$, 50분에서 $35.90 \pm 2.57\%$ 의 활성

을 나타내었으며 반응시간 증가에 따라 억제 활성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 뿌리 추출물은 10분에서 $8.99 \pm 3.62\%$, 20분에서 $11.57 \pm 3.96\%$, 30분에서 $9.26 \pm 3.47\%$, 40분에서 $6.63 \pm 2.96\%$, 50분에서 $9.54 \pm 2.45\%$ 의 활성을 나타내었으며 시간 변화에 따른 활성의 규칙적인 변화를 관찰할 수 없었다 (Fig. 4B).

잎 추출물에 의한 세포내 염증관련 mRNA 발현양상 변화

Lipopolysaccharide (LPS)로 염증반응을 유도한 RAW 264.7 세포에서 청미래덩굴 잎 추출물 (0.5 mg/mL)의 처리가 염증반응에 미치는 영향을 관찰한 결과 Fig. 5와 같다. 실험결과는 전기영동 사진과 함께 밴드의 density를 측정하여 그래프로 표시하였다.

RAW 264.7 세포에서 발현되는 사이토카인인 IL-1 β 와 IL-6의 mRNA 발현을 확인한 결과 LPS의 처리에 의해 급격하게 증가했던 유전자가 청미래덩굴 잎 추출물의 처리에 의해 명확하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 산화적 스트레스와 염증신호에 영향을 미치는 것이 알려진 iNOS와 COX-2의 발현이 사이토카인과 같이 청미래덩굴 잎 추출물의 처리

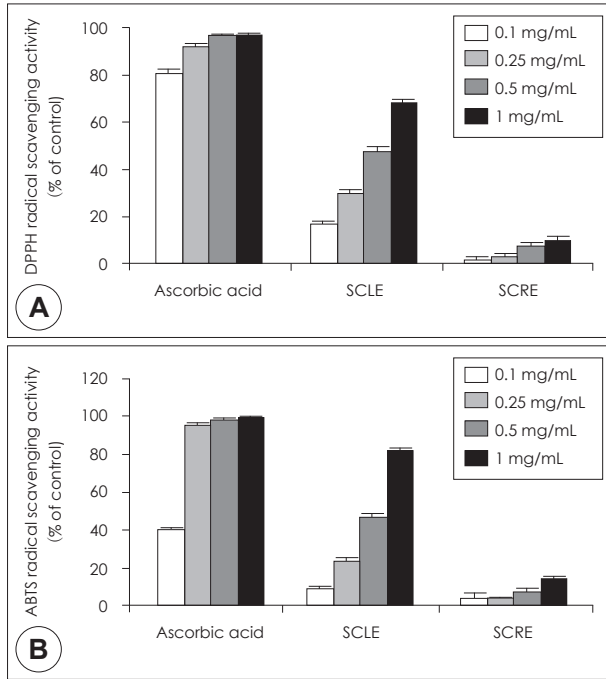


Fig. 3. Anti-oxidative activity of *Smilax china* L. leaf and root extract. DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activity assay was carried out according to concentration dependent manner. Ascorbic acid was used as positive control. Results are presented as Mean \pm SD of three independent experiments.

Table 2. DPPH and ABTS radical scavenging activity of water extracts obtained from *Smilax china* L. Leaf and root

	Sample	IC ₅₀ (mg/mL)
DPPH	SCLE	0.429
	SCRE	5.379
ABTS	SCLE	0.584
	SCRE	4.009

SCLE: *Smilax china* L. leaf extract, SCRE: *Smilax china* L root extract

Table 3. Reducing power of water extracts obtained from *Smilax china* L. Leaf and root Abbreviations: See Table 2

Sample	Concentration (mg/mL)		
	0.1	0.5	1
Ascorbic acid	0.028 \pm 0.001 ¹⁾	1.341 \pm 0.012 ^{2b)}	3.079 \pm 0.027 ^a
SCLE	0.047 \pm 0.001	0.217 \pm 0.004 ^b	0.381 \pm 0.008 ^b
SCRE	0.001 \pm 0.001	0.030 \pm 0.001 ^c	0.067 \pm 0.001 ^c

The results are Mean \pm SD for 3–4 repeats
 1) Absorbance at 700 nm 2) Values with different superscripts are significantly different among ascorbic acid, SCLE and SCRE

에 의해 명확히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

고찰

청미래덩굴의 뿌리는 한의학에서 토복령이라 하여 이뇨작용, 체력증강, 해독작용, 매독치료 및 통풍치료 등의 효능으

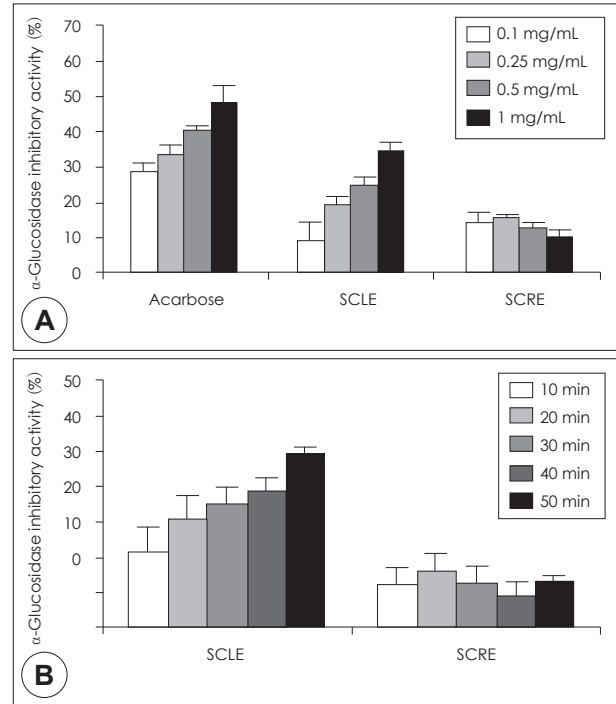


Fig. 4. Anti-diabetes activity of *Smilax china* L. leaf and root extract. α -Glucosidase inhibitory activity assay was carried out according to concentration (A) and time (B) dependent manner. Acarbose was used as positive control. Results are presented as Mean \pm SD of three independent experiments.

로 활용하였으나 그 잎은 뿌리보다 활용성이 제한되어 있었다. 어린잎은 나물로 이용되었으며, 노잎은 음식을 찌 때 사용하여 식품보존제로 사용하였다. 연구 또한 잎의 일반적인 항산화 및 항균작용에 대한 연구 외에 다른 기능성에 대한 연구는 아직 미흡한 상황이다.^{2,34)} 이에 본 실험에서는 청미래덩굴 잎과 뿌리의 항산화 활성, α -glucosidase 활성억제 및 항염증 효능을 확인하고 비교함으로써 청미래덩굴의 활용가능성을 검토하고 활용범위를 넓히고자 본 실험을 진행하였다.

먼저, 청미래덩굴 잎과 뿌리의 세포독성을 확인한 결과 2 mg/mL까지 RAW 264.7 세포에 대한 독성이 나타나지 않은 것을 확인할 수 있었다. 이는 왕취뽕나무잎 및 팽이버섯 추출물과 유사한 세포안전성을 나타내는 것이며,^{35,36)} 감잎차보다 높은 세포안전성을 나타내는 것이다.³⁷⁾ 그리고 이런 높은 안전성은 Oh가 발표한 중금속 세포독성에 대한 청미래덩굴 추출물의 세포 보호효과에 대한 연구결과와 관련이 있다고 판단된다.³⁸⁾ 본 실험에서는 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 1 mg/mL 이하에서 모든 실험을 진행하였다.

폴리페놀과 플라보노이드는 식물추출물에 일반적으로 함유되어있는 성분이며 항산화 및 항균 활성 등 다양한 기능을 나타내며 발효 등의 처리방법에 따라 수많은 유효성분으로 전환이 되는 것으로 알려져 있다.^{3,4,39)} 본 실험에서 청미래

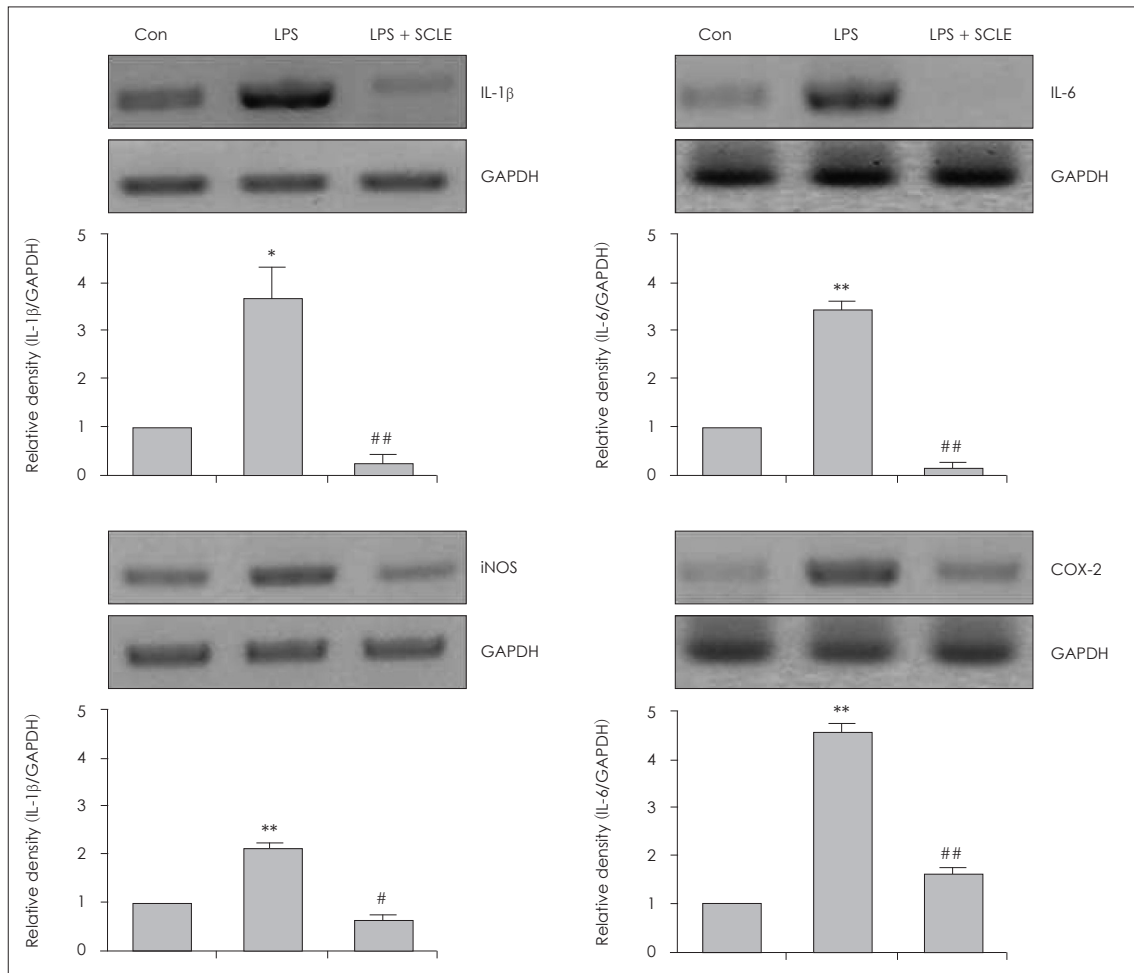


Fig. 5. Inhibition by water extract from *Smilax china* L. leaf on IL-1 β , IL-6, iNOS and COX-2 mRNA expression in LPS-induced Raw 264.7 macrophage. Raw264.7 cells (1×10^6 cells/mL) were pre-incubate for 24 hr, and the cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/mL) in the presence of *Smilax china* L. leaf extract (0.5 mg/mL) for 24 hr. Each value is expressed as Mean \pm SD in triplicate experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with Con. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ compared with LPS group. Con: non-treated (control) group, LPS: LPS alone treatment group, LPS + SCE: LPS induction in *Smilax china* L. leaf extract.

덩굴 잎 및 뿌리의 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 비교한 결과 잎에서 함량이 훨씬 높게 측정되는 것을 알 수 있었고, 추출물에서 측정된 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 Song 등,¹⁾ Ko 등³⁴⁾과 Lee 등³⁹⁾이 잎과 뿌리에서 측정한 함량보다 높았는데 이는 시료의 채취시기와 처리 및 추출방법의 차이에 의한 것으로 판단되며 본 실험에 사용된 시료의 처리와 추출방법이 폴리페놀과 플라보노이드의 함량을 높이는 좋은 방법이라 판단된다. 또한 향상된 폴리페놀과 플라보노이드의 함량은 추출물의 항산화 활성과 같은 생리학적 기능을 향상시킬 것으로 기대된다.

활성산소종 (ROS)의 발생에 의한 oxidative stress는 에너지 대사 과정에서 자연스럽게 일어나는 현상이며 생체는 superoxide dismutase (SOD) 활성화 같은 항산화기전에 따라 이를 제어한다.⁴⁰⁾ 그러나 생체의 균형이 깨지거나 질병 등으로 문제가 발생하면 이를 조절하지 못하게 되어 압, 혈관질환, 당뇨

를 비롯한 다양한 질병과 합병증을 유발하게 된다.^{16,41)} 이런 산화기전 억제효과를 확인하기위해 DPPH 및 ABTS radical 소거능과 환원력을 본 실험에서 측정하였다. DPPH 용액은 실온에서 1시간 동안 안정한 radical을 형성하기 때문에 전자 donation capacity 측정을 위해서 DPPH method가 널리 사용되고 있다. ABTS도 DPPH와 유사한 원리에 의해 radical 소거능의 확인이 가능하다. 식물추출물의 DPPH radical에 대한 scavenging 활성은 phenolic content와 밀접한 관계가 있으며 특히 플라보노이드 보다는 폴리페놀 성분에 의해서 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 환원력 또한 항산화 활성에 관계되는 중요한 인자로서 환원력을 가진 물질은 ferric-ferricyanide (Fe^{3+}) 복합체를 ferrous (Fe^{2+}) 형태로 환원시켜 푸른색을 띄게 한다.⁴²⁾ 본 실험에서 확인된 청미래덩굴의 항산화력은 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정 결과와 같이 잎에서 더 높은 활성이 확인되었으며 Kim 등의 연구에서 확인

된 감나무, 고비, 관중, 비수리, 쇠고비, 질경이, 삼백초 및 애엽의 DPPH radical 소거능과 유사하였으며, ABTS는 비교적 낮은 활성을 보였다.⁴⁾ 그리고 환원력은 Joo의 연구결과에서 확인된 쇠비름, 참빗살나무, 합환피의 활성과 유사하게 관찰되었다.⁴³⁾

당뇨의 치료 방법 중 섭취한 탄수화물 소화과정의 마지막 이당류를 단당류로 분해하는 α -glucosidase의 활성저해를 통해 당대사를 지연시켜 혈당상승을 막는 방법이 1990년 초부터 연구되기 시작하였다. 그 결과 acarbose와 voglibose 등이 제품으로 출시되었다. 그러나 이들 약제를 장기간 복용할 경우 일부 환자에서 복부팽만감, 구토, 설사 등 부작용이 일어날 수 있어 이런 부작용을 줄이고 식후 혈당강하 효과가 있는 대체식품 및 천연물에 대한 관심이 증가하고 있다.^{18,44,45)} 본 연구에서 수행한 실험의 결과 청미래덩굴 잎 추출물은 농도의 존적으로 반응시간 증가에 따라 α -glucosidase의 활성저해 효과가 상승하는 것이 관찰되었고 뿌리는 추출물의 농도나 반응시간 증가에 따른 효능이 관찰되지 않았다. 추출물 1 mg/mL을 기준으로 청미래덩굴 잎 추출물의 활성은 acarbose의 71.8%를 나타내었으며 뿌리는 약 19%의 활성을 나타내었다. 이것은 Jeong 등이 연구한 약용식물 중 백복령과 유사한 활성이며,³⁾ Xu 등⁴⁶⁾의 큰방가지뚱, Hwang과 Han⁴⁵⁾의 조릿대, Lee 등⁷⁾의 조각자 보다 높은 활성을 나타내는 것이다. 추출물의 형태로 이와 같은 높은 활성을 보이는 것은 향후 분획 및 유효성분 분리에 관한 추가연구의 가치가 높음을 시사한다.

에너지 대사를 통해 발생한 ROS의 증가는 일반적으로 항산화 메커니즘에 의해 조절되지만 비만, 당뇨 등의 질환이 발생할 경우 이를 제거하지 못해 질환이 악화되거나 합병증을 유발하게 된다.^{16,41)} 축적된 ROS는 oxidative stress를 유도하여 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ Solinas 등의 연구결과에 의하면 염증발생을 저해시킨 쥐에서는 비만이 유도되어도 당뇨증상이 나타나지 않음을 확인함으로써 염증 인자가 당뇨 발병에 중요한 요소임을 확인할 수 있다.⁴⁸⁾ 이에 본 연구에서는 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높고 α -glucosidase 활성억제 효능이 우수하였던 청미래덩굴 잎 물추출물을 LPS를 이용하여 염증신호를 유발한 RAW 264.7 세포에 처리한 결과 IL-1 β , IL-6, iNOS 및 COX-2의 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 이를 통해 청미래덩굴 잎 추출물의 항산화, 항당뇨 및 항염증 효능을 확인할 수 있었으며 이는 청미래덩굴의 nutraceuticals 소재로서의 활용 가능성을 시사한다.

요 약

본 연구에서 청미래덩굴 잎과 뿌리의 물추출물을 이용하

여 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량을 측정된 결과 잎 추출물에서 더 많은 함량이 확인되었으며, DPPH 및 ABTS radical 소거능, 환원력 측정을 통한 항산화 활성을 비교한 결과도 폴리페놀과 플라보노이드함량 측정 결과와 마찬가지로 앞에서 높은 활성을 명확하게 확인할 수 있었다. 그리고 청미래덩굴 추출물의 항당뇨 효능에 대한 최초의 시도로서 α -glucosidase 활성억제능을 측정된 결과 뿌리추출물에서는 효소의 억제력을 확인할 수 없었지만 잎 추출물에서는 농도 및 반응시간의 증가에 따라 억제력이 증가하여 물 추출물 상태에서 1 mg/mL 기준으로 acarbose의 α -glucosidase 활성억제능과 비교하여 71.8%의 활성을 관찰할 수 있었다. 또한 당뇨와 염증의 관련성이 대두되는 최근의 연구 상황에서 청미래덩굴 잎 추출물의 IL-1 β , IL-6, iNOS, COX-2의 mRNA 발현 억제작용을 확인함으로써 염증반응의 개선 가능성도 제시할 수 있었다. 결과적으로 청미래덩굴 잎 추출물의 항산화능, α -glucosidase 활성억제능 및 항염증효능을 확인함으로써 nutraceuticals 소재로서의 개발가능성을 증명하였고 추가 연구의 필요성을 제시하였다.

Literature cited

- 1) Song HS, Park YH, Jung SH, Kim DP, Jung YH, Lee MK, Moon KY. Antioxidant activity of extracts from Smilax china root. J Korean Soc Food Sci Nutr 2006; 35(9): 1133-1138
- 2) Cha BC, Lee EH. Antioxidant activities of flavonoids from the leaves of Smilax china Linne. Korean J Pharmacogn 2007; 38(1): 31-36
- 3) Jeong HJ, Lee SG, Lee EJ, Park WD, Kim JB, Kim HJ. Antioxidant activity and anti-hyperglycemic activity of medicinal herbal extracts according to extraction methods. Korean J Food Sci Technol 2010; 42(5): 571-577
- 4) Kim EJ, Choi JY, Yu M, Kim MY, Lee S, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. Korean J Food Sci Technol 2012; 44(3): 337-342
- 5) Park MH, Choi C, Bae MJ. Effect of polyphenol compounds from persimmon leaves (Diospyros kaki folium) on allergic contact dermatitis. J Korean Soc Food Sci Nutr 2000; 29(1): 111-115
- 6) Zhu M, Gong Y, Yang Z, Ge G, Han C, Chen J. Green tea and its major components ameliorate immune dysfunction in mice bearing Lewis lung carcinoma and treated with the carcinogen NNK. Nutr Cancer 1999; 35(1): 64-72
- 7) Lee JM, Park JH, Chu WM, Yoon YM, Park E, Park HR. Antioxidant activity and alpha-glucosidase inhibitory activity of stings of Gleditsia sinensis extracts. J Life Sci 2011; 21(1): 62-67
- 8) Park YM, Jeong JB, Seo JH, Lim JH, Jeong HJ, Seo EW. Inhibitory effect of red bean (Phaseolus angularis) hot water extracts on oxidative DNA and cell damage. Korean J Plant Resour 2011; 24(2): 130-138
- 9) Shin JG, Park JW, Pyo JK, Kim MS, Chung MH. Protective effects of a ginseng component, maltol (2-Methyl-3-Hydroxy-4-Pyrone) against tissue damages induced by oxygen radicals. Korean J Ginseng Sci 1990; 14(2): 187-190

- 10) Kwon JW, Lee EJ, Kim YC, Lee HS, Kwon TO. Screening of antioxidant activity from medicinal plant extracts. *Korean J Pharmacogn* 2008; 39(2): 155-163
- 11) Rubin RR, Peyrot M. Quality of life and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 1999; 15(3): 205-218
- 12) Gregg EW, Cadwell BL, Cheng YJ, Cowie CC, Williams DE, Geiss L, Engelgau MM, Vinicor F. Trends in the prevalence and ratio of diagnosed to undiagnosed diabetes according to obesity levels in the U.S. *Diabetes Care* 2004; 27(12): 2806-2812
- 13) Lee SH, Lee JK, Kim IH. Trends and perspectives in the development of antidiabetic drugs for type 2 diabetes mellitus. *Korean J Microbiol Biotechnol* 2012; 40(3): 180-185
- 14) Lee EB, Na GH, Ryu CR, Cho MR. The review on the study of diabetes mellitus in oriental medicine journals. *J Korean Orient Med* 2004; 25(3): 169-179
- 15) Taylor-Fishwick DA. NOX, NOX who is there? The contribution of NADPH oxidase one to beta cell dysfunction. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 40
- 16) Sasaki S, Inoguchi T. The role of oxidative stress in the pathogenesis of diabetic vascular complications. *Diabetes Metab J* 2012; 36(4): 255-261
- 17) Tsujimoto T, Shioyama E, Moriya K, Kawaratani H, Shirai Y, Toyohara M, Mitoro A, Yamao J, Fujii H, Fukui H. Pneumatosis cystoides intestinalis following alpha-glucosidase inhibitor treatment: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* 2008; 14(39): 6087-6092
- 18) Kihara Y, Ogami Y, Tabaru A, Unoki H, Otsuki M. Safe and effective treatment of diabetes mellitus associated with chronic liver diseases with an alpha-glucosidase inhibitor, acarbose. *J Gastroenterol* 1997; 32(6): 777-782
- 19) Sarkar D, Fisher PB. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett* 2006; 236(1): 13-23
- 20) Fierro IM, Serhan CN. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34(5): 555-566
- 21) Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol* 1990; 144(4): 1425-1431
- 22) Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 1992; 70(5): 705-707
- 23) Sunyer T, Rothe L, Kirsch D, Jiang X, Anderson F, Osdoby P, Collin-Osdoby P. Ca²⁺ or phorbol ester but not inflammatory stimuli elevate inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid and nitric oxide (NO) release in avian osteoclasts: autocrine NO mediates Ca²⁺-inhibited bone resorption. *Endocrinology* 1997; 138(5): 2148-2162
- 24) Kim JY, Jung KS, Jeong HG. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett* 2004; 569(1-3): 321-326
- 25) Zarghi A, Arfaei S. Selective COX-2 inhibitors: a review of their structure-activity relationships. *Iran J Pharm Res* 2011; 10(4): 655-683
- 26) McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 211(1): 24-32
- 27) Chung MJ, Walker PA, Brown RW, Hogstrand C. ZINC-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 205(3): 225-236
- 28) Kim JM, Baek JM, Kim HS, Choe M. Antioxidative and anti-asthma effect of Morus bark water extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2010; 39(9): 1263-1269.
- 29) Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 2000; 71(1-2): 109-114
- 30) Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181: 1199-1200
- 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 Radic Biol Med* 1999; 26(9-10): 1231-1237
- 32) Arabshahi-Delouee S, Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chem* 2007; 102(4): 1233-1240
- 33) Ryu HW, Lee BW, Curtis-Long MJ, Jung S, Ryu YB, Lee WS, Park KH. Polyphenols from *Broussonetia papyrifera* displaying potent α -glucosidase inhibition. *J Agric Food Chem* 2010; 58(1): 202-208
- 34) Ko MS, Yang JB. Antioxidant and antimicrobial activities of *Smilax china* leaf extracts. *Korean J Food Preserv* 2011; 18(5): 764-772
- 35) Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeong JH. Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2012; 41(9): 1205-1210
- 36) Kang HW. Antioxidant and anti-inflammatory effect of extracts from *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2012; 41(8): 1072-1078
- 37) Yoo KH, Jeong JM. Antioxidative and antiallergic effect of per-simmon leaf extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2009; 38(12): 1691-1698
- 38) Oh YL. Protective effect of *Smilax china* L. extract on the cytotoxicity induced by chromium of environmental pollutant. *J Korean Soc Plants People Environ* 2011; 14(1): 29-34
- 39) Lee SI, Lee YK, Kim SD, Kang YH, Suh JW. Antioxidative activity of *Smilax china* L. leaf teas fermented by different strains. *Korean J Food Nutr* 2012; 25(4): 807-819
- 40) Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, Davies KJ. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291(3): R491-R511
- 41) Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2012; 12(1): 5-18
- 42) Pratt DE, Miller EE. A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts (*Arachia hypogoea*). 1984; 61(6): 1064-1067
- 43) Joo SY. Antioxidant activities of medicinal plant extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2013; 42(4): 512-519
- 44) Bischoff H. The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clin Invest Med* 1995; 18(4): 303-311
- 45) Hwang JY, Han JS. Inhibitory effects of *Sasa borealis* leaves extracts on carbohydrate digestive enzymes and postprandial hyperglycemia. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2007; 36(8): 989-994
- 46) Xu ML, Wang L, Xu GF, Wang MH. Antidiabetes and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of *Sonchus asper* (L) hill extract. *Korean J Pharmacogn* 2011; 42(1): 61-67
- 47) Solinas G, Vilcu C, Neels JG, Bandyopadhyay GK, Luo JL, Naulgler W, Grivennikov S, Wynshaw-Boris A, Scadeng M, Olefsky JM, Karin M. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab* 2007; 6(5): 386-397