

새싹 잔대 잎과 뿌리의 항산화 및 항암 효과

윤선영 · 김기현 · 현태경

Antioxidant and anticancer activities of *Adenophora triphylla* leaf and root extracts

Seon Young Yoon · Ki Hyun Kim · Tae Kyung Hyun

Received: June 23 2023 / Revised: June 27 2023 / Accepted: June 27 2023 / Published: 11 July 2023
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The root of *Adenophora triphylla* is a highly valued medicinal resource that is used to prevent human obesity, cancer, and inflammation, whereas young leaves or sprouts of *A. triphylla* are used as food ingredients. In this study, we compared the antioxidant and anticancer activities of 70% ethanol extracts of *A. triphylla* roots and leaves. The leaf extract exhibited stronger 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)-radical scavenging activity, reducing power, and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) than the root extract. Furthermore, the leaf extract was observed to be a potent source of anticancer compounds that were effective against A549 (lung cancer), LNCaP (prostate cancer), SKOV3 (ovarian cancer), and Caco-2 (colorectal cancer) cells. These results indicate that not only the roots but also the leaves of *A. triphylla* can serve as valuable sources of functional materials in the pharmaceutical industry.

Keywords *Adenophora triphylla*, antioxidant activity, cytotoxic activity, lupenone, β -sitosterol

서론

현대 의학이 발달하고 영양가 있는 식품이 개발됨에 따라 인간 기대 수명이 증가하고 있다. 하지만 식량 품질과 과학 기술의 발달이 노화 속도를 늦추지 못하여 최근 한국을 포함한 선진국에서 급속한 고령화 문제가 심각하게 대두되고 있다 (Son et al. 2019). 지속적인 노령 인구의 증가에 따라 각종 성인병 발병률도 증가하는 추세이며, 더불어 이에 원인이 되는 활성산소 종의 산화 스트레스가 주목받고 있다. 생체 내에서 활성산소는 DNA 변성, 지질 산화, 세포막 손상, 단백질 분해 등을 초래하여 암 및 심혈관계 질환 등의 발병률을 증가시킨다고 알려져 있다 (Biesalski 2002; Papa and Skulachev 1997; Yu 1996). 따라서 증가된 수명에 발맞추어 건강한 삶을 영위하려면 생체 내 항산화제의 공급을 늘려 활성산소의 방어 체계를 구축할 필요성이 있다. 기존에 Butylated hydroxytoluene (BHT)나 Butylated hydroxyanisole (BHA)는 산화력이 뛰어나 상업용 식품 첨가제 및 의약품 등에 많이 사용되어 왔으나, 이들은 독성이 있어 암 또는 기형을 유발할 가능성이 높아 현재는 사용량이 법적으로 규제되어 있다 (Choi et al. 2011; Hwang et al. 2013). 따라서 최근 부작용을 최소화하기 위해 일상에서 섭취되고 있는 식물에서 새로운 대체제를 찾고자 하는 연구들이 활발히 진행되고 있다.

잔대(*Adenophora triphylla* var. *japonica*)는 초롱꽃과(Companulaceae)의 다년생 초본으로 사삼, 제니, 딱주라고도 불린다. 잔대의 뿌리는 우리나라 5대 삼 중 하나로 예부터 한국을 포함한 동아시아 전역에서 거담, 진해, 강장제, 건위 등의 민간요법 치료제로 이용되어 왔다. 또한 잔대에는 saponin, inulin, β -sitosterol, lupenone, daucosterol, triphyllol 등의 기능성 물질이 존재한다고 보고되어 있으며 (Ham et al. 2009b; Yoo et al. 2017), 간 보호 효과 (Gum et al. 2007), 항비만 효과

S. Y. Yoon · T. K. Hyun (✉)
충북대학교 농업생명환경대학 특용식물학과
(Department of Industrial Plant Science and Technology,
Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea)
e-mail: taekyung7708@chungbuk.ac.kr

K. H. Kim
충청북도농업기술원
(Chungbuk Agricultural Research and Extension Services,
Cheongju 28130, Korea)

(Choi et al. 2010), 잔대 뿌리의 성분 분석과 항산화 효과(Ham et al. 2009a), 잔대 순의 미백 효과(Yoo et al. 2017) 등의 연구가 이루어져 있다. 식품의약품안전처에 따르면 잔대 잎과 뿌리 모두 식용 가능하다고 등록되어 있으나 잎과 뿌리를 나누어 효능을 평가한 연구는 미미한 실정이다. 이에 본 연구에서는 잔대의 잎과 뿌리를 이용하여 항산화 및 인체 암세포에 대한 독성 평가를 통해 고령화 사회에 대항하는 식품 소재로의 잠재적 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료

충청북도 농업기술원에서 파종 후 2개월 된 잔대를 잎과 뿌리로 나누어 채취하였다(Fig. 1A). 시료는 72시간 동안 동결 건조 후 분쇄하여 70% 에탄올(50% V:V)에 2회 추출하였다. 추출물은 150 mm filter로 여과한 뒤 감압농축기를 사용하여 -70°C 에 보관하였다.

DPPH radical 소거 활성 측정

Free radical인 DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl)를 이용하여 free radical 소거 활성을 측정하였다. 96 well plate에 0.4 mM DPPH 180 μl 와 10 mg/ml 시료 20 μl 를 분주한 후 serial dilution 하였다. 혼합 시료를 암조건에서 10분간 반응시킨 뒤 microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정했다. DPPH radical 소거능은 DPPH를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 농도 IC_{50} 로 나타냈다.

Reducing power assay

Reducing power assay는 Jin 등(2019)의 방법을 참고하여 ferric ion (Fe^{3+})이 ferrous (Fe^{2+})로 환원되는 정도를 분석함으로써 시료의 환원력을 평가하였다. 양성대조군으로는 BHT를 사용하였다.

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) assay

ORAC assay는 Jin 등(2019)에 기술된 방법을 참고하였다. AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride)에서 유도된 peroxy radical에 대한 항산화 저해 능력을 형광 signal을 측정하여 평가했다. SynergyTM HTX multi-mode microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 형광 signal을 90분 동안 매분 측정하였다(485 nm excitation, 530 nm emission). 이때 Trolox를 양성 대조군으로 사용하였고 형광

감소 곡선 아래 면적을 사용하여 정량화 했다. ORAC 값은 Trolox ($\mu\text{M TE}$)로 나타냈다.

인체 암세포 생존을 평가

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 이용하여 잔대 추출물의 인체 암세포의 세포 독성 평가를 진행했다. 실험에 사용한 세포주는 A549 (Lung cancer), LNCaP (Prostate cancer), SKOV3 (Cystadenocarcinoma), Caco-2 (Colorectal adenocarcinoma), HCT-15 (Colorectal cancer), Hep G2 (Hepatocellular carcinoma)다. A549, SKOV3, HCT-15, Hep G2는 5×10^4 cells/ml, LNCaP, Caco-2는 1×10^5 cells/ml 농도로 맞춰서 96 well plate에 100 μl 씩 분주하였다. 24시간 동안 37°C , 5% CO_2 incubator에 배양한 후 시료를 100 μl 씩 처리하

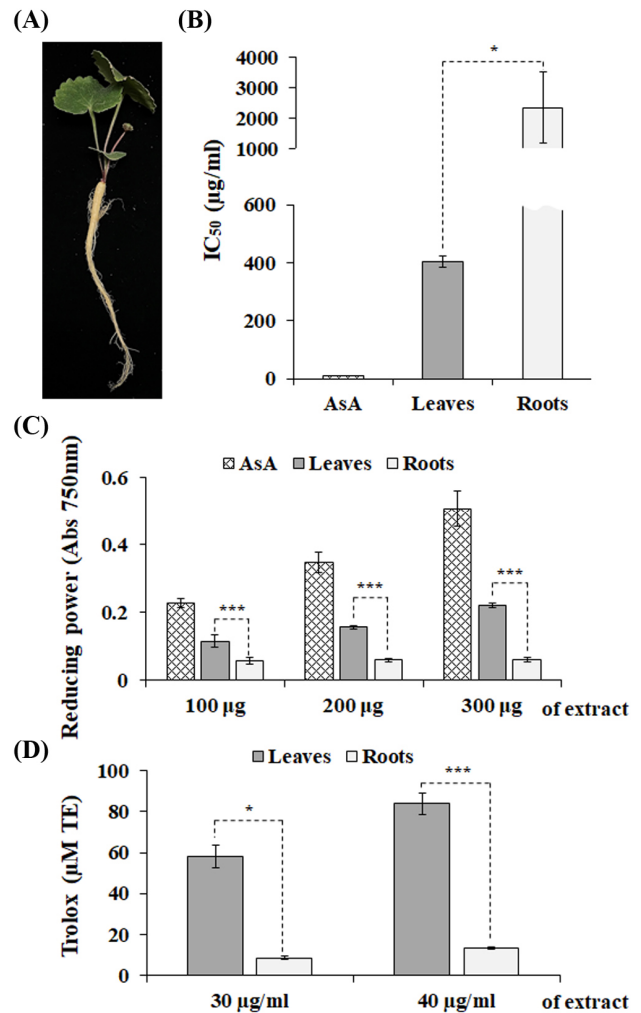


Fig 1 The antioxidant activities of *Adenophora triphylla* extracts. (A) The *A. triphylla* plant used in this study. The antioxidant activities were determined using the DPPH free radical scavenging activity (B), reducing power (C), and ORAC (D) assays. Each value is mean \pm SE of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$)

였다. 48시간 배양 후 PBS 완충액에 녹은 1 mg/ml MTT 용액을 20 μ l 분주한 후 CO₂ incubator에 4시간 배양하였다. 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹인 후, microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 550 nm 파장에서 흡광도를 측정했다. 대조군 세포수를 100%로 정하고 상대적인 암세포 생존율을 구했다.

HPLC 분석

잔대 지표성분 분석을 위한 HPLC (Agilent 1260 Infinity II, Agilent, Santa Clara, CA, USA) 분석 조건은 다음과 같다. 칼럼은 Poroshell 120 EC-C18 column (4 μ m, 4.6 \times 150 mm)을 사용하였다. 이동상 용매는 Methanol : Acetonitrile = 1 : 1 (v/v)를 isocratic 조건하에서 0-60 min 동안 용출하였다. 이때 flow는 0.7 ml/min, injection volume은 20 μ l, column temperature은 25°C로 설정했고, UV-vis DAD detector로 206 nm 파장대에서 측정했다.

통계처리

모든 데이터는 3회 반복실험을 진행하여 평균 \pm 표준편차로 표시했다. 대조군과 실험군 간의 유의성은 신뢰수준 $p < 0.05$ 에서 Student's t-test를 이용하여 나타냈다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$).

결과 및 고찰

잔대 추출물의 항산화 활성

활성산소제거능을 결정하기 위해 사용되는 시험은 수소원자전달반응(hydrogen atom transfer, HAT) 기반 시험과 단일전자전달반응(single electron transfer mechanism, SET) 기반 시험으로 나눌 수 있다(Liang and Kitts 2014). 이에 잔대 추출물의 항산화능 및 작용 기전을 규명하기 위하여 SET 기반의 Reducing power assay, HAT 기반의 ORAC assay 그리고 혼합메커니즘 기반의 DPPH radical scavenging assay를 수행하였다. Fig. 1B에서와 같이 50% DPPH free radical을 소거하는데 필요한 시료의 농도를 나타내는 IC₅₀ 값을 측정하였으며, 그 결과 잔대 잎 추출물이(IC₅₀ = 405.4 \pm 19.4 μ g/ml) 뿌리 추출물(IC₅₀ = 2339.7 \pm 1167.6 μ g/ml)보다 강력한 DPPH free radical 소거능을 나타내는 것으로 조사되었다. 또한 잔대 잎 추출물의 경우 농도가 증가함에 따라 환원력이 증가하였다(Fig. 1C). 300 μ g/g of extract의 시료에서 가장 높은 환원력을 보여주었으며, 같은 양의 잔대 뿌리 추출물과 비하여 유의미하게 높은 환원력을 나타내는 것으로 조사되었다. ORAC assay는 산화 물질(peroxyl radical generator)에서 유도된 peroxyl

radical에 대한 항산화 물질의 저해능을 측정하는 방법으로 현재 사용 중인 시험관 내 항산화능 측정 실험법 중에서 임상 시험법과 상관관계가 가장 높은 항산화능 측정법 중 하나이다(Ryu and Yim 2012). 잔대 잎 추출물 및 뿌리 추출물은 농도 의존적인 peroxyl radical 소거 활성을 보였으며, 40 μ g/ml 농도에서 잎 추출물은 83.9 \pm 5.2 μ M TE 그리고 뿌리 추출물은 13.3 \pm 0.3 μ M TE peroxyl radical 소거 활성능을 나타냈다(Fig. 1D). 이상의 결과를 통해 잔대 잎 추출물의 경우 대표적인 수용성 항산화제인 ascorbic acid (AsA) 보다는 다소 떨어지는 항산화능 보였지만, 잔대 뿌리 추출보다 뛰어난 항산화능(SET 및 HAT 기반 항산화능)을 나타남을 확인하였다. Polyphenol 화합물은 강력한 항산화능을 지닌 식물 유래 물질로 신경 퇴행성 질환, 암, 당뇨병, 염증성 질환 그리고 활성산소에 의한 손상 등과 같은 관련된 수많은 질병으로부터 보호 효과가 있는 물질로 잘 알려져 있다(Pandey and Rizvi 2009). 또한 잔대 잎 추출물의 경우 뿌리 추출물과 비교하여 7배 높은 총 페놀 함량 및 5배 높은 총 플라보노이드 함량을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Kim et al. 2009). 따라서 본 연구에서 나타난 잔대 추출물 간의 항산화 능의 차이는 polyphenol 화합물과 같은 기능성 물질 함량 차이에 의해 야기되었을 것이라 사료된다.

잔대 추출물의 암세포 성장 억제 효과

잔대 잎 및 뿌리 추출물이 다양한 암세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 폐암세포 A549, 전립선암세포 LNCaP, 자궁암세포 SKOV3, 대장암세포 Caco-2, 직장암세포 HCT-15, 간암세포 Hep G2에 각 추출물을 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포사멸 효과를 분석하였다. 그 결과 Fig. 2에 제시한 바와 같이 암세포주의 종류에 따라 암세포 사멸효과의 정도가 다른 것을 확인할 수 있었으며, 추출물에 따라 암세포 사멸효과 또한 차이를 확인하였다. 잔대 잎과 뿌리 추출물 200 μ g/ml 처리 시, 각각 A549에서 46.2%, 17.1%, LNCaP에서 49.1%, 16.8%, SKOV3에서 32.8%, 25.4%, Caco2에서 42.8%, 21.5%, HCT-15에서 29.0%, 25.0%, 그리고 Hep G2에서 26.1%, 11.4%의 세포 사멸효과를 보였다. 이들 중 HCT-15, Hep G2 세포를 제외한 A549, LNCaP, SKOV3 그리고 Caco-2 세포에서 잔대 부위별 추출물 간 유의미한 세포 사멸효과의 차이가 나타남을 확인했다. Ham 등(2009b)은 250 μ g/ml의 잔대 뿌리 추출물(70% EtOH 추출물)이 폐암 세포 A549 증식을 15.95% 억제하는 것으로 보고하였으며, 이러한 결과는 본 연구에서 조사한 잔대 뿌리 추출물의 암세포 사멸효과와 유사하였다. 또한 잔대 뿌리 추출물 및 분획물의 암세포 사멸효과를 평가한 결과 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 사멸효과를 보이는 것으로 보고된다(Ham et al. 2009b). Polyphenol 화합물은 반극성(semi-polar)의 경향이 있어 반극성 용매인 에틸

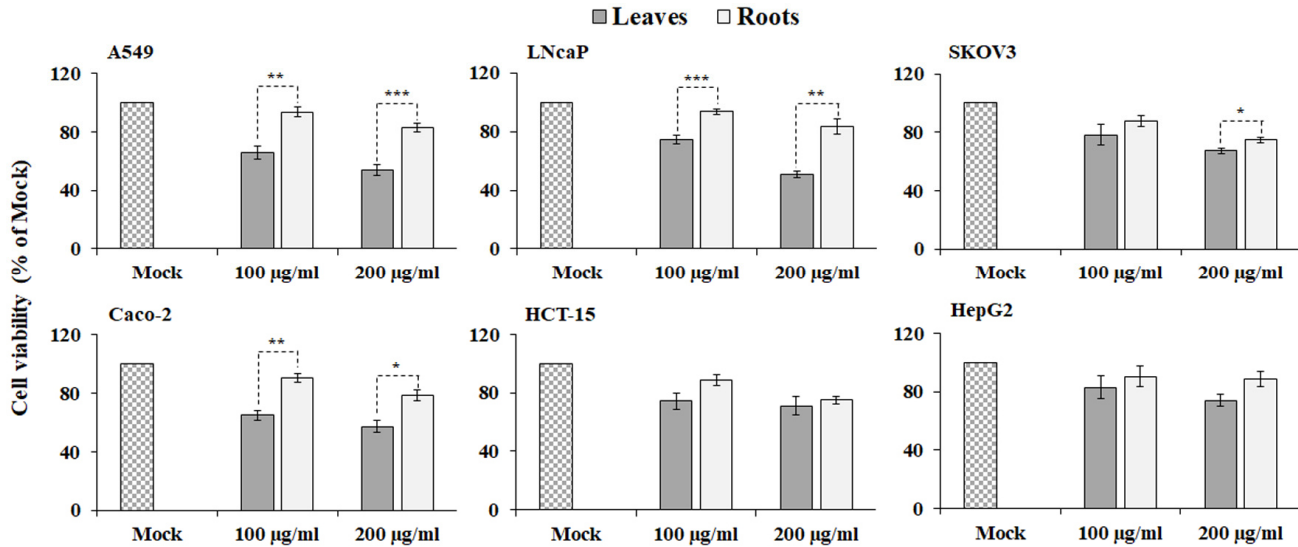


Fig 2 The cytotoxic effect of *Adenophora triphylla* extracts on human cancer cell lines. The indicated cell lines were treated with each extract for 48 h, and cell viability was determined using an MTT assay. Asterisks indicate significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$; mean \pm SE of three independent experiments)

아세테이트 분획물에 추출된다고 알려져 있다(Akbar and Soekanto 2021). 특히 플라보노이드는 식물 특이적 이차대사 산물로서 항산화 및 항암 효과가 뛰어난 것으로 보고되어 있으며(Kopustinskiene et al. 2020), 이는 잔대 잎과 뿌리에 존재하는 polyphenol 화합물이 항산화 활성 및 암세포 사멸효과를 보이는 주요 활성 물질임을 시사한다. 이전 연구에서는 잔대 뿌리의 항암 효과를 평가하는 데 그쳤지만 본 연구에서는 잔대 잎과 뿌리를 비교하여 항암 효능을 평가하였으며, 이를 통해 잔대 뿌리보다 잎의 이용 가치가 높다는 사실을 밝혔다. 이는 잔대, 특히 잎 추출물이 새로운 항암 기능성 식품 소재로서 활용 가능성이 있음을 시사한다.

잔대 추출물의 지표성분 분석

지표성분 함량 분석은 원료 품질의 표준화를 위한 필수과정으로 알려져 있으나, 이들 물질의 함량은 재배 환경, 추출 방법 및 분석법 등에 의하여 차이를 보이는 것으로 보고되어 있다(Bang et al. 2013). 최근 약용작물 부산물의 화장품 및 건강기능식품 원료화에 관한 연구가 많이 진행됨에 따라 작물 조직 별 지표성분의 함량 차이 등에 관한 정보가 원료 품질의 표준화를 위한 중요한 기초자료로 활용되고 있다(Lee et al. 2019a; 2019b). Lupenone과 β -sitosterol은 잔대의 대표적인 지표성분으로 보고되어 있으며(Kim et al. 2022), 이 두 물질은 항암활성, 항염증 활성 등 다양한 생리활성을 지닌 기능성 물질로도 잘 알려져 있다(Sayeed and Ameen 2015; Xu et al. 2018). 이에 본 연구에서는 HPLC를 이용하여 잔대의 지표성분으로 알려진 lupenone, β -sitosterol의 함량을 분석하였고, Fig. 3은 잔대 잎 및 뿌리 추출물에서의 이들 성분 함량 분석 결과를 보여주고 있다. Lupenone은 잎과 뿌리 추출물에서 각

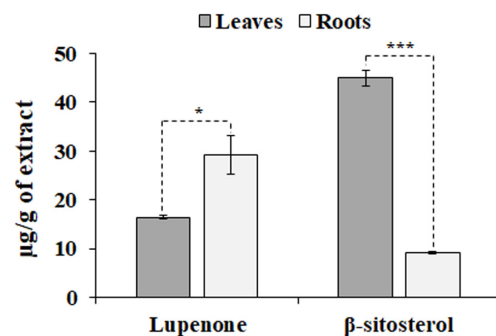


Fig 3 The lupenone and β -sitosterol contents of *Adenophora triphylla* extracts, determined using high-performance liquid chromatography. Asterisks indicate significant differences (** $p < 0.01$; mean \pm SE of three independent experiments)

각 16.4 ± 0.3 mg/g extract, 29.1 ± 3.9 mg/g extract 검출되었으며, β -sitosterol의 경우 잎 추출물에서 44.9 ± 1.6 mg/g extract, 뿌리 추출물에서 9.1 ± 0.2 mg/g extract 검출되었다. 이상의 연구 결과는 작물 이용 부위에 따라 지표성분들의 함량 차이가 나타날 수 있음을 시사하며, 잔대 지표성분 분석에 대한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

잔대(*Adenophora triphylla* var. *japonica*)의 뿌리는 비만, 암, 염증을 예방하는 데 사용되는 귀중한 약용 자원으로 사용되지만, 어린잎이나 순은 식재료로 사용되고 있다. 본 연구에서는 *A. triphylla* 뿌리와 잎에서 얻은 70% 에탄올 추출물의 항산화 및 항암 효과를 비교 평가하였다. 잎 추출물이 뿌리 추출물보다 강력한 DPPH-radical 소거 활성, 환원력 및

ORAC 값을 나타냈다. 또한, 인체 암세포주에서 잔대 추출물의 세포독성 사멸 효과를 조사한 결과, 잎 추출물이 A549 (폐암), LNcaP (전립선암), SKOV3 (난소암) 및 Caco-2 (대장암) 세포에서 강력한 항암 성분의 공급원임을 보여주었다. 이러한 결과는 뿌리뿐만 아니라 잎도 제약 산업에서 기능성 소재의 귀중한 공급원이 될 수 있음을 시사한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ01704506)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Akbar A, Soekamto NH (2021) Antioxidant of n-hexane, ethyl acetate and methanol extracts of *Padina* sp with DPPH method. IOP Conf Ser Earth Environ Sci 800:012019
- Bang HY, Yang EJ, Kim JA, Song KS (2013) Simultaneous HPLC determination of marker compounds for the standardization of *Hedyotis diffusa*. J Life Sci 23: 1025-1031
- Biesalski HK (2002) Free radical theory of aging. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 5:5-10
- Choi CY, Degrandi IH, Cho SH (2011) Antioxidant effect of assai palm methanolic extract. Korean J Food Preserv 18:967-972
- Choi HJ, Chung MJ, Ham SS (2010) Antiobese and hypocholesterolaemic effects of an *Adenophora triphylla* extract in HepG2 cells and high fat diet-induced obese mice. Food Chem 119:437-444
- Gum SI, Lee DU, Cho MK (2007) Protective effects of water extracts composed of *Adenophora triphylla* var. *japonica* Hara on the acetaminophen-induced hepatotoxicity. Korean J Food Sci Technol 39:688-693
- Ham YA, Choi HJ, Chung MJ, Ham SS (2009a) Component analysis and antioxidant activity of *Adenophora triphylla*. Int J Food Sci Nutr 38:274-279
- Ham YA, Choi HJ, Kim SH, Chung MJ, Ham SS (2009b) Antimutagenic and antitumor effects of *Adenophora triphylla* extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 38:25-31
- Hwang SY, Choi HM, Lim SY (2013) Total phenolics of dried *Platycodon grandiflorum* and its effect on growth of human cancer cell lines. Korean J Food Sci Technol 45:84-89
- Jin SR, Eom SH, Kim JS, Jo IH, Hyun TK (2019). Influence of ripening stages on phytochemical composition and bioavailability of ginseng berry (*Panax ginseng* CA Meyer). J Appl Bot Food Qual 92:130-137
- Kim JH, Hong JY, Shin SR, Yoon KY (2009) Comparison of antioxidant activity in wild plant (*Adenophora triphylla*) leaves and roots as a potential source of functional foods. Int J Food Sci Nutr 60:150-161
- Kim SI, Jee MG, Park YC, Jang WS, Kwon AR, Kil KJ, Lee KS (2022) Physicochemical characteristics and antioxidant activities of white ginseng extract supplemented with *Adenophora triphylla* var. *japonica* Hara leaf. J Korean Soc Food Sci Nutr 51:1296-1303
- Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J (2020) Flavonoids as anticancer agents. Nutrients 12:457
- Lee MS, Im HJ, Jeong HS, Cho HJ, Woo HS, Oh YJ, Lee SI, Kim HC, Ahn KW, Kim YS, Kim DW (2019a) Quantitative determination of marker compounds in the extracts of *Camellia sinensis* L. sub-branches (residual products) by HPLC. Korean J Medicinal Crop Sci 27:24-29
- Lee SH, Lee SH, Jin M, Hong CO, Hur M, Han JW, Lee WM, Yun HM, Kim YB, Lee Y, Koo SC (2019b) Analysis of index component content and antioxidant activity according to the root diameter of *Angelica gigas* Nakai. Korean J Plant Res 32:116-123
- Liang N, Kitts DD (2014) Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. Molecules 19:19180-19208
- Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev 2:270-278
- Papa S, Skulachev VP (1997) Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. Mol Cell Biochem 174:305-319
- Ryu J-S, Yim J-H (2012) Effects of in vitro antioxidant and in vivo anti-aging improvement of finished cosmetic products containing ramalin. Kor J Aesthet Cosmetol 10:345-352
- Sayed MSB, Ameen SS (2015) Beta-sitosterol: a promising but orphan nutraceutical to fight against cancer. Nutr Cancer 67:1216-1222
- Son DH, Park WJ, Lee YJ (2019) Recent advances in anti-aging medicine. Korean J Fam Med 40:289
- Xu F, Huang X, Wu H, Wang X (2018) Beneficial health effects of lupenone triterpene: A review. Biomed Pharmacother 103: 198-203
- Yoo SK, Park SK, Kang JY, Kim JM, Park SH, Kwon BS, Lee CJ, Kang JE, Park SB, Lee UK, Heo HJ (2017) Skin whitening effect of ethyl acetate fraction of *Adenophora triphylla* var. *japonica* sprout. Korean J Plant Res 30:352-363
- Yu BP (1996) Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. Free Radic 21:651-668