2003 추계학술발표회 논문집
한국원자력학회

B16 흑색종 세포주에 대한 식물추출물의 방사선 방어 효과

Radioprotective Effects of Extracts from Plants on B16 Melanoma Cells

우현정, 신선희, 김진규
한국원자력연구소
대전광역시 유성구 덕진동 150

김지향
한양대학교
서울특별시 성동구 행당동 17

요 약

본 연구는 우리나라 자생종인 퉁퉁마디(*Saliconia herbacea*) 씀바귀(*Ixeris dentata*)를 이용해 산화적 스트레스의 일종인 방사선에 대한 방어효과를 알아보고자 하였다. DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성실험 결과 씀바귀 추출물(RC_{80}=75.9)의 경우 Ascorbic acid(RC_{80}=14.16)나 BHA (RC_{80}=17.79)에는 미치지 못하였으나 Glutathione(RC_{80}=64.69)과 유사한 활성을 보였다. 퉁퉁마디의 경우 RC_{80}이 179.77로 다소 낮은 결과를 도출했으나 비교한 항산화제가 정제된 화학물질임을 감안할 때 분획과정을 거쳐 좀더 정제될 경우 기존의 항산화제와 비슷하거나 씀바귀의 경우 더 뛰어난 항산화 활성을 보일 거라 기대된다. MTT cell viability assay의 경우 방사선 조사시 대조군(saline)의 경우 43%, 양성대조군 72%, 퉁퉁마디 38%, 씀바귀 118%로 방사선을 조사하지 않은 경우와 비교하여 대조군은 57%, 양서대조군 30%, 퉁퉁마디 36%로 감소하였고 씀바귀의 경우 오히려 생존율이 26% 증가함을 보였다. 이는 이들 식물을 방사선 방어제로서 효과가 탁월함을 보여준다. 전체적으로 씀바귀 추출물이 퉁퉁마디 추출물에 비해 높은 활성을 나타내었으며 각 식물의 추출물을 분획을 통해 좀더 정제한다면 방사선방어제로서의 뛰어난 효과가 기대된다.

Abstract

The antioxidative effects of extracts from *S. herbacea* and *I. dentata* were analyzed with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The RC_{80} of the extract from *I. dentata* was 75.9㎍/㎖. While the RC_{80} of ascorbic acid, BHA and glutathione, well-known antioxidants were 14.16, 17.79 and 64.69㎍/㎖, respectively. However, in case of the extract from *S. herbacea* it was 179.77㎍/㎖. The radioprotective effects from *S. herbacea* and *I. dentata* were analyzed with the MTT assay. The cell viability in the group treated with the extract from *I. dentata* increased by 26% after irradiation. On the other hand, the cell viability of the control (saline), ascorbic acid- and *S. herbacea* extract-treated groups decreased by 57, 30, 36% after irradiation. In conclusion, the extracts from *S. herbacea* and *I. dentata* have high activities of radioprotection in B16 melanoma cells.

1. 서 론

퉁퉁마디(*Saliconia herbacea*)는 명아주과에 속하는 1년생 식물로 우리나라 서해안이나 남해안 지방의 바닷물이 닿는 해안이나 개펄, 염전과 같은 염습지대에서 자생한다[1]. 염생식물(halophyte)인 퉁퉁마디는 다량의 염분을 체내에 축적하고 있을 뿐만 아니라 Mg, Ca, Fe, 그리고 K 등의 천연미네랄을 다량함유하는 식물로 염류를 흡수하여 체내에 저장하는 능력을 가지고 있다[2].

씀바귀(*Ixeris dentata*)는 국화과에 속하는 여러해살이 식물로 한국, 중국, 일본에 분포하며 이른봄에 뿌리와 어린순을 나물로 사용한다[1]. 뿌리를 포함한 모든 부분을 약재로 사용되며 해열, 소화불량, 폐렴, 간염 등의 효과가 있다고 알려져 있다. 밝혀진 성분으로는 aliphatics, triterpenoids, sesquiterpene glicoside 등이 있다[3].

현재 퉁퉁마디에 관한 연구는 국내에서만 내염성 식물로서 염해지 개량연구, 자생지별 성분특성, 인공재배시 생육조건, 생리·생태적 특성, 약리 효과(diet 식품으로서의 이용을 위한 in vivo 실험), 항산화효과등이 이루어지고 있고 국외에서는 퉁퉁마디에 관한 연구는 전무한 상태이다[4,5]. 씀바귀의 경우도 비슷해 국내에서만 연구되고 있는데 항산화성, 항돌연변이원성 및 항암활성 효과, 성분조성과 혈청 지질저하작용 등이 알려져 있다[6,7].

최근 우리가 일상적으로 섭취하거나 민간요법에서 경험적으로 쓰고 있는 식품들의 효과에 대한 관심이 증가하는 가운데 일반 채소류를 포함하여 식용 밎 약용으로 쓰이는 야생 식물자원들로부터 산화적 스트레스에 대한 방어효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이에 본 연구에서는 자생종인 퉁퉁마디와 씀바귀를 이용해 산화적 스트레스의 일종

인 방사선에 대한 방어효과를 알아보고자 한다.

2. 재료 및 방법

식물 재료

본 실험에서 사용한 식물은 모두 지상부로, 씀바귀의 경우 (주)천길에서 제공받아 사용하였으며 퉁퉁마디의 경우 충청남도 보령 일원에서 자생하는 퉁퉁마디를 2003년 6월 초에 채취하여 70℃에서 열풍건조, 마쇄하여 사용하였다. 각 건분 100g을 10배에 해당하는 증류수로 현탁시켜 95℃에서 2시간씩 추출한 후 12,000rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 취하였으며 잔사를 이용하여 2회 더 반복하였다. 추출액은 감압농축 후 동결건조 하였으며 퉁퉁마디의 경우 동결건조 전에 실온(24℃)에서 48시간 투석(M.W. 12,400)을 2회 실시하였다.

세포주 배양

세포주는 흑색종인 B16세포주를 사용하였으며 기본 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco)이 포함된 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM; Gibco)으로, 100U/㎖ Penicillin (Gibco), 100㎍/㎖ Streptomycin(Gibco)을 첨가하여 사용하였다. 또한 37℃에서 95% 공기와 5% CO_2가 공급되고 충분한 습도가 유지되는 배양기(Forma Scientific)내에서 배양하였다.

DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성

Free radical인 1,1,-dipheny-2-picryl hydrazyl(DPPH)을 사용한 항산화활성 측정법을 이용하였다[8]. 증류수로 현탁시킨 시료에 DPPH(0.1mM)용액을 1:1로 첨가한 후 실온에서 30분간 반응시킨 후 517㎚에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 RC80(㎍/㎖)은 시료가 첨가되지 않은 대조군의 값을 80%로 감소시키는 시료의 농도를 나타냈으며, 기존의 항산화제인 Butylated hydroxyanisole(BHA), Ascorbic acid, caffeine 및 Glutathione과 비교하였다.

MTT cell viability assay

세포의 생존율은 MTT(3-［4,5-dimethylthiazol-2yl］-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma) reduction method를 변용하여 측정하였다[9]. 이 방법은 세포 내 미토콘드리아의 호흡기능을 측정하는 방법으로 tryphan blue dye-exclusion의 방법보다 정확히 세포의 생존율을 측정할 수 있다고 알려져 있다. B16 세포를 2×10^4cell/㎖의 밀도로 6 well-plate에 접종 후 DMEM 배양액에 24시간 배양하였다. 방사선 조사 3시간 전에 생리식염수로 녹인 각 추출물(0.5mg/㎖)을 배양액에 처리하였다. 방사선 조사는 한국원자력연구소의 ^{60}Co γ-ray를 이용하여 6.5Gy의 선량으로 처리하였다. 조사 후 0시간과 24시간에

배양액을 제거하고 MTT용액(0.05% in medium)을 30㎕ 첨가하여, 배양기 내에서 2시간 동안 반응시키고 반응시킨 MTT용액은 제거한다. 배양접시 바닥에 형성된 formazan crystals을 DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma) 1㎖에 녹인 후 spectrophotometer(Amersham Pharmacia)를 사용하여 580㎚의 파장으로 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 계측하였다.

3. 결과 및 고찰

DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성

퉁퉁마디 및 씀바귀 추출물에 대한 DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성을 검색한 결과 Table 1에서 보여지는 바와 같이 씀바귀 추출물(RC_{80}=75.9)의 경우 Ascorbic acid(RC_{80}=14.16)나 BHA (RC_{80}=17.79)에는 미치지 못하였으나 Glutathione(RC_{80}=64.69)과 유사한 활성을 보였다. 퉁퉁마디의 경우 RC_{80}이 179.77로 다소 낮은 결과를 도출했으나 비교한 항산화제가 정제된 화학물질임을 감안할 때 분획과정을 거쳐 좀더 정제될 경우 기존의 항산화제와 비슷하거나 씀바귀의 경우 더 뛰어난 항산화활성을 보일 거라 기대된다.

MTT cell viability assay

각 추출물에 대해 MTT cell viability assay를 수행, 대조군(saline) 처리 시를 100%로 환산한 결과 방사선 조사를 하지 않은 경우 양성대조군인 Ascorbic acid는 102%, 퉁퉁마디 74%, 씀바귀 92%를 나타내었다. 이는 씀바귀의 경우 거의 생존율에 영향을 미치지 않으나 퉁퉁마디의 경우 생존율에 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 방사선 조사시 대조군의 경우 43%, 양성대조군 72%, 퉁퉁마디 38%, 씀바귀 118%로 방사선을 조사하지 않은 경우와 비교시 대조군은 57%, 양서대조군 30%, 퉁퉁마디 36%로 감소하였고 씀바귀의 경우 오히려 생존율이 26% 증가함을 보였다. 이는 이들 식물을 방사선 방어제로서 효과가 탁월함을 보여준다.

항산화활성 실험과 세포생존율을 관찰한 결과 씀바귀가 퉁퉁마디에 비해 좀더 뛰어난 효과를 나타내었다. 이는 씀바귀 성분인 terpenoid계 화합물질에 의한 것으로 생각되어지며 이미 여러 보문을 통하여 terpenoid계 물질이 대사기능항진, 강장, 진정 등 여러 약리적 효과가 입증되어있다. 따라서 각 추출물을 분획을 통해 좀더 정제한다면 방사선방어제로서의 뛰어난 효과가 기대된다.

4. 참고 문헌

[1] **이영노, 대한식물도감. 항문사** (1985).

[2] H. Roessner, and M. Popp, Ionic patterns in some Crassulaceae from Austrian habitats. Flora 178 (1986).

[3] M. J. Kim, J. S. Kim, D. M. Jeong, S. S. Ham and C. Y. Yu, Effect of antioxidant, antimutagenicity and anticancer of root extract from *Ixeris dentata* Nakai. Korean J. Medicinal Crop Sci. 10, 3 (2002).

[4] Y. C. Jo, K. S. Lee, S. M. Chon and D. S. Byun, Characteristics of growth and germination of *Salicornia herbacea* L. for the soil salinity and manure condition, korean J. Medicinal Crop Sci. 10, 2 (2002).

[5] S. K. Han and S. M. Kim, Antioxidative effect of *Saliconia herbacea* L. grown in closed sea beach, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32, 2 (2003).

[6] M. J. Kim, J. S. Kim, W. H. Kang and D. M. Jeong, Effect on antimutagenic and cancer cell growth inhibition of *Ixeris dentata* Nakai. Korean J. Medicinal Crop Sci. 10, 3 (2002).

[7] S. S. Lim and J. h. Lee, A study on the chemical composition and hydpocholesterolaemic effect of *Aster scaber* and *Ixeris dentata*, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26, 1 (1997).

[8] Q. Xiong, S. Kadota, T. Tadata, and T. Namba, Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. Biol. Pharm. Bull., 19 (1996)

[9] T. Mossman, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay, J. Immunol Method 65 (1983)

Table 1. DPPH free radical scavenging activity of plant extracts and chemical compound.

Extracts and Chemical compound	RC_{80} (μg/μℓ)
S. herbacea	179.77
I. dentata	75.90
BHA	17.79
Ascorbic acid	14.16
Caffeine	>20,000
Glutathione	64.69

Amount required for 80% reduction of DPPH after 30 min.

Table 2. Effects of Plant extracts and chemical compound on the B16 cells cultured for 24 hours *in vitro*.

Group	Hours		Cell viability (%)
	0 hr.	24 hr.	
Con.(saline)	1.98	3.42	100
Con.-Rad.	1.72	1.27	43
Ascorbic acid	1.21	2.13	102
Ascorbic acid-Rad.	1.71	2.14	72
S. herbacea	1.72	2.20	74
***S. herbacea*-Rad.**	0.73	0.48	38
I. dentata	1.78	2.82	92
***I. dentata*-Rad.**	1.50	3.06	118