

꾸지뽕나무 추출물의 생리 활성(제1보)

최학주^{1,2}, 김청택³, 도민연⁴, 랑문정^{5*}

¹대전대학교 난치성면역질환 동서생명의학연구소(TBRC),

²큐슈대학교 의학연구원 천연물화학연구소, ³(주)알엔에스,

⁴고성군 농업기술센터, ⁵배재대학교 분자과학부

Physiological Activities of *Cudrania tricuspidata* Extracts (Part I)

Hak Joo Choi^{1,2}, Cheong Taek Kim³, Min Yeon Do⁴ and Moon Jeong Rang^{5*}

¹Traditional and Biomedical Research Center (TBRC), Daejeon University

²Department of Chemo-Pharmaceutical Science, Kyusu University

³RNS, Ltd., ⁴Goseong Agricultural Technology Center

⁵Division of Molecular Science, Pai Chai University

요 약 꾸지뽕나무는 한국과 중국에서 전통 한방약재로 오랫동안 사용되어 왔다. 본 논문은 꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리부분의 에탄올 추출물의 물, 에탄올, 에칠아세테이트 용해성 분획물에 대한 생리활성에 관한 실험결과이다. 이들 분획물들의 다양한 세포들의 성장에 대한 영향을 검토한 결과, 잎, 줄기, 뿌리의 에칠아세테이트 분획물이 macrophage(RAW 264.7 cell), melanoma cell(B16-F10 cell), fibroblast cell(CCD-986sk cell), lung carcinoma cell(A549 cell) 등의 성장을 현저하게 억제시키는 세포독성을 나타내었다. 자유라디칼 DPPH (di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium)를 소거할 수 있는 분획물의 농도를 비교한 결과, 잎과 뿌리의 물분획물 그리고 뿌리의 에탄올분획물이 다른 분획물들에 비해 라디칼을 소거하는 항산화효과가 더 우수한 것으로 나타났다.

Abstract *Cudrania tricuspidata* has been used for a long time as a traditional herb medicine in Korea and China. This paper has shown the experimental results about the physiological activities of water-, ethanol-, ethyl acetate-soluble fractions from ethanolic extracts of leaves, stems and roots of *Cudrania tricuspidata*. The effects of these fractions on the growth of various cells have exhibited that the ethyl acetate fractions from leaves, stems and roots inhibited significantly the growths of macrophage(RAW 264.7 cell), melanoma cell(B16-F10 cell), fibroblast cell(CCD-986sk cell), and lung carcinoma cell(A549 cell). The water and ethanol fractions of leaves and ethanol fraction of stems demonstrated better antioxidant activities scavenging radicals than other fractions when compared with the concentrations of different fractions for scavenging free radical DPPH (di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium).

Key Words : Anti-oxidant, *Cudrania tricuspidata*, Cytotoxicity, Physiological Activities

1. 서론

꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 굻가시나무라고도 하는 쌍떡잎식물 쑤기풀목 뽕나무의 낙엽활엽 교소목으로서 2~8m정도 자라며 한국(황해도 이남), 일본, 중국 등지에 분포하며 산기슭의 양지쪽이나 마을 부근에서 자

란다. 가지에 가시가 있고, 잎은 3갈래로 갈라진 것과 가장자리가 밋밋하고 달걀 모양인 것이 있다. 꽃은 암수딴그루이고 5~6월에 두상꽃차례를 이루며 핀다. 열매는 껍질이 말라서 단단해지고 그 속에 종자를 가지는 수과이고 열매들이 모여 덩어리를 이루는데 지름이 2~3cm로 둥근 모양이고 육질이며 9월에 붉은 색으로 익는다.

*Corresponding Author : Moon Jeong Rang(Pai Chai Univ.)

Tel: +82-42-520-5919 email: mjrang@pcu.ac.kr

Received July 2, 2013

Revised (1st July 18, 2013, 2nd July 25, 2013)

Accepted August 7, 2013

일반적으로 잎은 뽕잎대용으로 누에사료로 쓰고 열매는 먹을 수 있으며 잼이나 술을 담그고, 줄기와 뿌리는 약용이나 종이원료로 쓰인다[1-3]. 동의보감에서는 자목(柞木) 또는 산뽕나무라고 하는 약재로서 성질이 따뜻하며 맛이 달고 독이 없으며 풍허로 귀먹은 것과 학질을 낫게 하며 삶은 물은 노랑계 물이 든다고 하였다 [4]. 또한 중약대사전에서는 꾸지뽕나무의 뿌리를 '천파석(穿破石)', 나무껍질과 뿌리껍질 '자목백피(柞木白皮)', 잎을 '자수경엽(柞樹莖葉)', 열매를 '자수과실(柞樹果實)' 이라고 하여 부위별로 다양한 효능의 약재로서 기재되어 있다. 뿌리인 천파석은 풍사를 몰아내고 습을 배출시키며 혈을 잘 순환시키고 월경을 통하게 하는 효능이 있으며. 풍습에 의한 관절통, 황달, 임탁(임병), 고창(주로 간장병에 복부가 붓는 증상), 폐경, 노상에 의한 해혈, 타박상, 정창, 부스럼을 치료한다. 나무껍질과 뿌리껍질인 자목백피는 신을 보하고 정을 수렴하며 혈을 서늘하게 하고 근육과 힘줄을 푸는 효능이 있으며 요통, 유정, 객혈, 구혈, 외상성 손상을 치료한다. 잎인 자수경엽은 부스럼, 습진을 치료한하고 소염하고 통증을 완화시키며 풍을 제거하고 혈액 순환을 촉진시키고 유행성 이하선염, 폐결핵, 만성 요통, 타박노상, 부스럼, 종기, 급성 관절 좌상을 치료한다, 열매인 자수과실은 열을 내리고 혈분에서 열사를 제거하며 근육과 힘줄을 풀고 나뭇을 잘 통하게 한다[5,6].

위와 같이 다양한 질환에 오랫동안 사용되어 온 꾸지뽕나무는 최근에는 느릅나무(유근피), 하고초(꿀풀), 외송과 함께 4대 항암약초로 알려져 특히 자궁암, 난소암, 식도암, 대장암(직장암), 위암, 결장암, 폐암, 간암, 모든 소화기관암에 대해 항암효능이 있는 것으로 관심을 받고 있다[6,7]. 동의보감 과 중약대사전에 기재된 많은 천연약재들이 나타내는 효능과 작용기전을 확인하기 위해 많은 연구가 수행되어 온 것처럼 꾸지뽕나무에 대해서도 항균, 항산화, 항염, 항당뇨, 항고지혈증, 항고혈압, 항바이러스, 항세포독성, 항비만 등의 연구를 통해 꾸지뽕나무의 효능을 확인하기 위한 노력들이 진행되고 있다[7-12]. 본 연구에서는 꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리 부위별로 추출물 및 분획물에 대하여 다양한 세포독성과 항산화 실험을 통해 꾸지뽕나무의 생리활성효과를 확인하고 활용분야 확대를 검토하는 데 도움이 되고자 한다.

2. 실험방법

2.1 시약 및 기기

2.1.1 약재

본 연구에서 사용된 꾸지뽕나무는 고성군 농업기술센

터에서 공급받아 줄기, 잎, 뿌리의 부위별로 나누어 분쇄기로 분쇄하여 사용하였다.

2.1.2 시약

Lipopolysaccharide(LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO), di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium (DPPH), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Sigma 사(Saint Louis, USA)에서, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), Fetal Bovine Serum(FBS), Penicillin 및 Streptomycin은 Hyclone사(Logan, Ut, USA)에서, Cell viability assay kit은 Daeillab sevice사(Seoul, Korea)에서 구입하였다.

2.1.3 기기

본 실험에 사용된 기기는 ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A)와 Flow cytometry system(BD Biosciences immunocytometry systems, U.S.A.) 등을 이용하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 꾸지뽕나무의 생리활성 성분의 추출 및 용매 분획물 제조

가. 꾸지뽕나무의 생리활성 성분의 추출

꾸지뽕나무의 잎, 줄기 및 뿌리 각 500 g씩 취하여 5배 부피의 에탄올을 가하고 80℃에서 3시간동안 환류추출한 후 여과지로 여과하였다. 여과액을 40 ~ 50℃에서 감압농축하여 에탄올 엑스를 각각 94 g, 53 g, 131 g을 얻었다.

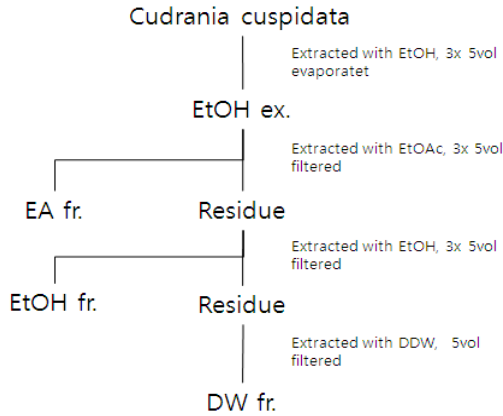
나. 용매분획물 제조[Fig. 1]

꾸지뽕나무 각 부위별 에탄올 엑스에 5배 부피의 초산에칠을 가한 후 상온에서 3시간 환류 추출한 후 여과하여 얻은 초산에칠 가용분획을 40 ~ 50℃에서 감압농축하여 각각의 초산에칠 분획물(EA fr.)을 26 g, 3 g, 49 g을 얻었다. 초산에칠에 녹지않는 각각의 잔사에 5배 부피의 에탄올을 가한 후 상온에서 3시간 환류추출한 후 여과하여 얻은 에탄올 가용분획을 40 ~ 50℃에서 감압농축하여 각각의 에탄올 분획물(EtOH fr.)을 21 g, 18 g, 29 g을 얻었다. 에탄올에 녹지 않는 각각의 잔사에 5배 부피의 증류수를 가하고 상온에서 환류 추출한 후 여과하여 얻은 증류수 가용분획을 40 ~ 50℃에서 감압농축하여 각각의 물 분획물(DW fr.)을 47 g, 32 g, 53 g을 얻었다.

다. 생리활성 평가 시료의 조제

꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리의 물, 에탄올, 초산에칠 분획물 각각의 100 mg을 DMSO 10 ml에 녹인 후, 0.2 μm

멤브레인 필터로 여과하여 생리활성 평가시료로 사용하였다.



[Fig. 1] Scheme of Solvent Fractionation

2.2.2 세포독성

가. RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells은 96 well plates에 10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, 각각의 추출물을 각각 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 10 ul의 WST solution을 첨가한 후 CO2 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 30분 반응 시킨 후, 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

나. B16-F10 cells

B16-F10 cells은 96 well plates에 10^4 cells/well로 분주하여 48시간 동안 배양 한 후, 각각의 추출물을 각각 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 10 ul의 WST solution을 첨가한 후 CO2 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 30분 반응 시킨 후, 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

다. CCD-986sk cells

CCD-986sk cells은 96 well plates에 10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, 각각의 추출물을 각각 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 10 ul의 WST solution을 첨가한 후 CO2 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 30분 반응 시킨 후, 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

라. A549 cells

A549 cells은 96 well plates에 2×10^3 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, 각각의 추출물을 각각 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 10 ul의 WST solution을 첨가한 후 CO2 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 30분 반응 시킨 후, 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

2.2.3 DPPH소거능 측정

자유라디칼 소거 활성 시험은 안정적인 자유라디칼 DPPH (di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium)를 사용하는 방법으로 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 ul와 각각의 추출물 (25, 50, 100, 200 ug/ml) 100 ul 를 각각 혼합하고, 37°C에서 30분간 반응 시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액 대신 증류수를 넣었으며, DPPH 용액대신 에탄올을 넣어 보정값을 얻었다. 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

소거율 (%)

$$= \frac{(\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도})}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.2.4 세포내 ROS생성 측정

Raw 264.7 세포 내에서 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. 12 well plate에 Raw 264.7 세포를 1.5×10^5 cells/well이 되게 분주하였다. 24시간 동안 배양 한 후, 여기에 LPS 및 각각의 추출물을 10 - 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각각의 well에 첨가한 후, 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 모든 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 후 DCF-DA 10 μM 이 되도록 첨가하여 15분 동안 빛이 차단된 상온에서 염색하였다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상등액을 제거하고 다시 PBS 400 μl 를 부유시켜 유세포 분석기 (Flow cytometer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA)를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

2.2.5 실험결과의 통계처리

세포독성, DPPH 소거능 측정, 세포내 ROS생성 실험 등 모든 실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test를 사용하여 통계처리 하였으며 P<0.05, P<0.01 및 P<0.001 수준에서 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 세포독성실험결과

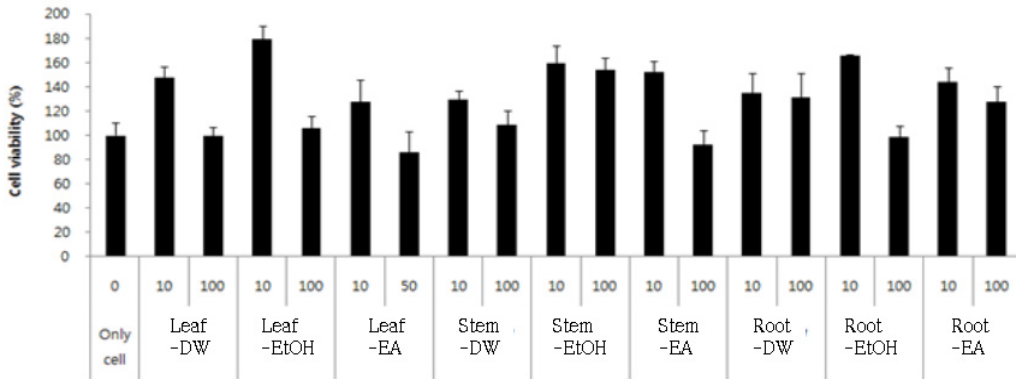
3.1.1 RAW 264.7 cells

Murine macrophage인 RAW 264.7 세포주에서 잎, 줄기, 뿌리 각각의 물, 에탄올, 에틸아세테이트 추출물이 세포에 미치는 영향을 측정된 결과 Fig. 2와 같은 결과를 나타내었다. 대조군의 세포 생존율을 100%로 하였을 때, 각각의 추출물은 10-100 ug/ml의 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었는데, 잎의 에틸아세테이트 추출물만 100 ug/ml의 농도에서 세포독성이 나타나서 10과

50 ug/ml의 농도로 처리하였다.

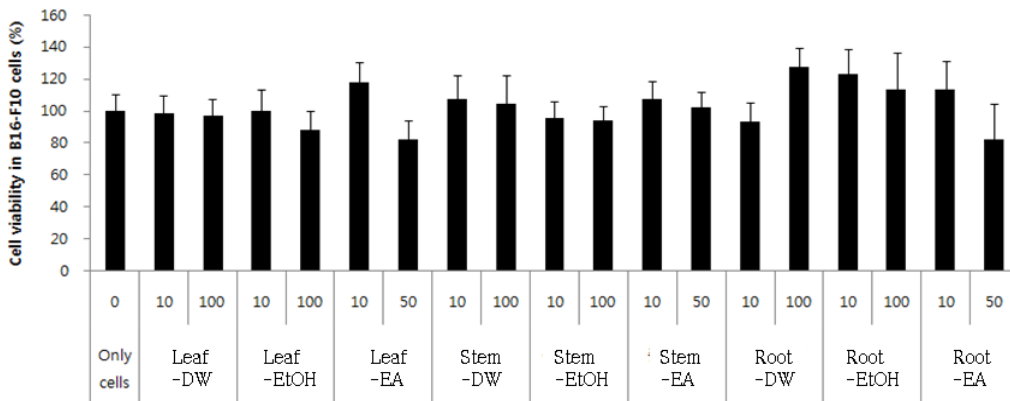
3.1.2 B16-F10 cells

Murine melanoma cell인 RB16-F10 세포주에서 잎, 줄기, 뿌리 각각의 물, 에탄올, 에틸아세테이트 추출물이 세포에 미치는 영향을 측정된 결과 Fig. 3과 같은 결과를 나타내었다. 대조군의 세포 생존율을 100%로 하였을 때, 각각의 추출물은 10-100 ug/ml의 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 나타내었는데, 잎, 줄기, 뿌리의 에틸아세테이트 추출물만 100 ug/ml의 농도에서 세포독성이 나타나서 10과 50 ug/ml의 농도로 처리하였다.



[Fig. 2] Effect of Each Extract on the Cell Viability of RAW 264.7 Cells

Cells were treated with 10-100 ug/ml of each extract for 24 hr. Cell viability was determined using the WST assay. The results are expressed as mean±SD from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with only cells.



[Fig. 3] Effect of Each Extract on the Cell Viability of B16-F10 Cells

Cells were treated with 10-100 ug/ml of each extract for 24 hr. Cell viability was determined using the WST assay. The results are expressed as mean±SD from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with only cells.

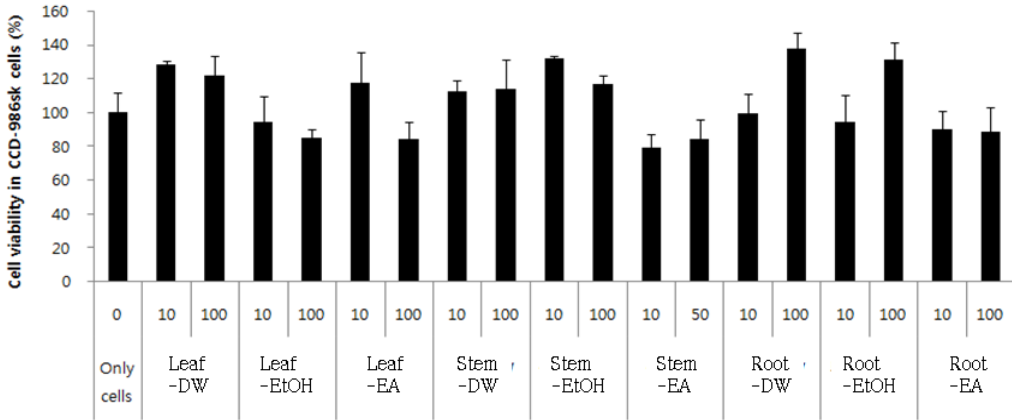
3.1.3 CCD-986sk cells

Human skin fibroblast cell인 CCD-986sk 세포주에서 잎, 줄기, 뿌리 각각의 물, 에탄올, 에틸아세테이트 추출물이 세포에 미치는 영향을 측정한 결과 Fig. 4와 같은 결과를 나타내었다. 대조군의 세포 생존율을 100%로 하였을 때, 각각의 추출물은 10-100 ug/ml의 농도에서 84% 이상의 세포 생존율을 나타내었는데, 줄기의 에틸아세테이트 추출물만 100 ug/ml의 농도에서 세포독성이 나타나서 10과 50 ug/ml의 농도로 처리하였다.

3.1.4 A549 cells

Human lung carcinoma cell인 A549 cells에서 잎, 줄기, 뿌리의 물, 에탄올, 에틸아세테이트 추출물이 암세포에

미치는 영향을 측정한 결과 Table 1과 같은 결과를 나타내었다. 대조군의 세포 생존율을 100%로 하였을 때, 잎의 물과 에탄올 추출물은 200 ug/ml의 농도에서도 85% 이상의 세포 생존율을 나타내었으나, 에틸아세테이트 추출물만 50, 100, 200 ug/ml의 농도에서 25%, 54%, 76%의 세포독성을 나타냈다. 줄기의 에탄올 추출물은 200 ug/ml의 농도에서도 세포독성이 나타나지 않았으나, 물과 에틸아세테이트 추출물은 50, 100, 200 ug/ml의 농도에서 각각 25%, 54%, 76%와 0%, 45%, 89%의 세포독성을 나타냈다. 뿌리 물 추출물은 200 ug/ml의 농도에서도 세포독성이 나타나지 않았으나, 에탄올과 에틸아세테이트 추출물은 50, 100, 200 ug/ml의 농도에서 각각 17%, 17%, 20%와 10%, 15%, 33%의 세포독성을 나타냈다.



[Fig. 4] Effect of Each Extract on the Cell Viability of CCD-986sk Cells
Cells were treated with 10-100 ug/ml of each extract for 24 hr. Cell viability was determined using the WST assay. The results are expressed as mean±SD from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with only cells.

[Table 1] Effect of Each Extract on the Cell Viability of A549 Cells

Groups	Conc.(ug/ml)	DW(%)	EtOH(%)	EA(%)
Leaf	50	117.2 ± 4.6	103.7 ± 19.7	75.9 ± 0.4 ^{***}
	100	107.0 ± 15.0	87.7 ± 7.9	46.1 ± 1.2 ^{***}
	200	106.3 ± 0.4	86.4 ± 10.9	24.3 ± 2.0 ^{***}
Stem	50	75.9 ± 0.4 ^{**}	199.9 ± 2.3	111.3 ± 11.8
	100	46.1 ± 1.2 ^{**}	100.3 ± 12.5	55.9 ± 17.0
	200	24.3 ± 2.0 ^{**}	110.5 ± 11.6	11.5 ± 5.4 ^{**}
Root	50	142.5 ± 7.6	83.3 ± 7.0	90.8 ± 9.2
	100	141.6 ± 14.1	83.3 ± 12.0	85.6 ± 4.3 [*]
	200	138.8 ± 7.4	80.3 ± 6.6	67.2 ± 12.2 [*]

Cells were treated with 50-200 ug/ml of each extract for 24 hr. Cell viability was determined using the WST assay. The results are expressed as mean±SD from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with only cells (*P<0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001).

대부분의 식물과 마찬가지로 꾸지뽕나무가 함유한 생리활성 성분들은 폴리페놀계화합물, 즉 flavonoid 유도체들로써 대표적인 성분은 flavanone, flavonol, flavonol glycoside, flavanone glycoside, xanthone 등 이다[13]. 이들 성분 중 flavonol, xanthone 등이 tumor cell들에 대해 세포독성효과를 나타낸다 [14-16]. 꾸지뽕나무를 알코올로 추출한 추출물중 잎부위 추출물이 가장 높은 페놀함량을 보여 주는 연구결과[17]와 뿌리부분의 에틸아세테이트추출물이 가장 현저한 세포독성을 보였다는 연구결과[14]를 고려한다면 본 실험에서 잎부위의 에틸아세테이트추출물이 가장 높은 세포독성효과를 보인 것은 추출부위와 추출조건이 상이하지만 중전의 실험결과와 일관성을 유추할 수 있다. 단 실험대상 세포에 따라 분획추출물의 세포독성정도의 차이는 분획추출물중의 성분상의 차이와 이에 따른 세포의 민감성의 차이로 판단된다.

3.2 항산화실험결과

3.2.1 DPPH 소거능 효과

잎, 줄기, 뿌리의 물, 에탄올, 에틸아세테이트 추출물 25-200 ug/ml의 농도에서 DPPH 소거능에 미치는 영향을

측정한 결과, Table 2와 같은 결과를 나타내었다. 대조군을 0으로 보았을 때, 잎의 물 추출물은 25-200 ug/ml의 농도에서 11%, 15%, 23%, 43%, 에탄올 추출물은 5%, 12%, 20%, 24%, 에틸아세테이트는 10%, 17%, 29%, 37%의 소거능을 보였다. 줄기의 물 추출물은 25-200 ug/ml의 농도에서 1%, 6%, 10%, 15%, 에탄올 추출물은 8%, 13%, 23%, 29%, 에틸아세테이트 추출물은 1%, 3%, 6%, 10%의 소거능을 보였다. 또한, 뿌리의 물 추출물은 10%, 13%, 19%, 41%, 에탄올 추출물은 17%, 22%, 25%, 54%, 에틸아세테이트 추출물은 10%, 11%, 12%, 28%의 소거능을 보였다.

3.2.2 ROS 생성억제 효과

RAW 264.7 세포주에서 잎, 줄기, 뿌리의 물, 에탄올, 에틸아세테이트 추출물이 ROS 생성 억제에 미치는 영향을 측정한 결과, Table 3과 같은 결과를 나타내었다. 대조군을 100으로 보았을 때, 정상군에 비해 3.4배 증가하였고, 잎과 줄기의 물 추출물과 뿌리의 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 추출물은 효과가 거의 없었으나, 잎의 에탄올 추출물은 10과 100 ug/ml의 농도에서 10%와 17%, 에

[Table 2] DPPH Free Radical Scavenging Activity of Each Extract

Groups	Conc.(ug/ml)	DW(%)	EtOH(%)	EA(%)
Leaf	25	10.6 ± 1.2	5.4 ± 2.3	9.9 ± 1.9
	50	15.1 ± 1.9	12.0 ± 4.2	17.2 ± 1.3
	100	23.4 ± 4.4	20.0 ± 8.6	28.9 ± 1.9
	200	43.2 ± 2.7	24.3 ± 6.4	37.3 ± 1.9
Stem	25	1.1 ± 2.8	7.5 ± 1.0	0.9 ± 1.3
	50	6.2 ± 0.6	12.9 ± 1.7	2.9 ± 0.5
	100	9.9 ± 1.6	23.4 ± 2.2	5.6 ± 0.8
	200	15.1 ± 5.2	29.3 ± 4.7	9.6 ± 1.1
Root	25	10.2 ± 0.4	16.8 ± 2.6	9.8 ± 5.5
	50	13.4 ± 0.5	21.8 ± 4.0	10.8 ± 9.2
	100	18.5 ± 0.5	24.7 ± 2.2	12.1 ± 5.2
	200	41.1 ± 0.5	54.1 ± 5.1	28.2 ± 1.3

Extracts were incubated with DPPH solution at 37°C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results are expressed as mean±SD from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with 0 ug/ml.

[Table 3] Effect of Each Extract on ROS Production in RAW 264.7 cells

Groups	Conc.(ug/ml)	DW(%)	EtOH(%)	EA(%)
Leaf	10	96.6 ± 8.1	89.8 ± 12.8	93.0 ± 14.6
	100	101.4 ± 10.0	82.9 ± 4.9*	82.5 ± 15.8
Stem	10	123.9 ± 17.1	116.7 ± 11.4	99.9 ± 13.6
	100	112.2 ± 11.5	86.2 ± 18.9	75.0 ± 20.8
Root	10	90.4 ± 7.4	108.9 ± 0.8	137.1 ± 9.5
	100	105.2 ± 2.2	96.1 ± 4.4	246.9 ± 28.3

Raw 264.7 cells were stimulated with LPS(1 µg/ml) and treated with 10-100 µg/ml of each extract for 24 hrs. The ROS production was analysed following incubation with DCFH-DA by flow cytometry. The results are presented by the mean±SD from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with control (*P<0.05).

틸아세테이트 추출물 10과 50 ug/ml의 농도에서 각각 7%와 17%, 줄기의 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 추출물 100 ug/ml의 농도에서는 14%와 25%, 뿌리 물 추출물 10 ug/ml의 농도에서는 10%의 생성 억제능을 보였다.

ROS는 세포의 구성성분에 손상을 주어 세포의 대사 활동 저해 및 사멸을 유도한다. 일반적으로 폴리페놀은 ROS에 전자를 공여함으로써 ROS의 반응성을 감소시켜 ROS에 의한 세포의 산화적 손상을 방지한다[18,19]. ROS의 일종인 DPPH에 전자를 공여하여 non-radical DPPH로 변환시키는 항산화능력은 잎과 줄기부위 추출물이 뿌리부분 추출물보다 높은 것으로 나타났다. 이는 당연히 부위별로 함유된 성분 또는 부위별로 추출된 성분들의 종류 및 양의 차이로 기인한 것으로 판단된다. 대식세포내에서의 ROS생성에 대한 꾸지뽕나무추출물의 억제효과는 미미한 것으로 나타났다. ROS자체에 대해서는 어느 정도의 항산화효과가 있으나 대식세포의 대사과정에서 항산화성분의 기능이 발현되지 못한 것으로 판단된다.

4. 결론

꾸지뽕의 각 부위(잎, 줄기, 뿌리)에 대한 각 용매(물, 에탄올, 에틸아세테이트) 분획물들의 세포독성, 항산화에 대한 효과를 평가한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

첫째, 꾸지뽕나무의 잎, 줄기 및 뿌리 각 부위별 에탄올 엑스를 에틸아세테이트, 에탄올, 증류수를 이용하여 용매분획을 수행하여 꾸지뽕의 각부위별 에틸아세테이트, 에탄올, 물분획물을 제조하였다.

둘째, murine macrophage인 RAW 264.7 cell 에 대한 세포 독성은 각 부위별/용매별 세포생존율이 잎의 에틸아세테이트 분획물은 50 ug/ml의 농도 이하에서 그리고 나머지는 100 ug/ml 이하에서 세포독성을 나타내지 않았다.

셋째, murine melanoma cell인 B16-F10 cell 에 대한 세포 독성은 각 부위별/용매별 세포생존율이 잎, 줄기, 뿌리의 에틸아세테이트 분획물들은 50 ug/ml의 농도 이하에서 그리고 나머지는 100 ug/ml 이하에서 세포독성을 나타내지 않았다.

넷째, human skin fibroblast cell인 CCD-986sk cell 에 대한 세포 독성은 각 부위별/용매별 세포생존율이 줄기의 에틸아세테이트 분획물은 50 ug/ml의 농도 이하에서 그리고 나머지는 100 ug/ml 이하에서 세포독성을 나타내지 않았다.

다섯째, human lung carcinoma cell인 A549 cell의 생

장 억제 효과를 측정된 결과, 잎의 에틸아세테이트분획물의 모든 농도에서 유의성 있는(**P<0.001) 억제효과를 나타내었고, 줄기의 물분획물 모두와 줄기의 에틸아세테이트분획물에서 유의성 있는(**P<0.01) 억제효과를 나타내었다. 그리고 뿌리의 에틸아세테이트분획물의 100 ug/ml과 200 ug/ml 처리에서 유의성 있는(*P<0.05) 억제효과를 나타내었다.

여섯째, 항산화 효과의 자유라디칼 DPPH 소거능을 측정된 결과, 잎의 물분획물 200 ug/ml, 뿌리의 물분획물 200 ug/ml에서 40%이상의 소거효과와 뿌리의 에탄올분획물 200 ug/ml 처리에서 50%이상의 소거효과를 나타내었다. 그리고 RAW 264.7 세포주에서의 ROS생성 억제 효과는 분획물들 모두 전체적으로 효과를 나타내지 않았다.

위 실험결과를 통해 꾸지뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리의 에틸아세테이트추출물이 macrophage, melanoma cell, skin fibroblast cell, lung carcinoma cell 등의 성장을 현저하게 억제하는 세포독성을 나타냈으며, 꾸지뽕나무의 잎과 뿌리의 물, 에탄올추출물이 라디칼을 소거하는 항산화효과가 나타났다. 본 연구를 토대로 앞으로 지속적인 연구를 통해 꾸지뽕나무의 식품, 의약, 화장품 등 다양한 분야에 의 소재의 응용가능성을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

References

- [1] Y. N. Lee, New Flora of Korea, I, p.246-247, Kyo-Hak Publishing Co. Ltd., 2006.
- [2] J. S. Kim and T. Y Kim, Woody Plants of Korea, p.142, Dolbegae, 2011.
- [3] Doopedia(Doosan Encyclopedia), Cudrania tricuspidata, Doosan Corporation, Available From http://www.doopedia.co.kr/doopedia/master/master.do?method=view&MAS_IDX=101013000831679, (accessed May 24, 2013)
- [4] Heo-Jun, Translation Dongui Bogam, pp.1972, Bub-In Culture Co., 1999.
- [5] C. M. Kim, Translation Encyclopedia of Oriental , p.4166, p.3357, p.3582, Herbal Medicine, Jeong-Dam, 2004.
- [6] D. M. Jeon, Cudrania tricuspidata, Available From <http://www.jdm077.com>, (accessed May 24, 2013)
- [7] H. J. Lee, J. R. Do, J. H. Kwon and H. K. Kim, Physiological Activities of Extracts from Different Parts of *Cudrania tricuspidata*, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 40, 7, pp.942~948, 2011.

- DOI: <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.7.942>
- [8] K. S. Youn and J. W. Kim, Antioxidant and Angiotensin Converting Enzyme I Inhibitory Activities of Extracts from Mulberry (*Cudrania tricuspidata*) Fruit subjected to Different Drying Methods, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41, 10, pp.1388~1394, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.10.1388>
- [9] D. H. Kwon, M. B. Kim, D. Y. Yoon, Y. H. Lee, J. W. Kim, H. G. Lee, I. S. Cha, J. S. Lim. and Y. K. Choe, Screening of Plant Resources of Anti-viral Activity, *Korean J Medicinal Crop Sci*. 11, 1, pp.24-30, 2003.
- [10] K. W. Lee, K. S. Sung, S. S. Kim, O. H. Lee, B. H. Lee and C. K. Han, Effects of *Cucurbita moschata*, Adlay Seed and *Cudrania tricuspidata* Leaf Mixed-powder Diet Supplements on the Visceral Fat, Fecal Amount and Serum Lipid Levels of the Rats on a High-Fat Diet, *Korean J Food & Nutr*, 25, 4, pp.990~998, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.9799/ksfan.2012.25.4.990>
- [11] O. K. Kim, J. N. Ho, D. E. Nam, W. J. Jun, K. T. Hwang, J. E. Kang, O. S. Chae, and J. M. Lee, Hepatoprotective Effect of *Cudrania tricuspidata* Extracts against Oxidative Damage, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41, 1, pp.7~13, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.1.007>
- [12] J. Y. Cha, H. J. Kim, C. H. Chung and Y. S. Cho, Antioxidative Activities and Contents of Polyphenolic Compound of *Cudrania tricuspidata*, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 28, 6, pp.1310~1315, 1999.
- [13] Z. P. Zheng, H. Y. Tan, J. Chen and M. F. Wang, Characterization of tyrosinase inhibitors in the twigs of *Cudrania tricuspidata* and their structure - activity relationship study, *Fitoterapia*, 84, pp.242-247, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2012.12.006>
- [14] I. K. Lee, C. J. Kim, K. S. Song, H. M. Kim, H. Koshino, M. Uramoto, and I. D. Yoo, Cytotoxic Benzyl Dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*, *Phytochemistry*, 41, 1, pp.213-216, 1996.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00609-5](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(95)00609-5)
- [15] Y. S. Zou, A. J. Hou, G. F. Zhu, Y. F. Chen, H. D. Sun and Q. S. Zhao, Cytotoxic isoprenylated xanthenes from *Cudrania tricuspidata*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, pp.1947-1953, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2004.01.030>
- [16] B. W. Lee, J. H. Lee, S. T. Lee, H. S. Lee, W. S. Lee, T. S. Jeong and K. H. Park, Antioxidant and cytotoxic activities of xanthenes from *Cudrania tricuspidata*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, pp.5548-5552, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.08.099>
- [17] S. R. Choi, D. H. You, J. Y. Kim, C. B. Park, D. H. Kim, and J. Ryu, Antioxidant activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to harvesting parts and time, *Korean J Medicinal Crop Sci*, 17, pp.115-120, 2009.
- [18] A. W. Boots, G. R. Haenen, G. M. den Hartog, and A. Bast, Oxidative Damage Shifts from Lipid Peroxidation to Thiol Arylation by Catechol-containing Antioxidants, *Biochim. Biophys. Acta*, 1583, pp.279. 2002.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981\(02\)00247-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00247-0)
- [19] W. Lopaczyski and S. H. Zeisel, Antioxidants, Programmed Cell Death, and Cancer, *Nutr. Res*. 21, pp.295, 2001.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00288-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00288-8)

최 학 주(Hak Joo Choi)

[정회원]



- 2003년 3월 : 가고시마대학교(생체공학석사)
- 2012년 3월 : 큐슈대학교 약학연구원(박사수료)
- 2003년 5월 ~ 2011년 2월 : 대전대학교 한의과대학 연구원
- 2011년 3월 ~ 현재 : 대전대학교 난치성면역질환의동서생명의학 연구센터 연구교수

<관심분야>

천연물 식의약 소재, 화장품 소재

김 청 택(Cheong Taek Kim)

[정회원]



- 1994년 2월 : 서울대학교 약대학 제약학과 (약학사)
- 1996년 2월 : 서울대학교 대학원 약학과 (약학석사)
- 1996년 3월 ~ 2008년 4월 : LG 생활건강 기술연구원 연구원
- 2009년 6월 ~ 현재 : (주)알엔에스 대표이사

<관심분야>

피부생리활성, 피부외용제

도 민 연(Min Yeon Do)

[정회원]



- 1995년 2월 : 강릉대학교 원예학과 (학사)
- 1995년 8월 : 속초시농촌지도소 농촌지도사 입사
- 1996년12월 ~ 2012년 2월 : 강원도고성군농업기술센터
- 2012년 2월 ~ 현재 : 강원도고성군농업기술센터 원예특작담당

<관심분야>
원예특용작물

랑 문 정(Moon Jeong Rang)

[정회원]



- 1973년 2월 : 서울대학교 공과대학 화학공학과 (공학사)
- 1998년 5월 : Rice University, Department of Chemical engineering (Ph. D)
- 1979년 8월 ~ 2006년 2월 : LG 화학/LG생활건강 연구원/연구위원
- 2006년 3월 ~ 현재 : 배재대학교 분자과학부 교수

<관심분야>
계면활성제, 화장품