

## 국내산 법제 하수오의 라디칼 소거능 및 산화적 스트레스 개선 효과

김현영<sup>1</sup> · 김준영<sup>2</sup> · 조은주<sup>3</sup> · 최지명<sup>3</sup> · 황정은<sup>1</sup> · 이희율<sup>1</sup> · 안민주<sup>1</sup>  
이진환<sup>4</sup> · 김윤근<sup>5</sup> · 고건희<sup>5</sup> · 구영민<sup>5</sup> · 오경렬<sup>5</sup> · 조계만<sup>1</sup>

<sup>1</sup>경남과학기술대학교 식품과학과  
<sup>2</sup>식품의약품안전처 부산지방식품의약품안전청  
<sup>3</sup>부산대학교 식품영양학과, <sup>4</sup>환경부 화학물질안전원  
<sup>5</sup>(재)산청한방약초연구소

### Free Radical Scavenging Effect and Oxidative Stress Protective Activity of Domestic Processed *Polygoni Multiflori Radix*

Hyun Young Kim<sup>1</sup>, Jun Young Kim<sup>2</sup>, Eun Ju Cho<sup>3</sup>, Ji Myung Choi<sup>3</sup>, Chung Eun Hwang<sup>1</sup>,  
Hee Yul Lee<sup>1</sup>, Min Ju Ahn<sup>1</sup>, Jin Hwan Lee<sup>4</sup>, Yun-Geun Kim<sup>5</sup>, Keon Hee Ko<sup>5</sup>,  
Young-Min Goo<sup>5</sup>, Kyeong Yeol Oh<sup>5</sup>, and Kye Man Cho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology  
<sup>2</sup>Busan Regional Korea Food and Drug Administration, Ministry of Food and Drug Safety  
<sup>3</sup>Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University  
<sup>4</sup>National Institute of Chemical Safety, Ministry of Environment  
<sup>5</sup>Sancheong Oriental Medicinal Herb Institute

**ABSTRACT** In this study, we confirmed biological compounds from methanol (MeOH) extract of processed *Polygoni Multiflori Radix* (PPMR), and the radical scavenging effect and oxidative stress protective activity of MeOH extract of PPMR were investigated under *in vitro* conditions using LLC-PK<sub>1</sub> renal epithelial cells. In HPLC analysis, MeOH extract of PPMR contained four species of biological compounds named 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside, emodin, chrysophanol, and rhein. 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside was detected as the main compound in PPMR as 115.02 mg/kg. MeOH extract of PPMR showed 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS), and hydroxyl radical scavenging activities in a concentration-dependent manner. In particular, upon 50 μg/mL of PPMR extract treatment, DPPH, ABTS, and hydroxyl radical scavenging activities were approximately 48.4%, 57.9%, and 81.2%, respectively. LLC-PK<sub>1</sub> cell viability declined in response to oxidative stress induced by pyrogallol, sodium nitroprusside (SNP), and morpholinoydnonimine (SIN-1) generators of NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, and ONOO<sup>-</sup>, respectively. However, MeOH extract of PPMR significantly and dose-dependently inhibited oxidative-stressed LLC-PK<sub>1</sub> cell cytotoxicity. In fact, upon 50 μg/mL of PPMR extract treatment, LLC-PK<sub>1</sub> cell viabilities were approximately 82.1%, 89.1%, and 77.6% compared to stress levels induced by pyrogallol, SNP, and SIN-1, respectively.

**Key words:** processed *Polygoni Multiflori Radix*, biological compounds, radical scavenging activity, LLC-PK<sub>1</sub> cell, oxidative stress

## 서 론

21세기 생활수준의 향상과 의학기술의 눈부신 발전으로 인간의 평균수명이 증가된 고령화 사회로 접어들면서 건강하게 나이를 먹는 것에 대한 욕구가 강해지고 있다. 이러한 시대에 부응하여 건강기능식품 분야의 시장은 급속도로 성

장하고 있다(1). 인체의 노화에는 유전적 요인과 환경적 요인으로 나눌 수 있으며, 환경적 요인으로 자유 라디칼은 세포막과 핵산의 주성분인 당질, 지질, 단백질, DNA와 같은 분자들을 과산화시키며, apoptosis와 같은 세포 손상을 초래하게 된다(1,2). 특히 과도한 자유 라디칼은 인체의 항산화 기전의 균형을 깨트리고, 산화적 스트레스를 유발하여 세포 및 조직 손상을 비롯하여 만성퇴행성 질환을 일으키게 된다. 산화적 스트레스의 원인인 자유 라디칼은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 및 hydroxyl radical

Received 8 April 2015; Accepted 29 May 2015

Corresponding author: Kye Man Cho, Department of Food Science, College of Life Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju, Gyeongnam 660-758, Korea  
E-mail: kmcho@gntech.ac.kr, Phone: +82-55-751-3272

(·OH) 뿐만 아니라 염증 반응과 관련된 nitric oxide(NO), NO<sub>2</sub>, peroxyxynitrite(ONOO<sup>-</sup>) 등의 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)이 ROS와 함께 질환 발병에 관여하게 된다(2-7).

ROS와 RNS에 의한 손상을 개선시키기 위한 항산화 방어 시스템에는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase, catalase 같은 생체 내의 활성산소 제거 효소에 의해 조절되는 항산화 시스템(8)과 식품을 섭취하는 β-carotene, 비타민 C와 E, anthocyanin 및 polyphenol성 화합물 등의 비효소적 항산화 시스템이 존재한다(2,7,9,10). 최근에 산화적 스트레스가 다양한 만성질환의 원인이 되고 있음이 밝혀져 이를 개선시킬 수 있는 항산화제에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있는데, 특히 식품을 통해 섭취하는 천연 항산화제가 유해성은 적으면서 효과적인 것으로 판단되고 있다(2,7,10,11).

하수오는 다년생 덩굴성 초본으로 길이 5~10 cm, 지름 3~10 cm의 여뀌과(Polygonaceae)의 방추형 덩이뿌리로(12), 장기 복용 시 혈압강화, 동맥경화의 방지 효과를 나타내어 예로부터 민간요법에 많이 이용되어 왔으며(13), 항산화 효과(14), 심보호 효과(15), 신경보호 효과(16) 및 항노화 효과(17)에 효능이 있는 것으로 보고되어 있다. 한편 하수오에는 anthraquinone 화합물인 chrysophanol, emodin, rhein, physcion 및 이들의 배당체인 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucopyranoside 및 2'-O-mongalloyl ester 등이 함유되어 있다(18). 하수오의 다양한 생리활성에도 불구하고 생으로 장기 섭취 시 부작용이 있어 검정콩 우린 물 혹은 막걸리 침지법에 의한 법제를 통하여 섭취를 하고 있다(12). 그러나 법제된 하수오의 항산화 성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 재배되어 법제된 하수오의 항산화 효과를 조사함으로써 법제 하수오 섭취를 통한 효과적인 천연 항산화제 이용 가능성 및 그 효율성을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료, 시약 및 세포주

법제 하수오는 2011년 경상남도 산청군 생초면에서 3년간 재배하여 수확한 하수오를 절단하고 증자 후 검정콩 우린 물과 막걸리 법제를 통하여 건조한 것을 산청군 지리산하수오영농조합법인에서 공급받아 사용하였다. 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside, emodin, chrysophanol 및 rhein은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS), 2-deoxyribose, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide(MTT) 및 dimethyl sulfoxide(DMSO) 역시 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였다. 산화적

스트레스를 유도하기 위해 사용한 sodium nitroprusside (SNP)는 Wako Co.(Tokyo, Japan)에서 구입하였고 pyrogallol 및 3-morpholinopyridone(SIN-1)은 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였다. 이외에 분석을 위한 시약은 필요에 따라 특급 혹은 1급을 구입하여 사용하였다. LLC-PK<sub>1</sub> procrine renal epithelial cell은 ATCC(Solon, OH, USA)에서 분양받았고 세포배양을 위한 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)과 fetal bovine serum (FBS)은 Invitrogen Co.(Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 추출물 제조

하수오로부터 생리활성물질 확인 및 생리활성 검정을 위한 추출 용매로는 식물로부터 다양한 생리활성물질 추출에 가장 보편적으로 사용되는 메탄올을 사용하였다. 건조 법제 하수오 20 g에 메탄올 400 mL를 가하여 320 rpm에서 12시간 추출하였고 동일한 과정을 3회 반복한 후 여과지(No. 2, Whatman, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 모은 후 여과액을 감압농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 50°C에서 감압농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 농축된 시료는 추출용매인 메탄올로 녹여 각각 10, 25 및 50 µg/mL 농도로 제조하여 라디칼 소거능 및 산화적 스트레스 개선 효과를 확인하였다.

### HPLC 분석

법제 하수오 메탄올 추출물의 생리활성물질 분석은 Liang 등(18)의 분석법을 변형하여 High Press Liquid Chromatogram(HPLC, Agilent 1200 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)으로 분석하였다. 건조 법제 하수오 1 g에 메탄올을 20 mL 가하여 320 rpm에서 12시간 추출한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. 분석 column은 Lichrophore 100 RP C18 column(4.6×250 mm, 5 µm, Merck & Co., Kenilworth, NJ, USA)을 사용하였고, 이동상 용매는 1.0% glacial acetic acid(solution A)와 100% acetonitrile(solution B)로 분석하였으며, 이동상 조건은 solvent B 기준으로 각각 20, 10, 10 및 10분 동안 10%, 20%, 25% 및 35%로 유지시켰다. 시료는 20 µL를 주입하였고 이동상의 속도는 30°C에서 1 mL/min으로 유지하였으며, 생리활성물질은 diode array UV detector(Agilent 1200 series, Agilent Co.)의 흡광도 280 nm에서 정량하였다.

### DPPH 라디칼 소거능 측정

1.5×10<sup>-4</sup> M DPPH 용액 0.8 mL와 각 농도별 추출물 0.2 mL를 가한 후 10초간 vortex 하고 실온에서 30분 방치한 후 분광광도계(Spectronic 2D, Thermo Electron Co., Marietta, OH, USA)를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측

정하였다(19). 음성 대조군은 시료 대신에 메탄올을 0.2 mL 취하여 실험하였고 양성 대조군은 L-ascorbic acid를 사용하였다.

**ABTS 라디칼 소거능 측정**

2.45 mM potassium persulfate(K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)와 7 mM ABTS 용액을 1:1로 혼합하고 실온의 어두운 곳에서 12~16시간 보관하여 ABTS 라디칼을 생성시켰다. ABTS 라디칼은 732 nm에서 흡광도가 0.7±0.02가 되도록 메탄올로 희석하여 사용하였다. 메탄올로 희석된 ABTS 용액 0.9 mL와 각 농도별 추출물 0.1 mL를 혼합하고 정확히 3분 후 분광광도계(Spectronic 2D)를 이용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다(19). 음성 대조군은 시료 대신에 메탄올을 0.1 mL 취하여 실험하였고 양성 대조군은 L-ascorbic acid를 사용하였다.

**Hydroxyl radical(·OH) 라디칼 소거능 측정**

Fenton 반응에 따라 10 mM FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O-EDTA에 10 mM의 2-dexyribose solution과 각 농도별 추출물을 혼합한 후 10 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 이 혼합액에 2.8% trichloroacetic acid와 1.0% thiobarbituric acid 용액을 각각 첨가하여 20분간 끓인 후 식혀 520 nm에서 흡광도를 측정하였다(2). 음성 대조군은 시료 대신에 메탄올을 사용하였고 양성 대조군은 L-ascorbic acid를 사용하였다.

**세포 배양**

LLC-PK<sub>1</sub> cell은 100 units/mL의 penicillin-streptomycin (PS)과 5% FBS가 함유된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 1~2일에 한 번 배양액을 바꾸어 주면서 배양하여 세포 분화가 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline으로 세포를 세척한 후 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액으로 부착된 세포를 분리한 뒤 원심분리 하여 세포를 모은 다음 세포를 재분산 후 계대배양 하면서 실험에 사용하였다(6).

**Cell viability 측정**

세포가 75% confluence 상태가 되면 96 well culture plate에 LLC-PK<sub>1</sub> cell을 1×10<sup>4</sup> cells/mL로 분주하여 2시간 배양한 후 산화적 스트레스 유발 물질인 250 μM pyrogallol, 500 μM SNP 및 1 mM SIN-1을 처리하여 24시간 배양하였다. 산화적 스트레스 유발 후 시료를 농도별로 처리하여 다시 24시간 배양한 뒤 5 mg/mL의 MTT solution을 각 well에 주입하여 37°C에서 4시간 동안 재배양한 후 생성된 formazan 결정을 빛을 차단한 상태에서 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(6).

**통계분석**

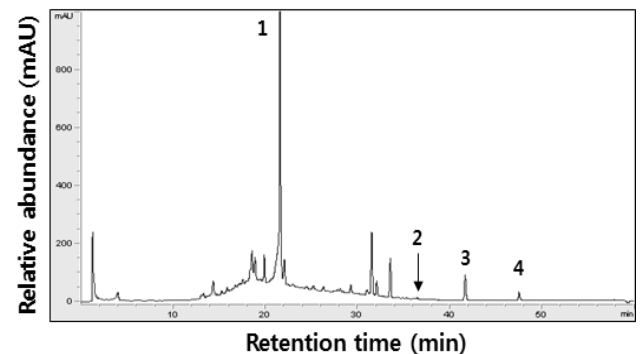
대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 평균±표준편차로 나타내었고 각 실험 결과로부터 ANOVA(analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 군의 평균 간의 유의성을 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**법제 하수오 추출물의 생리활성물질 확인**

법제 하수오 메탄올 추출물의 생리활성물질 분석 결과는 Fig. 1 및 Table 1과 같았다. HPLC 분석 결과 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside, emodin, chrysophanol 및 rhein이 확인되었으며(Fig. 1), 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside는 115.02 mg/kg으로 주 화합물로 확인되었고 그다음으로 emodin이 0.38 mg/kg, chrysophanol이 0.11 mg/kg, rhein이 0.03 mg/kg 순으로 확인되었다(Table 1).

Liang 등(18)은 중국산 법제 하수오로부터 catechin, 2, 3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside, emodin-8-O-β-D-glucopyranoside, physcion-8-O-β-D-glucopyranoside, emodin 및 physcion을 보고하였으며, 특히 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside와 emodin 함량이 비슷한 수준으로 확인되었으나 본 연구의 재배산(산청군) 법제 하수오의 경우 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside, emodin-8-O-β-

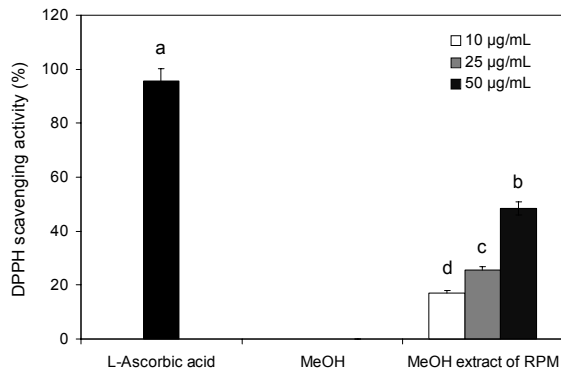


**Fig. 1.** Typical HPLC chromatograms of the MeOH extract from processed *Polygoni Multiflori Radix* (PPMR). 1, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside; 2, rhein; 3, emodin; 4, chrysophanol.

**Table 1.** Biological compound contents of the MeOH extract from processed *Polygoni Multiflori Radix*

| Compounds                                       | Contents (mg/kg)          |
|-------------------------------------------------|---------------------------|
| 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside | 115.02±3.60 <sup>1)</sup> |
| Emodin                                          | 0.38±0.02                 |
| Chrysophanol                                    | 0.11±0.01                 |
| Rhein                                           | 0.03±0.00                 |

<sup>1)</sup>Values are presented as the mean±SD of triplicate determinations.



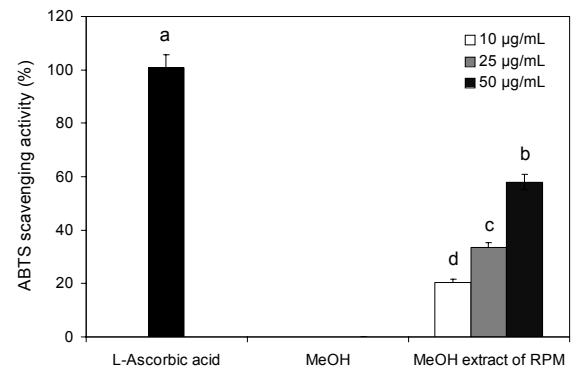
**Fig. 2.** DPPH radical scavenging activity of the MeOH extract from processed *Polygoni Multiflori Radix*. Means with the different letters (a-d) above the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

D-glucopyranoside가 약 90%를 차지하였다. 이러한 결과는 재배 환경(토양, 기후) 및 법제 처리과정 등의 차이에 기인하는 것으로 판단되었다. 한편 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O- $\beta$ -D-glucoside, emodin-8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside는 항염증 효과(20-22), 항산화 활성(23-26), 알츠하이머병 예방과 치료 효과(27,28), 자유 라디칼 소거 활성(29,30) 및 색소 침착을 유도하고 머리카락의 성장 효과(31-33) 등이 보고되어 있으며, emodin 역시 항산화 활성(34), 항염증 작용(35), 항균 활성(36) 및 항암 활성(37,38) 및 monoamine oxidase 억제 활성(15) 등의 여러 가지 유용한 활성을 지니고 있는 것으로 알려져 있어 기능성 식품 소재로서 잠재성이 높은 것으로 평가되고 있다(13,39).

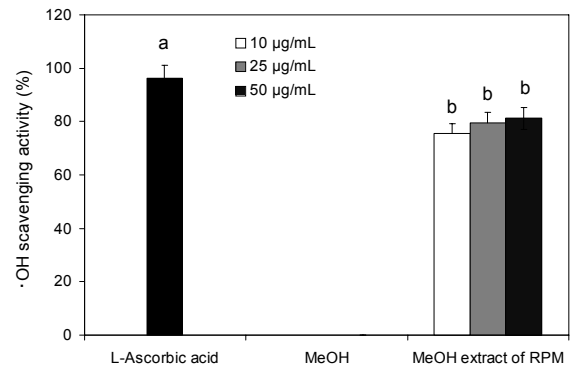
#### 법제 하수오 추출물의 라디칼 소거능

법제 하수오 메탄올 추출물의 DPPH, ABTS 및 hydroxyl 라디칼 소거능의 결과는 Fig. 2~4와 같았으며, 처리 농도가 증가할수록 라디칼 소거능은 증가하였다. 법제 하수오 메탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 처리 농도가 증가할수록 활성은 유의적으로 증가하였으며 50 µg/mL의 처리 농도에서 48.4%의 라디칼 소거능을 보였다(Fig. 2). Blois(40)에 의해 소개된 DPPH법은  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl 라디칼의 소거능을 이용한 것으로 가장 널리 이용되는 항산화 활성 측정 방법 중 하나이며,  $\alpha$ -토코페롤을 평가하기 위한 물질로 사용되었다. DPPH는 안정한 라디칼로 cysteine, glutathione과 같은 함유황 아미노산과 아스코르브산, 토코페롤, hydroquinone, phenylenediamine, aminophenol과 같은 aromatic amine 등에 의해서 환원되어 짙은 자색이 탈색되므로 수소 공여능 또는 유리기 소거작용을 특징하는 데 널리 이용되고 있다(41-43).

법제 하수오 메탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거능을 살펴본 결과 처리 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거능이 증가하였으며, 50 µg/mL 처리 시 57.9%의 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었다(Fig. 3). ABTS 라디칼 소거능은 potas-



**Fig. 3.** ABTS radical scavenging activity of the MeOH extract from processed *Polygoni Multiflori Radix*. Means with the different letters (a-d) above the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



**Fig. 4.** Hydroxyl ( $\cdot$ OH) radical scavenging activity of the MeOH extract from processed *Polygoni Multiflori Radix*. Means with the different letters (a,b) above the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

sium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 라디칼이 시료의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 점을 이용한 측정 방법으로 이 방법의 장점은 hydrogen-donating antioxidants와 chain breaking antioxidants 모두를 측정할 수 있고, aqueous phase와 organic phase 모두에 적용이 가능하다는 점에서 동일한 농도 처리 시 DPPH 라디칼 소거능보다 높은 활성을 나타내는 것으로 알려져 있어 본 연구에서도 동일 농도 처리 시 DPPH 라디칼 소거능보다는 ABTS 라디칼 소거능이 높게 나타났다(19,44).

법제 하수오 메탄올 추출물의 hydroxyl 라디칼에 대한 소거능을 측정한 결과 10 µg/mL의 낮은 농도에서 70% 이상의 라디칼 소거능을 보였으며 농도 의존적으로 hydroxyl 라디칼 소거능이 증가하여 우수한 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). Hydroxyl 라디칼은 활성산소종으로 ROS 중에서 가장 독성이 강하고 반응성이 높으며 지질산화와 많은 생리적 손상, 특히 DNA 변이를 일으켜 많은 질병의 원인이 된다. 또한 hydroxyl( $\cdot$ OH)은  $H_2O_2$ 로부터 Fenton 반응에 의해 생성되며 활성산소종인 ONOO $^-$ 의 분해에 의해 생성된다(2,7,10).

Kim(1)은 하수오 80% 메탄올 추출물의 경우 DPPH 라디칼 소거 활성은 63.0%였고, SOD 유사 활성은 19.8%로 보고하여 동일 농도에서 비교는 어렵지만 본 연구의 법제 하수오보다 높은 것으로 추정되었다. 이는 법제 하수오의 경우 주요 화합물인 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside 함량이 감소한다고 보고되어 있어(18) 항산화 활성 등의 생리활성은 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside와 관련 있을 것으로 추정되었다. 향후 하수오 및 법제 하수오의 주요 화합물 함량과 항산화 활성 등의 비교 실험이 이루어져야 할 것으로 판단되었다.

**법제 하수오 추출물의 산화적 스트레스 개선 효과**

Renal proximal tubule cell은 자유 라디칼에 매우 민감한 세포로, 특히 LLC-PK<sub>1</sub> pig renal tubular cell은 네프론에서 유도된 MDCK darby canine kidney epithelial cell보다 산화적 스트레스에 더욱 민감한 세포로 LLC-PK<sub>1</sub> 세포에 자유 라디칼 생성물질로 라디칼 생성을 유도하여 산화적 손상을 일으킨 후 이에 대한 개선 효과를 살펴봄으로써 시료의 산화적 스트레스 개선에 의한 항산화 효과를 살펴볼 수 있는 대표적인 세포 모델이다(2,45,46). 따라서 LLC-PK<sub>1</sub> cell에 pyrogallol, SNP 및 SIN-1을 처리하여 라디칼을 생성시킨 후 법제 하수오 메탄올 추출물을 농도별로 처리하여 산화적 스트레스 개선 효과를 살펴본 결과는 Table 2와 같았으며, 처리 농도가 증가할수록 산화적 스트레스 개선 효과는 증가하였다.

Pyrogallol은 페놀화합물이자 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 전구체로 수용액 상태일 때 빠른 자동산화과정을 통해 활성산소종인 O<sub>2</sub><sup>-</sup>를 생성하고 이렇게 생성된 ROS는 동맥경화 및 혈관 관련 여러 질환의 병리적 매개 물질로 작용하게 된다(6,7). Table 2는 pyrogallol을 처리한 LLC-PK<sub>1</sub> cell에 대한 하수오 메탄올 추출물의 보호 효과를 세포 생존율로 살펴본 결과이다. Pyrogallol만을 처리하여 O<sub>2</sub><sup>-</sup>가 유발된 control군의 경우 70.2%의 세포 생존율을 보인 반면 하수오 시료를 처리하였을 때 농도가 10, 25 및 50 μg/mL로 증가할수록 세포 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 50 μg/mL 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 보임으로 낮은 농도에서도 O<sub>2</sub><sup>-</sup>에 대한 세포 보호 효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다 (Table 2).

SNP는 nitrosodium ion을 함유해 가시광선에 노출될 때

NO를 생성하는 화합물로 이에 의해 생성된 NO는 인체에서 중요한 생리적 조절인자로 작용하지만 고농도의 NO는 반응성 산화물질로 전환되어 세포에 병적인 손상을 유발한다. NO가 세포 생존에 미치는 영향은 농도와 세포 종류에 따라 다르게 나타나는 것으로 알려져 있으며, 일반적으로 고농도에서는 세포 생존율에 해로운 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(2,7,47). 그리하여 RNS에 의한 산화적 스트레스 개선 효과를 살펴보기 위해 LLC-PK<sub>1</sub> 세포에 SNP 처리로 NO를 유발해 산화적 스트레스를 가한 후 이에 대한 하수오 추출물의 세포 보호 효과를 확인하였다. SNP만을 처리한 control군은 세포 생존율이 68.3%로 감소하여 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 확인할 수 있었고, 25 μg/mL 이상의 시료 처리군에서 80% 이상의 세포 생존율을 나타내어 낮은 농도에서도 NO에 대한 세포 보호 효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다(Table 2).

생체 내에서 NO와 O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 반응에 의해 생성되는 ONOO<sup>-</sup>는 자극을 받은 macrophage, 호중구, 내피세포에 의해 생성되고, 이는 pathogenic cellular damage와 organ dysfunction의 주요인으로 알려져 있다. ONOO<sup>-</sup>는 protein, 아미노산, DNA 등과 반응하여 세포 및 조직 손상을 야기할 뿐만 아니라 NO signalling을 저해하여 여러 만성질환 발생에 관여한다. SIN-1은 NO와 O<sub>2</sub><sup>-</sup>를 생성하고 이들은 급속히 반응하여 ONOO<sup>-</sup>를 형성하며 이는 강력한 cytotoxic oxidants로 분해되기 때문에 독성 효과를 나타내게 된다(2,7,10,48). LLC-PK<sub>1</sub> 세포에 SIN-1을 처리하여 ONOO<sup>-</sup>에 의한 산화적 스트레스를 유발시킨 후 이에 대한 김치의 보호 효과를 세포 생존율을 통해 살펴보았다(Table 2). SIN-1만을 처리한 control군은 60.4%로 세포 생존율이 낮아졌고 하수오 메탄올 추출물의 처리 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하는 양상을 나타냈다. 25 및 50 μg/mL 농도를 처리하였을 때 각각 72.5%와 77.6%의 세포 생존율을 나타내는 것을 확인하여 ONOO<sup>-</sup>에 대한 직접적인 소거능을 통해 산화적 스트레스 개선 효과를 보이는 것으로 사료된다(Table 2).

이상 국내산 법제 하수오 메탄올 추출물의 HPLC 분석 결과 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside, emodin, chrysophanol 및 rhein이 확인되었고 주 화합물은 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside로 약 90% 이상을 차지하였다. 추출물의 DPPH, ABTS

**Table 2.** Effect of the MeOH extract from processed *Polygoni Multiflori Radix* on the viability of LLC-PK<sub>1</sub> cells treated with pyrogallol, SNP, and SIN-1

| Compounds  | Cell viability (%)         |                       |                        |                       |                       |
|------------|----------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
|            | Normal                     | Control               | Treatment con. (μg/mL) |                       |                       |
|            |                            |                       | 10                     | 25                    | 50                    |
| Pyrogallol | 100.0±2.8 <sup>a1)2)</sup> | 69.4±3.2 <sup>c</sup> | 74.8±1.4 <sup>c</sup>  | 75.7±4.2 <sup>c</sup> | 82.1±1.9 <sup>b</sup> |
| SNP        | 100.0±1.8 <sup>a</sup>     | 68.3±2.2 <sup>d</sup> | 75.1±2.3 <sup>c</sup>  | 85.3±2.8 <sup>b</sup> | 89.1±3.1 <sup>b</sup> |
| SIN-1      | 100.0±2.2 <sup>a</sup>     | 60.4±3.5 <sup>c</sup> | 64.6±1.8 <sup>c</sup>  | 72.5±3.9 <sup>b</sup> | 77.6±2.4 <sup>b</sup> |

<sup>1)</sup>Values are presented as the mean±SD of triplicate determinations.

<sup>2)</sup>Means with the different letters within a row are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

및 hydroxyl 라디칼 소거능을 측정한 결과 50 µg/mL 처리 시에도 50% 수준의 항산화능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한 LLC-PK<sub>1</sub> 돼지 신장 상피세포에서 자유 라디칼에 의한 산화적 스트레스 개선 효과를 살펴본 결과 우수한 자유 라디칼 소거능을 확인하였다. 특히 pyrogallol 및 SNP를 처리한 경우 10 µg/mL의 낮은 농도에서도 약 70% 이상의 우수한 소거능을 보였으며 SIN-1을 처리한 경우 64% 이상의 소거능을 나타냈다. 법제 하수오의 라디칼 소거능과 LLC-PK<sub>1</sub> cell에서 산화적 스트레스 개선 효과를 보이는 주 화합물은 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside로 추정되었다.

## 요 약

본 연구에서는 국내산 법제 하수오 메탄올 추출물로부터 생리활성물질을 확인하였고, 추출물의 라디칼 소거능과 LLC-PK<sub>1</sub> cell을 이용한 산화적 스트레스 개선 효과를 살펴보았다. HPLC 분석 결과 4종의 생리활성물질인 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside, emodin, chrysophanol 및 rhein을 확인하였다. 특히 주요 화합물인 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside는 115.02 mg/kg이었다. 법제 하수오 추출물의 DPPH, ABTS, hydroxyl 라디칼 소거능은 농도 의존적으로 증가하였다. 추출물의 50 µg/mL 처리 시 DPPH 라디칼 소거능은 48.4%, ABTS 라디칼 소거능은 57.9% 및 hydroxyl 라디칼 소거능은 81.2%로 나타내었다. 한편 LLC-PK<sub>1</sub> cell에서 각각의 NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, 및 ONOO<sup>-</sup> 생성물질인 pyrogallol, sodium nitroprusside(SNP) 및 morpholinolonylamine(SIN-1) 처리에 의해 유도된 산화적 스트레스 상에서 세포 생존율은 감소하였다. 그러나 법제 하수오 메탄올 추출물은 농도 의존적으로 세포 독성을 저해하였다. 추출물의 50 µg/mL 처리 시 세포 생존율은 각각 82.1%(pyrogallol), 89.1%(SNP) 및 77.6%(SIN-1)였다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 농생명산업기술개발사업(과제번호: 314021-03-1)에 의해 이루어진 결과입니다.

## REFERENCES

- Kim IC. 2008. Antioxidative properties and whitening effects of the *Polygoni Multiflori Radix*, *Polygonati Rhizoma* and *Ephedrae Herba*. *J Korean Oil Chemists' Soc* 25: 533-538.
- Sin SM, Mok SY, Lee S, Cho KM, Cho EJ, Kim HY. 2011. Protective effect of bitter melon (*Momordica charantia*) against oxidative stress. *Cancer Prev Res* 16: 86-92.
- Oberley TD, Schultz JL, Li N, Oberley LW. 1995. Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Radic Biol Med* 19: 53-65.
- Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. 1995. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* 369: 131-135.
- Lim DG. 2004. Oxidative stress: reactive oxygen species and nitric oxide. *Korean J Crit Care Med* 19: 81-85.
- Kim HY, Lee YA, Cho EJ. 2012. Free radical scavenging effect and protective activity from oxidative stress of broccoli and sprouts. *CNU J Agric Sci* 39: 81-86.
- Choi JM, Choi MJ, Lee SL, Yamabe N, Lee S, Cho EJ. 2012. Protective effects of ethylacetate fraction from *Taraxacum coreanum* against peroxynitrite-induced oxidative damage under cellular system. *Cancer Prev Res* 17: 251-256.
- Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. 1997. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 43: 562-568.
- Nuttall SL, Kendall MJ, Martin U. 1999. Antioxidant therapy for the prevention of cardiovascular disease. *OJM* 92: 239-244.
- Kim HY, Hwang BR, Wu TT, Cho EJ. 2012. The protective effect of *Perilla frutescens* from ONOO<sup>-</sup>-induced oxidative stress and antiaging effect under cellular system. *CNU J Agric Sci* 39: 467-471.
- Kim HY, Sin SM, Lee S, Cho KM, Cho EJ. 2013. The butanol fraction of bitter melon (*Momordica charantia*) scavenges free radicals and attenuates oxidative stress. *Prev Nutr Food Sci* 18: 18-22.
- Bae SH, Kim DH, Bae YS, Lee KJ, Kim DW, Yoon JB, Hong JH, Kim SH. 2010. Toxic hepatitis associated with *Polygoni multiflori*. *Korean J Hepatol* 16: 182-186.
- Choi J, Lee H, Kim Y, Kim B, Kim I, Lee C. 2012. Effect of *Polygonum multiflorum* Thunberg extract on lipid metabolism in rats fed high-cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 957-962.
- Chiu PY, Mak DH, Poon MK, Ko KM. 2002. *In vivo* antioxidant action of a lignan-enriched extract of *Schisandra* fruit and an anthraquinone-containing extract of *Polygonum* root in comparison with schisandrin B and emodin. *Planta Med* 68: 951-956.
- Yim TK, Wu WK, Mak DH, Ko KM. 1998. Myocardial protective effect of an anthraquinone-containing extract of *Polygonum multiflorum* *ex vivo*. *Planta Med* 64: 607-611.
- Wang W, Cao CY, Wang DQ, Zhao DZ. 2006. Effect of prepared *Polygonum multiflorum* on striatum extracellular acetylcholine and choline in rats of intracerebral perfusion with sodium azide. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 31: 751-753.
- Xiao PG, Xing ST, Wang LW. 1993. Immunological aspects of Chinese medicinal plants as antiaging drugs. *J Ethnopharmacol* 38: 167-175.
- Liang Z, Chen H, Yu Z, Zhao Z. 2010. Comparison of raw and processed *Radix Polygoni Multiflori* (*Heshouwu*) by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Chin Med* 5: 29.
- Choi JS, Kim HY, Seo WT, Lee JH, Cho KM. 2012. Roasting enhances antioxidant effect of bitter melon (*Momordica charantia* L.) increasing in flavan-3-ol and phenolic acid contents. *Food Sci Biotechnol* 21: 19-26.
- Zhang YZ, Shen JF, Xu JY, Xiao JH, Wang JL. 2007. Inhibitory effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside on experimental inflammation and cyclooxygenase 2 activity. *J Asian Nat Prod Res* 9: 355-363.
- Wang X, Zhao L, Han T, Chen S, Wang J. 2008. Protective effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside, an active component of *Polygonum multiflorum* Thunb, on

- experimental colitis in mice. *Eur J Pharmacol* 578: 339-348.
22. Zeng C, Xiao JH, Chang MJ, Wang JL. 2011. Beneficial effects of THSG on acetic acid-induced experimental colitis: Involvement of upregulation of PPAR- $\gamma$  and inhibition of the Nf-Kb inflammatory pathway. *Molecules* 16: 8552-8568.
  23. Lv LS, Gu XH, Tang J, Ho CT, Tang J. 2006. Stilbene glycosides from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb and their *in vitro* antioxidant activities. *J Food Lipids* 13: 131-144.
  24. Lv LS, Gu XH, Tang J, Ho CT. 2007. Antioxidant activity of stilbene glycoside from *Polygonum multiflorum* Thunb *in vivo*. *Food Chem* 104: 1678-1681.
  25. Liu QL, Xiao JH, Ma R, Ban Y, Wang JL. 2007. Effect of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside on lipoprotein oxidation and proliferation of coronary arterial smooth cells. *J Asian Nat Prod Res* 9: 689-697.
  26. Chiang YC, Huang GH, Ho YL, Hsieh PC, Chung HP, Chou FI, Chang YS. 2011. Influence of gamma irradiation on microbial load and antioxidative characteristics of Polygoni Multiflori Radix. *Process Biochem* 46: 777-782.
  27. Um MY, Choi WH, Aan JY, Kim SR, Ha TY. 2006. Protective effect of *Polygonum multiflorum* Thunb on amyloid  $\beta$ -peptide 25-35 induced cognitive deficits in mice. *J Ethnopharmacol* 104: 144-148.
  28. Wang R, Tang Y, Feng B, Ye C, Fang L, Zhang L, Li L. 2007. Changes in hippocampal synapses and learning-memory abilities in age-increasing rats and effects of tetrahydroxystilbene glucoside in aged rats. *Neuroscience* 149: 739-746.
  29. Chen Y, Wang M, Rosen RT, Ho CT. 1999. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from *Polygonum multiflorum* Thunb. *J Agric Food Chem* 47: 2226-2228.
  30. Luo A, Fan Y, Luo A. 2011. *In vitro* free radicals scavenging activities of polysaccharide from *Polygonum multiflorum* Thunb. *J Med Plants Res* 5: 966-972.
  31. Guan S, Su W, Wang N, Li P, Wang Y. 2008. A potent tyrosinase activator from Radix Polygoni multiflori and its melanogenesis stimulatory effect in B16 melanoma cells. *Phytother Res* 22: 660-663.
  32. Jiang ZQ, Xu JM, Long MH, Tu ZM, Yang GX, He GY. 2009. 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside (THSG) induces melanogenesis in B16 cells by MAP kinase activation and tyrosinase upregulation. *Life Sci* 85: 345-350.
  33. Park HJ, Zhang N, Park DK. 2011. Topical application of *Polygonum multiflorum* extract induces hair growth of resting hair follicles through upregulating Shh and  $\beta$ -catenin expression in C57BL/6 mice. *J Ethnopharmacol* 135: 369-375.
  34. Yen GC, Chen HW, Duh PD. 1998. Extraction and identification of an antioxidative component from Jue Ming Zi (*Cassia tora* L.). *J Agric Food Chem* 46: 820-824.
  35. Chang CH, Lin CC, Yang JJ, Namba T, Hattori M. 1996. Anti-inflammatory effects of emodin from *Ventilago leio-carpa*. *Am J Chin Med* 24: 139-142.
  36. Hatano T, Uebayashi H, Ito H, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T. 1999. Phenolic constituents of cassia seeds and antibacterial effect of some naphthalenes and anthraquinones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 47: 1121-1127.
  37. Kuo YC, Sun CM, Ou JC, Tsai WJ. 1997. A tumor cell growth inhibitor from *Polygonum hypoleucum* Ohwi. *Life Sci* 61: 2335-2344.
  38. Chan TC, Chang CJ, Koonchanok NM, Geahlen RL. 1993. Selective inhibition of the growth of ras-transformed human bronchial epithelial cells by emodin, a protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 1152-1158.
  39. Shao L, Zhao SJ, Cui TB, Liu ZY, Zhao W. 2012. 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside biosynthesis by suspension cells cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb and production enhancement by methyl jasmonate and salicylic acid. *Molecules* 17: 2240-2247.
  40. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
  41. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T. 1989. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull* 37: 2016-2021.
  42. Koleva II, van Beek TA, Linssen JP, de Groot A, Evstatieva LN. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal* 13: 8-17.
  43. Lee YA, Kim HY, Cho EJ. 2005. Comparison of methanol extracts from vegetables on antioxidant effect under *in vitro* and cell system. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1151-1156.
  44. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
  45. Okuda M, Tsuda K, Masaki K, Hashimoto Y, Inui K. 1999. Cisplatin-induced toxicity in LLC-PK1 kidney epithelial cells: role of basolateral membrane transport. *Toxicol Lett* 106: 229-235.
  46. Yokozawa T, Satoh A, Cho EJ, Kashiwada Y, Ikeshiro Y. 2005. Protective role of Coptidis Rhizoma alkaloids against peroxynitrite-induced damage to renal tubular epithelial cells. *J Pharm Pharmacol* 57: 367-374.
  47. Cui FJ, Li TZ, Lee SJ, Park SJ, Lim Y, Kim KA, Chang BJ, Lee JH, Lee MH, Choe NH. 2006. The effects of airborne particulate matters on the alveolar macrophages for the iNOS expression and nitric oxide with nitrotyrosinated-proteins formation. *Tuberc Respir Dis* 60: 426-436.
  48. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288: 481-487.