

## 천마추출물의 항산화 및 항암 활성

허진철 · 박자영 · 안상미 · 이진만<sup>1</sup> · 윤치영<sup>2</sup> · 신흥묵<sup>3</sup> · 권택규<sup>4</sup> · 이상한<sup>†</sup>  
경북대학교 식품공학과, <sup>1</sup>경북과학대학, <sup>2</sup>대전대학교 생물학과, <sup>3</sup>동국대학교 한의대, <sup>4</sup>계명대학교 의과대학

### Anti-oxidant and Anti-tumor Activities of Crude Extracts by *Gastrodia elata* Blume

Jin-Chul Heo, Ja-Young Park, Sang-Mi An, Jin-Man Lee<sup>1</sup>, Chi-Young Yun<sup>2</sup>,  
Heung-Mook Shin<sup>3</sup>, Taeg-Kyu Kwon<sup>4</sup> and Sang-Han Lee<sup>†</sup>

Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Herbal BioFood Science, Kyongbuk College of Science, Chilgok 718-851, Korea

<sup>2</sup>Department of Biology, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

<sup>3</sup>College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyungju 780-714, Korea

<sup>4</sup>Department of Immunology, Keimyung University, Daegu 702-701, Korea

#### Abstract

*Gastrodia elata* Blume is a major important medicinal resource in Korea. In order to confirm the biological activities of *Gastrodia elata* Blume, we carried out various *in vitro* assays. Of them, anti-oxidant and anti-tumor activities were detected from assays. The prototype of *Gastrodia elata* Blume extracts was used for the evaluation of DPPH, FRAP, hydroxyl radical scavenging assay as anti-oxidant assays, as well as anti-tumor activities as wound assay and invasion assay. As a result, the prototype of *Gastrodia elata* Blume extracts showed potent anti-oxidative activity and anti-tumor activity *in vitro*. These above results suggest that the *Gastrodia elata* Blume extracts could have potential to alleviate oxidation process, cell motility activity, and tumorigenesis.

**Key words :** *Gastrodia elata* Blume, anti-oxidant, anti-tumor, *in vitro* assay, extracts.

#### 서 론

천마(*Gastrodia elata* Blume)는 난초목 난초과의 여러해살이풀로 뿌리는 없고 감자와 같은 괴경으로 되어있다. 줄기는 붉은 밤색이고 계란모양의 비늘잎이 드물게 붙어있으며, 줄기의 윗부분은 천마의 종류에 따라 노란색과 빨간색으로 꽃이 핀다. 표면은 윤상(輪狀)의 비늘조각이 늘어선 형태로 원기둥꼴로 곧추서며 황적색을 띤다. 보통 잎은 없고 비늘 조각 잎이 성기게 나며 하부의 것은 짧은 잎집을 형성한다. 지상부에 형성된 줄기의 색깔에 따라서 홍천마 및 청천마(*Gastrodia elata*) 그리고 녹천마(*Gastrodia gracilis*)로 구분되어지고, 괴경과 줄기는 약용으로 이용되고 있다.

한방에서 천마는 뇌신경쇠약증(brain nervous breakdown), 진통(pain), 두통(headache), 중풍(paralysis), 고혈압(hypertension) 등에 효과를 보이는 약재로 알려져 있는데, 신경을 튼튼하게 하며 피를 보하고 머리를 검게 한다는 말이 전해져 오고 있다. 또한 콩팥염(kidney inflammation), 당뇨병(glycosuria)등에도 사용된다.

천마는 한방에서 많이 이용되는 약재로 최근에 들어 가공 기술의 발달로 천마를 이용한 제품들이 출시되고 있다. 또한 이에 대한 연구도 급속한 진행을 보여, 재배방법, 성분 분석 등 많은 부분이 알려져 있다. 본 연구는 이러한 천마의 지속적인 연구과정의 일환으로 천마가 항산화제(antioxidant)로서의 활성과 암세포의 생육에 미치는 영향을 *in vitro* level에서 알아보려고 한다.

천마의 효능에 대한 연구는 이미 보고되고 있는 바와

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr,  
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

같이, amyloid  $\beta$ -peptide에 의한 neuroblastoma 세포주인 IMR-32의 세포사멸 과정 중에 천마 추출물이 이를 억제하는 것으로 나타났다(1). PC12 (rat pheochromocytoma) 세포주에서 apoptosis를 억제하며, serin/threonine kinase family인 ERK1/2, JNK1/2-p38 MAPKs의 phosphorylation과 dephosphorylation에 연관되어 있다고 보고되어 있다. 천마는 또한 경련을 억제하는 것으로도 알려져 있는데 천마의 성분인  $\gamma$ -aminobutyric acid는 간질성 발작에 효과가 있는 것으로 보고되었다(2). 천마 성분중의 일종인 p-hydroxybenzyl alcohol은 antioxidant gene의 발현을 통하여 focal ischemic brain 손상을 감소시키는 것으로 보고되었다(3). Rat brain을 이용한 *in vivo* 실험에서는 ROS (Reactive oxygen species) / RNS (Reactive nitrogen species)를 제거시켜 주기도 한다(4). 학습능력과 기억능력의 증가(5, 6)에도 효과가 있어서 총명탕의 주재료로 사용되기도 한다.

따라서 본 연구에서는 기능성 식품소재로서 천마의 항산화활성 및 항암 활성을 기능적으로 검증하기 위한 목적과 식품소재로서의 가능성을 확인하고자 본 실험을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

본 실험에 사용한 재료는 천마(*Gastrodia elata* Blume)는 2003년 3~4월에 대구 및 경북 일대의 농가에서 수확된 것(본 제품에 사용한 것은 K영농조합법인의 제품)을 직접 구매하여 원료로 사용하였다. 실험에 사용된 시약으로는 항산화 활성을 확인하기 위하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH; St. Louis, MO), ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ; St. Louis, MO) 등이 사용이 되었으며, 항암 효과를 확인하기 위하여 Matrigel (354234, Beckton Dickinson, San Jose), Invasion chamber (3401, Costar; NY) 등이 사용되었다.

### 천마 기능성 식품의 조제

생천마를 세척하여 절단한 후 100°C에서 40분간 증자한 것을 80°C에서 8시간 건조한 뒤 95°C에서 3.5시간 열수 추출하였다. 이 때 가수량은 18 mL/g로 하였으며, 추출 후 부직포로 여과하여 8,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 감압증발농축기를 이용하여 30 °brix가 될 때까지 농축하였다. 천마 농축액을 이용하여 여러 재료를 혼합한 후 천마음료를 제조하였으며 배합비는 아래 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of prototype with *Gastrodia elata* Blume extracts

Components	Content (%)	Components	Content (%)
<i>Gastrodia elata</i> Blume extracts (30brix)	12.0	Honey	7.0
<i>Schizandra chinensis</i> Bailon Ext.	3.0	Fructose syrup	3.0
<i>Paeoniae radix</i> Ext.	1.0	Caramel BA	0.3
<i>Glycyrrhizae radix</i> Ext.	2.0	Jamong extracts	0.01
Sodium citrate	0.02	Flavour for drinks	0.15
Citric acid	0.15	distilled water	71.332
Vitamin C	0.038	Total	100

### DPPH assay

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 자체가 매우 안정한 free radical로서 517nm에서 특징적인 흡광도를 나타내는 보라색 화합물이다. DPPH는 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다. DPPH를 methanol에 400  $\mu$ M의 농도로 녹인 다음 DPPH를 190  $\mu$ L 와 시료 10  $\mu$ L를 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성 비율 (% inhibition)은 다음과 같이 계산 (% inhibition =  $[A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}] \times 100$ )을 하였다.

### Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay

FRAP assay는 화합물의 환원력 (ferric reducing ability)을 측정하는 것이다. 3.6의 낮은 pH에서 ferric tripyridyltriazine (Fe<sup>III</sup>-TPTZ) 복합체가 환원제 (antioxidant)에 의해서 파란색의 ferrous tripyridyltriazine (Fe<sup>II</sup>-TPTZ) 복합체로 될 때 흡광도를 측정하여 검색하고자 하는 화합물에 대한 환원력 (ferric reducing ability)를 보는 것이다. C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> × 3H<sub>2</sub>O와 acetic acid (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)를 이용하여 acetate buffer (pH 3.6, 300 mM)를 만든다. 이후 HCl과 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine)를 이용하여 TPTZ solution을 만들었다. 실험을 위한 반응액으로는 acetate buffer (pH 3.6, 300 mM) : 10 mM의 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) : 20 mM의 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 10 : 1 : 1의 비율로 섞어 실험직전에 만들어 사용을 하였다. 반응액 (190  $\mu$ L)와 추출물 (10  $\mu$ L)을 혼합한 후 20분 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원력은 상대비교를 하였으며, 재료별 활성정도는 20분 후의 값을 기준으로 하였다.

### Wound healing assay

Wound healing은 세포의 운동성을 확인하는 것으로 attach cell인 B16F1 cell을 plate에 spreading한 다음 CO<sub>2</sub>

incubator에서 2 h 배양한다. 이후 tip을 이용하여 약 1 mm의 wound를 만든 다음 배양액을 교환 한다. 시료를 처리한 다음 37°C 5 % CO<sub>2</sub> incubator에서 36 h 배양 후 healing 정도를 현미경을 통하여 관찰 하였다.

**Hydroxy radical scavenging activities**

Fe<sup>2+</sup>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 반응하는 Fenton's reaction에 의해 생성되어진 hydroxyl radical이 2-deoxyribose를 산화시켜 malondialdehyde (MDA)로 분해시킨다. 이때 MDA를 530nm에서 측정된 hydroxyl radical을 확인하여 반응정도를 확인하고자 하였다.

50 mM의 FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 µl 와 50 mM의 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 10 µl을 각각 넣는다. 그리고 증류수에 녹인 50 mM 2-deoxyribose 20 µl, 0.2 ng/µl 화합물을 20 µl 첨가한 후 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) 120 µl, 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 µl 넣고 37°C에서 4시간 동안 배양하고 2.8 % trichloroacetic acid 100 µl 그리고 50 mM NaOH에 녹인 1 % TBA (2-thiobarbituric acid) 100 µl 를 반응물에 첨가하였다. 그 후 시료액을 혼합하고 100°C에서 15분 동안 가열시켰고, 얼음 속에서 급속히 냉각하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성 정도는 다음 식을 이용 하였다.

$$\text{Hydroxy radical scavenging activities (\%)} = 1 - \left( \frac{\text{시료첨가구의흡광도}}{\text{시료무첨가구의흡광도}} \right) \times 100$$

**Invasion assay**

천마 추출액이 항암 활성을 지니는지를 invasion assay로 활성 여부를 관찰하였다. Matrigel (BD Biosciences)을 invasion chamber에 coating 후 gel이 굳으면 chamber의 아랫 부분에 fibronectin을 coating하였다. RPMI 1640 (FBS free)을 넣은 후 37 °C에서 2 h 배양 후 B16F1을 1×10<sup>5</sup> cells/well의 수로 넣은 다음 5% CO<sub>2</sub>의 환경에서 37 °C에서 2 h 배양 후 천마를 처리한 다음 동일 조건에서 24 h 배양을 하였다. Methanol을 이용하여 고정한 다음 hematoxilin을 이용하여 세포를 염색하였다. 이후 현미경을 이용하여 invasion 정도를 세포의 수를 세어 확인하였다.

**결과 및 고찰**

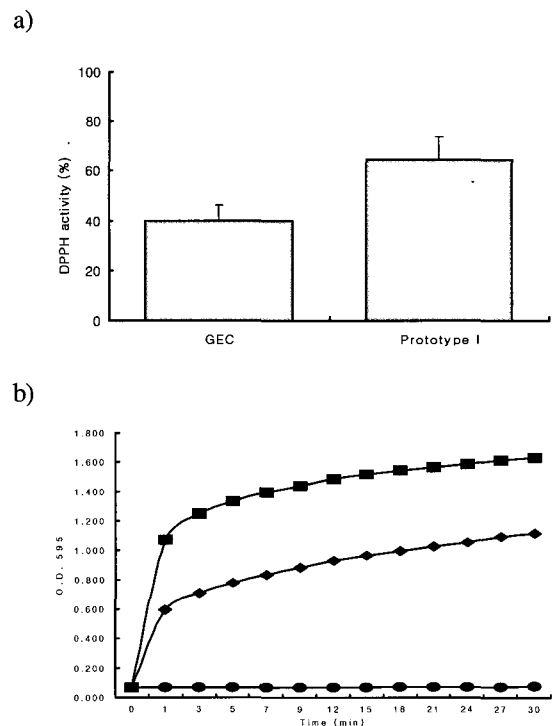
**Antioxidant activity**

산화물은 체내에서 산화스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있는데 여기에 대표적인 일례가 노화로 알려져 있다. 또한 산화물 중 활성산소는 인체에 매우 독성이 강한 물질로 생성과 동시에 superoxide의 저해물질인 superoxide

dismutase (SOD)에 의해서 독성이 사라지는 것으로 알려져 있다. 하지만 아주 적은 양의 활성 산소는 세포에 치명적인 영향을 미칠 수 있으며 이는 각종 질병으로 표출된다. 최근 에 이에 대한 보완된 형태로 SOD의 기능을 가지는 식·음료를 이용해 보충을 하는 기능성 식품이 많이 보고되어 있으며, 시장 또한 많이 커지고 있다. 이에 본 연구에서도 천마의 항산화 효과를 확인해 보았다.

DPPH, FRAP, Hydroxy radical을 이용하여 항산화 활성과 free radical 소거능을 측정하였다. DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl)는 짙은 자주색을 나타내며 그 자체가 질소 중심의 radical로서, radical 전자의 비 편재화에 의해 안정화된 상태로 존재한다. 실험 방법 또한 어렵지 않아 항산화와 관련한 실험에 많이 이용이 되고 있다. 기존에 알려진 항산화제인 Trolox, BHA, BHT를 표준시료로 하여 항산화 활성을 비교하였다. 실험 결과 천마가 들어있는 실험군인 천마 농축액, 제품에서 활성이 고르게 높게 나타났다. 표준 시료와 비교한 천마의 항산화 활성 능력은 상당히 높은 활성을 보여 주었다. 다만 시제품을 농도별로 여러 가지 제조 하였는데 농도에 따라 활성이 다소 낮게 나타났다. 이는 제조상에서 천마의 농도와 관련이 있는 것으로 보이며, 또한 각종 첨가물에 의한 영향 또한 있는 것으로 사료된다.

FRAP 활성의 경우 천마농축액에서 가장 활성이 높게



**Fig. 1.** Effect of the *Gastrodia elata* Blume on radical DPPH and FRAP radical scavenging assay. The radical scavenging activity was expressed by the remaining percentage of no treatment by DPPH assay (a), and time-dependent antioxidant activity by FRAP assay (b). (◆, GEC; ■, Prototypyr I; ●, No treated).

나왔다. 상대적으로 BHA 등의 control 보다 그 활성이 높게 관찰되는 것으로 보아서 항산화활성이 매우 뛰어나다고 판단된다.

Hydroxy radical 활성의 경우도 DPPH나 FRAP assay와 유사한 활성을 보였으며, control로 사용한 Trolox, BHA, BHT 보다는 전반적으로 활성이 낮게 나왔다.

항산화 활성을 측정하기 위해서 대표적으로 알려진 DPPH, FRAP, hydroxy radical 활성을 비교한 결과 실험 방법에 따라 활성 품목이 다소 차이를 보였다. 천마의 항산화 활성은 이전에 많은 보고가 있었다. DPPH, superoxide, hydroxy radical 소거에 강력하게 작용하는 것으로 보고되고 있으며(8), *in vitro*, *in vivo*에서 항산화제로서 탁월한 효과를 나타내고 있다(9). 항산화와 관련된 본 실험에서는 이전의 천마를 이용한 결과와 마찬가지로 항산화에 상당히 높은 활성을 보여 주었다.

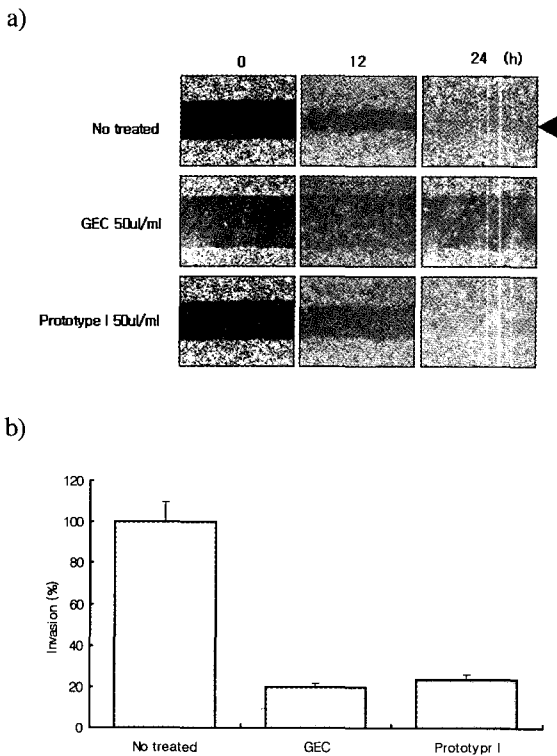


Fig. 2. Effect of the *Gastrodia elata* Blume inhibited cell migration activity. Data shows the wound healing (arrow head) activity (a), and cell migration rate in a matri-gel chamber (b).

#### B16 세포에 의한 *in vitro* antitumor activity

전이 암의 확산을 유도하는 암세포의 특징으로서 전이의 가장 중요한 요소로서 암세포의 운동성을 들 수 있다. 운동성은 세포의 형태가 바뀌면서 일정한 방향성과 함께 관찰을 할 수 있다. 암세포에서 천마에 의한 세포의 운동성을 확인하기 위하여 wound healing assay와 invasion assay를 실시하였다. Wound healing assay의 경우 시간에 따른

healing 정도를 확인한 결과 천마농축액에서 세포의 운동성이 많이 억제되는 것으로 나타났다. healing에 대한 정도의 차이는 있지만 실험군 대부분에서 세포의 운동성이 억제되는 것을 알 수 있었다. 특히 일부제품군에서는 세포의 손상을 다소 발견할 수 있었는데 이는 천마 이외에 다른 첨가물에 의한 것으로 사료 된다. Invasion assay에서의 wound assay의 결과와 마찬가지로의 결과를 얻었다.

세포의 운동성은 암에 있어 전이와 깊은 관련을 가지며, 국지적으로 암의 확장과도 밀접한 관련을 가지고 있다. 천마와 관련한 세포의 운동성은 아직 보고된 바 없지만 천연물을 이용하여 세포의 운동성을 억제하는 보고는 많이 있으며, 또한 이들 중 일부는 민간에서 항암 치료에 이용되고 있다. *Wisteria gall*의 추출물을 이용하여 세포의 운동성을 확인한 실험에서 이러한 운동성이 Rho family 단백질의 활성과 CD44 단백질의 활성을 저해하여 세포의 운동성을 억제한다고 보고하였다(10). 세포의 운동성과 관련하여서 현상적으로 천마가 세포의 운동성을 억제하는 것으로 보아 보다 많은 세포내 신호전달 체계에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

## 요 약

한의학에서 천마는 여러 치료의 목적으로 사용이 되는 한약재이다. 본 연구는 천마의 항산화활성과 항암 효과를 검증하기 위하여 실시하였다. 천마와 이를 이용한 식음료를 이용하여 항산화활성과 암세포를 이용한 세포의 운동성을 측정하였다. 항산화활성의 경우 DPPH, FRAP, Hydroxyl radical assay를 실시하였으며, 항암효과를 확인하기 위하여 wound / invasion assay를 실시하였다. 실험 결과 천마의 항산화 활성은 매우 뛰어난 것으로 나타났으며, 특히 DPPH / FRAP 실험에서 높은 활성을 보여주었다. 항암효과로 세포의 운동성을 확인한 결과 천마와 제품군 모두에서 세포의 운동성을 억제하는 효과가 매우 높은 것으로 나타났다. 천마는 항산화 효과와 함께 암세포의 운동성을 억제하는 항암 효과를 가지는 것으로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업과제 (HMP-B050042)의 연구지원으로 수행된 결과의 일부입니다.

## 참고문헌

- Kim, H.J., Moon, K.D., Lee, D.S. and Lee, S.H. (2003) Ethyl ether fraction of *Gastrodia elata* Blume protects

- amyloid  $\beta$ -peptide induced cell death. *J. Ethnopharmacol.*, 84, 95-98
2. An, S.J., Park, S.K., Hwang, I.K., Choi, S.Y., Kim, S.K., Kwon, O.S., Jung, S.J., Baek, N.I., Lee, H.Y., Won, M.H. and Kang, T.C. (2003) Gastrodin decreases immunoreactivities of  $\beta$ -aminobutyric acid shunt enzymes in the hippocampus of seizure-sensitive gerbils. *J. Neurosci. Res.*, 71, 534 - 543
  3. Yu, S.J., Kim, J.R., Lee, C.K., Han, J.E., Lee, J.H., Kim, H.S., Hong, J.H., and Kang, S.G. (2005) *Gastrodia elata* blume and an active component, p-hydroxybenzyl alcohol reduce focal ischemic brain injury through antioxidant related gene expressions. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 1016-1020
  4. Mori, A., Yokoi, I., Noda, Y. and Willmore, L.J. (2004) Natural antioxidants may prevent posttraumatic epilepsy: a proposal based on experimental animal studies. *Acta. Med. Okayama.*, 58, 111-118
  5. Niu, Q., Niu, P. and He, S. (2004) Effect of *Gastrodia elata* on learning and memory impairment induced by aluminum in rats. *Wei Sheng Yan Jiu*, 33, 45-48
  6. Hu, J.F., Li, G.Z. and Li, M.J. (2003) Protective effect of *Gastrodia elata* and E-gelatin on lead-induced damage to the structure and function of rat hippocampus. *Zhonghua. Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, 21, 124-127
  7. Huang, N.K., Lin, Y.L., Cheng, J.J. and Lai, W.L. (2004) *Gastrodia elata* prevents rat pheochromocytoma cells from serum-deprived apoptosis: the role of the MAPK family. *Life Sci.*, 75, 1649-1657
  8. Liu, J. and Mori, A. (1993) Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA. *Neuropharmacol.*, 32, 659-669
  9. Liu, J. and Mori, A. (1992) Antioxidant and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata* Bl. and *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks. *Neuropharmacol.*, 31, 1287-1298
  10. Heo, J.C., Park, J.Y., Lee, J.M., Kwon, T.K., Kim, S.U., Chung, S.K. and Lee, S.H. (2005) *Wisteria floribunda* gall extract inhibits cell migration in mouse B16F1 melanoma cells by regulating CD44 expression and GTP-RhoA activity. *J. Ethnopharmacol.*, 102, 10-14
  11. Xiao, Y.Q., Li, L. and You, X.L. (2002) Studies on chemical constituents of effective part of *Gastrodia elata*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 27, 35-36

---

(접수 2005년 11월 2일, 채택 2006년 1월 27일)