추출조건에 따른 마늘 추출물의 항산화 및 항암활성 효과

김혜자[1] · 한중호[1] · 김난영[1] · 이은경[2] · 이기남[1,3] · 조화은[1] · 최윤희[1] · 정명수[2,3]*

1 : 원광대학교 한의학전문대학원, 2 : 원광대학교 한의과대학, 3 : 원광대학교 한국전통의학연구소

Effect of Garlic Extracts with Extraction Conditions on Antioxidant and Anticancer Activity

Hae Ja Kim[1], Choong Ho Han[1], Nan Young Kim[1], Eun Kyoung Lee[2], Ki Nam Lee[1,3], Hwa Eun Cho[1], Yun Hee Choi[1], Myong Soo Chong[2,3]*

1 : Professional Graduate School of Oriental Medicine, 2 : College of Oriental Medicine, 3 : Research Center of Korean Traditional Medicine, Wonkwang University

The purpose of this study was to investigate the effect of garlic(Allium sativum L.) extracts with extraction conditions on antioxidant and anticancer activity. The extracts prepared for garlic by hot temperature extraction (HG), low temperature extraction (LG), UMPM extraction (UG), fermentation (FG) and black garlic hot temperature (BG) method. Content of total polyphenol compound was the BG higher than other extracts. The EDA (electron donating ability) and SOD-like activity was increased in dose-dependent manners, and the activity of BG and UM was significantly higher than LG and FG. We examined cytotoxicity, nitric oxide production of Raw 264.7 cell and inhibition of HT 1080 cell by MTT assay. All extracts does not have any toxic effects in macrophages(Raw 264.7). And UG inhibited the production of nitrite in Raw 264.7 cells activated with LPS. The antitumor effects of LG and UG on HT 1080 cell was indicated a significantly inhibition activity. These results suggested that UG (UMPM extraction of garlic) have activities of antioxidant, anticancer effects.

Key words : garlic, allium sativum L., antioxidant, anticancer, Raw 264.7 cell, HT 1080 cell

서 론

우리나라의 식생활양상과 질병발생 유형 및 사망원인은 국민 소득의 향상으로 크게 변화하였다. 즉, 1인당 동물성 식품 섭취량은 현저히 늘었고, 식생활의 서구화 및 외식의 증가에 따라 지방과 가공식품의 섭취도 현저히 증가하여 최근에는 암, 뇌혈관 질환, 심장질환 등이 주된 사망원인으로 보고되고 있다[1,2]. 이에 따라 최근 자연식품 중에서 기능성 물질을 섭취하려는 요구의 증가와 함께 천연 항산화물질과 같은 생리활성물질의 개발에 노력하고 있으며[3], 특히 질병의 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물로 마늘이 주목받고 있다.

마늘(Allium sativum L.)은 백합과(Lilliaceae)에 속하는 다년초 식물이며, 대표적인 Allium속 식물로, 한의학에서는 마늘을 大蒜으로 불리우며, 性은 溫, 有毒하며, 味는 辛한 특징을 가지고 있으며, 風을 쫓고 久食이면 血을 맑게 하고 머리털이 早白한다고 하였다[4].

본초학적인 효능으로는 通達走竅, 祛寒濕, 闢邪惡, 散癰腫, 化積聚, 暖脾胃, 行諸氣 등의 효능을 가지고 있다[5]. 마늘은 식품의 맛을 증진시킬 뿐만 아니라 보존 능력이 있으며, 식중독균과 같은 균의 증식을 억제하는 항균작용[6-8], 고혈압 예방 및 혈압강하 효과[9-11], 항암 효과[12-15], 간 보호 및 간 질환 치료효과[16,17]등이 알려져 있으며, 그 작용기전이 규명되고 있다. 이러한 생리적 활성으로 인해 기능성 소재로 광범위하게 이용되고 있다. 마늘의 유효 성분은 alliin, 즉 결정성 아미노산인 S-allyl-L-cysteine sulfoxide라고 알려져 있으며, 마늘 특유의 휘발성 향기성분은 마늘 조직이 파괴될 때 자체효소인 allinase에 의하여 alliin이 분해되어 생성된 allicin이 다시 diallyl thiosulfinate와 diallyl disulphide 및 저급의 sulphide류로 분해되어 발생된다고 보고되었지만[18] 이러한 연구는 생마늘을 대상으로 대부분 연구 되어졌

* 교신저자 : 정명수, 익산시 신용동 원광대학교 한의과대학 예방의학교실
· E-mail : neurokid@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6912
· 접수 : 2009/11/13 · 수정 : 2009/12/10 · 채택 : 2009/12/30

으며, 열처리 마늘에서는 효능이 감소되거나 소멸하는 것으로 알려져 있어 연구가 미비한 것이 실정이다. 따라서 다양한 추출조건으로 가공하였을 때 기능성의 변화 및 효능 비교 등은 아직도 연구되어야 할 부분이다.

이에 본 연구에서는 추출조건에 따른 마늘 추출물에 대한 in vitro 실험에서 항산화 활성 및 대식세포(Raw 264.7 cell)에서의 세포독성, NO 생성능에 의한 항염증 활성, 인간유래 섬유성육종 암세포(HT 1080 cell)에서의 암세포 억제능에 미치는 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 마늘(Allium sativum L.)은 경남 남해에서 2008년 봄에 생산된 것을 사용하였고, 실험대조군으로 사용한 흑마늘은 경남 밀양 삼랑진 농협에서 구입하여 사용하였다. 또한 발효에 사용한 유산균(Lactobacillus plantarum 3108)은 한국생명공학연구원에서 분양받아 사용하였다.

2. 추출물의 제조

본 실험에 사용된 마늘은 믹서를 이용하여 분쇄 후 추출에 사용하였다. 마늘 고온추출물(Garlic of hot temp. water extract; HG)은 10배의 물을 가하여 환류냉각기를 이용하여 90℃에서 3시간 가열 추출하였으며, 마늘 저온추출물(Garlic of low temp. water extract; LG)은 10배의 물을 가하여 shaking water bath를 이용하여 25℃에서 3시간 추출하였다. 마늘 UMPM추출물(Garlic of UMPM extract; UG)은 UMPM추출기(MEDIPS, UMEX, Korea)를 이용하여 10배의 물을 가하여 60℃에서 3시간 동안 ultra sonicwaves, micro waves 등으로 저온 추출하였으며, 마늘 발효추출물(Garlic of fermented extract; FG)은 마늘을 30초간 3회 UV(365 nm)로 처리한 뒤 분쇄 후 1배수의 멸균수를 가하여 유산균 전배양액을 2% 접종하여 37℃에서 48시간 발효 후 10배의 물을 가하여 shaking water bath를 이용하여 60℃에서 3시간 추출하였다. 또한, 흑마늘 고온추출물(Black garlic of hot temp. water extract; BG)은 10배의 물을 가하여 환류냉각기를 이용하여 90℃에서 3시간 가열 추출하였다. 실험에 사용된 추출물은 추출 후 여과하여 감압 농축하였으며 모든 시료는 동결건조 후 -20℃이하의 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

3. 총 폴리페놀 화합물 함량 측정

총 폴리페놀 화합물 함량은 Folin-Denis법[19]을 응용하여 측정하였다. 즉, 각 추출물 시료를 증류수를 이용해 10 ㎍/㎖ 농도로 희석하여 2 N Folin 시약 200 ㎕를 첨가하고 잘 혼합하여 3분간 방치하였다. 여기에 10% Na_2CO_3 2 ㎖를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 방치한 후 ELISA(Bio-Tek Instruments Inc, USA)를 이용하여 725 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

4. 전자 공여능 측정

전자공여능 측정은 Blois 법20)에 준하여 각 추출물의 DPPH(α-α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl radicals)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 일정 농도의 시료에 4.0×10^{-4} M DPPH 용액 150 ㎕를 가하고, 혼합하여 실온에서 반응시켰다. 이 반응액을 525 ㎚에서 흡광도를 측정하였으며, 전자공여 효과는 시료 첨가 전 · 후의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

5. SOD 유사활성 측정

SOD 유사활성측정은 SOD assay kit(Dojindo Molecular Technologies, Inc., USA)를 이용하여 superoxide anion radical(O_2^-)의 소거 활성율을 측정하였다. 동결건조한 각 시료를 증류수에 농도별로 희석한 후 450 ㎚에서 흡광도를 측정하여 kit의 계산법에 따라 활성율을 측정하였다.

6. Nitric Oxide(NO) 농도의 측정

NO(Nitric Oxide) 생성 유도 효과 측정은 Lee 등[21]의 방법을 응용하여 측정하였다. 즉, 대식세포주인 Raw 264.7 세포로부터 일산화질소(nitric oxide NO) 생산의 지표로서 배양 상층액 내에 안정된 NO 산화물인 NO_2^-를 Griess 반응으로 측정하여 540 ㎚에서 측정한 후 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

7. MTT 분석

세포독성 및 암세포 증식억제 효과 측정은 Lee 등[21]의 방법을 응용하여 측정하였다. 즉, 대식세포주인 Raw264.7 세포에 대한 세포독성과 섬유성육종암세포인 HT 1080 세포에 대한 증식억제효과를 보기 위해 MTT 분석법으로 측정했다. HT 1080 세포와 Raw 264.7 세포 각각 RPMI-1640 배지를 이용 1×10^7cell/㎖의 밀도로 현탁하여 24 well plate에 500 ㎕씩 분주한 후 3시간 incubation 하였으며, 각각의 농도로 희석한 추출시료 5 ㎕ 넣어 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 MTT 용액을 각 plate에 20 ㎕첨가하고 다시 2시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 종료 후 MTT-formazan 생성물은 DMSO를 이용하여 용해하여 570 ㎚에 흡광도를 측정하였다.

8. 통계처리

모든 자료의 통계분석은 SPSS program을 이용하여 일원 배치 분산 분석(one-way ANOVA)으로 검정하여 평균±표준오차로 나타내었으며, 유의성 검정은 Duncan's multiple range test에 따라 $p<0.05$ 수준에서 검정하였다.

결 과

1. 총 폴리페놀 화합물 함량

추출조건에 따른 각각의 마늘 추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량을 측정한 결과, 고온추출물(HG)은 24.80 ㎍/㎖로 유의적으로 가장 낮은 함량을 보였으며, UMPM추출물(UG)은 34.33 ㎍/㎖, 저온추출물(LG)과 발효추출물(FG)은 각각 36.76, 40.73 ㎍/㎖

로 나타났다. 한편 흑마늘추출물(BG)은 171.07 ㎍/㎖로 유의적으로 가장 높은 함량을 보였다(Table 1).

Table 1. Content of total polyphenolic compounds in garlic extracts with extraction conditions (㎍/㎖)

Garlic extracts	Total polyphenolic compounds
HG	24.80 ± 0.26[a]
LG	36.76 ± 0.62[bc]
UG	34.33 ± 0.75[b]
FG	40.73 ± 0.67[c]
BG	171.07 ± 2.80[d]

Values are mean ± SE of triplicate determinations. Means with different superscripts within a table are significant different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. HG : Garlic of Hot temp. water extract, LG : Garlic of Low temp. water extract, UG : Garlic of UMPM extract, FG : Garlic of Fermentation extract, BG : Black garlic of Hot temp. water extract

2. 전자공여능

추출조건에 따른 각각의 마늘 추출물의 전자공여능(Electron donating ablility, EDA)은 1, 5, 10, 20 ㎎/㎖ 농도에서 측정한 결과, 1 ㎎/㎖의 농도에서 저온추출물(LG)은 가장 낮은 1.40%의 활성을 보였으며, UMPM추출물(UG) 2.75%, 발효추출물(FG) 3.98%, 열수추출물(HG) 5.64%이었으며 흑마늘추출물(BG)은 28.71%로 유의적으로 높게 나타났다. 5 ㎎/㎖의 농도에서는 1 ㎎/㎖ 농도와 마찬가지로 LG가 가장 낮은 2.95%로 나타났으며 BG는 90.27%의 높은 활성을 보였다. 한편, 10 ㎎/㎖의 농도에서는 LG 9.70%로 가장 낮은 활성을 보였으며, FG 12.75%, UG 14.79% 및 HG 20.06%의 순으로 나타났으며 BG에서 가장 높은 91.09%의 활성을 보였다. 20 ㎎/㎖농도에서 BG가 91.03%로 가장 높았으며 HW 35.42%, UG 29.95%, FG 25.36% 및 LG 20.30 %로 각 군간 유의적인 차이를 보였다(Table 2).

Table 2. Electron donating ability in garlic extracts with extraction conditions (%)

Conc. (㎎/㎖)	1	5	10	20
HG	5.64 ± 0.36[d]	12.03 ± 0.76[b]	20.06 ± 0.12[c]	35.42 ± 0.45[d]
LG	1.40 ± 0.27[a]	2.95 ± 0.47[a]	9.70 ± 2.54[a]	20.30 ± 0.02[a]
UG	2.75 ± 0.22[b]	7.80 ± 0.23[b]	14.79 ± 0.37[b]	29.95 ± 0.26[c]
FG	3.98 ± 0.16[c]	8.43 ± 2.73[b]	12.75 ± 0.54[ab]	25.36 ± 0.75[b]
BG	28.71 ± 0.42[e]	90.27 ± 0.15[c]	91.09 ± 0.43[d]	91.03 ± 2.00[e]

Values are mean ± SE of triplicate determinations. Means with different superscripts within a table are significant different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. Abbreviated words of experimental groups are same as table 1.

3. SOD 유사활성능

추출조건에 따른 각각의 마늘 추출물의 SOD 유사활성능을 측정한 결과, 각 추출물은 모든 농도에서 SOD 유사활성능이 있었으며, 농도에 비례하여 높게 나타났다. 즉, 1 ㎎/㎖의 농도에서 고온추출물(HG) 21.74%, UMPM추출물(UG) 24.08%, 흑마늘추출물(BG) 30.38%, 발효추출물(FG) 33.04%의 순으로 나타났으며 저온추출물(LG)은 40.19%로 가장 높게 나타났다. 5 ㎎/㎖ 농도에서 HG는 23.50%, FG 43.73%인 반면, UG, BG 및 LG는 각각 60.69, 61.93 및 66.76%로 유의한 수준을 보였으며, 10 ㎎/㎖ 농도에서 역시 HG는 22.62%로 가장 낮게 나타났으며 BG, LG 및 UG에서 각각 70.64, 78.70 및 80.60%의 순으로 높게 나타났다. 한편 20 ㎎/㎖ 농도에서는 HG를 제외한 모든 추출물에서 높은 활성을 보였으며 그 중 UG의 경우 91.80%로 유의적으로 가장 높은 활성을 보였다(Table 3).

Table 3. Superoxide dismutase(SOD) like activity of garlic extracts with extraction conditions (%)

conc.(㎎/㎖)	1	5	10	20
HG	21.74 ± 4.02[a]	23.50 ± 1.39[a]	22.62 ± 6.08[a]	28.99 ± 7.17[a]
LG	40.19 ± 1.10[c]	66.76 ± 1.17[c]	78.70 ± 2.56[c]	86.38 ± 2.20[c]
UG	24.08 ± 2.27[a]	60.69 ± 6.22[c]	80.60 ± 4.47[c]	91.80 ± 1.46[c]
FG	33.05 ± 3.28[ab]	43.73 ± 0.64[b]	57.49 ± 1.22[b]	67.42 ± 4.32[b]
BG	30.38 ± 5.49[ab]	61.93 ± 1.17[c]	70.64 ± 3.73[bc]	78.62 ± 1.02[bc]

Values are mean ± SE of triplicate determinations. Means with different superscripts within a table are significant different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. Abbreviated words of experimental groups are same as table 1.

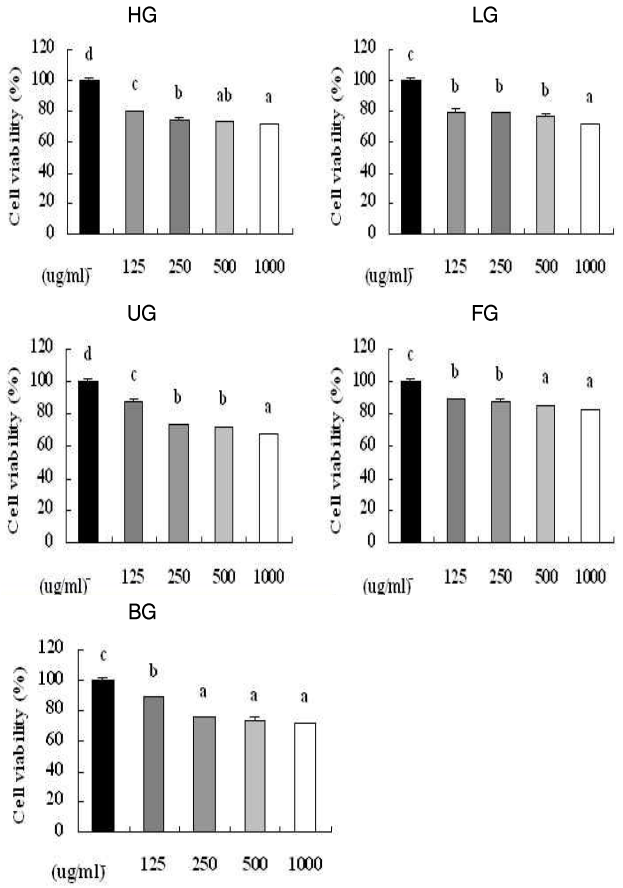

Fig. 1. Effect of garlic extracts with extraction conditions on cytotoxity in Raw 264.7 cell. Different superscripts in the figure indicate significant difference by Duncan's multiple range test(p<0.05). Abbreviated words of experimental groups are same as table 1.

4. 대식세포(Raw 264.7)에 대한 세포독성

추출조건에 따른 각각의 마늘 추출물의 세포독성을 측정하기 위하여 대식세포(Raw 264.7)에 각 시료를 농도 의존적으로 처리하여 24시간 후에 세포의 생존율을 측정한 결과, 무처리군의 세포생존도 100%를 기준으로 125, 250, 500 및 1000 ㎍/㎖농도에서 유의적인 차이를 보였다. 즉, 고온추출물(HG)은 80.20, 74.92, 72.66 및 71.75%의 생존율을 보인 반면, 저온추출물(LG)은 79.80, 78.80, 77.00 및 71.70%였으며 UMPM추출물(UG)은 88.04, 73.27, 72.01 및 66.90%였다. 또한 발효추출물(FG)은 89.15, 87.94, 85.00

및 83.00%의 생존율을 보여 시료 간 가장 높은 활성을 보였으며, 흑마늘추출물(BG)은 88.80, 75.27, 73.76 및 72.06%로 측정되었다. 즉, 대식세포에서는 125 ~ 1000 ㎍/㎖의 추출물 모두 70%이상의 세포생존율을 보였다(Fig. 1).

5. NO 생성에 미치는 영향

추출조건에 따른 각각의 마늘 추출물의 항염 효과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Raw 264.7 세포에서 LPS에 의한 NO 생성을 125, 250, 500 및 1000 ㎍/㎖농도에서 측정한 결과, 무처리 대조군에서는 NO의 생성이 2.50 μM로 거의 생성되지 않은 반면, LPS 처리 후 세포가 활성화됨으로써 42.50 μM 농도로 현저히 증가하였다. LPS로 자극한 대조군에 비해 각각의 추출물 모두 농도 의존적으로 NO 생성이 유의적으로 감소하였다. 즉, 125, 250, 500 및 1000 ㎍/㎖농도에서 고온추출물(HG)과 발효추출물(FG)은 각각 38.55, 40.58, 38.76 및 37.96 μM와 39.32, 33.01, 32.33 및 28.63 μM로 나타났으며, 흑마늘추출물(BG)은 34.47, 32.47, 32.21 및 25.83 μM의 순으로 NO 생성이 유의적으로 감소되었다. 한편, 저온추출물(LG)과 UMPM추출물(UG)은 각각 32.93, 29.19, 27.88 및 25.17 μM과 26.51, 26.92, 23.37 및 17.46 μM로 유의적으로 NO 생성이 가장 낮게 나타났다(Fig. 2).

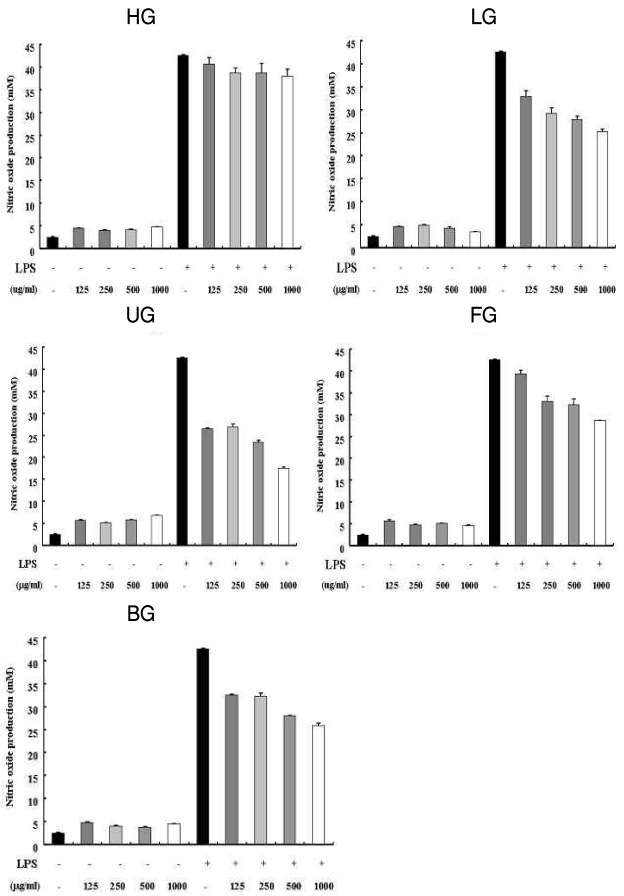

Fig. 2. Inhibition of LPS-induced NO production by garlic extracts with extraction conditions in Raw 264.7 cell. Means with different superscripts within a figure are significant different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. Abbreviated words of experimental groups are same as table 1.

6. 섬유성육종암세포(HT 1080 cell)의 증식억제 효과

추출조건에 따른 각각의 마늘 추출물에 대한 섬유성육종암세포(HT 1080 cell)의 MTT assay에 의한 항암 활성의 결과, 무처리군의 세포생존도 100%를 기준으로 각 시료는 125, 250, 500 및 1000 ㎍/㎖농도에서 암세포 증식 억제 효과를 보였다. 즉, 고온추출물(HG), 발효추출물(LP) 및 흑마늘추출물(BG)은 농도에 따른 유의적인 차이 없이 각각 125 ~ 1000 ㎍/㎖농도에서 97.15 ~ 93.75%, 98.86 ~ 94.60% 및 96.57 ~ 95.36%의 세포 생존율을 보였다. 반면, 저온추출물(LG)와 UMPM추출물(UG)은 농도 의존적으로 가장 낮은 세포 생존율을 보였으며, 특히 250 ㎍/㎖농도에서는 각각 79.13, 80.39 %의 세포 생존율을 보였으며 500, 1000 ㎍/㎖농도에서는 무처리 대조군에 비해 각각 68.19 ~ 53.84%, 76.80 ~ 58.51%로 나타나 유의적으로 가장 낮은 생존율을 보였다(Fig. 3).

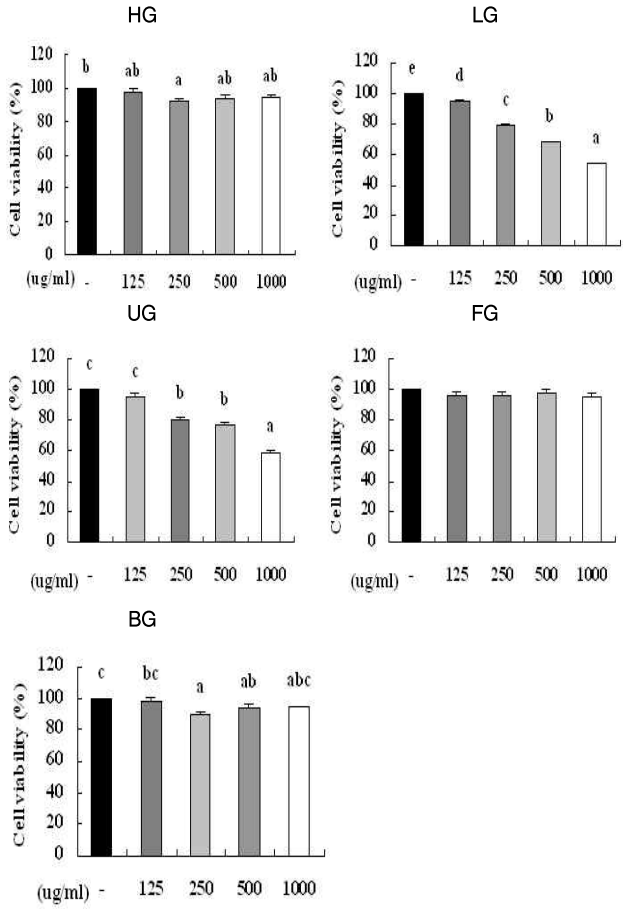

Fig. 3. Cytotoxity of garlic extracts with extraction conditions on HT1080 cell. Means with different superscripts within a figure are significant different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. Abbreviated words of experimental groups are same as table 1.

고 찰

본 연구에서는 마늘을 고온추출법, 저온추출법, UMPM 추출법, 발효추출법 을 이용하여 추출하였으며, 흑마늘을 구입하여 고온추출법으로 추출하여 각 추출물에 대해 항산화 활성, 대식세

포(Raw 264.7 cell)에 대한 세포독성과 NO 생성 억제능 및 인간 유래 섬유성육종암세포(HT 1080 cell)에서 MTT assay를 이용한 암세포 성장 억제능을 비교하였다.

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지며, phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화 효과 등의 생리활성 기능도 가지고 있다[22]. Tannic acid 표준곡선을 이용하여 추출조건에 따른 마늘 추출물 중의 총 폴리페놀 화합물의 함량을 측정한 결과, 흑마늘 추출물(BG)이 가장 높게 나타난 반면, 발효추출물(FG) > 저온추출물(LG) > UMPM추출물(UG) > 고온추출물(HG)의 순으로 나타났다. Kwon 등[23]의 결과에 의하면 열처리한 마늘은 생마늘에 비해 폴리페놀과 플라보노이드가 모두 증가하였는데, 이는 마늘의 열처리 공정으로 인하여 마늘 내 화합물들이 폴리페놀 화합물로 전환되었거나 열처리로 인하여 추출이 용이해졌기 때문으로 판단하였다. 본 실험의 결과도 이와 유사한 경향으로 고온에서 추출된 흑마늘의 총 폴리페놀 화합물 함량이 가장 높게 나타난 것은 흑마늘이 장시간 열처리 과정을 거치면서 일부 마늘 내 화합물의 구조적 전환 및 성분의 용출이 용이해지고 수분의 감소에 따른 상대적인 성분의 농축이 이루어졌기 때문으로 판단된다. 또한 흑마늘 추출물보다는 낮은 함량을 나타내었지만 마늘의 발효추출물과 저온추출물 및 UMPM추출물은 고온추출물보다 모두 높은 함량을 나타난 것은 높은 온도에서 추출하는 것보다는 저온에서의 추출이 폴리페놀 함량과 상관관계가 있는 것으로 사료된다.

생물학 체계에서 항산화제의 보호능력은 주로 항산화제의 free radical 소거능, 금속촉매 chelating 능력, 항산화 효소의 활성, 산화효소의 억제작용으로 판단한다. 그 중에서도 전자공여능에 이용되는 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazy) radical은 화학적으로 유도되는 비교적 안정한 radical로서 어떠한 반응계에서 전자를 공여 받으면 고유의 자색이 엷어진다[24]. 이 방법은 lipoxygenase에 의한 지방 산화 반응계에서의 항산화 활성 측정 결과와도 잘 부합되며 간편하면서도 신뢰성이 높은 장점을 가지고 있다. 각 추출물에 대한 전자공여능 또한 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며 특히 20 ㎎/㎖ 농도에서 흑마늘추출물(BG)이 가장 높은 활성을 보였으며 고온추출물(HG) > UMPM추출물(UG) > 발효추출물(FG) > 저온추출물(LG)의 순으로 활성이 나타났다.

Superoxide dismutase(SOD)는 활성산소종에 대한 항산화 효소의 일종으로 세포와 조직에 강한 독성을 갖는 superoxide radical anion(O_2^-)을 hydrogen peroxide(H_2O_2)와 O_2로 전환시켜주어 세포를 보호하는 물질로 특히 항산화 기능과 연관이 있는 SOD-like activity를 갖는 물질은 SOD와 결합된 phenol류인 것으로 Nice 등[25]이 보고하고 있다. 따라서 일반적으로 SOD-like activity 물질은 SOD와 유사한 기능을 하는 phytochemical에 속하는 물질로 OH기를 2개 이상 갖고 있으며, 녹차의 카테킨, 검은콩의 안토시아닌 등의 폴리페놀 성분으로 항산화, 산화방지 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[26]. 본 실험에서 추출조건에 따른 마늘 추출물의 SOD 유사활성능을 측정한 결과, 농도 의존적으로 모든 추출물에서 높은 활성을 보였으며 특히 UMPM추출물(UG)의 경우 90%이상의 높은 활성이 나타나 유효한 항산화 작용을 할 것으로 사료된다. 한편, 흑마늘추출물(BG)의 경우 총 폴리페놀 화합물 함량과 전자공여능은 다른 추출물에 비해 월등히 높게 나타난 반면 SOD 유사활성능은 다소 낮은 활성을 보였으며 고온추출물(HG)의 경우 총 폴리페놀 화합물 함량과 마찬가지로 가장 낮은 활성을 보였다.

대식세포는 체내로 유입된 암세포 등 이물질을 비특이적으로 탐식, 소화하여 NO(nitric oxide), H_2O_2(hydrogen peroxide) 등의 세포독성 물질을 분비하여 암세포 등을 파괴하는 면역세포이다. 또한 대식세포는 암세포를 탐식하는 과정에서 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 cytokine과 phosphatase 등의 효소를 분비하여 체내 면역체계를 조절하며 각종 염증반응이나 조혈작용에도 관여하는 중요한 면역기관으로[27], 대식세포의 활성화 지표인 NO 생성능과 연계하여 대식세포의 활성능 및 면역활성 나아가 항암활성 등에 관하여 많은 보고가 되어 있다[28,29]. 본 실험에서는 Raw 264.7 cell을 이용하여, 추출조건에 따른 마늘추출물을 농도 의존적으로 처리하여 24시간 후에 세포 생존율을 측정한 결과, 모든 추출물에서 70%이상의 세포 생존율을 보였다.

활성산소종의 일종인 NO는 short-lived free radical로서 혈관 내 항상성을 유지시키고 뇌에서 신호전달 및 항암, 세포 독성 등에 관여하는 세포신호 전달자이며, LPS 자극에 의해 대식세포로부터 L-arginine으로부터 iNOS에 의해 NO free radical이 생성되면, 산소와 쉽게 결합하여 peroxynitrite(ONOO-)를 형성하고 pro-oxidant molecule인 NO가 다량 생성되는데 이들은 손상된 조직이나 세포에 세포독성을 통해 염증반응을 나타내게 된다[30]. 본 실험에서 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 대식세포가 과도하게 생성하는 NO 생성을 농도 의존적으로 모든 시료에서 유의적으로 낮은 활성을 보였으며 추출조건에 따른 마늘 추출물 간의 유의적인 차이를 보였다. 특히, 고온에서 추출한 고온추출물(HG)의 경우 LPS를 처리한 대조군과 거의 비슷한 경향인 반면, UMPM추출법으로 추출한 UMPM추출물(UG)의 경우 농도 의존적으로 유의성 있게 가장 낮은 농도로 감소시키는 것으로 나타났다. 이는 저온추출과 동시에 저분자 물질이 용출되어져 단순 고온, 저온으로 추출한 방법보다 유효한 성분이 추출되어진 결과로 사료되며, 또한 대식세포에서의 과도한 NO 생성을 효과적으로 억제하였기 때문에 UMPM추출물(UG)이 iNOS 유전자 발현 역시 효과적으로 억제시키는 것으로 보여 진다. 나아가 특정약물에 의한 NO 생성 억제효과는 ROS 제거와도 연관되는데, ROS는 MAPKs 및 nuclear transcription fators c-Jun 및 NF-κB 등을 활성화시키는 것으로 알려져 있기 때문에, UMPM추출물(UG)의 NO 생성억제 효과도 ROS 제거 및 ROS와 연관된 신호전달경로에 영향을 줄 것으로 사료된다. 따라서 NO의 과도한 생성을 효과적으로 억제시킴으로써 항염증 효과를 나타내며, 이런 마늘 UMPM추출물(UG)을 통해 다양한 염증성 질환 개선을 위한 다각적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

다단계 과정으로 일어나는 암 발생 단계는 처음에 하나의

세포내에서 일어나며, 개시(initiation), 촉진(promotion), 진행(progression)의 과정으로 구분할 수 있다. 암 개시단계는 발암물질이 DNA와 반응하여 유전자 변이를 초래하는 비가역적 과정으로 계속적으로 종양 촉진제에 노출이 되지 않는 한 암세포로 전환될 수 있는 잠재력만을 가지고 있다. 암 촉진단계는 상대적으로 오랜 시간을 두고 서서히 진행되는 과정으로 암 개시된 세포의 증식을 유도하여 전암병변(prenoplastec resions) 상태의 세포군집을 형성시킨다. 암 개시단계와는 달리 암 촉진단계는 원인이 제거되면 이전 단계로 되돌아갈 수 있는 가역적인 단계이다. 암 진행단계는 비교적 양성이던 병소가 악성으로 되어, 침입성(invasiveness) 전이능(metastatic potential)이 증가한 신생물(neolasm)로 전환되는 단계이다[31]. 이렇듯 암 발생은 한 순간에 이루어지지 않고 오랜 시간에 걸쳐 일어난다. 본 실험에서 추출조건에 따른 마늘 추출물에 대한 암세포 성장 억제 활성을 측정하기 위해 인간유래 섬유성육종암세포(HT 1080 cell)를 이용하여 MTT assay에 의한 암세포 성장억제 활성을 측정한 결과, 무처리군의 세포 생존도 100%를 기준으로 고온추출물(HG), 발효추출물(FG) 및 흑마늘추출물(BG)은 농도에 따른 유의적인 차이 없이 90%이상의 세포 생존율을 보인 반면 저온추출물(LG)와 UMPM추출물(UG)은 농도 의존적으로 모든 농도에서 유의적으로 암세포 증식 억제 효과를 보였다. Block 등[32]은 garlic oils의 경우 열에 의해 여러 종의 새로운 화합물로 변한다고 보고하였으며, 마늘의 항암성분을 규명하기 위한 연구가 다양하게 연구되고 있다. 즉, 마늘의 항암성분은 열이나 다른 물리적 방법에 의해 이차적으로 형성되는 생리활성 성분들에 의한 것으로 생각되며 본 실험 결과에서 저온추출과 UMPM추출로 인한 마늘의 유의성 있는 결과 볼 때 향후 여러 가지 암세포주에 대한 항암활성을 확인할 필요가 있을 것으로 판단된다.

결 론

추출조건에 따른 마늘 추출물의 새로운 기능성 물질로서의 가능성을 살펴보고자 in vitro에서 항산화 활성 및 대식세포(Raw 264.7 cell)에서의 세포독성, NO 생성능에 의한 항염증 활성, 인간유래 섬유성육종암세포(HT 1080 cell)에서의 항암활성에 미치는 영향을 비교 · 분석한 결과, 총 폴리페놀 화합물의 함량은 흑마늘 추출물(BG)이 가장 높게 나타난 반면, 발효추출물(FG) > 저온추출물(LG) > UMPM추출물(UG) > 고온추출물(HG)의 순으로 나타났다. 전자공여능은 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며 흑마늘추출물(BG)이 가장 높은 활성을 보였고, 고온추출물(HG) > UMPM추출물(UG) > 발효추출물(FG) > 저온추출물(LG)의 순으로 활성이 나타났다. SOD 유사활성능은 농도 의존적으로 모든 추출물에서 높은 활성을 보였으며 특히 UMPM추출물(UG)의 경우 90%이상의 높은 활성이 나타났다. 추출조건에 따른 마늘추출물의 세포독성을 조사한 결과, 대식세포(Raw 264.7)에 대한 세포 생존율은 대조군의 세포생존율 100%를 기준으로 시료 군 간 큰 차이는 나타나지 않았으나, 모든 농도에서 70% 이상의 세포 생존율을 보였다. 대식세포(Raw 264.7 cell)에서 LPS에 의한 NO 생성에 대한 효과를 실험한 결과, LPS로 자극한 대조군에 비해 UMPM추출법으로 추출한 UMPM추출물(UG)의 경우 농도 의존적으로 유의성 있게 가장 낮은 농도로 감소시키는 것으로 나타났다. 섬유성육종암세포(HT1080 cell)에 대한 증식 억제능을 확인 한 결과, 저온추출물(LG)와 UMPM추출물(UG)은 농도 의존적으로 모든 농도에서 유의적으로 암세포 증식 억제 효과를 보였다.

이상의 결과를 종합해 보면 추출조건을 달리한 각각의 마늘 추출물은 항산화 활성에서 흑마늘 추출물에 비해 다소 낮은 활성을 보였으나, 대식세포의 세포독성 및 NO 생성능, 암세포에서의 항암 활성능은 UMPM추출법으로 추출한 마늘 추출물에서 유용한 효과가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. Korea National Statistical Office. Annual report of mortality statistics. Seoul, 2005.
2. Ministry of Health and Welfare. Report on 2005 National Health and Nutrition survey. Seoul, 2006.
3. Culter, R.G. Antioxidants aging and longevity. In Free Radicals in Biology. Pryor WA, ed. Academic Press, New York, USA. 6: 371-423, 1984.
4. Huh, J. Jeuungbo Dogneubogam. Namsandang, Seoul, p 1172, 1981.
5. Kim, C.M., Shin, M.K., Ahn, D.G., Lee, K.S. The encyclopedia of oriental herbal medicine. Jeung Dam pub. 2003.
6. Choi, H.K. A study on the antibacterial activity of garlic against Escherichia coli 0157. J Korean Practical Arts Edu. 14: 159-167, 2001.
7. Lemar, K.M., Turner, M.P. and Lloyd, D. Garlic(Allium sativum) as an anti-candida agent : a comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts. J Appl microbiol. 93: 398-405, 2002.
8. Yin, M.C. and Tsao, S.M. Inhibitory effect of seven Allium plants upon three Aspergillus species. Int. J Food Microbiol. 49: 49-56, 1999.
9. Ruffin, J., Hunter, S.A. An evaluation of the effect of garlic as an antihypertensive agent. Ctyobios. 37: 85-89, 1983.
10. Ackermann, R.T., Mulrow, C.D., Ramirez, G., Gardner, C.D., Morbidoni, K. and Lawrence, V.A. Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors. Arch Intern Med. 161: 813-824, 2001.

11. Banerjee, S. and Maulik, S. Effect of garlic on cardiovascular disorder. review. Nutr J. 1: 4, 2002.
12. Kim, E.S., Chun, H.J. The anticarcinogenic effect of garlic juice against DMBA induced carcinoma on the hamster buccal pouch(in korean). J Korean Soc Food Nutr. 22: 398-404, 1993.
13. Takezaki, T., Gao, C.M., Wu, J.Z., Ding, J.H., Liu, Y.T., Zhang, Y., Li, S.P., Su, P., Liu, T.K. and Tajima, K. Dietary protective and risk factors for esophageal and stomach cancers in a low-epidemic area for stomach cancer in Jiangsu Province, china : comparison with those in a high-epidemic area. Jpn J Cancer Res. 92: 1157-1165, 2001.
14. Takezaki, T., Gao, C.M., Ding, J.H., Liu, T.K., Li, M.S. and Tajima, K. Comparative study of ligestyles of residents in high and low risk areas for gastric cancer in Jiangsu province, China: with special reference to Allium vegetables. J Epidemiol. 9: 297-305, 1999.
15. Fleischauer, A.T., Poole, C. and Arab, K. Garlic consumption and cancer prevention : meta-analyses of colorectal and stomach cancers. Am J Clin Nutr. 72: 1047-1052, 2000.
16. Iciek, M.B., Rokita, H.B. and Wlodek, L.B. Effects of diallyl disulfide and other donors if sulfane sulfur on the proliferation of human hepatoma cell line(Hep G2). Neoplasma. 48: 307-312, 2001.
17. Lea, M.A. and Randolph, V.M. Induction of histone acetylation in rat liver and hepatoma by organosulfur compounds including diallyl disulfide. Anticancer Res. 21: 2841-2845, 2001.
18. Stoll, A., Seebeck, B. Chemical investigation on allin the specific principle of garlic. Adv Enzymol. 11: 377-400, 1951.
19. AOAC. Official Methods of Analysis, 8th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC USA, p 144, 1955.
20. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. J Agric Food Chem. 25: 103-107, 1977.
21. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in Raw 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach Eur Pharmacol. 406: 301-309, 2000.
22. Kim, H.J., Jun, B.S., Kim, S.Y., Cha, J.Y., Cho, Y.S. Polyphenolic compound content and antioxidative acticities by extracts from seed, sprout and flower of Safflower(Carthamus tinctorius L.). J Korean Soc Food Sci Nutr. 29(6):1127-1132, 2000.
23. Kwon, O.C., Woo, K.S., Kim, T.M., Kim, D.J., Hong, J.T., Jeong, H.S. Physicochemical characteristics of garlic(Allium sativum L.) on the high temperature and pressure treatment. Korean J Food Sci Technol. 38: 331-336, 2006.
24. Ancerewicz, J., Migliavacca, E., Carrupt, P.A., Testa, B., Brée, F., Zini, R., Tillement, J.P., Labidalle, S., Guyot, D., Chauvet-Monges, A.M., Crevat, A., Le Ridant, A. Structure-property relationships of trimetazidine dericatives and model compounds as potential antioxidant. Free Radic Biol Med. 25: 113-120, 1998.
25. Nice, D.J., Robinson, D.S., Holden, M.A. Characterization of a heat stable antioxidant co purified with the superoxide dismutase activity from dried peas, Food Chem. 52: 393-397, 1995.
26. Kim, S.J., Han, D., Moon, K.D., Rhee, J.S. Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidant, Biosci Biochem. 59(5):822-826, 1995.
27. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Otsuka, Y. Purification and characterization of complement activation acidic polysaccharide from the roots of Lithospermum euchromum royale. International J Immunopharmacology. 8: 71-82, 1986.
28. Park, K.M., Kim, Y.S., Jeong, T.C., Joe, C.O., Shin, H.J., Kee, Y.H., Nam, K.Y., Park, J.D. Nitric oxide in involved in the immuno-modulating activities of acidic polysaccharide from Panax ginseng. Planta Medica. 67: 122-126, 2001.
29. Park, J.D. Recent studied on the chemical constituents of Korean ginseng(Panax ginseng CA Meyer). Korean J Gingseng Sci. 20: 389-396, 1996.
30. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 6: 3051-3064, 1992.
31. Surh, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nature Rev. 3: 711-780, 2003.
32. Block, R.P. The organosulfur chemistry of genus Allium implications for the organic chemistry of sulfur. Angw Chem Int Ed Engli. 31: 1135-1178, 1992.