



ISSN 1229-8565 (print) ISSN 2287-5190 (on-line)
한국지역사회생활과학회지 31(4): 601~611, 2020
Korean J Community Living Sci 31(4): 601~611, 2020
<http://doi.org/10.7856/kjcls.2020.31.4.601>

추출 용매에 따른 히렴초 추출물의 항산화 활성 및 암 침윤 억제 효과

이 수 진 · 이 주 민^{†1)}

조선대학교 영양교육대학원 대학원생 · 조선대학교 식품영양학과 부교수¹⁾

Study of the Antioxidant and Anti-invasive Effects of *Siegesbeckia glabrescens* Makino Extracts with Different Solvents

Su-Jin Lee · Joomin Lee^{†1)}

Graduate Student, Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju, Korea
Associate Professor, Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju, Korea¹⁾

ABSTRACT

Siegesbeckia glabrescens Makino (SM) has been used as a traditional medicine to treat inflammatory disease and allergic disorders. The present study investigated the antioxidant potential, anti-proliferation effect, and anti-invasive effect using the 80% ethanol extract of *Siegesbeckia glabrescens* Makino (SM-EE) and the water extract of *Siegesbeckia glabrescens* Makino (SM-WE). The results showed that the total polyphenol and flavonoid contents from SM-EE were significantly higher than those of SM-WE. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), reducing power, and ferric reducing antioxidant power (FRAP) scavenging activities of SM-EE were higher than those of SM-WE. Next, the anti-proliferation effects of SM-EE and SM-WE in MCF-7 and HeLa cancer cells were examined. The results showed that only SM-EE decreased cell proliferation significantly at 24 h. Furthermore, 0.1 and 0.2 mg/mL SM-EE exerted significant inhibition on mRNA expression of matrix metalloproteinase (MMP), particularly MMP-2 and MMP-9 in both cancer cells. These findings suggest that SM-EE has strong antioxidant and anti-proliferation effects and can be used as MMP-inhibiting natural compounds.

Key words: *Siegesbeckia glabrescens* Makino, antioxidant activity, anti-proliferation effect, matrix metalloproteinases, cancer cells

Received: 12 October, 2020 Revised: 24 November, 2020 Accepted: 25 November, 2020

[†]**Corresponding Author:** Joomin Lee Tel: +82-62-230-7722 E-mail: joominlee@chosun.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. 서론

현대 사회는 환경적, 사회적 발암 요인들이 광범위하게 분포하고 있고 산업화에 따른 발암 요인으로부터의 노출 위험이 커지고 있어 암의 발생 비율이 급속히 높아지고 있다. 암 치료 과정에서 나타나는 부작용과 비용 부담이 커지면서 이를 극복하기 위한 치료 차원이 아닌 암을 예방하려는 관점이 점차 크게 대두되고 있다(Liu 2004). 호흡 과정이나 세포의 대사과정에서 자연스럽게 생성되는 활성산소(superoxide, hydroxy peroxy, alkoxyl, hydroperoxy radical, nitric oxide)는 여러 가지 세포 반응을 조절하는 역할을 한다. 하지만 생체 내에서 생성되는 활성 산소의 양이 필요 이상으로 만들어지게 되면 우리 몸의 세포막이나 효소 및 단백질, 유전자 등을 손상시키게 되어 오히려 인체에 해를 미치는 경우도 있다(Sabharwal & Schumacker 2014). 최근 활성산소의 과잉 생성은 발암(carcinogen)의 원인 또는 발암을 촉진 시키는 원인이 될 수 있다는 사실이 알려지면서 활성산소를 억제하고자 하는 노력이 이루어지고 있다. 특히 활성산소에 대한 방어 능력을 지닌 항산화제(antioxidant)의 발굴을 우리의 식생활을 대상으로 찾고자 하는 노력과 함께 이들의 항암 및 암 예방에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다.

희렴초(*Siegesbeckia glabrescens* Makino)는 희렴(*Siegesbeckia pubescens*), 희침, 시침, 저고 또는 진득찰이라고 불리는 쌍떡잎식물에 초롱꽃목으로서 국화과(Compositae)에 속하는 일년생 초본이다(Park et al. 2013). 한국, 일본, 타이완, 중국 등지에 분포 자생하며 우리나라 각처의 들이나 길가에서 흔히 자라는 식물이다. 한방에서는 뿌리를 제외한 식물체 전체를 약재로 쓰는데

이는 관절염, 사지마비, 중풍, 고혈압, 두통, 어지럼증, 급성간염, 황달, 종기, 피부가려움증과 같은 습진에 효과가 있다고 보고되었다(Park et al. 2013).

본 연구에서는 메탄올, hexan 및 아세톤과 같은 고독성의 유기용매에 비해 취급이 안전하여 추출용매로 주로 사용되는 에탄올과 증류수를 이용하여, 추출조건을 달리한 희렴초 추출물의 항산화 효과, 암세포 증식 및 암 침윤 억제 효과를 분석함으로써 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인해 보고자 하였다.

II. 연구방법

1. 실험재료

국내산 희렴초를 (주)청명약초에서 건조된 분말의 형태로 2020년 6월에 구입하여 본 연구의 시료로 사용하였다. 건조된 희렴초를 분쇄기(HR1378, Philips, Karner, Slovenia)로 분말화하였다. 분말상태인 시료를 분석 시까지 -70°C deep freezer (MDFU52V, Sanyo, Osaka, Japan)에 보관하였다.

2. 시료추출

분쇄된 희렴초 분말을 80% ethanol 및 증류수를 가하여 3회 반복 추출하였다. 이후 얻어진 희렴초 추출액을 whatman filter paper로 여과한 후 여액을 감압·농축하였다. 농축된 희렴초를 24시간 -70°C deep freezer(MDFU52V, Sanyo, Osaka, Japan)에 냉동시킨 후 동결건조기(ED 8512, Ilshin, Yangju, Korea)를 이용하여 동결건조하였으며 이후 얻어진 희렴초 추출물은 분석 시까지 -70°C에 보관하여 사용하였다.

3. 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량

총 플라보노이드 함량은 Davis법을 변형한

Chae 등의 방법(2002)에 따라 측정하였다. 각 희석된 히렴초 에탄올 추출물 및 증류수 추출액(0.5 mL), diethylene glycol(Sigma, St. Louis, MO, USA) (0.5 mL)를 혼합한 후 1N NaOH (0.01 mL) 용액을 첨가하여 37°C 에서 1시간 반응 후 흡광도 420 nm에서 측정하였다. Rutin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 표준물질로 이용하여 표준검량곡선을 적용한 후 총 플라보노이드 함량을 산출하였다. 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis의 방법(1912)에 따라 측정하였다. 각 희석된 히렴초 에탄올 추출물 및 증류수 추출액(0.2 mL)과 folin reagent(Sigma, St. Louis, MO, USA)(0.2 mL)을 혼합하여 3분간 실온에서 반응시킨 후, 10% Na₂CO₃용액(0.8 mL)을 넣고 40분간 암소에서 반응시켰다. 그 후 흡광도 760 nm에서 흡광도를 측정하고, tannic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 표준물질로 이용하여 표준검량곡선을 적용한 후 총폴리페놀 함량을 산출하였다. 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis의 방법(1912)에 따라 측정하였다.

4. DPPH 라디칼 소거능 측정

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능은 Blois의 방법(1958)을 변형하여 사용하였다. 0.2 mM DPPH 용액 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 900 µL에 농도별로 희석된 각각의 시료 100 µL을 첨가하여 37°C heating block에 30분간 반응시킨 후 흡광도 517 nm에서 측정하였다. 시료 농도별 소거능 값으로 표준곡선을 이용하여 IC₅₀값을 산출하였다.

5. ABTS⁺ 라디칼 소거능 측정

ABTS⁺ 라디칼 소거능은 Re의 방법(1999)을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 2,2-azinobis-

3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 7 mM과 potassium persulfate 2.4 mM을 1 : 1 비율로 혼합하여 암소에서 약 24시간 반응시켰다. 이후 실험 직전에 ABTS 시약을 734 nm에서 흡광도가 0.70 ± 0.02가 되도록 methanol로 희석하여 사용하였다. 900 µL ABTS 시약과 100 µL의 농도별로 희석된 각각의 시료를 첨가하여 37°C heating block에 30분간 반응시킨 후 흡광도 734 nm에서 측정하였다. 시료 농도별 소거능 값으로 표준곡선을 이용하여 IC₅₀값으로 산출하였다.

6. Ferric reducing antioxidant power(FRAP) 측정

FRAP assay는 Benzie&Strain(1996)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 300 mM sodium acetate buffer(pH 3.6)(Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA), 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ) (Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA), 20 mM ferric chloride(Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA)를 각각 10:1:1의 비율로 혼합하여 FRAP reagent를 만든 후 사용하였다. 10 µL 시료, 90 µL 증류수, 200 µL FRAP reagent를 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 593 nm 흡광도에서 측정하였다. Iron sulfate hexahydrate(Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA)를 표준물질로 하여 표준검량곡선을 적용해 추출물 1 mg에 들어있는 iron sulfate hexahydrate의 µM 함량으로 나타내었다.

7. 환원력(Reducing power) 측정

히렴초의 환원력을 알아보기 위한 reducing power 측정은 Oyaizu(1986)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2

mg/mL 농도별로 희석한 희렴초 에탄올 추출물과 증류수 추출물 200 μ L에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6) 200 μ L와 1% potassium ferricyanide 200 μ L를 첨가한 후 50°C에서 20 분 동안 반응시켰다. 이후 10% trichloroacetic acid(w/v) 200 μ L를 첨가한 후 14,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. 원심분리한 상층액 750 μ L에 증류수 750 μ L, 0.1% ferric chloride 용액 100 μ L를 혼합하여 실온에서 10분 동안 방치시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 환원력은 흡광도 값으로 나타내었다.

8. 세포배양

인체유방암세포주 MCF-7과 인체자궁암세포주 HeLa는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 본 실험실에서 배양하여 사용하였다. MCF-7과 HeLa 세포는 1% penicillin/streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)을 포함한 RPMI 1640 배지(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-18AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

9. MTS assay

MCF-7과 HeLa 세포를 96 well plate에 2×10^3 /well로 분주하여 24시간 배양하였다. 96 well plate에 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL의 농도로 희석한 희렴초 추출물 100 μ L를 첨가하여 24시간 처리한 후, CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(MTS) 용액(Promega, CA, USA)을 이용하여 각 well에 20 μ L씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 반응시킨 후, UV-spectrophotometer(Bio-rad,

Hercules, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10. RNA 분리 및 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 분석
희렴초 에탄올 추출물을 24시간 처리한 MCF-7과 HeLa 세포를 RNeasy mini kit(QIAGEN, Maryland, USA)를 사용하여 RNA를 추출하고 정량하였다. 동량의 RNA(1 μ g)를 PCR RT PreMix (BIONEER, Daejeon, Korea)로 cDNA를 합성하고 MMP-2와 MMP-9 primer를 사용하여 PCR 방법으로 증폭하였고, internal control gene으로 β -actin을 사용하였다(Table 1). 증폭된 PCR 산물들은 1.5% agarose gel을 사용하여 전기영동하여 분리시킨 후 ethidium bromide 용액에서 30분간 반응시키고 UV(Davinch-Chemi imager(TM, ACS-400SM, Davinch-K, Seoul, Korea)를 이용하여 mRNA 발현 정도를 관찰하였다.

Table 1. Sequences of the primers used for RT-PCR

Gene name	Sequence
MMP-2	Forward 5'-TTGACGGTAAGGACGGACTC-3'
	Reverse 5'-ACTTGCAGTACTCCCCATCG-3'
MMP-9	Forward 5'-TTGACAGCGACAAGAAGTGG-3'
	Reverse 5'-GCCATTACGTCGTCCTTAT-3'
β -actin	Forward 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3'
	Reverse 5'-AAGGGACTTCCTGTAAACAATGCA-3'

12. 통계처리

본 연구의 모든 실험은 독립적으로 3회 반복을 통해 얻었으며, 각 실험군 간의 유의성 검증은 GraphPad Prism 6 program(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 이용하여 평균(mean)과 표준편차(SD)로 제시하였다. 각 시료 간의 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 Student's *t*-test와 분산분석(one-way ANOVA)법을 실시하여 유의적 차이를 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량

본 연구에 사용된 희렴초 에탄올 추출물과 증류수 추출물의 추출수율은 각각 18.1%와 14.1%로 나타났다. 여러 식물에 존재하는 플라보노이드류는 대표적인 항산화성 물질이며, 지질 과산화물 및 반응성 산소종의 생성을 억제하는 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Heim et al. 2002). 희렴초 에탄올 추출물과 증류수 추출물의 총 플라보노이드 함량은 각각 120.86 mg RE/g과 61.35 mg RE/g으로 두 군간의 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$)(Table 2). 폴리페놀류는 하나 이상의 벤젠링과 한 개 이상의 수산기를 구성하며, 식이 내 폴리페놀은 항산화 및 항염증 작용 등을 하는 것으로 알려져 있다(Bors et al. 2002). 희렴초 에탄올 추출물과 증류수 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 182.92 mg TAE/g과 160.39 mg TAE/g로 두 군간의 유의적인 차이를 나타냈다($p < 0.05$)(Table 1). Lee(2018)의 연구에 의하면 국화과에 속하는 한련초의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 274.80 mg/g과 122.75 mg/g으로 나타나 본 연구와 다소 차이를 보였다. 또한 ethanol로 추출한 개똥썩 잎의 총

폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 99.98 mg/g과 51.86 mg/g으로 나타내어 본 연구와의 차이를 나타내었다(Ryu et al. 2011).

Table 2. Total polyphenol and total flavonoid contents of the *Siegesbeckia glabrescens* Makino extract

	Extraction yield (% dry basis)	Total polyphenol (mg TAE/g)	Total flavonoid (mg RE/g)
SM-EE ¹⁾	18.1	182.92 ± 4.47*	120.86 ± 5.10*
SM-WE ²⁾	14.1	160.39 ± 2.00	61.35 ± 1.78

¹⁾SM-EE, 80% ethanol extract of *Siegesbeckia glabrescens* Makino

²⁾SM-WE, water extract of *Siegesbeckia glabrescens* Makino

All values are expressed as the mean ± SD of triplicate determinations (n=3).

* $p < 0.05$; Significantly different by Student's *t*-test between SM-EE and SM-WE

2. DPPH 라디칼 소거능

DPPH를 이용한 전자공여능 측정은 산화환원 반응으로부터 전자의 활동을 조사할수 있는 방법으로 널리 이용되고 있다(Hu et al. 2004). 희렴초 에탄올 추출물과 증류수 추출물을 이용한 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과는 Table 3에 나타났다. 희렴초 에탄올 추출물을 이용한 DPPH 라디칼 소거능은 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL 농도에서 25.02%, 31.11%, 42.56%, 86.96%를 나타내었으며, 라디칼 소거능의 50% 저해능 값인 IC₅₀을 구한 결과, 희렴초 에탄올 추출물은 0.53 mg/mL를 나타냈다. 희렴초 증류수 추출물을 이용한 DPPH 라디칼 소거능은 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL 농도에서 12.57%, 16.16%, 31.21%,

Table 3. DPPH radical-scavenging activity of the *Siegesbeckia glabrescens* Makino extract

Concentration (mg/mL)	DPPH radical scavenging activity (%)			
	0.125	0.250	0.500	1.000
SM-EE ¹⁾	25.02 ± 12.62 ^a	31.11 ± 3.40 ^b	42.56 ± 14.28 ^c	89.96 ± 0.14 ^d
SM-WE ²⁾	12.57 ± 1.19 ^b	16.16 ± 4.10 ^c	31.21 ± 0.59 ^d	61.56 ± 5.62 ^e

¹⁾SM-EE, 80% ethanol extract of *Siegesbeckia glabrescens* Makino

²⁾SM-WE, water extract of *Siegesbeckia glabrescens* Makino

Data are the mean ± SD of triplicate experiments (n=3). Means with the different letters (a-e) within the same row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

61.56%를 나타내었으며, 50%의 라디칼 소거능의 값인 IC₅₀을 구한 결과, 희렴초 증류수 추출물은 0.81 mg/mL를 나타내며 희렴초 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 희렴초 증류수 추출물에 비해 뛰어남을 확인하였다. Ryu et al.(2011)의 연구에 의하면 국화과에 속하는 개똥쑥 잎의 에탄올 추출물을 DPPH IC₅₀ 값을 측정한 결과, 0.15 mg/mL로 본 논문과 다소 큰 차이를 보였다.

3. ABTS⁺ 라디칼 소거능

ABTS 양이온 소거능은 ABTS 용액과 potassium persulfate의 반응에 의해 생성된 ABTS 양이온이 추출물의 항산화력에 의해 제거되는 것을 이용한 측정 방법이다. 본 연구 결과, 희렴초 에탄올 추출물을 이용한 ABTS⁺ 라디칼 소거능은 0.125

mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL 농도에서 각각 36.37%, 65.60%, 94.74% 를 나타내었으며, 50%의 라디칼 소거능의 값인 IC₅₀은 0.22 mg/mL를 나타냈다(Table 4). 희렴초 증류수 추출물을 이용한 ABTS⁺ 라디칼 소거능은 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL 농도에서 26.80%, 49.30%, 86.04% 를 나타내었으며, 50%의 라디칼 소거능의 값인 IC₅₀을 구한 결과, 희렴초 증류수 추출물은 0.27 mg/mL를 나타냈다. 따라서 희렴초 에탄올 추출물은 희렴초 증류수 추출물에 비해 ABTS⁺ 라디칼 소거능이 우수함을 확인하였다.

4. Reducing power 분석

환원력은 시료가 Fe³⁺에 수소를 공여하여 라디칼을 안정화시킴으로써 Fe²⁺로 환원되는 것을 이

Table 4. ABTS⁺ radical-scavenging activity of the *Siegesbeckia glabrescens* Makino extract

Concentration (mg/mL)	ABTS ⁺ radical scavenging activity (%)		
	0.125	0.250	0.500
SM-EE ¹⁾	36.37 ± 0.24 ^a	65.60 ± 0.63 ^c	94.74 ± 0.08 ^e
SM-WE ²⁾	26.80 ± 0.21 ^b	49.30 ± 0.97 ^d	86.04 ± 0.16 ^f

¹⁾SM-EE, 80% ethanol extract of *Siegesbeckia glabrescens* Makino

²⁾SM-WE, water extract of *Siegesbeckia glabrescens* Makino

Data are the mean ± SD of triplicate experiments (n=3). Means with the different letters (a-f) within the same row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 5. Reducing power of the *Siegesbeckia glabrescens* Makino extract

(Absorbance at 700nm)

Concentration (mg/mL)	Reducing power				
	0.125	0.250	0.500	1.000	2.000
SM-EE ¹⁾	0.05 ± 0.01 ^a	0.22 ± 0.05 ^a	0.38 ± 0.03 ^b	0.88 ± 0.16 ^c	1.35 ± 0.11 ^c
SM-WE ²⁾	0.05 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.01 ^b	0.13 ± 0.07 ^d	0.63 ± 0.05 ^f

¹⁾SM-EE, 80% ethanol extract of *Siegesbeckia glabrescens* Makino²⁾SM-WE, water extract of *Siegesbeckia glabrescens* Makino

Data are the mean ± SD of triplicate experiments (n=3). Means with the different letters (a-f) within the same row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

용한 방법으로 널리 이용된다(Hwang & Thi 2014). 히렴초 에탄올 추출물과 증류수 추출물의 reducing power 측정 결과는 Table 5와 같다. 히렴초 에탄올의 추출물을 이용한 환원력은 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL 농도에서 각각 0.05, 0.21, 0.37, 0.87, 1.34 나타났다. 히렴초 증류수 추출물의 환원력은 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL 농도에서 각각 0.051, 0.053, 0.06, 0.13, 0.63 나타났다. 히렴초 에탄올 추출물의 환원력은 농도 의존적으로 증가함을 확인하였으며, 히렴초 에탄올 추출물이 증류수 추출물에 비해 환원력이 뛰어난 것을 확인하였다.

5. FRAP 분석

FRAP은 항산화물질에 의해 ferric 2,4,6-tripyridyl-triazine[Fe(III)-TPIZ]를 ferrous 2,4,6-tripyridyls-triazine[Fe(II)-TPIZ] 혼합물로 환원되는 원리로 고안된 방법으로 항산화 측정에 널리 이용되고 있다(Benzie & Strain 1996). 히렴초 에탄올 추출물과 증류수추출물의 FRAP 활성은 Table 6과 같다. 히렴초 에탄올 추출물 1.0 mg/mL 농도에서 FRAP 활성을 측정한 결과, 히

렴초 에탄올 추출물은 50.36 μ M, 히렴초 증류수 추출물은 35.77 μ M으로 히렴초 에탄올 추출물의 FRAP 활성이 유의적으로 더 높음을 알 수 있었다 (p<0.05). Ryu et al.(2011)의 연구에 따르면 에탄올로 추출한 개똥쑥 잎의 FRAP 활성은 133.58 μ M, 물로 추출한 개똥쑥 잎의 FRAP 활성은 54.53 μ M로 나타나 본 연구와 차이를 나타내었다.

Table 6. Ferric reducing antioxidant power of the *Siegesbeckia glabrescens* Makino extract(FeSO₄·7H₂O eq μ M)

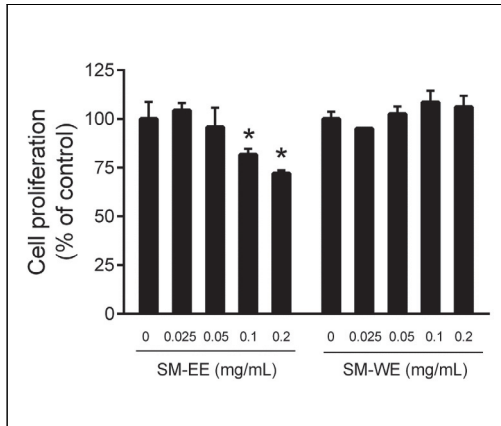
Ferric reducing antioxidant power	
SM-EE ¹⁾	50.36 ± 2.01 [*]
SM-WE ²⁾	35.77 ± 0.81

¹⁾SM-EE, 80% ethanol extract of *Siegesbeckia glabrescens* Makino²⁾SM-WE, water extract of *Siegesbeckia glabrescens* Makino

All values are expressed as the mean ± SD of triplicate determinations (n=3).

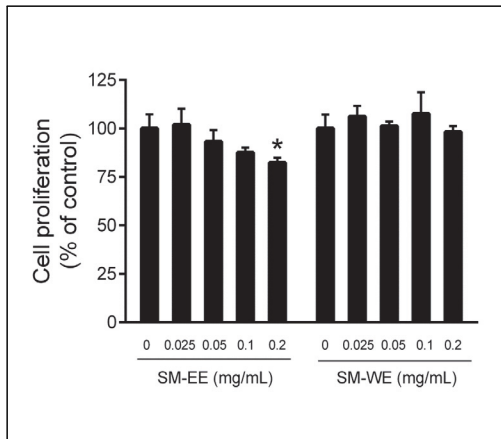
^{*}p<0.05; Significantly different by Student's t-test between SM-EE and SM-WE

6. 히렴초 추출물이 암세포의 성장에 미치는 영향
히렴초 추출물이 인체 유방암세포인 MCF-7과



The data are reported as the mean ± SD of triplicate experiments (n=3). Statistically significant (p<0.05) compared to the *corresponding DMSO-treated control by one-way ANOVA.

Fig. 1. Effects of *Siegesbeckia glabrescens* Makino extract on the proliferation of MCF-7 cells for 24 h by MTS assay.



The data are reported as the mean ± SD of triplicate experiments (n=3). Statistically significant (p<0.05) compared to the *corresponding DMSO-treated control by one-way ANOVA.

Fig. 2. Effects of *Siegesbeckia glabrescens* Makino extract on the proliferation of HeLa cells for 24 h by MTS assay.

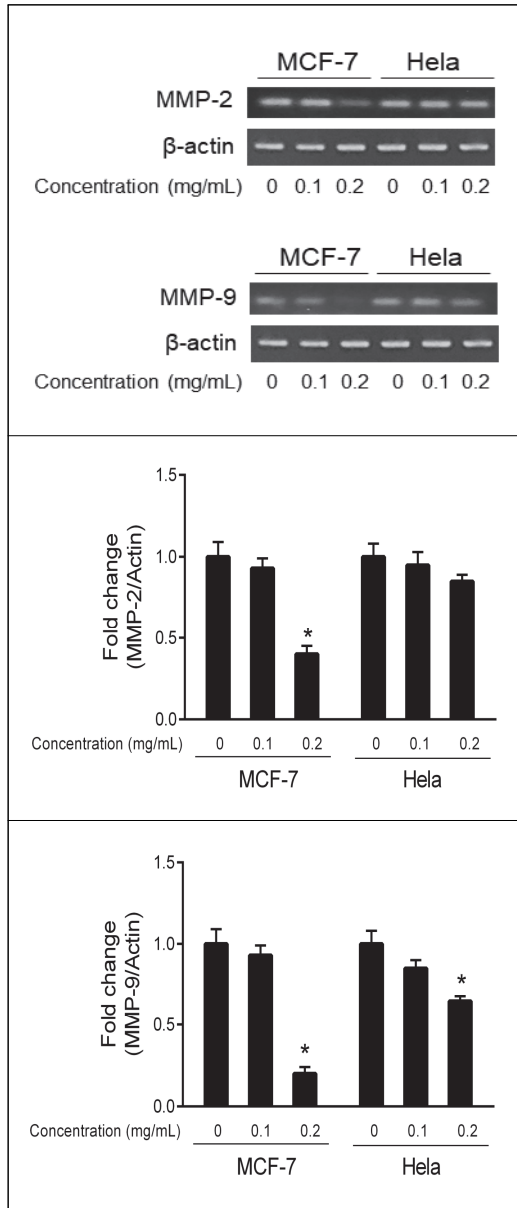
자궁암 세포주인 HeLa의 성장에 미치는 영향을 MTS assay를 통해 측정하였으며 그 결과는 Fig.

1과 2에 나타내었다. MCF-7 세포주에 희렴초 에탄올 및 증류수 추출물을 각각 0.025g/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL 및 0.2 mg/mL 처리하여 24 시간 동안 배양한 결과, 무처리군에 비해 0.1 mg/mL와 0.2 mg/mL 희렴초 에탄올을 첨가한 세포주의 성장이 유의적으로 억제되는 효과를 나타내었다 (p<0.05). 위와 동일한 조건으로 희렴초 추출물이 HeLa 세포의 성장에 미치는 영향을 확인한 결과, 0.2 mg/mL 희렴초 에탄올을 첨가한 세포주의 성장이 무첨가군에 비해 유의적으로 억제되었다 (p<0.05). 그러나 희렴초 증류수 추출물을 처리한 경우, MCF-7과 HeLa 세포에서 암 성장 억제 효과를 나타내지 못함을 확인하였다.

7. 희렴초 추출물이 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 발현에 미치는 효과

암세포의 성장 및 전이는 세포외 기질 (extracellular matrix, ECM)의 분해와 신생혈관의 형성(angiogenesis) 후 종양세포의 순환계를 통한 이동, 타 조직에 부착하여 침윤하는 과정을 통해 발생한다(Kato et al. 2002). Matrix metalloproteinase(MMPs)는 세포외 기질의 재형성 및 분해를 통해 암의 전이 및 혈관 질환과 같은 다양한 생리적 과정과 연관되어 있다(Amar & Fields 2015). MMPs 중 MMP-2와 MMP-9의 발현이 세포외기질의 주요 구조 성분인 type IV collagen을 분해하여, 암세포의 침윤 및 전이와 연관된 것으로 보고되어 있다(Shay et al. 2015). 본 연구에서는 희렴초 추출물이 암세포 전이와 관련된 인자인 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보았다(Fig. 3). 희렴초 증류수 추출물이 두 종류의 암세포 증식에 아무런 영향을 미치지 못하였으므로, 희렴초 에탄올 추출물만을 이용하여 MCF-7과 HeLa 세포에서 MMP-2와

MMP-9의 mRNA 발현 양상을 측정하였다. 그 결



The data are reported as the mean \pm SD of triplicate experiments (n=3). Statistically significant ($p < 0.05$) compared with the *corresponding DMSO-treated control by one-way ANOVA.

Fig. 3. Effect of *Siegesbeckia glabrescens* Makino 80% EtOH extract on MMP mRNA expression in MCF-7 and HeLa cells.

과, MCF-7 세포주에 0.2 mg/mL 히렴초 에탄올 추출물 처리 시 MMP-2 mRNA 발현이 유의적으로 감소함을 나타내었으며($p < 0.05$), HeLa 세포에서는 차이를 보이지 않았다. 또한 히렴초 에탄올 추출물 (0.2 mg/mL)의 농도로 처리하였을 경우 MCF-7과 HeLa 세포주에서 MMP-9 mRNA 발현이 유의적으로 감소함을 나타내었다($p < 0.05$).

IV. 요약 및 결론

본 연구는 히렴초 에탄올 추출물 및 증류수 추출물을 이용하여 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량, DPPH, ABTS⁺ assay, reducing power 및 FRAP 분석을 이용한 free radical 소거능을 측정하고, MCF-7와 HeLa 세포주를 이용하여 히렴초 추출물 처리가 유방암 세포의 증식 억제 및 암 침윤에 미치는 영향에 관하여 연구하였다. 본 실험 결과, 히렴초 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량 및 총 폴리페놀 함량은 각각 120.86 mg RE/g, 182.92 mg TAE/g이었으며 히렴초 증류수 추출물의 총 플라보노이드 함량 및 총 폴리페놀 함량은 각각 61.35 mg RE/g, 160.39 mg TAE/g로 히렴초 에탄올 추출물에서 유의적으로 높은 수치를 나타내었다 ($p < 0.05$). 히렴초 에탄올 추출물의 DPPH 와 ABTS⁺ assay를 이용한 IC₅₀는 각각 0.53 mg/mL와 0.2 mg/mL이었으며, 히렴초 증류수 추출물의 경우는 각각 0.81 mg/mL와 0.27 mg/mL으로 히렴초 증류수 추출물보다 에탄올 추출물이 보다 우수한 항산화 효과를 나타내었다. Reducing power와 FRAP 활성을 분석한 결과, 히렴초 증류수 추출물보다 에탄올 추출물이 보다 높은 항산화력을 보여주었다. 또한 히렴초 에탄올 추출물 및 증류수 추출물(0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL)을 이용하여 MCF-7와 HeLa 세포주에서 세포 증식에 미치는 영향을 분석한 결

과, 희렴초 에탄올 추출물이 암세포의 증식을 억제하는 효과를 나타내었다. 위와 같은 결과를 바탕으로 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 발현을 통해 희렴초 추출물이 암세포 전이에 미치는 영향에 대해 검토하고자 하였으며, 희렴초 에탄올 추출물(0.1, 0.2 mg/mL)처리에 의해 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 본 연구 결과, 희렴초 에탄올 추출물이 희렴초 증류수 추출물보다 우수한 항산화활성을 가지고 있으며, 암세포의 증식 및 암 전이와 관련되어 억제효과를 가지고 있는 것으로 나타나 향후 암의 예방 및 치료를 위한 가능성과 함께 이들에 대한 기전 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

- Amar S, Fields GB(2015) Potential clinical implications of recent matrix metalloproteinase inhibitor design strategies. *Expert Rev Proteomics* 12(5), 445-447 doi:10.1586/14789450.2015.1069190
- Benzie IFF, Strain JJ(1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239(1), 70-76. doi:110.1006/abio.1996.0292
- Blois MS(1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nat* 181, 1199-1200. doi:10.1038/1811199a0
- Bors W, Michel C(2002) Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann N Y Acad Sci* 957, 57-69 doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb02905.x
- Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh MW, Oh SH(2002) Standard food analysis. Paju: Jigu-MoonwhaSa, pp381-382
- Folin O, Denis W(1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12(2), 239-249
- Goli AH, Barzegar M, Sahari MA(2005) Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chem* 92(3), 521-525. doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.020
- Hwang ES, Thi ND(2014). Effects of extraction and processing methods on antioxidant compound contents and radical scavenging activities of laver (*Porphyra tenera*). *Prev Nutr Food Sci* 19(1), 40-48. doi:10.3746/pnf.2014.19.1.040
- Heim KE, Tagliaferro AR Tagliaferro, Bobilya DJ(2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13(10), 572-584. doi:10.1016/s0955-2863(02)00208-5
- Hu F, Lu R, Huang B, Liang M(2004) Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. *Fitoterapia* 75(1), 14-23. doi:10.1016/j.fitote.2003.07.003
- Lee JM(2018) Comparison of nutritional components and antioxidant activities of *Eclipta prostrata* (L.) L. using different drying methods. *Korean J Community Living Sci* 29(1), 59-68. doi:110.7856/kjcls.2018.29.1.59
- Liu RH(2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* 134(12 Suppl), 3479S-3485S. doi:10.1093/jn/134.12.3479S
- Oyaizu M(1986) Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44, 307-315
- Park JA, Jin KS, Lee JY, Kwon HJ, Kim BW(2013) Anti-Oxidative and Anti-Obesity Activities of *Tetrapanax papyriferus* and *Siegesbeckia pubescens* Extracts and their Synergistic Anti-Obesity Effects. *Korean J Microbiol Biotechnol* 41(3), 341-349. doi:10.4014/kjmb.1306.06002
- 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(9-10), 1231-1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Ryu JH, Kim RJ, Lee SJ, Kim IS, Lee HJ, Sung NJ(2011) Nutritional properties and biological activities of *Artemisia annua* L. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40(2), 163-170. doi:10.3746/jkfn.2011.40.2.163
- Sabharwal SS, Schumacker PT(2014) Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an

Achilles' heel? Nat Rev Cancer 14(11), 709-721. doi:10.1038/nrc3803

Shay G, Lynch CC, Fingleton B(2015) Moving targets: emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. Matrix Biol May-Jul, 44-46:200-206 doi:10.1016/j.matbio.2015.01.019