



ISSN 1229-8565 (print) ISSN 2287-5190 (on-line)
한국지역사회생활과학회지 31(3): 365~373, 2020
Korean J Community Living Sci 31(3): 365~373, 2020
<http://doi.org/10.7856/kjcls.2020.31.3.365>

까마귀쪽나무 열매와 잎의 항산화 활성 및 암세포 증식억제 효과 비교

이 수 진 · 이 주 민^{†1)}

조선대학교 영양교육대학원 대학원생 · 조선대학교 식품영양학과 부교수¹⁾

Comparative Study of *Litsea japonica* Fruit and Leaf Extract on the Antioxidant and Anti-proliferation Effects in Breast Cancer Cells

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

This study evaluated the antioxidant potential and anti-proliferation effects in breast cancers using *Litsea japonica* (*L. japonica*) Jussieu (Lauraceae) (LJ) fruit and LJ leaf extract. The total flavonoid and total polyphenol contents in the LJ leaves were higher than in the LJ fruit. The LJ leaf extract had higher antioxidant activity than the LJ fruit extract, according to a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) assay. The LJ leaf extract showed better antioxidant activity than the LJ fruit using the FRAP and reducing power method. Next, the effects of the LJ fruit and LJ leaf extracts on MCF-7 and HCC38 breast cancer cells were examined in terms of cell proliferation. The results showed that the LJ fruit-treated breast cancer cells showed significantly reduced cell proliferation in a dose-response manner for 24 h and 48 h. On the other hand, LJ leaf extract did not affect cell proliferation. These findings suggest that the leaf extracts from LJ have strong antioxidant effects, and LJ fruit showed significant growth inhibition in breast cancer cells.

Key words: *Litsea japonica* (*L. japonica*) Jussieu, antioxidant activity, anti-proliferation effect, breast cancer cells

Received: 1 July, 2020 Revised: 15 July, 2020 Accepted: 24 August, 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

현대인의 건강을 해치는 암, 심혈관 질환 및 당뇨병과 같은 만성 질환을 예방하고 지연시키기 위한 여러 가지 방안으로 천연물 및 식물 유래 생리활성물질에 대한 관심이 높아지고 있다. 산화 스트레스는 만성 질환을 유발하는 중요한 원인 중 하나로 알려져 있으며, 지질, 단백질 및 DNA와 같은 중요한 생체 분자에 산화적 손상을 일으켜 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성에 기여한다(Rao & Amanat 2007). ROS의 생성은 정상적인 대사 과정의 부산물로, 식이, 흡연, 운동과 같은 요소들에 의해서도 생성되며, 항산화제는 ROS에 의한 손상을 완화하고 만성 질환 예방에 중요한 역할을 하며 노화의 지연 및 암의 생성을 억제하는데 기여하는 것으로 알려져 높은 관심이 집중되고 있다.

까마귀쪽나무(*Litsea japonica* (Thunb.) Jussieu)는 상록엽 소교목으로서 한국의 남쪽지역 및 일본에 주로 자생한다(Min et al. 2003). 까마귀쪽나무 열매에는 lactones, alkaloids 및 terpenoids 등이 포함되어 있으며(Tanaka et al. 1990), 주요한 생리활성성분으로 hamabiwalactone A, hamabiwalactone B, akolactone B, litsealactone A 및 litsealactone B 등이 보고되었다(Min et al. 2003). 까마귀쪽나무가 항염증에 미치는 영향에 대한 연구로는 대식세포에 염증 유발물질 lipopolysaccharid (LPS)과 까마귀쪽나무 잎을 처리한 경우 염증성 cytokine 증가에 대하여 유의적인 억제 효과를 보임을 확인하였다(Namkoong et al. 2015). 또한 위염을 유발하게 한 흰 쥐에게 까마귀쪽나무 열매 추출물을 투여한 결과 위염에 대한 억제효과가 있는 것으로 보고되었다(Park et al. 2017). 뿐만 아니라 까마귀쪽나무 추출물이

제2형 당뇨병(db/db mouse)에 당뇨병 유발 혈액-망막 장벽 분해를 차단하여 당뇨병성 합병증 예방 효과가 있음을 보고하였다(Kim et al. 2014). 현재까지 까마귀쪽나무를 이용하여 내성암세포주에서 apoptosis 유도효과(Kim et al. 2009)를 보인 연구가 있으나 다양한 암을 대상으로 한 항암 연구는 부족하며, 까마귀쪽나무 열매 및 잎을 이용하여 항산화능을 비교한 연구 역시 미비한 상태임으로 이에 대한 연구가 더욱 필요한 실정이다. 이에 본 연구에서는 까마귀쪽나무 열매와 잎의 항산화 효과를 비교 분석하고자 하였으며, 또한 유방암 세포주를 이용하여 까마귀쪽나무 열매 및 잎 추출물이 암의 증식억제에 미치는 영향에 대해 알아보려 하였다.

II. 연구방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 까마귀쪽나무 열매는 청명약초에서 분말의 형태로 2020년 2월에 구입하여 사용하였다. 까마귀쪽나무 잎은 제주시 한경면에서 2020년 2월에 채집한 것을 구입하여 깨끗이 수세한 후 냉동건조시켜 사용하였다. 까마귀쪽나무 열매와 잎은 -80°C 에서 냉동시킨 후 동결건조기(ED 8512, Ilshin, Yangju, Korea)를 이용하여 동결 건조한 후, 분쇄기(HR1378, Philips, Karner, Slovenia)로 분쇄하였다. 각각의 시료 분말은 분석 시까지 -70°C deep freezer(MDFU52V, Sanyo, Osaka, Japan)에 보관하였다.

2. 시료추출

건조된 까마귀쪽나무 열매와 잎 100 g에 80% 에탄올 1.5 L를 첨가한 후 65°C 의 heating mantle(Mtops ms-265, Seoul, Korea)에 환류냉각관을 부착하여 3시간씩 3회 반복 추출하였다. 이후

얻어진 까마귀쪽나무 열매와 잎 추출액을 whatman filter paper(Whatman No.2)로 여과한 후 여액을 rotary vacuum evaporator(EYELA VACUUM NVC-1100, Tokyo, Japan)를 이용하여 40℃ 수욕상에서 감압·농축한 후에 동결건조 하였다. 시료는 -70℃에 보관하여 분석 시 사용하였다.

3. 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량

총 플라보노이드 함량은 Davis법을 변형한 Chae et al.의 방법(2002)에 따라 측정하였다. 먼저 10 mg/mL 농도로 조제한 까마귀쪽나무 열매와 잎 에탄올 추출물 0.5 mL와 diethylene glycol (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 0.5 mL를 넣고 1N NaOH 10 µL을 첨가한 후 37℃ heating block에서 1시간 반응시킨후 UV-spectrophotometer (Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 rutin (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 표준검량곡선을 적용하여 총 플라보노이드 함량을 산출하였다. 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis의 방법(1912)에 따라 측정하였다. 10 mg/mL 농도로 조제한 까마귀쪽나무 열매와 잎 에탄올 추출물을 사용하여, 각 시료 0.5 mL와 Folin reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 0.5 mL을 혼합하여 3분간 실온에서 반응시킨 후, 10% Na₂CO₃용액 0.8 mL을 넣고 40분간 암소에서 반응시켰다. UV-spectrophotometer(Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준물질로 tannic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 표준검량곡선을 적용하여 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

4. DPPH 라디칼 소거능 측정

까마귀쪽나무 열매와 잎 추출물의 0.2 mM

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능은 Blois의 방법(1958)을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 0.2 mM DPPH 시약 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 900 µL에 농도별로 조제한 각각의 시료 100 µL을 첨가하여 37℃ heating block에 30분간 반응시켰다. 96 well plate에 200 µL씩 분주하고 UV-spectrophotometer (Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. ABTS⁺ 라디칼 소거능 측정

까마귀쪽나무 열매와 잎 추출물의 ABTS⁺ 라디칼 소거능은 Re의 방법(1999)을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 7 mM 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sul fonic acid(ABTS) 시약(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 2.4 mM potassium persulfate를 혼합하여 암소에서 24 시간 반응시킨다. 반응이 끝난 ABTS 시약 900 µL에 농도별로 조제한 시료 100 µL을 첨가하여 37℃ heating block에 30분간 반응시킨 후, UV-spectrophotometer(Bio-rad, Hercules, CA, USA)로 734 nm에서 흡광도를 측정하였다

6. Ferric reducing antioxidant power(FRAP) 측정

FRAP assay는 Benzie&Strain(1996)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. FRAP reagent는 300 mM sodium acetate buffer(pH 3.6) (Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA), 10 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 사용하였다. 각각의 시료 10 µL, 증류수 90 µL와 FRAP reagent 200

μ l를 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. Iron sulfate hexahydrate(Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA)를 표준물질로 하여 표준검량곡선을 적용해 추출물 1 mg에 들어있는 iron sulfate hexahydrate의 μ M 함량으로 나타내었다.

7. Reducing power 측정

Reducing power는 Oyaizu(1986)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 까마귀쪽나무 열매와 잎 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 20분 동안 방치하였다. 이후 10% trichloroacetic acid 200 μ l를 첨가한 후 14,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. 원심분리한 상층액 750 μ l, 증류수 750 μ l와 0.1% ferric chloride 100 μ l를 혼합하여 37°C에서 10분 동안 반응시키고 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 세포배양

실험에 사용된 인체유방암세포주 MCF-7과 HCC38은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 본 실험실에서 배양하여 사용하였다. MCF-7과 HCC38 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 HCC38 세포를 96 well plate에 2×10^3 /well로 분주하여 24시간 배양하였다. Dimethyl

sulfoxide(DMSO)에 녹인 까마귀쪽나무 열매와 잎 추출물을 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL의 농도로 24시간 및 48시간 처리한 후, CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) 용액(Promega, CA, USA)을 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. 통계처리

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 나타내었다. 각 시료간의 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 Student's t-test와 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하여 유의성을 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량

본 연구에 사용된 까마귀쪽나무 열매와 잎의 추출수율은 각각 22.38%와 18.96%로 나타났다. 여러 식물에 존재하는 플라보노이드류는 대표적인 항산화성 물질이며, 지질 과산화물 및 반응성 산소종의 생성을 억제하는 등의 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Heim et al. 2002). 까마귀쪽나무 열매와 잎 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량은 각각 23.23 mg RE/g과 60.52 mg RE/g으로 두 군간의 유의적인 차이를 나타내었다(Table 1). 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). 까마귀쪽나무 열매와 잎 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 72.90 mg TAE/g과 109.74 mg TAE/g로 두 군간의 유의적인 차이를 나타냈다. 녹나무과에 속하는 토후박나무껍질의 H₂O fraction 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 각각 189.92 mg/g과 58.38mg/g으로 나타나 본 연구와 다소 차이를 보였다(Xu et al. 2010). 또한 Hong (2013)은 50% 에탄올로 추출한 생강나무 잎의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 각각 311.84 mg/g과 259.05 mg/g으로 나타내었다.

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents of the *Litsea japonica* fruit and leaf extract

	LJ fruit	LJ leaf	F-value
Total polyphenol (mg TAE/g)	72.90 ± 3.79	109.74 ± 1.58	2.78***
Total flavonoid (mg RE/g)	23.23 ± 1.07	60.52 ± 2.05	2.63***

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

*p<0.05, **p<0.01; significantly different by Student's t-test between LJ fruit and LJ leaf

2. DPPH 라디칼 소거능

DPPH를 이용한 전자공여능 측정은 산화환원

반응으로부터 전자의 활동을 조사할수 있는 방법으로 널리 이용되고 있다(Hu et al. 2004). 까마귀쪽나무 열매와 잎의 추출물을 이용한 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 2에 나타냈다. 까마귀쪽나무 열매의 추출물을 이용한 DPPH 라디칼 소거능은 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL 농도에서 10.89%, 20.46%, 38.35%, 64.75%를 나타내었으며, 50%의 라디칼 소거능의 값인 IC₅₀을 구한 결과, 까마귀쪽나무 열매는 0.74 mg/mL를 나타냈다. 까마귀쪽나무 잎의 추출물을 이용한 DPPH 라디칼 소거능은 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL 농도에서 21.34%, 35.19%, 64.73%, 85.51%를 나타내었으며, 50%의 라디칼 소거능의 값인 IC₅₀을 구한 결과, 까마귀쪽나무 잎은 0.48 mg/mL를 나타내었다. 까마귀쪽나무 잎의 DPPH 라디칼 소거능이 까마귀쪽나무 열매에 비해 뛰어난 것을 확인하였다. 녹나무과에 속하는 육계피 추출물을 DPPH IC₅₀ 값을 측정한 결과, 0.89 mg/mL으로 본 연구와 유사한 결과를 보였다(Cha et al. 2018). 또한 *Endlicheria anomala* (Nees) Mez를 이용하여 측정한 DPPH IC₅₀ 값은 1.42 µg/mL로 본 논문과 다소 큰 차이를 보였다(Jin et al. 2013).

Table 2. DPPH radical-scavenging activity of the *Litsea japonica* fruit and leaf extract

Concentration (mg/mL)	DPPH radical scavenging activity (%)				F-value
	0.125	0.250	0.500	1.000	
LJ fruit	10.89 ± 1.11 ^a	20.46 ± 0.93 ^b	38.35 ± 3.48 ^c	64.75 ± 3.47 ^d	256.00***
LJ leaf	21.34 ± 0.90 ^b	35.19 ± 0.36 ^c	64.73 ± 1.10 ^d	85.51 ± 1.79 ^e	1864.00***

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, according to a Duncan's multiple range test.

*p<0.05, **p<0.01

3. ABTS⁺ 라디칼 소거능

ABTS 양이온 소거능은 ABTS 용액과 potassium persulfate의 반응에 의해 생성된 ABTS 양이온이 추출물의 항산화력에 의해 제거되는 것을 이용한 측정방법이다. 본 연구 결과, 까마귀쪽나무 열매의 추출물을 이용한 ABTS⁺ 라디칼 소거능은 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL 농도에서 각각 23.63%, 45.46%, 77.89%, 97.41%를 나타내었으며, 50%의 라디칼 소거능의 값인 IC₅₀은 0.30 mg/mL를 나타냈다. 까마귀쪽나무 잎 추출물을 이용한 ABTS⁺ 라디칼 소거능은 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL 농도에서 34.13%, 60.90%, 94.60%, 97.45%를 나타내었으며, 50%의 라디칼 소거능의 값인 IC₅₀을 구한 결과, 0.23 mg/mL를 나타냈다. 본 결과로 까마귀쪽나무 잎이 까마귀쪽나무 열매에 비해 ABTS⁺ 라디칼 소거능이 우수함을 확인하였다.

4. Reducing power 분석

환원력은 시료가 Fe³⁺에 수소를 공여하여 라디칼을 안정화시킴으로써 Fe²⁺로 환원되는 것을 이용한 방법으로 널리 이용된다(Hwang & Thi 2014). 까마귀쪽나무 열매와 잎 추출물의 reducing power 측정 결과는 Table 4와 같다. 까마귀쪽나무 열매의 추출물을 이용한 700 nm에서 측정한 환원력은 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL 농도에서 각각 0.05, 0.08, 0.27, 0.73, 1.49 나타났다. 까마귀쪽나무 잎의 환원력은 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL 농도에서 각각 0.05, 0.09, 0.27, 0.73, 1.49 나타났다. 까마귀쪽나무 열매와 잎 추출물 환원력은 농도 의존적으로 증가하였으며, 까마귀쪽나무 잎이 열매에 비해 뛰어난 것을 알 수 있다.

Table 3. ABTS⁺ radical-scavenging activity of *Litsea japonica* fruit and leaf extract

Concentration (mg/mL)	ABTS ⁺ radical scavenging activity (%)				F-value
	0.125	0.250	0.500	1.000	
LJ fruit	23.63 ± 0.96 ^a	45.46 ± 0.26 ^c	77.89 ± 0.54 ^e	97.41 ± 0.10 ^g	10,011.00 ^{***}
LJ leaf	34.13 ± 0.45 ^b	60.90 ± 1.15 ^d	94.60 ± 0.70 ^f	97.45 ± 0.01 ^g	5,390.00 ^{***}

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 according to a Duncan's multiple range test.

*p<0.05, **p<0.01

Table 4. Reducing power of the *Litsea japonica* fruit and leaf extract

(Absorbance at 700nm)

Concentration (mg/mL)	Reducing power					F-value
	0.125	0.250	0.500	1.000	2.000	
LJ fruit	0.05 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.04 ^a	0.27 ± 0.01 ^b	0.51 ± 0.02 ^c	0.92 ± 0.06 ^c	324.30 ^{***}
LJ leaf	0.05 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.01 ^a	0.27 ± 0.12 ^b	0.73 ± 0.02 ^d	1.49 ± 0.02 ^f	380.00 ^{***}

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 according to a Duncan's multiple range test.

*p<0.05, **p<0.01

5. FRAP 분석

FRAP은 항산화물질에 의해 ferric 2,4,6-tripyridyl-striazine[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). 까마귀쪽나무 열매와 잎 추출물의 FRAP 활성은 Table 5와 같다. 까마귀쪽나무 열매 추출물 1.0 mg/mL 농도에서 FRAP 활성을 측정한 결과, 까마귀쪽나무 열매는 24.95 μM, 까마귀쪽나무 잎은 55.44 μM으로 까마귀쪽나무 잎의 FRAP 활성이 유의적으로 더 높음을 알 수 있었다. Hong (2013)의 연구에 따르면 50% 에탄올로 추출한 생강나무 잎의 FRAP 활성은 1.70 mg/g으로 나타나 본 연구와 상이함을 보였다.

6. 까마귀쪽나무 열매와 잎 추출물이 유방암세포의 성장에 미치는 영향

까마귀쪽나무 열매와 잎 추출물이 인체 유방암 세포인 MCF-7과 HCC38 세포의 성장에 미치는 영향을 MTS assay를 통해 측정하였으며 그 결과는 Table 6과 7에 나타내었다. 유방암세포주에 까마귀쪽나무 열매 추출물 0.025 g/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL 및 0.2 mg/mL을 24시간과 48시간 동안 처리하였을 경우, 암세포의 성장이 무처리한 군에 비해 유의적으로 억제되는 효과를 나타내었다. 그러나 까마귀쪽나무 잎 추출물의 경우는 암 성장 억제 효과를 나타내지 못함을 확인하였다. 본 연구 결과를 토대로 까마귀쪽나무 잎 추출물이 까마귀쪽나무 열매 추출물에 비해 높은 항산화 효과를 나타내었던 것과 달리 까마귀쪽나무 열매 추출물이 암세포의 성장을 억제 저해율을

Table 5. Ferric reducing antioxidant power of the *Litsea japonica* fruit and leaf extract

	LJ fruit	LJ leaf	F-value
Ferric reducing antioxidant power	24.95 ± 0.60	55.44 ± 2.76	6.24 ^{*,**}

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

*p<0.05, **p<0.01; significantly different according to a Student's t-test between LJ fruit and LJ leaf

Table 6. Effect of the *Litsea japonica* fruit and leaf extract on the proliferation of MCF-7 breast cancer cells for 24 and 48 h according to an MTS assay

Concentration (mg/mL)	MCF-7 cell proliferation (24 h)					F-value
	0	0.025	0.05	0.1	0.2	
LJ fruit	100.00 ± 3.16 ^c	76.82 ± 1.64 ^d	55.61 ± 0.25 ^c	39.97 ± 1.56 ^b	20.88 ± 0.86 ^a	902.19 [*]
LJ leaf	100.00 ± 6.33	100.68 ± 2.86	106.50 ± 6.72	106.79 ± 6.18	113.37 ± 11.70	1.65 ^{N.S.}
Concentration (mg/mL)	MCF-7 cell proliferation (48 h)					F-value
	0	0.025	0.05	0.1	0.2	
LJ fruit	100.00 ± 9.32 ^d	75.19 ± 5.18 ^c	33.88 ± 0.25 ^b	39.97 ± 2.39 ^a	9.61 ± 0.40 ^a	177.24 [*]
LJ leaf	100.00 ± 5.31	103.61 ± 10.14	113.97 ± 2.81	113.74 ± 3.42	113.51 ± 4.86	3.82 ^{N.S.}

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 according to a Duncan's multiple range test.

N.S, non-significant, *p<0.05

Table 7. Effect of *Litsea japonica* fruit and leaf extract on the proliferation of HCC38 breast cancer cells for 24 and 48 h according to an MTS assay

HCC38 cell proliferation (24 h)						
Concentration (mg/mL)	0	0.025	0.05	0.1	0.2	F-value
LJ fruit	100.00 ± 6.41 ^d	74.36 ± 1.61 ^c	44.58 ± 3.52 ^b	31.98 ± 0.61 ^a	32.42 ± 0.31 ^a	234.19*
LJ leaf	100.00 ± 2.14	97.98 ± 8.01	103.30 ± 4.47	113.54 ± 4.92	117.26 ± 12.59	4.00 ^{N.S.}
HCC38 cell proliferation (48 h)						
Concentration (mg/mL)	0	0.025	0.05	0.1	0.2	F-value
LJ fruit	100.00 ± 7.52 ^c	62.86 ± 2.61 ^b	26.46 ± 4.28 ^a	18.16 ± 0.57 ^a	21.29 ± 1.92 ^a	217.52*
LJ leaf	100.00 ± 10.93	95.52 ± 12.02	98.68 ± 16.23	105.72 ± 10.72	109.59 ± 14.55	0.56 ^{N.S.}

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 according to a Duncan's multiple range test.

N.S, non-significant, *p<0.05

나타내어 향후 이에 따른 생리활성물질에 대한 규명이 필요할 것으로 사료된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구는 까마귀쪽나무 열매와 잎 추출물을 이용하여 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량, DPPH, ABTS⁺ assay, reducing power 및 FRAP 분석을 이용한 free radical 소거능을 측정하고, 인체 유래 유방암세포인 MCF-7와 HCC38 세포주를 이용하여 까마귀쪽나무 열매와 잎 추출물 처리에 의해 유발되는 유방암 세포의 증식 억제에 미치는 영향에 관하여 연구하였다. 본 실험 결과, 까마귀쪽나무 열매의 총 플라보노이드 함량 및 총 폴리페놀 함량은 각각 23.23 mg RE/g, 72.90 mg TAE/g이었으며 까마귀쪽나무 잎의 총 플라보노이드 함량 및 총 폴리페놀 함량은 각각 60.52 mg RE/g, 109.74 mg TAE/g로 까마귀쪽나무 잎에서 유의적으로 높은 수치를 나타내었다. 까마귀쪽나무 열매 추출물의 DPPH 와 ABTS⁺ assay를 이용한 IC₅₀는 각각 0.74 mg/mL와 0.3 mg/mL이었으며, 까마귀쪽나무 잎 추출물의 경우는

각각 0.48 mg/mL와 0.23 mg/mL으로 까마귀쪽나무 열매보다 잎이 보다 우수한 항산화 효과를 나타내었다. Reducing power와 FRAP 활성을 분석한 결과, 까마귀쪽나무 열매보다 잎 추출물이 보다 우수하였다. 까마귀쪽나무 열매와 잎 추출물 (0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL)을 이용하여 MCF-7와 HCC38 유방암세포주에서 세포 증식에 미치는 영향을 분석한 결과, 까마귀쪽나무 잎은 암세포의 억제에 영향을 미치지 못하는 반면 까마귀쪽나무 열매 추출물이 암세포의 증식을 억제하는 효과를 나타내었다. 위와 같은 결과를 통하여 까마귀쪽나무 잎은 까마귀쪽나무 열매에 비해 우수한 항산화활성을 가지고 있으며, 유방암세포주에 있어 까마귀쪽나무 열매가 세포증식 억제효과를 가지고 있는 것으로 나타나 이러한 결과를 통해 까마귀쪽나무 열매와 잎이 향후 여러 분야에서 다양한 식품 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

References

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:10.1006/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
- Cha J, Kim CT, Cho YJ(2010) Effect of extraction methods on flavoring compounds and antioxidant activity of extracts from Cinnamon (*Cinnamomum cassia* Blume). Food Eng Prog 22(4), 304-308
- Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh MW, Oh SH(2002) Standard food analysis. Paju: JigumoonwhaSa, pp381-382
- Folin O, Denis W(1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem 12(2), 239-249
- 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
- Hong JH(2013) Physiological Activities of leaf and twig extracts from *Lindera obtusiloba* Blume. Korean J Food Cookery Sci 29(5), 573-580. doi:10.9724/kfcs.2013.29.5.573
- 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
- Jin KS, Lee JY, Kwon HJ, Kim BW(2013) Anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-melanogenic activities of *Endlicheria anomala* extract. Korean J Microb Biotech 41(4), 433-441. doi:10.4014/kjmb.1309.09005
- Kim MK, Kim SC, Kang JI, Yoo ES, Kang HK, Kim E, Boo HJ, Hyun JH(2009) The effects of *Litsea japonica* on the induction of apoptosis in HL-60/ADR Korea J Pharmacogn 40(1), 65-69
- Min BS, Lee SY, Kim JH, Kwon OK, Park BY, An RB, Lee JK, Moon HI, Kim TJ, Kim YH, Joung H, Lee HK(2003) Lactones from the leaves of the *Litsea japonica* and their anti-complement activity. J Nat Prod 66(10), 1388-1390. doi:10.1021/np030227i
- Kim J, Kim CS, Lee IS, Lee YM, Sohn E, Jo K, Kim JH(2014) Extract of *Litsea japonica* ameliorates blood-retinal barrier breakdown in db/db mice. Endocrine 46(3), 462-469. doi:10.1007/s12020-013-0085-x
- Namkoong S, Jang SA, Sohn EH, Bak JP, Sohn E, Koo HJ, Yoon WJ, Kwon JE, Jeong YJ, Meng X, Han HS, Kang SC(2015) Comparative study of *Litsea japonica* leaf and fruit extract on the anti-inflammatory effects. Korean J Plant Res 28(2), 145-152. doi:10.7732/kjpr.2015.28.2.145
- 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 SH, Park IJ, Yun JH, Choi GH, Kim HJ, Seo YH, Cho JH(2017) Protective effect of *Litsea japonica* fruit flesh extract on indomethacin-induced gastritis in rats. Korean J Food Preserv 24(7), 1017-1024. doi:10.13103/JFHS.2017.32.6.536
- Rao AV, Amanat Ali(2007) Biologically active phytochemicals in human health: Lycopene. Int J Food Prop 10(2), 279-288. doi:10.1080/10942910601052673
- 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
- Tanaka H, Nakamura T, Ichino K, Ito K, Tanaka KT(1990) Butanolides from *Litsea japonica*. Phytochem 29(3), 857-859. doi:10.1016/0031-9422(90)80033-D
- Yoon WJ, Song SM, Ham YM, Oh DJ, Ko CS, Yoon SA, Lee YB, Park DW, Jeong YJ, Kwon JE, Cho YM, Cho JH, Kim CS, Kang SC(2015) Anti-osteoarthritis effects on fruit extract of *Litsea japonica*. Korean J Plant Res 28(5), 591-599. doi:10.7732/kjpr.2015.28.5.591
- Xu ML, Hu JH, Wang L, Kim HS, Jin CW, Cho DH(2010) Antioxidant and anti-diabetes activity of extracts from *machilus thunbergii* S. et Z. Korean J Med Crop 18(1), 34-39