



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

초석잠 뿌리 및 잎의 화학성분 분석 및
생리활성

Analysis of Chemical Components and Biological Activities
of Roots and Leaves from *Stachys sieboldii* Miq.



지도교수 임 선 영

2018년 2월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과

이 정 우

본 논문을 이정우의 이학석사 학위논문으로 인준함



한국해양대학교 대학원

목 차

List of Tables	iv
List of Figures	v
Abstract	2
1. 서 론	4
2. 재료 및 방법	7
2.1. 재료	7
2.2. 초석잠 뿌리와 잎 추출 및 분획	7
2.3. 초석잠 뿌리와 잎의 활성 성분 분리	8
2.4. 초석잠 뿌리와 잎의 총 플라보노이드 함량 측정	10
2.5. 초석잠 뿌리와 잎의 총 페놀 함량 측정	11
2.6. 초석잠 뿌리와 잎의 지질 및 지방산 추출	12
2.7. Gas chromatography를 이용한 초석잠 뿌리와 잎의 지방산 분석 ..	14
2.8. 초석잠 뿌리와 잎 생리활성 측정	15
2.8.1. 항암 실험	15
① 세포 배양	15
② MTT assay	16
2.8.2. 항산화 실험	18
① 세포 배양	18
② 세포 내 활성산소종 (Reactive oxygen species) 측정	19
③ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazly (DPPH) 라디칼 소거 활성 측정 ·	21
④ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt radical cation (ABTS+) 라디칼 소거활성 측정 ...	23
⑤ Genomic DNA 추출 및 DNA 산화 생성물 측정	25

⑥ 세포 내 Glutathione (GSH) 함량 측정	25
2.8.3. 항염증 실험	25
① 세포 내 Nitric oxide (NO) 생성 측정	25
2.9. 통계 분석	26
3. 결과 및 고찰	27
3.1. 초석잠 뿌리와 잎의 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량	27
3.1.1 초석잠 뿌리의 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량	27
3.1.2 초석잠 잎의 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량	29
3.2. 초석잠 뿌리와 잎의 지방산 조성	31
3.2.1 초석잠 뿌리의 지방산 조성	31
3.2.2 초석잠 잎의 지방산 조성	33
3.3. 초석잠 뿌리와 잎의 추출물 및 분획물의 생리활성	35
3.3.1. 초석잠 뿌리와 잎 추출물 및 분획물의 항암 효과	35
3.3.1.1 초석잠 뿌리 추출물 및 분획물의 항암 효과	35
3.3.1.2 초석잠 잎 추출물 및 분획물의 항암 효과	45
3.3.2. 초석잠 뿌리와 잎 추출물 및 분획물의 항산화 효과	55
3.3.2.1 초석잠 뿌리 추출물 및 분획물의 항산화 효과	55
① 초석잠 뿌리가 세포 내 활성산소종 (Reactive oxygen species) 생성 억제효과	55
② 초석잠 뿌리의 DPPH 라디칼 소거활성	58
③ 초석잠 뿌리의 ABTS+ 라디칼 소거활성	60
④ 초석잠 뿌리의 Genomic DNA 산화 억제효과	62
⑤ 초석잠 뿌리가 Glutathione (GSH) 생성에 미치는 효과	64
3.3.2.2 초석잠 잎 추출물 및 분획물의 항산화 효과	67
① 초석잠 잎의 세포 내 활성산소종 (Reactive oxygen species) 생성 억제효과	67
② 초석잠 잎의 DPPH 라디칼 소거활성	70
③ 초석잠 잎의 ABTS+ 라디칼 소거활성	72

④ 초석잠 잎의 Genomic DNA 산화 억제효과	74
⑤ 초석잠 잎의 Glutathione (GSH) 생성에 미치는 효과	76
3.3.3.1 초석잠 뿌리 추출물 및 분획물의 항염증 효과	67
① 세포 내 Nitric oxide (NO) 생성 저해효과	67
3.3.3.2 초석잠 잎 추출물 및 분획물의 항염증 효과	67
① 세포 내 Nitric oxide (NO) 생성 저해효과	67

4. 요약 및 결론	93
참고문헌	96
감사의 글	103



List of Tables

Table 1. Contents of total flavonoids and phenols of extracts and fractions from root of <i>Stachys sieboldii</i> Miq.	28
Table 2. Contents of total flavonoids and phenols of extracts and fractions from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Miq.	30
Table 3. Fatty acid composition(% area) of root of <i>Stachys sieboldii</i> Miq.	32
Table 4. Fatty acid composition(% area) of leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Miq.	34
Table 5. IC ₅₀ values of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from root of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on the growth of AGS, HT-29 and HT-1080 cells	39
Table 6. IC ₅₀ values of solvent fractions from root of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on the growth of AGS, HT-29 and HT-1080 cells	44
Table 7. IC ₅₀ values of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on the growth of AGS, HT-29 and HT-1080 cells	49
Table 8. IC ₅₀ values of solvent fractions from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on the growth of AGS, HT-29 and HT-1080 cells	54
Table 9. DPPH radical scavenging effect of solvent extracts and fractions from root of <i>Stachys sieboldii</i> Miq.	59
Table 10. ABTS radical scavenging effect of solvent extracts and fractions from root of <i>Stachys sieboldii</i> Miq.	61
Table 11. DPPH radical scavenging effect of solvent extracts and fractions from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Miq.	71
Table 12. ABTS radical scavenging effect of solvent extracts and fractions from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Miq.	73

List of Figures

- Fig. 1. Preparation of crude extraction and solvent fractions from root of *Stachys sieboldii* Miq. 8
- Fig. 2. Preparation of crude extraction and solvent fractions from leaf of *Stachys sieboldii* Miq. 9
- Fig. 3. Procedure of extracts of lipids and fatty acids 13
- Fig. 4. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells 17
- Fig. 5. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system 20
- Fig. 6. Scavenging of the DPPH radical by phenol 22
- Fig. 7. Scavenging of the ABTS radical 24
- Fig. 8. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from root of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells36
- Fig. 9. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from root of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of HT-29 human colon cancer cells37
- Fig. 10. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from root of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of HT-1080 cell line38
- Fig. 11. Inhibitory effect of solvent fractions of extracts from root of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma41
- Fig. 12. Inhibitory effect of solvent fractions of extracts from root of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of HT-29 human colon cancer cells42
- Fig. 13. Inhibitory effect of solvent fraction of extracts from root of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of HT-1080 cell line43

Fig. 14.	Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Mq. on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells	46
Fig. 15.	Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Mq. on the growth of HT-29 human colon cancer cells	47
Fig. 16.	Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Mq. on the growth of HT-1080 cell line	48
Fig. 17.	Inhibitory effect of solvent fractions of extracts from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Mq. on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma ..	51
Fig. 18.	Inhibitory effect of solvent fractions of extracts from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Mq. on the growth of HT-29 human colon cancer cells	52
Fig. 19.	Inhibitory effect of solvent fraction of extracts from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Mq. on the growth of HT-1080 cell line	53
Fig. 20.	Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from root of <i>Stachys sieboldii</i> Mq. on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells	56
Fig. 21.	Inhibitory effect of solvent fractions of extracts from root of <i>Stachys sieboldii</i> Mq. on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells	57
Fig. 22.	Antioxidant effect of crude extracts and solvent fractions from root of <i>Stachys sieboldii</i> Mq. on genomic DNA in HT-1080 human fibrosarcoma cells	63
Fig. 23.	Effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from root of <i>Stachys sieboldii</i> Mq. on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells	65
Fig. 24.	Effect of solvent fractions of extracts from root of <i>Stachys sieboldii</i> Mq. on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells	66

Fig. 25. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells	68
Fig. 26. Inhibitory effect of solvent fractions of extracts from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells	69
Fig. 27. Antioxidant effect of crude extracts and solvent fractions from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on genomic DNA in HT-1080 human fibrosarcoma cells	75
Fig. 28. Effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells	77
Fig. 29. Effect of solvent fractions of extracts from leaf of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells	78
Fig. 30. Effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from roots of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells	80
Fig. 31. Effect of <i>n</i> -Hexane fraction from roots of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells	82
Fig. 32. Effect of 85% aq. MeOH fraction from roots of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells	83
Fig. 33. Effect of <i>n</i> -BuOH fraction from roots of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells	84
Fig. 34. Effect of Water fraction from roots of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cell	85
Fig. 35. Effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaves of <i>Stachys sieboldii</i> Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells	87

Fig. 36. Effect of *n*-Hexane fraction from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells89

Fig. 37. Effect of 85% aq. MeOH fraction from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells90

Fig. 38. Effect of *n*-BuOH fraction from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells91

Fig. 39. Effect of Water fraction from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cell92



Analysis of Chemical Components and Biological Activities of Roots and Leaves from *Stachys sieboldii* Miq.

Lee, Jung Woo

Division of Marine Bioscience and Environment, Graduate School of Korea
Maritime and Ocean University, Busan 49112, Korea
(Advisor : Prof. Sun-Young Lim)



Abstract

This study analyzed flavonoid and phenol contents and fatty acid composition of *Stachys sieboldii* Miq. and investigated biological activities of crude extracts and fractions of *S. sieboldii* Miq. The flavonoid and phenol contents of the methanol (MeOH) extract were greater than those of the acetone+methylene chloride (A+M) extract. Among fractions, the flavonoid and phenol contents of the *n*-butanol (*n*-BuOH) fraction were highest in root of *S. sieboldii* Miq., while the flavonoid and phenol contents of the 85% aqueous methanol (85% aq. MeOH) fraction were highest in leaves of *S. sieboldii* Miq. In fatty acid composition of root of *S. sieboldii* Miq., the percentages of linoleic acid (LA, 18:2n-6), linolenic acid (LNA, 18:3n-3) and oleic acid (OA, 18:1n-9) were 54.27%, 20.82% and 2.28%, respectively. Leaves of *S. sieboldii* Miq. showed that the percentages of LA, LNA and OA were 11.27%, 16.37% and 5.45%, respectively.

In anticancer activity, treatments of crude extracts and fractions from *S. sieboldii* Miq. significantly inhibited the growth of HT-29, AGS and HT-1080 human cancer cell lines ($p < 0.05$). Both A+M and MeOH extracts from roots and leaves showed inhibitory effects on growth by more than 50% at the concentrations of 0.5 mg/mL in AGS and HT-1080 cancer cells. Among the fractions, the 85% aq. MeOH and *n*-Hexane fractions exhibited a higher inhibitory effect on proliferation of three types of cancer cells.

In antioxidant activity, all tested extracts and fractions of *S. sieboldii* Miq. dose-dependently decreased cellular reactive oxygen species (ROS) production induced by H₂O₂ in comparison with that produced by exposure to the extract-free control. The A+M extract of roots showed a higher inhibitory effect on cellular ROS producing than that of the MeOH extract at all concentrations tested. On the other hand, MeOH extract of leaves showed a higher inhibitory effect on cellular ROS producing than that of the A+M extract at all concentrations tested. Among the fractions, both BuOH fraction (0.1 mg/mL concentration) from roots and leaves showed a higher inhibitory effect on cellular ROS production. In DPPH and ABTS radical scavenging assay, the A+M extract from roots showed a greater scavenging effect than that of the MeOH extract of roots ($p < 0.05$). Among extracts from leaves, MeOH extract showed a greater scavenging effect than that of the A+M extract ($p < 0.05$). The *n*-BuOH fraction showed a stronger radical inhibitory effect than dibutyl hydroxy toluene (BHT). The A+M and MeOH extracts from *S. sieboldii* Miq. significantly inhibited genomic DNA oxidation ($p < 0.05$). The 85% aq. MeOH fraction showed a higher inhibitory effect against DNA oxidation compared with control ($p < 0.05$). In addition, the extracts and fractions from *S. sieboldii* Miq. increased levels of intracellular glutathione (GSH) in a dose manner.

In anti-inflammatory activity, the productions of nitric oxide (NO) assay showed that the extracts and fractions significantly reduced NO production induced by lipopolysaccharide (LPS) ($p < 0.05$). The *n*-BuOH fraction from roots of *S. sieboldii* Miq. showed the highest reduction of NO production by 75.4% and then A+M and MeOH extracts showed reduced NO production by 67.9% and 78.4%. The *n*-BuOH fraction from leaves of *S. sieboldii* Miq. showed the highest reduction of NO production by 61.4% and then A+M and MeOH extracts showed reduced NO production by 57.7% and 61.1%. respectively ($p < 0.05$).

These results suggested that 85% aq. MeOH and *n*-BuOH fractions from roots and leaves of *S. sieboldii* Miq. inhibited cellular oxidation and growth of human cancer cells, suggesting that their biological activity may be associated with the contents of flavonoids and phenols. Thus, *S. sieboldii* Miq. might be useful for providing valuable materials to the pharmaceutical, cosmetic nutraceutical and food industries.



제 1 장 서 론

초석잠은 중국의 전통적인 건강채소로서 중국, 일본 및 러시아 등에서 주로 재배되고 있다. 1년생 본초로 줄기는 직립이며, 잎은 장 타원형에, 꽃은 8월 하순에 담홍색으로 이삭모양의 작은 꽃을 개화한다. 뿌리는 가을에 지하에서 3~6 cm 정도로 자라는데 형태가 동충하초와 비슷하고 약효도 비슷하여 식물의 동충하초라고 불린다. 일본에서는 정월 요리에 귀하게 사용되기도 하며, 중국의 중약편에 의하면 뇌경색과 노인성치매 예방에 효과적이며 또한 기억력 증진과 장을 강화하는 효과가 있어 장수채로 알려져 있다. 초석잠은 뿌리뿐만 아니라 잎도 식용이 가능하여 초석잠 잎은 나물로 먹거나 말려서 차로 사용하기도 한다. 초석잠분말의 부위별 영양성분은 잎 분말이 뿌리 분말에 비하여 조단백질과 조지방 함량이 높았고 총아미노산과 필수아미노산 함량 또한 잎 분말이 뿌리 분말에 비해 높다고 보고하였다(Kim, et al., 2017). 초석잠은 동물의 뇌 조직에서 acetylcholine esterase의 활성을 억제하여 치매증상을 개선시키고, monoamine oxidase와 xanthine oxidase의 활성을 저해하여 뇌의 정상적인 기능 유지 및 활성산소에 의한 뇌 조직의 손상을 억제한다고 보고되어 있다(Ryu & Kim, 2004).

최근 생활환경과 식습관 변화와 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 노화억제와 성인병 예방을 위한 이러한 항산화물질에 대한 관심도 함께 높아져 자유라디칼을 방어하는 항산화물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Imai, et al., 1994; Re, et al., 1999). 최근 Kang 등(2017)은 초석잠 추출물에 의한 항산화 효능을 보고하였고(Kang, et al., 2017), Baek 등(2004)은 초석잠 메탄올 추출물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 이용해 분획하여 UV/VIS 흡광광도계를 이용하여 Flavones 계통의 phenolic compounds가 초석잠속에 함유되어있음을 규명하였다(Baek, et al., 2004). 또한 초석잠 뿌리와 줄기 추출물은 과산화 지질의 형성을 억제하고 아질산염을 소거하는 등의 항산화 활성을 보였다(Na & Lee,

2017; Jeon & Park, 2015; Lee, et al., 2016). Yamahara 등(1990)은 초석잠의 잎, 줄기 및 뿌리의 추출물을 분석한 결과, 항산화 활성, 세포막의 지질과산화물이 억제되어 치매예방과 기억력 개선에 효과가 있다고 보고하였다(Yamahara, et al., 1990). Lee 등(2014)은 초석잠 분말을 첨가한 두부의 항산화 활성 및 품질 특성을 연구한 결과 초석잠 첨가 두부가 미첨가 두부보다 기호도와 항산화 활성이 우수함을 보고하였다. Yang (2012)은 초석잠을 활용한 기능성 즉석식품 개발 연구에서 돈육 패티제조 시 초석잠 메탄올 추출물 첨가는 저장 중 지방의 산화방지, 총균, 대장균 및 식중독균의 증식 억제, 풍미를 향상시킨다고 보고하였다. 또한 초석잠 잎 핵산 추출물의 식중독균에 대한 천연 항균활성 가능성도 검토된바 있다(Ryu & Park, 2002). Ryu 등(2002)은 초석잠 알코올 추출물이 마우스 비장세포의 증식반응은 항진 시키고 YAC-1 세포주의 증식능은 억제시켰다고 보고하였다. 또한 CD4+/CD8+ T 세포와 비장세포에서 IL-2 수용체의 발현을 증진시켰다고 초석잠의 항암효과 및 면역조절자로서의 기능을 보고하였다.(Ryu, et al., 2002)

인간의 노화와 질병의 주요 원인으로 알려진 자유라디칼(free radical)은 생체 내에서 산화되는 생리기능에 스트레스를 가하는 현상인 산화스트레스(oxidative stress)를 유발하는 것으로 알려져 있으며(Macrae, et al., 1993), 이러한 자유라디칼은 세포막 손상, 단백질 분해, 지질 산화 및 DNA 변성 등을 초래하여 각종 성인병을 유발한다(Halliwell, et al., 1984). 현재 산화스트레스를 막기 위해 천연항산화제 및 합성항산화제가 사용되고 있는데, 이러한 항산화제는 산소를 제거하거나 흡수하는 것이 아니라 자유기와 반응함으로써 특정 비타민류와 필수 아미노산 등의 손실을 최소화 하거나, 유지 제품의 산패를 지연 또는 방지하는 목적으로 사용된다. 합성항산화제로는 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT)등이 있으며, 특히 BHT는 여러 연구 결과 실험동물의 간에서 마이크로솜 효소 활성(microsomal enzyme activity)을 증가시킨다는 것이 알려지면서, 이들 합성항산화제의 안전성에 대한 논란이 제기되어 현재는 그 사용량이 법적으로 규제되어 있다(Brannen, 1975; Ito, et al., 1983; Chan, et al., 1993). 그에 따라 기능성과 안전성 면에서 두각을 나타내는 식물유래

천연항산화제의 연구가 활발히 진행되고 있는 추세이다(Kim, et al., 2012; Rice-Evans, et al., 1997). 다양한 식물에 포함되어있는 플라보노이드는 활성산소종을 효과적으로 제거하여 항산화능이 높다고 알려져 있으며 폴리페놀과 마찬가지로 항바이러스, 항염증, 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있다.(Tsao, 2010; Heim, et al., 2002; williams, et al., 2004; Sohn, et al., 2008)

따라서 본 연구에서는 초석잠 뿌리 및 잎을 이용하여 극성이 다른 유기용매로 추출 후 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량을 측정하고 지방산 조성을 검토하였으며 다시 초석잠 뿌리 및 잎의 생리활성에 대해 알아보고자 하였다.



제 2 장 재료 및 방법

2.1 재료

본 실험에 사용한 초석잠은 미산약초농장(경상북도 대구광역시)로부터 건조 초석잠을 구입하여 사용하였다.

2.2 초석잠 뿌리 및 잎의 추출 및 분획

초석잠의 유기용매 추출을 위하여 acetone:methylene chloride 를 1:1 비율로 혼합하여 초석잠이 충분히 잠기도록 하여 24 시간 방치한 후 추출하였다. 이 과정을 2 회 반복하여 얻은 여액은 40°C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (N-1000, Eyela, Japan)로 농축하여 acetone/methylene chloride (A+M) 추출물을 얻었다. A+M 용매로 추출되지 않은 성분을 methanol (MeOH)로 추출하고자 남은 잔사에 A+M 과 동량의 MeOH 을 부어 위와 동일한 방법으로 2 회 반복한 후 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 두 용매로부터 최대 수득한 추출물을 혼합하여 다시 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-butanol (*n*-BuOH), Water 분획물을 얻었다. 실험에는 각각의 추출물을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 세포배지로 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 DMSO 의 최종 농도는 0.1% 이하가 되도록 하였다(Fig. 1).

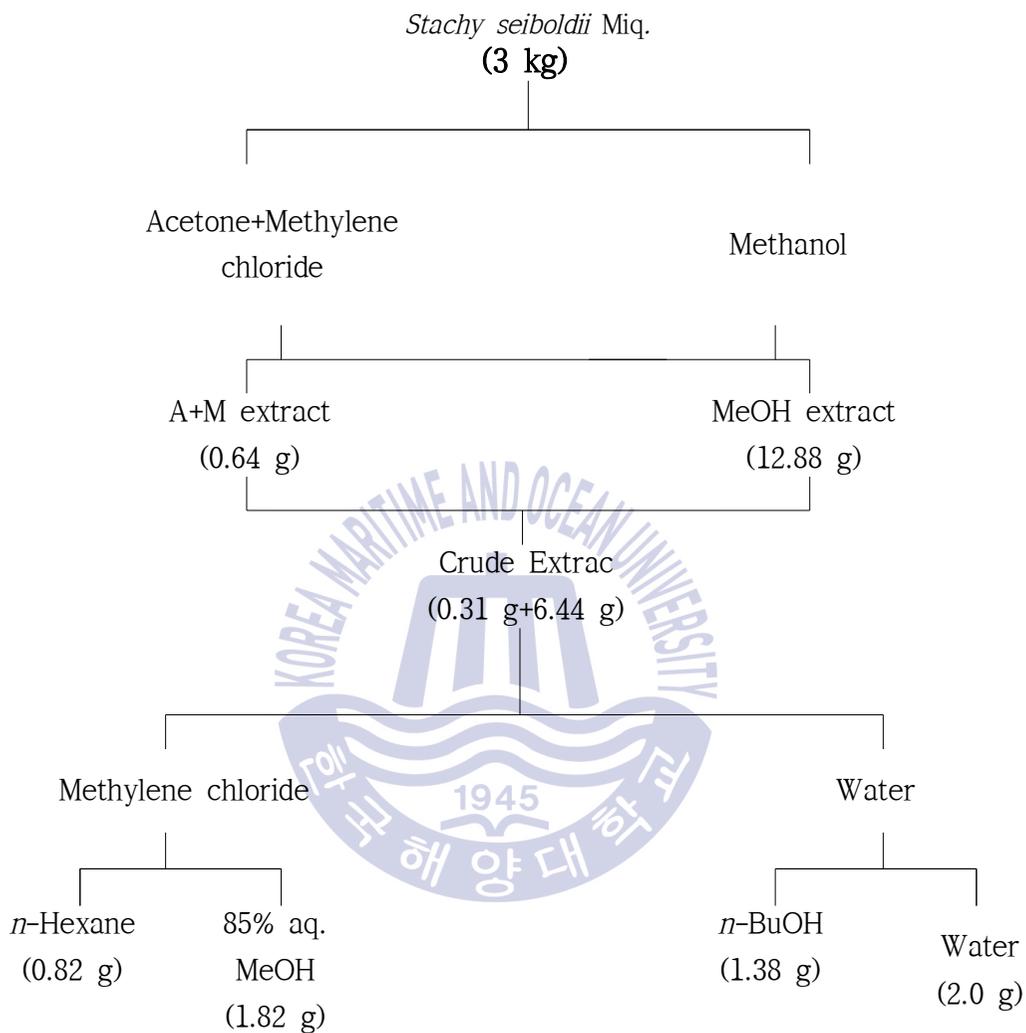


Fig. 1. Preparation of crude extraction and solvent fractions from root of *Stachys sieboldii* Miq.

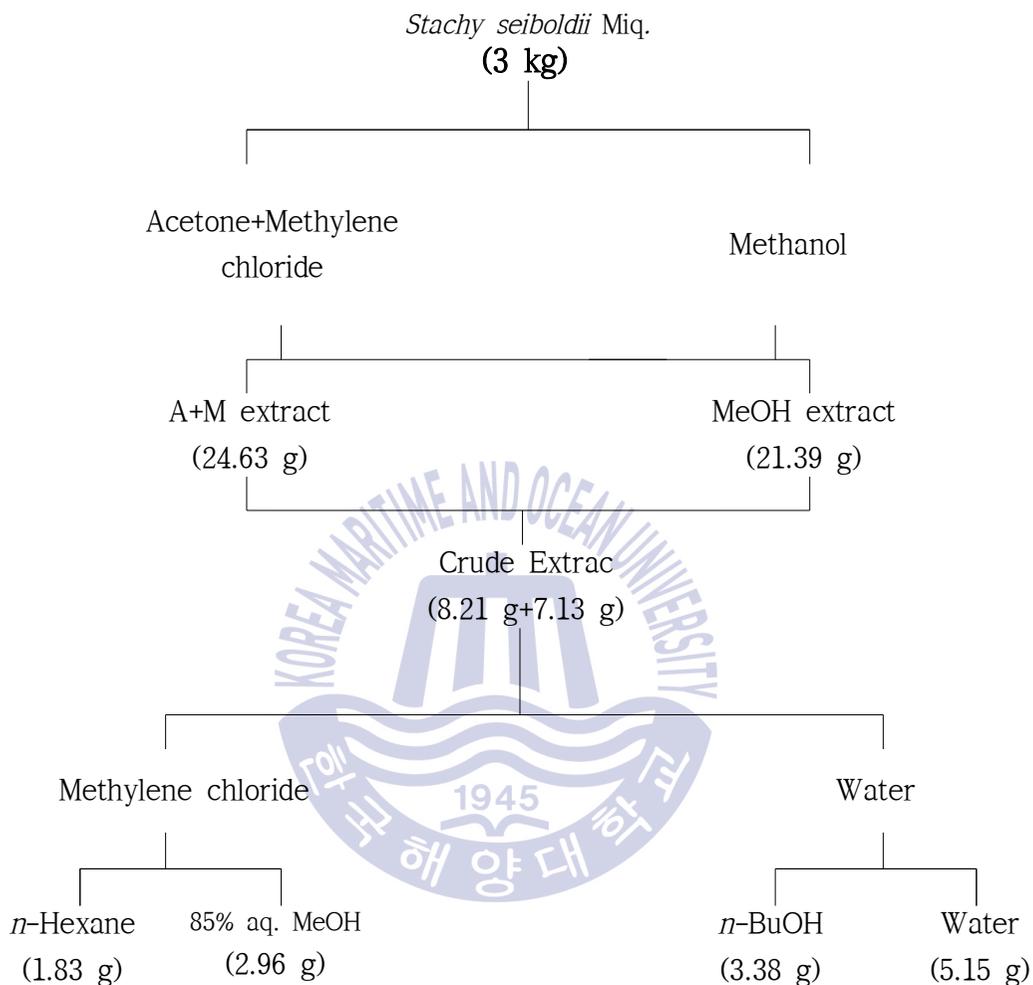


Fig. 2. Preparation of crude extraction and solvent fractions from leaf of *Stachys sieboldii* Miq.

2.3 초석잠 뿌리 및 잎의 총 플라보노이드 함량 측정

시료 중 총 플라보노이드(flavonoid) 함량은 Davis 방법을 변형하여(Chae, et al., 2002) 다음과 같이 측정하였다. 초석잠 용매별 추출물 및 분획물 1 mg 을 MeOH 1 mL 에 녹여 시험관에 취하고 10 mL 의 diethylene glycol 을 가하여 잘 혼합한 후 1 N NaOH 1 mL 첨가하여 37℃에서 1 시간 동안 반응 시킨다. 반응이 끝난 후 UV-visible spectrometer (Helios beta, Thermo electron corporation, USA)를 사용하여 420 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질은 rutin (Sigma Co., USA)을 사용하여 표준곡선에 의해서 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.



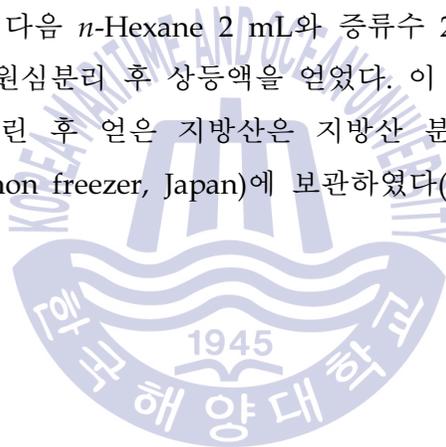
2.4. 초석잡 뿌리 및 잎의 총 페놀 함량 측정

총 페놀(phenol) 화합물 함량은 Folin-Denies 법 (Folin & Denies, 1912)을 응용하여 측정하였다. 추출물 및 분획물 1 mg 을 MeOH 1 mL 에 녹이고, 10 배 희석한 희석액 2 mL 에 2 배 희석한 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 2 mL 을 첨가하여 혼합한 다음 3 분 동안 방치한 후 10% Na₂CO₃ 용액 2 mL 을 넣고 1 시간 동안 반응 시킨다. 반응이 끝난 후 UV-visible spectrometer (Helios beta, Thermo electron corporation, USA)를 사용하여 750 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질로 tannic acid 를 사용하였으며 시료와 동일한 방법으로 분석 후 얻은 표준곡선으로부터 총 페놀성 화합물 함량을 측정하였다.



2.6. 초석잡 뿌리 및 잎의 지질 및 지방산 추출

지질 추출은 Folch, et al. (1957)의 방법을 변형하여 실시하였으며 간단히 요약하면 다음과 같다. 조직을 butyl hydroxy toluene (BHT)을 함께 함유한 methanol로 교반하여 균질화하였다. 균질물을 1 mL 취한 후 chloroform 2 mL와 0.2 M NaH_2PO_4 1.4 mL를 넣고 교반하여 4°C, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 지질층을 얻었다. 이와 같은 방법을 한 번 더 진행한 뒤 질소가스를 이용하여 지질층의 유기용매를 완전히 날린 다음 지질을 얻었다. Morrison & Smith. (1957)의 방법에 따라 추출된 지질에 methylation용 시약인 boron trifluoride (BF_3) methanol 1 mL와 *n*-Hexane 0.4 mL를 가한 후 1시간 동안 100°C에서 가열하였다. 1시간 후 실온까지 충분히 냉각시킨 다음 *n*-Hexane 2 mL와 증류수 2 mL를 가한 후 다시 4°C, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상등액을 얻었다. 이 상등액에서 질소가스를 이용하여 유기용매를 날린 후 얻은 지방산은 지방산 분석 전 까지 -75°C deep freezer (NF-400SF, Nihon freezer, Japan)에 보관하였다(Fig. 3).



Sample + BHT/MeOH 1 mL
 ↓
 Add chloroform 2 mL + 0.2 M NaH₂PO₄ 1.4 mL
 ↓ ←N₂ gas, vortexing
 Centrifuge (3,000 rpm, 4°C, 3 min)
 ↓
 Place lower chloroform layer in another tube
 ↓
 Add chloroform 2 mL + 0.2 M NaH₂PO₄ 1.4 mL again
 ↓ ←N₂ gas, vortexing
 Centrifuge (3,000 rpm, 4°C, 3 min)
 ↓
 Combine the 2 chloroform layers
 ↓
 Dry to completeness using nitrogen
 ↓
 Add BF₃/MeOH 1 mL + *n*-Hexane 0.4 mL
 ↓ ←N₂ gas, vortexing
 heating (100°C, 1 hr)
 ↓
 Take tube out and cool
 ↓
 Add *n*-Hexane 2 mL + DW 2 mL
 ↓
 Centrifuge (3,000 rpm, 4°C, 3 min)
 ↓
 Remove upper *n*-Hexane layer into tube
 ↓
 Add *n*-Hexane 2 mL + D.W 2 mL again
 ↓ ←N₂ gas, vortexing
 Centrifuge (3,000 rpm, 4°C, 3 min)
 ↓
 Combine the 2 *n*-Hexane layers
 ↓
 Purge with gentle nitrogen until dry and keep in deep freezer

Fig. 3. Procedure of extracts of lipids and fatty acids

2.7. 초석잠 뿌리 및 잎의 Gas chromatography 를 이용한 지방산 분석

샘플에서 분리된 지방산을 1 μ L 취하여 지방산 분석용 gas chromatography에 주입하여 지방산을 분석하였다(Salem, et al., 1996). 지방산 분석에 사용한 표준용액은 미국 Nu-Chek-Prep사의 462 standard이며, 이용된 column은 silica capillary column (CP-7856, 60 m \times 0.32 mm inner diameter \times 0.10 μ m film thickness)이다. 기기의 분석조건은 injector 250 $^{\circ}$ C, detector (FID) 250 $^{\circ}$ C, oven (initial 130 $^{\circ}$ C, 분당 증가율은 175 $^{\circ}$ C까지 4 $^{\circ}$ C/min, 210 $^{\circ}$ C까지 1 $^{\circ}$ C/min, 245 $^{\circ}$ C까지 30 $^{\circ}$ C/min), carrier gas는 헬륨을 사용하였다. 지방산 분석은 표준용액의 retention time과 비교하여 정성하였고, 내부 표준물질(22:3n-3, methyl ester)을 이용하여 총 지방산을 정량하였으며 각각의 지방산들은 전체 peak area의 퍼센트로 산출하였다.



2.8 초석잠 뿌리 및 잎의 생리 활성 측정

2.8.1 항암실험

① 세포배양

한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 인체 섬유종세포(HT-1080)를 분양받아 본 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였다. HT-1080 세포는 100 units/mL의 penicillin-streptomycin (Gibco, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS, Corning Cellgro, USA)가 함유된 RPMI 1640 (Lonza, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Japan)에서 배양하면서 배양 중인 세포를 일주일에 2번 새로운 배지로 교환하였다. 일주일 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA (Gibco, USA)로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 집적된 세포에 배지를 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 cell culture flask에 10 mL 씩 일정한 세포수로 분할하여 주입하고, 6~7일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

② MTT assay

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하여 각 시료의 암세포 억제에 미치는 영향을 살펴보았다. MTT assay는 세포의 증식과 세포의 살아있는 정도를 간접적으로 측정하는 것으로 항암제의 감수성에 대한 1차 선별검사의 목적으로 많이 사용된다. 대사과정이 온전한 암세포의 경우 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan 결정으로 환원시킨다 (Fig. 4). 생성된 MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아 있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 따라서 각 well에 존재하는 세포 생존 수와 비례한다. 배양된 암세포는 96 well cell culture plate에 5×10^4 cells/mL이 되도록 100 μ L씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 배지를 제거한 뒤 각 시료를 배지로 희석하여 각 well당 시료를 100 μ L씩 첨가하고, control에는 시료 대신 PBS를 100 μ L씩 첨가하였다. 이 plate를 다시 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 MTT assay를 위하여 MTT 시약 5 mg을 1 mL PBS로 녹인 후, 10% FBS가 함유된 배지 9 mL와 희석하여 각 well에 100 μ L를 첨가하고 3 ~ 4시간 동안 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다.

배양종료 후 생성된 formazan 결정을 가라앉힌 후 각 well에 형성된 결정이 흐트러지지 않도록 주의하면서 반응 후 남은 MTT 처리 배지를 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 formazan 결정을 용해시키기 위하여 DMSO를 100 μ L씩 분주하여 5 ~ 10분간 반응시켜 microplate reader (Victor3, Perkin Elmer, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Denizot & Lang, 1986).

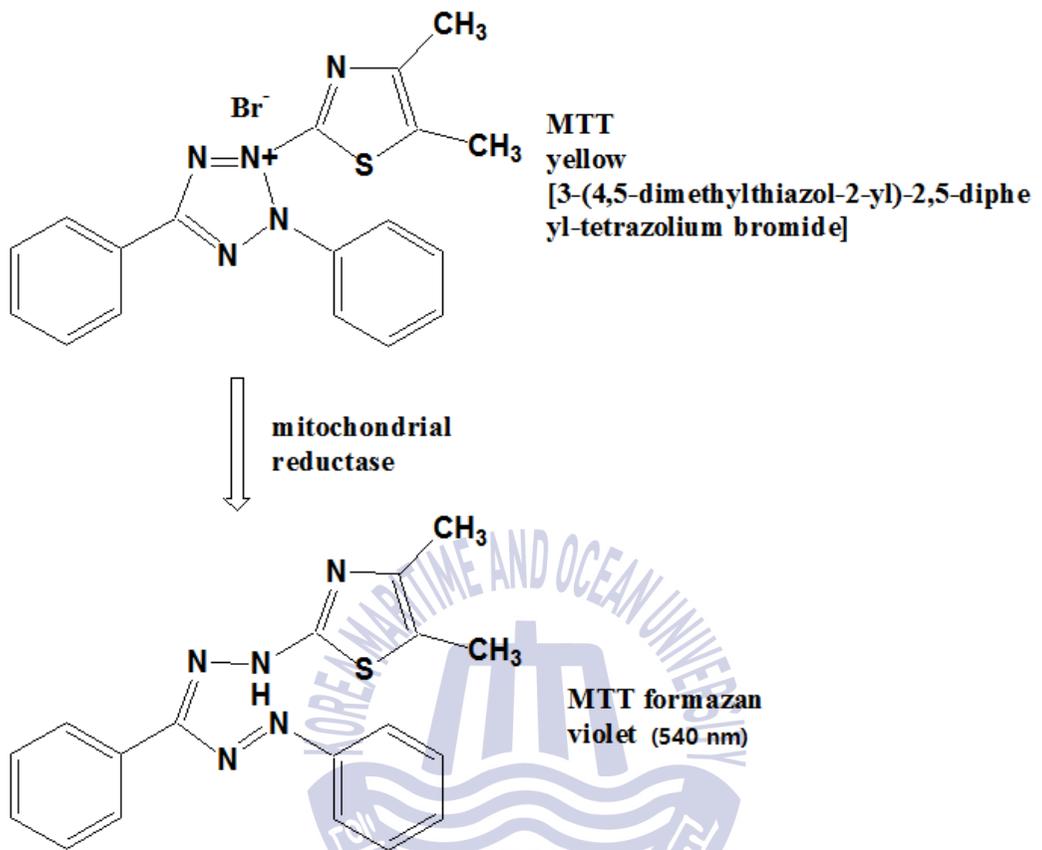
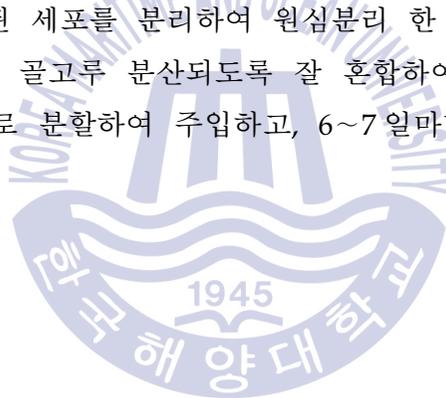


Fig. 4. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells

2.8.2 항산화 실험

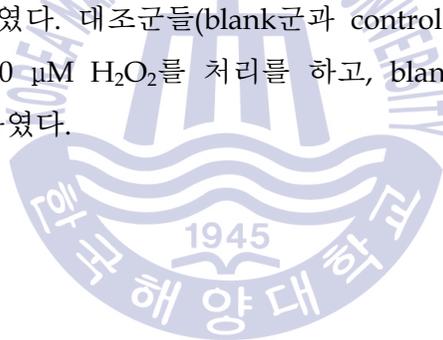
① 세포배양

한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 인체 섬유종세포(HT-1080)를 분양받아 본 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였다. HT-1080 세포는 100 units/mL의 penicillin-streptomycin (Gibco, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS, Corning Cellgro, USA)가 함유된 RPMI 1640 (Lonza, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Japan)에서 배양하면서 배양 중인 세포를 일주일에 2 번 새로운 배지로 교환하였다. 일주일 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA (Gibco, USA)로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 집적된 세포에 배지를 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 cell culture flask 에 10 mL 씩 일정한 세포수로 분할하여 주입하고, 6~7 일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.



② 세포 내 활성산소종(Reactive oxygen species) 측정

세포 내 활성산소종은 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) assay로 측정하였다(Lebel, et al., 1992; Tsuchiya, et al., 1994). DCFH-DA (Sigma, USA)는 세포 내 활성산소종과 반응하여 형광물질 (dichlorofluorescein, DCF)을 만들어 내는 것으로 이 시약을 세포 속에 넣어 발생하는 형광을 측정함으로써 세포 내의 활성산소종을 측정할 수 있다(Fig. 5). 세포를 96 well cell culture plate에 분주한 후 24시간 배양하고, PBS로 씻은 후 20 μ M DCFH-DA를 각 well에 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 20분간 pre-incubation 하였다. 각 well에 시료를 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양한 후, DCFH-DA를 제거하고 세포는 다시 PBS로 씻은 후 500 μ M H₂O₂를 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 excitation 488 nm, emission 530 nm에서 microplate reader (Victor3, Perkin Elmer, USA)로 측정하였다. 대조군들(blank군과 control군)은 시료 대신 PBS를 처리하며, control군은 500 μ M H₂O₂를 처리를 하고, blank군은 500 μ M H₂O₂ 대신 PBS를 처리하여 측정하였다.



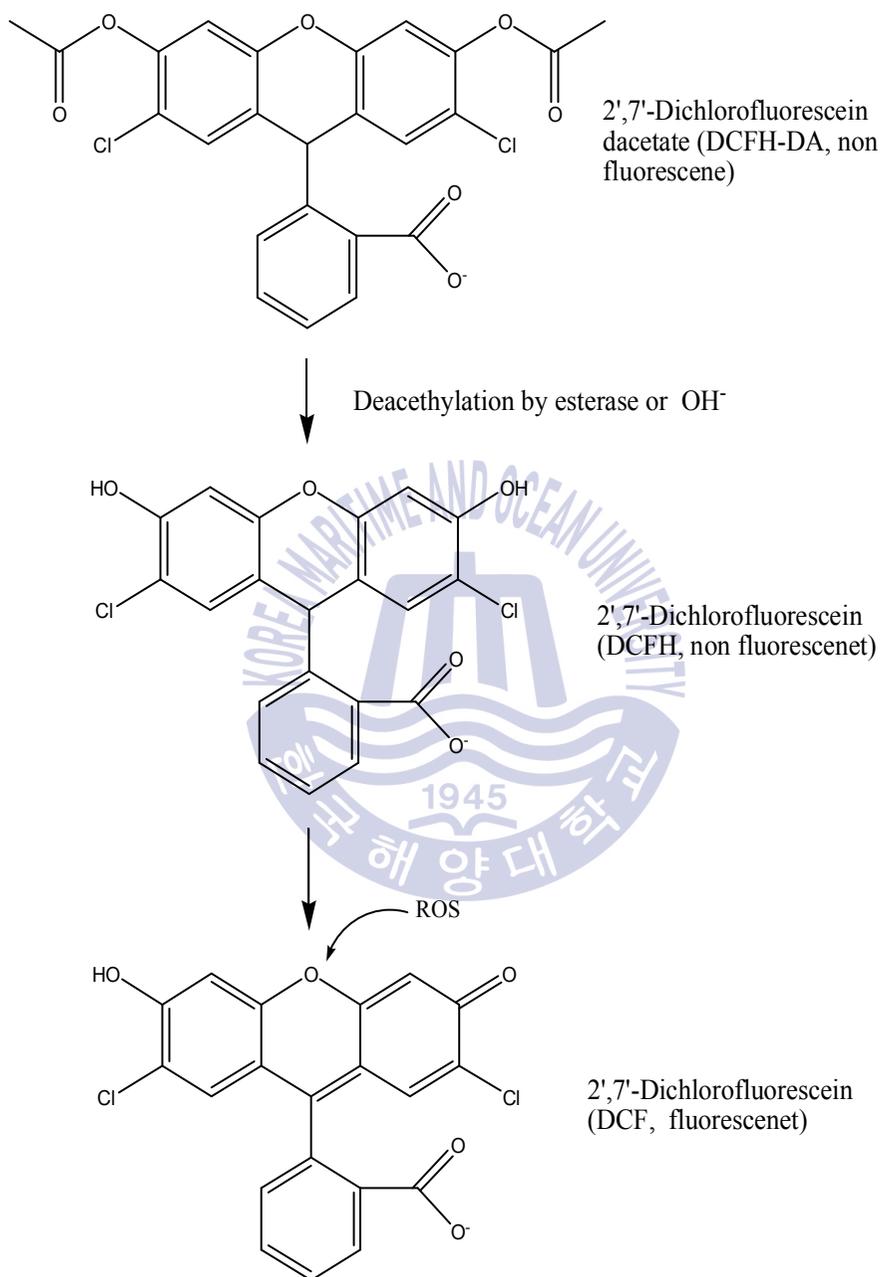
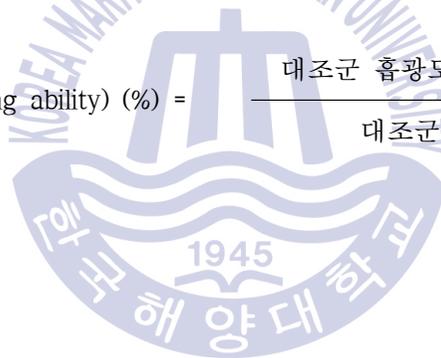


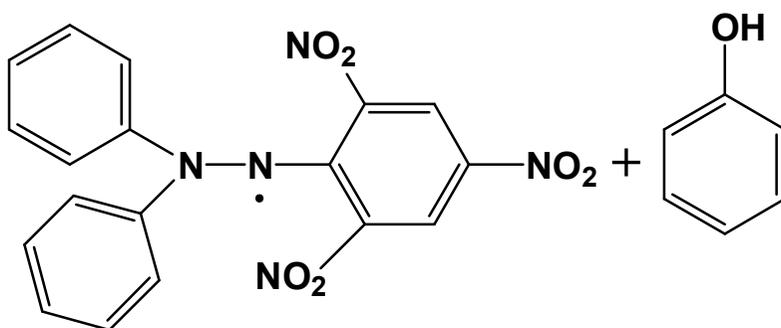
Fig. 5. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system

③ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성

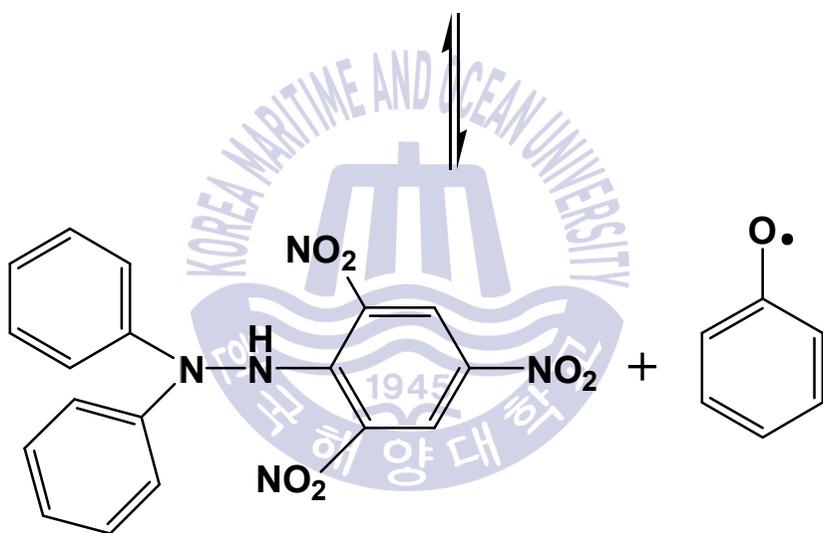
시료의 DPPH 라디칼 소거활성 (Chen, et al., 1995) 측정을 위해 먼저 각 추출물 및 분획물을 MeOH 로 희석하여 농도별로 준비하였다. DPPH 2 mg 을 ethanol 15 mL 에 녹여 DPPH 원액을 만든다. 원액 1.2 mL 에 DMSO 0.5 mL 와 EtOH 를 3 mL 를 혼합하여 DPPH 희석액을 준비하였다. 준비된 DPPH 희석액은 cuvette 에 넣고 흡광도를 측정하여 흡광도가 0.94~0.97 이 되도록 맞춘다. 준비한 시료 0.1 mL 와 DPPH 희석액 0.9 mL 를 섞은 후 10 분 후 UV-visible spectrophotometer (Helios beta, Thermo electron corporation, USA)로 518 nm 에서 측정하였다(Fig. 6). 이때 control 은 천연항산화제인 L-ascorbic acid 와 합성항산화제인 dibutyl hydroxy toluene (BHT)를 사용하였다. 초석잠의 DPPH 라디칼 소거활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{EDA (electron donating ability) (\%)} = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$





DPPH • (Violet, 518 nm)



**Diphenylpicrylhydrazine
(yellow)**

**Phenoxy
radical**

Fig. 6. Scavenging of the DPPH radical by phenol

④ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation (ABTS+) 라디칼 소거활성

초석잠에 대한 ABTS+ 라디칼 소거활성은 Re, et al. (1999)으로 측정하였다. 7 mM 의 ABTS+와 2.45 mM 의 potassium persulfate 를 첨가하여 radical 생성을 위해 암소에서 16 시간 방치한 후, 734 nm 에서 흡광도가 0.68~0.72 가 되도록 EtOH 로 희석하였다. ABTS+ 희석액 0.98 mL 와 추출물 및 분획물 0.02 mL 를 혼합하여 암소에서 10 분간 방치 후 UV-visible spectrophotometer 732 nm 에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 7). control 으로는 천연항산화제인 L-ascorbic acid 와 합성항산화제인 BHT 를 사용하였다. 초석잠의 ABTS+ 라디칼 소거활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{EDA (electron donating ability) (\%)} = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$



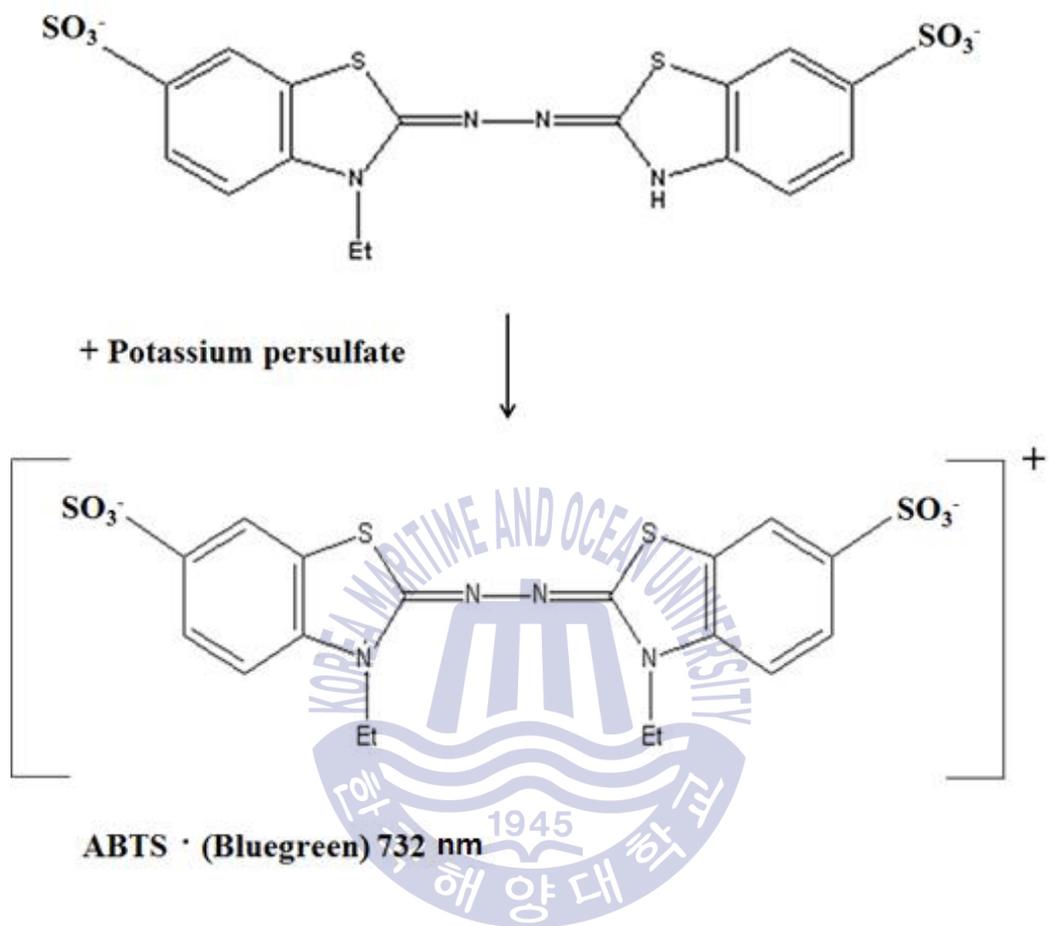


Fig. 7. Scavenging of the ABTS radical

⑤ Genomic DNA 추출 및 DNA 산화 생성물 측정

Raw 세포로부터의 genomic DNA의 추출은 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction kit (USA Bioneer, Inc.)를 이용하여 순차적인 방법에 따라 추출하였다. 추출되어진 genomic DNA의 산화 정도는 Milne, et al. (1993)의 방법을 이용하여 측정하였다. 어떤 일정농도의 시료, genomic DNA, FeSO₄ 및 H₂O₂를 물에 녹여 100 µL의 혼합물을 만들고 각각의 최종농도가 genomic DNA, FeSO₄ 및 H₂O₂의 최종 농도가 50 µg/mL, 200 µM, 그리고 0.1 µM이 되도록 준비하였다. 이 혼합물을 30분간 실온에서 반응시키고 10 mM의 EDTA를 첨가하여 반응을 중지시켰으며 반응물은 1% agarose gel을 이용하여 100 V에서 30분 동안 전기영동하였다. 전기영동한 gel은 1 mg/mL ethidium bromide로 염색하고 Alpha Ease gel image analysis software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)를 이용하여 UV로 관찰하였다.

⑥ 세포 내 Glutathione (GSH) 함량 측정

세포 내에 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 mBBr (monobromobimane)을 이용하여 측정하였다(Poot, et al., 1986). 세포는 96 well cell culture plate에 well 당 5×10^4 cells/mL가 되도록 분주하여 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 다시 37°C, 5% CO₂ incubator에서 30분간 배양하였다. 다시 각 well은 PBS 완충액으로 씻은 후 40 µM mBBr을 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 30분간 반응시킨 후 시료처리에 의한 GSH 함량의 변화를 시간별로 excitation 360 nm, emission 465 nm에서 microplate reader (Victor3, Perkin Elmer, USA)로 측정하였다.

2.8.3 항염증 실험

① 세포 내 Nitric oxide (NO) 생성 측정

NO reduction assay는 대식세포의 중요한 기능 중의 하나인 phagocytosis와 관련된 간접적인 활성측정의 한 방법으로 대식세포가 그 활동을 얼마나 활발하게 하고 있는지를 알아보는 방법이다(Kong, et al., 2005). Raw 264.7 세포를 96 well cell culture plate에 well 당 5×10^4 cells/mL가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 MEM 배지로 교체한 후 준비된 시료를 1시간 동안 전처리하고, NO 생성을 유도하기 위해 LPS (1 µg/mL = 1 ppm)를 처리한 후, 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이 후 생성된 NO의 양은 Griess 시약(0.1% N-(1-naphtyl)etylenediamine : 1% sulfanilamide = 1:1)을 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. sodium nitrate를 사용하여 측정된 흡광도로 표준곡선을 작성하여 NO의 농도별 흡광도를 얻었으며, 표준곡선을 실험결과에 적용하여 생성된 NO의 함량을 정량하였다.

Over night 후 plate를 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 assay diluent 200 µL를 분주한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 plate의 각 well에 시료 100 µL를 적하하여 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액을 4번 세척한 후 avidin-horseradish peroxidase액 100 µL를 적하하여 다시 실온에서 30분 동안 방치하였다. 세척용 완충액을 5번 세척한 후 tetramethylbenzidine이 포함된 기질액 100 µL를 적하하여 실온에서 15분 동안 방치한 후 stop액을 100 µL씩을 가하여 반응을 정지시켰다. optical density는 ELISA (Bio-Rad, Model 500, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다 (Kim, et al., 2001)

2.9. 통계분석

실험결과는 각 항목에 따라 Mean±SEM (Standard Error of Mean)으로 나타내었고 분석된 실험 데이터는 control 과 각 시료의 비교를 위해 statistica program 을 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 one-way ANOVA 를 실시하여 유의성을 검증하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

3.1.1 초석잠 뿌리의 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량

초석잠의 용매별 추출물 및 분획물들의 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량은 Table 1 에 나타내었다. 초석잠 뿌리 A+M 및 MeOH 추출물들의 총 플라보노이드 함량은 각각 3.15 ± 0.19 및 7.04 ± 0.00 mg/g 으로 A+M 추출물의 총 플라보노이드 함량이 높았다. 분획물들 중에서는 *n*-BuOH 분획물이 16.67 ± 0.74 mg/g 으로 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었으며, 다음으로 *n*-Hexane, Water 및 85% aq. MeOH, Water 분획물 순이었다. 각 용매별 추출물 및 분획물의 총 페놀 함량은 MeOH 추출물(0.41 ± 0.00 mg/g)이 A+M 추출물(0.35 ± 0.00 mg/g)보다 높은 페놀 함량을 나타내었으며 분획물들 중에서 *n*-BuOH 분획물이 0.49 ± 0.00 mg/g 으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 이에 따라 총 플라보노이드 및 페놀 함량은 *n*-BuOH 분획물에서 높게 나타남을 알 수 있었다. Jeon & Park(2015)은 초석잠 분말의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총 탄닌의 함량은 각각 139.09 1.97 mgGAE/g dw, 74.33 2.69 mg QE/g dw, 40.41 2.54 mg TAE/g dw 로 분석되었다고 보고하였다. Chung & Lee(1993)의 연구에서 초석잠 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량이 24.58 mg/g 이었다. Baek, et al(2004)]의 연구에 의하면 초석잠 메탄올 추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 각각 14.3 μ g/ml 와 9.9 μ g/ml 이었다. Lee, et al(2014)은 초석잠 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 38.62 mg GAE/g 과 221.00 mg QE/g 이었다. 이런 차이는 초석잠의 재배 환경, 추출 용매의 종류, 추출 온도 및 시간과 같은 추출 조건 등의 차이에 기인한 것으로 생각된다.

Table 1. Contents of total flavonoids and phenols of extracts and fractions from roots of *Stachys sieboldii* Miq.*

Sample	Total flavonoid contents (mg/g)	Total phenol contents (mg/g)
A+M extract	3.15 ± 0.19 ^d	0.35 ± 0.00 ^d
MeOH extract	7.04 ± 0.00 ^a	0.41 ± 0.00 ^b
<i>n</i> -Hexane fraction	7.22 ± 1.30 ^a	0.30 ± 0.00 ^e
85% aq. MeOH fraction	3.89 ± 0.56 ^d	0.33 ± 0.00 ^f
<i>n</i> -BuOH fraction	16.67 ± 0.74 ^b	0.49 ± 0.00 ^a
Water fraction	5.19 ± 0.37 ^c	0.36 ± 0.00 ^c

*Values are expressed as mean±SD and ^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

3.1.2 초석잠 잎의 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량

초석잠 잎의 용매별 추출물 및 분획물들의 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량은 Table 2 에 나타내었다. 초석잠 잎 A+M 및 MeOH 추출물들의 총 플라보노이드 함량은 각각 7.59 ± 0.26 및 9.44 ± 0.26 mg/g 으로 MeOH 추출물의 총 플라보노이드 함량이 높았다. 분획물들 중에서는 85% aq. MeOH 분획물이 10.37 ± 0.52 mg/g 으로 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었으며, 다음으로 *n*-BuOH, Water 및 *n*-Hexane 분획물 순이었다. 각 용매별 추출물 및 분획물의 총 페놀 함량 또한 MeOH 추출물(0.24 ± 0.00 mg/g)이 A+M 추출물(0.23 ± 0.00 mg/g)보다 높은 페놀 함량을 나타내었으며 분획물들 중에서 *n*-BuOH 분획물이 0.24 ± 0.00 mg/g 으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 이에 따라 총 플라보노이드 및 페놀 함량은 MeOH 추출물, 85% aq. MeOH 및 *n*-BuOH 분획물에서 높게 나타남을 알 수 있었다.

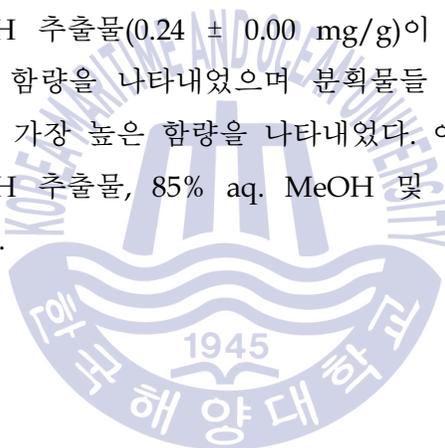


Table 2. Contents of total flavonoids and phenols of extracts and fractions from leaves of *Stachys sieboldii* Miq.*

Sample	Total flavonoid contents (mg/g)	Total phenol contents (mg/g)
A+M extract	7.59 ± 0.26 ^c	0.23 ± 0.00 ^b
MeOH extract	9.44 ± 0.26 ^b	0.24 ± 0.00 ^a
<i>n</i> -Hexane fraction	4.44 ± 0.00 ^e	0.23 ± 0.01 ^b
85% aq. MeOH fraction	10.37 ± 0.52 ^a	0.23 ± 0.00 ^b
<i>n</i> -BuOH fraction	4.81 ± 0.52 ^{de}	0.24 ± 0.00 ^a
Water fraction	5.37 ± 0.26 ^{de}	0.23 ± 0.00 ^b

*Values are expressed as mean±SD and ^{a-e}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

3.2.1 초석잠 뿌리의 지방산조성

초석잠을 지방산 추출 후 gas chromatography 를 이용하여 지방산 조성을 분석한 결과를 Table 3 에 나타내었다. 초석잠의 지방산 조성은 n-6 지방산(54.27%) > n-3 지방산(21.18%) > 포화지방산(19.70%) > n-9 지방산(3.60%) 순으로 나타났으며, 함유량이 가장 높은 n-6 계 지방산인 linoleic acid (18:2n-6)가 54.27%로 가장 높은 함량을 나타내었고 oleic acid (18:1n-9)가 2.28%, linolenic acid (18:3n-3)가 20.82%의 함량을 가진 것으로 나타났다. 많은 연구는 자가 면역 질환에 대한 oleic acid 의 유익한 항염증 효과를 보고하였고 면역력 개선 또한 발견하였다(Linos, et al., 1991; Kremer, et al., 1990). 지중해식 식단의 항염증 특징은 높은 양의 oleic acid 와 연관되어 있다고 보고되었다(Sales, et al., 2011). 더욱이 n-3 지방산을 포함한 올리브 오일의 섭취는 만성 염증과 관련 질환을 낮추고 예방하는데 도움을 준다고 보고되었다(Wardhana & Surachmanto, 2011).

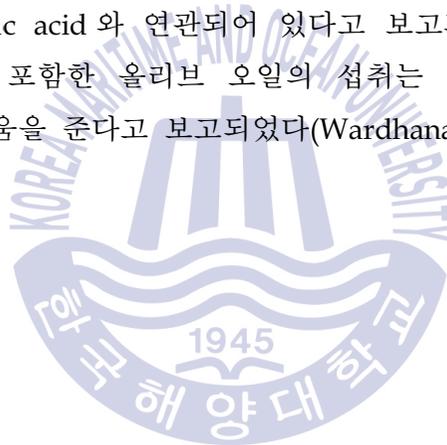


Table 3. Fatty acid composition (% area) of roots of *Stachys sieboldii* Miq.

Fatty Acid	%
14:0	0.18
16:0	17.5
18:0	1.01
20:0	0.31
22:0	0.67
Total Sat.¹⁾	19.70
18:1n-9	2.28
20:1n-9	0.19
22:1n-9	0.13
Total Mono.²⁾	3.60
18:2n-6	54.27
Total n-6	54.27
18:3n-3	20.82
20:3n-3	0.35
Total n-3	21.18

1) Sat, saturated fatty acids 2) Mono, monounsaturated fatty acids

3.2.2 초석잠 잎의 지방산조성

초석잠 잎을 지방산 추출 후 gas chromatography 를 이용하여 지방산 조성을 분석한 결과를 Table 4 에 나타내었다. 초석잠의 지방산 조성은 포화지방산(38.85%) > n-9 지방산(22.96%) > n-6 지방산(17.12%) > n-3 지방산(8.97%) 순으로 나타났으며, 불포화 지방산 중 함유량이 가장 높은 n-9 계 지방산인 oleic acid (18:1n-9)가 16.37%로 가장 높은 함량을 나타내었고 linoleic acid (18:2n-6)가 11.27%, linolenic acid (18:3n-3)가 5.45%의 함량을 가진 것으로 나타났다.



Table 4. Fatty acid composition (% area) of leaves of *Stachys sieboldii* Miq.

Fatty Acid	%
12:0	0.10
14:0	0.85
16:0	21.76
18:0	5.13
20:0	17.54
Total Sat.¹⁾	38.85
14:1n-9	0.15
18:1n-9	16.37
20:1n-9	4.84
22:1n-9	1.59
Total Mono.²⁾	22.96
18:2n-6	11.27
18:3n-6	0.59
20:2n-6	4.90
22:4n-6	0.36
Total n-6	17.12
18:3n-3	5.45
20:3n-3	2.78
20:5n-3	0.74
22:6n-3	0.26
Total n-3	8.97

1) Sat, saturated fatty acids 2) Mono, monounsaturated fatty acids

3.3 초석잠의 추출물 및 분획물의 생리활성

3.3.1.1 초석잠 뿌리 추출물 및 분획물의 항암효과

초석잠뿌리의 인체 유래 암세포에 대한 증식 억제효과를 알아보기 위해 MTT assay 를 통해 측정하였다. 실험 대상 세포들은 인체 위암세포(AGS)와 인체 결장암세포(HT-29) 그리고 인체 섬유육종세포(HT-1080)을 이용하였으며 각 세포별 샘플의 농도는 0.025, 0.05, 0.1 0.25 및 0.5 mg/mL 의 농도로 실험하였다.

AGS 암세포에 초석잠뿌리 A+M 추출물과 MeOH 추출물을 처리했을 때 암세포 증식 억제효과를 나타내었으며 0.05 mg/mL 농도에서는 A+M 과 MeOH 추출물의 세포 증식 억제효과가 각각 42.8%와 5.8% 0.5 mg/mL 의 농도에서는 각각 57.5% 83.3%의 높은 세포 증식 억제효과를 나타내었다(Fig. 8).

HT-29 암세포에 대한 초석잠 뿌리 A+M 과 MeOH 추출물은 0.05 mg/mL 의 농도에서는 각각 5.9% 1.7% 그리고 0.5 mg/mL 의 농도에서는 각각 65.4% 29.5%로 AGS 위암세포에 비해 낮은 세포 증식 억제효과를 보여주었다(Fig. 9).

A+M 과 MeOH 추출물의 HT-1080 암세포 증식 억제효과와 경우 0.05 mg/mL 의 농도에서 각각 26.3%, 13.1% 그리고 0.5 mg/mL 의 경우에는 각각 84.2% 72.0%로 AGS 및 HT-29 암세포와 비교했을 때 상대적으로 높은 억제효과를 보였다(Fig. 10).

각 세포별 초석잠 뿌리의 A+M 추출물과 MeOH 에 대한 IC₅₀ 값을 Table 5 에 나타내었다. 초석잠의 A+M 추출물의 AGS, HT-29 및 HT-1080 에 대한 IC₅₀ 각각 0.06, 0.40 그리고 0.19 mg/mL 이며 MeOH 추출물의 경우에는 각각 0.28, 0.93 그리고 0.34 mg/mL 이었다

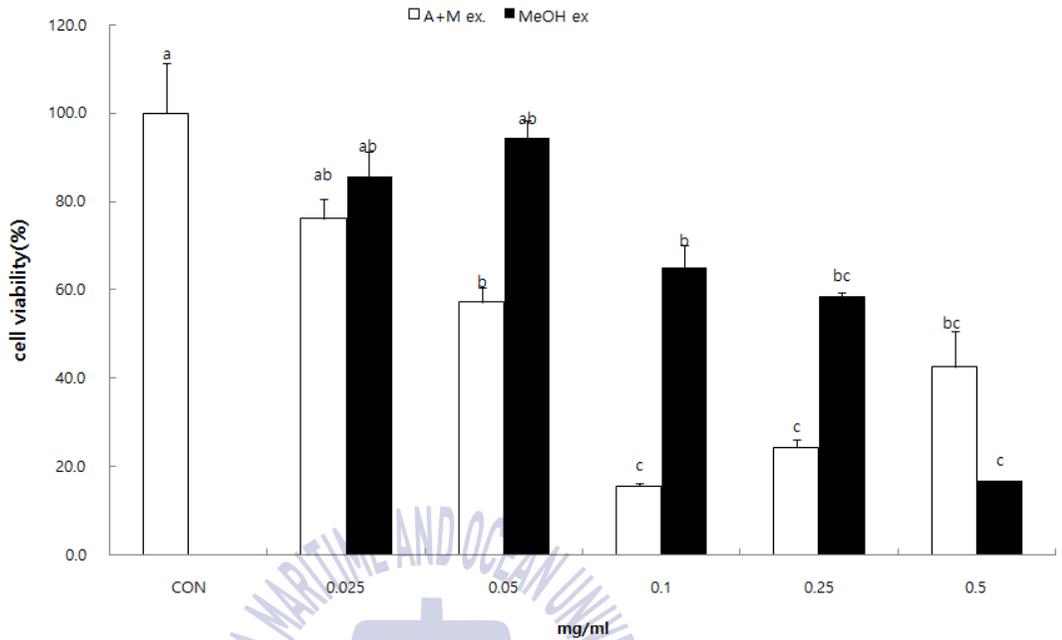


Fig. 8. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells

^{a-c}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

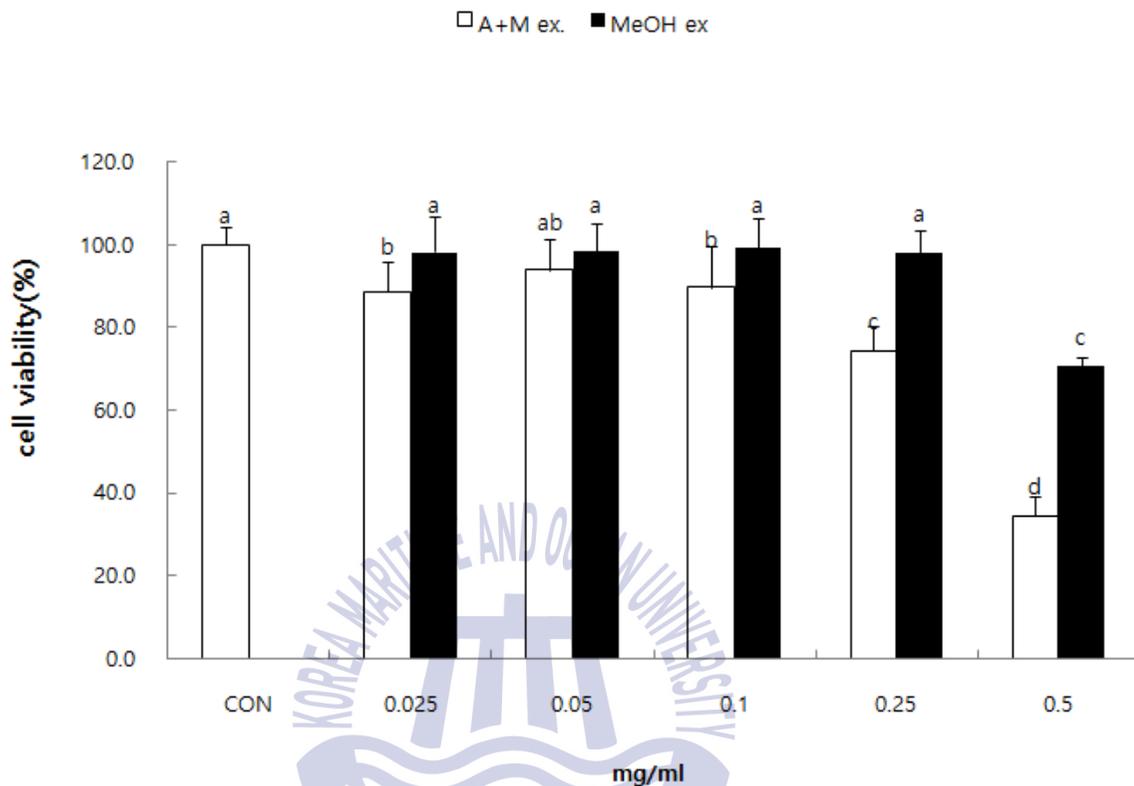


Fig. 9. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of HT-29 human colon cancer cells
^{a-d}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

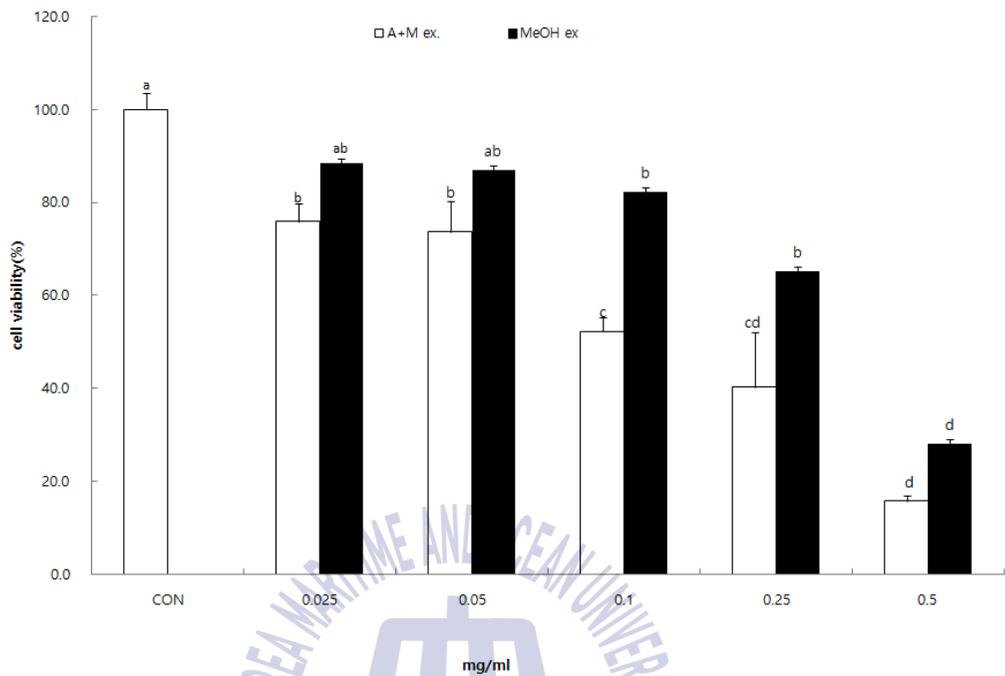


Fig. 10. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of HT-1080 cell line

^{a-d}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 5. IC₅₀ values of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of AGS, HT-29 and HT-1080 cells

Samples	AGS ¹⁾	HT-29	HT-1080
A+M extract	0.06 ²⁾	0.40	0.19
MeOH extract	0.28	0.93	0.34

¹⁾AGS-human gastric carcinoma cell, HT-29-human colonic cancer cell, HT-1080-fibrosarcoma cell ²⁾mg/mL



초석잠 뿌리의 추출물을 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water로 다시 분획하여 얻어진 각 분획물을 AGS 암세포에 처리한 결과 모든 0.05 mg/mL의 농도에서 분획물들 모두 높은 암세포 증식 억제효과를 보였다 특히 85% aq. MeOH 분획물의 경우에는 암세포 증식 억제 효과가 0.05 mg/mL에서 86.3%, 0.5 mg/mL의 농도에서는 89.8%의 매우 높은 억제 효과를 나타내었다(Fig. 11).

HT-29 암세포에 각 분획물들을 처리한 결과는 Fig. 12에 나타내었다. HT-29 암세포에 대한 세포 증식 억제효과는 AGS 암세포와 비교했을 때 상대적으로 낮지만 0.5 mg/mL의 농도에서는 모든 분획물에서 약 50% 가량의 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다.

HT-1080 암세포에 대한 세포증식 억제 효과는 Fig. 13에 나타내었다. *n*-Hexane 과 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water 분획물에서 control과 유의적인 차이가 나타났으며 85% aq. MeOH의 경우 0.5 mg/mL의 농도에서 95.1%의 높은 세포 증식 억제효과를 나타내었다.($p < 0.05$).

AGS, HT-29 그리고 HT-1080 암세포에 대한 각 분획물들의 IC₅₀ 값을 Table 6에 나타내었다. AGS 암세포에서 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water 분획물들에 대한 IC₅₀ 값은 각각 0.03, 0.12 0.27 그리고 0.45 mg/mL였고 HT-29 암세포에 대한 IC₅₀ 값은 각각 0.23, 0.30 0.27 그리고 0.49 mg/mL였고 HT-1080 암세포에 대한 IC₅₀ 값은 0.01, 0.17 0.19 그리고 0.33 mg/mL로 나타났다.

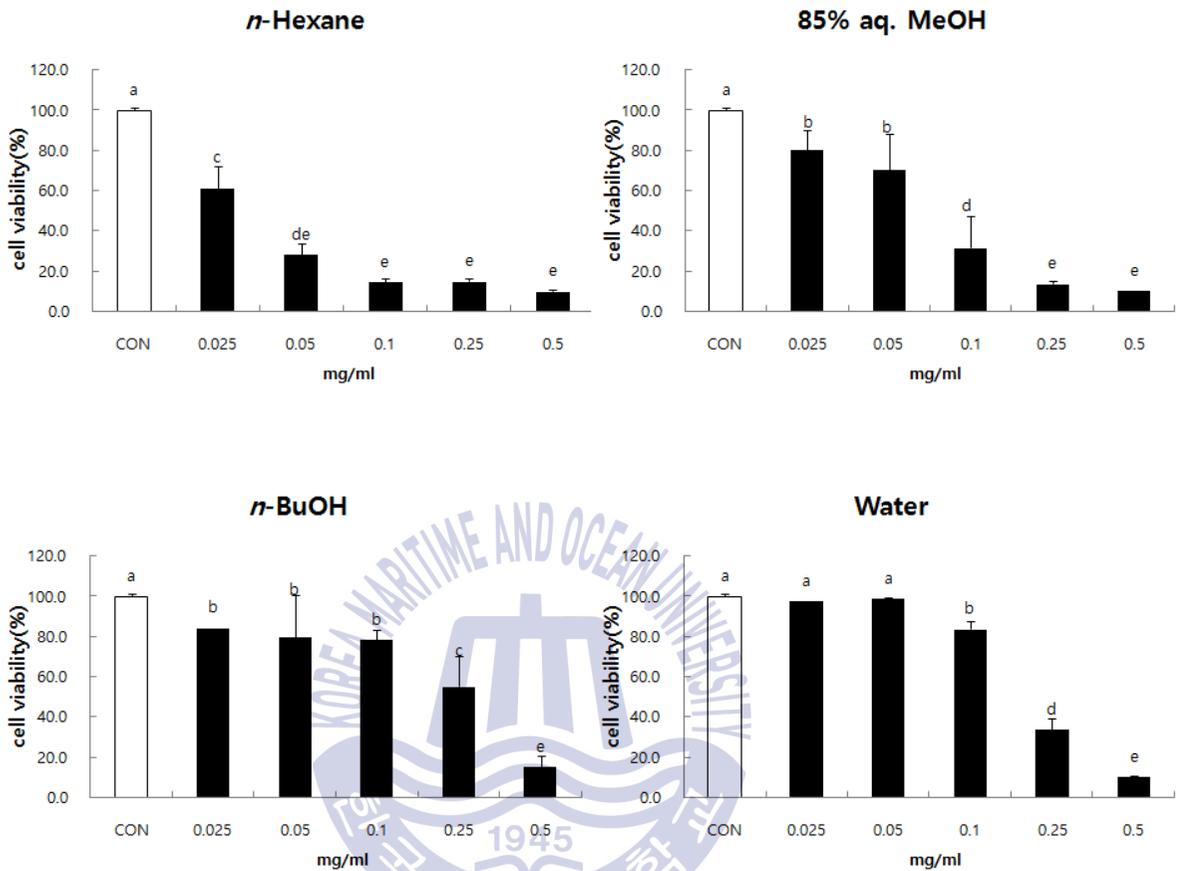


Fig. 11. Inhibitory effect of solvent fractions of extracts from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma

^{a-e}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

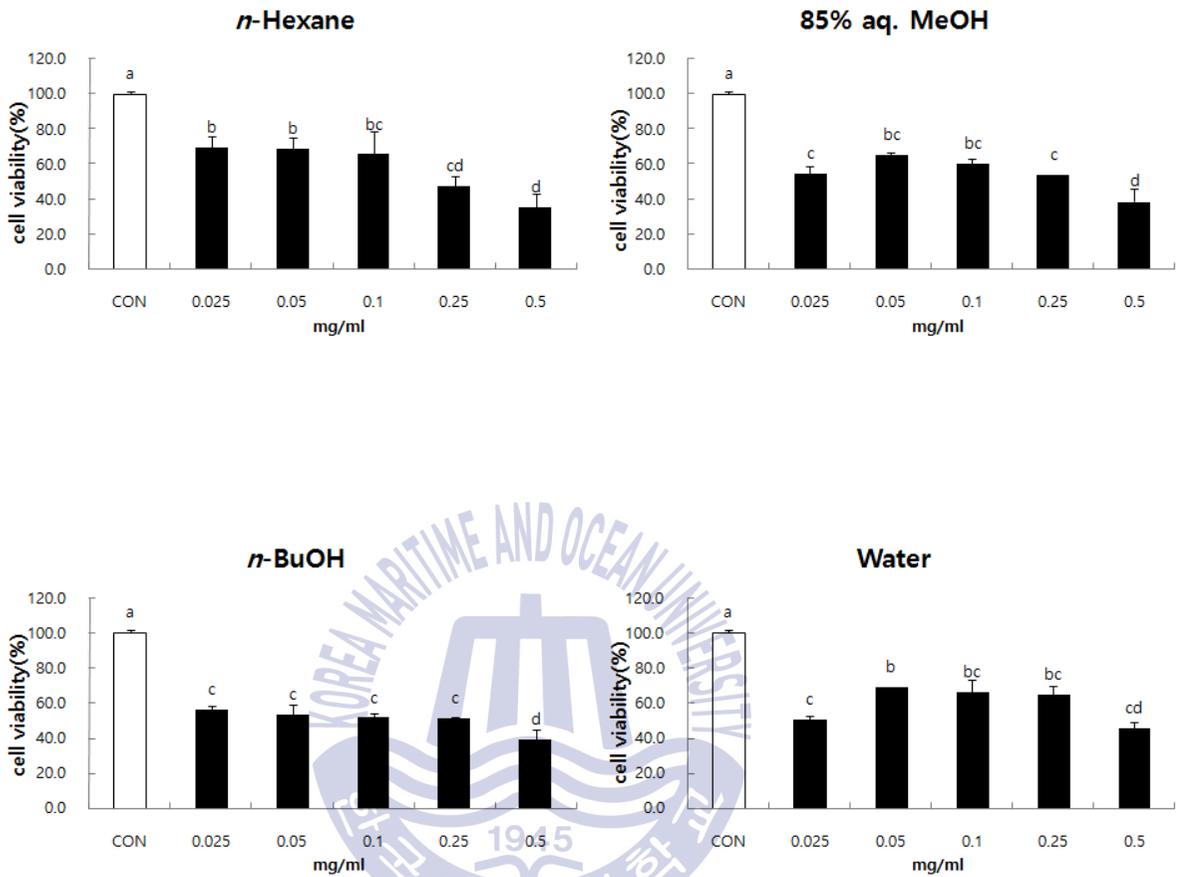


Fig. 12. Inhibitory effect of solvent fractions from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of HT-29 human colon cancer cells
^{a-d}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

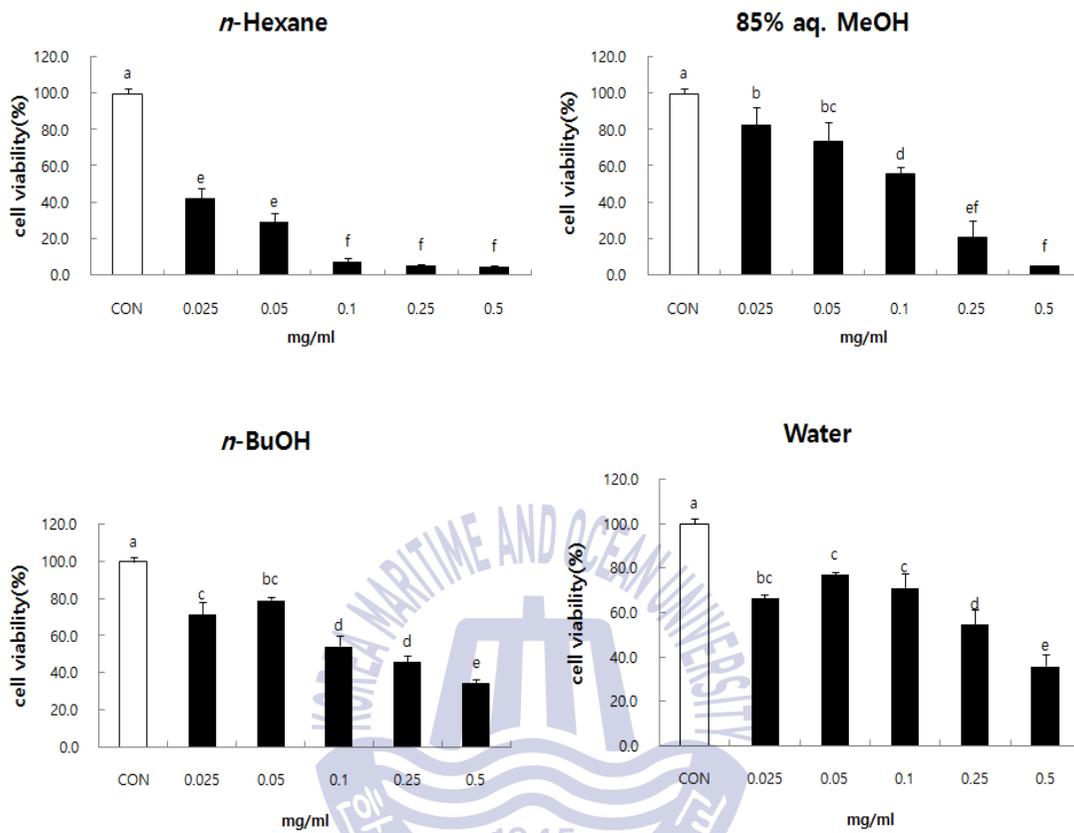
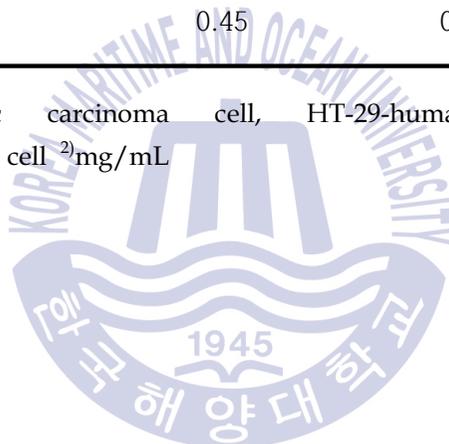


Fig. 13. Inhibitory effect of solvent fractions from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of HT-1080 cell line
^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 6. IC₅₀ values of solvent fractions from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of AGS, HT-29 and HT-1080 cells

Samples	AGS ¹⁾	HT-29	HT-1080
<i>n</i> -Hexane fraction	0.03 ²⁾	0.23	0.01
85% aq. MeOH fraction	0.12	0.30	0.17
<i>n</i> -BuOH fraction	0.27	0.27	0.19
Water fraction	0.45	0.49	0.33

¹⁾AGS-human gastric carcinoma cell, HT-29-human colonic cancer cell, HT-1080-fibrosarcoma cell ²⁾mg/mL



3.3.1.2 초석잠 잎 추출물 및 분획물의 항암효과

초석잠의 인체 유래 암세포에 대한 증식 억제효과를 알아보기 위해 MTT assay 를 통해 측정하였다. 실험 대상 세포들은 인체 위암세포(AGS)와 인체 결장암세포(HT-29) 그리고 인체 섬유육종세포(HT-1080)을 이용하였으며 각 세포별 샘플의 농도는 0.025, 0.05, 0.1 0.25 및 0.5 mg/mL 의 농도로 실험하였다.

AGS 암세포에 초석잠 잎 A+M 추출물과 MeOH 추출물을 처리했을 때 암세포 증식 억제효과를 나타내으며, 0.25 mg/mL 농도에서는 A+M 과 MeOH 추출물의 세포 증식 억제효과가 각각 70.6%와 73.9%이며 0.5 mg/mL 의 농도에서는 각각 75.1%와 85.7%의 높은 세포 증식 억제효과를 나타내었다(Fig. 14).

HT-29 암세포에 대한 초석잠 잎 A+M 과 MeOH 추출물은 0.05 mg/mL 의 농도에서는 각각 48.2% 45.6% 그리고 0.5 mg/mL 의 농도에서는 각각 81.4% 71.9%로 AGS 위암세포에 비해 낮은 세포 증식 억제효과를 보여주었다(Fig. 15).

A+M 과 MeOH 추출물의 HT-1080 암세포 증식 억제효과의 경우 0.05 mg/mL 의 농도에서 각각 39.2%, 18.6% 그리고 0.5 mg/mL 의 경우에는 각각 86.1% 87.5%로 AGS 및 HT-29 암세포와 비교했을 때 상대적으로 높은 억제효과를 보였다(Fig. 16).

각 세포별 초석잠 잎의 A+M 추출물과 MeOH 에 대한 IC₅₀ 값을 Table 7 에 나타내었다. 초석잠 잎의 A+M 추출물의 AGS, HT-29 및 HT-1080 에 대한 IC₅₀ 각각 0.04, 0.07 그리고 0.09 mg/mL 이며 MeOH 추출물의 경우에는 각각 0.03, 0.06 그리고 0.18 mg/mL 이었다

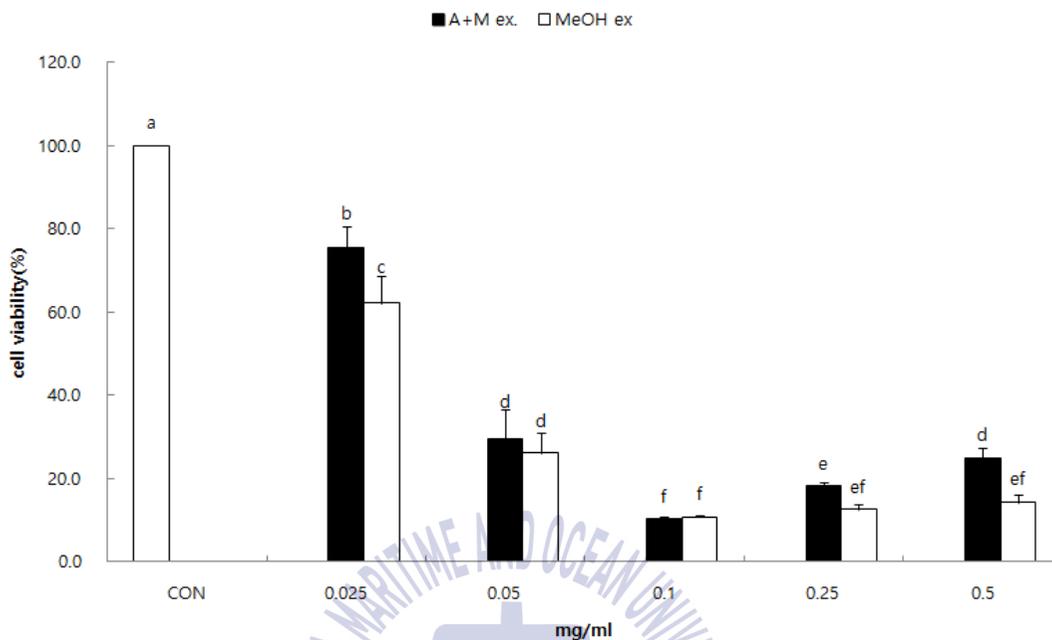


Fig. 14. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells
^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

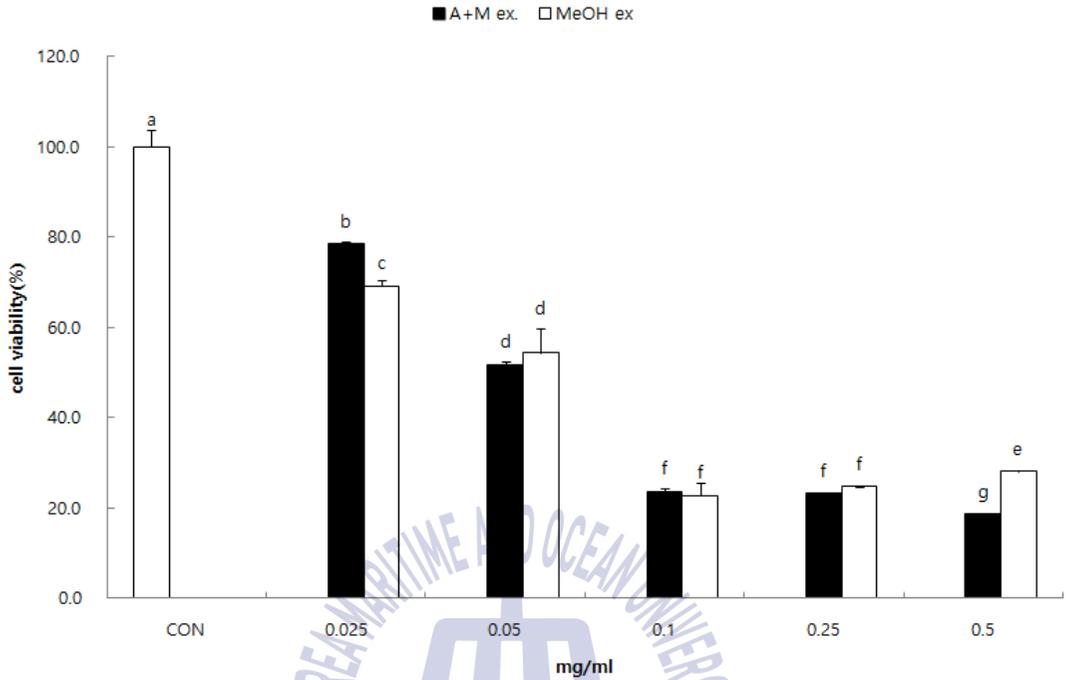


Fig. 15. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of HT-29 human colon cancer cells

^{a-g}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

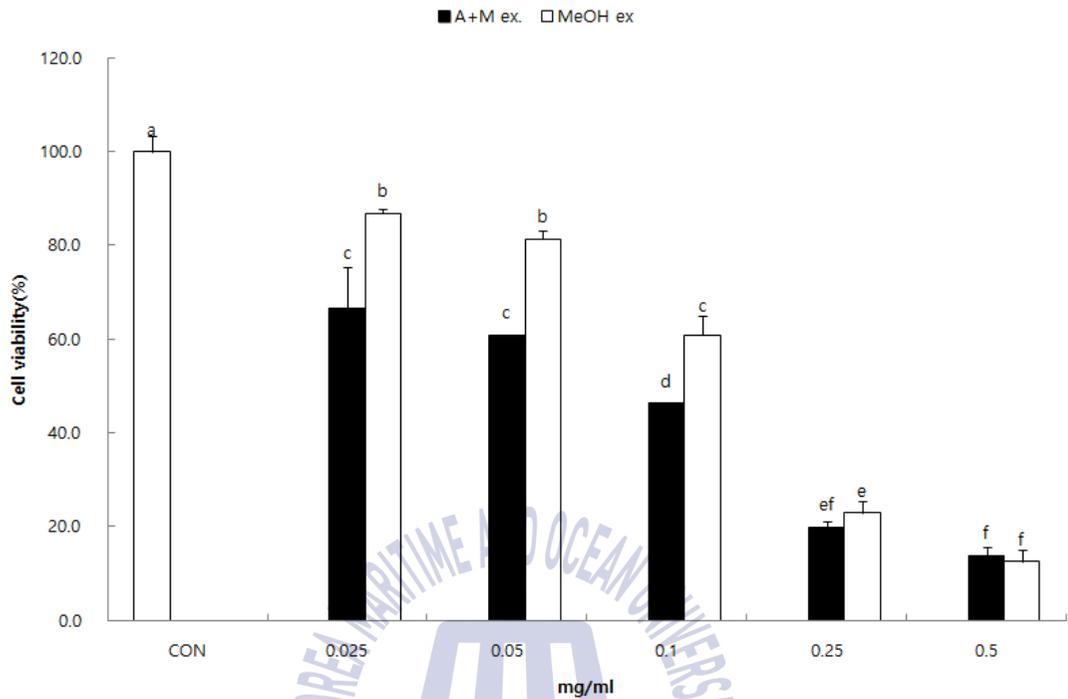


Fig. 16. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of HT-1080 cell line

^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 7. IC₅₀ values of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of AGS, HT-29 and HT-1080 cells

Samples	AGS ¹⁾	HT-29	HT-1080
A+M extract	0.04 ²⁾	0.07	0.09
MeOH extract	0.03	0.06	0.18

¹⁾AGS-human gastric carcinoma cell, HT-29-human colonic cancer cell, HT-1080-fibrosarcoma cell ²⁾mg/mL



초석잠 잎의 추출물을 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water로 다시 분획하여 얻어진 각 분획물을 AGS 암세포에 처리한 결과 모든 0.05 mg/mL의 농도에서 분획물들 모두 유의적인 차이를 보였으나 특히 85% aq. MeOH 분획물의 경우에는 암세포 증식 억제 효과가 0.1 mg/mL 이상의 농도에서 80% 이상의 높은 효과를 나타내었다.(Fig. 17).

HT-29 암세포에 각 분획물들을 처리한 결과는 Fig. 18에 나타내었다. HT-29 암세포에 대한 세포 증식 억제효과는 0.5 mg/mL의 농도에서는 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water 분획물에서는 약 50% 가량의 암세포 증식 억제 효과를 나타냈으며 특히 85% aq. MeOH 분획물은 0.25 mg/mL 이상의 농도에서 88% 이상의 높은 효과를 나타내었다.

HT-1080 암세포에 대한 세포증식 억제 효과는 Fig. 19에 나타내었다. Water를 제외한 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH 그리고 *n*-BuOH 분획물에서는 control과 유의적인 차이가 나타났으며 85% aq. MeOH의 경우 모든 농도에서 50% 이상의 높은 세포 증식 억제효과를 나타내었다($p < 0.05$).

AGS, HT-29 그리고 HT-1080 암세포에 대한 각 분획물들의 IC₅₀ 값을 Table 8에 나타내었다. AGS 암세포에서 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water 분획물들에 대한 IC₅₀ 값은 각각 0.01, 0.07 0.09 그리고 0.16 mg/mL였고 HT-29 암세포에 대한 IC₅₀ 값은 각각 0.04, 0.15 0.09 그리고 0.17 mg/mL였고 HT-1080 암세포에 대한 IC₅₀ 값은 0.08, 0.01 0.31 그리고 1.09 mg/mL로 나타났다.

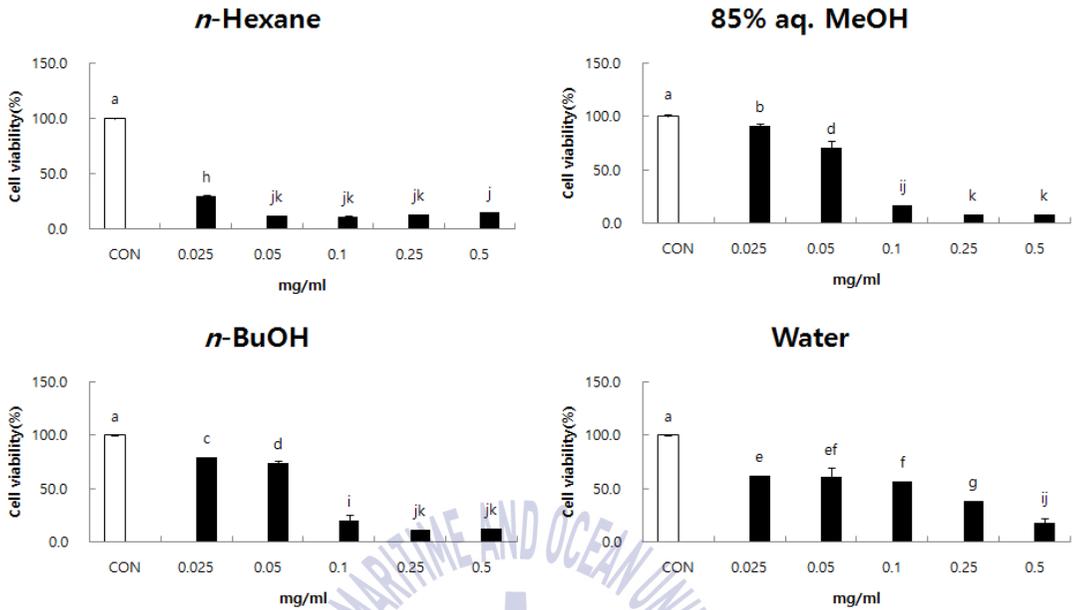


Fig. 17. Inhibitory effect of solvent fractions of extracts from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma

^{a-k}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

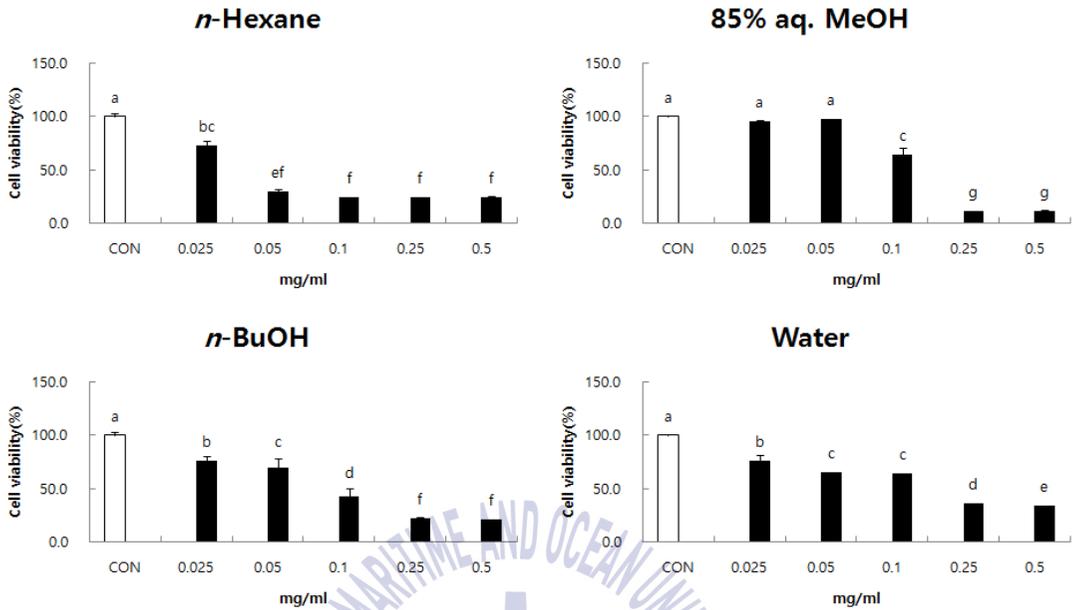


Fig. 18. Inhibitory effect of solvent fractions from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of HT-29 human colon cancer cells
^{a-g}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

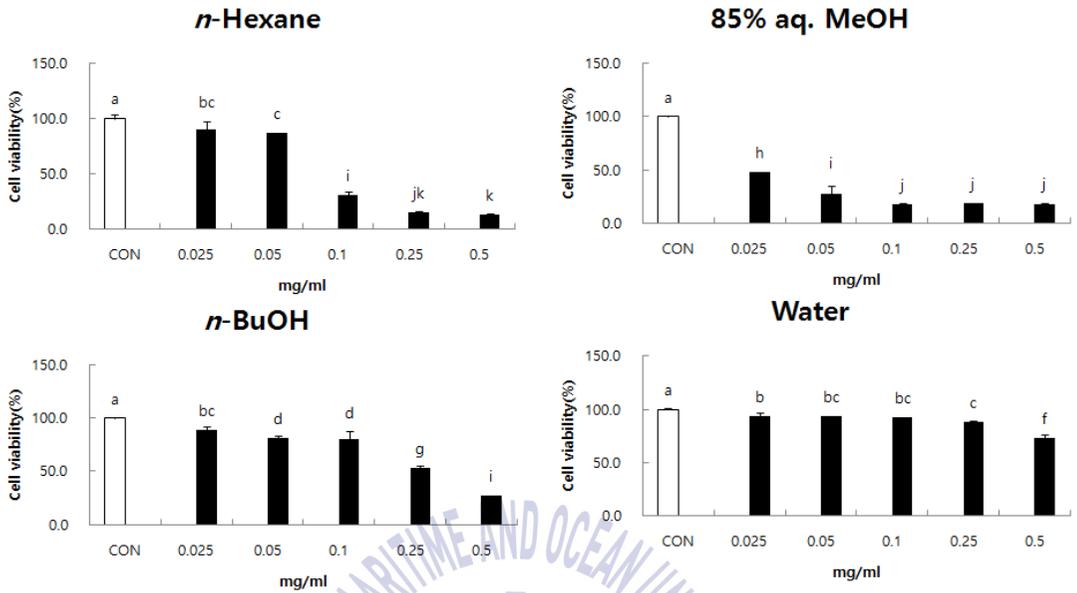
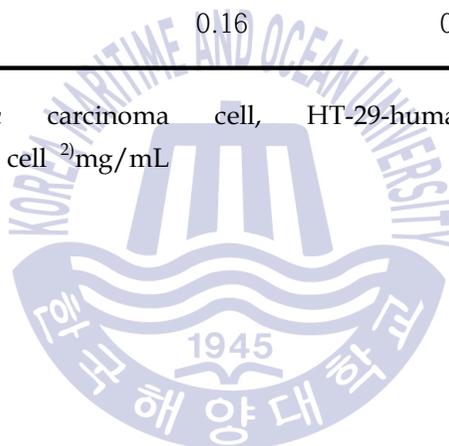


Fig. 19. Inhibitory effect of solvent fractions from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of HT-1080 cell line
^{a-k}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 8. IC₅₀ values of solvent fractions from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on the growth of AGS, HT-29 and HT-1080 cells

Samples	AGS ¹⁾	HT-29	HT-1080
<i>n</i> -Hexane fraction	0.01 ²⁾	0.04	0.08
85% aq. MeOH fraction	0.07	0.15	0.01
<i>n</i> -BuOH fraction	0.09	0.09	0.31
Water fraction	0.16	0.17	1.09

¹⁾AGS-human gastric carcinoma cell, HT-29-human colonic cancer cell, HT-1080-fibrosarcoma cell ²⁾mg/mL



3.3.2.1 초석잠 뿌리의 추출물 및 분획물의 항산화 효과

① 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species) 생성 억제 효과

초석잠 뿌리의 A+M 및 MeOH 추출물을 0.05 및 0.1 mg/mL 의 농도로 인체 섬유유육종세포(HT-1080)에 처리하여 세포 내 활성 산소종을 측정 한 결과, 두 추출물들 모두 측정시간 120 분이 지남에 따라 높은 세포 내 활성산소종 억제 효과를 나타내었다. A+M 추출물의 경우 MeOH 추출물과 비교 하였을 때 세포 내 활성산소종을 상대적으로 크게 억제하였으며, 특히 A+M 추출물 0.5 mg/mL 농도에서는 control 과 비교하여 높은 억제효과를 나타내었다(Fig. 20). 초석잠 추출물의 에틸 아세테이트 분획물은 (알파)-tocopherol, BHT, BHA 와 같은 항산화제에 비해서 과산화지질 형성 억제능, 전자공여능이 우수한 항산화 활성을 갖는다고 보고되었다(Baek, et al). 초석잠 추출물의 에틸아세테이트 분획물은 α -tocopherol, BHT, BHA 와 같은 항산화제에 비해서 과산화지질 형성 억제능, 아질산염 소거능, 전자공여능이 우수한 항산화 활성을 갖는다고 보고되었다(baek, et al, 2004). 또한 Takeda, et al(1985)은 초석잠으로부터 분리한 페놀성 화합물인 4'-methyl ether 7-O- β -(6''-O-acetyl-2''-allosyl)glucoside, isoscutellarein 7-O- β -(6'' -O-acetyl-2'' -allosyl) glucoside, acteoside 는 hyaruloidase 활성을 저해하여 염증을 억제하는 작용을 한다. 초석잠의 항산화 효능과 관련하여 페놀성 및 플라보노이드의 높은 함량 이외에도 Feung, et al(2015)은 초석잠으로부터 추출한 다당류에 의한 라디칼 소거능이 우수함을 밝혔고 이들 다당류는 수소원자 공여자로서 역할하여 라디칼 연쇄반응을 종결시킴으로서 항산화 효과를 나타낸다고 보고하였다.

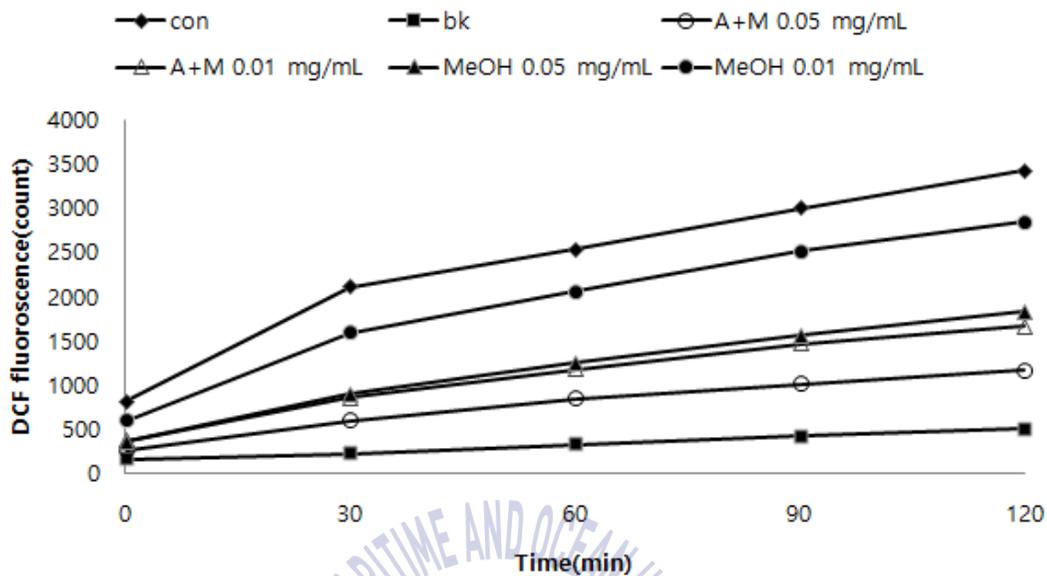
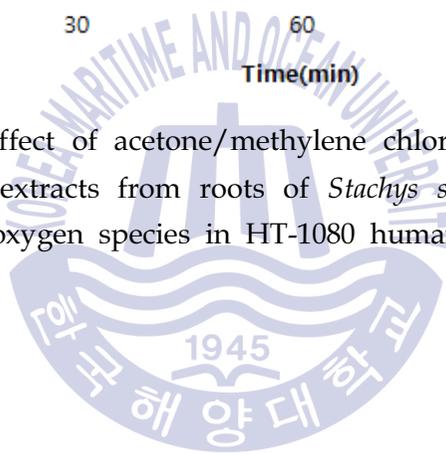


Fig. 20. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells



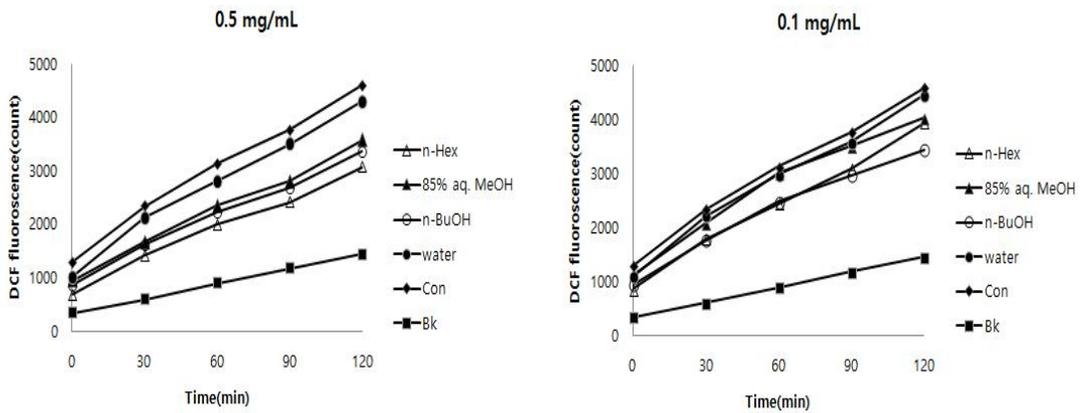


Fig. 21. Inhibitory effect of solvent fractions from roots of *Stachys sieboldii* Miq. fractions on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells



② DPPH 라디칼 소거활성

초석잠 뿌리 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성은 활성산소를 제거할 수 있는 능력인 EDA (electron donating ability, %)로 Table 9에 나타내었다. 각 용매별 추출물 및 분획물을 각각 0.25, 0.05, 0.1, 0.25 그리고 0.5 mg/mL의 농도로 control(L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였다. 먼저 추출물들과 비교했을 때 A+M 추출물은 MeOH 추출물과 비교했을 때 활성산소 소거능이 우수하였다. 이는 앞서 A+M 추출물의 높은 총 플라보노이드 함량과 연관있는 것으로 여겨진다. 분획물들 중 *n*-BuOH 분획물은 실험한 모든 농도에서 EDA 값이 높게 나타났으며, 0.5 mg/mL의 농도에서 85.35%의 소거능을 나타내었다. 이 또한 *n*-BuOH 분획물의 높은 함량의 총 플라보노이드 및 페놀과 연관되어 있다고 여겨진다.



Table 9. DPPH radical scavenging effect of extracts and fractions from roots of *Stachys sieboldii* Miq.*

Sample	concentraion (mg/mL)				
	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5
A+M extract	17.38 ± 0.00 ^d	22.54 ± 0.02 ^e	33.10 ± 0.00 ^e	42.45 ± 0.00 ^e	60.28 ± 0.02 ^e
MeOH extact	11.05 ± 0.00 ^b	12.08 ± 0.00 ^b	14.96 ± 0.01 ^b	18.63 ± 0.02 ^b	27.46 ± 0.01 ^b
n-hexane fraction	9.31 ± 0.00 ^a	10.28 ± 0.01 ^{ab}	11.50 ± 0.01 ^a	13.89 ± 0.00 ^a	15.72 ± 0.00 ^a
85% aq. MeOH fraction	10.91 ± 0.00 ^b	13.64 ± 0.01 ^c	18.39 ± 0.01 ^c	35.84 ± 0.00 ^c	58.73 ± 0.00 ^c
n-BuOH fraction	12.81 ± 0.00 ^c	16.76 ± 0.01 ^d	23.55 ± 0.01 ^d	63.68 ± 0.03 ^d	85.35 ± 0.00 ^d
Water fraction	9.66 ± 0.00 ^a	10.77 ± 0.00 ^{ab}	12.60 ± 0.01 ^a	19.08 ± 0.00 ^b	28.39 ± 0.00 ^b
L-ascorbic acid	99.69 ± 0.00 ^f	99.69 ± 0.00 ^g	99.72 ± 0.00 ^g	99.79 ± 0.00 ^g	99.79 ± 0.00 ^g
BHT	39.34 ± 0.00 ^e	54.33 ± 0.00 ^f	69.56 ± 0.00 ^f	86.98 ± 0.00 ^f	91.45 ± 0.00 ^f

*Values are expressed as mean±SD and ^{a-e}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

③ ABTS+ 라디칼 소거활성

초석잠 추출물 및 분획물의 ABTS+ 라디칼 소거활성도 DPPH 라디칼 소거활성과 마찬가지로 전자공여능인 EDA 로 Table 10 에 나타내었다. 각 용매별 추출물 및 분획물을 각각 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 그리고 0.5 mg/mL 의 농도로 control(L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였다. A+M 추출물과 *n*-BuOH 분획물은 높은 소거능 나타내었다. A+M 추출물은 0.5 mg/ml 의 농도에서 90.36%의 소거능을 나타내었으며 *n*-BuOH 분획물은 90.22%로 control 과 유사한 값을 나타내었다.



Table 10. ABTS radical scavenging effect of extracts and fractions from roots of *Stachys sieboldii* Miq.*

Sample	concentration (mg/mL)				
	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5
A+M extract	24.01 ±0.02 ^b	39.22 ±0.01 ^d	68.43 ±0.05 ^d	89.57 ±0.01 ^e	90.36 ±0.00 ^d
MeOH extract	10.76 ±0.00 ^{ab}	14.56 ±0.00 ^c	24.85 ±0.00 ^b	40.70 ±0.02 ^c	65.00 ±0.02 ^b
n-hexane fraction	3.20 ±0.00 ^a	4.17 ±0.00 ^a	5.89 ±0.00 ^{ab}	8.39 ±0.00 ^a	12.47 ±0.00 ^a
85% aq. MeOH fraction	25.64 ±0.15 ^b	22.72 ±0.02 ^e	41.72 ±0.06 ^c	67.87 ±0.04 ^d	90.77 ±0.00 ^d
n-BuOH fraction	18.68 ±0.01 ^b	39.82 ±0.02 ^d	54.43 ±0.02 ^{bc}	90.91 ±0.00 ^e	90.22 ±0.00 ^d
Water fraction	5.56 ±0.00 ^{ab}	8.44 ±0.00 ^b	13.26 ±0.01 ^{ab}	28.74 ±0.01 ^b	54.94 ±0.01 ^c
BHT	92.77 ±0.00 ^c	92.91 ±0.00 ^f	92.77 ±0.00 ^e	93.05 ±0.00 ^e	92.77 ±0.00 ^e
L-ascorbic acid	92.91 ±0.00 ^c	92.91 ±0.00 ^f	92.77 ±0.00 ^e	93.05 ±0.00 ^e	92.91 ±0.00 ^e

*Values are expressed as mean±SD and ^{a-e}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

④ Genomic DNA 산화 억제 효과

수퍼옥사이드 이온(O_2^-), 과산화수소(H_2O_2) 그리고 하이드록시 라디칼(OH)같은 활성산소는 세포의 DNA 염기변이나 염기가닥 손상 등 DNA 를 산화시킨다. 이러한 산화적 스트레스의 요인에 의해 DNA 가 손상을 입게되면 암이나 노화 같은 생리학적 문제가 나타난다고 밝혀졌다(Halliwell, et al., 1984).

초석잠의 추출물 및 분획물을 이용하여 직접적으로 DNA 산화를 억제시키는 효과를 보기위해 HT-1080 세포로부터 genomic DNA 를 추출하여 H_2O_2 와 $FeSO_4$ 를 이용하여 DNA 를 산화시켜 샘플이 DNA 산화를 방지하는 정도를 측정하였다. 대조군으로는 H_2O_2 와 $FeSO_4$ 만 넣고 산화시킨 control 과 시료와 산화제를 넣지 않은 Blank 를 사용하였다.

초석잠의 DNA oxidation 실험 결과 추출물 및 분획물 모두 blank 와 비교했을 때 유의적 차이를 가졌다($p < 0.05$). 그 가운데 85% aq. MeOH 분획물의 경우 blank 과 비슷한 수준의 매우 높은 산화 억제효과가 나타났다(Fig. 22).

Devasagayam, et al. (1995)는 천연항산화제인 카로티노이드와 플라보노이드가 ROS에 대해 pBR322 plasmid DNA를 보호한다고 밝혔고, Noroozi, et al. (1998)은 플라보노이드와 카로티노이드가 인체립프구에서 H_2O_2 에 대한 DNA 산화에 대해 효과적이라고 밝혔다.

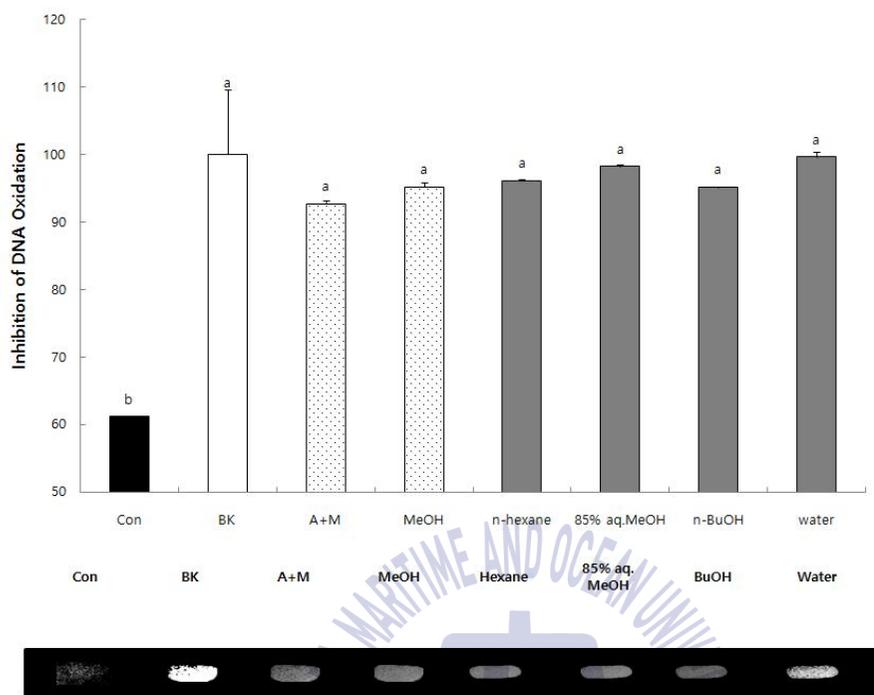


Fig. 22. Antioxidant effect of crude extracts and solvent fractions from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on genomic DNA in HT-1080 human fibrosarcoma cells

^{a-b}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

⑤ Glutathione (GSH) 생성 상승 효과

Glutathione (L- γ -glutamyl-L-cysteyl-glycine, GSH)은 thiol 기를 포함한 tripeptide 로 세포내 풍부하게 존재 하는 물질로서 체내에 산화적 스트레스의 영향으로 생성된 GSH 는 활성 산소종을 제거하거나 glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, thioltransferase 같이 항산화 효소들의 조효소로 작용하여 세포에 작용하는 산화적 스트레스를 억제시킨다(Schroeder, et al., 1996; Dickinson, et al., 2002). 그리고 높아진 GSH 는 산화적 스트레스로 유도된 세포자멸사로부터 세포를 보호하는데 세포자멸사, 괴사, 염증에 필수적인 역할을 하는 cysteins protease 인 caspases 의 촉매적 위치에 GSH 가 작용하여 세포자멸사를 방어한다(Musallam, et al., 2002).

초석잠의 추출물 및 분획물이 세포 내의 GSH 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 HT-1080 세포에 추출물 및 분획물들을 0.025, 0.5, 0.1, 0.25 그리고 0.5 mg/mL 의 농도로 처리한 후 mBBr 처리를 하고 90 분 후 측정된 결과, Fig. 23 과 같다. 초석잠 추출물들의 경우 모든 농도에서 control 보다 GSH 는 함량이 유의적으로 증가하였고 상대적으로 MeOH 추출물보다 A+M 추출물의 GSH 함량이 높은 것으로 확인되었다($p < 0.05$). Fig. 24 에서는 각 추출물을 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, Water 로 분획하여 GSH 함량을 측정한 것으로 모든 농도에서 control 과 유의적으로 높은 GSH 함량이 나타났다($p < 0.05$).

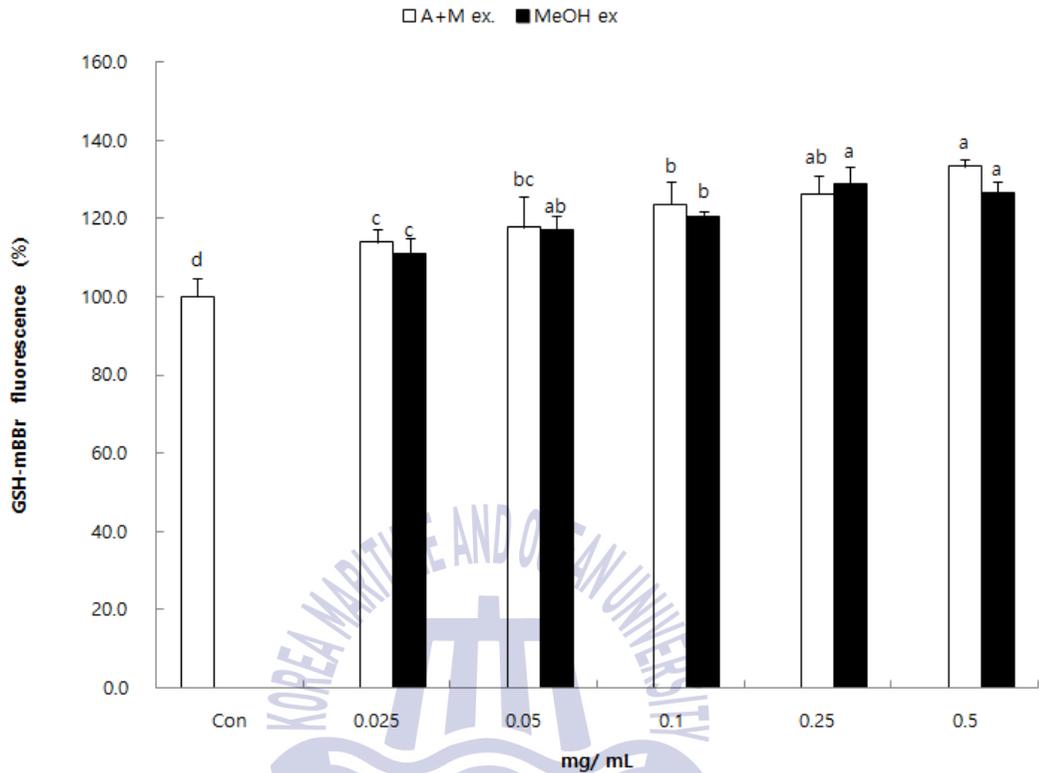


Fig. 23. Effect of acetone/methylen chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells

^{a-c}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

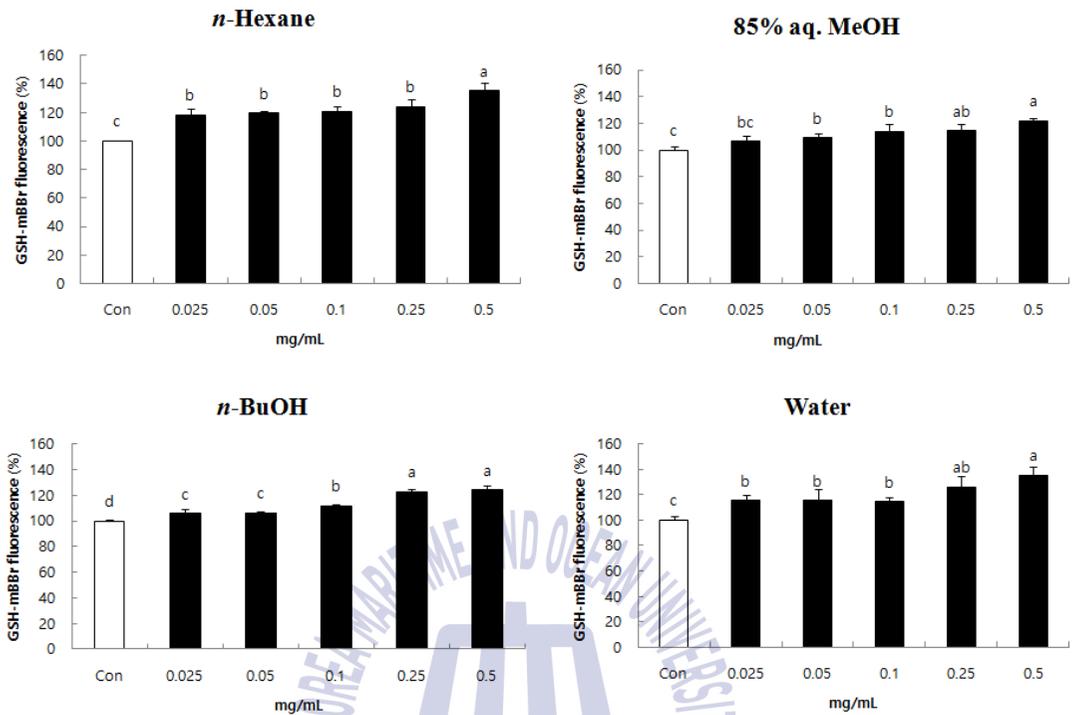


Fig. 24. Effect of solvent fractions of extracts from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells
^{a-c}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

3.3.2.2 초석잠 잎의 추출물 및 분획물의 항산화 효과

① 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species) 생성 억제 효과

초석잠 잎의 A+M 및 MeOH 추출물을 0.5 및 0.1 mg/mL의 농도로 인체 섬유육종세포(HT-1080)에 처리하여 세포 내 활성 산소종을 측정된 결과, 두 추출물들 모두 측정시간 120 분이 지남에 따라 높은 세포 내 활성산소종 억제 효과를 나타내었다. MeOH 추출물의 경우 A+M 추출물과 비교 하였을 때 세포 내 활성산소종을 상대적으로 크게 억제하였으며, 특히 MeOH 추출물 0.5 mg/mL 농도에서는 control 과 비교하여 높은 억제효과를 나타내었다(Fig. 25). 초석잠 추출물을 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, Water 로 다시 추출하여 얻은 분획물을 0.5 및 0.1 mg/mL의 농도로 처리하였을 때, 0.5 mg/mL 에서 *n*-BuOH > 85% aq. MeOH > Water > *n*-Hexane 분획물 순으로 세포 내 활성산소종 억제율이 높게 나타났다. 이들 중 가장 높은 세포 내 활성산소종 억제 효과를 나타낸 *n*-BuOH 분획물의 경우 높은 억제율을 보였다(Fig. 26).

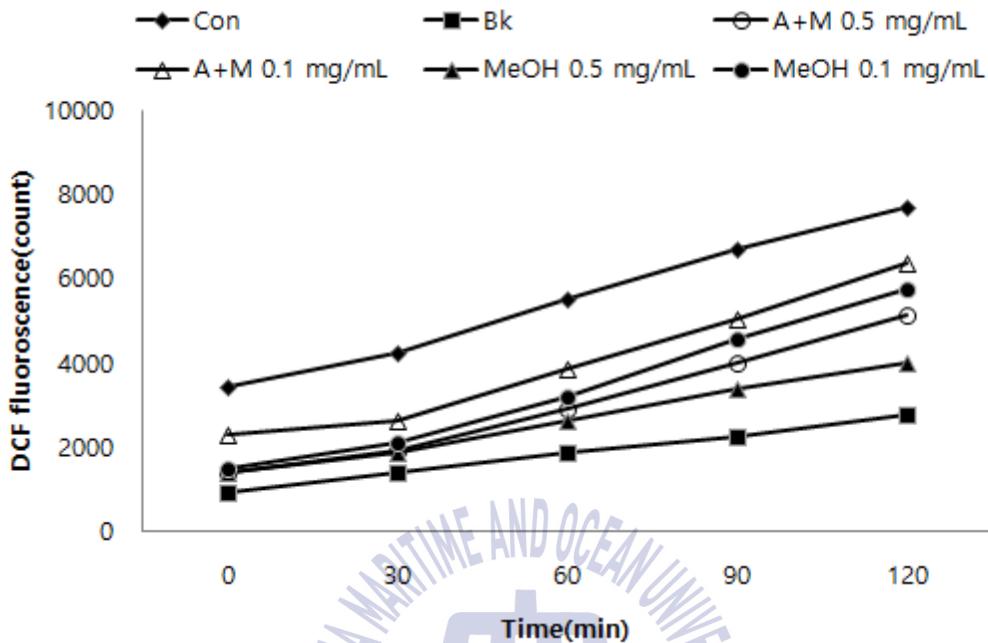


Fig. 25. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells

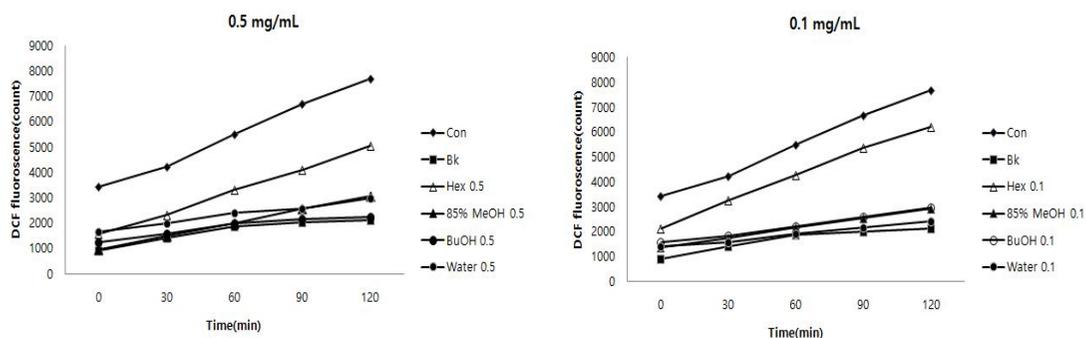


Fig. 26. Inhibitory effect of solvent fractions from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. extracts on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells



② DPPH 라디칼 소거활성

초석잠 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성은 활성산소를 제거할 수 있는 능력인 EDA (electron donating ability, %)로 Table 11에 나타내었다. 각 용매별 추출물 및 분획물을 각각 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 그리고 0.5 mg/mL의 농도로 control(L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였다. 먼저 추출물들과 비교했을 때 MeOH 추출물은 A+M 추출물과 비교했을 때 활성산소 소거능이 우수하였다. 이는 앞서 MeOH 추출물의 높은 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량과 연관있는 것으로 여겨진다. 분획물들 중 *n*-BuOH 분획물의 EDA 값이 높게 나타났으며, 0.5 mg/mL의 농도에서 17.79%의 소거능을 나타냄으로써 이 또한 *n*-BuOH 분획물의 높은 함량의 총 플라보노이드 및 페놀과 연관되어 있다고 여겨진다.



Table 11. DPPH radical scavenging effect of extracts and fractions from leaves of *Stachys sieboldii* Miq.*

Sample	concentration (mg/mL)				
	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5
A+M extract	9.49±0.00 ^a	9.44±0.00 ^a	9.44±0.00 ^a	7.12±0.00 ^a	11.71±0.01 ^a
MeOH extract	11.82±0.00 ^c	12.72±0.01 ^c	15.30±0.00 ^d	20.27±0.00 ^f	25.71±0.01 ^f
<i>n</i> -Hexane fraction	10.29±0.00 ^b	9.81±0.01 ^b	10.76±0.00 ^b	11.29±0.00 ^c	10.13±0.00 ^c
85% aq. fraction	11.13±0.00 ^c	11.76±0.00 ^c	13.40±0.00 ^c	14.30±0.00 ^d	15.73±0.00 ^d
<i>n</i> -BuOH fraction	11.34±0.00 ^c	11.76±0.00 ^c	13.35±0.00 ^c	15.25±0.00 ^e	17.79±0.00 ^e
Water fraction	9.86±0.00 ^{ab}	10.02±0.00 ^{ab}	10.18±0.00 ^b	10.13±0.00 ^b	8.75±0.01 ^b
L-ascorbic acid	91.33±0.00 ^e	91.44±0.00 ^e	91.44±0.00 ^f	91.55±0.00 ^f	91.55±0.00 ^h
BHT	41.25±0.00 ^d	61.11±0.00 ^d	63.23±0.00 ^e	86.05±0.00 ^g	88.48±0.00 ^g

*Values are expressed as mean±SD and ^{a-h}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

③ ABTS+ 라디칼 소거활성

초석잠 추출물 및 분획물의 ABTS+ 라디칼 소거활성도 DPPH 라디칼 소거활성과 마찬가지로 전자공여능인 EDA 로 Table 12 에 나타내었다. 각 용매별 추출물 및 분획물을 각각 0.05, 0.1, 0.25 그리고 0.5 mg/mL 의 농도로 control(L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였다. MeOH 추출물과 *n*-BuOH 분획물은 0.25 및 0.5 mg/mL 농도에서 MeOH 추출물은 85.34% 및 65.31%의 소거능을 나타내었으며 *n*-BuOH 분획물은 77.08%, 53.12%의 EDA 값을 나타내었다.



Table 12. ABTS radical scavenging effect of extracts and fractions from leaves of *Stachys sieboldii* Miq.*

Sample	concentration (mg/mL)				
	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5
A+M extract	5.55±0.00 ^a	7.62±0.00 ^a	9.75±0.00 ^b	12.99±0.00 ^b	13.68±0.01 ^a
MeOH extract	15.19±0.00 ^e	24.55±0.00 ^e	39.97±0.01 ^f	65.31±0.00 ^e	85.34±0.00 ^e
<i>n</i> -Hexane fraction	5.48±0.00 ^a	7.00±0.00 ^a	8.38±0.00 ^a	11.13±0.00 ^a	12.16±0.00 ^a
85% aq. MeOH fraction	9.27±0.00 ^b	13.54±0.00 ^b	17.74±0.00 ^c	23.73±0.00 ^c	30.06±0.00 ^b
<i>n</i> -BuOH fraction	13.06±0.00 ^d	20.90±0.00 ^d	31.78±0.00 ^e	53.12±0.01 ^f	77.08±0.00 ^d
Water fraction	10.30±0.00 ^c	15.26±0.00 ^c	24.21±0.00 ^d	42.38±0.00 ^d	64.55±0.01 ^c
L-ascorbic acid	92.84±0.00 ^f	92.98±0.00 ^f	92.84±0.00 ^g	93.12±0.00 ^g	92.98±0.00 ^f
BHT	92.84±0.01 ^f	92.98±0.01 ^f	92.84±0.01 ^g	93.12±0.01 ^g	92.84±0.00 ^f

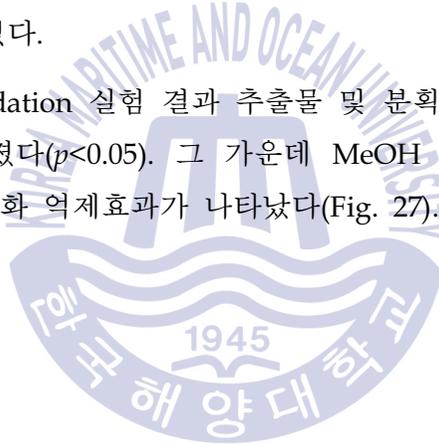
*Values are expressed as mean±SD and ^{a-g}Means with the different letters are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test

④ Genomic DNA 산화 억제 효과

수퍼옥사이드 이온(O_2^-), 과산화수소(H_2O_2) 그리고 하이드록시 라디칼(OH)같은 활성산소는 세포의 DNA 염기변이나 염기가닥 손상 등 DNA 를 산화시킨다. 이러한 산화적 스트레스의 요인에 의해 DNA 가 손상을 입게되면 암이나 노화 같은 생리학적 문제가 나타난다고 밝혀졌다(Halliwell, et al., 1984).

초석잠의 추출물 및 분획물을 이용하여 직접적으로 DNA 산화를 억제시키는 효과를 보기위해 HT-1080 세포로부터 genomic DNA 를 추출하여 H_2O_2 와 $FeSO_4$ 를 이용하여 DNA 를 산화시켜 샘플이 DNA 산화를 방지하는 정도를 측정하였다. 대조군으로는 H_2O_2 와 $FeSO_4$ 만 넣고 산화시킨 control 과 시료와 산화제를 넣지 않은 Blank 를 사용하였다.

초석잠의 DNA oxidation 실험 결과 추출물 및 분획물 모두 blank 와 비교했을 때 유의적 차이를 가졌다($p < 0.05$). 그 가운데 MeOH 추출물과 85% aq. MeOH 분획물의 경우 높은 산화 억제효과가 나타났다(Fig. 27).



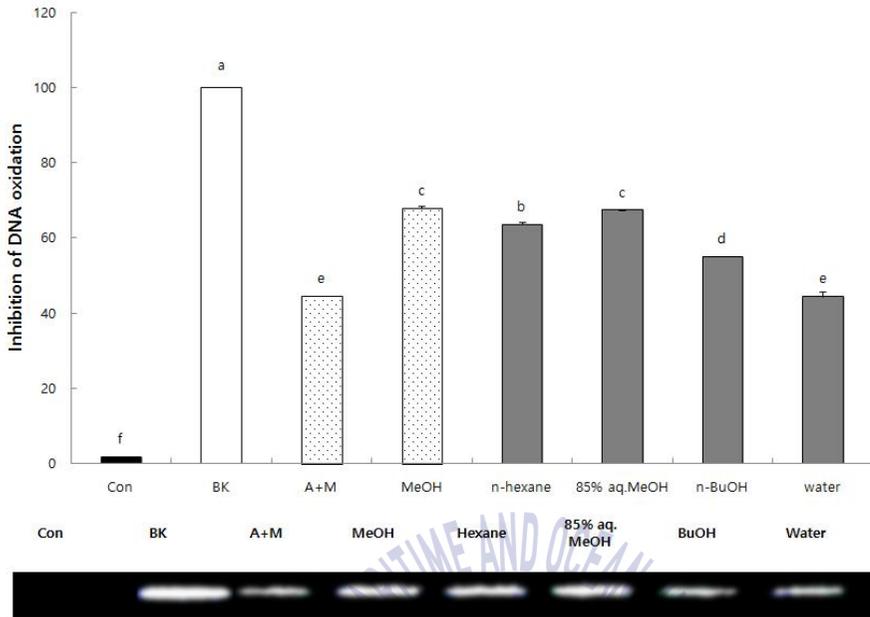


Fig. 27. Antioxidant effect of crude extracts and solvent fractions from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on genomic DNA in HT-1080 human fibrosarcoma cells

^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

⑤ Glutathione (GSH) 생성 상승 효과

Glutathione (L- γ -glutamyl-L-cysteyl-glycine, GSH)은 thiol 기를 포함한 tripeptide 로 세포내 풍부하게 존재 하는 물질로서 체내에 산화적 스트레스의 영향으로 생성된 GSH 는 활성 산소종을 제거하거나 glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, thioltransferase 같이 항산화 효소들의 조효소로 작용하여 세포에 작용하는 산화적 스트레스를 억제시킨다(Schroeder, et al., 1996; Dickinson, et al., 2002). 그리고 높아진 GSH 는 산화적 스트레스로 유도된 세포자멸사로부터 세포를 보호하는데 세포자멸사, 괴사, 염증에 필수적인 역할을 하는 cysteins protease 인 caspases 의 촉매적 위치에 GSH 가 작용하여 세포자멸사를 방어한다(Musallam, et al., 2002).

초석잡의 추출물 및 분획물이 세포 내의 GSH 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 HT-1080 세포에 추출물 및 분획물들을 0.1, 0.25, 0.5 그리고 1 mg/mL 의 농도로 처리한 후 mBBr 처리를 하고 90 분 후 측정된 결과, Fig. 28 과 같다. 초석잡 추출물들의 경우 모든 농도에서 control 보다 GSH 는 함량이 유의적으로 증가하였고 상대적으로 MeOH 추출물보다 A+M 추출물의 GSH 함량이 높은 것으로 확인되었다($p < 0.05$). Fig. 29 에서는 각 추출물을 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, Water 로 분획하여 GSH 함량을 측정된 것으로 모든 분획물들이 유의적으로 증가하는 GSH 함량이 나타났다($p < 0.05$).

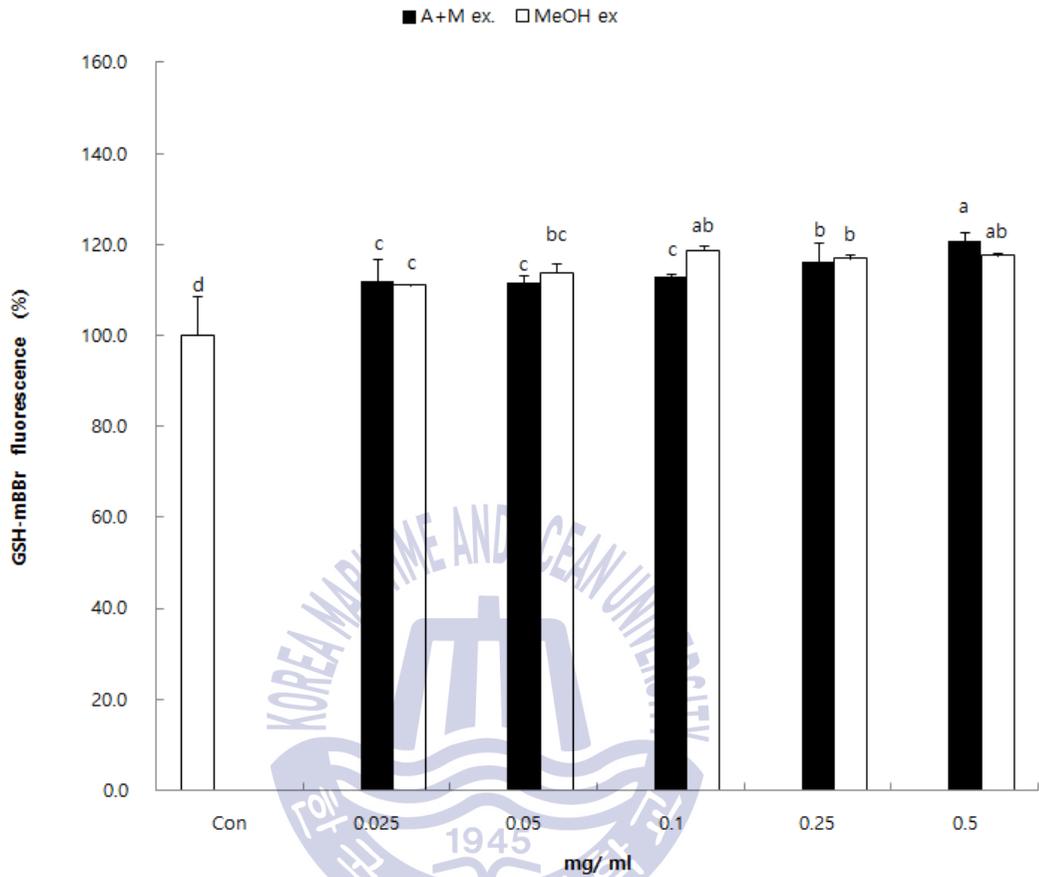


Fig. 28. Effect of acetone/methylen chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells

^{a-c}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

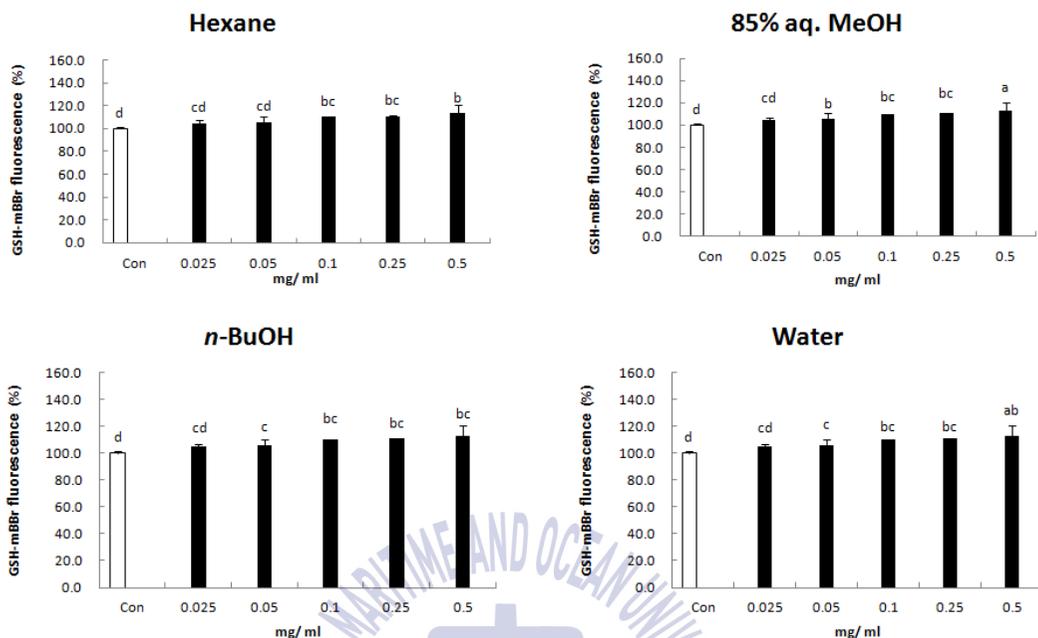


Fig. 29. Effect of solvent fractions of extracts from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells
^{a-d}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

3.3.3.1 초석잠 뿌리의 추출물 및 분획물의 항염증 효과

① 세포 내 Nitric oxide (NO) 생성 저해효과

염증 반응이란 대식세포나 간세포에서 외부자극에 의해 NO, tumor necrosis factor α (TNF- α) 등을 분비를 통해 생체를 보호하는 방어기작 중 하나이다. 염증 반응으로 분비되는 NO는 합성 효소에 의해 L-arginine에서 만들어지며 소량일 경우 혈액순환 촉진, 항균작용, 면역력 증강 등 이로인 효과를 가져오지만 과 분비 시 독성이 강한 peroxynitrite (ONNOO)등을 생성하여 염증 반응을 촉진시켜 여

러 염증질환을 유발하는 것으로 알려져 있다(Minghetti & Levi, 1998; Radi, et al., 1991; Glezer, et al., 2007).

초석잠 뿌리가 NO의 생성에 얼마나 영향을 끼치는지 알아보기 위해서 초석잠 뿌리 추출물 및 분획물들을 세포 배양액에 처리하고, 자극제인 LPS를 이용해 세포를 자극시킨 후 세포 배양액과 Griess 시약과 반응시켜 확인하였다. 시료는 0.5, 1 및 2, mg/mL의 농도로 처리하였으며 대조군으로는 시료 대신 PBS를 처리한 control군과 LPS를 처리하지 않은 blank군을 사용하였다. LPS를 처리한 control군의 경우 NO 생성량이 상대적으로 높았으며 LPS를 처리하지 않은 blank군은 NO 생성량이 상대적으로 낮게 나타났다. 초석잠 뿌리 A+M 추출물과 MeOH 추출물은 모두 농도 의존적으로 NO 생성을 저해하였다($P < 0.05$). 2 mg/mL의 농도에서는 control군과 비교하였을 때 A+M 추출물은 67.9% MeOH 추출물은 78.4%의 높은 NO 생성 저해 효과가 나타났다(Fig. 30).



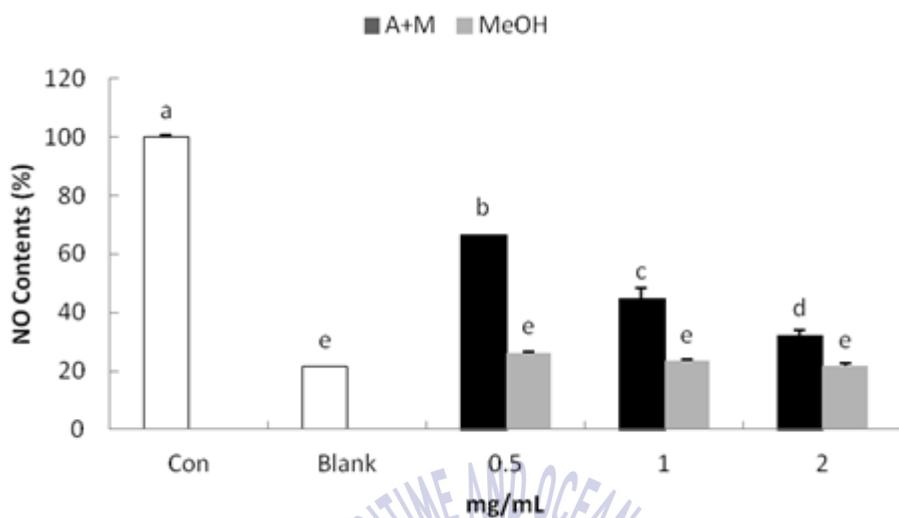


Fig. 30. Effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells
 $*P < 0.05$, significant effect between the control and each extract

초석잠 뿌리의 추출물을 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water로 다시 분획하여 얻어진 각 분획물을 농도별로 처리 후 NO 생성량을 측정한 결과로 모든 분획물들이 0.5, 1 및 2 mg/mL의 농도에서 control과 유의적 차이를 보였다($p < 0.05$). 분획물들 가운데 85% aq. MeOH과 Water 분획물이 2 mg/mL의 농도에서 control과 비교했을 때 각각 75.4% 및 77.9%로 높은 NO 생성 저해 효과를 나타내었으며 *n*-Hexane과 *n*-BuOH 분획물의 경우에는 각각 74.7% 및 70.5%의 NO 생성 저해 효과를 나타내었다(Figs. 31~34).



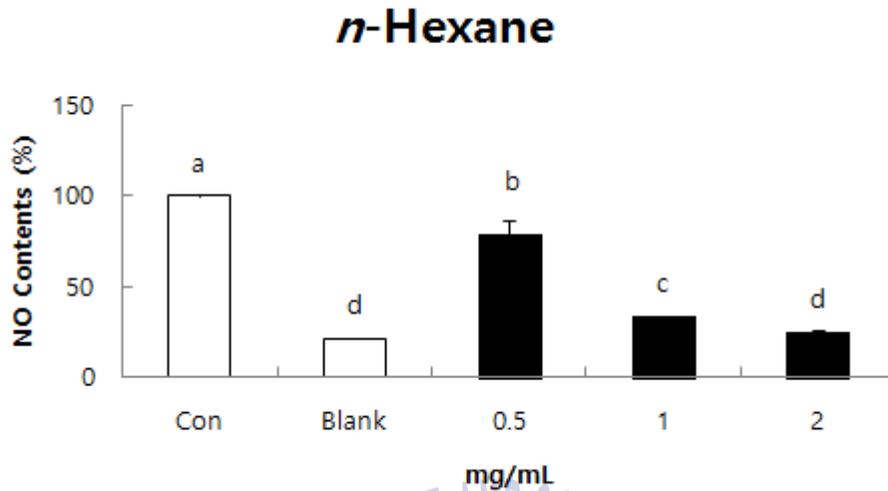
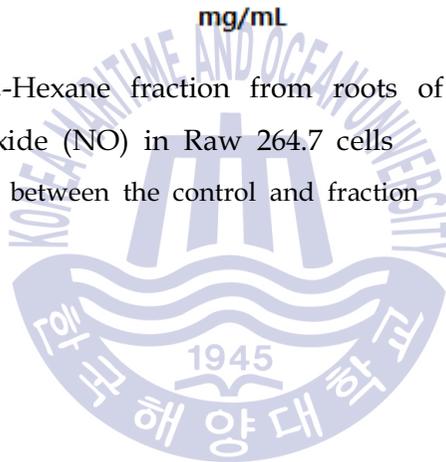


Fig. 31. Effect of *n*-Hexane fraction from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells
 $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction



85% aq. MeOH

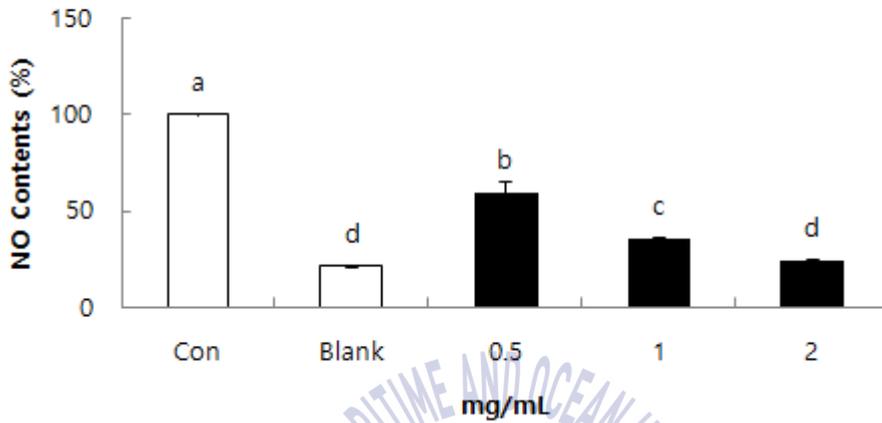
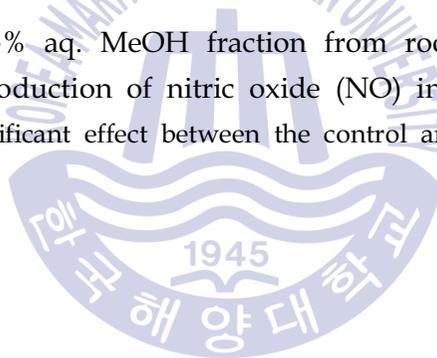


Fig. 32. Effect of 85% aq. MeOH fraction from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells
* $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction



n-BuOH

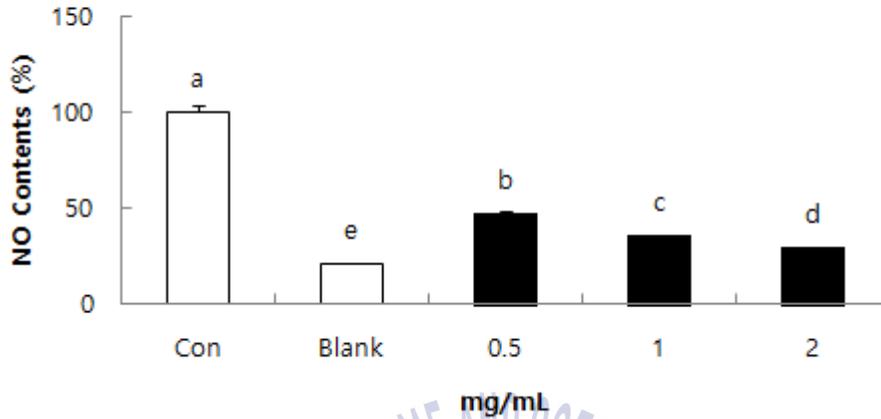
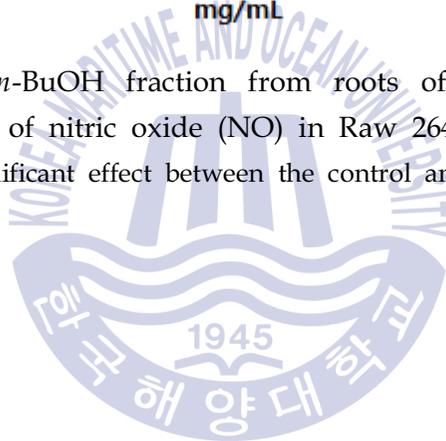


Fig. 33. Effect of *n*-BuOH fraction from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells
* $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction



Water

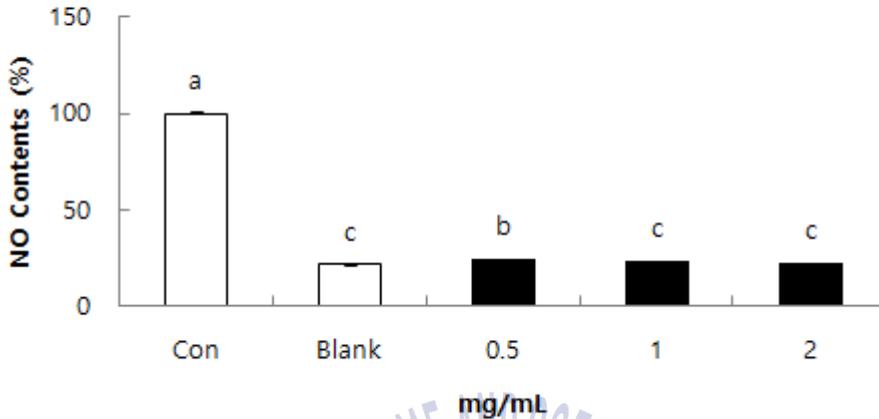
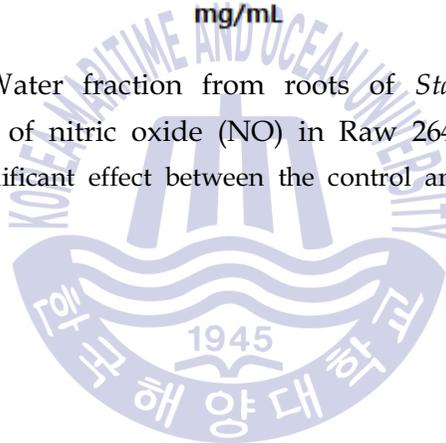


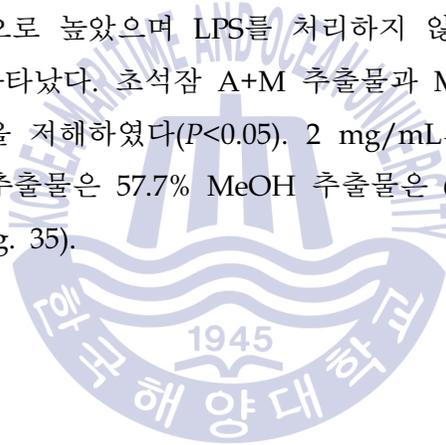
Fig. 34. Effect of Water fraction from roots of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cell
* $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction



3.3.3.2 초석잠 잎의 추출물 및 분획물의 항염증 효과

① 세포 내 Nitric oxide (NO) 생성 저해효과

초석잠 잎이 NO의 생성에 얼마나 영향을 끼치는지 알아보기 위해서 초석잠 추출물 및 분획물들을 세포 배양액에 처리하고, 자극제인 LPS를 이용해 세포를 자극시킨 후 세포 배양액과 Griess 시약과 반응시켜 확인하였다. 시료는 0.5, 1 및 2, mg/mL의 농도로 처리하였으며 대조군으로는 시료 대신 PBS를 처리한 control 군과 LPS를 처리하지 않은 blank군을 사용하였다. LPS를 처리한 control군의 경우 NO 생성량이 상대적으로 높았으며 LPS를 처리하지 않은 blank군은 NO 생성량이 상대적으로 낮게 나타났다. 초석잠 A+M 추출물과 MeOH 추출물은 모두 농도 의존적으로 NO 생성을 저해하였다($P < 0.05$). 2 mg/mL의 농도에서는 control군과 비교하였을 때 A+M 추출물은 57.7% MeOH 추출물은 61.1%의 높은 NO 생성 저해 효과가 나타났다(Fig. 35).



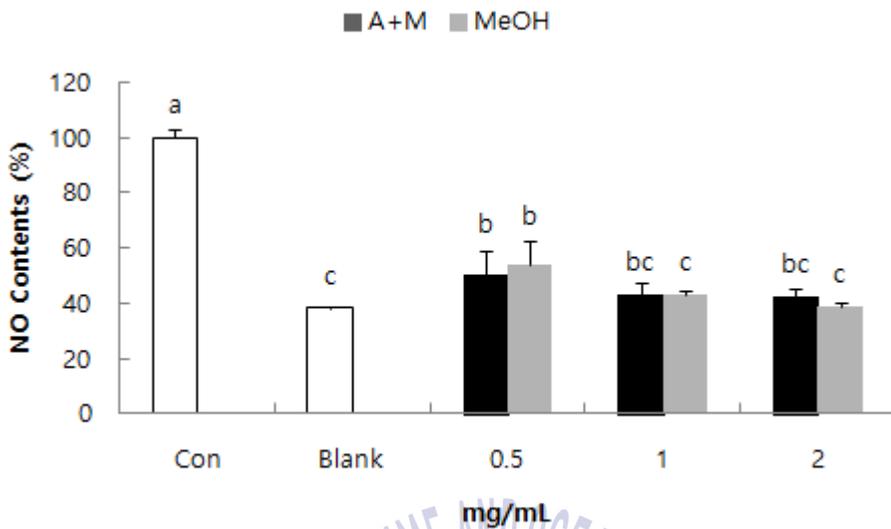


Fig. 35. Effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells
 * $P < 0.05$, significant effect between the control and each extract

초석잠 잎 추출물을 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water로 다시 분획하여 얻어진 각 분획물을 농도별로 처리 후 NO 생성량을 측정한 결과로 모든 분획물들이 0.5, 1 및 2 mg/mL의 농도에서 control과 유의적 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 분획물들 가운데 *n*-Hexane과 *n*-BuOH 분획물이 2 mg/mL의 농도에서 control과 비교했을 때 각각 60.4% 및 61.4%로 추출물 보다 높은 NO 생성 저해 효과를 나타내었으며 85% aq. MeOH 과 Water 분획물의 경우에는 각각 55.8% 및 59.8%의 저해 효과로 추출물들과 유사한 NO 생성 저해 효과를 나타내었다 (Figs. 36~39).



n-Hexane

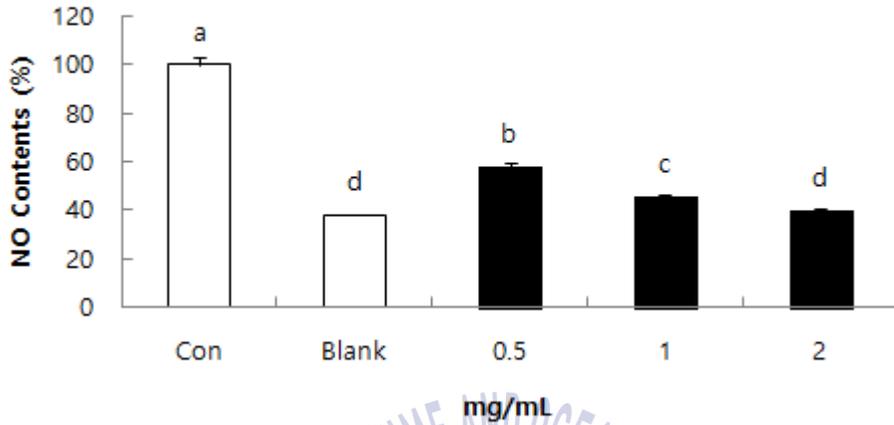
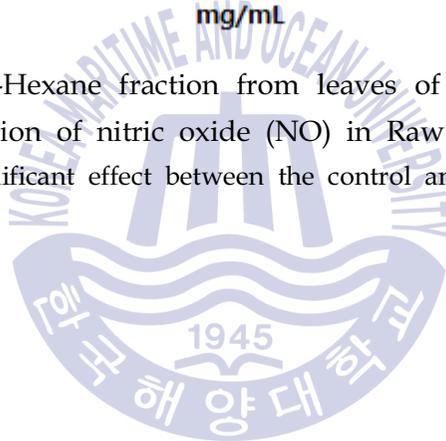


Fig. 36. Effect of *n*-Hexane fraction from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells
* $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction



85% aq. MeOH

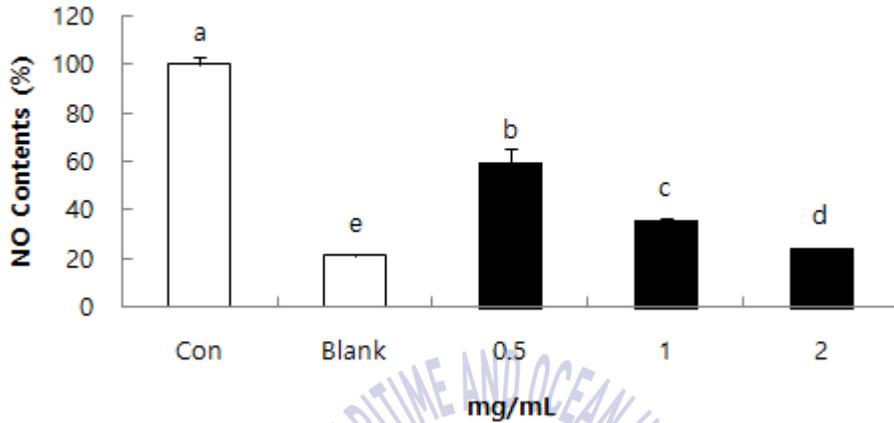
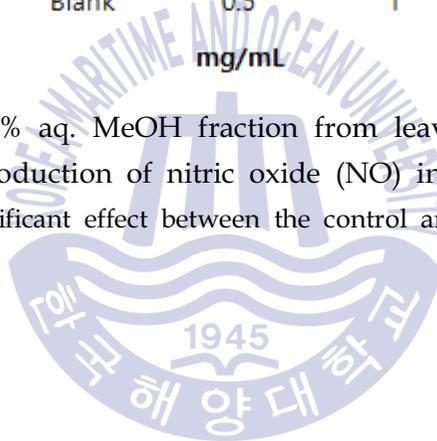


Fig. 37. Effect of 85% aq. MeOH fraction from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells
* $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction



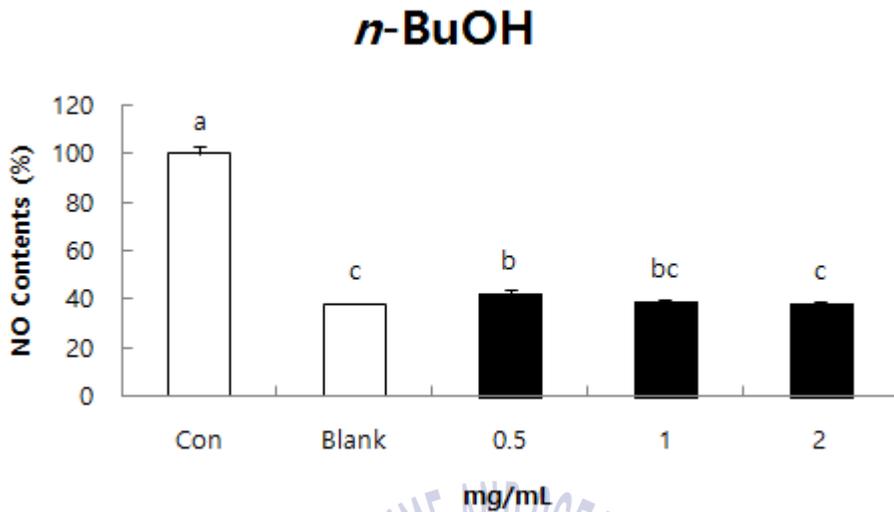
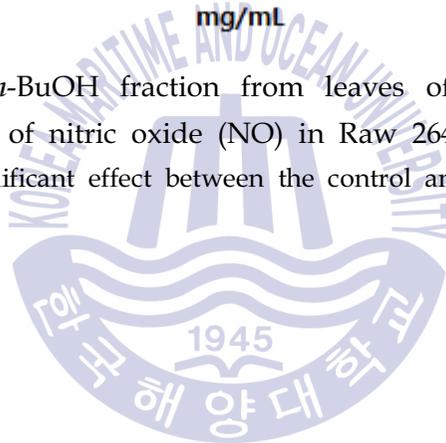


Fig. 38. Effect of *n*-BuOH fraction from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells
 $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction



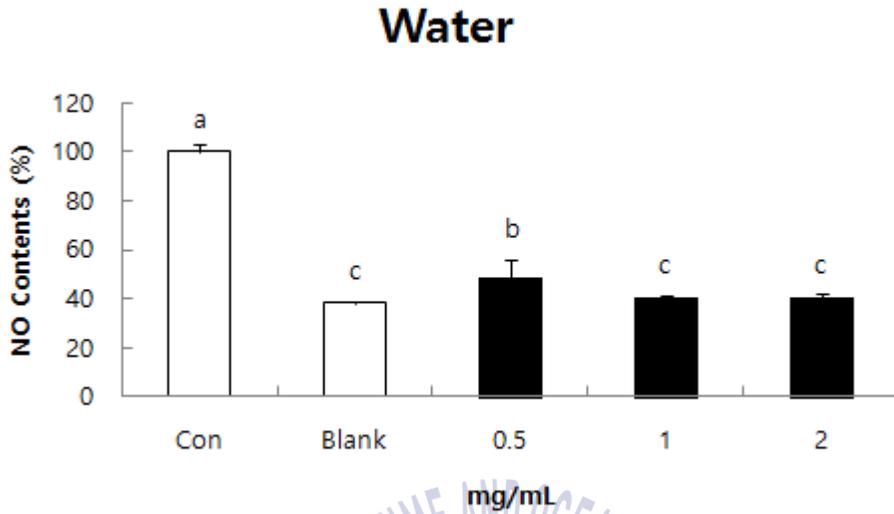
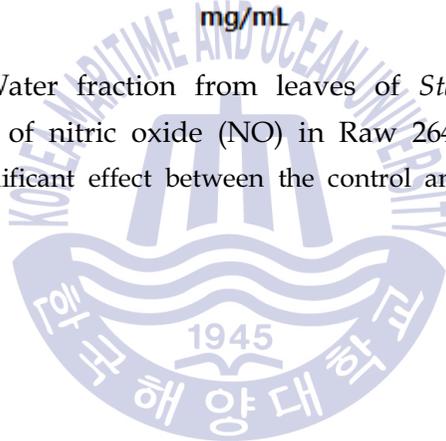


Fig. 39. Effect of Water fraction from leaves of *Stachys sieboldii* Miq. on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cell
 $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction



제 4 장 요약 및 결론

본 연구에서는 초석잠 뿌리 및 잎을 이용하여 각기 다른 용매를 이용해 추출 및 분획하여 총 플라보노이드, 총 페놀함량 및 지방산 조성을 분석하였고 초석잠의 항암, 항산화 그리고 항염증 효과에 대해 연구하였다.

총 플라보노이드의 경우 초석잠 뿌리는 A+M과 MeOH 추출물에서 각각 3.15 mg/g과 7.04 mg/g으로 MeOH 추출물의 플라보노이드 함량이 많았으며, *n*-BuOH 분획물에서 16.67 mg/g으로 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다. 초석잠 잎 A+M과 MeOH 추출물에서 각각 7.59 mg/g과 9.44 mg/g으로 MeOH 추출물의 플라보노이드 함량이 많았으며, 85% aq. MeOH 분획물에서 10.37 mg/g으로 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다. 총 페놀함량의 경우 A+M과 MeOH 추출물에서 각각 뿌리는 0.35 mg/g과 0.41 mg/g, 잎은 0.23 mg/g, 0.24 mg/g으로 MeOH 추출물이 많았다.

초석잠 뿌리와 잎의 지방산 분석을 한 결과 각각 *n*-6계 지방산 linoleic acid (18:2n-6)이 54.27% *n*-9계 지방산 oleic acid (18:1n-9)이 16.37%로 가장 높은 함량을 나타내었다.

초석잠 뿌리와 잎 A+M과 MeOH 추출물의 인체 유래 암세포인 HT-29, AGS 및 HT-1080 암세포에 대한 증식 억제효과를 측정한 결과 뿌리 A+M 추출물 IC₅₀ 값은 각각 0.06, 0.40 그리고 0.19 mg/mL로 MeOH 추출물에 비해 높은 억제효과를 나타내었고 AGS 위암세포에서 잎 A+M 및 MeOH 추출물의 IC₅₀ 값은 각각 0.04, 0.03 mg/mL로 나타내었다($p < 0.05$). 뿌리 및 잎 분획물들에 의한 인체 유래 암세포의 증식 억제효과를 확인해 본 결과, 뿌리 분획물들 중 특히 *n*-Hexane 및 85% aq. MeOH 분획물들에 의한 증식 억제효과가 높았으며 HT-29, AGS 및 HT-1080 암세포들에서 *n*-Hexane 분획물 IC₅₀ 값은 각각 0.03 0.23 및 0.01 mg/mL였고 85% aq. MeOH 분획물 IC₅₀ 값은 각각 0.12, 0.30 및 0.17 mg/mL로 나타났다. 잎

의 경우 *n*-Hexane 분획물 IC₅₀ 값은 0.01, 0.04 및 0.08 mg/mL였고, 85% aq. MeOH 분획물 IC₅₀ 값은 0.07, 0.15 및 0.01 mg/mL로 뿌리의 경우와 유사하게 이들 두 분획물들에 의한 증식 억제효과가 높았다($p < 0.05$).

항산화 효과의 경우 A+M 및 MeOH 추출물들에 의한 활성산소종 (ROS) 억제 효과를 비교한 결과 뿌리 A+M 추출물과 잎 MeOH 추출물이 상대적으로 높은 활성산소종 저해효과를 나타냈다. 초석잠 뿌리와 잎 분획물들 중에서 뿌리 *n*-BuOH 분획물과 잎 85% aq. MeOH 분획물에 의한 ROS 억제효과가 높았다. DPPH 라디칼 소거 활성과 ABTS 라디칼 소거 활성의 경우 라디칼 소거 활성능이 유사하게 나타내었다. 초석잠 뿌리의 경우 A+M 추출물과 85% aq. MeOH 분획물에서 높은 라디칼 소거활성을 보였고 잎은 MeOH 추출물과 *n*-BuOH 분획물에서 높은 소거활성을 보였으며($p < 0.05$) ROS 억제효과와 유사한 항산화 효과를 나타내었다.

HT-1080세포에서 추출한 DNA를 이용하여 DNA 산화 억제효과를 알아본 결과 초석잠 뿌리와 잎 추출물 및 분획물들 모두 control과 비교했을 때 유의적 차이를 보였다($p < 0.05$). 특히 뿌리와 잎 MeOH 추출물과 85% aq. MeOH 분획물에 의한 DNA 산화 억제효과가 높게 나타났다($p < 0.05$). HT-1080 세포를 이용하여 GSH 생성을 측정한 결과 뿌리와 잎의 A+M 및 MeOH 추출물에서 control과 비교했을 때 GSH 함량이 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 분획물들의 경우도 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water 분획물에서 모든 농도에서 GSH 생성이 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$).

항염증 효과의 경우 초석잠 뿌리 및 잎의 NO 생성 저해효과를 알아본 결과 뿌리 및 잎 A+M과 MeOH 추출물을 비교한 결과 뿌리와 잎 모두 MeOH 추출물에서 각각 78.4%, 61.1%로 A+M 추출물에 비해 높은 NO 생성 억제효과를 나타냈으며 분획물들 중에서 뿌리 85% aq. MeOH 분획물이 75.4%, 잎 *n*-BuOH이 61.4%로 높은 NO 억제 효과를 나타내었다.

이상의 결과로부터 사용한 초석잠 뿌리와 잎은 항암효과, 항산화 및 항염증 효과가 우수한 것으로 확인할 수 있었고 그중 특히 항암 및 항산화, 항염증 활성이 높았던 85% aq. MeOH와 *n*-BuOH 분획물을 이용하여 분리 및 정제와 같은 추가

적인 연구가 필요하다고 사료된다.



참 고 문 헌

Baek, H.S., Na, Y.S., Kim, D.H., Lee, C.H., Ryu, B.H., Song, S.K. 2004. Antioxidant Activities of *Stachys sieboldii* MIQ. Roots. *J. LifeSci.*, 14, pp.1-7.

Baek, H.S., Song, S.K., Na, Y.S., Ryu, B.H. 2003. Antioxidant activities of *Stachys sieboldii* MIQ. stalks. *Korean J Biotechnol Bioeng.*, 18, pp.266-271.

Brannen, A.L., 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy toluene and butylated hydroxy anisole. *J. Am. Oilchem Soc.*, 52, pp.59-63.

Chan, K.M., Decker, E.A. and Means, W.J., 1993. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in brrf muscle. *J. Food Sci.*, 58, pp.1-4.

Chae, S.K., Kang, G.S., Ma, S.J., Bang, K.W., Oh, M.M. and Oh, S.H., 2002. *Standard food analysis*. Jigu Publishing: Paju, Korea., pp.381-382.

Coona, G., Deiana, M., Incani, A, Vauzour, D., Dessi, M.A. and Spencer, J.P. 2007. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem. Biophysic. Res. Com.*, 362, pp.606-611.

Denizot F. and Lang R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol Methods.*, 89, pp.271-277.

Derlindati, E., Dall'Asta, M., Ardigò, D., Brighenti, F., Zavaroni,I., Crozier, A.

and Del Rio, D., 2012. Quercetin-3-O-glucuronide affects the gene expression profile of M1 and M2 human macrophages exhibiting anti-inflammatory effects. *Food Funct.*, 3, pp.1144-1152.

Dickinson, D.A. and Forman, H.J., 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem., Pharmacol.*, 64, pp.1019-1026.

Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H., 1957. A Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, pp.497-509.

Glezer, I., Simard, A.R. and Rivest, S., 2007. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience*, 147, pp.867-883.

Gomez-Alonso, S., Collins, V.J., Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G, and Spencer, J.P.E., 2012. Inhibition of colon adenocarcinoma cell proliferation by flavonols is linked to G2/M cell cycle block and reduction in cyclin D1 expression. *Food Chem.*, 130, pp.493-500.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *J. Biochem.*, 219, pp.1-4.

Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O.I. 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol.*, 33, pp.601-617.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., and Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), pp.572-584.

Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H. and Itakura, Y., 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Plant. Med.*, 60, pp.417-420.

Ito, N., Fukushima, S. and Hasebawa, A., 1983. Carcinogenicity of BHA in F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 70, pp.343-352.

Jeon, K.S. and Park, S.I., 2015. Antioxidative Properties of Chinese Artichoke (*Stachys sieboldii* Miq) added White Bread. *Korean J Culinary Research*(6), pp120-132

Kang, J.R., Kang, M.J., Shin, J.H., Park, J.H., Kim, D.I., Chung, S.Y., and Shin, J. H., 2017. Antioxidant and antidiabetic activities of various solvent extracts from *Stachys sieboldii* Miq. *Korean J Food Preserv*, 24, pp615-622.

Kim, E.J., Choi, J.Y., Yu, M.R., Kim, M.Y., Lee, S.H. and Lee, B.H., 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J. Food Sci., Technol.* 44, pp.337-342.

Kim, Y.K., Son, H.K. and Lee, J.J., 2017. Nutritional components and antioxidant activities of various *Stachys Sieboldii* Miq parts. *Korea J Community Living Sci*, 28(2), pp.203-215

Kong, C.S., Bak, S.S., Jung, K.O., Kil, J.H., Lim, S.Y. and Park, K.Y., 2005. Antimutagenic and anticancer effects of salted mackerel with various kinds of salts. *J. Kor. Fish. Soc.*, 38, pp.281-285.

Kremer, J.M., Lawrence, D.A., Jubiz, W., di Giacomo, R., Rynes, R., Bartholomew, K.E. and Sherman, M. 1990. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic

effects. *Arthritis Rheum.* 33, pp.810-820

LeBel, C.P., Ischiropoulos, H. and Bondy, S.C., 1992. Evaluation of the probe 2', 7'-Dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.*, 5, pp.227-231.

Lee, A.Y., Jeong, E.J. and Kim, Y.S., 2016. The Physicochemical Quality and Antioxidant Activity of Fermented beverage Added with *Stachys sieboldii* Miq. Methanol Extract. *Korea J Food And Nutrition*, pp.361-361

Lee, J.E., Jin, S.Y. and Han, Y.S. 2014. Antioxidant activities and quality characteristics of tufu supplemented with Chinese artichoke powder. *Kor. J. Food Nutr.* 27, pp.10-21.

Linos, A., Kaklamanis, E., Kontomerkos, A., Koumantaki, Y., Gazi, S., Vaiopoulos, G., Tsokos, G.C. and Kaklamanis, P. 1991. The effect of olive oil and fish consumption on rheumatoid arthritis—a case control study. *Scand. J. Rheumatol.* 20, pp.419-426

Macrae, R.G., Robinson, R.K. and Sadler, M.J., 1993. *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition.* pp.607-171, 1st ed., Academic Press: Waltham, MA., USA.

Milne, L., Nicotera, P., Orrenius, S. and Burkitt, M.. 1993. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation : pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, 304, pp.102-109.

Minghetti, L. and Levi, G., 1998. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog. Neurobiol.* 54, pp.99-125.

Ministry of agriculture, food and rural affairs: Korea, 2014. *Agriculture, food and rural affairs statistics yearbook*. pp.117.

Morrison, W.R. and Smith, L.M., 1957. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, 5, pp.600-608.

Musallam, L., Ethier, C., Haddad, P.S., Denizeau, F. and Bilodeau, M., 2002. Resistance to Fas-induced apoptosis in hepatocytes:role of GSH depletion by cell isolation and culture. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 283, pp.709-718.

Na, B.R. and Lee. J.H., 2017. Antioxidative Capacities of *Stachys sieboldii* Miq. and Ginseng Powder sand Their Effects on Quality Characteristics of Cookies. *Korean J Food And Nutrition*. 46(1), pp.68-76

Noroozi, M., Angerson, W.J. and Lean, M.E.J., 1998. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 67, pp.1210-1218.

Poot, M., Verkerk, A., Koster, J.F., Jongkind, J.F. E.e. novo, 1986. synthesis of glutathione in human fibroblasts during in vitro ageing and in some metabli diseases as measured by a flow cytomertric method. *Biochim Biophys Acta.*, 883, pp.580-584.

Radi, R., Brckman, J.S., Bush, K.M. and Freeman, B.A., 1991. Peroxynitrite oxidation of suldhryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *j. Biol. Chem.*, 266, pp.4244-4250.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Tang, M. and Rice-Evans,

C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, pp.1231-1237.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, pp.152-159.

Ryu, B.H. and Kim, S.O. 2004. Effects of methanol extract of *Stachys sieboldii* Miq. on acetylcholine esterase and monoamine oxidase in rat brain. *Korean J Food Nutr.*, 17, pp.347-355.

Ryu, B.H. and Park, B.G., 2002. Antimicrobial activity of the hexane extract of *Stachys sieboldii* MIQ leaf. *Korean J Life Sci*, 12(6), pp.803-811

Ryu, B.H., Park, B.G., and Song, S.K. 2002. Antitumor effects of the hexane extract of *Stachys sieboldii* Miq. *Korean J Biotechnol Bioeng*, 17(6), pp.520-524

Sales C., Oliviero, F. and Spinella, P. 2009. The Mediterranean diet model in inflammatory rheumatic diseases. *Reumatismo*. 61, pp.10-14

Saunders, C. 2009. The anti-proliferative effect of different tomato varieties on the human colon adenocarcinoma cells, *Bio. Sci. Horizons*, 2, pp.172-179.

Schroeder, C.P., Godwin, A.K., O'Dwyer, P.J., Tew, K.D., Hamilton, T.C. and Ozols, R.F., 1996. Glutathione and drug resistance. *Cancer Invest.*, 14, pp.158-168.

Sohn, H.Y., Ryu, H.Y., Jang, Y.J., Jang, H.S., Park, Y.M. and Kim, S.Y. 2008. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of aerial part of *Saxifraga stolonifera*. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 36(3), pp.195-200.

Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*,

2(12), pp1231-1246.

Tsuchiya, M., Suematsu, M. and Suzuki, H., 1994. In Vivo visualization of oxygen radical-dependent photoemission. *Methods Enzymol.*, 233, pp.128-140.

Wardhana, E. and Dauau, S.E.A. 2011. The role of omega-3 fatty acids contained in olive oil on chronic inflammation. *Acta. Med. Indones-Indones J. Intern. Med.* 43, pp.138-143

Williams, R.J., Spencer, J.P. and Rice-Evans, C. 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free radical biology and medicine*, 36(7), pp.838-849.

Yamahara, J., Kitani, T., Kobayashi, H., and Kawahara, Y., 1990. Studies on *Stachys sieboldii* MIQ. II. Anti-anoxia action and the active constituents. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 110(12), pp.932-935.

Yang, M.R. 2012. The analysis of bioactive materials in *Stachys sieboldii* Miq. And its application on functional ready-to-eat food. PhD Dissertation. Gyengnam National University, Chagwon, Korea.

감사의 글

이 논문의 실험부터 완성까지 모든 과정에서 아낌없이 가르침을 주시고 조언해 주신 임선영 교수님께 감사의 말씀을 드리고 싶습니다.

또 실험실 생활을 함께 하면서 실험부터 대학원 생활에 많은 도움을 준 은이에게 항상 고맙다고 전하고 싶습니다. 연정이와 원희에게도 실험실 분위기를 이끌어주고 잘 챙겨줘서 고맙다는 인사를 전하고 싶습니다.

대학원 수업에 많은 가르침과 도움을 주신 서영완교수님과 문기환 교수님께도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다. 학부시절부터 대학원 생활까지 함께한 호준이형과 재민이 그리고 준세에게도 고맙다는 말을 전하고자 합니다. 실험에 관심을 갖고 많은 조언과 도움을 준 실험실선배 재열이형에게 감사의 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로 늘 응원하고 아낌없는 지원을 해주신 가족에게 감사의 인사를 전하고 싶습니다.

