

# 국내산과 중국산 삼지구엽초의 생리 활성 비교

노준현\* · 김영진\* · 김세원\* · 이현용\*\*

## Comparison of biological activities of *Epimedium koreanum* Nakai produced in Korea and China

Joon Hyun Noh\*, Young Jin Kim\*, Se Won Kim\* and Hyeon Yong Lee\*\*

**ABSTRACT** : This study was carried out to compare the biological activities of *Epimedium koreanum* Nakai grown wild in Korea and China. The antioxidative effect of *E. koreanum* Nakai extracts grown wild in Gangwondo was 78%, which was higher than that in China as 71%. The inhibition ratio of growing cancer cells was estimated as 89, 91 and 86% for human liver, lung and breast cancer cell lines, respectively in adding 0.1g/l of ethanol extracts of *E. koreanum* grown in Korea. The hepatoprotective effect and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibiting effect of Korean one were also observed as 124 and 87% respectively, which were also higher than those produced in China. There was not much difference between Korean and Chinese one in inhibiting  $\alpha$ -glucosidase activities in all ranges of supplement.

It was proved that most effective extraction solvent was mixed type as water and ethanol (1:1, v/v) to have higher biological activities from both Korean and Chinese ones.

**Key words** : antioxidative, anticancer, hepatoprotective, Angiotensin

Converting Enzyme (ACE),  $\alpha$ -glucosidase inhibiting activities

---

\* 강원도농업기술원(Gangwon Agricultural Research and extension services, Chunchon, 200-939, Korea)

\*\* 강원대학교 바이오산업공학부(School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon, 200-701, Korea)

## 서 언

예로부터 삼지구엽초(*Epimedium koreanum* Nakai)의 전초를 건조시킨 것을 음양곽(淫羊藿)이라 하여 한방에서 강장, 강정, 거풍, 이뇨, 음위 등의 약재로 이용되어 왔다. 건조된 줄기는 가늘고 긴 원기둥 모양으로 속이 비어있으며 靑草 같은 냄새가 나고 쓴맛이 난다.

삼지구엽초(음양곽)의 주성분은 icariin이며 잎과 줄기에 들어있다. 잎에는 icariin 외에 volatile oils, ceryl alcohol, hentria-contane, phytosterol, tannin, 유지도 들어 있다. 지방유 중의 지방산은 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid 이다. 心葉淫羊藿의 줄기, 잎도 icariin을 함유한다.

최근에는 국민소득의 향상과 환경의 악화 등 사회적 변화에 따라 건강에 대한 관심도가 고조되면서 각종 건강보조식품이 개발되고 그 수요 또한 증가하고 있는 실정이다. 그 중에서도 삼지구엽초는 앞에서 언급된 바와 같이 이용성이 높은 植物 임에도 불구하고 국내에는 생리활성에 대하여 과학적으로 주로 연구된바 없으며 다만 한방에서 약제 첨가물로서 일부 사용되고 있을 뿐이다.

더욱이 국내산 삼지구엽초의 가격이 수입산에 비해 약 4배 높은 실정에서 원산지에 따른 활성 차이에 대한 연구 역시 전혀 된 바 없다. 따라서 본 연구는 강원도 철원 지역에서 재배된 국내산과 중국산 수입 삼지구엽초 경엽의 생리 활성의 체계적 검정 및 비교를 수행하였다.

## 재료 및 방법

국내산 삼지구엽초는 강원도농업기술원 북부농업시험장(철원 소재)에서 강원도 내 자생지에서 수집하여 재배한 성묘에서 경엽을 채취하여 음건한 후 시료 중량에 대해 10배의 증류수, 에탄올 및 증류수와 에탄올 혼합(1:1, v/v) 용매로 물 추출은 90℃, 에탄올 추출은 60℃, 혼합용매 추출은 70℃로 각 12시간 동안 2회 열탕 추출하였다. 추출은 환류 냉각기를 연결시킨 flask에서 행하였고 각각의 추

출물들은 뜨거운 상태에서 감압 여과한 후 농축, 동결건조하고 분말화하여 실험에 사용하였다. 중국산 삼지구엽초는 서울 경동시장에서 수입된 것을 구입하여 국내산과 같은 전처리를 실시하였다.

### 1. 항산화활성

$4.5 \times 10^3$  M linoleic acid 5 ml에 시료를 각각 0.5 ml 첨가하여 50°C에서 산화 반응을 실시한 후 반응액을 4일마다 경시적으로 1.1 ml씩 test tube에 채취하여 TCA 1 ml, TBA 2 ml, BHT 0.1 ml, SDS 1 ml를 첨가하였다. 그리고 비등수욕조에서 15분간 가열하고 빙냉한 후 빙초산 1 ml, chloroform 2 ml를 가하여 원심분리(2500rpm, 10분)하여 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하여 시료를 투여하지 않은 대조구와 비교하여 항산화 활성을 측정하였다(Koji et al., 1997).

### 2. 항암활성

항암활성 검정에 사용된 균주는 인간 유래의 간암세포(Hep3B), 폐암세포(A549), 유방암세포(MCF7)이며 세포독성은 간세포(WRL68)를 사용하였다. 실험에 사용된 기본 배지, DMEM과 RPMI1640(GIBCO, USA)이며 FBS(GIBCO, USA) 10%(v/v)를 첨가해 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 실험에 사용된 초기 세포수는  $2 \times 10^4$  cells/ml로 조절하여 96 well tissue culture microplate에 100  $\mu$ l/well씩 접종하여 사용하였다. 세포생육도 측정은 SRB (sulforhodamine B)방법(Kata et al., 1986 ; Kun & Sook, 1992)을 이용하였으며 세포의 성장률은 각 plate의 대조군과 비교하여 측정하였고, 세포독성은 MTT방법을 이용하였다(Lee & Jee, 1996).

### 3. 항돌연변이성

항돌연변이성 검정에 사용된 균주는 Bacillus subtilis PB1652 rec 와 PE1791 rec 이며 이 동결건조된 균주를 petridish상에 미리 준비하여 둔 agar 배지상에 접종시킨 후 24-48시간 배양하였다. 배양이 완료되면 멸균된 TSB 액체 배지에 백금으로 취하여 37°C에서 24시간 배양하여 실험에 사용하였다(Franca, 1995). 돌연변이원성은 아가 배지에 thin paper disk(8mm)를 올려놓은 다음 각각의 시료

를 50, 100  $\mu\text{l}$ /paper disk의 양으로 투여하여 DNA 손상으로 세포의 생육이 억제되어서 생성된 clear zone의 지름을 측정하였고 대조구에는 강한 돌연변이 유발물질인 N-methyl-N-nitroso-guanidine(MNNG)을 이용하였다. 돌연변이원성을 확인한 후 thin paper disk에 MNNG(6 $\mu\text{l}$ /paper disk)와 각 추출물(3, 6  $\mu\text{l}$ /paper disk)을 혼합 투여하여 형성된 Inhibition zone을 비교하여 각 추출물이 MNNG의 돌연변이원성을 얼마나 억제하는지를 두 균주의 difference zone과 difference ratio로 나타내었다.

#### 4. 면역활성 및 간 기능 증진효과

면역활성기능 검정에 사용된 균주는 인간면역 세포인 T cell(Jurkat, TL-6)로서 생육촉진 정도를 측정하였다. 우선 활성화된 T cell을  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 조절한 후에 20% FBS를 함유하는 RPMI 1640배지에서 배양하고 MTT 방법을 이용하여 T cell의 생육을 시료를 투여하지 않은 대조구와 비교하여 측정하였다(Lee & Jee, 1996).

GST의 활성 측정은 먼저 LOWRY법을 이용하여 시료의 단백질 함량을 측정한 후 각 추출물을 test tube에 농도별로 첨가한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 반응시킨 후 1-chloro-2,4-dinitrobenzene을 첨가하여 다시 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 반응시키고 20% TCA를 가하여 반응을 종결하였다. 원심분리하여 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정하고 시료를 투여하지 않은 대조구와 비교하여 단백질 함량에 따른 specific activity와 활성률을 계산하였다(Habig & Pabst, 1974 ; Benson et al., 1979 ; Kim & Park, 1994).

#### 5. 혈압 및 혈당조절효과

혈압조절능은 ACE(Angiotensin Converting Enzyme) reagent one vial을 10 ml의 증류수(37 $^{\circ}\text{C}$ )에 녹여 effendorf tube에 1ml씩 담고 시료들을 0.1 ml씩 첨가하고 ACE calibrator one vial을 1 ml의 증류수에 녹여 각 effendorf tube에 첨가한 뒤 5분동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정하고 5분후 흡광도를 다시 측정하여 그 차를 ACE reagent(50 $\mu\text{l}$ ) 활성과 곱하여 ACE 활성률을 비교하였다.

**Table 1.** Comparison of extraction yields of *E. koreanum* Nakai produced in

Korea and China according to extraction solvents

Area	Solvent*		
	Water	EtOH	Water + EtOH
Korea	12.8	12.7	21.3
China	12.6	12.4	20.9

\* Extraction temperature was 90, 60 and 70°C for water and EtOH and mixed, respectively.

**Table 2.** Comparison of antioxidative effects of *E. koreanum* Nakai extracts

produced in Korea and China

Concentration n (g/l)	Korea(%)			China(%)		
	Water	EtOH	Water : EtOH (1:1)	Water	EtOH	Water : EtOH (1:1)
0.2	33	38	42	27	25	31
0.4	37	46	55	32	37	42
0.6	42	56	64	45	44	54
0.8	59	63	75	51	52	66
1.0	67	70	78	59	63	71

## 2. 항암활성 및 세포독성 비교

항암활성을 검정하기 위해 간암, 폐암, 유방암 세포주에 대한 생육억제 활성을 살펴보았을 때 각기 89, 91, 83%의 생육억제 활성을 나타냈다(Table 3). 이러한 암세포 억제 기능이 단순히 모든 세포를 죽이는 것인지 암세포만을 선택적으로 죽이는지의 검토가 필요하여 사람의 정상 간세포(WRL68)를 사용하여 세포독성을 살펴보았다. 세포독성 검사에서 추출물, 0.4 g/l 이하의 농도로 투여시 정상세

포의 생존율은 70% 이상으로 유지되어 정상세포에 대한 독성이 낮음을 확인하였다(Table 4). 그러나 Chung et al.(1999)이 60종의 약용식물과 식용작물을 대상으로 항암제 개발을 위해 항종양활성의 생리활성 검정에서 검정콩과 쑥 등은 높은 활성억제력을 나타냈으나 음양곽 등은 억제력이 낮았다고 보고한 것과는 약간의 차이를 보였다.

**Table 3.** Anticancer effects of *E. koreanum* Nakai extracts

Cell lines	Conc. (g/l)	Korea(%)			China(%)		
		Water	EtOH	Water : EtOH (1:1)	Water	EtOH	Water : EtOH (1:1)
liver (Hep3B)	0.2	34	48	39	38	43	41
	0.4	44	57	52	41	51	44
	0.6	59	69	65	53	63	63
	0.8	68	78	81	67	72	79
	1.0	72	84	89	69	79	83
lung (A549)	0.2	44	42	45	34	42	33
	0.4	49	53	61	42	43	47
	0.6	52	67	72	51	59	55
	0.8	63	81	88	62	74	73
	1.0	68	87	91	65	82	81
breast (MCF7)	0.2	42	37	36	36	33	31
	0.4	47	48	48	39	41	43
	0.6	54	56	69	47	54	51
	0.8	68	79	82	58	71	69
	1.0	71	84	86	62	73	75

**Table 4.** Cytotoxicities of *E. koreanum* Nakai extracts against normal human

liver cell line, WRL68

Conc. (g/l)	Korea(%)			China(%)		
	Water	EtOH	Water : EtOH (1:1)	Water	EtOH	Water : EtOH (1:1)
0.2	13	7	18	17	19	23
0.4	17	23	29	28	31	29
0.6	24	42	34	32	38	34
0.8	36	51	41	37	43	39
1.0	41	53	44	42	48	47

### 3. 항돌연변이성 및 면역증진 효과 비교

일반적으로 돌연변이 억제물질들은 발암성분의 억제작용도 함께 가지고 있는 것으로 알려져 있는데 이는 암세포가 일종의 돌연변이 세포라는 것을 생각할 때 쉽게 이해가 가능하다. 항돌연변이성 실험에서 국내산, 중국산 삼지구엽초 추출물들의 돌연변이원성은 없었으나 항돌연변이성 또한 낮게 나타났다(Table 5). 이러한 항암활성과 항돌연변이성의 결과로 추출물의 감염에 대한 보호작용, 암 등 질환에 대한 면역반응을 확인한 결과 국내산 삼지구엽초의 혼합용매 추출물에서 254%의 높은 활성을 나타냈다(Table 6).

**Table 5.** Anti-mutagenicity test of *E. koreanum* Nakai extracts

Area	Solvent	Inhibition halo diameter(cm)		Difference zone(cm)	Difference ratio (Sample/MNNG)
		PB1652 rec	PE1791 rec		
Korea	water	1.2	2.8	1.6	0.94
	EtOH	1.1	2.6	1.5	0.82
	1:1	1.2	2.4	1.2	0.71
China	water	1.2	2.8	1.6	0.94
	EtOH	1.3	2.8	1.5	0.82
	1:1	1.2	2.7	1.5	0.82
MNNG(blank)		1.2	2.9	1.7	1.0

**Table 6.** The effect of *E. koreanum* Nakai extracts on the growth of human immune

## B cell

Conc. (g/l)	Korea(%)			China(%)		
	Water	EtOH	Water : EtOH (1:1)	Water	EtOH	Water : EtOH (1:1)
0.2	112	114	121	117	122	125
0.4	125	136	144	128	135	146
0.6	149	158	168	142	149	164
0.8	184	195	199	169	178	188
1.0	209	237	254	194	203	219

### 4. 간기능 증진효과 비교

간장 기능은 간의 주요 해독 기전인 GST(glutathione-S-transferase)에 대한 각 추출물이 미치는 영향을 검색하였다. GST는 reduced glutathione의 다양한 친전자체를 결합시키는 반응을 촉매하는데 발암원들은 대부분 친전자체이므로 GST의 측정은 발암물질의 해독하는 수단으로 중요하게 여겨진다. 국내산 삼지구엽초가 간기능 증진에서 중국산보다 높은 활성을 나타냈고 혼합용매 추출물에서 124%의 높은 활성을 나타냈다(Table 7).

**Table 7.** Enhancing effects of GST activity by adding *E. koreanum* Nakai extracts

Conc. (g/l)	Korea(%)			China(%)		
	Water	EtOH	Water : EtOH (1:1)	Water	EtOH	Water : EtOH (1:1)
0.2	76	74	89	64	67	78
0.4	84	78	95	77	76	80
0.6	89	86	103	82	89	95
0.8	92	98	116	91	94	102
1.0	96	107	124	98	104	113

※ values of GST activities compared to control (free *E. koreanum* Nakai extracts)

### 5. 혈압 및 혈당조절 효과 비교

고혈압과 혈당 강하능 검정 결과, 국내산이 중국산보다 혈압상승 관련효소 (ACE)와 혈당상승 관련 효소( $\alpha$ -glucosidase)에 대한 활성 억제율이 혼합용매 추출물에서 각각 87%의 높은 활성 억제율을 나타냈다(Table 8, 9).

**Table 8.** Inhibition effect of *E. koreanum* Nakai extracts on ACE

Conc. (g/l)	Korea(%)			China(%)		
	water	EtOH	water : EtOH (1:1)	water	EtOH	water : EtOH (1:1)
0.2	64	67	70	64	66	67
0.4	68	71	71	68	68	70
0.6	70	73	78	72	73	73
0.8	76	82	86	73	79	82
1.0	77	84	87	75	82	83

**Table 9.** The effect of inhibiting  $\alpha$ -glucosidase activity of *E. koreanum* Nakai extracts

Conc. (g/l)	Korea(%)			China(%)		
	water	EtOH	water : EtOH (1:1)	water	EtOH	water : EtOH (1:1)
0.2	72	70	71	62	65	69
0.4	74	73	73	67	68	73
0.6	76	79	78	71	74	79
0.8	78	82	84	75	77	82
1.0	81	86	87	78	83	88

혈당강하능은  $\alpha$ -glucosidase와 PIPES buffer(10mM)을 섞은 10  $\mu$ l에 20 mM maltose 40  $\mu$ l와 샘플 10  $\mu$ l을 넣어 반응액을 만들고 37°C에 20분간 반응시킨 다음, 1 ml DNS 시약을 가해 100°C에서 10분간 반응시키고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 항산화 활성 비교

본 실험에서 사용된 국내산과 중국산 삼지구엽초의 용매에 따른 추출수율은 혼합용매에서 국내산 삼지구엽초가 21.3%로 가장 높게 나타났고 전체적으로도 국내산 삼지구엽초의 수율이 다소 높게 나타났으나 유의적인 수준은 아니었다 (Table 1).

암, 면역기능 저하, 혈관계 질환, 노화의 발생이나 진행의 주요 촉진인자로 생체내에 존재하는 free radical과 관련되는 mechanism이 오래 전부터 알려져 왔으며 항산화제는 체내의 free radical을 소거하기 때문에 그 결과로 질병예방의 효과가 있는 것으로 사료되고 있다. 따라서 항산화활성의 측정은 암이나 노화의 진행을 억제할 수 있는 천연물질의 규명에 이용될 수 있다. 최근 국내에서는 천연물로부터 항산화활성 물질 개발에 대한 연구가 활발한데 Kim et al.(1997), Cha & Lee(1998), Kwon et al.(1998)은 뽕나무 오디 추출물, 오배자, 고로쇠 나무에서 각각 높은 항산화활성을 보고한 바 있다. 국내산과 중국산 삼지구엽초 각 추출물의 농도별 항산화활성 검색 결과 국내산 삼지구엽초의 혼합용매 추출물 1.0 g/l농도에서 78%의 높은 항산화활성을 보여 중국산 삼지구엽초보다 우수하게 나타났으며 농도가 증가할수록 항산화활성이 증대되는 경향을 나타내어 (Table 2) Kim et al.(1992)이 음양곽 추출물 농도가 증가할수록 항산화 효과가 증대된다는 보고와 일치하였다. 또한 Kim et al.은 음양곽 methanol 추출물중의 유효 항산화성분은 tocopherol류와 flavonoid류로 추정하였다.

따라서 국내산 삼지구엽초는 중국산 삼지구엽초에 비해 항산화활성, 항암활성, 간기능 증진, 혈당강하 등에서 우수한 생리활성기능을 가지고 있고 특히 가장 우수한 생리활성기능을 가진 것으로 나타난 증류수와 에탄올 1:1 혼합용매 추출물의 기능을 이용한다면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

## 적 요

강원도에 자생하는 삼지구엽초와 중국산 삼지구엽초의 생리활성을 검정한 결과는 다음과 같다.

1. 삼지구엽초의 항산화활성은 국내산이 중국산보다 높게 나타났으며, 추출용매는 증류수와 에탄올 1:1 혼합용매 추출물에서 78%로 가장 높은 활성을 보였다.
2. 간암, 폐암, 유방암 세포에 대한 생육억제능은 국내산에서 각각 89, 91, 86%로 나타났으며 이 추출물을 0.4 g/L 이하의 농도로 투여시 정상세포의 생존율은 70% 이상으로 유지되어 세포독성이 낮았으며 국내산이 중국산보다 면역증진능이 높고 혼합용매 추출물에서 254%의 활성을 나타냈다.
3. 삼지구엽초 추출물들에서는 돌연변이원성이 나타나지 않았고 항돌연변이성은 낮게 나타났다.
4. 간기능 증진효과는 국내산이 124%의 활성을 보여 중국산보다 높았다.
5. 고혈압 관련인자의 작용에서 국내산이 중국산보다 관련효소(ACE)에 대한 활성억제율이 높았고, 혈당상승 관련효소( $\alpha$ -glucosidase)에 대한 활성억제율은 87 또는 88%로 높은 편이나 국내산과 중국산간에는 차이가 없었다.
6. 이러한 결과로 국내산 삼지구엽초는 중국산에 비해 항산화, 항암, 간기능 증진, 고혈압억제효과 등 생리활성이 높아 활용성이 더욱 높은 것으로 판단되었다.

## LITERATURE CITED

- Benson AM, Cha YN, Talalay P (1979) Elevation of extrahepatic GST and epoxide hydrolase activities by hydroxyanisole. *Cancer Res.* 39 : 2971-2977
- Cha BC and Lee SB (1998) Antioxidative and Free Radical Scavenging Effects of *Rhus javanica* Linne. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 6(3) : 181-187.
- Chung IM, Kim KH, Ahn JK, Ahn JS, Ahn SC (1999) Screening of Korean Medicinal and Food Plants with Antitumoral Activity. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 7(1) : 37-44.
- Franca Z (1995) Studies on the insectidal activities of some new N-benzoyl-N'-serylureas. *Pestic. Sci.* 44 : 227-236.
- Habig WH, Pabst JM (1974) Glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem* 22 : 7130-7139.
- Kata T, Inoue T, Ohta T, Shrisu Y (1986) Antimutagen and their modes of action. In D. H. Shankel et al. Plenum, New York 181-189.
- Kim SH, Park ES (1994) The study of prepared GE-132 on the hepatic glutathione-S-transferase activity in rat. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 23 : 581-586.
- Kim SR, Kim JH, Kim SK (1992) Isolation and Characterization of Antioxidant Components in *Epimedium koreanum* Nakai extract. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* 24(6) : 535-540.
- Kim SY, Park KJ, Lee WC (1998) Antiflammatory and Antioxidative Effects of *Morus* spp. Fruit Extract. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 6(3) : 204-209.
- Kun YP, Sook HR (1992) Inhibitory effect of green-yellow vegetables on the mutagenicity in salmonella assay system and on the growth of AZ-521 human gastric cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 21(2) : 149-153.

Kwon YS, Kim MJ, Choi YH, Kwak SS (1997) Activity of Antioxidative Components from the Stem of *Acer mono* Max. Korean J. Medicinal Crop Sci. 5(4) : 302-306.

Lee GY. and Jee UK (1996) Cytotoxicity, stability and antitumor activity of 5-fluorouracil prodrugs entrapped in liposomes. Yakhak Hoeji 40(5) : 522-531.

Tamagawa K, Iizuka S, Fukushima S, Endo Y, Komyama Y (1997) Antioxidative activity of polyphenol extracts from Barley Bran. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi 44(7) : 512-515.