개양귀비 부위별 추출물의 항산화 활성 및 간세포 보호효과

양희선 · 김미진 · 김민아 · 임푸름 · 최정숙

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부

Antioxidant Activity and Hepatoprotective Effects of Extracts from Different Parts of *Papaver rhoeas* L.

Hee Sun Yang, Mi Jin Kim, Mina Kim, Pu Reum Im, and Jeong-sook Choe

Department of Agrofood Resources, National Institute of Agricultural Science,
Rural Development Administration

ABSTRACT This study examined the antioxidant activities of the two *Papaver rhoeas* L. (PR; PRP (pink flower PR), PRR (red flower PR)) on hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress in HepG2 cells. Different parts (whole, leaf, and fruit) of PRP and PRR were extracted with 50% ethanol. Their antioxidant activities were analyzed using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging assay. The extracts were evaluated for cellular anti-oxidation and protection from the cell viability, intracellular reactive oxygen species (ROS) scavenging activity and antioxidant enzyme activities. The PR leaf and fruit extracts contained high amounts of bio-active compounds, such as total phenol and total flavonoid. The DPPH and ABTS results revealed antioxidant activity in the following order: leaf, fruit, and whole plant. The pretreatment with all the PR extracts increased the viability, antioxidant enzyme activities and intracellular ROS scavenging activity in a dose-dependent manner in H₂O₂-treated HepG2 cells. In particular, intracellular ROS scavenging activity was highest using the leaf extracts. These results suggest that 50% ethanol extracts of PR could be used as functional food sources.

Key words: *Papaver rhoeas* L., antioxidant, hepatoprotection, HepG2 cell

서 론

간은 에너지대사와 내인성, 외인성 물질에 대한 해독 작용을 수행하는 기관으로 간손상은 알코올, 바이러스에 의한 감염, 약물의 오남용, 산화 자극에 의한 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 생성 등 여러 가지 원인에 의해 생길 수 있다(Lee 등, 2018; Cichoż-Lach와 Michalak, 2014). 특히 과잉 생성된 ROS는 표적이 될 수 있는 단백질과 핵산 등을 손상시키고, 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 과산화하여 체내 과산화지질의 축적을 증가시켜 간손상뿐만 아니라 피부 노화, 동맥경화, 뇌졸중, 당뇨병, 종양 생성과 같은 다양한 질환을 유발한다고 보고되고 있다(Gupta 등, 2014).

과산화지질의 체내 축적을 억제하기 위해 간세포를 포함한 생체 내 세포는 방어기전으로 superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT)와 같은 효소계 산화 방어기전을 가

지고 있다. 이는 세포막뿐만 아니라 세포 내 여러 부분에서도 특이적으로 작용하여 조직의 과산화를 억제한다(Vardi 등, 2008; Yoon 등, 2012). 생성된 활성산소는 항산화제를 통해 제거되는데 비타민 C, 비타민 E, β-카로틴, 플라보노이드 등이 대표적인 항산화제 물질로 알려져 있다(Gupta와 Sharma, 2006). 이러한 천연 항산화제뿐만 아니라 생체 내 활성산소 발생을 억제하기 위해 다양한 합성 항산화제가 개발되었으나, 간독성 등의 부작용 문제가 제기되어(Bondi 등, 2017) 안전한 천연 항산화제 개발의 필요성이 지속해서 요구되고 있다.

개양귀비(*Papaver rhoeas* L.)는 양귀비목 양귀비과 양귀비속의 두해살이풀로 일반적으로 관상용으로 이용되고 있으며 마약 성분이 없는 안전한 식물로 알려져 있다. 개양귀비는 유럽, 북아프리카 및 서아시아의 여러 지역에서 야생적으로 발견되며(Kati 등, 2013), 예전부터 설사와 복통, 심한 기침 등에 효능이 있어 민간요법이나 한약재로 사용되고 있다(Soulamani 등, 2001). 게다가 개양귀비의 어린잎은 샐러드, 꽃잎으로는 술이나 시럽을 만들고 씨는 기름을 짜는데 사용하는 등 식용으로도 사용된다(Mitich, 2000; Schaffer 등, 2005). 식물 화학적 연구에 따르면 개양귀비 잎에는 퀘르세틴(quercetin), 캠페롤(kaempferol), 미리세틴(myricetin)과 같은 플라보노이드와 칼륨, 나트륨, 칼슘과 같은

미네랄을 포함한다고 알려져 있다(Kostic 등, 2010; Tri-chopoulou 등, 2000). 또한, 최근의 연구에서는 개양귀비의 잎에서 의약 소재로 활용 가능한 켈리도닌(chelidone), 프로토펜(protopine), 크립토펜(cryptopine) 등이 확인되기도 하였으나(Oh 등, 2018; Grauso 등, 2020) 현재 우리나라의 경우 개양귀비는 대부분 화훼용으로 사용되어 식·의약 소재로서의 활용 가능한 연구가 미미한 실정이다.

이에 본 연구에서는 2종의 개양귀비(분홍색 꽃이 피는 개양귀비와 빨간색 꽃이 피는 개양귀비)를 이용한 항산화 활성 및 간세포 보호효과를 확인하고자 하였다. 각 부위에 따른 차이를 확인하기 위해 2종의 개양귀비는 전초, 잎 그리고 열매로 분리하여 50% 에탄올로 추출하였다. 이 추출물들을 이용하여 라디칼 소거 활성과 hydrogen peroxide(H_2O_2)를 처리한 인간 간암세포주인 HepG2 세포에서 산화 자극에 대한 세포 보호효과를 분석하여 기능성식품 소재로서의 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 개양귀비(*Papaver rhoeas* L.)는 국립원예특작과학원 인삼특작부(Eumseong, Korea)에서 재배한 것을 개화시기에 맞춰 채취하고 시료로 사용하였다. 분홍색 꽃이 피는 개양귀비와 빨간색 꽃이 피는 개양귀비를 각각 전초, 잎, 열매로 나누어 활성을 평가하였다. Folin-Ciocalteu, sodium carbonate(Na_2CO_3), aluminum trichloride($AlCl_3$), gallic acid, quercetin, ascorbic acid, potassium acetate(CH_3COOK), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS), hydrogen peroxide(H_2O_2), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다.

추출물 제조

2종의 개양귀비는 수세하고 동결건조(PVTFD 10R, IIsin, Yangju, Korea)하여 균일하게 분쇄 후 사용하였다. 시료 50 g에 중량 대비 20배의 50% 발효주정을 가하여 실온에서 160 rpm으로 19시간 동안 교반 추출하였다. 추출물은 감압 여과하고 34°C에서 감압농축(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)한 후 동결건조하여 -20°C에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다(Kim 등, 2019). 개양귀비 추출물 100 μ L에 10% Folin-Ciocalteu 용액 200 μ L를 가하고 실온에서 5분간 반응시켰다. 700 mM Na_2CO_3 용액 800 μ L를 가하고 잘 혼합

한 후 200 μ L씩 96 well plate에 옮겨 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 사용하여 총 폴리페놀 함량을 산출하였고, gallic acid equivalents(mg GAE/g freeze-dried extract)로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 $AlCl_3$ 용액을 이용한 Kim 등(2019)의 방법을 변형하여 측정하였다. 개양귀비 추출물 100 μ L에 10% $AlCl_3$ 용액 5 μ L와 1 M CH_3COOK 용액 5 μ L를 가하여 혼합하였다. 증류수 140 μ L를 가하고 실온에서 30분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 사용하여 총 플라보노이드 함량을 계산하였고, quercetin equivalents(mg CE/g freeze-dried extract)로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거 활성 측정은 Blois 방법을 변형하여 측정하였다(Kim 등, 2019). 개양귀비 추출물 40 μ L에 0.2 mM DPPH 용액 160 μ L를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거 활성은 시료 무첨가군에 대한 시료 첨가군의 흡광도 비로 계산하여 백분율(%)로 나타내었다. 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하여 개양귀비 추출물의 라디칼 소거 활성을 비교 평가하였다.

ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거 활성은 Re 등(1999)의 방법을 변형하여 측정하였다(Kim 등, 2018). 7.4 mM ABTS 용액과 2.6 mM potassium persulfate 용액을 섞어 빛을 차단한 상태로 16시간 반응시켜 라디칼을 형성시켰다. 실험 직전 ABTS 라디칼 용액은 734 nm에서 흡광도 값이 1.0 ± 0.05 가 될 때까지 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 150 μ L에 시료 50 μ L를 혼합하고 실온에서 15분 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거 활성은 시료 무첨가군에 대한 시료 첨가군의 흡광도 비로 계산하여 백분율(%)로 나타내었다. 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하여 개양귀비 추출물의 라디칼 소거 활성을 비교 평가하였다.

세포 배양

본 실험에 사용된 인간 간암세포주인 HepG2 세포는 한국세포주은행(KCLB; Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Waltham, MA, USA)과 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin(Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; HyClone, Logan, UT, USA) 배지를 사용하여 5% CO_2 가 공급되는 incubator에서 37°C로 배양하였

다. 세포 밀도가 80% 이상으로 포화되었을 때 trypsin-EDTA(Invitrogen)를 처리하여 계대배양하며 실험에 사용하였다.

세포 생존율

세포 생존율은 Ez-Cytox cell viability assay kit(DAEIL Lab, Seoul, Korea)을 사용하였으며, 제조사에서 권장하는 실험 방법에 따라 측정하였다. HepG2 세포를 96 well plate에 최종농도 1×10^5 cells/mL가 되도록 분주한 뒤 24시간 배양하였다. 개양귀비 추출물을 처리하고 1시간 후 1 mM H_2O_2 를 처리하여 24시간 배양하였다. 반응 종료 후 Ez-Cytox 시약 20 μ L를 넣어 4시간 반응시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 내 활성산소종(ROS) 소거 활성

세포 내 ROS는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 방법을 이용하여 측정하였다. 96 well black plate에 최종농도 1×10^5 cells/mL가 되도록 분주한 뒤 24시간 배양하였다. 개양귀비 추출물을 처리하여 미리 1시간 배양하고 1 mM H_2O_2 를 처리하여 산화 자극 후 30분 배양하였다. 배양 종료 후 phosphate buffered saline(PBS; Gibco, Paisley, Scotland, UK)로 3회 세척하고, 10 μ M DCFH-DA 용액을 처리하여 15분 반응시켰다. 반응 종료 후 PBS로 3회 세척한 세포는 형광현미경(Leica, Wetzlar, Germany) 및 fluorescence microplate reader(Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 excitation 510 nm, emission 560 nm에서 형광도를 측정하였다.

항산화 효소 활성

항산화 지표 효소인 SOD, CAT를 대상으로 활성을 측정하였다. HepG2 세포를 96 well plate에 최종농도 1×10^5 cells/mL가 되도록 분주한 뒤 24시간 배양하였다. 개양귀비 추출물을 처리하고 1시간 후 1 mM H_2O_2 를 처리하여 24시간 배양한 세포는 수거하여 enzyme assay kit(BioVision Inc., Milpitas, MA, USA)을 사용하였으며 제조사에서 권장하는 실험 방법에 따라 측정하였다. SOD 활성을 측정하기 위해 수거된 세포를 lysis buffer(BioVision Inc.)로 용해한 후 원심분리(14,000 $\times g$, 5 min, 4°C)하고 상층액을 회수하여 효소 활성 평가를 위한 시료로 사용하였다. 96 well plate에 20 μ L 시료, WST working solution 200 μ L, dilution buffer 20 μ L, enzyme working solution 20 μ L를 넣고 37°C에서 20분 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. CAT 활성을 측정하기 위해 수거된 세포에 assay buffer로 용해한 후 원심분리(10,000 $\times g$, 15 min, 4°C)하고 상층액을 회수하여 효소 활성평가를 위한 시료로 사용하였다. 96 well plate에 60 μ L 시료, assay buffer 18 μ L, catalase reaction solution 12 μ L를 넣고 25°C에서 30분 반응시킨 후, 10 μ L stop solution을 넣어 반응을 종료시켰다. 용액에

developer mix 50 μ L를 넣고 25°C에서 10분 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하여 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었고, 실험으로부터 얻은 결과는 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계처리 하였다. 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance) 후 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 수행하였고, Student's t-test로 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

추출수율, 총 플라보노이드, 총 폴리페놀 함량

개양귀비 부위별 건조 분말 시료를 50% 발효주정으로 추출한 후 추출수율을 구했으며, 각 시료의 추출수율은 Table 1과 같다. 전체 시료의 추출수율은 18.44~21.75%의 범위로 확인되었다. 전초와 열매 추출물은 분홍색 꽃이 피는 개양귀비(PRP), 잎 추출물은 붉은색 꽃이 피는 개양귀비(PRR)의 추출수율이 높았다. 식물 추출물이 생리활성이 우수해도 추출수율이 낮은 경우 경제성이 떨어지기 때문에 추출수율은 산업화에 고려되어야 할 중요한 요인으로 작용한다. 식물 추출물의 추출수율이 10% 이상이면 경제성이 있다고 알려져 있는데(Hah 등, 2005), 본 연구에서 각 시료의 추출수율이 모두 10% 이상으로 확인되어 개양귀비가 경제적으로 활용 가능성이 있는 식물 소재로 판단되었다. 개양귀비 추출물 동결건조 분말 시료의 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 시료 1 g당 quercetin mg 상당량으로 나타낸 총 플라보노이드 함량 범위는 9.12~18.20 mg QE/g이며, 빨간색 꽃이 피는 개양귀비 잎 추출물(PRRL)이 18.20 mg QE/g으로 가장 높았고 분홍색 꽃이 피는 개양귀비 잎 추출물(PRPL)이 15.19 mg QE/g으로 다른 부위의 추출물보다 높은 함량을 나타냈다.

Table 1. Extraction yields of *Papaver rhoeas* L. (PR) extracts

Sample ¹⁾		Yield (%) ²⁾
PRP	PRPW	21.69
	PRPL	20.98
	PRPF	21.70
PRR	PRRW	19.37
	PRRL	21.75
	PRRF	18.44

¹⁾PRP: pink flower PR, PRR: red flower PR, PRPW: whole extract of pink flower PR, PRPL: leaf extract of pink flower PR, PRPF: fruit extract of pink flower PR, PRRW: whole extract of red flower PR, PRRL: leaf extract of red flower PR, PRRF: fruit extract of red flower PR.

²⁾The values on the table are calculated in percentage (w/w) from the raw material (100%).

Table 2. Contents of total flavonoid and total phenol of PR extracts

Sample ¹⁾		Total flavonoid content (mg QE/g) ²⁾	Total phenol content (mg GAE/g) ³⁾
PRP	PRPW	9.12±0.37 ^{f*}	14.02±0.32 ^{e*}
	PRPL	15.19±0.36 ^{b*}	17.40±0.19 ^{b*}
	PRPF	14.11±0.42 ^c	18.81±0.23 ^a
PRR	PRRW	10.47±0.41 ^e	14.88±0.12 ^d
	PRRL	18.20±0.38 ^a	16.65±0.15 ^c
	PRRF	13.41±0.41 ^d	18.62±0.32 ^a

¹⁾Samples are the same as Table 1.

²⁾mg QE/g: mg quercetin equivalent per sample 1 g.

³⁾mg GAE/g: mg gallic acid equivalent per sample 1 g.

Values are mean±SD (n>3 independent experiment).

Means with different letters (a-f) in the same column are significantly different ($P<0.05$).

* $P<0.05$ compared with PRP and PRR of same parts.

또한 시료 1 g당 galic acid mg 상당량으로 나타난 총 폴리페놀 함량 범위는 14.02~18.81 mg GAE/g으로 분홍색 꽃이 피는 개양귀비 열매 추출물(PRPF)이 18.81 mg GAE/g, 빨간색 꽃이 피는 개양귀비 열매 추출물(PRRF)이 18.62 mg GAE/g으로 다른 부위의 추출물보다 높은 함량을 나타냈다. 시료의 부위별로 비교하였을 때, 잎과 열매 추출물이 많은 양의 플라보노이드와 폴리페놀을 함유하고 있었으며 전초 추출물(PRRW, PRPW)은 플라보노이드와 폴리페놀 함량이 유의적으로 낮게 나타났다. 일반적으로 폴리페놀 및 플라보노이드는 식물체의 잎이나 열매에서 높은 함량을 나타내며, 이는 항산화 활성과도 연관된다고 알려져 있다(Hwang 등, 2015). Kostic 등(2010)의 연구에 의하면 개양귀비 잎에는 케르세틴, 캄페롤과 같은 플라보노이드를 포함한다고 하였다. 또한, Montefusco 등(2015)의 연구에서 개양귀비 잎은 높은 페놀 화합물 및 플라보노이드를 함유하고 있으며 우수한 항산화 활성을 가진다고 보고하였다. 2종의 개양귀비 추출물(PR, PRR)을 비교하였을 때, 총 플라보노이드 함량은 PRRL이 PRPL보다, PRRW가 PRPW보다 높았으며, 총 폴

리페놀 함량은 PRPL이 PRRL보다, PRRW가 PRPW보다 높게 나타났다. 열매 추출물은 총 플라보노이드와 총 폴리페놀 함량에서 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. 식물자원의 경우에는 동일 품종의 경우에도 재배지 특성, 재배 방법에 따라 기능성분의 함량이 다르게 나타난다(Baek 등, 2014). 그러나 동일 환경에서 동일 방법으로 재배된 PRP와 PRR의 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량 차이는 환경 적응도에 기인한 것으로 PRR이 본 연구 진행을 위해 마련된 재배 환경에서 기능성분을 축적하기에 보다 적합했던 것으로 판단되었다. Choi 등(2019)은 적색 장미는 안토시아닌 색소의 영향으로 분홍색, 황색 및 흰색 장미보다 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 높다고 하였으며, Mlcek과 Rop(2011)의 연구에 따르면 총 안토시아닌 농도가 높을수록 총 플라보노이드 함량이 높으며 이는 강력한 항산화의 결정적인 요인 중 하나라고 보고하였다. 이러한 결과들은 본 연구에서 꽃을 포함하는 전초 추출물 중 PRRW의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 높은 결과와 유사하였다.

라디칼 소거 활성

개양귀비 추출물의 항산화 활성을 *in vitro*에서 측정하기 위해 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성을 통한 항산화 활성을 분석한 결과는 Table 3, 4와 같다. DPPH 라디칼 소거 활성은 1,000 µg/mL 농도에서 PRRL이 74.59%로 가장 높았고, PRPL 69.79%, PRRF 66.02%, PRPF 61.60% 순이었다. 그러나 PRRW 57.07%, PRPW 56.47%로 잎과 열매보다 낮은 활성을 나타냈다. ABTS 라디칼 소거 활성은 1,000 µg/mL 농도에서 PRRF가 81.98%로 가장 높았고, PRPF 80.80%, PRRL 79.28%, PRPL 78.63% 순이었다. ABTS 라디칼 소거 활성 평가에서도 전초 추출물인 PRRW 68.63%, PRRW 67.15%로 잎과 열매보다 낮은 활성을 나타냈다. 이는 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 잎과 열매 추출물에서 높고 전초 추출물에서 낮았던 결과와 비례함을 확인할 수 있었으며, 개양귀비 추출물에 함유된 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량과 연관된 것으로 판단된다. Isbilir와

Table 3. DPPH radical scavenging activity of PR extracts

Sample ¹⁾		Concentration (µg/mL)				EC ₅₀ (µg/mL) ²⁾
		125	250	500	1,000	
PRP	PRPW	7.34±0.56 ^{Cd}	17.09±1.84 ^{Dc}	32.88±1.58 ^{Eb}	56.47±1.58 ^{Fa}	864.91±15.23 ^{A*}
	PRPL	13.84±1.84 ^{Bd*}	22.16±1.66 ^{Bc}	42.30±0.63 ^{Cb}	69.79±1.85 ^{Ca}	671.28±15.79 ^{E*}
	PRPF	9.29±1.56 ^{Cd}	18.71±1.95 ^{Cdc}	35.74±1.75 ^{Db}	61.60±1.77 ^{Da*}	784.98±8.36 ^{C*}
PRR	PRRW	7.73±1.99 ^{Cd}	17.22±2.17 ^{Dc}	34.50±1.27 ^{DEb}	57.07±0.23 ^{Fa}	836.24±5.84 ^B
	PRRL	9.03±0.85 ^{Cd}	23.65±1.95 ^{Bc}	45.09±1.36 ^{Bb}	74.59±1.00 ^{Ba}	631.88±8.38 ^F
	PRRF	7.34±1.13 ^{Cd}	18.97±2.88 ^{Cdc}	35.80±0.41 ^{Db}	66.02±1.81 ^{Ea}	742.45±12.20 ^D
Ascorbic acid		92.98±0.23 ^{Aa}	93.18±0.11 ^{Aa}	93.76±0.23 ^{Aa}	93.63±0.39 ^{Aa}	29.69±0.43 ^G

¹⁾Samples are the same as Table 1.

²⁾EC₅₀ means the concentration of sample that gives 50% of its maximal effect.

Values are mean±SD (n>3 independent experiment).

Means with different letters (a-d) in the same row are significantly different ($P<0.05$).

Means with different letters (A-G) in the same column are significantly different ($P<0.05$).

* $P<0.05$ compared with PRP and PRR of same parts.

Table 4. ABTS radical scavenging activity of PR extracts

Sample ¹⁾		Concentration ($\mu\text{g/mL}$)				EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ²⁾
		125	250	500	1,000	
PRP	PRPW	18.35 $\pm$ 0.51 ^{Fd}	32.72 $\pm$ 0.54 ^{Ec}	38.08 $\pm$ 0.84 ^{Fb}	67.15 $\pm$ 1.05 ^{Ea}	678.89 $\pm$ 9.46 ^{A*}
	PRPL	34.46 $\pm$ 0.69 ^{Bd*}	47.71 $\pm$ 0.67 ^{Dc*}	57.12 $\pm$ 0.94 ^{CDb*}	78.63 $\pm$ 0.60 ^{Da}	374.26 $\pm$ 1.07 ^{C*}
	PRPF	34.33 $\pm$ 0.84 ^{Cd}	49.49 $\pm$ 0.67 ^{Cc}	56.26 $\pm$ 0.90 ^{Db}	80.80 $\pm$ 1.48 ^{BCa}	362.39 $\pm$ 8.15 ^{C*}
PRR	PRRW	20.26 $\pm$ 1.09 ^{Ed}	32.16 $\pm$ 1.16 ^{Ec}	46.14 $\pm$ 0.15 ^{Eb}	68.63 $\pm$ 1.09 ^{Ea}	622.70 $\pm$ 8.90 ^B
	PRRL	36.77 $\pm$ 1.23 ^{Dd}	54.39 $\pm$ 0.80 ^{Bc}	60.28 $\pm$ 0.81 ^{Bb}	79.28 $\pm$ 0.35 ^{CDa}	366.92 $\pm$ 13.07 ^C
	PRRF	35.84 $\pm$ 1.04 ^{Bd}	49.33 $\pm$ 0.52 ^{Cc}	57.78 $\pm$ 0.74 ^{Cb}	81.98 $\pm$ 1.66 ^{Ba}	343.04 $\pm$ 10.15 ^D
Ascorbic acid		94.80 $\pm$ 0.20 ^{Aa}	95.10 $\pm$ 0.26 ^{Aa}	95.00 $\pm$ 0.26 ^{Aa}	95.46 $\pm$ 0.32 ^{Aa}	52.04 $\pm$ 0.33 ^E

¹⁾Samples are the same as Table 1.

²⁾ EC_{50} means the concentration of sample that gives 50% of its maximal effect.

Values are mean $\pm$ SD (n>3 independent experiment).

Means with different letters (a-d) in the same row are significantly different ($P<0.05$).

Means with different letters (A-G) in the same column are significantly different ($P<0.05$).

* $P<0.05$ compared with PRP and PRR of same parts.

Sagiroglu(2012)의 물, 에탄올, 에틸아세테이트를 이용한 개양귀비 잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거능과 총 페놀함량이 서로 비례관계가 성립된다는 연구 결과는 본 연구 결과와 유사하였다. 또한, 2종의 개양귀비 추출물(PRP, PRR)을 EC_{50} 값으로 비교하였을 때, DPPH 라디칼 소거능은 잎 추출물의 활성이 가장 크게 나타났으며 PRR이 PRP보다 낮은 농도에서 활성을 나타냈다. ABTS 라디칼 소거능은 열매 추출물의 활성이 가장 크게 나타났고, DPPH 라디칼 소거능과 동일하게 PRR이 PRP보다 높은 활성을 보였다.

산화 자극에 대한 간세포 보호효과

개양귀비 추출물이 HepG2 세포 생존율에 미치는 영향을 분석한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 모든 개양귀비 추출물을 500 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도로 처리하였을 때, 세포독성을 보이지 않았다(Fig. 1). HepG2 세포에 산화 자극을 위한 H_2O_2 의 농도는 약 50% 세포 생존율 감소를 보인 1 mM로 결정하였으며(data not shown), 산화 자극으로부터 개양귀비 추출물

의 HepG2 세포 보호효과를 조사하기 위해 각 추출물을 농도별(0~500 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하고 1시간 미리 배양한 다음 1 mM H_2O_2 를 처리하여 24시간 후 세포 생존율을 확인한 결과는 Fig. 2와 같다. HepG2 세포에서 H_2O_2 처리군의 세포 생존율은 51%로 감소하였고, 모든 개양귀비 추출물은 농도 의존적으로 H_2O_2 에 의한 세포사멸을 억제하였다. 산화 자극에 대한 HepG2 세포 보호효과는 잎 추출물, 열매 추출물, 전초 추출물 순이었다. 특히, PRRL 처리군은 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 70% 이상 세포 생존율이 증가하여 세포 보호효과가 가장 크게 나타났다. PRPL과 PRPF가 67% 이상, PRRF, PRPW, PRRW는 66% 이상으로 세포 생존율이 증가하였다. 2종의 개양귀비 추출물(PRP, PRR)을 비교했을 때, 고농도(250 $\mu\text{g/mL}$ 이상)에서 PRRL이 PRPL보다 유의적으로 높은 간세포 보호효과를 나타냈다. 이는 라디칼 소거 활성(DPPH, ABTS)의 결과와 비례함을 확인할 수 있었다. 세포 내에서 생성된 H_2O_2 는 ROS를 형성시켜 세포에 산화 스트레스를 유발하는데 ROS는 superoxide radicals, per-

Fig. 1. Effect of PR on viability of HepG2 cells. HepG2 cells were treated with PR at various concentrations for 24 h and the relative cell viability was assessed by EZ-cytox cell viability assay. Data are presented as the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Samples are the same as Table 1.

Fig. 2. Protective effect of PR on against H₂O₂-induced cytotoxicity in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 1 mM H₂O₂ for 24 h after pre-treatment with or without PR for 1 h. After treatment, cell viability was assessed by EZ-cytox cell viability assay. Data are presented as the mean±SD of three independent experiments. #*P*<0.01 compared with the control (None) group. **P*<0.05, ***P*<0.01 compared with the H₂O₂ treated group. #*P*<0.05 compared with PRP and PRR of same parts. Samples are the same as Table 1.

oxyl radicals, peroxynitrite 등 다양한 형태로 존재한다 (Lambert와 Brand, 2009). 이러한 라디칼의 과다 생성 및 축적은 세포사멸을 유도하고 다양한 질병을 유발하기 때문에 세포를 보호하기 위해서는 세포 내 ROS의 형성을 억제하는 것이 매우 중요하다(Kim 등, 2013). 이에 본 연구에서는 개양귀비 추출물의 간세포 보호효과가 ROS 소거 활성과 관련하는지 확인하고, ROS에 의한 세포독성을 최소화하여 세포를 보호하는 항산화 방어시스템인 항산화 효소 활성을 평가하였다.

세포 내 활성산소 억제 활성

HepG2 세포에서 H₂O₂ 처리에 의해 유발된 세포독성 및 세포사멸에 대한 개양귀비 추출물의 간세포 보호효과가 산화 자극에 대하여 직접적인 차단 효과인지 확인하기 위해 ROS 생성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 각 추출물을 농도별(0~500 µg/mL)로 처리하여 1시간 미리 배양하고 1 mM H₂O₂를 처리하여 30분 후 DCF-DA probe를 이용하여 ROS 소거 활성을 평가하였다. HepG2 세포에서 H₂O₂ 처리군은 무처리군과 비교하여 299% ROS 생성이 증가하였고, 모든 개양귀비 추출물은 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다(Fig. 3A). 특히, 개양귀비 잎 추출물의 활성이 전초 및 열매 추출물보다 세포 내 ROS 억제 활성이 크게 나타났다. HepG2 세포 내 500 µg/mL 농도에서 PRRL 222%, PRPL 225%로 ROS 생성이 감소하였다. 2종의 개양귀비 추출물(PRPL, PRR)을 비교했을 때, 고농도(250 µg/mL 이상)에서 PRRL이 PRPL보다 유의적으로 높은 활성을 나타냈다. 이는 H₂O₂ 산화 자극에 대한 HepG2 세포 보호 활성의 결과와 비례함을 확인할 수 있었다. 가장 활성이 크게 나타난 개양귀비 잎 추출물(PRPL, PRRL)을 각각 처리하여 형광 현미경으로 확인한 결과에서도 ROS 생성을 의미하는 초록

형광의 강도가 H₂O₂ 단독 처리군에서는 매우 강하게 나타났으나 PRPL 또는 PRRL을 500 µg/mL의 농도로 전처리했을 때 형광 강도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 다량의 ROS는 DNA, 단백질, 세포 내 소기관 등을 손상시켜 여러 질병을 유발하고 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다 (Ishikawa 등, 2008). Parthasarathi 등(2015), Zhuang 등(2017)의 다양한 연구에서 기능성 소재를 처리했을 때, H₂O₂로 유도된 ROS를 소거함으로써 HepG2 세포의 손상을 억제할 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서도 H₂O₂ 처리로 과도하게 증가한 ROS를 개양귀비 추출물의 전처리로 감소시킬 수 있었으며, 이로 인해 HepG2 세포 생존율이 증가했을 것으로 판단되었다.

항산화 효소 활성

HepG2 세포에서 H₂O₂ 처리로 유발된 산화 자극에 대한 개양귀비 추출물의 간세포 보호 활성이 항산화 효소인 SOD와 CAT의 활성과 관련하는지 확인한 결과는 Fig. 4, 5와 같다. HepG2 세포에 개양귀비 추출물을 각각 500 µg/mL 농도로 처리하여 1시간 동안 미리 배양하고 1 mM H₂O₂를 처리하여 24시간 후 단백질을 추출하였다. SOD와 CAT의 활성평가 결과, H₂O₂ 처리군과 비교하여 모든 개양귀비 추출물을 전처리했을 때 효소 활성이 유의적으로 증가하였다. 특히, 개양귀비 잎 추출물의 효소 활성이 전초 및 열매 추출물보다 높게 나타났다. HepG2 세포에서 H₂O₂ 처리군은 무처리군과 비교하여 SOD의 활성은 70%로 감소하였으나, 500 µg/mL 개양귀비 추출물을 처리하였을 때 PRRL 84%, PRPL 80%로 활성이 증가하였다. PRRW 79%, PRPW 77%, PRRF 74% 그리고 PRPF 73% 순이었다. CAT의 경우, H₂O₂ 처리군은 무처리군과 비교하여 CAT의 활성은 52%로 감소하였으나 500 µg/mL 개양귀비 추출물을 처리하였을

Fig. 3. Effect of PR on the generation of intracellular ROS levels in H₂O₂-treated HepG2 cells. (A) HepG2 cells were treated with 1 mM H₂O₂ for 30 min after pre-treatment with or without PR for 1 h. After staining with DCF-DA fluorescent dye, DCF fluorescence intensity was measured using a fluorescence microplate reader. Data are presented as the mean±SD of three independent experiments. [#]*P*<0.01 compared with the control (None) group. ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01 compared with the H₂O₂ treated group. [†]*P*<0.05 compared with PRP and PRR of same parts. (B) HepG2 cells were treated with 1 mM H₂O₂ for 30 min after pre-treatment with or without 500 µg/mL PRAL and PRSL for 1 h. The fluorescent images were obtained by a fluorescence microscope (magnification 200×, scale bar 100 µm). These images are representative of at least three independent experiments. Samples are the same as Table 1.

Fig. 4. Effect of PR on the superoxide dismutase (SOD) activity in H₂O₂-treated HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 1 mM H₂O₂ for 24 h after pre-treatment with or without 500 µg/mL PR for 1 h. After treatment, SOD activity was assessed by enzyme assay kit. Data are presented as the mean±SD of three independent experiments. Different letters (a-e) above the bars are significantly different at *P*<0.05. Samples are the same as Table 1.

때 PRRL 87%, PRPL 81%로 활성이 증가하였다. PRRW 72%, PRPW 66%, PRRF 59% 그리고 PRPF 57% 순이었다. 2종의 개양귀비 추출물(PRP, PRR)을 비교했을 때, SOD와 CAT 모두 PRP보다 PRR의 활성이 높게 나타났다. 이는 HepG2 세포 내 H₂O₂로 인해 발생한 ROS 억제 활성의 결과와 비례함을 확인할 수 있었다. SOD와 CAT와 같은 항산화 효소는 H₂O₂에 의해 유발된 산화 스트레스를 저하시킨다고 보고되어 있다(Steiling 등, 1999). 즉, SOD는 자유라디칼을 hydrogen peroxide로 바꿔주고, CAT에 의해 H₂O와 O₂로 전환되어 배출되면서 세포를 산화 자극으로부터 보호한

다고 알려져 있다(Kang 등, 2006). Orr와 Sohail(1994)의 연구에 따르면 항산화 효소 활성이 증가할수록 수명이 연장된다고 하였는데, 본 연구에서 개양귀비 추출물이 항산화 효소인 SOD와 CAT의 활성을 증가시켜 HepG2 세포의 생존율을 증가시켰을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 2종의 개양귀비(PRA, PRS)를 전초, 잎, 열매로 나누고 50% 주정으로 추출하여 각각의 시료를 DPPH

Fig. 5. Effect of PR on the catalase (CAT) activity in H₂O₂-treated HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 1 mM H₂O₂ for 24 h after pre-treatment with or without 500 µg/mL PR for 1 h. After treatment, SOD activity was assessed by enzyme assay kit. Data are presented as the mean±SD of three independent experiments. Different letters (a-f) above the bars are significantly different at $P<0.05$. Samples are the same as Table 1.

또는 ABTS 측정을 통한 항산화 활성과 인간 간암세포인 HepG2 세포를 이용하여 ROS 억제 활성 및 항산화 효소 활성을 조사하였다. 개양귀비 부위별 추출물의 총 플라보노이드 및 총 페놀화합물은 2종 모두 잎과 열매 추출물이 전초 추출물보다 함량이 높았다. DPPH와 ABTS에 의한 라디칼 소거 활성도 잎, 열매, 전초 순으로 높았다. 모든 개양귀비 추출물은 H₂O₂로 자극한 HepG2 세포의 생존율을 농도 의존적으로 증가시켰고 그중에서 잎 추출물의 활성이 가장 크게 나타났다. HepG2 세포 내 ROS 소거 활성과 항산화 효소 중 SOD, CAT의 활성이 모든 추출물에서 증가했지만 잎 추출물을 전처리했을 때 가장 크게 증가하였다. 이상의 결과로 2종의 개양귀비 추출물 모두 잎 추출물에서 라디칼 소거 활성 및 간세포 보호효과가 크게 나타났으며, 이는 개양귀비 잎에 함유된 페놀 화합물 및 플라보노이드에 기인한 것으로 사료된다. 특히, 2종의 개양귀비 추출물 중 PRR이 PRP보다 총 플라보노이드 및 총 페놀 화합물의 함량이 높았으며 항산화 활성이 비교적 높게 나타났다. 이상의 결과로 2종의 개양귀비 중 PRR을 천연 생리활성물질로 활용하는 것이 더 효과적이라고 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술연구개발사업(과제번호: PJ01511502)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

Baek JP, Lee GH, Kang HM. Quality characteristics of *Ligularia stenocephala* and *Asparagus officinalis* produced in Yanggu, Gangwon province. *J Agric Life Environ Sci*. 2014. 26:42-49.

Bondi M, Lauková A, de Niederhausern S, Messi P, Papapoulou C. Natural preservation to improve food quality and safety. *J Food Qual*. 2017. Article ID 1090932. <https://doi.org/10.1155/2017/1090932>

Choi SY, Kim MY, Lee YJ, Choi EK, Kim YB, Lee J, et al. Antioxidant activities and functional components of some rose flower cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2019. 48:

494-500.

Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2014. 20:8082-8091.

Grauso L, de Falco B, Mitti R, Lanzotti V. Corn poppy, *Papaver rhoeas* L.: a critical review of its botany, phytochemistry and pharmacology. *Phytochem Rev*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09676-7>

Gupta RK, Patel AK, Shah N, Choudhary AK, Jha UK, Yadav UC, et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014. 15:4405-4409.

Gupta VK, Sharma SK. Plants as natural antioxidants. *Nat Prod Rad*. 2006. 5:326-334.

Hah D, Kim C, Kim G, Kim E, Kim J. Antioxidative effects of traditional medicinal plants on lipid peroxidation. *Korean J Vet Res*. 2005. 45:341-350.

Hwang JS, Lee BH, An X, Jeong HR, Kim YE, Lee I, et al. Total phenolics, total flavonoids, and antioxidant capacity in the leaves, bulbs, and roots of *Allium hookeri*. *Korean J Food Sci Technol*. 2015. 47:261-266.

Isbirlir SS, Sagiroglu A. An assessment of *in vitro* antioxidant activities of different extracts from *Papaver rhoeas* L. leaves. *Int J Food Prop*. 2012. 15:1300-1308.

Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, et al. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science*. 2008. 320:661-664.

Kang KA, Lee KH, Chae S, Zhang R, Jung MS, Ham YM, et al. Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. *J Cell Biochem*. 2006. 97:609-620.

Kati V, Corre V, Michel S, Jaffrelo L, Poncet C, Délye C. Isolation and characterisation of 11 polymorphic microsatellite markers in *Papaver rhoeas* L. (corn poppy), a major annual plant species from cultivated areas. *Int J Mol Sci*. 2013. 14: 470-479.

Kim DG, Shin JH, Kang MJ. Antioxidant and anti-inflammatory activities of water extracts and ethanol extracts from *Portulaca oleracea* L.. *Korean J Food Preserv*. 2018. 25:98-106.

Kim GH, Lee MH, Han MH, Park C, Hong SH, Choi YH. Induction of apoptosis by citri pericarpium methanol extract through reactive oxygen species generation in U937 human leukemia cells. *J Life Sci*. 2013. 23:1057-1063.

Kim I, Ji S, Jeong Y. Antioxidant activity of *Suaeda japonica* Makino sprout extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2019. 48:40-48.

Kim M, Hwang IG, Kim SB, Choi AJ. Chemical characterization of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) sprout

- extracts and their regulation of inflammatory activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells. *Food Sci Nutr*. 2020. 8:246-256.
- Kostic DA, Mitic SS, Mitic MN, Zarubica AR, Velickovic JM, Dordevic AS, et al. Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Papaver rhoeas* L. extracts from south-east Serbia. *J Med Plants Res*. 2010. 4:1727-1732.
- Lambert AJ, Brand MD. Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol Biol*. 2009. 554:165-181.
- Lee G, Kim J, Kang H, Bae D, Choi C. Antioxidant activities and hepato-protective effects of *Stauntonia hexaphylla* fruit extract against H₂O₂-induced oxidative stress and acetaminophen-induced toxicity. *J Life Sci*. 2018. 28:708-717.
- Mitich LW. Corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). *Weed Technol*. 2000. 14:826-829.
- Mlcek J, Rop O. Fresh edible flowers of ornamental plants – A new source of nutraceutical foods. *Trends Food Sci Technol*. 2011. 22:561-569.
- Montefusco A, Semitaio G, Marrese PP, Iurlaro A, De Caroli M, Piro G, et al. Antioxidants in varieties of chicory (*Cichorium intybus* L.) and wild poppy (*Papaver rhoeas* L.) of southern Italy. *J Chem*. 2015. Article ID 923142. <https://dx.doi.org/10.1155/2015/923142>
- Oh JH, Ha JJ, Lee MY, Kim EO, Park D, Lee JH. et al. Identification and metabolite profiling of alkaloids in aerial parts of *Papaver rhoeas* by liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*. 2018. 41:2517-2527.
- Orr WC, Sohai RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 1994. 263:1128-1130.
- Parthasarathi S, Hong SC, Oh MH, Park YS, Yoo JH, Seol SY, et al. Anti-oxidant and hepatoprotective effect of white ginsengs in H₂O₂-treated HepG2 cells. *Nat Prod Sci*. 2015. 21: 210-218.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999. 26:1231-1237.
- Schaffer S, Schmitt-Schillig S, Muller WE, Eckert GP. Antioxidant properties of mediterranean food plant extracts: geographical differences. *J Physiol Pharmacol*. 2005. 56:115-124.
- Soulamani R, Younos C, Jarmouni-Idrissi S, Bousta D, Khallouki F, Laila A. Behavioral and pharmacotoxicological study of *Papaver rhoeas* L. in mice. *J Ethnopharmacol*. 2001. 74: 265-274.
- Steiling H, Munz B, Werner S, Brauchle M. Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res*. 1999. 247:484-494.
- Trichopoulou A, Vasilopoulou E, Hollman P, Chamalides CH, Foufa E, Kaloudis TR, et al. Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the mediterranean diet. *Food Chem*. 2000. 70:319-323.
- Vardi N, Parlapinar H, Ozturk F, Ates B, Gul M, Cetin A, et al. Potent protective effect of apricot and β -carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol*. 2008. 46:3015-3022.
- Yoon BR, Lee YJ, Kim SG, Jang JY, Lee HK, Rhee SK, et al. Antioxidant effect of hot water and ethanol extracts from *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*) on reactive oxygen species (ROS) production in 3T3-L1 adipocytes. *Korean J Food Preserv*. 2012. 19:443-450.
- Zhuang Y, Ma Q, Guo Y, Sun L. Protective effects of rambutan (*Nephelium lappaceum*) peel phenolics on H₂O₂-induced oxidative damages in HepG2 cells and D-galactose-induced aging mice. *Food Chem Toxicol*. 2017. 108:554-562.