한방비만학회지 제9권 제2호
Journal of Society of Korean Medicine for Obesity Research 2009:9(2):57-63

원 저

호박잎의 항산화 효과 연구

차 윤 엽

상지대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Experimental Study on Effects of *Cucurbita moschata Duch.* on Antioxidation

Yun-Yeop Cha, O.M.D., Ph.D.

Dept. of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Sangji University

In recent year, We are concerned about anti-aging, disease-protection, long-life, many methods are used in solving this problem. And Those are related with antioxidative ability.
Recently, We heard that *Cucurbita moschata Duch.* has anti-hypertensive effect and good for health.
So I let made a experiment for this result of the anti-oxidant effect of *Cucurbita moschata Duch.* used for 3 methods, those are DPPH radical scavenging activity, Nitric oxide(NO) radical scavenging activity and Bovine serum albumin(BSA).
The results of this study were as follows:
We measured level of DPPH radical scavenging activity. And we obtained results that the ability of DPPH radical's elimination was increased when concentration of *Cucurbita moschata Duch.* was to 20 ㎎/㎖.
We measured level of Nitric oxide(NO) radical scavenging activity. And we founded that the ability of NO radical's elimination was increased when concentration of *Cucurbita moschata Duch.* was to 10 ㎎/㎖.
When we inspected antioxidation with Bovine serum albumin(BSA). And we obtained that antioxidative ability was increased after 2.5 ㎎/㎖ of *Cucurbita moschata Duch.*.
So I guess that *Cucurbita moschata Duch.* has effect of antioxidative ability. Hereafter we need differential experimental methods for evidence of antioxidative effect on *Cucurbita moschata Duch.*.

Key Words : *Cucurbita moschata Duch.*, Antioxidation

■ 교신저자 : 차윤엽, 강원도 원주시 우산동 283번지 상지대학교 부속한방병원 한방재활의학과
(033) 741-9260(1), omdcha@sangji.ac.kr
■ 접수: 09년 11월 3일 수정: 09년 11월 10일 채택: 09년 11월 19일

Ⅰ. 서 론

호박은 남과(南瓜), 번과(番果), 금과(金果), 북과(北瓜), 금동과(金冬果), 번포(番蒲)라 하며, 甘, 溫, 無毒으로 脾胃經으로 들어가며, 補中益氣, 消炎止痛, 利小便 등의 효능을 가지고 있다. 민간에서는 늑간신경통, 화상, 당뇨병, 야맹증, 각막건조증, 요충, 회충 감염증 등에 많이 사용한다고 알려져 있다[1-3].

최근 생활수준의 향상으로 노화방지, 장수 등에 관심을 많이 가지고 있으며, 이를 해결하기 위한 다양한 방법들이 개발되고 있다. 노화에 관련된 학설은 여러 가지가 있으나, 최근에는 Harman에 의해 체창된 free radical에 의한 연쇄적인 유해반응의 결과로 노화과정이 진행된다는 학설이 유력한 것으로 보고되고 있다[4-7]. 이러한 건강 및 노화에 대한 관심 속에 호박잎은 특유의 맛과 조직감으로 쌈 싸먹는 한국인의 독특한 식생활 문화와 어우러져 예부터 친숙한 식품으로 이용되어져 왔으며, 건강식품으로 많이 알려져 있고 임상에서 비만환자 치료에 음식으로 많이 활용한다고 알려져 있어 그 효능에 대한 사전 실험으로서 진행을 해보았다. DPPH radical scavenging activity, Nitric oxide(NO) radical scavenging activity 등을 통하여 먼저 각각의 항산화효과를 알아보았으며, Bovine serum albumin(BSA)을 이용하여 CU^{2+}/H_2O_2에 대한 방어능을 알아보아 다음의 결과를 얻었다.

Ⅱ. 실 험

1. 재료

본 실험에 사용한 호박잎은 시중에서 구입하였으며, 50 g을 세척하여, 5000 ㎖ 둥근 프라스크에 증류수를 1000 ㎖와 함께 넣어 3시간 동안 전탕하였다. 전탕액을 16겹의 거즈로 거르고, 동결건조하여 실험에 사용하였다. 건조엑기스의 수율은 16.64%였다.

호박잎의 농도는 40 ㎎/㎖를 최초의 농도로 하여 20 ㎎/㎖, 10 ㎎/㎖, 5 ㎎/㎖, 2.5 ㎎/㎖, 1.25 ㎎/㎖, 0.625 ㎎/㎖, 0.3125 ㎎/㎖, 0 ㎎/㎖의 농도가 되게 PBS에 희석하였다. 실험에 사용한 시료는 0.2㎛ membrane filter (Whatman, U.S.A)로 filtration 하였다.

2. 방법

1) DPPH radical scavenging activity[8]

보라색의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)이 항산화물질과 반응하여 무색으로 탈색되는 특징을 이용하여 항산화능을 측정하는 방법이다.

1.5 ㎖ tube에 DPPH 400 ㎕와 시료를 농도별로 40 ㎕씩 넣고 최종용량이 800 ㎕가 되도록 PBS로 조정하였다. 그 후 실온에서 빛을 차단시키며 30분간 방치하였다.

그 후 바닥이 편평한 96 well plate에 200 ㎕씩 3set로 분주하여 ELISA reader(Molecular Device, U.S.A)로 540 ㎚의 파장으로 2회 측정하였다. 측정된 값을 아래의 공식에 따라 DPPH radical scavenging activity로 표시하였다.

$$\% \text{ DPPH radical Scavenging} = [1-(ABS_{sample} / ABS_{control}]\times 100$$

2) Nitric oxide(NO) radical scavenging activity[9-10]

Nitric oxide(NO)를 포함한 여러 가지 free radical은 질병과 연관되어 있는데, NO는 O_2와 반응하여 안정된 nitrite와 nitrate를 생성하며, O_2와 경쟁하는 NO 유리기는 nitrite의 생성을 감소한다. nitrite의 농도를 Greiss reagent를 사용해 흡광도를 측정함으로서 NO 억제능을 측정한다.

실험 시작 전에 Sodium nitroprusside(SNP, Sigma, U.S.A)를 PBS buffer에 10 mM이 되도록 녹였다. 1.5 ㎖ tube에 다양한 농도의 시료 500 ㎕와 10 mM SNP 500 ㎕를 섞어주고 25℃에서 2시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 96 well plate에 반응한 mixture (桑白皮+SNP) 100 ㎕를 넣고 Greiss reagent 100 ㎕를 첨가하고 ELISA reader(Molecular Device, U.S.A)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 control (시료 0 ㎕)과 비교한 nitrite 생성 %를 계산한다.

% Scavenging effect= [1-(nitrite concentration of sample / nitrite concentration of control]×100

3) Bovine serum albumin(BSA)를 이용한 항산화 효과 검증[11)]

1.5 ㎖ tube에 각 농도별 시료 10 ㎕, H_2O_2 5 ㎕, CU^{2+} 5 ㎕, PBS 42.5 ㎕를 섞은 후 37℃ water bath에서 2시간동안 반응하였다. 그 후 Bovine serum albumin(BSA, Sigma, U.S.A) 12.5 ㎕씩 첨가하고 37℃ water bath에서 2시간동안 반응하였다. 그 후 5X Loading dye 12 ㎕ 첨가한 뒤, 12.5% SDS-PAGE를 실시하고 Coomassie Blue 시약으로 Gel 염색과 탈염색을 실시 후 Gel을 scanning(HUMAX, Korea) 하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. DPPH radical scavenging activity을 통한 전자공여능 확인

호박잎 추출물의 농도를 40 ㎎/㎖를 최초의 농도로 하여 20 ㎎/㎖, 10 ㎎/㎖, 5 ㎎/㎖, 2.5 ㎎/㎖, 1.25 ㎎/㎖, 0.625 ㎎/㎖, 0.3125 ㎎/㎖, 0 ㎎/㎖ 까지 사용하였으며, 0 ㎎/㎖를 0%로 하여 농도별 DPPH rad-

Table Ⅰ. DPPH Radical Scavenging Activity(%)

Cucurbita moschata Duch.(㎎/㎖)	0.3125	0.625	1.25	2.5	5	10	20	40
DPPH Radical Scavenging Activity(%)	7.2	7.67	11.86	20.93	37.20	43.72	44.65	43.02

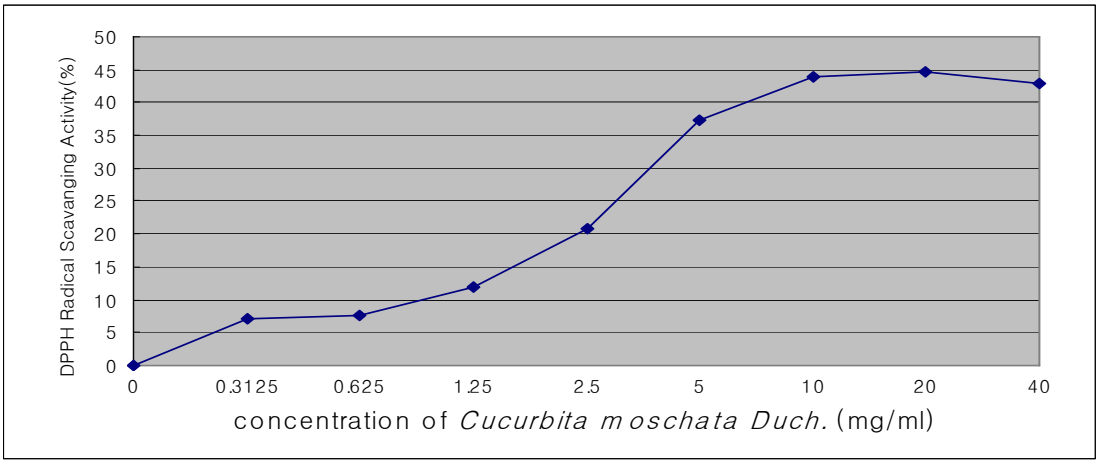

Fig. 1. DPPH radical scavenging activity(%)

ical 소거 활성 영향을 측정하였다. 농도가 증가함에 따라 소거능이 증가하는 경향을 보였고 20 ㎎/㎖에서 최고의 효과를 나타내었다(Table Ⅰ, Fig. 1).

2. Nitric oxide(NO) radical scavenging activity를 통한 저해활성 측정

Nitric oxide(NO) radical scavenging activity를 측정하기 위하여 호박잎 추출물의 농도를 40 ㎎/㎖를 최초의 농도로 하여 20 ㎎/㎖, 10 ㎎/㎖, 5 ㎎/㎖, 2.5 ㎎/㎖, 1.25 ㎎/㎖, 0.625 ㎎/㎖, 0.3125 ㎎/㎖, 0 ㎎/㎖ 까지 사용하였다. 0 ㎎/㎖를 0%로 하여 농도별 제거능을 측정하였으며, 농도가 증가함에 따라 소거능이 증가하는 경향을 보이다가 10 ㎎/㎖에서 최고의 효과를 나타내다가 그 후로는 감소되는 경향을 보였다(Table Ⅱ, Fig. 2).

Table Ⅱ. NO Radical Scavenging Activity(%)

Cucurbita moschata Duch.(㎎/㎖)	0.3125	0.625	1.25	2.5	5	10	20	40
NO Radical Scavenging Activity(%)	34.26	40.07	50.31	55.75	61.31	62.32	54.86	41.46

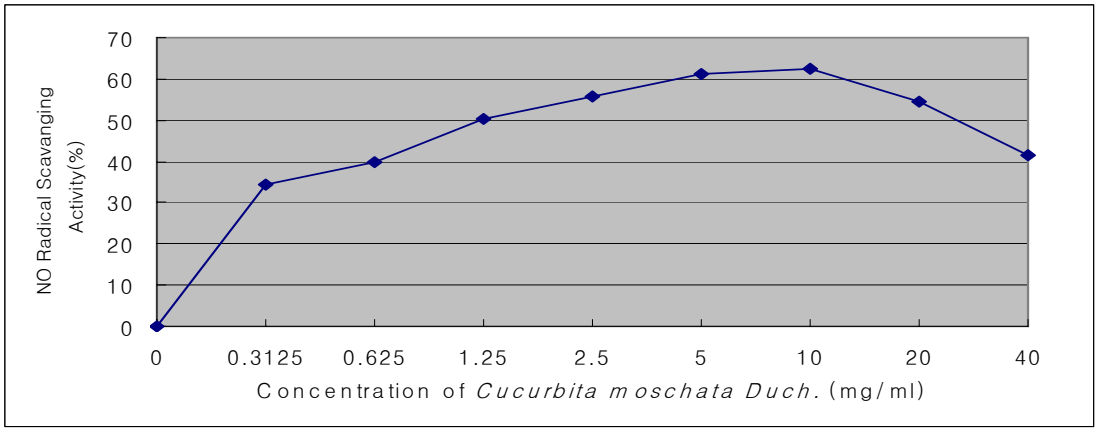

Fig. 2. NO radical scavenging activity(%)

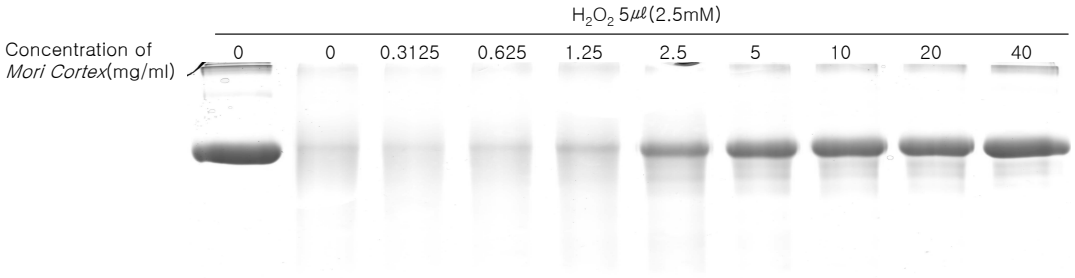

Fig. 3. Antioxidative effect using BSA

3. BSA를 이용한 항산화 효과 검증

Bovine Serum albumin(BSA)를 이용하여 항산화 효과를 검증하였다. 호박잎의 농도를 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0 ㎎/㎖까지 사용하였으며 0 ㎎/㎖를 0%로 하여 H_2O_2에 의한 방어능을 확인하였다. 2.5 ㎎/㎖의 농도에서부터 방어능이 증가하는 경향을 보이고 있으며, 이후로 점점 높은 항산화능을 보였다(Fig. 3).

Ⅳ. 고 찰

산화 스트레스에 관해서는 최근에는 Harman에 의해 제창된 free radical에 관한 학설이 가장 유력하게 보고되고 있으며, 이로 인해 노화과정도 진행된다고 보고 있다[12-15].

Free radical은 인체의 radiation에 의한 노출이나 내부효소반응에 의하여 생성되는데, 단백질의 -SH기와 반응하여 효소의 활성을 잃게 되거나 가교결합의 촉진, DNA, RNA, 효소 및 membrane에 손상을 일으켜 세포괴사를 유발한다[16]. 즉, free radical theory는 대사과정에서 발생하는 superoxide anion(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2) 및 hydroxy radical (OH^-) 등의 free radical이 세포나 결체조직에 작용하여 해로운 물질을 생성하게 되고 이것이 축적된 결과가 로화와 만성 퇴행성 질병의 근본적인 원인이라고 보며 또한 비만의 원인으로까지도 생각을 할 수 있는 것으로, free radical이 축적되는 것을 방지하기 위하여 정상세포는 O_2를 분해하는 superoxide dismutase(SOD)와 H_2O_2를 분해하는 catalase 와 같은 효소들을 가지게 된다[17,18]. 이러한 산화작용에 효과가 있다고 알려져 있는 연구는 많이 있으며, 그 중 호박잎은 특유의 맛과 조직감으로 쌈 싸먹는 한국인의 독특한 식생활 문화와 어우러져 예부터 친숙한 식품으로 이용되어져 왔으며, 건강식품으로 알려져 있는 음식 중 하나이다.

호박의 열매는 남과(南瓜), 번과(番果), 금과(金果), 북과(北瓜), 금동과(金冬果), 번포(番蒲)라 하며, 그 성분은 과실에는 trigonelline, carotenoid, fatty acid, 자당, 포도당, 비타민 A, B1, B2, 니코틴산, 비타민, 칼륨, 인, 칼슘, 나트륨 등이 함유되어 있다[1-3]. 그러나, 호박잎의 성분 및 효능에 대해서는 많이 알려지지 않았다. 따라서, 본 실험에서 일단 호박잎의 항산화 작용이 어떠한 지에 대한 내용을 알아보았으며 그 내용은 다음과 같다.

먼저 DPPH radical scavenging activity을 통한 전자공여능을 확인하였으며, 생체막 구성성분을 파괴하며 각종 산화작용을 나타내는 활성산소를 소거하여 줄 수 있는 활성을 알아보기 위하여 측정에 사용된 DPPH는 안정한 freeradical로서 시료가 항산화활성을 갖고 있다면, DPPH가 갖고 있는 지질산화에 관여하는 free radical의 비공유결합을 소거하여 DPPH의 환원성을 높일 것이고, 보라색의 DPPH가 환원이 많이 될수록 보라색을 잃게 되어 UV 측정 시 그 수치도 낮아진다[19]. 시료가 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화활성 및 활성산소를 비롯한 다른 radical에 대한 소거활성을 기대할 수 있고 인체 내의 활성 산소량의 척도로 이용될 수 있다.

호박잎 추출물의 농도를 40 ㎎/㎖를 최초의 농도로 하여 20 ㎎/㎖, 10 ㎎/㎖, 5 ㎎/㎖, 2.5 ㎎/㎖, 1.25 ㎎/㎖, 0.625 ㎎/㎖, 0.3125 ㎎/㎖, 0 ㎎/㎖ 까지 사용하였으며, 0 ㎎/㎖를 0%로 하여 농도별 DPPH radical 소거 활성 영향을 측정한 결과 농도가 증가함에 따라 소거능이 증가하는 경향을 보였고 20 ㎎/㎖에서 최고의 효과를 나타내었으며, 40 ㎎/㎖에서는 약간 감소한 결과를 보였다(Table Ⅰ, Fig. 1). 이는 20 ㎎/㎖이상의 농도에서는 항산화작용에 큰 의미가 없는 농도로 생각이 된다.

다음으로 Nitric oxide(NO) radical scavenging

activity를 통한 저해활성을 측정하였다. Nitric oxide는 무기 저분자 radical로서 과거에는 대기오염에 관계하는 오염 물질정도로 인식되었으나[20] 현재는 EDRF(endotherium-derived relaxing factor)로서 혈관 평활근의 이완작용 뿐 아니라 중추・말초 신경계에도 신경정보를 전달하는 물질로 밝혀짐으로써 그 기능이 다각도로 연구되어지고 있다[21]. 최근에는 혈액응고 및 혈압조절기능, 암세포에 대항하는 면역기능, 세포사에 영향 등이 밝혀졌다[22-24].

Nitric oxide(NO) radical scavenging activity를 측정하기 위하여 호박잎 추출물의 농도를 40 ㎎/㎖를 최초의 농도로 하여 20 ㎎/㎖, 10 ㎎/㎖, 5 ㎎/㎖, 2.5 ㎎/㎖, 1.25 ㎎/㎖, 0.625 ㎎/㎖, 0.3125 ㎎/㎖, 0 ㎎/㎖ 까지 사용하였다. 0 ㎎/㎖를 0%로 하여 농도별 제거능을 측정하였으며, 농도가 증가함에 따라 소거능이 증가하는 경향을 보이다가 10 ㎎/㎖에서 최고의 효과를 나타내다가 그 후로는 감소되는 경향을 보였다(Table Ⅱ, Fig. 2). 역시 10 ㎎/㎖ 이상의 농도에서는 항산화효과를 증가시키는 요인이 되지는 못하였다.

마지막으로 Bovine Serum albumin(BSA)를 이용하여 항산화 효과를 검증하였다. 호박잎의 농도를 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0 ㎎/㎖까지 사용하였으며 0 ㎎/㎖를 0%로 하여 H_2O_2에 의한 방어능을 확인하였다. 2.5 ㎎/㎖의 농도에서부터 방어능이 증가하는 경향을 보이고 있으며, 이후로 점점 높은 항산화능을 보였으나 뚜렷한 차이는 보이지 않았다(Fig. 3).

이상에서 볼 때 호박잎 추출물의 농도가 20 ㎎/㎖일 때가 가장 항산화작용이 뛰어난 것으로 생각되며, 그 보다 높은 농도는 항산화효능과는 비례하지 못한 결과를 얻었다. 향후 다른 방식으로의 항산화효과 검증이 더 필요하며, 나아가 호박잎의 항비만에 대한 직접적인 효과에 대해서도 연구해 볼만할 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

호박잎의 항산화효과를 알아보기 위해 추출물의 농도를 40 ㎎/㎖를 최초의 농도로 하여 20 ㎎/㎖, 10 ㎎/㎖, 5 ㎎/㎖, 2.5 ㎎/㎖, 1.25 ㎎/㎖, 0.625 ㎎/㎖, 0.3125 ㎎/㎖, 0 ㎎/㎖ 까지 사용하여 다음의 3가지 방법으로 검증한 결과 다음과 같다.

1. 호박잎 추출물의 DPPH radical scavenging activity을 통한 전자공여능 확인 결과 농도가 증가함에 따라 소거능이 증가하는 경향을 보였고 20 ㎎/㎖에서 최고의 효과를 나타내었으며, 그 후로는 감소하는 경향을 보였다.
2. 호박잎 추출물의 Nitric oxide(NO) radical scavenging activity를 통한 저해활성 측정 결과 농도가 증가함에 따라 소거능이 증가하는 경향을 보이다가 10 ㎎/㎖에서 최고의 효과를 나타냈으며 그 후로는 감소되는 경향을 보였다.
3. Bovine Serum albumin(BSA)를 이용하여 항산화 효과를 검증 결과 2.5 ㎎/㎖의 농도에서부터 방어능이 증가하는 경향을 보이고 있으며, 이후로 계속 높은 항산화능을 보였다.

이상의 결과로 호박잎 추출물의 농도에 따른 실험적 항산화 효과가 있음을 알았으며, 이를 이용한 여러 질병에의 효과 연구가 더 필요할 것으로 생각 된다.

Ⅵ. 감사의 글

이 논문은 2009년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의한 것입니다.

Ⅶ. 참고문헌

1. 육창주. 원색한국약용식물도감. 아카데미서적. 서울. 1990:584.
2. 황도연. 증맥・방약합편. 남산당. 서울. 2000:260, 296, 300.
3. 이시진. 본초강목. 인민위생출판사. 북경. 1975:1700, 2451.
4. 김숙희, 김화영. 노화. 서울. 민음사. 77-85, 94. 1991.
5. 李獻平 外. 四大懷藥延綬衰老作用的研究. 서울. 中西醫結合雜誌. 11(8). 486-7. 1991.
6. Cutler, R. G. Antioxidant, aging and longevity. Free Radicals in Biology(ed. Pryor, W.). Acedimic Press. (6). 371-424. 1984.
7. 장석태. 피부과학. 서울. 여문각. 23-5. 1994.
8. Kai-Jin Wang, Ying-Jun Zhang, Chong-Ren Yang. Antioxidant phenolic constituents from Fagopyrum dibortrys. Journal of Ethnopharmacology 99. 2005:259-64.
9. Manjeshwar Shrinath Baliga, Ganesh Chandra Janetia, Shaival Kamalakasha Rao and Kiran Babu S. Evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain spices in vitro :A preliminary study. Nahrung/Food. 2003:47(4);261-4.
10. Jung-Yi Bor, Hui-Yin Chen, Gow-chin Yen. Evalution of antioxidant and Inhibitory effects on Nitric Oxide Production of Some Common Vegetables. J. Agric. Doof Chem. 54. 2006: 1680-6.
11. Park, YH. Effect of polyamine on modification of biommodics by aldehyde. PhD in Medicine Thesis. Seoul National University. 2000.
12. 김숙희, 김화영. 老化. 서울.민음사. 1991:77-85, 94.
13. 李獻平 外. 四大懷藥延綬衰老作用的研究. 서울. 中西醫結合雜誌. 1991;11(8):486-7.
14. Cutler, R. G. Antioxidant, aging and longevity. Free Radicals in Biology(ed. Pryor, W.). Acedimic Press. (6). 1984:371-424.
15. 장석태. 피부과학. 서울. 여문각. 1994:23-5.
16. Feher, J., Cosmos, G and Vereckei, A. The free radical theory of aging Free Radicals Reactions in Medicine. Springer-Verlag. Berlin. 1987:57-9.
17. 리정복. 장수학. 과학백과사전출판사. 1987:11-99. 492-576.
18. 김영곤, 김영균. 프리radical. 서울. 여문각. 1997: 31-5, 98-101, 259-60, 278-86, 396-400, 425-6, 564-8.
19. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 26. 1958: 1198-120.
20. Dimmeler S, Zeiher AM. Nitric oxide and apoptosis. Another paradigm for the double edged role of nitric oxide. Nitric oxide. 1997; 1(41):275-81.
21. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar T R, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. Biochem biophys rescommum. 2001; 282:1075-9.
22. Monocada S, Higgs A. L-arginine nitric oxide pathway. NEng. J. Med. 1993;329:2002-12.
23. Kim YM, Bombeck CA. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. Circ. res. 1999;1(4):253-6.
24. Kim HY. Statistical study of acne vulgaris in korean adolescence. Kor. J. Dermatol. 1978;16: 471-6.