pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 3, pp. 234~242 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.3.234

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물의 항산화 및 항비만 활성 비교

조봉연 · 이진하 · 최선일 · 정태동 · 최승현 · 라문진[1] · 김선영[1] · 강일준[2] · 한경찬[3] · 이옥환*
강원대학교 식품생명공학과, [1]홍천메디칼허브연구소, [2]한림대학교 식품영양학과, [3](주)하티

Changes in Antioxidant and Antiobesity Activities of *Cirsium setidens* Nakai Ethanolic Extract Depending on Different Harvest Time

Bong-Yeon Cho, Jin-Ha Lee, Sun-Il Choi, Tae-Dong Jung, Seung-Hyun Choi, Moon-Jin Ra[1], Sun-Young Kim[1], Il-Jun Kang[2], Kyoung-Chan Han[3], and Ok-Hwan Lee*
Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea
[1]Hongcheon Institute of Medicinal Herb, Hongcheon, Korea
[2]Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon, Korea
[3]HATTI Co., Ltd., Hongcheon, Korea
(Received March 28, 2017/Revised April 13, 2017/Accepted May 16, 2017)

ABSTRACT - This study was conducted to provide basic data of *Cirsium setidens* Nakai in different harvest time that will be applied for development of functional foods and ingredients. We investigated pectiolinarin and pectolinarigenin content, total flavonoids content and antioxidant effects (DPPH radical scavenging activity and ORAC assay) of *C. setidens* Nakai. Our results showed that the pectolinarin and total flavonoids contents of *C. setidens* Nakai in harvesting time ranged from 43.13 ± 0.22 to 95.65 ± 0.34 mg/g and from 32.81 ± 1.68 to 40.43 ± 0.35 mg rutin equivalent (RE)/g, respectively. The DPPH radical scavenging activity of *C. setidens* Nakai did not show differences in harvesting time. The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) value was highest in August (2016) extracts (827.72 μmole TE/g). In addition, *C. setidens* Nakai exthanolic extract in harvesting time did not show any cytotoxicity up to 200 μg/mL. During adipocyte differentiation, *C. setidens* Nakai extract in harvesting time significantly inhibited lipid accumulation and ROS production, compared with the controls. These results suggest that *C. setidens* Nakai extract could be considered as a non-toxic natural resources of functional food ingredients and natural antioxidants.

Key words : *C. setidens* Nakai, Pectolinarin, Antioxidant Activity, Antiobesity

비만은 열량 섭취와 에너지 소비의 불균형으로 발생하는 대사성 질환으로 심혈관계 질환을 비롯한 제 2형 당뇨병 등과 같은 만성 질환의 발생 가능성을 증가시키는 주요 요인으로 인류 건강을 위협하고 있다[1]. 비만을 치료하기 위해서는 약물요법 뿐만 아니라 식이요법, 운동요법들을 병행하게 되면 좋은 효과를 나타내며, 그 중에서도 식이요법은 비만의 예방과 치료를 하는데 있어 가장 중요하고 근본적인 방법이라고 알려져 있다[2,3]. 식욕, 지방흡수 억제 및 지방산화 조절 등을 통해 비만환자를 치료하기 위해 많은 비만 치료 약물이 개발이 되었지만 낮은 효능 및 불면증, 두통, 메스꺼움 등의 부작용이 발생하여 많은 치료제들이 시장에서 회수되었다[4,5]. 현재는 항비만 효능을 나타내는 기능성 식품 소재에 관한 연구가 활발하게 이루어져 Park 등[6]은 흑마늘 열수추출물이 지방세포의 분화과정에서 중요한 역할을 하는 adipogeneic transcription factor의 발현을 효과적으로 억제하며 lipid droplet 및 triglyceride 생성을 효과적으로 억제시켜 지방세포로의 분화를 막는 항비만 효능을 가질 수 있음을 확인한 바 있으며 Kim 등[7]은 후박 추출물이 지방 세포로의 분화에 관여하는 유전인자를 억제하여 분화를 억제하며, HSL (Hormone sensitive lipase) 발현의 증가로 인해 성숙된 지방세포가 생성한 triglyceride의 분해를 촉진하여 항비만 효과를 가진다고 보고한 바 있다.

고려엉겅퀴(*Cirsium setidens* Nakai)는 국화과(Asteraceae)에 속하는 다년생의 초본으로 주로 강원도 지역에 분포하며 그 맛이 담백하고 향이 독특하여 예로부터 빈궁기에 곤드레 밥을 지어 부족한 식량을 해결하는 구황식품으로

*Correspondence to: Ok-Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: 82-33-250-6454, Fax: 82-33-259-5565
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

활용되어 왔다[8]. 구황식물로서 활용되었던 고려엉겅퀴가 최근 건강식품의 원료로 관심이 높아지면서 고려엉겅퀴의 다양한 기능성이 밝혀졌으며 Yoo 등[9] 은 고려엉겅퀴의 지표성분은 pectolinarin 및 비배당체의 형태인 pectolinarigenin으로 보고한 바 있고, Noh 등[10]은 고려엉겅퀴가 고지방식이를 섭취한 쥐로부터 무알콜성 지방간의 간 지방축적 억제작용에 효능이 있다고 보고한바 있다. 이처럼 고려엉겅퀴의 다양한 기능성이 밝혀지면서 건강기능식품 소재로서의 활용방안이 요구되고 있다.

고려엉겅퀴를 사용하여 건강기능식품을 개발하기 위해서는 원료의 표준화를 통한 소재의 기능성과 안전성을 평가하는 것이 중요하며 재배산지와 수확시기의 차이에 따른 지표성분의 함량분석 생산 단계별 공정 조건별 지표성분의 함량분석 등 건강기능식품 원료의 표준화와 규격화를 하는 것 매우 중요하다[11]. 고려엉겅퀴의 보통재배의 경우 5월 중순부터 수확하여 생채나 삶은 후 건조하여 식용으로 사용하는 것이 일반적이나 일부에서는 비닐하우스를 활용하여 조기에 재배와 수확기를 연장시켜 보통 5~9월 사이에 수확을 하는 것으로 알려져 있다[12]. 식물의 경우 수확시기 차이에 의해 생리활성과 유용성분의 함량이 크게 좌우됨을 고려했을 때 수확시기별 고려엉겅퀴의 유용생리활성 변화 및 지표성분 변화에 대한 연구가 필요하지만 아직 보고된바 없으며 생리활성평가의 경우 항산화 활성에 한정되어있는 실정이다[13,14].

따라서 본 연구에서는 고려엉겅퀴를 건강기능식품 소재의 원재료 표준화를 위한 기초자료를 제공하고자 하였으며 6월에서 8월 사이에 수확된 고려엉겅퀴 주정추출물의 지표성분 및 유용생리활성 변화를 관찰하기위해 pectolinarin 함량분석과 이에 따른 총 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거능, ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay, 항비만 활성을 조사하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

본 연구에 사용한 고려엉겅퀴(*Cirsium setidens* Nakai)는 (주)하티(Hongcheon, Korea)로부터 2016년 6월부터 2016년 8월에 수확된 고려엉겅퀴를 제공받아 사용하였다. 각각의 시료는 음건 후 분쇄한 것을 사용하였으며, 분쇄된 시료는 5 g 당 200 mL의 40% ethanol (EtOH)을 혼합한 뒤 70°C에서 2시간 추출하였다. 각 추출액은 filter paper로 여과한 후 rotary vacuum evaporator를 이용하여 용매를 제거하였으며 농축물은 동결 건조하였다. 최종 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물 분말은 일정 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물의 항산화활성과 항비만활성 조사에 사용된 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) 등은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, pectolinarin 표준물질 (purity ≥ 98.0%)은 Carbosynth (Compton, Berkshire, UK)에서 pectolinarin의 비배당체 형태인 pectolinarigenin은 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (Chengdu, Sichuan, China)에서 구입하였다. HPLC 분석에 사용된 acetonitrile은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서, trifluoroacetic acid는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 3T3-L1 세포배양 및 분화에 사용된 N-acetyl-L-cysteine (NAC), insulin, dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), nitroblue tetrazolium (NBT), Oil Red O (ORO), isopropanol은 Sigma (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), bovine serum (BS), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (P/S), phosphate-buffered saline (PBS) 및 trypsin-EDTA는 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

Pectolinarin과 pectolinarigenin 함량 분석

수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물의 pectolinarin 및 pectolinarigenin의 분석을 위하여 Oh 등[15]의 방법을 변형하여 실시하였으며 서로 다른 두 개의 표준물질을 동시분석 하였다. 분석에 사용한 기기는 Waters 2695 Separation Module HPLC system과 Waters Photodiode Array Detector

Table 1. HPLC conditions of pectolinarin and pectolinarigenin analysis for *C. setidens* Nakai ethanolic extract at different harvesting times

Instrument	Conditions		
Column	Sunfire™ C_{18}, 5.0 μm, 4.6 mm × 250 mm		
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector UV 340 nm		
Column temp.	40°C		
Mobile phase (Gradient)	Time (min)	0.05 % TFA[1)] in water (%)	0.05 % TFA in acetonitrile (%)
	0	70	30
	6	70	30
	11	53	47
	22	53	47
	25	70	30
	30	70	30
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Run time	30 min		

[1)]TFA: trifluoroacetic acid

(Waters Co., Milford, MA, USA)로 조건은 Table 1과 같으며 분석용 column은 Sunfire™ C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm, Waters Co., Milford, MA, USA)을 사용하였다.

총 플라보노이드 함량 분석

총 플라노이드 함량은 Kim 등[16]의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 mL에 95% 에탄올 1.5 mL을 첨가한 후 10% aluminium nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL와 증류수 2.8 mL를 혼합하여 상온에서 30분간 방치하였다. 다음 microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 rutin을 이용하였으며 표준 검량 곡선($y = 1.7408x - 0.0027$ $R^2 = 0.9998$)으로부터 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거활성 측정은 Kim 등[17]의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.2 mL에 ethanol로 용해한 0.4 mM DPPH 용액 0.8 mL를 첨가하여 혼합한 후 상온에서 10분간 반응하였다. 그리고 microplate reader를 사용하여 517 nm에서 흡광도 값을 측정한 후 시료의 DPPH 라디칼 소거활성은 다음 식에 의해 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거활성}(\%) = \left\{1 - \left[\frac{A_{\text{Exp eriment}}}{A_{control}}\right]\right\} \times 100$$

ORAC 지수 측정

ORAC 지수 측정은 Ou 등[18]의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료의 농도별 희석은 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하였다. Black well plate에 시료 25 μL, 40 nM fluorescein 150 μL을 첨가하고 측정 직전에 150 mM AAPH 25 μL을 첨가한 다음 microplate reader를 이용하여 485 nm에서 전자여기 후 530 nm에서 방출되는 조건으로 37°C에서 90분간 3분마다 fluorescence의 감소율을 측정하였다. 결과 값은 시료 첨가구와 무 첨가구의 area under curve (AUC) 값을 나타낸 후, 표준물질인 Trolox를 이용하여 표준 검량 곡선($y = 1.2127x + 0.5667$ $R^2 = 0.9941$)에 대입하여 나타내었다.

$$\text{Area under curve (AUC)} = 1 + f1/f0 + f2/f0 + f3/f0 + 4/f0 + ...f/31/f0$$

XTT assay를 이용한 세포독성평가

3T3-L1 지방세포에 대한 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물의 세포 독성평가는 Kim 등[19]의 방법에 따라 XTT {2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide innersalt} assay kit를 이용하여 측정하였다. 3T3-L1 세포는 1×10^6 cell 농도로 48-well plate에 seeding하고 BS (10%) 및 P/S (1%)를 함유한 DMEM (89%)에서 100% confluence 될 때까지 배양하였다. 이로부터 2일 후에, 지방세포 분화유도 물질(1 μg/mL insulin, 250 nM DEX, 0.5 mM IBMX)과 FBS (10%) 및 P/S (10%)를 함유한 DMEM으로 전지방세포를 지방세포로 분화유도 하였다. 지방세포 분화(day 0)시 각각의 시료를 50, 100 및 200 μg/mL 농도로 처리하였다. 분화 6일차가 되었을 때 1 mL의 XTT reagent와 20 μL PMS reagent (N-Methylphenazonium methyl sulfate)를 혼합하여 working solution을 준비하여 놓고, pipet을 이용하여 48-well medium 부피의 20% 되는 양 만큼 취하고 각각의 well에 조심스럽게 첨가하여 plate를 바닥에 붙인 상태로 가볍게 흔들면서 혼합하였다. 4시간 동안 CO_2 incubator에서 배양한 후, microplate reader를 이용하여 450 nm 흡광도 값에서 690 nm의 흡광도 값을 뺀 결과 값으로 세포 독성을 계산하였다.

3T3-L1 세포 배양 및 분화

3T3-L1 지방세포의 분화 과정 중, 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물에 의한 지방세포 분화를 관찰하기 위해 사용된 마우스 유래 3T3-L1 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, CL-173, Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받아 사용하였다. 3T3-L1 전지방세포를 실험목적에 따라 24-well plate에 각각 5×10^6 cell 농도로 seeding한 후, 10% BS 및 1% P/S를 함유한 DMEM (89%)에서 100% confluence 될 때까지 배양하였다. 이로부터 2일 후에, 지방세포 분화유도 물질(1 μg/mL insulin, 250 nM DEX, 0.5 mM IBMX)과 10% FBS 및 10% P/S를 함유한 DMEM으로 전지방세포를 지방세포로 분화 유도하였다. 지방세포 분화(day 0)시 DMEM에 시료를 각각 50 그리고 100 μg/mL로 처리하였고, 이때 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물의 효과를 관찰하기 위하여 negative control에는 아무것도 처리하지 않았다. 지방세포의 분화는 분화유도 물질을 처리한 후, 2일마다 지속적으로 1 μg/mL insulin, 1% P/S, 10% FBS가 함유된 배지에 각각의 시료를 처리하였다.

Oil red O staining을 이용한 지방축적량 관찰

분화 과정에 따른 3T3-L1 세포 내 지방축적량을 측정하고자 각각의 시료를 처리하여 24-well에서 8일 동안 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후, 10% formalin 용액 500 μL를 첨가하여 5분간 실온에서 방치한 뒤 제거하였다. 그 후 동량의 formalin 용액으로 분화된 3T3-L1 세포 1시간 이상 실온에서 방치한 후, formalin을 제거하고 60% isopropanol 용액 500 μL로 세척하여 세포를 완전히 건조시켰다. 완전히 건조된 세포들은 미리 제조해 둔 ORO working solution (Oil red O:DDW = 6:4)으로 세포 내 축적된 지방성분들을 충분히 염색 한 후, 증류수를 이용하여 세포를 3~4회 세척하고, 완전히 건조시켰다. 세포

내 축적된 지방 성분과 결합한 Oil red O는 100% isopropanol을 이용하여 모두 용출시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NBT assay를 이용한 ROS 생성량 관찰

분화과정에 따른 지방세포의 ROS 생성량을 측정하기 위하여 먼저 24-well에 배양 및 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후 멸균된 PBS (Phosphate buffer saline, pH 7.4)를 이용하여 2회 세척하고 0.2% NBT 용액 200 μL를 첨가하여 CO_2 incubator안에서 90분간 반응시킨 뒤 KOH solution (DMSO:1N KOH = 7:3)을 이용하여 dark blue formazan을 모두 용출시킨 후 동량의 증류수를 첨가하여 잘 섞어준 후 microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

Pectolinarin 함량, 총 플라보노이드 함량, 항산화 활성, 항비만 활성 결과 값의 통계처리는 SAS version 9.4 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 분석하였다. 유의성 분석은 one-way ANOVA 검정을 실시하였으며 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로 유

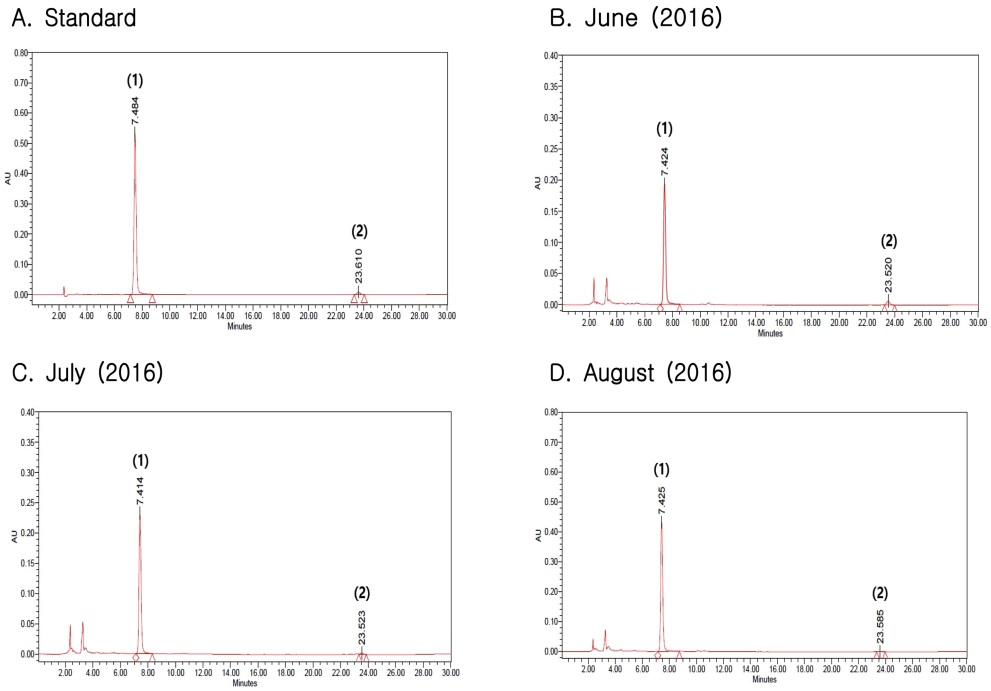

Fig. 1. HPLC chromatograms of standard mixture and *C. setidens* Nakai ethanolic extract at different harvesting times. A, Standard mixture compound; B, June (2016); C, July (2016); D, August (2016). (1): pectolinarin, (2): pectolinargenin.

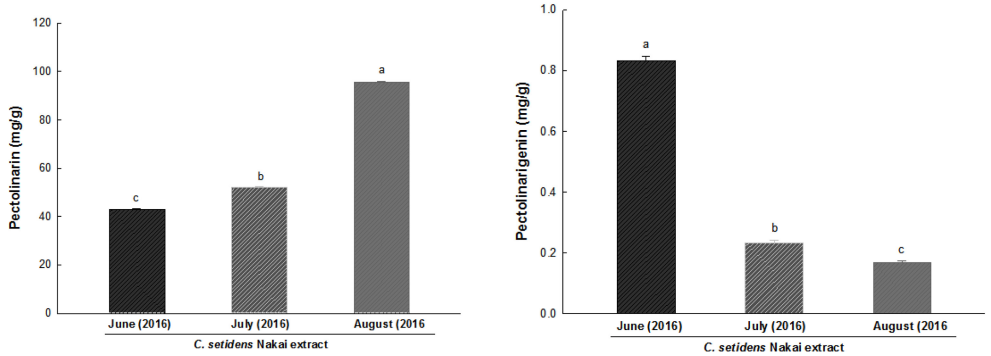

Fig. 2. The contents of pectolinarin and pectolinarigenin of *C. setidens* Nakai ethanolic extract at different harvesting times. Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

의성은 $P < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

Results and Discussion

수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물의 pectolinarin 함량

산지별 고려엉겅퀴의 pectolinarin 함량을 분석한 결과는 Fig. 1과 같이 분석에 사용한 표준물질 pectolinarin 및 pectolinarigenin의 머무름 시간(retention time, RT)과 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물의 머무름 시간은 일치하였다. 수확시기별 고려엉겅퀴 추출물의 지표성분함량은 Fig. 2와 같이 pectolinarin 함량은 수확시기별로 43.13 ± 0.22, 51.96 ± 0.44 및 95.65 ± 0.34 mg/g로 수확시기 가운데 2016년 8월에 수확한 고려엉겅퀴에서 가장 높은 함량을 보였으며 pectolinarin의 비배당체인 pectolinarigenin의 함량은 수확시기별로 0.83 ± 0.01, 0.23 ± 0.01 및 0.17 ± 0.01 mg/g로 나타났다. Lee 등[20] 에 따르면 폴리페놀 화합물인 epicathechin, catechin, resveratrol, quercetin 등의 활성 물질이 포도의 수확시기에 따라 함량차이를 보였는데 이는 일조량 및 생육시기 등의 복합적 요인들이 활성물질 함량 정도에 영향을 주기 때문인 것으로 밝힌 바 있으며 고려엉겅퀴의 수확시기에 따른 지표성분의 함량 또한 일조량 및 생육시기 등의 특성에 따라서 많은 차이를 보인 것으로 사료되었다.

수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물의 총 플라보노이드 함량

식물에 널리 분포되어있다고 잘 알려진 플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 황색계열의 물질로 항산화활성을 비롯하여 여러 생리활성 기능을 가진 물질이다. 최근 많은 연구에서 플라보노이드는 항비만, 항염증 등의 반응에 효과가 있다고 발표한 바 있으며 플라보노이드 성분을 지방전구세포 분화과정 동안 처리했을 시 분화억제 및 항산화효과가 있음이 밝혀진 바 있다[21,22]. 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물의 총 플라보노이드 함량은 표준물질 rutin (RE)으로 하여 표준검량곡선을 작성한 후 그 함량을 확인하여 Fig. 3와 같이 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 수확시기별로 32.81 ± 1.68, 36.05 ± 1.28, 40.43 ± 0.35 mg RE/g 수준으로 측정되었으며 2016년 6월에 수확한 고려엉겅퀴 추출물에서 측정된 총 플라보노이드 함량에 비해 2016년 8월에 수확한 고려엉겅퀴 추출물에서 약 23% 정도 증가한 것으로 확인되었다. 곰취의 품종 및 수확시기별 생리활성을 비교한 Seo 등[23]의 연구에 따르면 품종별로 총 플라보노이드 함량이 상이하였지만, 모든 품종에서 6월 중순 이후 분명한 함량변화를 확인하였으며 7월 초까지 총 플라보노이드 함량이 유의적으로 증가함을 확인한 바 있다. 본 연구의 고려엉겅퀴의 경우에도 수확시기가 길어짐에 따라서 총 플라보노이드 함량이 증가함을 확인하여 활성 물질이 많이 함유되어 있는 고려엉겅퀴를 얻기 위한 최적의 수확시기를 선정하는데 도움이 될 것으로 사료되었다.

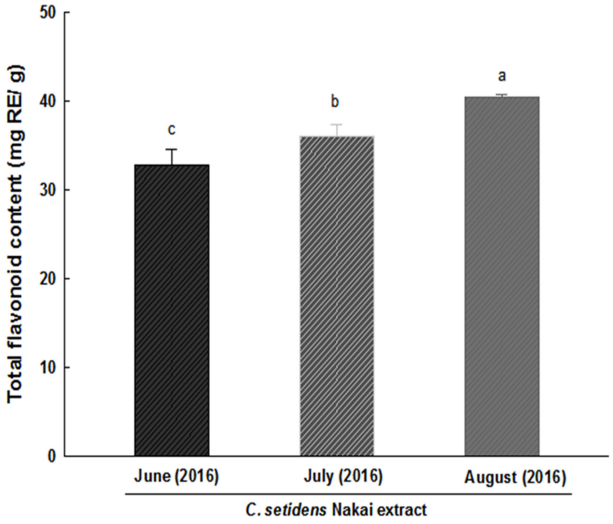

Fig. 3. Comparison of total flavonoid contents of *C. setidens* Nakai ethanolic extract at different harvesting times. Total flavonoid contents expressed as rutin equivalents (mg RE/g). Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

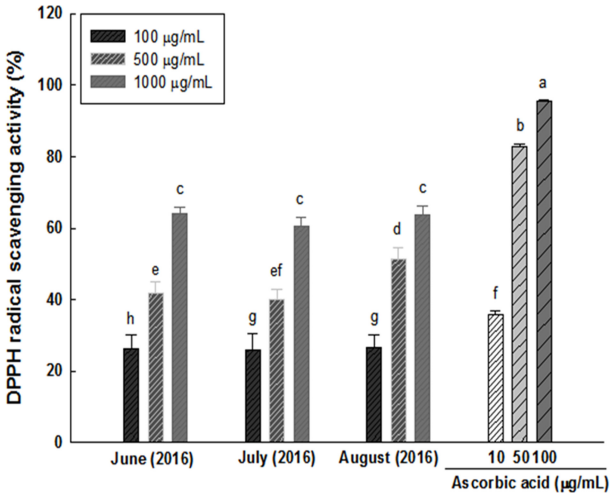

Fig. 4. Comparison of DPPH radical scavenging activity of *C. setidens* Nakai ethanolic extract at different harvesting times. Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물의 항산화활성 측정 (DPPH 라디칼 소거능, ORAC assay)

DPPH는 항산화 능력을 측정하는데 있어 대표적인 반응물질로 그 자체로 매우 안정한 자유 라디칼이며 DPPH 라

디칼 소거능은 하이드록시 라디칼(–OH)을 갖는 페놀성 화합물이나 플라보노이드를 가진 물질에서 수소공여를 통한 라디칼의 소거로 자색 화합물이 노란색으로 탈색되는 원리는 이용하는 방법이다[24]. 수확시기별 고려엉겅퀴의 DPPH 라디칼의 소거능을 확인한 결과는 Fig. 4과 같다. 수확시기에 따른 고려엉겅퀴 주정추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 100, 500 및 1000 μg/mL 농도에서 26.02%~64.10%의 소거활성이 나타났으며 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 동일 농도인 1000 μg/mL 농도에서 수확시기에 따라 64.10 ± 1.74, 60.71 ± 2.44, 63.83 ± 2.46%의 DPPH 라디칼 소거활성이 나타났으나 통계 유의적으로 차이는 없는 것으로 확인되었다. Villaňo 등[25]은 플라보노이드 계열의 화합물이 항산화 활성 간 높은 상관관계를 나타낸다는 보고한 바 있으나 Nabasree 등[26]에 따르면 항산화활성은 평가방법에 따라 효과가 상이하며, 항산화 효과와 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량간의 상관관계는 시료를 구성하는 유용성분에 따라 다르게 나타난다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 수확시기에 따른 고려엉겅퀴의 총 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거능 간의 명확한 상관관계가 보이지 않아 다양한 항산화활성 평가를 이용하여 상호보완적인 기능성 평가를 수행하여 기능성 원료로서의 자료를 구축하는 것이 필요하다고 판단되었다. 수확시기별 고려엉겅퀴 주정 추출물의 ORAC 지수를 측정한 결과는 Fig. 5와 같이 수확시기별로 345.69~827.72 μmole TE/g의 값을 나타내었다. 2016년 6월에 수확한 고려엉겅퀴 추출물에서 측정된 ORAC 지수에 비해 2016년 8월에 수확한 고려엉겅퀴 추출물에서 약 2.4배 가량 증가한 것으로 확인되었다. ORAC 지수가 총 페놀 함량에 비례하여 증가한다고 보고한 바 있는 Prior 등[27]의 연구결과와 유사하게 지표성분 함량 및 페놀성 화합물의 일종인 총 플라보노이드 함량에 비례하여 ORAC 지수가 증가하였으며 그 차이는 수확시기별 고려엉겅퀴 추출물의 페놀성 화합물의 함량의 차이에 의한 것으로 사료되었다.

수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물의 지방세포 분화 억제 및 ROS 저감효과

수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물(*Cirsium setidens* Nakai ethanolic extract)은 50~200 μg/mL의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았으며, 현미경 상에서의 morphology의 변화도 관찰되지 않았다(Fig. 6). 따라서 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물의 항비만 및 항산화 활성을 평가하기 위한 처리 농도는 50 및 100 μg/mL로 결정하였다. 수확시기별 고려엉겅퀴 추출물이 3T3-L1 전구지방세포의 분화 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3T3-L1 세포에 수확시기별 고려엉겅퀴 추출물을 농도별로 MDI(분화유도배지)와 동시에 처리하면서 adipocyte로 분화를 유도시키고 세포 내에 형성된 중성지방을 붉게 염색시키는 Oil red O 시약을 통해 중성지방의 양을 측정한 결과는 Fig. 7와 같다. 음성대조군(CON)에 비해 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물을 각각 100 μg/mL 처리한 군에서 각각 75.72 ± 2.99, 73.98 ± 3.57, 및 69.88 ± 1.49% 로 세포 내 지질 축적량이 감소한 것을 확인하였으며 수확시기에 따른 고려엉겅퀴 추출물의 지질 축적 억제능의 차이는 미비한 것으로 확인되었다. 이는 항비만 효과를 확인하기위해 사용된

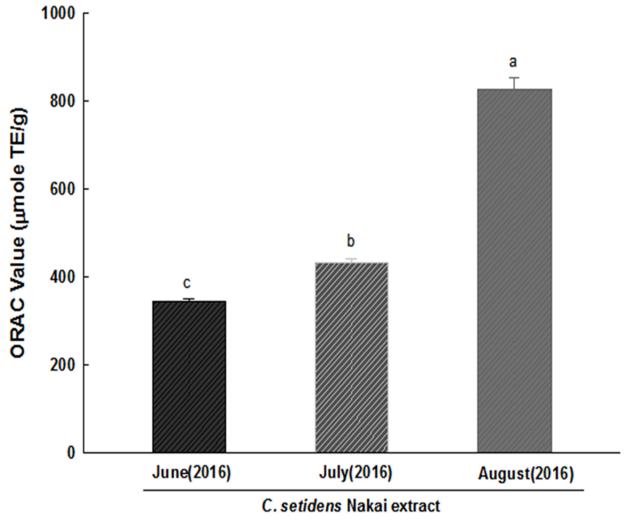

Fig. 5. Comparison of ORAC value of *C. setidens* Nakai ethanolic extract at different harvesting times. ORAC values expressed as Trolox equivalents (μmole TE/g). Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

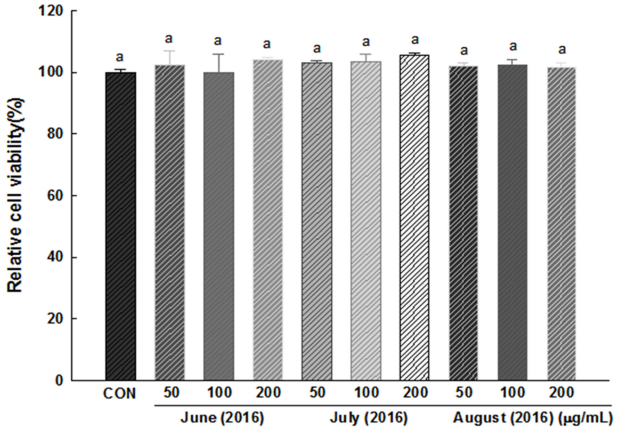

Fig. 6. Effect of *C. setidens* Nakai ethanolic extract at different harvesting times on cell viability. Cell viability was measured by XTT assay. 3T3-L1 preadipocytes were incubated in differentiation medium with *C. setidens* Nakai extract at different harvesting times. After 6 days, XTT reagent was added to the medium. After 4 hours of incubation, the absorbance was read at 570 nm. XTT Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

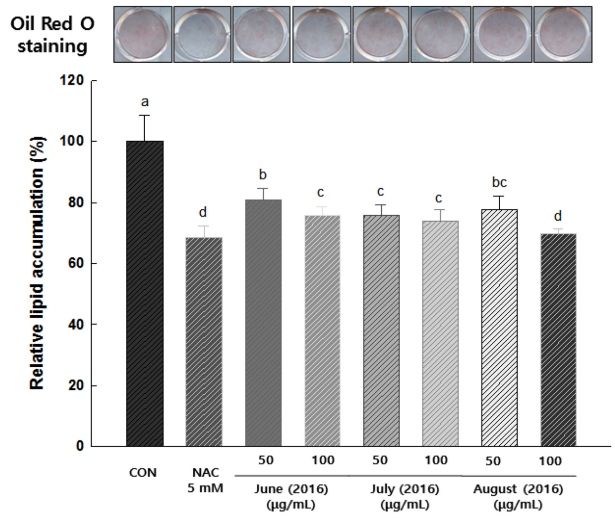

Fig. 7. Effect of *C. setidens* Nakai ethanolic extract at different harvesting times on lipid accumulation during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. Oil red O staining at day 6. Lipid accumulation determined by absorbance at 490 nm (Abbreviation: CON; Control, NAC; N-acetyl cysteine). Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

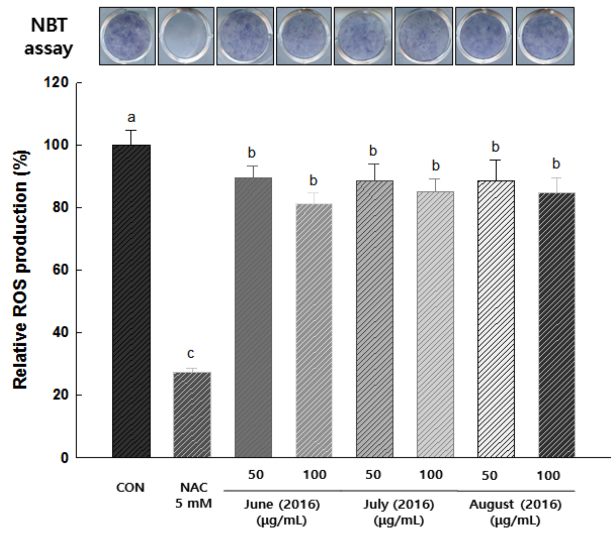

Fig. 8. Effect of *C. setidens* Nakai ethanolic extract at different harvesting times on ROS production during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. Dark-blue formazan (ROS production) was dissolved and the absorbance was determined at 570 nm (Abbreviation: CON; Control, NAC; N-acetyl cysteine). Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

고령엉겅퀴 주정추출물의 경우 단일성분이 아닌 복합추출물 형태로 처리하였기 때문에 수확시기에 따른 고려엉겅퀴 주정추추물의 유효성분 차이로 인한 항비만 효과는 미비하였던 것으로 사료되었다. 그러나 고려엉겅퀴 열수추출물의 지방세포 분화 억제를 보여주는 선행연구결과와 유사하게 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물 또한 3T3-L1 지방세포에 처리하였을 때 지방생성이 효과적으로 억제되는 연구결과를 보였으며 이는 지방세포의 분화 및 지방축적과 연관된 주요 전사인자인 PPARγ, C/EBPα 및 aP2의 발현과 관련이 있을 것으로 사료되었다[28].

지방세포 내 생성된 ROS를 측정할 수 있는 NBT assay는 NBT 시약과 ROS가 반응하여 dark blue formazan을 생성하고, 이를 용출시켜 세포 내 ROS의 생성량을 알 수 있는 방법이다. ROS는 3T3-L1 지방세포 내 대사과정에서 발생하는 NADPH를 이용하여 ROS를 생성하는 단백질 NADPH oxidase 4 (NOX4)에 의해 생성된다[29,30]. 3T3-L1 전구지방세포에 분화유도물질 및 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물을 처리하여 분화시킨 뒤 NBT assay를 통해 ROS 생성량을 측정한 결과는 Fig. 8과 같다. 음성대조군에 비하여 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물 100 μg/mL 처리한 군에서 ROS 생성량이 각각 18.83, 14.91 및 15.30% 정도 감소하는 것을 확인하였다. 글루타치온의 전구체로서 세포 내 항산화 효소 생성에 도움을 준다고 알려져 있는 NAC의 경우 지방축적 억제효과와 유사하게 ROS의 생성량을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. Lee 등[28]은 고려엉겅퀴 열수추출물을 3T3-L1 지방세포에 처리하였을 때 대조군에 비해 약 17.2% 정도 감소한 ROS 생성량을 확인한 바 있으며 주요 전사인자 가운데 ROS 생성과 관련한 G6PDH의 단백질 발현이 고려엉겅퀴 열수추출물을 처리한 군에서 유의적으로 감소하였다는 결과를 발표한 바 있다. 이상의 결과로 비추어 볼 때, 고려엉겅퀴 주정추출물은 지방세포 분화과정 및 ROS의 생성을 억제하는 효능을 갖는 것으로 판단되었으며, 추후 고려엉겅퀴 주정추출물에 대한 항비만, 항산화활성의 기초자료로 향후 본 연구를 바탕으로 하여 항비만 활성의 작용기작 구명 및 주요 활성성분의 분리, 정제 연구 등이 이루어진다면 고려엉겅퀴를 이용한 천연 항비만 건강기능식품을 개발하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성사업”(과제번호 R00004762)으로 수행된 연구결과 입니다.

국문요약

본 연구에서는 국내산 고려엉겅퀴를 건강기능식품 소재로 활용 시 기초자료 제공하고자 수확시기에 따른 고려엉겅퀴의 항산화활성 및 항비만 활성의 차이를 구명하고자

수행 하였다. 2016년 6월, 7월 그리고 8월에 수확한 고려엉겅퀴를 이용하여 지표성분 분석, 총 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거활성, ORAC assay 및 지방축적과 ROS 생성 억제효과를 관찰하였다. 지표성분 pectolinarin 함량은 수확시기별로 43.13 ± 0.22 ~ 95.65 ± 0.34 mg/g 로 수확시기 가운데 2016년 8월에 수확한 고려엉겅퀴에서 가장 높은 함량을 보였으며 총 플라보노이드 함량의 경우 2016년 8월에 수확한 고려엉겅퀴 주정추출물에서 40.43 ± 0.35 mg RE/g로 수확시기 가운데 가장 높은 함량을 나타냈다. DPPH 라디칼 소거활성은 수확시기에 따른 활성 차이를 보이지 않았지만 ORAC 지수의 경우 총 플라보노이드 및 지표성분 함량의 결과와 유사하게 2016년 8월에 수확한 고려엉겅퀴 주정추출물에서 6월 수확시기보다 2.4배가량 높은 ORAC 지수를 나타내었다. 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물은 50~200 μg/mL의 농도에서 지방세포에 대한 세포독성을 나타내지 않았으며 지방세포 분화 중 세포 내 지방축적 및 ROS 생성량을 비교한 결과, 수확시기별 고려엉겅퀴 주정추출물을 처리한 지방세포의 경우 지방축적량과 ROS 생성량 모두 유의적으로 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 고려엉겅퀴는 비만 등 대사증후군 관련 질환의 개선을 위한 건강기능식품 소재로의 활용이 기대된다.

References

1. Spiegelman, B.M., Flier, J.S.: Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.,* **104**, 531-543 (2001).
2. King, D.J., Devaney, N.: Clinical pharmacology of sibutramine hydrochloride (BTS 54524), a new antidepressant, in healthy volunteers. *Br. J. Pharmacol.,* **26**, 607-611 (1988).
3. Mason, E.E.: Methods for Voluntary Weight Loss and Control. *Obes. Surg.,* **2**, 275-276 (1992).
4. Elangbam, C.S.: Review paper: Current strategies in the development of anti-obesity drugs and their safety concerns. *Vet. Pathol*., **46**, 10-24 (2009).
5. Rodgers, R.J., Tschop, M.H., Wilding, J.P.: Anti-obesity drugs: past, present and future. *Dis Model Mech*., **5**, 621-626 (2012).
6. Kim, H.J., Lee, Y.M., Kim, Y.H., Won, S.I., Choi, S.A., Choi, S.W.: Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes with *Magnolia officinalis* Extracts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*., **2**, 117-123 (2009).
7. Park, J.H., Park, C., Han, M.H., Kim, B.W., Chung, Y.H., Kim, Y.H.: Inhibition of Adipocyte Differentiation and Adipogenesis by Aged Black Garlic Extracts in 3T3-L1 Preadipocytes. *J. Life. Sci.,* **5**, 720-728 (2011).
8. Park, H.Y., Lim, B.K.: Manufacturing optimization of wet noodle added with leaf powder of freeze-dried *Cirsium setidens* Nakai. *Food Eng. Prog*., **18**, 130-139 (2014).
9. Yoo, Y.M., Nam, J.H., Kim, M.Y., Choi, J., Park, H.J.: Pectolinarin and pectolinarigenin of *Cirsium setidens* prevent the hepatic injury in rats caused by D-galactosamine via an antioxidant mechanism. *Biol Pharm Bull*., **31**, 760-764 (2008).
10. Noh, H., Lee, H., Kim, E., Mu, L., Rhee, Y.K., Cho, C.W., Chung, J.: Inhibitory effect of a *Cirsium setidens* extracts on hepatic fat accumulation in mice fed a high-fat diet via the induction of fatty acid β-oxidation. *Biosci Biotechnol Biochem*., **77**, 1424-1429 (2013).
11. KFDA. Guideline for standard of health functional food. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2008).
12. RDA. Profitability Analysis of Agricultural Production in Region. Rural Development Administration, Jeonju-si, Korea (2012).
13. Cha, J.Y., Jeong, J.J., Kim, Y.T., Seo, W.S., Yang, H.J., Kim, J.S., Lee, Y.S.: Detection of chemical characteristics in hamcho (*Salicornia herbace* L) according to harvest periods. *J. Life Sci*., **16**, 683-690 (2006).
14. Kim, H.S., Park, J.W., Lee, Y.J., Shin, G.W., Park, I.B., Jo, Y.C.: The amino acid content and antioxidant activities of glasswort (S*alicornia herbacea* L.). *Kor. J. Food Preserv*., **16**, 427-434 (2009).
15. Oh, J.W., Lee, J.H., Cho, M.L., Shin, G.H., Kim, J.M., Choi, S.I., Jung, T.D., Kim, Y.H., Lee, S.J., Lee, B.J., Park, S.J., and Lee, O.H.: Development and validation of analytical method for pectolinarin and pectolinarigenin in fermented *Cirsium setidens* Nakai by bioconversion. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.*, **44**, 1504-1509 (2015).
16. Kim, I.S., Yang, M.R., Lee, O.H., Kang, S.N.: Antioxidant activities of hot water extracts from various spices. *Int. J. Mol. Sci*., **12**, 4120-4131 (2011).
17. Kim, J.H., Park, J.H., Park, S.D., Choi, S.Y., Seong, J.H., Hoon, K.D.: Preparation and antioxidant activity of health drink with extract powders from safflower (Carthamus tinctorius L.) seed. *Kor. J. Food Sci*., **34**, 617-624 (2002).
18. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L.: Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4619-4626 (2001).
19. Kim, D.J., Jung, J.H., Kim, S.G., Lee, H.K., Lee, S.K., Hong, H.D., Lee, B.Y., Lee, O.H.: Antioxidants and Anti-obesity Activities of Hot Water and Ethanolic Extracts from *Cheonnyuncho (Opuntia humifusa)*. *Kor. J. Food Preserv*., **18**, 366-373 (2011).
20. Lee, S.K., Kim, S.K., Hong, E.Y., Chun, S.H., Son, I.C., Kim, D.I.: Effect of Harvest Time on the Several Phenolic Compounds and Fruit Quality of Grape Cultivars. *Kor. J. Plant Res*., **27**, 119-124 (2014).
21. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J.: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.,* **13**, 572-584 (2002).
22. Hsu, C.L., Yen, G.C.: Effects of Flavonoids and Phenolic Acids on the Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 8404-8410 (2007).
23. Suh, J.T., Choi, E.Y., Yoo, D.L., Kim, K.D., Lee, J.N., Hong, S.Y., Kim, S.J., Nam, J.H., Han, H.M., Kim, M.J.: Comparative Study of Biological Activities at Different Harvesting Times and New Varieties for Highland Culture of Gom-chwi. *Kor. J. Plant Res*., **28**, 391-399 (2015).

24. Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C.: Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LWT-Food Sci. Technol.*, **30**, 609-615 (1997).
25. Villaoñ, D., Fernández-Pachón, M.S., Moyá, M.L., Troncoso, A.M., Garca-Parrilla, M.C.: Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Tanlanta*., **71**, 230-235 (2007).
26. Nabasreem, D., Bratati, D.: Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chem.,* **101**, 471-474 (2007).
27. Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Mainland, C.M.: Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *J. Agric. Food Chem.,* **46**, 2686-2693 (1998).
28. Lee, Y.J., Lee, J.H., Kim, Y.H., Kim, J.H., Yu, S.Y., Kim, D.B., Lee, J.S., Cho, M.L., Cho, J.H., Kim, B.K., Lee, B.Y., Lee, O.H.: Assessment of the Pectolinarin Content and the Radical Scavenging-linked Antiobesity Activity of *Cirsium setidens* Nakai Extracts. *Food Sci. Biotechnol*., **24**, 2235-2243 (2015).
29. Sampson, N., Koziel, R., Zenzmaier, C., Bubendorf, L., Plas, E., Jansen-Drr P., Berger, P.: ROS signaling by NOX4 drives fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stroma. *Mol Endocrinol.*, **25**, 503-515 (2011).
30. Basuroy, S., Tcheranova, D., Bhattacharya, S., Leffler, C.W., Parfenova, H.: Nox4 NADPH oxidase-derived reactive oxygen species, via endogenous carbon monoxide, promote survival of brain endothelial cells during TNF-α-induced apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*., **300**, 256-265 (2011).