

## 참취(*Aster scaber* Thunb.) 추출물의 항산화 효과와 3T3-L1 지방전구세포에서의 지방분화 억제 효과

최준혁<sup>1</sup> · 박윤희<sup>1</sup> · 이인선<sup>1</sup> · 이삼빈<sup>1,2</sup> · 유미희<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>계명대학교 식품가공학 전공, <sup>2</sup>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화 연구(TMR)센터

### Antioxidant Activity and Inhibitory Effect of *Aster scaber* Thunb. Extract on Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells

Jun-Hyeok Choi<sup>1</sup>, Yun-Hee Park<sup>1</sup>, In-Seon Lee<sup>1</sup>, Sam-Pin Lee<sup>1,2</sup>, and Mi-Hee Yu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Keimyung University

<sup>2</sup>The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University

**Abstract** Clinical and preclinical trials of involving drugs with anti-obesity effects have focused on screening for herbal medicines suspected to have anti-obesity activities. In this study, an extract of *Aster scaber* Thunb., which was prepared in 80% methanol (ASE), was assessed for its total phenol content, total flavonoid content, antioxidant activity ability to scavenge the  $\alpha$ - $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl, 2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline]-6-sulfonic acid radical, and anti-adipogenic effects. The anti-adipogenic effect of ASE on the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes to adipocytes was investigated by assaying the suppression of adipocyte differentiation and lipid accumulation by using western blot analysis and the Oil Red-O assay, respectively. The staining results showed that ASE significantly inhibited 3T3-L1. Western blot analysis results showed that ASE decreased the levels of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ , and sterol regulatory element-binding protein 1c. These results demonstrate that ASE directly inhibits the differentiation of preadipocytes, and might be an important adjunct in the therapeutic efforts to reduce adipogenesis.

**Keywords:** anti-adipogenic activity, 3T3-L1, antioxidant activity, *Aster scaber* Thunb.

## 서 론

현대 산업사회에서는 서구화된 식생활, 내분비 장애, 유전적인 요인으로 인하여 전 세계적으로 비만이 심각한 질환으로 대두되고 있다(1). 비만은 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 야기되는 대사성 질환의 일종으로, 고혈압, 심혈관계 질환, 제 2형 당뇨병 및 각종 암등과 같은 대사성 질환의 발생 가능성을 증가시키는 요소로 지목 받고 있다(2). 또한 비만인의 경우 지방세포에서 기초 지방분해율(basal lipolysis)이 정상인에 비해 매우 증가되어 많은 양의 유리지방산이 만들어지고, 유리지방산이 증가되면 활성 산소종 reactive oxygen species (ROS) 및 초과산화물(superoxide,  $O_2^{\cdot-}$ )의 생산이 증가되어 인슐린 신호전달이 억제되며  $O_2^{\cdot-}$ 가 2차 전령인자로 작용하여 세포의 신호를 세포내로 연결하여 동맥경화증에 연관된 유전자나 혈관의 염증성 유전자의 발현을 증가시키고(3), 세포와 조직층에 해로운 독성을 일으켜 질병 유발의 원인이 된다(4-6). 최근 연구에 따르면 대사성 질환을 야기하는 주요 요인인 비만을 억제하기 위하여 식이 조절 요법, 에너지 소비 증가, 전지방 세포의 분화와 증식억제, 지방형성(adipogenesis) 억

제, 지방분해 등의 기전이 제안되고 있다(7). 지방세포는 에너지 항상성 유지 및 지질대사에 중요한 역할을 하고, 지방전구세포인 3T3-L1은 여러 호르몬과 다양한 전사인자들에 의해 지방세포로 분화되면서 세포 내 지방을 축적한다. 이러한 지방세포 형성(adipogenesis) 과정에 관여하는 중요한 인자로 peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )와 CCAAT-enhancer-binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ )가 있다(8,9). 이들은 분화후기에 발현되어 adipose-specific 유전자 발현을 활성화 함으로서 분화를 촉진시켜 분화과정을 완성하는데 관여한다. 아울러 C/EBP $\alpha$ 는 PPAR $\gamma$ 의 활성화 및 지속적인 유지와 함께 성숙한 지방세포 생성을 위한 insulin 감수성에 중요한 역할을 한다(10). 분화된 세포는 백색 지방세포에서 나타나는 triglyceride의 축적 등과 같은 형태적 특징과 더불어 PPAR $\gamma$ , fatty acid synthase (FAS), lipoprotein lipase (LPL), sterol response element binding protein (SREBP) 및 adipocyte-specific lipid binding protein (aP2) 등과 같은 지방세포 특이적인 유전자의 발현이 유발되는 생화학적 특징을 가진다(11). 따라서 효과적인 비만억제 및 비만과 관련된 대사성 질환의 치료를 위해서는 지방세포 특이적인 분비물질의 조절과 더불어 지방세포 분화과정에 관여하는 전사인자들의 활성을 억제하는 것이 중요하다.

참취(*Aster scaber* Thunb.)는 우리나라 전국 각지의 산야지에 흔히 자생하며 농가에서 재배하기도 하는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 백운초, 백산국, 동풍, 나물채, 암취 및 나물취라고도 한다. 해수, 이노, 보익, 방광염, 두통, 현기증 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(12). 참취의 생리활성에 관한 연구로는 일상적

\*Corresponding author: Mi-Hee Yu, Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea  
Tel: 82-53-580-5538  
Fax: 82-53-580-5538  
E-mail: yumh55@kmu.ac.kr  
Received January 30, 2013; revised March 7, 2013;  
accepted March 28, 2013

으로 쉽게 접촉하는 식품의 유전독성에 관한 연구(13)와 지방대사와 항산화에 미치는 영향(14), 고지혈증 예방효과(15) 등이 보고되고 있다. 이와 같이 참취에 관한 여러 가지 생리활성이 보고되고 있으며 그에 대한 결과가 주목을 받고 있다. 따라서 본 연구에서는 참취 추출물의 항산화 활성을 검정하였고, 지방전구세포인 3T3-L1 세포에서 insulin, dexamethasone 및 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 등의 분화 유도인자를 혼합 처리를 통해 인위적으로 지방세포의 분화를 유도한 후 adipogenesis 과정에 미치는 참취 추출물의 영향을 조사하였고, 이때 C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  등과 같은 adipogenic transcription factor들의 발현에 어떠한 변화가 유발되었는지를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 추출물의 제조

실험에 사용된 참취는 문경농가에서 재배하여 건조시킨 상태의 것을 제공받아 사용하였다. 먼저 시료 무게의 10배량의 (w/v)의 80% methanol로 24시간 동안 정치 배양하여 총 3회 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 3, Maidstone, England)를 사용하여 2회 여과하고 상등액은 rotary vacuum evaporator (UNI TRAP UT-1000, Eyela, Tokyo, Japan)로 55°C로 농축하여 사용하여 동결하여 사용하였다.

### 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(16)을 응용하여 측정하였다. 각 시료 추출물 1 mg을 증류수 1 mL에 녹이고, 10배 희석한 희석액 2 mL에 2배 희석한 Folin 시약 2 mL을 첨가하고 3분간 방치한 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 mL을 넣고 1시간 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer (UVIKON 922, Kontron Instrument, Zürich, Switzerland)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하여 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량은 Moren 등(17)의 방법에 의해 측정하였다. 각 시료 추출물 0.1 mL와 80% ethanol 0.9 mL을 혼합한 혼합물 0.5 mL에 10% aluminium nitrate와 1 M potassium acetate 0.1 mL 그리고 80% ethanol 4.3 mL을 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 흡광도를 표준물질로 사용한 quercetin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) 검량선과 비교하여 총 플라보노이드의 함량을 구하였다.

### 항산화 활성 측정

Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay는 Benzie와 Strain 방법(18)을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. 반응

액은 300 mM acetate buffer (pH 3.6)와 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)과 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 10:1:1의 비율로 실험 직전에 만들어 사용하였다. 반응액과 시료를 혼합하여 4분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 환원력은 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Sigma Chemical Co)로 표준곡선을 작성하여 추출물 1  $\mu$ g당 Fe<sup>2+</sup>  $\mu$ mole로 표시하였다.

$\alpha$ - $\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Chemical Co.) radical에 대한 각 시료의 환원력을 측정하기 위해 99% 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 800  $\mu$ L와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 200  $\mu$ L을 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(19). 이때 활성비교를 위하여 ascorbic acid를 사용하였다. 또한 7 mM 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma Chemical Co.)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS<sup>+</sup> 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 $\pm$ 0.02이 되게 phosphate buffer saline (PBS, pH 4)로 희석하였다. 희석된 용액 180  $\mu$ L에 sample 20  $\mu$ L를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리 라디칼 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC<sub>50</sub>값으로 나타내었다.

### 3T3-L1 지방전구세포의 배양 및 분화 유도 및 샘플처리

실험에 사용된 3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 배양 및 분화 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM)에 10% calf serum와 antibiotics를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 인큐베이터에서 배양하여 세포가 confluent 상태가 되면 trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 원심분리하여 세포를 모아서 3 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well의 밀도로 6 well에 분주한 후 100% confluency 상태에서 48시간 방치 후 DMEM에 10% FBS와 23 mg/mL IBMX (Sigma Chemical Co.), 5 mg/mL insulin (Sigma Chemical Co.), 1 mM dexamethasone (Sigma Chemical Co.) 이 첨가된 배지(MDI)를 처리하여 분화를 48시간 동안 유도하고 그 후 2일 마다 10% FBS DMEM 배지에 5 mg/mL의 insulin이 첨가된 배지를 교체해주었다. 시료의 처리는 분화유도 배지 첨가 시점부터 같이 처리하였다(Fig. 1).

### Oil-red-O 염색

참취 추출물 및 분획물의 지방세포 분화억제 활성을 검토하기 위하여 Oil red O staining을 시행하였다. Oil red O staining은 중성지방을 염색하는 방법으로 지방 세포 내 중성지방 축적 정도를 시각화할 수 있다. 3T3-L1 전구지방세포를 9일 동안 분화시킨 후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하

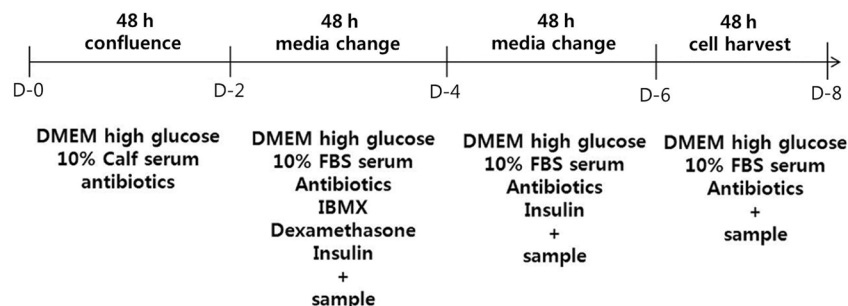


Fig. 1. Flowchart of 3T3-L1 differentiation protocol using differentiation medium. Cell differentiation was induced by changing the medium to DMEM containing 10% FBS, 23 mg/mL isobutylmethylxanthine (IBMX), 5 mg/mL insulin, 1 mM dexamethasone.

고 10% formaldehyde 용액으로 세포를 고정시켰다. 다시 PBS로 세척 후, Oil red O 용액을 첨가하여 30분간 실온에서 염색하고, Oil red O 용액을 제거한 후 증류수로 세척하여 건조시킨 다음 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. 또한, 흡광도 측정을 위하여 100% isopropyl alcohol로 염색된 지방구를 용출시켜 spectrophotometer (Spectra MAX M2, Molecular Device, Sunnyvale, California, USA)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Western blot법

참취 추출물 및 분획물의 지방세포 분화과정에서 발현하는 인자인 PPAR- $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$  단백질발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Western blot을 실시하였다. 먼저 샘플처리가 완료된 세포를 2-3회 PBS로 세척한 후 1 mL의 lysis buffer를 첨가, 30분-1시간 동안 용해시킨 후 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준화 한 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 정량하였다. 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 상등액은 단백질을 정량한 후 10% running gel과 4.5% stacking gel을 이용하여 125 V에서 SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SE260, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 실시하였다.

전기영동으로 분리한 단백질은 immobilon-P transfer membrane (PVDF transfer membrane, Port Washington, NY, USA)과 transfer buffer (20% methanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine)를 사용하여 350 mA에서 120분간 transfer시켰다. 단백질이 이동된 membrane은 fast green solution (Sigma Chemical Co.)으로 transfer의 유무를 확인한 후, 5% non-fat skim milk solution으로 blocking하였다. 4°C에서 일차 항체의 발현 정도를 검토하기 위하여 TST 용액에 1:1000으로 희석하여 24시간 반응시킨 후 TST로 3회 세척하였다. 계속하여 2차 항체를 2시간 반응시키고 다시 TST로 3회 세척하였다. 증류수로 세척하고 membrane에 ECL detection kit (WSE-7120S, ATTO Co. Tokyo, Japan)의 발색시약 I과 II를 1:1로 섞은 후에 혼합액을 도포하고, X-ray film (CP-G Plus, Agfa Healthcare Ltd, New Orleans, LA, USA)에 노출하여 현상한 후 film상의 band 농도를 관찰하였다.

### Real-time PCR법

Total RNA는 배양한 3T3-L1 지방전구세포를 TRI reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 분리하였다. 즉 배양된 세포에서 배지를 제거하고 PBS 10 mL로 두 번 세척한 후 TRI reagent를 처리하였다. 이것을 1.5 mL tube에 1 mL씩 담고 1-bromo-3-chloropropane을 200  $\mu$ L 첨가하여 30 초간 vortex 하여 원심분리(3,000 rpm, 15분, 4°C)하고, 상등액을 취해 새로운 tube에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 2시간 이상 방치하고 나서 원심분리(13,000 rpm, 15분, 4°C)한 후 상등액을 제거하였다. 침전물에 75% ethanol을 첨가하여 제거한 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수를 첨가하여 65°C 수조에서 10분간 반응시켜 침전물을 녹였다. 분리된 RNA는 UV/visible spectrophotometer (Biospec-1601, Shimadzu

Biotech, Kyoto, Japan)를 이용하여 정량하였다. 분리된 total RNA 2  $\mu$ g, RNA PCR kit을 혼합하여 42°C에서 90분간 반응시킨 후 70°C에서 10분간 가열하여 반응을 종결시켰다.

Total RNA를 역전사 시켜 생성된 cDNA는 C/EBP (TTGAAG-CACAATCGATCCATCC/GCACACTGCCATTGCACAAG), FAS (AGCACTGCCTTCGGTTCAGTC/AAGAGCTGTGGAGGCCACTTG)의 primer (Bioneer Co., Daejeon, Korea)들을 이용하여 Real-time PCR (Takara, Ohtsu, Japan)방법으로 증폭하였다. Real-time PCR의 반응은 2.5 U Taq polymerase, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP를 첨가하여 각각의 primer에 맞는 조건으로 실시하였다. Real-time PCR은 초기변성 95°C 30초, 변성은 95°C 5초, annealing은 60°C 15초, 신장반응은 72°C 10초로 하여 40 cycle을 진행했다. 용해 곡선은 55°C로 시작하여 95°C를 종말점으로 0.5°C씩 상승시키며 80번을 반응하여 원하는 형광 값을 검출하였다.

### 통계처리

실험결과는 SPSS™ (ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였고, 일원배치분산분석으로 비교하였으며 Duncan's multiple range test에 의해 각 실험군 간에 유의성을  $p < 0.05$  수준에서 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 참취 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물인 페놀성 화합물은 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소 단백질과 같은 거대 분자들과 결합하여 생리활성 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다 (20). 항산화 활성과 관련되어 생체 내 산소 free radical 반응이 생체조직의 노화나 질병에 영향을 미치며, 다양한 페놀성 물질들은 이러한 free radical 소거능이 우수하다고 보고되고 있다(21).

참취 추출물의 총폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량은 각각 57.07 $\pm$ 2.17, 54.62 $\pm$ 2.24  $\mu$ g/mg으로 나타났다(Table 1). 이는 Yoo 등(22)의 연구에서 국화과 식물인 톱풀, 좁개미취, 미국속부쟁이, 각시취, 울릉미역취, 수리취의 총폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량보다 더 높은 결과를 나타냈다. 폴리페놀 화합물이나 플라보노이드류는 여러 가지 식품에 분포되어 있으며 천연항산화제로써 작용이 가능할 수 있다는 연구들이 보고되고 있어 참취 추출물이 천연항산화제로써 우수한 작용을 나타낼 것으로 생각된다. 또한 Jeon 등(23)의 연구에 따르면 강원도 지역에서 재배된 70% 참취 추출물의 총 폴리페놀 화합물이나 플라보노이드 화합물의 함량이 각각 99.6 $\pm$ 2.1, 38.9 $\pm$ 3.9  $\mu$ g/mg로 나타났다. 작물의 재배환경에 대한 연구로는 재배환경에 따른 검정콩에 함유된 안토시아닌의 함량이 재배지역(24) 및 고도(25)에 따라 함량 변이가 있음이 보고된 바 있다. 또한 Woo 등(26)의 연구에 따르면 수수의 항산화 성분이 지역별로 차이가 있는 것으로 보고하였다. 본 실험에 이용한 참취는 경상북도 문경시 농가에서 재배된 시료로 강원도 지역에서 재배된 참취에 비해 플라보노이드 함량이 더 높은 것으로 확인되었다. 지역별 시료의 플라보노이드 함량 차이는

**Table 1. Contents of total polyphenols and flavonoids in methanol extracts from *Aster scaber* Thunb.**

Sample	Part used	Total polyphenols <sup>1)</sup> ( $\mu$ g/mg)	Total flavonoids <sup>2)</sup> ( $\mu$ g/mg)
<i>Aster scaber</i> Thunb.	Leaf	57.07 $\pm$ 2.17	54.62 $\pm$ 2.24

<sup>1)</sup>Micrograms of total polyphenol content/mg of plants based on tannic acid as standard.

<sup>2)</sup>Micrograms of total flavonoid content/mg of plants based on quercetin as standard.

**Table 2. Antioxidant activity of methanol extracts from *Aster scaber* Thunb. on ferric reducing/antioxidant power (FRAP) activity**

Sample	Part used	$\mu\text{M} \cdot \text{Fe}^{2+}/\text{mg}$
<i>Aster scaber</i> Thunb.	Leaf	57.07±2.17 <sup>1</sup>

FRAP value is expressed as  $\text{Fe}^{2+}$   $\mu\text{M}$  concentration, obtained from  $\text{FeSO}_4$  solution having an antioxidant capacity equivalent to that of the dilution of the *Aster scaber* Thunb.

<sup>1</sup>Values are means of triplicate determinations±SD.

지방세포의 분화 억제능에도 영향을 미칠 것으로 생각되며, 특히 플라보노이드 함량이 높은 문경 참취의 분화 억제능이 더 높을 것으로 생각된다. Kim 등(27)의 보고에 따르면 플라보노이드를 주성분으로 함유한 외송의 항고지혈증, 체중감소 효과, 1일 음식 섭취량 감소, 1일 체중 증가량 감소 등 체중 증가와 관련된 비만인자에 매우 직접적인 효과를 나타내었다고 보고하였다. 따라서 후후 참취의 플라보노이드 성분 규명을 통해 비만 억제 효과를 가지는 참취의 상품화를 위한 기초자료로 활용이 가능할 것으로 보인다.

**참취 추출물의 항산화 활성**

FRAP방법은 산화 및 환원 반응에 의한 메커니즘 즉 3가철이 2가철로 환원될 때 발생하는 청색 파장을 593 nm에서 측정하여 환원력을 계산하는 방법이다(18). 금속이온 인자(Fe, Cu, Co, Ni, Sn)는 산화 환원이 용이한 금속이나 이들의 금속염은 지질산화 과정에서 촉매로 작용 할 수 있다. 일부 식품에 함유되어 있는  $\text{Fe}^{2+}$  나  $\text{Cu}^{2+}$  등은 hydroxyl radical (-OH)과 superoxide radical ( $\text{O}_2^-$ ) 등의 생성을 촉진하여 식품의 지질산화를 가속화 시킨다. 이러한 금속이온인자에 대한 chelating 활성이 높을수록 지질산화 반응에 촉매작용을 감소시킬 수 있으며, free radical의 생성을 억제함

으로써 지질산화를 방지할 수 있는 능력을 측정하는 지표로 이용된다(28). 취나물의 chelating 활성을 측정한 결과  $520 \mu\text{M} \cdot \text{Fe}^{2+}/\text{mg}$  으로 나타났다(Table 2). 이는 Yoo 등(22)의 연구에서 국화과 식물인 톱풀, 좁게미취, 미국쑥부쟁이, 각시취, 울릉미역취, 수리취의 chelating 활성보다 다소 낮은 결과를 나타냈다. 일반적으로  $\text{Fe}^{2+}$  chelating 활성 효과는 페놀성 물질함량과 상관관계가 낮으며 금속이온을 제거하는 물질과 라디칼 제거 물질 간의 작용기작의 차이점에서 비롯된다는 연구(28)와 비슷한 결과를 나타내었다.

시료의 free radical 소거 활성 측정은 stable radical인 DPPH를 소거하는 항산화물질 활성을 측정하는 것으로 DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되는 것을 이용하여 항산화 물질을 검색하는데 이용되고 있다(29).

참취 추출물의 DPPH radical 소거능은 Table 3에 나타내었고, DPPH radical을 50% 저해하는 시료의 농도를  $\text{RC}_{50}$ 값으로 표기하였다. 참취 추출물은 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 21.14±0.75%, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 67.16±4.66%, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 93.30±3.92%로 농도 의존적으로 DPPH radical을 소거하였으며  $\text{RC}_{50}$ 값은 22.24±0.40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 이는 Jeon 등(23)의 참취 추출물과 용매 분획물의 항산화 활성 보고에서  $\text{RC}_{50}$ 값이 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났던 것과 비교하여 더욱 우수한 DPPH radical 소거능을 나타냈다. 이는 재배 지역에 따라 또는 추출 용매나 추출 조건에 따라 참취의 항산화 능에 차이가 나타나는 것으로 생각된다.

ABTS<sup>+</sup> 소거활성은 2-Azino-bis의 색을 띠는 양이온 라디칼의 감소에 근거하여 항산화력을 검사하고자 하는 시료와 표준물질인 Trolox의 값과 비교하여 항산화능을 측정하는 방법으로 추출물의 항산화력에 의해 ABTS<sup>+</sup>이 소거되어 청록색으로 탈색된 free radical의 제거 정도를 흡광도 값으로 나타내어 ABTS<sup>+</sup>의 소거활성능을 측정할 수 있고 탈색 반응이 1분 안에 종료되어 단시간에 측정이 가능하다(30).

**Table 3. Scavenging effects of BHA, methanol extracts from *Aster scaber* Thunb. on  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl radical (DPPH)**

Sample	Part used	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Scavenging effect (%)	$\text{RC}_{50}^{1)}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
<i>Astercaber</i> Thunb.	Leaf	10	21.14±0.93 <sup>2c</sup>	22.29±0.11
		25	67.16±0.64 <sup>b</sup>	
		50	93.30±0.10 <sup>a</sup>	
BHA <sup>3)</sup>		1	19.84±1.37 <sup>c</sup>	3.06±0.06
		2.5	45.59±0.78 <sup>b</sup>	
		5	75.18±0.72 <sup>a</sup>	

<sup>1</sup>)Concentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min after starting the reaction.

<sup>2</sup>)Values are means of triplicate determinations±SD.

<sup>3</sup>)*t*-Butylatedhydroxyanisole(BHA) were used as positive references.

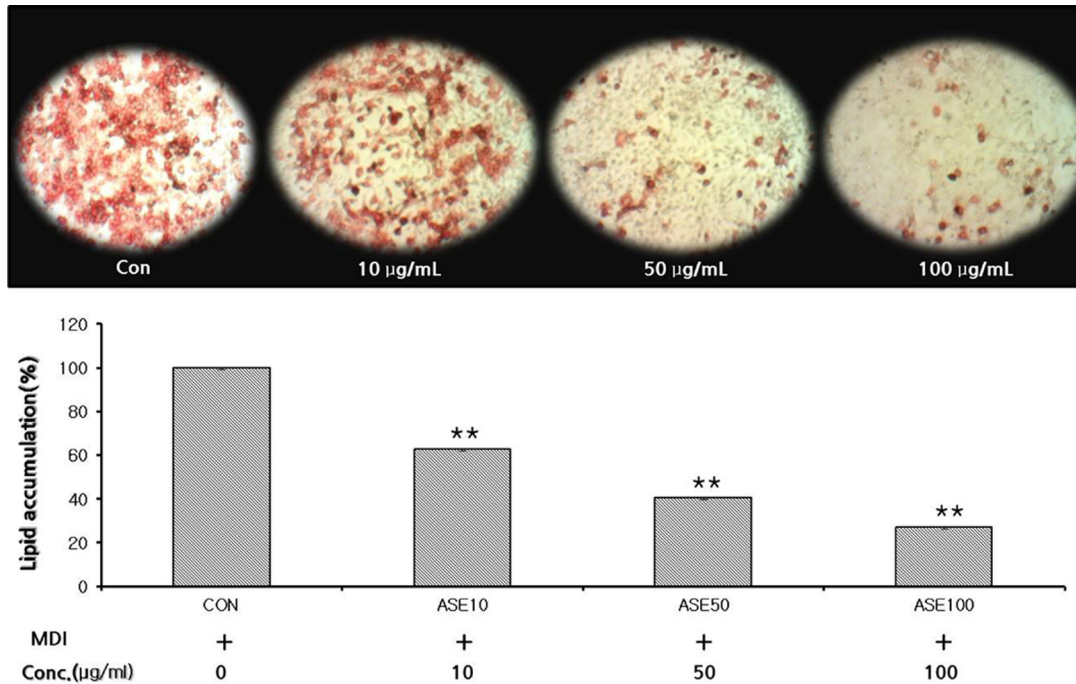
**Table 4. Scavenging effects of Trolox, methanol extracts from *Aster scaber* Thunb. on 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS<sup>+</sup>)**

Sample	Part used	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Scavenging effect (%)	$\text{RC}_{50}^{1)}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
<i>Astercaber</i> Thunb.	Leaf	10	11.39±2.10 <sup>(2)</sup>	53.19±1.61
		50	52.52±2.16 <sup>b</sup>	
		100	86.47±2.32 <sup>a</sup>	
Trolox <sup>3)</sup>		15	37.03±0.46 <sup>c</sup>	21.52±0.22
		30	77.45±0.66 <sup>b</sup>	
		60	93.74±0.07 <sup>a</sup>	

<sup>1</sup>)Concentration required for 50% reduction of ABTS<sup>+</sup> at 30 min after starting the reaction.

<sup>2</sup>)Values are means of triplicate determinations±SD.

<sup>3</sup>)Trolox were used as positive references.



**Fig. 2. Inhibitory effect of RC extract on the lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocyte.** Differentiating 3T3-L1 cells were treated every 2 days with extract and its fractions from *Aster scaber* Thunb. (10, 50, 100 µg/mL) for 9 days in adipocyte-induction media. Intracellular lipids were stained with Oil-Red-O. To determine the accumulation of lipid content, Oil-Red-O dye was dissolved in isopropanol and optical density detected at 510 nm. Results were presented as means±SD in triplicate. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs control. \*0: differentiated control. \*MDI: 5 mg/mL insulin, 1 mM dexamethasone, 23 µg/mL isobutylmethylxanthine (IBMX).

참취 추출물의 ABTS radical 소거능은 Table 4에 나타내었고, DPPH와 마찬가지로 RC<sub>50</sub>값으로 표기하였다. 참취 추출물은 10 µg/mL 농도에서 11.39±2.10%, 50 µg/mL 농도에서 52.52±2.16%, 100 µg/mL 농도에서 86.47±2.32%로 농도 의존적으로 DPPH radical을 소거하였으며 RC<sub>50</sub>값은 53.19±1.61 µg/mL로 나타났고 이는 DPPH와 유사한 경향을 나타냈다. 또한 국화과 식물인 톱풀, 좁개미취, 미국쑥부쟁이, 각시취, 울릉미역취, 수리취 보다 더 낮은 농도의 RC<sub>50</sub>값을 나타냈다. 이러한 결과는 참취가 다른 국화과 식물 중에서도 우수한 항산화 효과를 나타내어 고부가가치의 기능성 식품으로의 사용이 가능하리라 생각된다. 또한 참취의 우수한 항산화 효과는 비만으로 인한 인슐린 저항성을 개선시키고 비만인에서 증가된 활성산소에 의한 여러 합병증의 유발을 예방할 수 있음을 생각 할 수 있다(31).

이상의 결과로부터 경상북도 문경시에서 채배된 참취는 지역별, 품종별로 DPPH, ABTS radical을 제거하는 능력이 현저히 높은 것을 확인 할 수 있었다. 이는 플라보노이드 함량에서의 차이와 유사한 경향을 나타냈고, 참취의 뛰어난 항산화 효과와 더불어 비만 세포 분화에도 영향을 줄 수 있을지 확인해 보았다.

### 3T3-L1 지방전구세포의 lipid droplet 생성에 미치는 영향

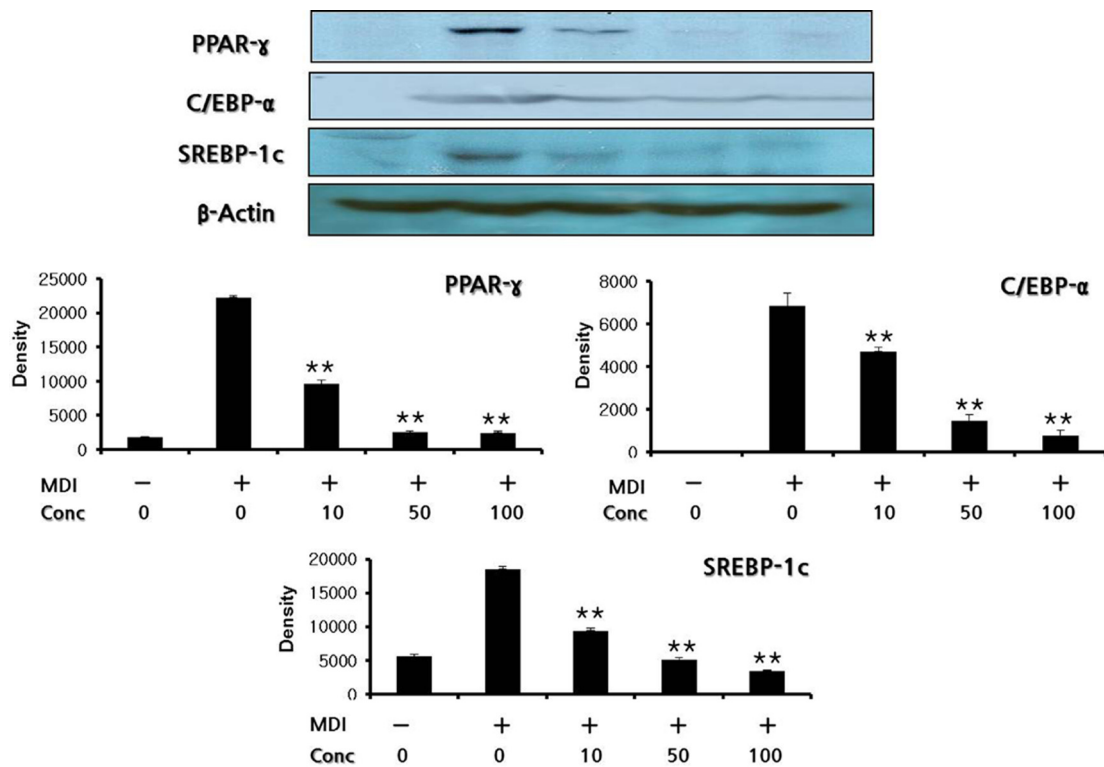
참취 추출물의 지방세포 분화억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 우선 세포독성 평가를 실시하였다. 3T3-L1 전구지방세포에 참취 추출물을 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리한 결과, 세포 생존율은 95% 이상으로 나타나 실험 농도에서는 세포독성이 전혀 나타나지 않았다(data not shown). 참취 추출물이 3T3-L1 전구지방세포의 지방구 형성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 전지방세포를 분화 유도 후 lipid droplet만 특이적으로 염색하는 Oil red O 염색시약을 이용하여 염색한 후 200배 배율의 현

미경으로 lipid droplet를 관찰하였다(Fig. 2). Lipid droplet는 phospholipid monolayer에 의해 둘러싸인 중성지방으로 precursor fibroblast에서부터 지방세포로의 분화과정에서 나타나며, PPAR $\gamma$ 와 같은 중요한 adipogenic transcription factor들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다(32). Oil red O로 염색하면 중성지방, cholesterol ester만이 염색되고, 그 외 유리지방산, 인지질은 염색이 되지 않는다. Lipid droplet이 축적된 부분은 대부분이 중성지방이기 때문에 염색이 가능하다. 따라서 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로의 분화과정에 나타나는 lipid droplet 생성에 참취 추출물이 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 각각의 시료를 적정 농도로 처리하여 분화를 유도한 후 Oil Red O 염색 전후로 구분하여 lipid droplet 생성 정도를 위상차 현미경으로 관찰하였다.

그 결과, 참취 추출물을 처리하지 않고 분화를 유도하였을 경우, 세포질 내 lipid droplet의 형성이 활발하게 유발되는 것으로 관찰되었고, 참취 추출물을 10, 50, 100 µg/mL로 처리하였을 때 농도 의존적으로 지방구 형성이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 실험 결과로 참취 추출물의 처리가 lipid droplet의 생성을 저해시켜 지방 축적을 억제하는 효과가 있음을 확인 하였다.

### CEBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , SREBP-1c 단백질 발현에 미치는 영향

Adipogenesis는 지방전구세포(preadipocyte)가 증식 및 분화되는 과정을 거쳐 성숙한 지방세포(adipocyte)로 되는 과정을 의미하고, 이 과정에서 지질 축적, 호르몬에 대한 민감성 변화가 초래되며, lipogenesis 및 lipolysis에 관여하는 일련의 유전자발현이 변화된다. 이들 유전자들의 발현은 궁극적으로 SREBP-1c, PPAR $\gamma$ 와 C/EBPs family 등의 전사인자에 의해 조절된다. C/EBP family와 PPAR $\gamma$ 는 호르몬에 의해 adipogenesis가 유도되는 과정에서 중요하게 작용하는 전사인자이다. Nuclear receptor superfamily에 속하



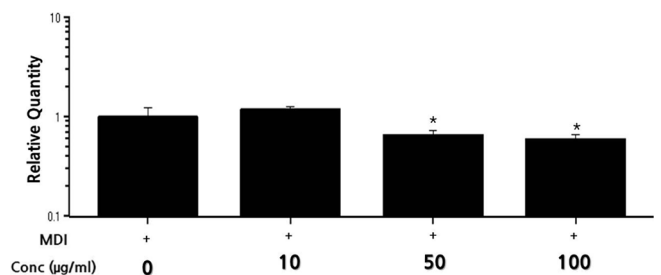
**Fig. 3. Effect of RC extract on CEBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , SREBP-1c protein expression in 3T3-L1 preadipocyte.** Differentiating 3T3-L1 cells were treated every 2 days with extract and its fractions from *Aster scaber* Thunb. (10, 50, 100  $\mu$ g/mL) for 9 days in adipocyte-induction media. At day 9, adipocytes protein was isolated and protein expressions of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  were determined by Western blot analysis. Each value represents the means $\pm$ SE of three independent experiments and is expressed relative to a control; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01. \*0: differentiated control. \*MDI: 5 mg/mL insulin, 1 mM dexamethasone, 23 mg/mL isobutyl-methylxanthine (IBMX).

는 PPAR $\gamma$ 는 adipogenesis를 총괄적으로 조절하는 역할을 하며, adipocyte로 분화된 상태를 유지하는데 필수적인 인자이다. 또한 C/EBP $\beta$ 는 PPAR $\gamma$  발현을 촉진시켜 preadipocyte의 초기 분화과정에서 중요한 역할을 하는 한편, C/EBP $\alpha$ 는 PPAR $\gamma$ 와의 강한 상승 작용을 통해 preadipocyte의 말기 분화 과정을 촉진한다(10).

따라서 참취 추출물이 adipogenic transcription factor의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 단백질 수준에서 확인하였다. Preadipocyte에서 분화를 유도하고 동시에 참취 추출물을 0, 10, 50, 100  $\mu$ g/mL 농도로 처리하고 FBS와 insulin 배지로 갈아 줄 때마다 시료를 같이 처리하여 분화 종료 후 단백질 발현을 조사한 결과는 Fig. 3와 같다. 시료를 처리하지 않은 분화 유도군에서는 PPAR $\gamma$  및 C/EBP $\alpha$ 의 발현이 현저하게 증가하는 것으로 나타났으며, 참취 추출물의 처리에 의해 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ , SREBP-1c의 단백질 발현이 감소함을 확인하였다. 이상의 결과를 살펴볼 때 참취 추출물은 3T3-L1 지방전구세포에서 adipogenic transcription factor인 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  및 SREBP-1c의 발현을 억제함으로써 lipid droplet의 생성을 감소시켜 지방세포로의 분화를 억제시킨 것으로 추정된다.

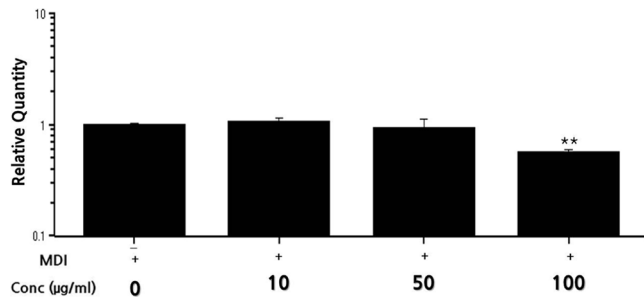
#### Adipogenic transcription factor 및 관련 유전자 발현에 미치는 영향

3T3-L1 전구지방세포의 분화억제 효과를 확인하기 위하여 참취 추출물을 이용하여 adipogenic transcription factor 및 관련 유전자들에 미치는 영향을 확인하기 위해 real-time PCR을 이용하여 나타낸 결과는 Fig. 4, 5와 같다. C/EBP $\alpha$ 는 PPAR $\gamma$ 의 활성화 및 지속적인 유지와 함께 성숙한 지방세포 생성을 위한 insulin



**Fig. 4. Effect of *Aster scaber* Thunb. on adipogenic transcription factor gene expression in 3T3-L1 preadipocyte.** Differentiating 3T3-L1 cells were treated with every 2 days with *Aster scaber* Thunb for 9 days in adipocyte-induction media. At day 9, adipocytes RNA was isolated and mRNA expressions of C/EBP $\alpha$  were determined by real-time PCR analysis. Results were presented as means $\pm$ SD in triplicate. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs control. \*0: differentiated control. \*MDI: 5 mg/mL insulin, 1 mM dexamethasone, 23 mg/mL isobutyl-methylxanthine (IBMX).

감수성에 중요한 역할을 한다(33). 분화된 세포는 백색지방세포에서 나타나는 triglyceride의 축적 등과 같은 형태적 특징과 더불어 fatty acid synthase (FAS)와 같은 지방세포 특이적인 유전자의 발현이 유발되는 생화학적 특징을 가진다(11). Wang 등(34)의 연구에 따르면 지방세포를 가지는 동물모델에서 C/EBP $\alpha$ 를 제거하였을 경우에 지방축적을 하지 못하는 것으로 보고 되었다. 따라서 효과적인 비만억제 및 비만과 관련된 대사성 질환의 치료를 위해서는 지방세포 분화과정에 관여하는 전사인자들의 활성을 억



**Fig. 5. Effect of *Aster scaber* Thunb. on FAS gene expression in 3T3-L1 preadipocyte.** Differentiating 3T3-L1 cells were treated every 2 days with *Aster scaber* Thunb for 9 days in adipocyte-induction media. At day 9, adipocytes RNA was isolated and mRNA expressions of FAS were determined by real-time PCR analysis. Results were presented as means±SD in triplicate. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs control. \*0: differentiated control. \*MDI: 5 mg/mL insulin, 1 mM dexamethasone, 23 mg/mL isobutyl-methylxanthine (IBMX).

제하는 것이 중요하다고 판단된다.

본 실험에서는, 분화를 유도한 control에서 C/EBP $\alpha$ , FAS의 mRNA 발현이 증가되는 것을 확인하였고, 참취 추출물을 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 그 발현이 감소됨을 확인하였다.

이상의 결과에서 참취 추출물은 3T3-L1 지방전구세포에서 adipogenic transcription factor인 C/EBP $\alpha$ 와 지방 합성에 관여하는 FAS의 발현을 억제함으로써 lipid droplet 및 triglyceride 생성을 감소시켜 지방세포로의 분화를 억제시킬 수 있는 것으로 생각된다. 따라서 향후 참취의 플라보노이드 성분의 분리·정제를 통해 지방세포의 분화억제에 영향을 미치는 성분을 규명함과 동시에 동물실험 등을 통해 이의 항비만 활성을 확인하고자 한다.

## 요 약

최근 연구에서 활성 산소 및 비만에 대한 유전자 발현이 비만과 노화를 촉진시키는 원인으로 주목 받고 있으며, 이를 통해 노화와 비만의 억제 체계를 규명하려는 다양한 방법들이 연구되고 있다. 본 연구에서는 우리나라 전국 각지의 산야지에 자생하며 농가에서 재배하기도 하는 국화과에 속하는 식물인 참취(*Aster scaber* Thunb.) 메탄올 추출물의 항산화력과 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포형성과정에 미치는 영향을 확인하였다. 참취 메탄올 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 57.07±2.17, 54.62±2.24 µg/mg으로 나타났다. 시료의 DPPH, ABTS radical 소거 활성을 측정된 결과 RC<sub>50</sub>값이 각각 22.24±0.40, 53.19±1.61 µg/mL로 우수한 항산화 효과를 나타냈다. 참취의 메탄올 추출물이 3T3-L1 전구지방세포에서 분화유도 물질(IBMx, DEXA, Insulin)과 함께 처리했을 때 지방구의 형성을 농도 의존적으로 감소시켰다. 또한 이들은 지방세포의 증식 및 분화되는 과정에서 발현되는 adipogenic transcription factor 및 관련 유전자의 단백질 발현과 mRNA 발현을 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 이상의 결과로 참취 메탄올 추출물을 이용하여 항비만에 우수한 효능을 가지는 기능성 식품 소재로서의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2012학년도 2학기 계명대학교 대학원 학생 학술연

구 장학금 및 대구경북과학기술원의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다(12-BD-0401).

## References

- Visscher TLS, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annu. Rev. Publ. Health* 22: 355-375 (2001)
- Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531-543 (2001)
- Park MJ. Recent advances in regulating energy homeostasis and obesity. *Korean J. Pediatr.* 48: 126-137 (2005)
- Ward PA. Mechanisms of endothelial cell injury. *J. Lab. Clin. Med.* 118: 421-425 (1991)
- Park SJ, Choi JH, Jung YS, Yu MH. Inhibitory effect of *Rumex crispus* L. fraction on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Korean J. Food. Sci. Technol.* 45: 90-96 (2013)
- Lee YJ, Han OT, Choi HS, Lee BY, Chung HJ, Lee OH. Antioxidant and anti-adipogenic effects of PineXol<sup>®</sup>. *Korean J. Food. Sci. Technol.* 45: 97-103 (2013)
- Wang YW, Jones PJ. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28: 941-955 (2004)
- Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 273: 30057-30060 (1998)
- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : A unified pathway. *Genes Dev.* 16: 22-26 (2002)
- Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Net. Rev. Mol. Cell Bio.* 7: 885-896 (2006)
- Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cell. *Cell* 7: 105-113 (1976)
- Kim TJ. *Korea Resources Plants IV*. Seoul National University Press, Seoul, Korea. p. 230 (1996)
- Ham SS, Hwangbo HJ, Cui CB, Lee EY, Cho MA, Lee DS. Suppressive effects of ethanol extract of *Aster scaber* root on genotoxicity. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 11: 446-471 (2001)
- Kim JH, Kim MK. Effect of dried leaf powders and ethanol extracts of *Perilla frutescens*, *Artemisia princeps* var. *orientalis* and *Aster scaber* on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean J. Nutr.* 32: 540-551 (1999)
- Lim SS, Lee JH. Effect of *Aster scaber* and *Ixeris dentata* on contractility and vasodilation of cardiovascular and endothelial cell in hyperlipidemic rat. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 300-307 (1997)
- Folin O, Denis W. On Phosphotungstic-phospho-molybdic compounds as colour reagents. *J. Biol. Chem.* 12: 239-249 (1912)
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109-114 (2000)
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70-76 (1996)
- Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. Components and their antioxidative of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujube* var. *inermis* Rehder. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38: 128-134 (2006)
- Roberfroid MB, Van Loo JA, Gibson GR. The bifidogenic nature of chicory insulin and its hydrolysis products. *J. Nutr.* 128: 11-19 (1998)
- Park CK, Cha JY, Jeon BS, Kim NM, Shim KH. Effects of chicory root water extracts on serum triglyceride and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) activity in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 518-524 (2000)
- Yoo MY, Kim SK, Yang JY. Characterization of an antioxidant from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32: 307-311 (2004)
- Jeon SM, Lee JY, Kim HW, Lee YM, Jang HH, Hwang KA, Kim HR, Park DS. Antioxidant activity of extracts and fractions from *Aster scaber*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 1197-1204

- (2012)
24. Yi MA, Kwon TW, Kim JS. Changes in isoflavone contents during maturation of soybean seed. *J. Food. Sci. Nutr.* 2: 255-258 (1997)
  25. Shin SO, Shin SH, Ha TJ, Lim SG, Choi KJ, Baek IY, Lee SC, Park KY. Soybean ecological response and seed quality according to altitude and seeding dates. *Korean J. Crop. Sci.* 54: 143-158 (2009)
  26. Woo KS, Lee JS, Kang JR, Ko JY, Song SB, Oh BG, Seo MC, Kwak DY, Nam MH. Effects of cultivated area on antioxidant compounds and antioxidant activities of sorghum (*Sorghum bivoor* L. Miench). *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* 40: 1512-1517 (2011)
  27. Kim SG, Choi JW, Park HJ, Lee SM, Jung HJ. Anti-hyperlipidemic effects of the flavonoid-rich fraction from the methanol extract of *Orostachy japonicas* in rats. *Kor. J. Pharmacogn.* 40: 51-58 (2009)
  28. Graf E, Eaton JW. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical Bio. Med.* 8: 61-69 (1990)
  29. An BJ, Lee JT, Lee SA, Kwak JH, Park JM, Lee JY, Son JH. Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korean *sanguisorbae officinalis* L. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47: 244-250 (2004)
  30. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extract from vegetable produced in Ullung Iand. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 233-240 (2005)
  31. Lim MR, Kang SM. The effect of functional foods on the abdominal obesity. *J. Cosmetological Sci.* 6: 95-104 (2010)
  32. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.* 14: 99-129 (1994)
  33. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Bi.* 16: 145-171 (2000)
  34. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GJ. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269: 1108-1112 (1995)