

## 좁은잎 엉겅퀴 추출물의 산화방지 활성 및 산화적 스트레스에 대한 PC12 세포 보호효과

장미란 · 김건희\*  
덕성여자대학교 식물자원연구소

### *Cirsium japonicum* Extracts Show Antioxidant Activity and PC12 Cell Protection against Oxidative Stress

Miran Jang and Gun-Hee Kim\*

Plant Resources Research Institute, Duksung Women's University

**Abstract** The phenolic compounds, antioxidant activity and neuronal cell protective effect of *Cirsium japonicum* extract were evaluated in this study. High performance liquid chromatography mass analysis showed that *C. japonicum* was composed of chlorogenic acid, linarin, and pectolarin. *C. japonicum* extract showed its antioxidant activity with half-maximal inhibitory concentrations of 567 and 130 µg/mL by DPPH and ABTS radical scavenging activity, respectively. The total antioxidant capacities of *C. japonicum* via DPPH, ABTS, and FRAP assays were 11.32, 100.15, and 12.76 µg/mL trolox equivalents, respectively. In addition, the neuroprotective effect of *C. japonicum* extract was investigated by measuring cell viability via MTT, LDH and DCF-DA assay using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-damaged PC12 cells. *C. japonicum* extract showed neuronal cell protective effects in a dose-dependent manner. These results indicated that *C. japonicum* extract has potent antioxidant and neuronal protective effects. Therefore, *C. japonicum* can be regarded as an effective and safe functional food resource as natural antioxidants, and may decrease the risk of neurodegenerative disorders.

**Keywords:** *Cirsium japonicum*, antioxidant activity, oxidative damage, PC12 cell, neuronal protective effect

## 서 론

알츠하이머병, 파킨슨병 및 헌팅턴병과 같은 퇴행성신경질환의 주요 원인은 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)으로 인한 산화적 스트레스 때문인 것으로 보고되고 있다. 과산화수소(hydrogen peroxide), 초과산화물음이온(superoxide anion), 수산화라디칼(hydroxyl radical) 등의 활성산소종에서 기인한 산화적 스트레스는 세포막의 지질, 단백질 및 DNA를 손상시켜 세포자살(apoptosis) 및 세포괴사(necrosis)를 유도하며 궁극적으로 퇴행성 신경장애를 유발한다고 보고되었다(1,2).

따라서 산화적 손상으로 인한 퇴행성 신경 질환의 예방을 위해서는 일상에서 비타민C, 비타민E 및 페놀성 화합물과 같은 천연 산화방지제의 섭취가 중요하게 대두되고 있다(3). 또한 이들 신경질환의 예방 및 치료는 장기간에 걸쳐 이루어져야 하기 때문에 독성이 없거나, 적어야 하며 또 다수에게 널리 보급될 수 있도록 국내 자생 천연물의 연구가 필요한 실정이다.

엉겅퀴(*Cirsium japonicum*)는 국화과 식물로서 예로부터 어린순을 식용으로 사용하고, 성숙한 것은 약용으로 이용해왔다. 엉겅퀴는 우리나라 전역의 산과 들에 자생하고 있으며 국내에 자

생하는 엉겅퀴속 식물로는 지느러미엉겅퀴, 큰 엉겅퀴, 좁은잎 엉겅퀴, 가시 엉겅퀴, 바늘 엉겅퀴 및 고려 엉겅퀴 등 13종, 6변종이 확인되었으며(4), 엉겅퀴에는 대표적으로 chlorogenic acid(5), hispidulin-7-neohesperidoside(6), linarin(6,7), pectolarin(6,8), luteolin(6,9) 및 apigenin(9)이 함유되어있다고 보고되었다.

엉겅퀴 중 밀크시슬(*Silybum marianum*)은 실리마린(silymarin)을 다량 함유하고 있으며 실리마린은 간과 신장에서 자유라디칼 소거활성을 통하여 강한 보호효과를 나타낸다고 알려져 있다(10). 따라서 국내 자생 엉겅퀴에 대한 연구는 간기능 개선, 혈중 지질 감소 및 심혈관계 질환 예방 등의 기능에 집중되어있으며(11), 산화방지 연구에 대하여도 엉겅퀴 잎 추출물(12,13), 엉겅퀴 뿌리 추출물(14,15), 엉겅퀴 부위별 추출물(16,17), 엉겅퀴 용매 분획물(18), 지역별 엉겅퀴 추출물(11) 등의 산화방지 활성이 다양하게 보고되었다. 하지만 엉겅퀴의 다양한 산화방지 활성 연구에 비하여 세포 내 산화방지 활성 및 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과에 대한 연구는 매우 미비한 실정이다. Liu 등(19)은 좁은잎 엉겅퀴(*Cirsium japonicum*)에서 획득한 luteolin이 당뇨로 인한 신경 손상에 보호효과를 나타낸다고 보고하였으며, Han 등(20)은 지느러미엉겅퀴(*Carduus crispus*)로부터 획득한 apigenin이 *in vitro* 및 *in vivo* 신경 보호효과를 나타낸다고 보고하였다. 따라서 엉겅퀴 추출물이 산화적 스트레스로 인한 신경세포 손상을 억제할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 강원도 평창군, 경기도 포천시, 전라남도 고흥군 및 제주도 제주시에 자생하는 엉겅퀴의 페놀성 화합물을 HPLC/MS를 통하여 분석하여, 페놀성 화합물을 다량 함유하고 있으며 선행연구를 통하여 산화방지 활성이 우수하였던 제주지

\*Corresponding author: Gun-Hee Kim, Department of Food and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea  
Tel: 82-2-901-8496  
Fax: 82-2-901-8474  
E-mail: ghkim@duksung.ac.kr  
Received December 8, 2015; revised March 22, 2016;  
accepted March 23, 2016

역의 엉겅퀴를 대상으로 산화방지 활성 및 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호활성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), potassium persulfate, sodium phosphate, ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>), sodium acetate, 4,6-tripryridyls-triazine, ascorbic acid, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dimethyl sulfoxide (DMSO), penicillin, streptomycin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide (MTT), phosphoric acid은 모두 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 세포 배양에 필요한 RPMI 1640 배지, fetal bovine serum (FBS)는 Welgene (Welgene, Daegu, Korea)에서 구입하였다. 엉겅퀴의 기능성 성분 분석에 사용한 표준물질 chlorogenic acid, luteolin 및 apigenin은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, linarin 및 pectolinarin은 ChemFaces (Wuhan, China)에서 구입하였다. Acetonitrile (ACN)은 HPLC 분석등급으로 Millipore (Bedford, MA, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

### 엉겅퀴 추출물 조제

본 연구에서 사용된 엉겅퀴(*Cirsium japonicum*)는 강원도 평창군, 경기도 포천시, 전라남도 고흥군, 제주도 제주시의 야산에 자생하는 것으로 2011년 7-8월중에 채집하였다. 채집한 엉겅퀴는 국립수목원 식물분류전문가에게 품종 및 학명에 대하여 확인 받았다. 실험에 사용한 모든 엉겅퀴는 채집 후 24시간 안에 종자와 뿌리부위를 제외한 지상부위를 세척 및 절단 과정을 거친 뒤 48시간 냉동건조(PVTE D 10R, Ilsin Lab, Yangju, Korea)하였다. 건조된 시료는 분쇄한 뒤 모두 냉동보관(-70°C)하였다가 실험에 사용하였다. 추출물은 엉겅퀴 시료 100 g에 중량대비 15배의 70% 에탄올을 가하고 70°C에서 6시간 환류추출하고, ADVANTEC paper (No. 6, ADVANTEC Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 여과하는 과정을 2번 거친 후 감압 농축기(EYELA N-1000, Riakikiai Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 농축한 후 DMSO에 100 mg/mL로 녹여 -70°C에 저장하였다가 실험에 적정농도로 희석하여 사용하였다.

### HPLC/MS 분석조건

엉겅퀴의 페놀성 화합물은 HPLC (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)와 MS spectrometer (Thermo scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 분석하였으며, waters symmetry C18 컬럼 (4.6×150 mm, 5 μm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였다. HPLC/MS 분석 조건은 Table 1에 나타내었다. 표준물질 chlorogenic acid, luteolin, apigenin, linarin 및 pectolinarin은 엉겅퀴 추출물과 머무름 시간을 비교 분석하여 확인하였으며, MS 분석을 통하여 분자량을 확인하여 정성분석 하였다. 분석에 사용된 표준물질은 내부 표준물질로 사용하여 정량 하였다.

### DPPH 라디칼 소거 활성

DPPH 라디칼 소거능은 농도별 시료에 0.2 mM DPPH 용액을 동일 비율로 가하여 잘 혼합하고, 암소에서 30분간 방치한 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다(21). DPPH 라디칼 소거 활성 결과는 첫째로 엉겅퀴 추출물을 trolox 당량 산화방지 활성으로 환산하여 나타내었고, 둘째로 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 농도(IC<sub>50</sub>)를 구하여 나타내었다.

### ABTS 라디칼 소거 활성

ABTS와 과황산칼륨(potassium persulfate)을 혼합하여 암소에 두면 ABTS 양이온이 생성되는데 추출물의 산화방지 물질과 반응하여 양이온이 소거됨으로써 특유의 청록색이 탈색되며 이의 흡광도를 측정하여 산화방지 능력을 측정할 수 있다(22). 7.4 mM ABTS 용액과 2.6 mM 과황산칼륨을 혼합하여 암소에서 약 24시간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도가 0.7±0.03가 되도록 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)으로 희석하여 사용하였다. 희석한 용액 950 μL에 농도별로 조제한 시료 50 μL를 첨가하여 잘 혼합하고 실온에 10분간 방치한 다음 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 라디칼의 제거활성으로 나타냈으며, 실험 결과는 첫째로 엉겅퀴 추출물을 trolox 당량 산화방지 활성으로 환산하여 나타내었고, 둘째로 ABTS 라디칼을 50% 소거하는 농도(IC<sub>50</sub>)를 구하여 나타내었다.

### 환원력 측정(FRAP)

FRAP (ferric reducing antioxidant power) 산화방지 활성은

**Table 1. HPLC condition for analysis of phenolic compounds from *Cirsium japonicum***

HPLC system	
Column	Waters symmetry C18 column (Waters, 4.6×150 mm, 5 μm)
Solvent	(A) acetonitrile (B) 0.02% (v/v) aqueous phosphoric acid Gradient: 87% solvent B for 6 min, 87-85% solvent B for the next 3 min, 85-81% solvent B for 17min, 81-72% solvent B for 28 min and a linear step from 72 to 87% solvent B for 12 min.
Column temperature	35°C
Wavelength	340 nm
Flow rate	1.0 mL/min
Mass system	
Polarity	ESI <sup>+</sup>
Capillary temperature	275°C
Voltage	Spray: 5 kV and capillary: 15 V
Mass scan range (m/z)	100-600

sodium acetate buffer (0.3 M, pH 3.6) 25 mL, 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ, Sigma) 2.5 mL, 20 mM FeCl<sub>3</sub> 2.5 mL 및 증류수 3 mL를 섞어 혼합물을 만든 후 실험에 사용하기 전까지 37°C로 유지하였다(23). 엉겅퀴 추출물은 실험에 적당한 농도로 희석하였다. 시료액 0.05 mL에 혼합물 1.5 mL를 가한 후 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 593 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 실험 결과는 엉겅퀴 추출물을 trolox 당량 산화방지 활성으로 환산하여 나타내었다.

#### Trolox 당량 산화방지 활성(총산화방지능)

결과 값은 10-200 µg/mL농도의 trolox를 사용하여 검량선을 작성하였으며 DPPH, ABTS 및 FRAP assay를 이용하여 500 µg/mL로 조제한 엉겅퀴 추출물을 trolox 당량 산화방지능으로 산출하였으며, 실험은 3회 반복 수행하여 평균값을 제시하였다.

#### 세포주 및 배양 조건

본 실험에 사용한 PC12 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 사용하였다. 배지는 5% FBS과 100 units/mL의 penicillin 및 100 µg/mL의 streptomycin을 첨가한 RPMI 1640 배지를 사용하였으며 10% CO<sub>2</sub>/90% air 배양기에 37°C로 24-48시간 배양하였다.

#### 세포 생존률 측정

과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도한 산화적 스트레스에 대한 PC12 세포 생존률은 MTT assay로 측정하였다(24). PC12 세포는 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하고 엉겅퀴 추출물을 농도별로 PC12 세포에 처리하여 24시간 동안 전 배양 후, 250 µM 과산화수소를 각각 3시간동안 처리하였다. 이 상태의 PC12 cell에 MTT stock solution을 처리하여 37°C에서 2시간 배양한 후, MTT solubilization solution 100 µL를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 마지막으로 흡광도는 microplate reader(Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 측정하였다. 양성대조군은 아스코르브산(ascorbic acid, 100 µg/mL)를 사용하였고, 세포 생존률은 대조구에 대한 % 값으로 나타냈다.

#### 세포막 손상 억제 효과

과산화수소로 유도한 산화적 스트레스에 대한 PC12 세포막 손상 억제효과는 엉겅퀴 추출물을 농도별로 PC12 세포에 처리하여 24시간 동안 전 배양 후, 250 µM 과산화수소를 처리하여 3시간 동안 배양한 다음, 원심분리(250×g, 5분)하여 100 µL의 상층액을 96 well plate로 옮긴 후 lactate dehydrogenase (LDH) kit (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하여 측정하였다(24). 양성대조군은 아스코르브산(100 µg/mL)를 사용하였다.

#### 활성세포종 생성률 측정

엉겅퀴 추출물이 PC12 세포의 산화적 손상에 대한 보호효과를 측정하기 위하여 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay를 실시하였다(24). PC12 세포는 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하고 엉겅퀴 추출물을 PC12 cell에 처리하여 24시간동안 전 배양시킨 후, 250 µM 과산화수소를 각각 3시간동안 처리하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음, PBS로 희석된 10 µM DCF-DA를 가하고, 40분간 배양하였다. PBS로 2회 washing한 다음 200 µM 과산화수소를 가하고, 3시간 뒤에 fluorescence microplate reader (Agilent Technologies, Inc.)를 사용하여, excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서 측정하였다. 양성대조군은 아스코르브산(100 µg/mL)를 사용하였다.

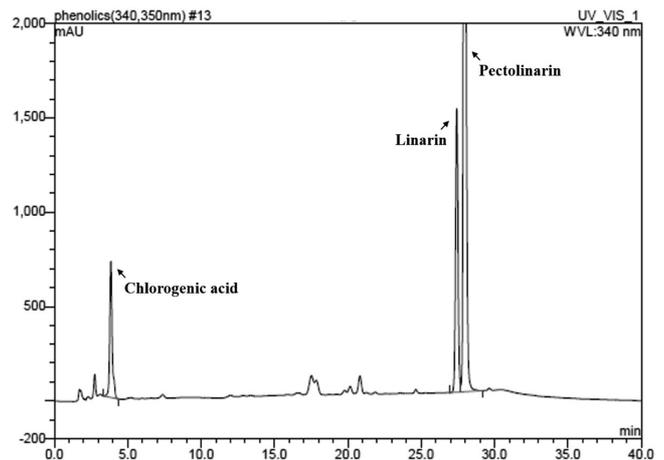


Fig. 1. HPLC Profiles of *Cirsium japonicum* from Jeju.

#### 통계처리

본 실험연구에서 얻어진 모든 측정치는 평균값과 표준편차로 나타내었고, 각 평균치간 차이에 대한 유의성은 SPSS program (ver. 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 ANOVA를 실시하고, Duncan's multiple range test로 각 군의 평균 차이에 대한 사후 검정을 하였으며, 통계적 유의성을 5% 수준에서 분석하였다.

## 결과 및 고찰

#### 엉겅퀴 추출물의 페놀성 화합물 함량 분석

같은 종의 식물이라도 자생하는 지역의 환경(기후, 토양, 지형 등)에 따라 함유하는 성분의 종류 및 함량이 다르며 그에 따른 생리활성이 달라진다(7,11). 또한, *Cirsium* 종은 외관상의 구분이 어려워 혼용하여 사용되는 경우가 많으며 그들의 생리활성은 각각 다를 수 있다. 따라서 자생 지역(환경)이 다른 같은 종의 식물이나 외관으로는 분류가 어려운 식물의 chromatographic fingerprint 기술 및 표준화 연구는 매우 중요하다(7).

본 연구에서는 HPLC/MS를 이용하여 강원도 평창군, 경기도 포천시, 전라남도 고흥군, 제주도 제주시에서 자생하는 엉겅퀴 추출물의 페놀성 화합물을 분석하였다. 엉겅퀴의 대표적인 페놀성 화합물로 보고된 chlorogenic acid(5), luteolin(6,9,19), apigenin(9,20), linarin (6,7), pectolinarin(6,8)을 사용하여 확인한 결과, luteolin 및 apigenin은 검출되지 않았으며, 실험에 사용된 엉겅퀴에서는 chlorogenic acid, linarin, pectolinarin이 확인되었다(Fig. 1).

중국 15개 지역에 자생하는 엉겅퀴(*Cirsium japonicum*)의 chromatographic fingerprint를 확인한 결과 15개 모든 엉겅퀴에 공통적으로 함유되어있는 성분은 linarin과 pectolinarin으로 보고되었으며(7), 본 연구에 사용된 4개 지역의 엉겅퀴에 모두 chlorogenic acid가 확인되어, chlorogenic acid, linarin 및 pectolinarin은 엉겅퀴의 대표적인 페놀성 화합물로 판단된다.

강원을 제외한 경기, 전남, 제주 지역의 엉겅퀴 추출물은 chlorogenic acid, linarin, pectolinarin을 모두 포함하고 있었으며 이중 제주지역의 엉겅퀴에 페놀산인 chlorogenic acid가 73.15 mg/g (dry weight basis)로 확인되었고, 플라보노이드 배당체인 linarin 및 pectolinarin이 각각 76.67 mg/g (dry weight basis), 12.98 mg/g (dry weight basis)으로 확인되었다(Table 2). 엉겅퀴의 대표 페놀성 화합물인 chlorogenic acid, linarin, pectolinarin 함량의 합이 가

**Table 2. The contents of phenolic compounds in *Cirsium japonicum* from Geonggi, Gangwon, Jeonnam and Jeju**

Collection regions	Phenolics contents (mg/g, dry weight basis)		
	Chlorogenic acid	Linarin	Pectolinarin
Geonggi	131.27±1.37	26.17±0.66	6.43±0.56
Gangwon	138.75±0.72	-	-
Jeonnam	53.57±1.33	35.83±0.28	8.07±0.73
Jeju	75.15±1.02	76.67±1.58	12.98±0.20

Values are mean±standard deviation (n=3).

장 큰 제주지역 엉겅퀴를 대상으로 페놀성 화합물 정량 분석, 산화방지 활성 및 산화적스트레스에 대한 신경세포 보호효과를 측정하였다.

앞으로 연구를 통해서 국내 자생하는 엉겅퀴의 종류를 확장하여 심도 있게 연구할 필요가 있으며, 본 연구 결과는 추후 HPLC 등의 크로마토그래피법을 이용한 국내 자생 엉겅퀴의 분류에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

**DPPH 라디칼 소거 활성**

DPPH 라디칼 소거 활성은 흡광도를 측정하여 trolox 당량으로 산화방지 활성을 환산하여 나타내었다. 엉겅퀴 추출물의 총산화방지능 및 IC<sub>50</sub>은 Table 3에 나타내었다. 엉겅퀴 추출물(500 µg/mL)의 DPPH 총산화방지능은 11.32 µg/mL trolox equivalent이었으며, IC<sub>50</sub>은 567 µg/mL으로 나타났다. Chon 등(5)에 연구에서 엉겅퀴 메탄올 추출물의 IC<sub>50</sub>은 350 µg/mL 정도로 나타났으며, Chon 등(14)의 연구에서 엉겅퀴 메탄올 추출물은 300-500 µg/mL 정도에서 50% 라디칼 소거활성을 나타내었다. 또한 Yin 등(14)의 연구에서 엉겅퀴 물 추출물의 IC<sub>50</sub>은 345 µg/mL, 엉겅퀴 메탄올 추출물의 IC<sub>50</sub>은 533 µg/mL으로 나타났다. 여러 연구를 통해 엉겅퀴 추출물의 DPPH 라디칼 소거능의 50% 저해 농도는 대략 300-500 µg/mL 범위로 판단된다. 이는 추출 용매, 추출 온도 등의 영향을 받아 각 연구 결과가 다소 차이가 있을 것으로 판단된다. 본 연구와 추출 조건이 유사한 Lee 등(12)의 연구에서는 엉겅퀴 에탄올 추출물 500 µg/mL에서 40% 정도 라디칼 소거활성을 나타내어 본 연구와 유사하였다.

**ABTS 라디칼 소거 활성**

엉겅퀴 추출물의 ABTS 총산화방지능은 trolox를 표준물질로 사용하여 ABTS 라디칼에 대한 소거활성을 흡광도로 측정하였으며, 총산화방지능 및 IC<sub>50</sub>은 Table 3에 나타내었다. 엉겅퀴 추출물 500 µg/mL 농도의 ABTS 총산화방지능은 100 µg/mL trolox equivalent이었으며, IC<sub>50</sub>은 130 µg/mL으로 나타났다. 엉겅퀴 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 DPPH 라디칼 소거능에 비하여 더 높게 나타났는데, 이는 추출물이 함유한 산화방지 물질의 특성과 두 라디칼의 특성에 의해 라디칼을 소거하는 활성에 차이가 생겼을 것으로 판단된다(25). ABTS 라디칼 소거능 측정법은 수소 공여 산화방지제(hydrogen-donating antioxidant)와 연쇄절단형 산화방지제(chain-breaking antioxidant)를 모두 측정할 수 있는 방법으로, 친수성 및 소수성에 모두 적용이 가능하여 DPPH 라디칼 소거활성보다 더 민감하게 나타난 것으로 판단된다(26).

**환원력 측정(FRAP)**

FRAP 총산화방지능은 trolox를 표준물질로 사용하여 흡광도로 측정하였으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 엉겅퀴 추출물

**Table 3. Antioxidant activities of *Cirsium japonicum* from Jeju**

Antioxidant assay	Trolox equivalent antioxidant capacity (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
DPPH	11.3±0.3	567
ABTS	100.2±2.4	130
FRAP	12.8±1.2	-

Values are mean±standard deviation (n=3).

500 µg/mL 농도의 FRAP 총산화방지능은 12.5 µg/mL trolox equivalent로 확인되었다. 식물에 포함되어 있는 다양한 페놀산 및 플라보노이드는 산화·환원에 영향을 미친다고 보고되었다(27). 본 연구와 마찬가지로 다양한 연구에서 엉겅퀴 추출물이 철 이온 환원력에 탁월한 효과가 있음이 입증되었다(11-15). 알츠하이머 치매는 신경세포가 자유라디칼 및 금속 이온에 의해 산화적 손상을 입어 발병하는데(28) 본 연구에서 엉겅퀴 추출물이 라디칼 소거능뿐만 아니라 철 이온의 환원에도 탁월한 효과가 있는 것으로 확인 되어 신경세포 내에서도 산화방지 효과가 기대되어 신경세포를 대상으로 산화적 스트레스에 대한 보호효과에 대하여 연구하였다.

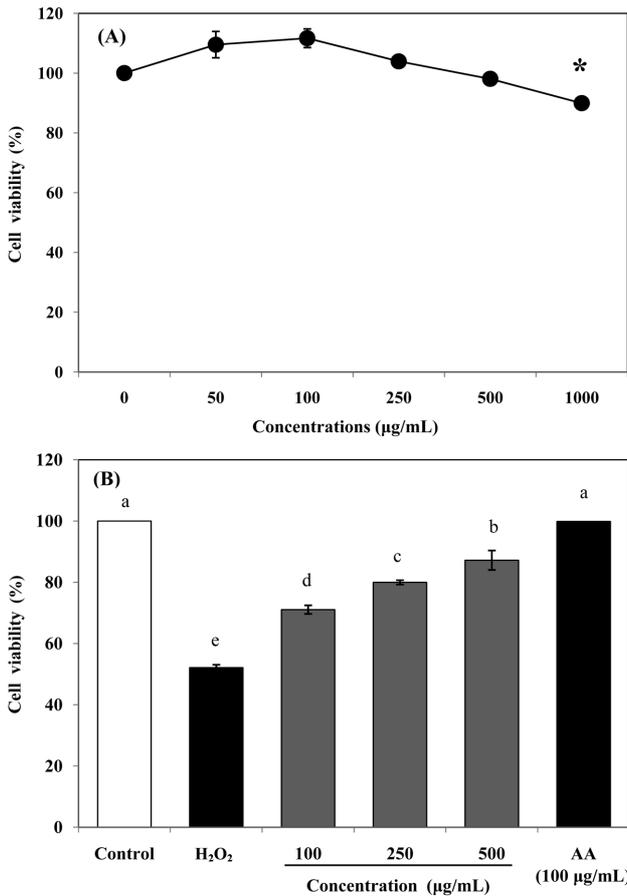
**PC 12 신경세포 보호효과**

MTT assay를 이용하여 엉겅퀴 추출물의 세포생존률 및 과산화수소로 유도된 산화적 스트레스 상태에서 PC12 신경세포에 대한 보호 효과를 측정된 결과는 Fig. 2과 같다. 엉겅퀴 추출물 100, 250, 500 µg/mL 농도로 처리하였을 때 각각 10, 12, 4% 정도 세포 생존률이 무처리군에 비하여 증가하는 것으로 나타났고, 1000 µg/mL 농도로 처리하였을 때 무처리군에 비하여 생존률이 유의적으로 감소한 것으로 나타남(p<0.05) 실험 농도로는 500 µg/mL 농도까지 채택하였다. 과산화수소를 처리한 처리군에서는 대조군 100% 대비 50%의 생존율을 나타냈고 과산화수소와 엉겅퀴 추출물을 함께 처리하였을 때 농도 의존적으로 신경세포 보호효과가 증가하였다(p<0.05).

신경세포의 경우 특이적인 전기적 신호전달을 위해 상대적으로 많은 지방질성분을 함유하고 있어 산화적 스트레스에 매우 취약한 것으로 알려져 있다(29). 따라서 신경세포 보호효과를 측정하기 위한 또 하나의 방법으로 LDH assay를 이용하였으며, 과산화수소로 유도된 신경세포막 손상에 대한 엉겅퀴 추출물의 보호 효과를 확인하였다(Fig. 3). 세포 괴사와 같은 세포사멸이 일어날 때 세포막이 손상되면 LDH가 방출되는데(30), 대조군의 LDH 방출량은 10% 정도인데 반해 과산화수소를 처리한 시료에서는 52%의 방출량을 보여 과산화수소에 의해 LDH 방출량이 약 42% 정도 증가하였다. 과산화수소와 엉겅퀴 추출물을 함께 처리하였을 때 농도 의존적으로 LDH 방출량이 감소하여 신경세포 보호효과가 증가하는 것을 확인하였다(p<0.05). 산화적 독성에 의한 신경세포의 사멸은 퇴행성 신경계 질환을 유발하며 천연 산화방지제인 플라보노이드와 같은 페놀성 화합물 등은 산화적 독성에 대한 신경세포 보호효과가 뛰어난 것으로 보고되고 있다(31).

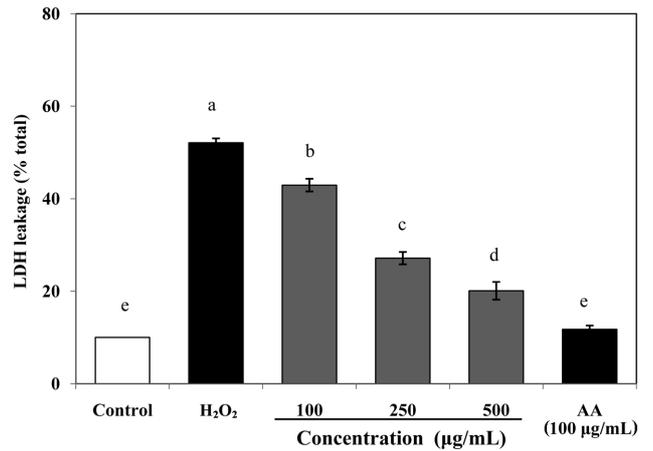
**세포 내 활성산소종 생성률 측정**

엉겅퀴 추출물이 과산화수소에 의해 유도된 PC12 세포 내 활성산소종 생성 저해 활성을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 과산화수소를 처리한 처리군에서는 대조군 100% 대비 120%의 DCF를 형성했고 과산화수소와 엉겅퀴 추출물을 처리하였을 때 농도 의존적으로 과산화수소 처리구에 비해 산화적 스트레스의 감소

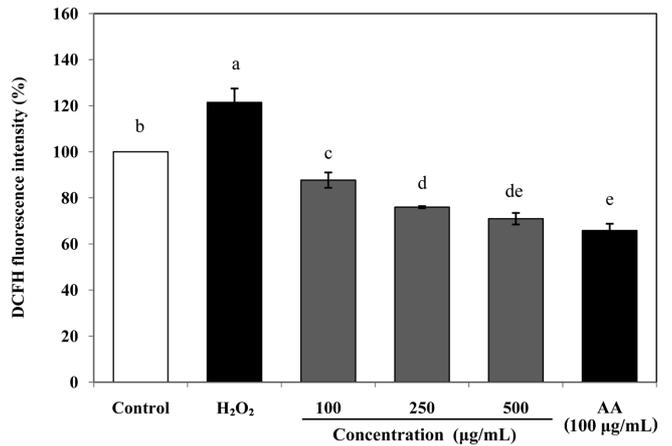


**Fig. 2. Effect of *Crisium japonicum* of Jeju on viability of PC12 cells.** Effect of *Crisium japonicum* of Jeju on viability of PC12 cells (A) and the cells damaged by oxidative stress of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) by MTT assay. Positive control used ascorbic acid (AA, 100 µg/mL). \**p*<0.05, significantly different as compared to the control. Each bar represents mean±standard deviation (*n*=3). Letters above bars indicate significant differences according to Duncan's multiple range test (*p*<0.05).

효과를 보였다(*p*<0.05). 아스코르브산을 동시에 처리한 처리군에서는 66%로 약 54%정도의 산화적 스트레스 감소 효과를 보였다. 영경귀 추출물(500 µg/mL)은 양성 대조군 아스코르브산(100 µg/mL)와 통계적으로 유사한 활성산소종 생성률을 나타내어 우수한 산화적 스트레스 감소 효과를 나타냈다(*p*<0.05). 이는 영경귀에 함유되어 있는 산화방지 물질인 chlorogenic acid, linarin 및 pectolinarin과 같은 페놀성 화합물에 의한 것으로 판단된다. Li 등(32)는 chlorogenic acid가 methylmercury로 산화적 독성을 유도한 PC12 신경세포에 대하여 세포자살 저해 및 신경세포 보호효과를 나타낸다고 보고하였다. 또한 커피에 있는 chlorogenic acid는 glutamate로 인한 독성에 대하여 뉴런(neuron) 보호효과가 보고되었다(33). Lou 등(34)은 linarin이 amyloid-β로 산화적 독성을 유도한 PC12 신경세포의 세포자살 저해 및 보호효과를 나타낸다고 보고하였다. 이처럼 영경귀가 함유한 각각의 산화방지 페놀성 화합물의 신경세포 보호활성 때문에 영경귀 추출물이 뛰어난 산화방지 활성 및 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호활성을 나타내는 것으로 판단된다. 추후 연구에서는 영경귀 추출물 및 각각의 페놀성 화합물의 세포내 산화방지 메커니즘 및 세포사멸 기전에 대하여 분자생물학적인 연구가 이어져야 할 것으로 판단된다.



**Fig. 3. Protective effect of extract of *Cirsium japonicum* of Jeju on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced membrane damage in PC12 cells.** Positive control used ascorbic acid (AA, 100 µg/mL). Each bar represents mean±standard deviation (*n*=3). Letters above bars indicate significant differences according to Duncan's multiple range test (*p*<0.05).



**Fig. 4. Effect of *Crisium japonicum* of Jeju on reactive oxygen species in PC 12 cells damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress.** Positive control used ascorbic acid (AA, 100 µg/mL). Each bar represents mean±standard deviation (*n*=3). Letters above bars indicate significant differences according to Duncan's multiple range test (*p*<0.05).

## 요 약

HPLC/MS를 이용하여 국내 자생 영경귀(*Cirsium japonicum*)의 페놀성 화합물을 분석한 결과 제주지역 영경귀가 가장 많은 페놀성 화합물을 함유하고 있었으며, chlorogenic acid가 73.15 mg/g dry weight, linarin이 76.67 mg/g dry weight 그리고 pectolinarin이 12.98 mg/g dry weight으로 확인되었다. 영경귀의 기능성 식품로서의 가치를 확인하기 위하여 산화방지 활성 및 신경세포 보호효과를 평가한 결과 DPPH, ABTS 및 FRAP assay에서 영경귀의 강력한 산화방지 활성이 나타났다. 영경귀 추출물이 DPPH 및 ABTS 라디칼의 50%를 저해하는 농도는 각각 567 µg/mL와 130 µg/mL로 나타났다. DPPH, ABTS, FRAP법을 통한 총산화방지능은 각각 11.32, 100.15, 12.76 µg/mL trolox equivalents 나타났다. 과산화수소로 산화적 손상을 유도한 PC12 세포에 대하여 MTT와 LDH assay를 이용하여 세포생존률을 측정된 결과 농도

의존적으로 세포 보호 활성이 나타났으며, 마찬가지로 활성산소종 생성률을 측정한 결과 농도 의존적으로 활성산소종 생성이 감소되어 세포 보호활성이 확인되었다. 본 연구를 통하여 엉겅퀴의 우수한 산화방지 활성 및 신경세포 보호효과가 검증되었다. 따라서 엉겅퀴는 안전한 식품 재료로서 꾸준히 섭취하였을 때 천연 산화방지제로 작용하여 신경퇴행을 예방함으로써 알츠하이머병, 파킨슨병 및 헌팅턴병 등의 질병 위험을 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

### 감사의 글

본 연구는 덕성여자대학교 2015년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

### References

- Lu YH, Su MY, Huang HY, Li L, Yuan CG. Protective effects of the citrus flavanones to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Neurosci. Lett.* 484: 6-11 (2010)
- Esposito E, Rotilio D, Matteo VD, Giulio CD, Cacchio M, Algeri S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol. Aging* 23: 719-735 (2002)
- Jeong CH, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Kim DO, Heo HJ. Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using *in vitro* model system. *Food Chem.* 125: 417-422 (2011)
- Jang MR, Park HJ, Hong EY, Kim GH. Comparison of the antibacterial activity of domestic *Cirsium japonicum* collected from different regions. *Korean J. Food Cook. Sci.* 30: 278-283 (2014)
- Chon SU, Kim YM, Kim DK, He BG, Cho JY. Phytotoxic effect, DPPH radical scavenging activity and chlorogenic acid level of methanol extracts from aerial parts of several Korean salad plants. *Korean J. Plant Resources* 19: 405-410 (2006)
- Ganzer M, Pocher P, Stuppner H. Differentiation of *Cirsium japonicum* and *C. setosum* by TLC and HPLC-MS. *Phytochem. Anal.* 16: 205-209 (2005)
- Ge H, Turhong M, Abudkrem M, Tang Y. Fingerprint analysis of *Cirsium japonicum* DC. using high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Anal.* 3: 278-284 (2013)
- Jeong DM, Jung HA, Choi JS. Comparative antioxidant activity and HPLC profiles of some selected Korean thistles. *Arch. Pharm. Res.* 31: 28-33 (2008)
- Kim SJ, Kim GH. Identification for flavones in different parts of *Cirsium japonicum*. *J. Food. Sci. Nutr.* 8: 330-335 (2003)
- Greenlee H, Abascal K, Yarnell E, Ladas E. Clinical applications of *Silybum marianum* in oncology. *Integr. Cancer. Ther.* 6: 158-165 (2007)
- Jang MR, Hong EY, Cheong JH, Kim GH. Antioxidative components and activity of domestic *Cirsium japonicum* extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 739-744 (2012)
- Lee JH, Choi SI, Lee YS, Kim GH. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extract from leaves of *Cirsium japonicum*. *Food Sci. Biotech.* 17: 38-45 (2008)
- Yin Y, Heo SI, Wang MH. Antioxidant and anticancer activities of methanol and water extracts from leaves of *Cirsium japonicum*. *J. Appl. Biol. Chem.* 51: 160-164 (2008)
- Chon SU, Kim TS, Shin JS, Boo HO. Antioxidant activities of methanol extracts from root parts of Korean salad plants. *Korean J. Plant Res.* 21: 413-419 (2008)
- Yin J, Heo SI, Wang MH. Antioxidant and antidiabetic activities of extracts from *Cirsium japonicum* roots. *Nutr. Res. Pract.* 2: 247-251 (2008)
- Kim EM, Won SI. Functional Composition and antioxidative activity from different organs of native *Cirsium* and *Carduus* genera. *Korean J. Food Cook. Sci.* 25: 406-414 (2009)
- Mok JY, Kang HJ, Cho JK, Jeon IH, Kim HS, Park JM, Jeong SI, Shim JS, Jang SI. Antioxidative and anti-inflammatory effects of extracts from different organs of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*. *Kor. J. Herbol.* 26: 39-47 (2011)
- Lee HK, Kim JS, Kim NY, Kim MJ, Park SU, Yu CY. Antioxidant, antimutagenicity and anticancer activities of extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* KITAMURA. *J. Med. Crop Sci.* 11: 53-61 (2003)
- Liu Y, Tia X, Gou L, Sun L, Ling X, Yin X. Luteolin attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Brain Res. Bull.* 94: 23-29 (2013)
- Han JY, Ahn SY, Kim CS, Yoo SK, Kim SK, Kim HC, Hong JT, Oh KW. Protection of apigenin against kainate-induced excitotoxicity by anti-oxidative effects. *Biol. Pharm. Bull.* 35: 1440-1446 (2012)
- Li G, Min BS, Zheng C, Lee J, OW SR, Ahn KS, Lee BK. Neuroprotective and free radical scavenging activities of phenolic compounds from *Hovenia dulcis*. *Arch. Pharm. Res.* 28: 804-809 (2005)
- Braca A, Politi M, Sanogo R, Sanou H, Morelli I, Pizza C, Tommasi ND. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) leaves. *J. Agr. Food Chem.* 51: 6689-6695 (2003)
- Wojdyło A, Oszmiański J, Czemyers R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105: 940-949 (2007)
- Heo HJ, Cho HY, Hong B, Kim HK, Kim EK, Kim BG, Shin DH. Protective effect of 4',5-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against Aβ-induced oxidative stress in PC12 cells. *Amyloid* 8: 194-201 (2001)
- Prior RL, Xu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agr. Food Chem.* 53: 4290-4302 (2005)
- Kwak JH, Choi GN, Park JH, Kim JH, Jeong HR, Jeong CH, Heo HJ. Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. *J. Agr. Life Sci.* 44: 57-66 (2010)
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Paganga Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio. Med.* 20: 933-956 (1996)
- Choi DY, Lee YJ, Hong JT, Lee HJ. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 10: 144-153 (2011)
- Heo HJ, Choi SJ, Choi SG, Shin DH, Lee JM, Lee CY. Effect of banana, orange, and apple on oxidative stress-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J. Food Sci.* 73: H28-32 (2008)
- Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J. Neurosci. Meth.* 96: 147-152 (2000)
- Zhao B. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* 34: 630-638 (2009)
- Li Y, Shi W, Li Y, Zhou Y, Hua X, Song C, Ma H, Wang C, Li Y. Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. *Environ. Toxicol. Phar.* 26: 13-21 (2008)
- Mikami Y, Yamazawa M. Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Sci.* 139: 69-74 (2015)
- Lou H, Fan P, Perez RG, Lou H. Neuroprotective effects of linarin through activation of the PI3K/Akt pathway in amyloid-β-induced neuronal cell death. *Bioorgan. Med. Chem.* 19: 4021-4027 (2011)