

Antioxidant Activity and Protective Effects of *Cirsium japonicum* against Damaged Mouse Liver Cell (BNL CL.2)

Seonjeong Kim¹, Seungmi Kang¹, Keonhee Ko² and Sanghae Nam^{1*}

¹Division of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea

²Gyeongnam Oriental Medicinal Herb Institute, Sancheong-gun, Gyeongnam-do 52215, Korea

Received January 26, 2017 / Revised March 21, 2017 / Accepted April 3, 2017

We analyzed the content of total phenolic and silymarin compounds of *Cirsium japonicum* (CJ), and its antioxidant activities and Liver protective effects were compared with those of *Silybum marianum* (SM). The total phenolic content in the aerial part (97.22 ± 5.51 mg/g) of CJ is higher than that in the underground part (85.32 ± 3.06 mg/g). The total silymarin content of CJ was 55.56% of SM, with the underground part (0.47 ± 0.03 mg/g) having higher content than the aerial part (0.18 ± 0.02 mg/g). The antioxidant activity of CJ was generally slightly lower than that of milk thistle, and the underground part of CJ generally had higher activity compared to the aerial part. When CJ extracts were processed at 1 mg/ml, DPPH activities were 83.76 ± 0.60 and $88.28 \pm 0.17\%$, and FRAP activities were 77.63 ± 0.70 and $82.83 \pm 0.39\%$ for extracts from aerial part and underground part, respectively. ABTS activities were 68.60 ± 1.24 and $63.41 \pm 0.57\%$ for underground and aerial part respectively when extracts were processed at 0.1 mg/ml. The Liver protective effects of CJ were higher in the extracts from underground part compared to the aerial part, Liver cells were damaged by treating them with *t*-BHP, H₂O₂ and Ethanol, and then they were treated with 0.2 mg/ml CJ extracts. The survival rates of the damaged liver cells were 49.58 ± 0.34 , 76.87 ± 1.10 and $71.73 \pm 0.58\%$ respectively, which were higher than the cells not treated with extracts.

Key words : Antioxidant, *Cirsium japonicum*, liver protective, silymarin, *Silybum marianum*

서론

간은 인체에서 가장 큰 장기로서 물질생성 및 합성, 해독작용, 호르몬 분해 및 대사기능, 영양소 저장 등의 역할을 담당하고 있다. 통각신경이 발달하지 않아 손상이 되어도 통증을 느끼지 못하여 '침묵의 장기'라고도 불린다[3, 21]. 따라서 간의 통증을 느끼게 되면 간 손상이 상당부분 진행되어 회복이 불가능하므로 사전에 간기능을 유지하고 간손상을 예방하는 것이 중요하다. 2015년 통계청에서 발표한 자료에 따르면 간질환은 우리나라 주요 사망원인 중 8위에 해당하며 남성 사망원인의 7위에 해당하는 것으로 나타났다. 연령별 3대 사인 중 간질환이 사회활동이 왕성한 40대에서 암, 자살 다음으로 주요 사망원인으로 보고되었다[22].

따라서 간손상을 예방 및 치료하기 위해 천연물로부터 간손상 개선 효과가 있는 기능성 식품소재를 발굴하고자 하는 노력이 지속적으로 이루어지고 있다[16]. 현재 임상적으로 사

용되고 있는 간질환 예방 효과가 보고된 기능성식품 소재는 서양영경귀(*Silybum marianum*)의 씨앗에서 분리한 silymarin 이 있다. Silymarin은 polyphenolic flavonolignan으로서 silybin, isosilybin, silydianin, silycristin, taxifolin이 포함되어 있으며 씨앗에 주로 함유되어 있다. 서양영경귀는 밀크시슬(milk thistle) 또는 흰무늬 영경귀라고도 불리며 독성으로부터 간세포 손상을 보호할 뿐 아니라 알코올성 간경화, 항염증 작용 및 항산화 작용 등의 약리효과가 있다고 보고되고 있다[4, 8, 12].

영경귀(*Cirsium japonicum*)는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 가시나물, 향가새라고도 불린다. 주로 북반구 온대지역에서 자생하며, 우리나라에서는 13종 6변종 1품종이 산야에 자생하고 있다. 한방에서는 지상부를 대계초, 지하부를 대계근이라 하여 사용되어 왔다. 주로 봄에 가시가 연한 줄기와 어린순을 채취하여 살짝 데쳐서 나물이나 국으로 이용하고, 여름 및 가을 개화기 때 지상부를 채취하며, 지하부는 가을철에 채취해 말려서 사용하며 지혈, 경혈, 소종의 효능이 있어서 토혈, 노혈, 간염, 대하 및 고혈압 등의 치료에 활용해왔다[7, 19, 24]. 생리활성이 뛰어난 apigenin, luteolin, myricetin, kaempferol, pectolarin을 포함한 약 78종의 flavonoid가 확인되었으며 apigenin은 암예방 및 신경보호효과, 항염증, 항균작용 등에 효과가 있으며[18] 지질과산화물 억제제이고 glutathione reductase의 활성을 증가시켜 알코올 해독작용을 촉진시키는

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3274, Fax : +82-55-751-3279

E-mail : shnam@gntech.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

간 보호작용 효과가 있다고 보고되고 있다[9].

본 연구에서는 고시형 기능성 원료로 인정받은 서양영경귀와 국내 자생 영경귀의 부위별 silymarin 분석 및 생리활성을 연구하여 두 시료의 비교를 통해 국내에서 자생하는 영경귀의 기능성 식품소재로 활용가능성에 대한 기초자료로 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출

본 실험에 사용된 BNL CL2는 한국세포주은행으로부터 구입하였으며, 사용된 시약 중 Folin-Ciocalteu phenol reagent, gallic acid, sodium carbonate, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), potassium persulfate, PBS buffer (phosphate buffered saline, pH 7.4), 2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), sodium acetate, iron (III) chloride, BHA, α -tocopherol, 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone, insulin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Oil red O, *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)는 Sigma Chemical Co. (St, Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (P/S), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) Gibco Co. (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하였다.

본 실험에 사용된 영경귀는 제천한방약초 및 동의약초 등에서 구입하였으며, 서양영경귀는 평택약초농원에서 건조 및 뿌리를 구입하여 사용하였다. 환류냉각장치를 부착한 3 L round flask에 분쇄한 영경귀 및 서양영경귀를 부위별로 각각 50 g 넣은 후 2 l의 메탄올을 가하여 65±1°C에서 6시간씩 2회 반복 추출하였으며 그 여과액을 합하였다. 모든 시료는 여과액을 60°C 이하에서 감압 농축한 후 재용해하여 사용하였다.

총페놀 함량

총 페놀 함량은 Folin-Denis법[5]을 일부 변형하여 측정하였다. 1 mg/ml 농도의 영경귀 추출물 0.5 ml에 2% Na₂CO₃ 용액 0.5 ml 첨가하여 3분간 정치시켰다. 그 후 2 N Folin-Ciocalteu phenol 용액 0.1 ml 첨가하여 혼합한 다음 30°C incubator에서 1 시간 동안 발색시켰다. 발색된 시료는 원심분리 (5,000 rpm, 10 min)하여 상등액을 얻었다. 상등액은 microplate reader (EL800, BioTek, Winooski, PA, USA)를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준 검량곡선으로부터 값을 산출하였으며 산출된 값은 mg/g으로 표시하였다. 각 실험은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

Silymarin compound 분석

영경귀로부터 silymarin의 추출은 T. Radjabian 등[23]에 따라 추출하였다. 영경귀 시료분말 10 g을 칭량하여 n-hexane에 4시간 동안 침지해 탈지하였다. 그 후 ethyl acetate로 8시간 동안 soxhlet extractor를 이용하여 환류냉각·추출하였다. Ethyl acetate 추출용액을 50°C 이하의 rotary vacuum evaporator로서 감압 농축하여 silymarin compounds를 추출하였으며, 이를 methanol에 2 mg/ml의 농도로 녹여 0.45 μ M membrane filter로 여과한 후 HPLC로서 분석하였다. HPLC는 Agilent 1200을, analytical column은 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (250×4.6 mm, I.D. 5 μ m)을 사용하였다. Mobile phase는 methanol:water (50:50, v/v), isocratic 모드로서 flow rate는 1 ml/min, column 온도는 35°C, UVD 288 nm에서 검출하였다. 분석시간은 시료 당 20분이 소요되었다.

Silymarin 표준용액은 silymarin (Sigma S0292, USA)을 methanol에 녹여 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml의 용액을 조제하고, 해당 분석조건에서의 silymarin 중의 flavonolignan 성분들의 chromatographic pattern을 결정하였으며 검량곡선을 작성해 시료에 대한 각각의 함량을 측정하였다.

DPPH free radical 소거활성

DPPH free radical 소거활성은 Blois와 Marsden의 방법[1]을 변형하여 각 추출물의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 전자공여능을 측정하였다. 추출물을 농도별 (0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml)로 희석한 다음, 96-well plate에 0.2 ml와 사용 직전 만든 0.2 mM DPPH 용액 0.1 ml를 넣고 혼합한 후, 실온에서 30분 간 반응시킨 다음 microplate reader를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 BHA와 α -tocopherol을 사용하였으며 전자공여능은 아래와 같은 식으로 계산하여 백분율(%)로 표시하였으며, 각 실험은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

$$\text{DPPH free radical 소거활성(\%)} = [1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{음성대조구의 흡광도})] \times 100$$

ABTS cation radical 소거활성

ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid diammonium salt)] cation radical 소거활성은 Re 등의 방법[20]을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM의 potassium persulfate를 1:1로 혼합한 다음 실온의 암실에서 24시간 방치시켜 ABTS radical (ABTS⁺)을 만들고 732 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7±0.02가 되도록 PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4) buffer로 희석하여 ABTS 용액으로 사용하였다. 96-well plate에 ABTS 용액 0.2 ml와 농도별(0.003125, 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 mg/ml)로 희석한 추출물 0.1 ml를 첨가하여 1분간 정치시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 BHA와 α -tocopherol의 소거활성과

비교하였으며, 엉겅퀴 추출물에 대한 ABTS radical 소거활성은 아래와 같은 식으로 계산하여 백분율(%)로 표시하였으며, 각 실험은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

$$\text{ABTS cation radical 소거활성(\%)} = [1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{음성대조구의 흡광도})] \times 100$$

FRAP (ferric reducing antioxidant power)

FRAP은 Benzie와 Strain의 방법[2]에 따라 측정하였다. FRAP 용액은 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 40 mM HCl에 녹인 10 mM TPTZ [2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine] 및 20 mM iron (III) chloride를 각각 37°C로 가온한 후 실험직전에 10:1:1의 부피 비율로 혼합하여 사용하였다. 96-well plate에 FRAP 용액 0.2 ml와 농도별(0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml)로 희석된 시료 0.05 ml를 혼합한 다음 37°C에서 15분간 반응시킨 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조군으로 trolox의 환원력과 비교하였다. 각 실험은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

BNL CL.2 세포배양

본 실험에 사용된 흰쥐 정상 간세포(mouse liver normal cell, BNL CL.2)는 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% P/S (penicillin-streptomycin)가 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)배지를 사용하여 배양하였다. 배양된 BNL CL.2 세포가 80% confluent 되었을 때 PBS로 세척한 후 0.5% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 4분간 정지시킨 다음, 세포를 탈착시켜 1,000 rpm에서 4분 동안 원심분리한 후 T-75 flask에 8×10⁴ cell/well씩 분주하여 2일 간격으로 계대배양하였다.

세포 독성 측정(MTT assay)

세포의 생존율은 Mosmann에 따른 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 환원 방법을 약간 변형하여 측정하였다[15]. 24-Well plate에 BNL CL.2 세포를 7×10⁴ cells/ml가 되도록 분주한 뒤 24시간 동안 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 예비 배양한 후, 각 시료를 최종 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mg/ml)가 되도록 세포를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액(5 mg/ml) 0.2 ml를 가하고 CO₂ incubator에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에 떨어져 나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하고 PBS로 2회 세척하였다. 그 후 DMSO를 1 ml씩 분주하여 20분 동안 혼합한 다음 96-well plate에 0.2 ml씩 옮겨 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

t-BHP에 의한 세포의 손상으로부터의 간세포보호 효과 측정

t-BHP (tert-butyl hydroperoxide)에 의한 산화적 손상에 대

한 간세포보호효과를 관찰하기 위하여, 24-Well plate에 BNL CL.2 세포를 7×10⁴ cells/ml가 되도록 분주한 뒤 24시간 동안 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 배양한 후 각 시료를 최종 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml)가 되도록 세포에 한 시간 전 처리한 후 t-BHP (최종농도 80 μM)를 첨가하고 24시간 더 배양하였다. 이후 MTT assay로서 세포의 생존율을 측정하였다. 세포 생존율은 540 nm에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

H₂O₂ 처리에 따른 세포 생존율 측정

H₂O₂ 처리에 따른 산화적 손상에 대한 간세포보호효과를 관찰하기 위하여, 24-Well plate에 BNL CL.2 세포를 5×10⁴ cells/ml가 되도록 분주하여 24시간 동안 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 예비 배양한 후 배지를 제거하고 PBS (phosphate-buffered saline)로 2회 세척한 다음 배지를 교환하였다. 그 후 각 시료를 최종 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml)가 되도록 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 산화적 스트레스를 일으키기 위하여 0.4 mM H₂O₂를 처리한 후, 2시간 동안 배양한 다음 이후 MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다. 세포 생존율은 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

Ethanol 처리에 따른 세포 생존율 측정

Ethanol 처리에 따른 산화적 손상에 대한 간세포보호효과를 관찰하기 위하여, 24-Well plate에 BNL CL.2 세포를 5×10⁴ cells/ml가 되도록 분주하여 20시간 동안 배양하고, 3% FBS를 함유한 DMEM 배지로 교환하여 시료를 최종 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml)가 되도록 처리하고 1시간 후 300 mM ethanol 0.1 ml를 처리하여 24시간 배양하였다. 5일간 같은 방법으로 세포에 시료와 ethanol을 처리한 다음 이후 MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다. 세포생존율은 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

통계처리

실험결과는 SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS inc, Chicago IL, USA) program Ver. 12.0을 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하여 유의성이 있는 경우에 Duncan의 다중범위검정(Duncan's multiple range test)으로 시료 간의 유의차를 검정하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

Total phenolics content

엉겅퀴의 부위별 총 페놀 함량은 Fig. 1과 같다. 엉겅퀴 지상부(97.22±5.51 mg/g)가 지하부(85.32±3.06 mg/g)보다 많았으며, 서양엉겅퀴의 전초보다 다소 낮은 함량을 보였다. MoK

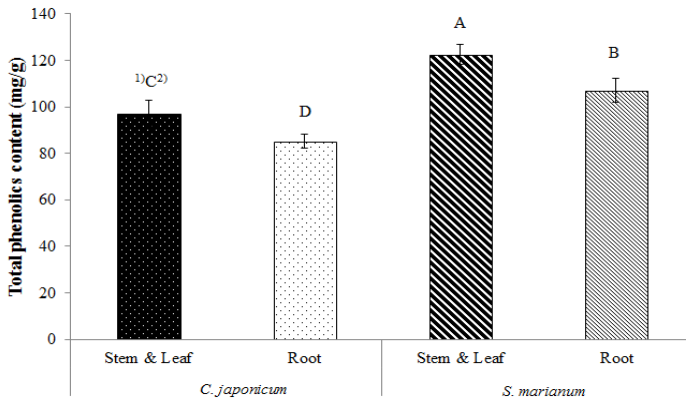


Fig. 1. Total phenolic compounds content in various parts of *C. japonicum* and *S. marianum*. ¹The values represent the mean ± SD (n=3). ²Different capital letters are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

등[17]의 연구에서는 엉겅퀴 부위별 열수추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과 잎에서 74.0 ± 1.03 mg/g, 줄기에서 40.7 ± 1.34 mg/g, 꽃에서 70.3 ± 1.50 mg/g, 씨앗에서 54.5 ± 0.50 mg/g, 뿌리에서 30.2 ± 0.65 mg/g으로 부위별 모든 추출물이 뿌리 추출물보다 높게 나타났다. 이는 본 연구결과와 다른 경향을 보였으며 이는 추출용매에 따른 차이라고 생각된다.

Analysis of silymarin compounds

엉겅퀴의 silymarin compound를 분석한 결과는 Table 1과 같다. 지상부와 지하부를 합친 total silymarin 함량은 서양엉겅퀴가 1.17 mg/g으로 엉겅퀴의 0.65 mg/g보다 2배정도 높은 함량을 나타냈다. 엉겅퀴는 지상부의 0.18 ± 0.02 mg/g보다 지하부에서 0.47 ± 0.03 mg/g가 함량이 많았으며, 지상부에서는 silychristin, silydianin이, 지하부에서는 silychristin, silydianin, silybin B, isosilybin B 등이 검출되었다. 그 중 지상부는 silychristin이 0.16 ± 0.02 mg/g, 지하부는 isosilybin B가 0.21 ± 0.02 mg/g으로 많이 함유되어 있었다. Silymarin은 서양엉겅퀴의 지표성분 물질이므로 엉겅퀴보다 많이 나온 것으로 사료되지만, 서양엉겅퀴는 수입에 의존하기 때문에 경제적인 면에선 국내에서 자생하고 있고 쉽게 구할 수 있으며 지상부

와 지하부를 모두 사용하는 엉겅퀴도 silymarin 추출물로서 활용이 매우 가능하다고 판단된다.

DPPH free radical scavenging activity

엉겅퀴 부위별 추출물의 DPPH radical 소거활성을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 엉겅퀴는 지하부에서 $4.72 \pm 0.46 \sim 88.28 \pm 0.17\%$ 로 지상부의 $5.86 \pm 4.63 \sim 83.76 \pm 0.60\%$ 보다 다소 활성이 높았으며, 서양엉겅퀴 지상부의 $9.09 \pm 0.65 \sim 89.02 \pm 0.23\%$ 과 지하부의 $7.75 \pm 1.42 \sim 87.08 \pm 0.17\%$ 와 유사한 활성을 보였다. Lee 등[13]의 연구에서는 엉겅퀴(*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*)의 뿌리의 ethyl acetate와 butanol 분획물은 줄기의 분획물보다 다소 높은 활성을 나타내어 이는 본 실험의 결과와 유사하였다.

ABTS cation radical scavenging activity

엉겅퀴 부위별 추출물의 ABTS radical 소거활성능을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 엉겅퀴는 지하부에서 $19.16 \pm 0.69 \sim 68.6 \pm 1.24\%$ 로 지상부의 $15.55 \pm 0.13 \sim 63.41 \pm 0.57\%$ 보다 높은 활성을 보였다. 추출물을 0.1 mg/ml로 처리하였을 때, 엉겅퀴 지상부와 지하부는 각각 $63.41 \pm 0.57\%$, 와 $68.6 \pm 1.24\%$ 로 억제

Table 1. The content of silymarin compounds in various parts of *C. japonicum* and *S. marianum*

Silymarin compounds	Contents (mg/g)			
	<i>C. japonicum</i>		<i>S. marianum</i>	
	Stem & Leaf	Root	Stem & Leaf	Root
Silychristin	0.16 ± 0.02 ^{1)B2)a3)}	0.14 ± 0.02 ^{BCb}	0.37 ± 0.03 ^{Aa}	0.13 ± 0.01 ^{BCa}
Silydianin	0.02 ± 0.01 ^{Cb}	0.05 ± 0.01 ^{Bd}	0.13 ± 0.01 ^{Ac}	0.04 ± 0.00 ^{BCb}
Silybin A	- ⁴⁾	-	0.10 ± 0.01 ^{Ad}	-
Silybin B	-	0.07 ± 0.01 ^{Bc}	0.13 ± 0.01 ^{Ac}	-
Isosilybin A	-	-	0.01 ± 0.00 ^{Ae}	-
Isosilybin B	-	0.21 ± 0.02 ^{Ba}	0.25 ± 0.02 ^{Ab}	0.01 ± 0.00 ^{Cc}
Total	0.18 ± 0.02 ^C	0.47 ± 0.03 ^B	0.99 ± 0.05 ^A	0.18 ± 0.01 ^C

¹⁾The values represent the mean ± SD (n=3).

²⁾Different superscripts within a same extract are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

³⁾Different superscripts within a same compound are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

⁴⁾Not detected.

Table 2. Antioxidant activity of various parts of *C. japonicum* and *S. marianum*

Treated conc. (mg/ml)	Antioxidant activities (%)							
	<i>C. japonicum</i>		<i>S. marianum</i>		BHA	α-Tocopherol	Trolox	
	Stem & Leaf	Root	Stem & Leaf	Root				
DPPH assay	0.03125	5.86±4.63 ^{1)E2)e3)}	4.72±0.46 ^{Ff}	9.09±0.65 ^{Fc}	7.75±1.42 ^{Fd}	66.37±1.38 ^{Da}	19.77±0.99 ^{Eb}	
	0.0625	12.17±5.08 ^{Df}	13.26±0.83 ^{Ee}	22.50±1.37 ^{Ecd}	17.54±0.91 ^{Ed}	85.79±0.31 ^{Ca}	46.30±1.27 ^{Db}	
	0.125	24.89±4.48 ^{Ce}	29.86±0.31 ^{Dd}	49.63±0.65 ^{Dd}	38.60±1.44 ^{Dc}	90.81±0.17 ^{Bc}	90.96±0.17 ^{Bc}	
	0.25	49.43±4.19 ^{Be}	59.22±0.70 ^{Cd}	70.89±0.31 ^{Cc}	71.88±0.46 ^{Cb}	91.21±0.15 ^{Ba}	91.21±0.15 ^{Ba}	
	0.5	83.26±1.20 ^{Ad}	87.98±0.09 ^{Bb}	85.05±0.09 ^{Bc}	82.36±0.96 ^{Be}	- ^{Aa}	- ^{Aa}	
	1	83.76±0.60 ^{Ad}	88.28±0.17 ^{Ab}	89.02±0.23 ^{Ab}	87.08±0.17 ^{Ac}	- ^{Aa}	- ^{Aa}	
ABTS assay	0.03125	15.55±0.13 ^{Fd}	19.16±0.69 ^{Fb}	14.80±0.68 ^{Fc}	13.37±0.65 ^{Ff}	38.77±1.13 ^{Da}	17.13±0.13 ^{Ec}	
	0.0625	20.96±1.02 ^{Ed}	25.17±5.86 ^{Ec}	19.98±0.39 ^{Ede}	17.66±0.47 ^{Ee}	62.73±0.69 ^{Ca}	28.40±0.72 ^{Db}	
	0.0125	25.47±1.38 ^{Dd}	41.17±0.81 ^{Dc}	25.85±1.41 ^{Dd}	20.51±0.26 ^{De}	84.22±0.23 ^{Aa}	57.55±0.85 ^{Cb}	
	0.025	27.20±1.13 ^{Ce}	43.13±1.16 ^{Cc}	36.81±0.26 ^{Cd}	43.58±0.57 ^{Cc}	82.49±0.13 ^{Ba}	81.52±0.81 ^{Bb}	
	0.05	43.88±1.35 ^{Bf}	46.43±0.72 ^{Be}	60.41±0.13 ^{Bd}	62.66±0.79 ^{Bc}	82.64±0.23 ^{Ba}	81.14±0.85 ^{Bb}	
	0.1	63.41±0.57 ^{Ae}	68.60±1.24 ^{Ad}	83.47±0.13 ^{Ab}	70.47±1.13 ^{Ac}	84.52±0.34 ^{Aa}	84.30±0.34 ^{Aa}	
FRAP assay	0.03125	3.23±0.63 ^{Fd}	4.64±1.60 ^{Fc}	12.96±1.56 ^{Fb}	12.67±1.47 ^{Fb}			45.99±1.16 ^{Ea}
	0.0625	14.08±2.58 ^{Ee}	21.79±1.62 ^{Ed}	31.33±0.82 ^{Eb}	25.95±1.63 ^{Ec}			63.74±0.46 ^{Da}
	0.125	29.33±0.89 ^{De}	38.43±1.23 ^{Dd}	47.49±1.00 ^{Dd}	42.87±0.95 ^{Dc}			77.46±0.98 ^{Ca}
	0.25	49.73±2.40 ^{Ce}	54.61±1.38 ^{Cd}	66.32±0.93 ^{Cb}	59.88±0.94 ^{Cc}			87.61±0.13 ^{Ba}
	0.5	66.01±1.58 ^{Be}	70.04±0.70 ^{Bd}	78.25±0.24 ^{Bb}	74.54±0.68 ^{Bc}			- ^{Aa}
	1	77.63±0.70 ^{Ae}	82.83±0.39 ^{Ad}	87.13±0.32 ^{Ab}	85.54±0.36 ^{Ac}			- ^{Aa}

¹⁾The values represent the mean ± SD (n=3).

²⁾Different superscripts within a same extract are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

³⁾Different superscripts within a same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

활성이 나타났다. 한편 서양 엉겅퀴의 지상부와 지하부에서는 각각 83.47±0.13%와 70.47±1.13% 보다 약간 낮은 활성을 보였다.

Mok 등[16]의 연구에서는 엉겅퀴 부위별로 열수추출물을 측정된 결과 잎의 경우 90.15±1.3%로 가장 높았으며 꽃, 씨, 줄기, 뿌리 순으로 radical 소거 활성을 보였으며, 지하부인 뿌리가 본 실험의 결과와 다르게 가장 낮은 활성을 나타낸 것은 추출용매의 차이 때문인 것으로 생각된다.

FRAP (ferric reducing antioxidant power)

엉겅퀴 부위별 추출물의 환원력을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 엉겅퀴 추출물을 1 mg/ml의 농도로 처리하였을 때 엉겅퀴 지하부가 82.83±0.39%가 지상부의 77.63±0.70%보다 높았으며, 서양엉겅퀴 지상부와 지하부의 87.13±0.32와 85.54±0.36 %보다는 다소 낮은 활성이었다. Ha 등[6]은 남해 약썩 부위별로 60% 에탄올 추출물을 FRAP 측정된 결과, 뿌리가 줄기보다 높은 활성을 보였으며 이는 본 연구결과와 유사하였다.

위와 같이 항산화 활성 실험 결과, 엉겅퀴는 서양엉겅퀴보다 다소 낮거나 거의 유사한 활성이 나타났으며, 지상부보다 지하부가 활성이 높았다. 하지만 항산화 활성과 비례한다고 알려진 총 페놀 화합물의 함량과 비교하였을 때, 항산화 활성이 대체로 높게 나타난 서양엉겅퀴에서 총 페놀 함량도 많았다. 그러나 엉겅퀴의 부위별로는 오히려 총 페놀 함량이 적은

지하부에서 항산화활성이 높게 나타났다. 이는 silymarin 화합물의 함량이 지하부가 지상부보다 높게 나타났기 때문인 것으로 생각되며, 특히 지하부에서만 검출된 silybin B와 isosilybin B 화합물의 영향인 것으로 생각된다.

세포 독성 측정

BNL CL2 세포에 농도별로 추출물을 처리한 후, 24시간 배양한 다음 MTT assay로 세포생존율을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 엉겅퀴 부위별 추출물을 처리하지 않은 대조군의 생존율을 100%로 하였을 때 0.5 mg/ml 농도를 처리한 군을 제외한 모든 군에서 세포생존율이 약 80~100%로 나타났다. 따라서 엉겅퀴 부위별 추출물이 0.2 mg/ml 이하에서 세포 독성 없음을 확인하여 0.2 mg/ml 이하로 처리농도를 설정하여 실험을 진행하였다.

t-BHP에 의한 세포의 손상으로부터의 간세포보호 효과 측정

엉겅퀴 부위별 추출물을 농도별(0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml)로 한 시간 전 처리한 후 t-BHP 80 μM을 24시간 동안 cell에 처리한 결과를 Table 3과 같다. t-BHP를 처리한 세포에서는 t-BHP를 처리하지 않은 정상세포(100±1.52%)에 비해 세포생존율이 24.60±0.57%로 유의적인 감소를 보였다. 엉겅퀴와 서양엉겅퀴 추출물이 처리된 세포에서는 농도 의존적으로 세포

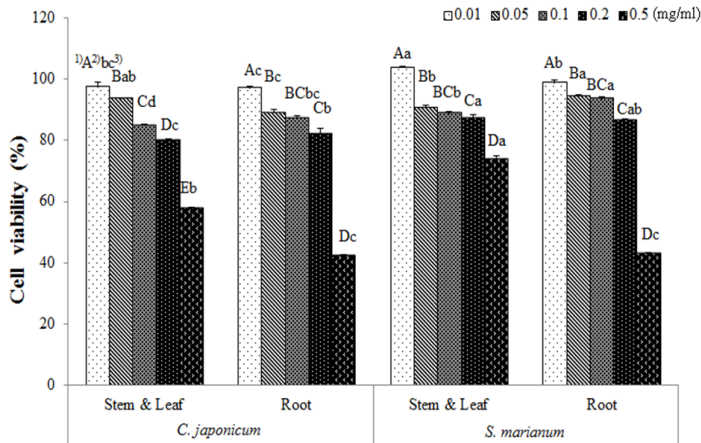


Fig. 2. Cell viabilities of extracts from various parts of *C. japonicum* and *S. marianum* against BNL CL.2 by MTT assay. ¹⁾The values represent the mean ± SD (n=3). ²⁾Different capital letters within a same extract are significantly different by Duncan's multiple range test at *p*<0.05. ³⁾Different small letters within a same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test at *p*<0.05.

Table 3. Protection effect against hepatocytes (BNL CL.2) damaged by *t*-BHP of various parts of *C. japonicum* and *S. marianum*

Treated conc. (mg/ml)	Cell viabilities (%) of liver cell damaged by <i>t</i> -BHP					
	<i>C. japonicum</i>		<i>S. marianum</i>		<i>t</i> -BHP ⁺	<i>t</i> -BHP ⁻
	Stem & Leaf	Root	Stem & Leaf	Root		
0.01	31.56±0.30 ^{1)(2)(cd3)}	32.46±0.20 ^{Dc}	35.24±1.73 ^{Db}	30.56±0.83 ^{Cd}	24.6±0.57 ^f	100±1.52 ^a
0.05	38.33±0.70 ^{Bc}	41.49±0.26 ^{BCc}	44.91±1.01 ^{Cb}	39.91±1.98 ^{Bd}		
0.1	39.46±0.60 ^{Be}	42.97±0.82 ^{Bc}	55.67±0.20 ^{Bb}	40.88±1.54 ^{ABd}		
0.2	43.42±0.42 ^{Ad}	49.58±0.34 ^{Ac}	65.15±0.30 ^{Ab}	41.84±0.31 ^{Ae}		

¹⁾The values represent the mean ± SD (n=3).

²⁾Different superscripts within a same extract are significantly different by Duncan's multiple range test at *p*<0.05.

³⁾Different superscripts within a same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test at *p*<0.05.

생존율이 증가하였으며, 영경귀 지상부는 서양영경귀 지상부보다 다소 낮은 활성을 보였다. 그러나 0.2 mg/ml를 처리하였을 때, 영경귀 지하부가 49.58±0.34%로 서양영경귀 지하부의 41.84±0.31%보다 약간 높은 세포 생존율을 보였다. Kim 등 [10]의 연구에서는 국화과 식물인 산국대 추출물을 0.2 mg/ml 농도로 전처리 한 후, *t*-BHP를 처리한 결과 71.8%로 나타났으며, *t*-BHP로 유도한 세포로부터 약 30% 정도의 세포 생존율이 증가하여 세포 손상을 보호하는 것으로 판단된다고 보고하였다. 본 연구에서는 *t*-BHP만을 처리한 세포보다 약 25%의 높은 세포생존율을 보였으며, 따라서 영경귀 추출물도 *t*-BHP로 유도된 산화적 스트레스에 대해 간세포 보호효과가 있는 것으로

생각된다.

H₂O₂ 처리에 따른 세포 생존율

영경귀 부위별 추출물을 농도별(0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml)로 전처리한 후, 0.4 mM H₂O₂를 2시간 동안 처리한 결과는 Table 4와 같다. H₂O₂를 처리한 세포는 생존율이 15.55±0.97%이었으나, 영경귀 추출물을 0.2 mg/ml의 농도를 처리하였을 때, 지상부는 72.21±0.51%, 지하부는 76.87±1.10%로서 서양영경귀 지하부의 73.86±0.80%와 비슷한 활성이었다. Kim 등 [11]은 H₂O₂의 처리에 의한 손상된 간세포에 꾸지뽕나무 잎의 80% 에탄올 추출물을 처리하였을 때, 세포생존율이 H₂O₂가

Table 4. Protection effect against hepatocytes(BNL.CL2) damaged by H₂O₂ of various parts of *C. japonicum* and *S. marianum*

Treated conc. (mg/ml)	Cell viabilities (%) of liver cell damaged by hydrogen peroxide					
	<i>C. japonicum</i>		<i>S. marianum</i>		H ₂ O ₂ ⁺	H ₂ O ₂ ⁻
	Stem & Leaf	Root	Stem & Leaf	Root		
0.01	33.28±1.98 ^{1)(D2)(d3)}	43.20±0.75 ^{Dc}	54.86±3.50 ^{Cb}	34.65±2.04 ^{Dd}	15.55±0.97 ^e	100±0.39 ^a
0.05	53.98±0.83 ^{Cd}	59.23±1.57 ^{Cc}	72.25±0.42 ^{BCb}	59.04±2.93 ^{Cc}		
0.1	67.93±1.10 ^{Bc}	73.28±0.30 ^{Bbc}	74.78±0.29 ^{Bb}	67.4±0.22 ^{Bc}		
0.2	72.21±0.51 ^{Ad}	76.87±1.10 ^{Ac}	85.28±1.86 ^{Ab}	73.86±0.80 ^{Ad}		

¹⁾The values represent the mean ± SD (n=3).

²⁾Different superscripts within a same extract are significantly different by Duncan's multiple range test at *p*<0.05.

³⁾Different superscripts within a same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test at *p*<0.05.

Table 5. Cell viabilities for protection effect against hepatocytes(BNL CL2) damaged by Ethanol of various parts of *C. japonicum* and *S. marianum*

Treated conc. (mg/ml)	Cell viabilities (%) of liver cell damaged by Ethanol					
	<i>C. japonicum</i>		<i>S. marianum</i>		Ethanol ⁺	Ethanol ⁻
	Stem & Leaf	Root	Stem & Leaf	Root		
0.01	40.20±0.19 ^{1)D2)c3)}	44.16±0.77 ^{Db}	43.33±2.61 ^{Dbc}	39.25±2.49 ^{Dd}		
0.05	51.63±0.29 ^{Cd}	56.35±1.65 ^{Cc}	59.8±0.58 ^{Cb}	44.93±0.58 ^{Ce}		
0.1	56.09±0.33 ^{Bd}	60.82±1.78 ^{Bc}	67.39±0.51 ^{Bb}	48.88±0.77 ^{Be}	33.69±0.83 ^f	100±0.29 ^a
0.2	67.77±0.38 ^{Ad}	71.73±0.58 ^{Ac}	81.11±1.92 ^{Ab}	56.6±0.80 ^{Ae}		

¹⁾The values represent the mean ± SD (n=3).

²⁾Different superscripts within a same extract are significantly different by Duncan's multiple range test at *p*<0.05.

³⁾Different superscripts within a same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test at *p*<0.05.

처리된 세포에 비하여 15% 정도의 세포생존을 향상을 보였다. 또한 Ma 등[14]은 국내산 엉겅퀴(*C. japonicum*)의 flavonoids가 CCl₄에 의하여 손상된 간세포에 대한 보호효과가 있었다고 하였으며, 서양엉겅퀴(*S. marianum*)의 flavonolignan의 일종인 silymarin과 동일한 성분을 함유하고 있었다고 하였다. 본 연구에서는 H₂O₂만을 처리한 세포보다 약 60%이상의 높은 세포생존율을 보여 간세포에 대한 보호효과가 큰 것으로 생각되었다.

Ethanol 처리에 따른 세포 생존율

BNL CL2 세포에 300 mM ethanol을 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 후, 엉겅퀴 부위별 추출물의 간세포보호 효과를 MTT assay로 세포 생존율을 측정 한 결과는 Table 5와 같다. 엉겅퀴 지상부는 40.20±0.19~67.77±0.38%, 지하부는 44.16±0.77~71.73±0.58%로서 서양엉겅퀴 지상부의 56.6±0.80~81.11±1.92%, 지하부의 39.25±2.49~56.60±0.80%보다 다소 낮았으나, ethanol만을 처리한 세포(33.69±0.83)에 비해 상당히 생존율이 높았다. 이는 엉겅퀴가 glutathione reductase의 활성을 증가시켜 알코올 해독작용을 촉진시키는 작용으로[9] 인해 나타난 결과로 생각되며 따라서 엉겅퀴 추출물은 ethanol로 인한 간세포의 손상에 대한 보호효과가 있는 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 농생명산업기술개발사업(과제 번호: 314021-03)에 의해 이루어진 결과입니다.

References

1. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
 2. Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.

3. Cho, E. J. and Yoon, S. H. 1999. Protective effect of *Asiasari radix* on rat liver. *J. Kor. Soc. Hygi. Sci.* **5**, 85-91.
 4. Choi, Y. J. 1987. Cultivation and Utilization of Wild Edible. Osung Press, Seoul, Korea. p 337.
 5. Folin, O. and Denis, W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* **12**, 239-243.
 6. Ha, G. J., Jeong, C. H., Jeong, H. R., Heo, H. J., Shon, G. M., Rho, C. W. and Kim, N. K. 2011. Antioxidant activities from the different parts of *Artemisia argyi* H. using an *in vitro* system. *J. Agric. Life Sci.* **45**, 109-117.
 7. Han, H. K., Je, H. S. and Kim, G. H. 2010. Effects of *Cirsium japonicum* powder on plasma glucose and lipid level in streptozotocin induced diabetic rats. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **42**, 343-349.
 8. Ishida, H., Umino, T., Tsuji, K. and Kosuge, T. 1987. Studies on antihemorrhagic substance in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine VII. On the antihemorrhagic principle in *Cirsium japonicum* DC. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 861-864.
 9. Katiyar, S. K., Mantena, S. K. and Meeran, S. M. 2011. Silymarin protects epidermal keratinocytes from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage by nucleotide excision repair mechanism. *PLoS. One* **6**, e21410.
 10. Kim, Y. S., Hwang, J. W., Park, P. J. and Jeong, J. H. 2014. Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Chrysanthemum boreale* on t-BHP induced oxidative stress in chag cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 60-66.
 11. Kim, O. J., Ho, J. N., Nam, D. E., Jun, W. J., Hwang, K. T., Kang, J. E., Chae, O. S. and Lee, J. M. 2012. Hepatoprotective effect of *Curdrania tricuspidata* extracts against oxidative damage. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 7-13.
 12. Lee, S. J. 1966. Korean Folk Medicine. Seoul National University Press, Seoul, Korea. p 145-146.
 13. Lee, H. K., Kim, J. S., Kim, N. Y., Kim, M. J., Park, S. U. and Yu, C. Y. 2003. Antioxidant, Antimutagenicity and Anticancer Activities of extract from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* KITAMURA. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **11**, 53-61.
 14. Ma, Q., Wang, L. H. and Jiang, J. G. 2016. Hepatoprotective effect of flavonoids from *Cirsium japonicum* DC on hepatotoxicity in comparison with silymarin. *Food Funct.* **7**, 2179-2184.

15. Murakmi, T., Kim, T. and Nakamura, H. 1998. Invited. Hepatitis, cirrhosis, and hepatoma. *J. Magn. Reson. Imaging* **8**, 346-358.
16. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
17. Mok, J. Y., Kang, H. J., Cho, J. K., Jeon, I. H., Kim, H. S., Park, J. M., Jeong, S. I., Shim, J. S. and Jang, S. I. 2011. Antioxidative and anti-inflammatory effects of extracts from different organs of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*. *Kor. J. Herbology* **26**, 39-47.
18. N, Skottova. and V, Krecman. 1998. Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug. *Physiol. Res.* **47**, 1-8.
19. Park, J. C., Her, J. M., Park, J. G., Kim, S. C., Park, J. R., Choi, S. H. and Choi, J. W. 2004. Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. *Phytother. Res.* **18**, 19-24.
20. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
21. Sohn, D. H., Kim, Y. C., Oh, S. H., Park, E. J., Li, X. and Lee, B. H. 2003. Hepatoprotective and free radical scavenging effects of *Nelumbo nucifera*. *Phytomedicine* **10**, 165-169.
22. Statistics Korea. 2015. Cause of death statistics.
23. T, Radjabian., Rezazadeh, S. H. and Fallah Huseini, H. 2008. Analytical of silymarin components in the seed extracts of some milk thistle ecotypes from Iran by HPLC. *Iran. J. Sci. Technol., Trans. A: Sci.* **32**, 141-146.
24. Yin, H. H., Cho, B. O., Fang, C. Z., Shim, J. S. and Jang, S. I. 2015. Anti-obesity effects of water extracts from different organs of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*. *J. Physiol. Pathol. Kor. Med.* **29**, 322-329.

초록 : 영경귀의 항산화 활성 및 손상된 흰쥐 간세포(BNL CL.2)에 대한 간 보호 효과

김선정¹ · 강승미¹ · 고건희² · 남상해^{1*}

(¹경남과학기술대학교 생명과학대학 식품과학부, ²경남한방약초연구소)

영경귀(*C. japonicum*) 부위별 추출물을 기능성 식품소재로 활용가능성을 알아보기 위해서 총 페놀 및 silymarin 화합물의 함량분석, 항산화 및 간 보호효과를 서양영경귀와 비교하였다. 영경귀의 총 페놀함량은 지상부(97.22±5.51 mg/g)가 지하부(85.32±3.06 mg/g)보다 많았으며, 서양영경귀의 전초보다 다소 낮은 함량을 보였다. 영경귀의 silymarin 화합물의 총 함량은 서양영경귀의 55.56%이었으며, 지하부(0.47±0.03 mg/g)는 지상부(0.18±0.02 mg/g)보다 많이 함유되어 있었다. 또한 지상부에서는 silychristin, silydianin이, 지하부에서는 silychristin, silydianin, silybin B, isosilybin B 등이 검출되었다. 영경귀의 항산화활성은 대체로 서양영경귀보다는 약간 낮았고, 지하부가 지상부보다 높은 활성을 보였다. 영경귀 추출물을 1 mg/ml 농도로 처리하였을 때, DPPH 활성은 지상부와 지하부에서 각각 83.76±0.60%, 88.28±0.17%의 활성을 나타냈으며, FRAP 활성은 지상부와 지하부에서 각각 77.63±0.70, 82.83±0.39%로 나타났다. ABTS 활성도 영경귀 추출물을 0.1 mg/ml 농도로 처리하였을 때, 지하부와 지상부에서 각각 68.60±1.24%와 63.41±0.57%로 나타났다. 영경귀 추출물의 간 보호효과는 지하부에서 지상부보다 다소 높은 활성이 나타났으나 서양영경귀 지상부의 활성보다는 낮았다. t-BHP, H₂O₂ 및 Ethanol의 처리에 따른 손상된 간세포에 영경귀 추출물을 0.2 mg/ml씩 처리하였을 때, 세포생존율은 각각 49.58±0.34, 76.87±1.10 및 71.73±0.58%로서 추출물을 처리하지 않았을 때보다 각각 24.78, 61.32 및 38.04%씩 높아졌다. 이와 같은 결과로 볼 때, 본 연구에서는 국내산 영경귀의 간 보호효과를 활용한 기능성 식품의 개발이 가능할 것으로 생각되었다.