

## 뽕나무(*Morus alba*)와 꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)의 부위에 따른 항산화 활성 및 3T3-L1세포 지방축적 억제 효과

†김 건 희 · 김 은 향\*

†덕성여자대학교 식품영양학과 교수, \*덕성여자대학교 식품영양학과 석사과정

### Antioxidative Activities and Inhibitory Effects on Lipid Accumulation of Extracts from Different Parts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*

†Gun-Hee Kim and Eunhyang Kim\*

Professor, Dept. of Food and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea

\*Master's Course, Dept. of Food and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea

#### Abstract

In this study, we examined antioxidative effects and the anti-adipogenesis effect of different parts of *Cudrania tricuspidata* (C), and *Morus alba* (M). Total polyphenol contents were highest in M-root ( $34.56 \pm 0.045$  mg GAE/g), and there was no significant difference, between C-root and M-leaf. Total flavonoid contents of C-root were highest ( $23.07 \pm 0.004$  mg QE/g). To examine antioxidant activities of C and M extracts, DPPH and ABTS radical scavenging activity, and FRAP assay, was used. Results show that antioxidant activities of C and M extracts increased, in a dose-dependent manner. Adipocytes are generated by preadipocyte differentiation, during adipogenesis. Matured adipocytes accumulate in abnormal and cause obesity. We investigated effects of leaf and root extracts of C and M, on lipid accumulation, in 3T3-L1 adipocytes. Changes in cell morphology, and degrees of lipid accumulation in adipocytes, were evaluated by Oil Red O staining. Root extracts of C and M, reduced lipid content in a dose-dependent manner. Therefore, root extracts of C and M, may be good candidates for managing obesity.

Key words: *Cudrania tricuspidata*, *Morus alba*, antioxidative activity, 3T3-L1, adipogenesis

#### 서 론

최근 우리나라는 가족형태 등의 사회 환경의 변화로 식생활이 서구화되면서 비만 인구가 증가하고 있다. 비만은 열량의 섭취와 소비가 불균형을 이룰 때 지방세포 수 또는 크기의 증가로 인하여 유발되며, 당뇨병, 고지혈증, 동맥경화, 심혈관 질환 및 암 등의 다양한 만성 질환의 위험을 증가시키는 것으로 보고되었다(Rosen 등 2000).

3T3-L1 지방세포는 지방전구세포 단계에서 여러 호르몬과 전사인자들이 작용하여 분화되면서 생성되며, 세포 내 중성지방을 축적한다. 특히, Peroxisome proliferator-activated receptor

(PPAR)  $\gamma$ 와 CCAAT/enhancerbinding protein(C/EBP)  $\alpha$ 가 함께 작용하여 지방조직을 형성하고 축적한다. 이렇게 분화된 지방세포는 지질 및 에너지 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된다(Rosen & MacDougald 2006; Ahn 등 2012).

한편, 자유라디칼은 체내 대사과정에서 필연적으로 생성되나, 불안정하며 반응성이 커서 세포막 인지질의 불포화 지방산을 공격하고 과산화지질을 생성하여 DNA 손상, 암 유발 및 세포의 노화 등 생체 기능 저하하여 현대인의 여러 질병 유발의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(Fukuzawa & Takaishi 1994). 최근 연구를 통해 지방세포 형성에 활성산소종이 밀접한 연관을 갖는다는 연구가 보고되었다(Lee 등 2012; Seo 등

† Corresponding author: Gun-Hee Kim, Professor, Dept. of Food and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea. Tel: +82-2-901-8496, Fax: +82-2-901-8661, E-mail: ghkim@duksung.ac.kr

2013). 비만은 그 자체로도 산화 스트레스를 유발할 수 있고, 지방세포로 분화되는 대사과정으로 인하여 끊임없이 ROS가 생성되어 adipocytokines의 조절 장애와 대사증후군의 초기 발병 원인이 되는 것으로 보고되었다(Halliwell B 1996). 축적된 지방은 NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase를 활성화시키고 ROS 생성을 유도하며, 상승된 ROS가 혈 중 산화스트레스를 증가시키는 악순환을 일으킨다(Furukawa 등 2004). 따라서 비만에서 산화스트레스를 줄이기 위한 항산화 체계를 강화하는 생리활성물질 개발에 대한 연구가 필요하다.

뽕나무(*Morus alba*)는 낙엽교목으로 온열대지역에 분포하고, 뽕나무과(Moraceae)에 속한다. 우리나라의 전역에 분포하고 있으며, 전통적으로 뽕나무의 어린 가지, 뿌리, 열매 및 잎 등은 전통적으로 약용으로 사용되어 왔다(Park 등 2012). 뽕나무류에는 플라보노이드 화합물들이 다량 함유되어 있어 혈중 중성지방, 고콜레스테롤, 고지혈증, 동맥경화와 더불어 지질과산화로 인한 대사성질환을 억제하는데 효과가 있는 것으로 기대된다(Enkhmaa 등 2005). 뿌리껍질은 '상백피'라고 하며, 혈압강화와 피부 항노화에 효과적인 물질인 prenylflavonoid, mulberrofuran 및 oxyresveratrol 등이 보고된 바가 있으며(Ni 등 2010), 항염증과 항돌연변이 효과, 당뇨, 빈혈과 심혈관계 질환(Enkhmaa 등 2005), 항균효과, 항산화효과, 항고지질혈증(Enkhmaa 등 2005) 및 비만개선 효과 등이 알려져 있다. 뽕나무 잎은 '상엽'이라 하며, 연구에 의하면 rutin, quercetin, isoquercetin, moracetin, deoxyojirimycin, calistegin, GABA, morusin, umbelliferone 등 다양한 flavonoid 성분뿐만 아니라(Zhishen 등 1999), pectin, cellulose 등의 식이섬유소나 아미노산, protein 등이 풍부하고, 항균, 항산화활성 등 생리활성물질이 다량 함유되어 있다(Russo GL 2007). 최근 당뇨, 고지혈증, 고혈압 및 암 등 만성 질환에 대한 효과가 보고되었으며, 예로부터 각기병, 부종, 상처, 식은땀 및 중풍 등에 효과가 있어 한약재로 많이 사용되고 있다(Jeon & Kim 2011).

꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*) 또한 뽕나무과(Moraceae)에 속하고, 한국, 일본, 중국 등지에 주로 분포하고 있다. 잎은 한방에서 폐결핵, 만성요통, 타박상, 급성관절염 등의 치료에 사용되고 있었으며(Lee 등 2009), 민간요법으로 간암치료를 위하여 꾸지뽕나무를 다려서 마시면 효과적인 것으로 알려져 있다. 최근 연구에서 kaempferol, kaempferol 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, kaempferide 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, naringenin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside(Park 등 1992), 6,8-p-hydroxybenzenyltaxifolin, 8-p-hydroxybenzenyltaxifolin, 6-p-hydroxybenzenyltaxifolin(Fujimoto & Nomura 1985) 등의 다양한 성분 연구가 보고되었으며, 항암활성(Lee 등 1996), 항산화(Choi 2009), 항균활성(Kim 등 1993; Lee 등 2004), 항당뇨(Park 등 2001), 지질

과산화 억제작용(Cha 등 2000) 및 세포독성(Kang 등 2002) 등이 보고되었다.

기존의 연구 결과를 통하여 꾸지뽕나무와 뽕나무의 잎과 뿌리에 함유된 성분들은 다양한 약리작용이 보고되었으며, 그 활용 방안에 대한 연구들이 보고되어지고 있지만, 부위별 비만을 억제하는 효능과 관련된 연구는 아직까지 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 뽕나무와 꾸지뽕나무의 뿌리, 잎 및 열매로 부위를 나누어 추출 후 항산화 활성을 측정 후 부위에 따른 항산화 기능성 효과를 비교하였다. 또한, 3T3-L1 지방전구세포에 뽕나무와 꾸지뽕나무의 잎, 뿌리 추출물을 처리한 후 지방세포로 분화되는 과정에서 지방축적 억제 활성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 연구에 사용된 꾸지뽕나무 뿌리(*Cudrania tricuspidata* Root, CR), 꾸지뽕나무 잎(*Cudrania tricuspidata* leaf, CL), 꾸지뽕나무 열매(*Cudrania tricuspidata* fruit, CF), 뽕나무 뿌리(*Morus alba* root, MR), 뽕나무 잎(*Morus alba* leaf, ML), 뽕나무 열매(*Morus alba* fruit, MF)는 경동시장에서 건조된 것을 구입하여 실험에 사용하였다. 3T3-L1 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 분양 받았다. 세포실험에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fetal bovine serum(FBS), Penicillin-streptomycin 및 Phosphate buffered saline(PBS)은 Gibco(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. 기타 모든 시험 용액 및 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 2. 추출물 제조

추출물은 건조시료 10 g을 70% 에탄올 150 mL에 잠기도록 하여 50°C에서 4시간 동안 추출하였고, 2회 반복하였다. 혼합한 추출 용액은 여과하여 농축하여 용매를 완전히 제거한 후에 DMSO에 용해하여 stock solution을 만든 후 증류수(D.W.)로 농도별 희석하여 사용하였다.

### 3. 총 페놀 함량 측정(Total phenolic content: TPC)

총 페놀 함량은 Folin-Denis법(Gutfinger J 1981)을 본 연구에 맞게 수정하여 사용하였다. 각 추출물과 Foline-Ciocalteu 시약 동량(0.05 mL)을 넣고 섞어 3분 후 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.1 mL씩을 가한 후 어두운 곳에 2시간 정치한 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 갈산을 사용하여 표준곡선을 나타낸 후 총 페놀 함량을 계산하였다.

#### 4. 총 플라보노이드 함량 측정(Total flavonoid content: TFC)

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등(2000)의 방법을 적절하게 수정하여 사용하였다. 추출물 20 µL와 10% 질산암모늄 용액 4 µL를 섞고 실온 암소에서 40분간 반응을 시켰다. 그 다음 1 M Potassium acetate 4 µL와 80% 에탄올을 172 µL 가한 후 40분간 다시 반응시켰다. 그 후 415 nm에서 흡광도를 측정하고 퀘르세틴을 이용하여 표준곡선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 나타내었다.

#### 5. DPPH 라디칼 소거능

각 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 Blois MS(1958)의 방법을 기반으로 측정하였다. 추출물과 0.2 mM DPPH 용액을 동량 섞은 후 암소에서 30분간 방치하고 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 다음 식에 의하여 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료흡광도}}{\text{대조구흡광도}}\right) \times 100$$

#### 6. ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등(1999)을 기반으로 측정하였다. 7.4 mM ABTS 용액과 2.6 mM 과황산칼륨을 갈색병을 이용하여 혼합한 후, 24시간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도가 0.7±0.03이 되도록 PBS(pH 7.4)로 희석하여 사용하였다. 추출물 0.05 mL에 ABTS 용액 0.15 mL를 처리하여 갈색병 안에 10분간 방치한 다음 732 nm에서 흡광도를 측정하였으며, ABTS 라디칼 소거활성은 다음 식에 의하여 나타내었다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료흡광도}}{\text{대조구흡광도}}\right) \times 100$$

#### 7. 환원력(FRAP) 측정

FRAP(ferric reducing antioxidant power) 법에 의한 항산화 활성은 Benzie & Strain(1996)의 방법을 수정 후 사용하였다. Sodium acetate buffer(0.3 M, pH 3.6), 40 mM HCl로 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma), 20 mM FeCl<sub>3</sub>을 각각 10:1:1(v/v)로 섞어 FRAP 용액을 만들고 37°C를 유지하여 실험에 사용하였다. 농도별 추출물 0.05 mL에 FRAP 용액 0.15 mL를 가하여 37°C에서 25분간 반응시키고 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 8. 3T3-L1 지방전구세포 배양 및 분화

3T3-L1 지방전구세포를 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였

다. 지방전구세포를 분화 유도하기 위해서 DMEM에 분화유도 호르몬(0.5 mM IBMX, 0.5 µM DEX, 10 µg/mL Insulin: MDI)을 혼합하여 분화를 유도하였다. 배지는 2일마다 인슐린(10 µg/mL)이 포함된 DMEM 배지로 교환하였고, 8일까지 분화시켰다. 분화억제 효능을 확인하기 위해 분화유도 배지에 각 추출물을 25~400 µg/mL 농도로 배지에 희석하여 처리하였다. 대조군(MDI)은 추출물을 처리하지 않고 분화 유도한 것으로 하였다.

#### 9. MTT assay

꾸지뽕나무 및 뽕나무의 잎과 뿌리 추출물의 지방세포 내 독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 96 well-plate에 3T3-L1 세포를 5×10<sup>4</sup> cells/well로 심고 24시간 배양 후 농도별 추출물을 처리하여 24시간 다시 배양하였다. 이 후 배지를 제거하고 MTT 용액(5 mg/mL)을 각 well에 첨가하며, 4 시간동안 배양해 배지를 제거하였다. 배지가 제거된 well에 DMSO를 첨가하여 보라색으로 염색된 결정을 용해시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 10. Oil Red O 염색

3T3-L1 세포 내 지질 축적량은 Oil Red O 염색법으로 측정하였다(Jang 등 2018). 3T3-L1 지방전구세포의 분화 유도 8일째 된 지방세포를 사용하였다. 배지를 제거한 뒤 PBS로 세척하고, 4% formalin 용액으로 상온에서 15분간 고정한 후 다시 PBS로 세척하였다. 세포 내 생성된 지방구들은 Oil Red O 용액(0.5% Oil Red O-isopropanol solution:water=3:2)으로 1시간 동안 염색하고, PBS로 세척 후, 염색된 지방구를 현미경으로 관찰하였다. 총 지질 축적량은 완전히 마른 well에 100% isopropyl alcohol을 첨가하여 붉은색으로 염색된 지방구를 녹여낸 후 96 well plate에 옮겨서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 11. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였으며, 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 각 평균값에 대한 유의적 차이는 SPSS(version 19)를 이용하여 Student *t*-test 및 ANOVA(Duncan's multiple range test)를 실시하고, 실험군 간의 평균 차이를 *p*<0.05 수준에서 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 추출 수율과 총 페놀 및 플라보노이드 함량

꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)와 뽕나무(*Morus alba*) 부위별 시료 추출 수율은 건조 시료량(10 g) 대비 추출 시료량으

로부터 추출 수율을 산정하였다(Table 1). 수율은 71.36%로 MF가 가장 높았으며, CF 52.90%, CL 44.50%, ML 21.90%, MR 20.80%, CR 17.50% 순서로 나타났다. Hong & Hong(2015)의 연구에서 꾸지뽕나무 부위 및 추출 용매에 따라 추출 수율이 다르게 나타났으며, 본 연구와 열매>잎>뿌리로 수율을 보인 것이 일치하였다. Choi 등(2015)의 연구에서 청일뽕 뽕나무의 부위별 에탄올 추출물의 수율은 열매 73.4%, 잎 23.9%, 뿌리 23.0%로 나타나 본 연구의 결과와 일치하였다. 이와 같이 열매 추출물의 수율이 높은 것은 열매에 안토시아닌 색소뿐 아니라, 당, 산 및 섬유소가 다량 함유되어 있기 때문이라 사료되어진다.

폴리페놀 화합물은 식물계에 수천가지 이상 존재하며, 체내 효소단백질과 같은 거대분자들과 쉽게 결합하여 항산화, 항염증, 항암, 항당뇨, 항비만 등의 효과를 나타낸다고 보고된다(Kim 등 2004). 플라보노이드는 폴리페놀 화합물 범주 내 속하며, 여러 생리적 기능을 나타내어 생체 내 산화작용을 억제한다(Beecher GR 2003).

본 연구에서 꾸지뽕나무와 뽕나무의 부위별 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 1에 나타내었다. 꾸지뽕나무 및 뽕나무 추출물에서 모두 뿌리의 페놀 화합물의 함량은 MR 추출물이 34.56 mg GAE/g, CR 추출물이 27.64 mg GAE/g으로 세 가지 부위 중에 가장 높은 페놀 함량을 보였다. Kim YM(2012)의 연구에서 뽕나무를 메탄올로 추출한 부위별 추출물의 총 페놀 함량은 뿌리에서 가장 높은 함량을 보였고, 잎, 줄기, 열매의 순으로 나타나 본 연구와 결과가 일치하였다.

총 플라보노이드 함량 결과를 측정한 결과는 Table 1에 나타내었다. 건조시료 무게 당 수율 대비 총 플라보노이드 함량 측정 결과, CL(4.61 mg QE/g), ML(4.49 mg QE/g), CR(4.04 mg QE/g), CF(2.12 mg QE/g), MF(1.92 mg QE/g), MR(1.13 mg QE/g) 순으로 함량을 보여 꾸지뽕나무와 뽕나무의 잎 추출물

**Table 1. Yield, total phenolic contents and total flavonoid contents of extracts from different parts of *Cudrania tricuspidata* and *Morus alba***

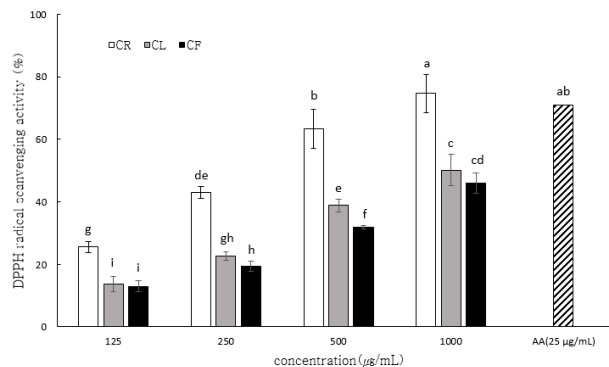
Sample	Part	Yield (%)	<sup>4)</sup> GAE/dry weight (mg/g)	<sup>5)</sup> QE/dry weight (mg/g)
<i>Cudrania tricuspidata</i> (C)	R <sup>1)</sup>	17.50	27.64±0.00	23.07±0.00
	L <sup>2)</sup>	44.50	16.00±0.00	10.35±0.00
	F <sup>3)</sup>	52.90	17.21±0.02	4.01±0.00
<i>Morus alba</i> (M)	R	20.80	34.56±0.04	5.43±0.00
	L	21.90	27.39±0.03	20.52±0.00
	F	71.36	10.92±0.01	2.69±0.00

<sup>1)</sup> R=root, <sup>2)</sup> L=leaf, <sup>3)</sup> F=fruit, <sup>4)</sup> GAE=gallic acid equivalent and <sup>5)</sup> QE=quercetin equivalent.

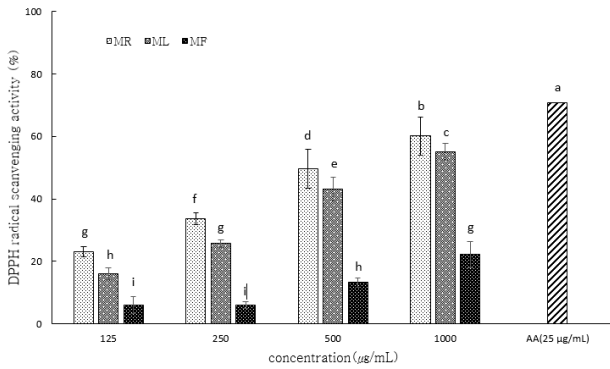
에서 총 플라보노이드 함량이 높게 나타났다. Hong & Hong (2015)은 꾸지뽕나무 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량은 잎>뿌리>열매로 함량을 나타내었다. 꾸지뽕나무에 함유된 다양한 플라보노이드는 뛰어난 항산화성을 나타내는 것으로 확인되었고, 특히 잎과 근피에 플라보노이드가 많은 것으로 알려져 있으며(Park 등 1992; Lee 등 1994; Lee SJ 2002; Chon 등 2005; Choi 등 2009), 본 연구 결과와 일치하였다. Choi 등(2009)은 이용부위와 채집시기에 다른 꾸지뽕나무의 메탄올 추출물 항산화성을 측정하였는데, 4월에 채취된 근피에서 플라보노이드 함량이 가장 높았다. 연구 결과들이 실험재료의 부위와 채취시기, 재배지역, 건조조건, 추출조건 및 표준물질의 종류 등 전처리 및 분석 조건에 따라서 결과의 차이가 있으므로 향후 연구에서 보완이 필요할 것으로 사료된다.

**2. DPPH 라디칼 소거능**

DPPH 라디칼 소거법은 항산화 물질의 전자공여능으로 인해 산화 억제의 정도를 확인하는 척도로 방법이 간단하여 항산화물질 연구에 많이 활용된다(Kwon 등 2007). 꾸지뽕나무와 뽕나무의 부위별 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. 모든 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 시험농도 내에서 농도 의존적으로 유의적으로 증가하였으며, 추출물 중 CR이 가장 높게 나타났다. 다음으로 MR, ML, CL, CF, MF의 순으로 부위는 뿌리, 잎, 열매 추출물에서 전자공여능이 강하게 나타났고, 이는 총 페놀 함량과 같은 경향으로 나타났다. Lee 등(2011) 및 Choi 등(2009)의 연구에서 꾸지뽕나무 부위별 추출물의 항산화 활성도 본 연구의 결과와 동일한 결과를 나타내었다.



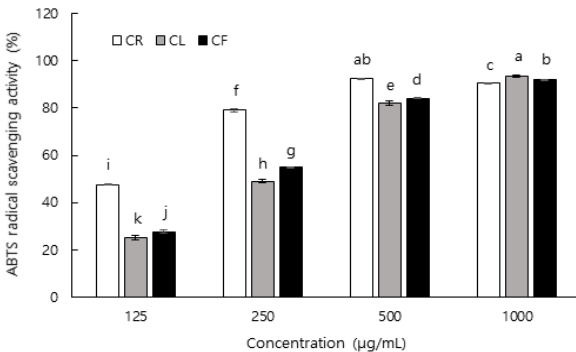
**Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of the extracts from different parts of *Cudrania tricuspidata*.** The results are presented as mean±S.D. from triplicate experiments. Different letters on the same colored bars means significantly different at  $p < 0.05$ . CR: Root of *Cudrania tricuspidata*, CL: Leaves of *Cudrania tricuspidata*, CF: Fruit of *Cudrania tricuspidata*.



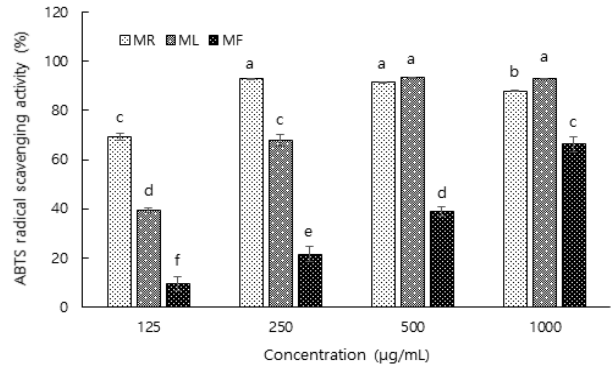
**Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of the extracts from different parts of *Morus alba*.** The results are presented as mean±S.D. from triplicate experiments. Different letters on the same colored bars means significantly different at  $p < 0.05$ . MR: Root of *Morus alba*, ML: Leaves of *Morus alba*, MF: Fruit of *Morus alba*.

**3. ABTS 라디칼 소거능**

ABTS 라디칼 소거능은 과산화칼륨의 반응에 의해 생성된 라디칼이 추출물 내 항산화 물질에 의해 제거되는 정도로 항산화 활성을 측정하는 방법이다(Re 등 1999). 꾸지뽕나무와 뽕나무의 부위별 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성은 Fig. 3 과 Fig. 4에 나타내었다. 모든 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 시험농도 내에서 농도 의존적으로 증가하였으며, 125~250 µg/mL에서는 MR이 가장 높았고, 다음으로 CR이 나타났다. 500~1,000 µg/mL에서는 열매를 제외한 모든 추출물이 80% 이상의 높은 소거활성을 보여 우수한 항산화력을 갖는 것으로 판단된다. 또한 ABTS 라디칼 소거활성은 DPPH 라디칼



**Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of the extracts from different parts of *Cudrania tricuspidata*.** The results are presented as mean±S.D. from triplicate experiments. Different letters on the same colored bars means significantly different at  $p < 0.05$ . CR: Root of *Cudrania tricuspidata*, CL: Leaves of *Cudrania tricuspidata*, CF: Fruit of *Cudrania tricuspidata*.



**Fig. 4. ABTS radical scavenging activity of extracts from different parts of *Morus alba*.** The results are presented as mean±S.D. from triplicate experiments. Different letters on the same colored bars means significantly different at  $p < 0.05$ . MR: Root of *Morus alba*, ML: Leaves of *Morus alba*, MF: Fruit of *Morus alba*.

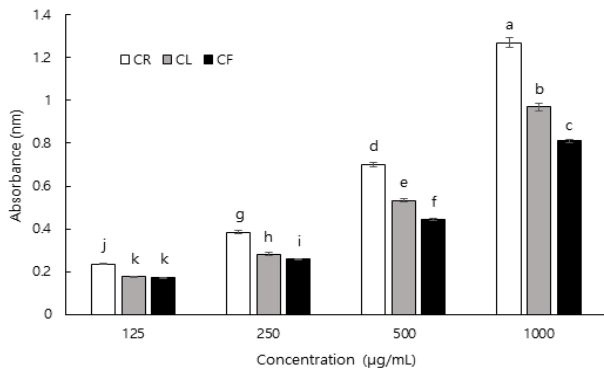
소거활성에 비하여 다소 높게 측정되었는데, 플라보노이드 등의 폴리페놀은 치환기의 위치에 따라 라디칼 소거능이 달라지며(Park & Kim 2004), ABTS 라디칼에 반응하여 제거하는 반면 DPPH 라디칼은 소거하지 못하는 경우가 보고되었다(Wang 등 1998).

**4. 환원력(FRAP) 측정**

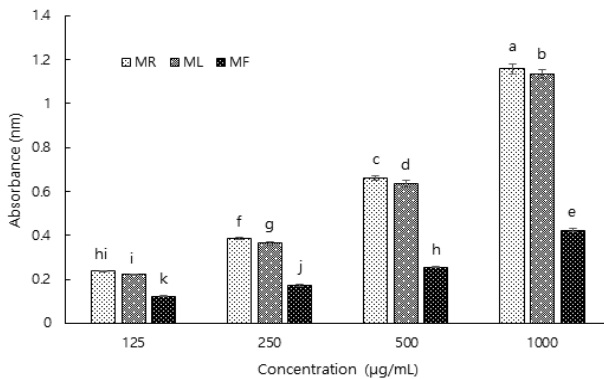
환원력은 항산화 능력을 확인할 수 있는 주요 인자로 항산화제와 같이 환원력을 가진 물질은  $Fe^{3+}$ 를  $Fe^{2+}$  형태로 환원시켜 푸른색을 띠게 한다(Kim 등 2011). 발색정도를 흡광도 수치로 확인하여 그 값이 클수록 환원력이 높은 것으로 나타난다. 꾸지뽕나무와 뽕나무의 부위별 추출물을 125~1,000 µg/mL의 농도에서 환원력을 측정한 결과, 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 5와 Fig. 6). CL보다 ML이 높게 나타났고, 부위별로는 뿌리>잎>열매 순으로 나타났다. 1,000 µg/mL에서 FRAP 값은 CF가 0.81(O.D.)로 MF의 0.42(O.D.)보다 두 배 가까이 환원력이 높게 나타났다. 또한 환원력 측정 결과는 DPPH 라디칼 소거활성과 유사한 결과의 활성능을 나타내었다.

**5. 꾸지뽕나무와 뽕나무의 잎과 뿌리 추출물의 지방세포 내 독성평가**

MTT assay는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질을 자주색을 띠는 비수용성의 결정으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용한 방법으로 세포 생존율을 측정하는 대표적인 방법이다(Carmichael 등 1987). 본 연구에서는 페놀성 화합물을 많이 함유하고 있고, 강한 항산화 활성을 나타냈던 꾸지뽕나무와 뽕나무의 잎과

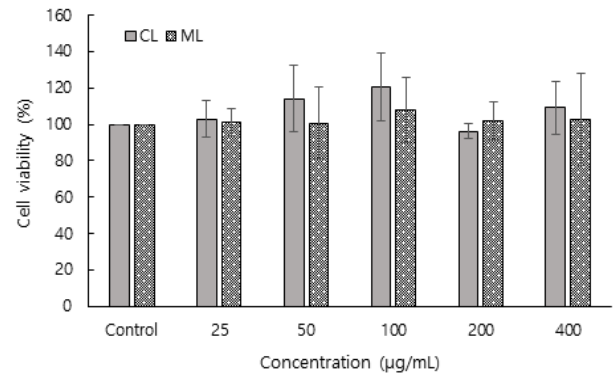


**Fig. 5.** Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of the extracts from different parts of *Cudrania tricuspidata*. The results are expressed as mean±S.D. from triplicate experiments. Different letters on the same colored bars means significantly different at  $p<0.05$ . CR: root of *Cudrania tricuspidata*, CL: Leaves of *Cudrania tricuspidata*, CF: Fruit of *Cudrania tricuspidata*.

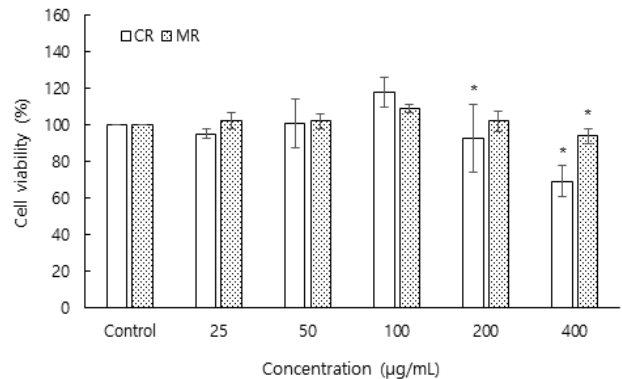


**Fig. 6.** Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of extracts from different parts of *Morus alba*. The results are expressed as mean±S.D. from triplicate experiments. Different letters on the same colored bars means significantly different at  $p<0.05$ . MR: Root of *Morus alba*, ML: Leaves of *Morus alba*, MF: Fruit of *Morus alba*.

뿌리 추출물의 25, 50, 100, 200 및 400 µg/mL 농도에서 72시간 동안 실험을 진행하였으며, 그 결과를 Fig. 7과 Fig. 8에 나타내었다. 꾸지뽕나무와 뽕나무의 잎 추출물은 400 µg/mL 농도까지 세포독성이 나타나지 않았다. 반면, 뿌리 추출물을 처리한 경우, CR은 200 µg/mL 농도부터 생존율 억제를 나타내었고, MR은 400 µg/mL 농도에서 생존율이 억제되었다. 따라서 지방 축적 저해 효과를 확인하기 위한 Oil red O 시험에서는 꾸지뽕나무와 뽕나무의 잎 추출물은 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도 범위인 25~400 µg/mL를 사용하였으며, 뿌리 추출물은 유의적으로 세포독성을 나타내지 않는



**Fig. 7.** Cell viability of the leaf extracts of *Cudrania tricuspidata* and *Morus alba* on 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 cells were treated with leaf extracts at 25, 50, 100, 200 and 400 µg/mL for 72 h. The results are presented as mean±S.D. from triplicate experiments. The significance was determined by the Student's  $t$ -test. \*  $p<0.05$  indicates statistically significant difference. CL: Leaves of *Cudrania tricuspidata*, ML: Leaves of *Morus alba*.



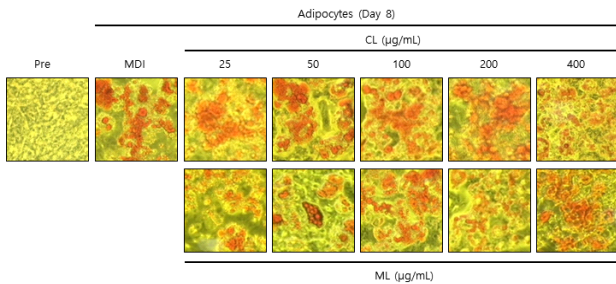
**Fig. 8.** Cell viability of the root extracts of *Cudrania tricuspidata* and *Morus alba* on 3T3-L1 preadipocytes. Cell viability was examined by MTT assay. 3T3-L1 cells were treated with root extracts at 25, 50, 100, 200 and 400 µg/mL for 72 r. Data are presented as mean±S.D. from triplicate experiments. The significance was determined by the Student's  $t$ -test. \*  $p<0.05$  indicates statistically significant difference. CR: Root of *Cudrania tricuspidata*, MR: Root of *Morus alba*.

25~100 µg/mL의 농도에서 실시하였다( $p<0.05$ ).

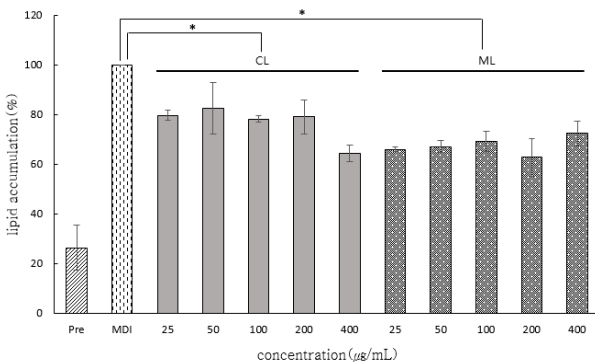
## 6. 지방전구세포 내 지질생성에 대한 꾸지뽕나무와 뽕나무의 잎과 뿌리 추출물의 효과

지방세포로의 분화과정에 생성되는 지방구는 중성지질이 축적되면서 만들어진다(Padilla-Benavides 등 2016). 중성지방은 포도당과 함께 체내 에너지원으로 사용되고, 남으면 다시

체내에 축적되어 비만의 원인이 되며, 여러 만성질환의 원인이 된다(Hafiz 등 2004; Labreuche 등 2009). 지방세포 내 지방 축적 억제 효능을 확인하기 위해 지방전구세포 분화 유도와 함께 세포독성이 관찰되지 않은 농도범위의 잎 추출물 및 뿌리 추출물을 처리하였다. 지방구를 특이적으로 염색하는 Oil red O 염색시약으로 처리하여 관찰한 결과는 잎 추출물은 Fig. 9와 Fig. 10에 나타내었고, 뿌리 추출물은 Fig. 11과 Fig. 12에 나타내었다. 추출물을 처리하지 않은 대조군(MDI)에서 추출물을 처리한 시험군에 비하여지방구의 형성이 다량으로 관찰되었다. CL과 ML 추출물을 농도별(25, 50, 100, 200 및 400 µg/mL)로 처리했을 때 대조군(MDI)에 비해 세포 내 지방의 축적이 저해되는 것이 확인되었다. CL 추출물을 처리했을 때 각각 35.5%까지 억제효과를 나타내었고, ML 추출물을 처



**Fig. 9.** Observation of lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes treated with leaf extracts of *Cudrania tricuspidata* and *Morus alba*. 3T3-L1 cells were stained with Oil Red O and then observed under microscope. CL: Leaves of *Cudrania tricuspidata*, ML: Leaves of *Morus alba*, Pre: Preadipocytes.

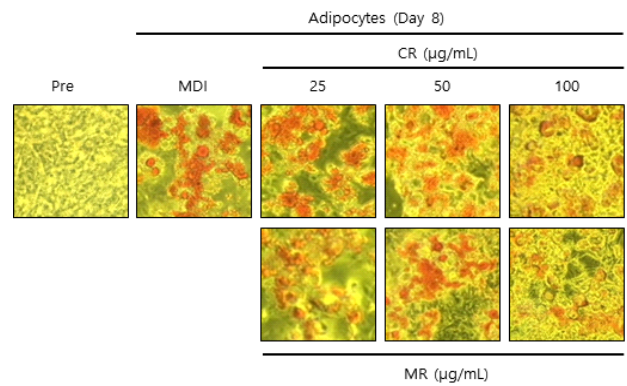


**Fig. 10.** Lipid accumulation of leaf extracts of *Cudrania tricuspidata* and *Morus alba* in 3T3-L1 adipocytes. The levels of intracellular lipids were measured by Oil Red O staining. Results are presented as mean±S.D. \*  $p < 0.05$  indicates statistically significant difference. CL: Leaves of *Cudrania tricuspidata*, ML: Leaves of *Morus alba*, Pre: Preadipocytes.

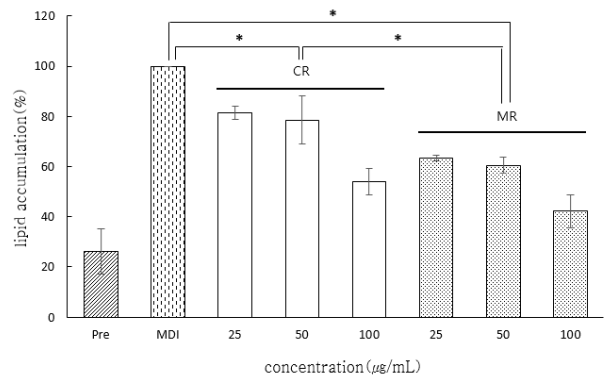
리했을 때 각각 37.3%까지 억제효과를 나타내었다(Fig. 10).

뿌리 추출물 또한 농도별(25, 50 및 100 µg/mL)로 처리하였을 때 대조군(MDI)에 비해 농도 의존적으로 지방의 축적이 저해되는 것이 확인되었다. CR 추출물 처리구는 45.9%까지 억제되는 효과를 나타내었고, MR 추출물 처리구는 각각 57.7%까지 억제되는 것이 확인되었다(Fig. 12). 본 연구에서 꾸지뽕 나무와 뽕나무 모두 잎 추출물보다 뿌리 추출물의 지방 축적 억제 효과가 우수하게 나타났다.

한편, 최근 지방세포 내 항산화 및 ROS 생성 억제 기전 연구가 다양하게 수행되고 있는데, Lee 등(2013)에 의하면 총 페



**Fig. 11.** Observation of lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes treated with root extracts of *Cudrania tricuspidata* and *Morus alba*. 3T3-L1 cells were stained with Oil Red O and then observed under microscope. CR: Root of *Cudrania tricuspidata*, MR: Root of *Morus alba*, Pre: Preadipocytes.



**Fig. 12.** Lipid accumulation of root extracts of *Cudrania tricuspidata* and *Morus alba* in 3T3-L1 adipocytes. The levels of intracellular lipids were measured by Oil Red O staining. Results are presented as mean±S.D. \*  $p < 0.05$  indicates statistically significant difference. CR: Root of *Cudrania tricuspidata*, MR: Root of *Morus alba*, Pre: Preadipocytes.

놀 함량에 비하여 총 플라보이드 함량이 지방세포 내 지질축적 및 ROS 생성에 관련이 있음이 나타났으나, 총 플라보노이드의 함량과 지방세포 내 지질 축적 및 ROS 생성 저해와의 관련성은 각각  $R=0.379(p<0.05)$ 와  $R=0.419(p<0.05)$ 로 나타나 그 관련성이 미약한 것으로 나타났다. 반면, 총 페놀 함량은 DPPH, ABTS, FRAP 항산화법과의 상관성에서 모든  $R$ 값이 0.9 이상으로 관찰되었다( $p<0.05$ ). 이는 연구결과에 의하면 폴리페놀 및 플라보노이드의 작용 기작이 다르기 때문에 판단된다.

본 연구 결과를 바탕으로 비만예방 및 관련 질환 개선을 위한 기능성 소재로서 가능성을 나타내는 것으로 사료되나, 실제로 개발 및 적용을 위해서는 꾸지뽕나무와 뽕나무의 부위별 유효성분 분석이 필요할 것으로 사료되며, 에너지 대사 및 신호전달계와 관련된 항비만 기전에 대한 생리화학적 해석과 지방세포 내 항산화 기전에 대한 연구가 수행되면 좋을 것으로 판단된다.

## 요약 및 결론

본 연구에서는 꾸지뽕나무와 뽕나무 부위별 추출물의 항산화 활성을 측정하였고, 효과가 뛰어난 잎과 뿌리 추출물에서 지질 축적 억제 효과를 알아보았다. 총 페놀 함량은 꾸지뽕나무와 뽕나무의 부위별 추출물 중 뿌리에서 높게 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 꾸지뽕나무와 뽕나무의 부위별 추출물의 뿌리 및 잎에서 높게 나타났다. 항산화 활성을 알아보기 위해 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성, FRAP 법을 이용하여 각각 측정하였으며, 125~1,000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도 의존적으로 활성이 증가하였다. 꾸지뽕나무와 뽕나무의 세포 생존을 측정에서 잎 추출물은 25, 50, 100, 200 및 400  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 세포독성을 나타내지 않았고, 뿌리 추출물은 세포독성을 나타내지 않은 25, 50 및 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 실험을 진행하였다. Oil red O 염색 결과 잎 추출물을 처리한 시험관에서 지방세포 내 중성지방 축적이 억제되는 것이 나타났다. 특히 뿌리 추출물 처리군의 지방세포 내 중성지방 생성은 대조군에 비해 농도 의존적인 억제를 나타내었으며, 잎 추출물보다 지방 축적 억제 효과가 크게 나타났다. 이상의 연구 결과는 꾸지뽕나무와 뽕나무 부위별 추출물에서 뿌리와 잎이 항산화 및 항비만 효과가 있는 천연 기능성소재로 활용될 수 있는 가능성을 나타내어 향후 이를 활용한 식품 개발에 기초 자료로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 논문은 덕성여자대학교 2017년 교내연구 지원에 의해

이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## References

- Ahn EK, Lee JA, Seo DW, Hong SS, Oh JS. 2012. 1 $\beta$ -hydroxy-2-oxopomolic acid isolated from *Agrimonia pilosa* extract inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Biol Pharm Bull* 35:643-649
- Beecher GR. 2003. Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 133:3248S-3254S
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936-942
- Cha JY, Kim HJ, Cho YS. 2000. Effect of water-soluble extract from leaves of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid peroxidation in tissues of rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29:531-536
- Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Kim DH, Ryu J, Choi DG, Park HM. 2009. Antimicrobial activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to the parts harvested and time. *Korean J Med Crop Sci* 17:335-340
- Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Kim DH, Ryu J. 2009. Antioxidant activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to harvesting parts and time. *Korean J Med Crop Sci* 17:115-120
- Choi SW, Lee YJ, Ha SB, Jeon YH, Lee DH. 2015. Evaluation of biological activity and analysis of functional constituents from different parts of mulberry (*Morus alba* L.) tree. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44:823-831
- Chon IJ, Lee SW, Cha JH, Han JH, Whang WK. 2005. Antioxidant compounds of *Cudrania tricuspidata* leaves. *Yakhak Hoeji* 49:416-421
- Enkhmaa B, Shiwaku K, Katsube T, Kitajima K, Anuurad E, Yamasaki M, Yamane Y. 2005. Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 135:729-734
- Fujimoto T, Nomura T. 1985. Components of root bark of



- Cudrania tricuspidata* 3. Isolation and structure studies on the flavonoids. *Planta Med* 51:190-193
- Fukuzawa K, Takaishi Y. 1994. Antioxidants. *J Act Oxyg Free Rad* 1:55-70
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114:1752-1761
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *JAOCS* 58:966-968
- Hafiz MS, Arslan MI, Banarjee S, Obaidullah M. 2004. Studies on serum triglyceride level in patients with myocardial infarction. *Mymensingh Med J* 13:185-187
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16:33-50
- Hong MH, Hong CH. 2015. Research of functional components and antioxidant capacity by extract solvents from *Aralia eleta* Seemann and *Cudrania tricuspidata*. *Korean Acad Foodservice Indus Manag* 11:77-90
- Jeon YS, Kim MW. 2011. The antioxidative effects and isolation and characterization of the extracts from *Morus alba* L. *Korean J Food Nutr* 24:94-100
- Jang M, Choi HY, Kim GH. 2018. Inhibitory effects of *Orostachys malacophyllus* var. *iwarenge* extracts on reactive oxygen species production and lipid accumulation during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Food Sci Biotechnol* 28:227-236
- Kang DG, Hur TY, Lee GM, Oh H, Kwon TO, Sohn EJ, Lee HS. 2002. Effects of *Cudrania tricuspidata* water extract on blood pressure and renal functions in NO-dependent hypertension. *Life Sci* 70:2599-2609
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36:333-338
- Kim IH, Jeong CH, Park SJ, Shim KH. 2011. Nutritional components and antioxidative activities of jujube (*Zizyphus jujuba*) fruit and leaf. *Korean J Food Preserv* 18:341-348
- Kim SH, Kim NJ, Choi JS, Park JC. 1993. Determination of flavonoid by HPLC and biological activities from the leaves of *Cudrania tricuspidata* Bureau. *J Korean Soc Food Nutr* 22:68-72
- Kim YM. 2012. Chemical components and physiological activities of different part from mulberry (*Morus alba*). *Food Ind Nutr* 17:28-35
- Kwon GJ, Choi DS, Wang MH. 2007. Biological activities of hot water extracts from *Euonymus alatus* leaf. *Korean J Food Sci Technol* 39:569-574
- Labreuche J, Touboul PJ, Amarenco P. 2009. Plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis: A systematic review of the epidemiological studies. *Atherosclerosis* 203:331-345
- Lee BW, Kang NS, Park KH. 2004. Isolation of antibacterial prenylated flavonoids from *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47:270-273
- Lee HJ, Do JR, Kwon JH, Kim HK. 2011. Physiological activities of extracts from different parts of *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:942-948
- Lee IK, Kim CJ, Song KS, Kim HM, Koshino H, Uramoto M, Yoo ID. 1996. Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. *Phytochemistry* 41:213-216
- Lee IK, Song KS, Kim CJ, Kim HM, Oh GT, Yoo ID. 1994. Tumor cell growth inhibition and antioxydative activity of flavonoids from the stem bark of *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Agric Chem Biotech* 37:105-109
- Lee OH, Seo MJ, Choi HS, Lee BY. 2012. Pycnogenol<sup>®</sup> inhibits lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes with the modulation of reactive oxygen species (ROS) production associated with antioxidant enzyme responses. *Phytother Res* 26:403-411
- Lee SJ. 2002. Antioxidative activity of flavonoid compounds from *Cudrania tricuspidata* root bark. Master Thesis, Jungang Univ. Seoul. Korea
- Lee YJ, Kim DB, Lee JS, Cho JH, Kim BK, Choi HS, Lee BY, Lee OH. 2013. Antioxidant activity and anti-adipogenic effects of wild herbs mainly cultivated in Korea. *Molecules* 18:12937-12950
- Lee YJ, Kim S, Lee SJ, Ham I, Whang WK. 2009. Antioxidant activities of new flavonoids from *Cudrania tricuspidata* root bark. *Arch Pharm Res* 32:195-200
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71:109-114
- Ni G, Zhang QJ, Wang YH, Chen RY, Zheng ZF, Yu DQ. 2010. Chemical constituents of the stem bark of *Morus cathayana*. *J Asian Nat Prod Res* 12:505-515
- Padilla-Benavides T, Velez-delValle C, Marsch-Moreno M, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. 2016. Lipogenic enzymes complexes and cytoplasmic lipid droplet formation

- during adipogenesis. *J Cell Biochem* 117:2315-2326
- Park IC, Young HS, Choi JS. 1992. Constituents of *Cudrania tricuspidata* in Korea. *Yakhak Hoeji* 36:40-45
- Park JH, Lee KW, Sung KS, Kim SS, Cho KD, Lee BH, Han CK. 2012. Effect of diets with mulberry leaf and *Cudrania tricuspidata* leaf powder supplements on blood glucose-related biomarkers in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:766-773
- Park SH, Kim KS. 2004. Isolation and identification of antioxidant flavonoids from *Salicornia herbacea* L. *J Kor Soc Appl Biol Chem* 47:120-123
- Park YY, No JS, Lee KS. 2001. Hypoglycemic effect of *Cudrania tricuspidata* root bark. *Korean J Pharmacogn* 32:248-252
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 26:1231-1237
- Rosen ED, MacDougald OA. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:885-896
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14:1293-1307
- Russo GL. 2007. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 74:533-544
- Seo MJ, Choi HS, Lee OH, Lee BY. 2013. *Grateloupia lanceolata* (Okamura) Kawaguchi, the edible red seaweed, inhibits lipid accumulation and reactive oxygen species production during differentiation in 3T3-L1 cells. *Phytother Res* 27:655-663
- Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, Lavoie EJ, Huang TC, Ho CT. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 46:4869-4873
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64:555-559

---

Received 13 March, 2019

Revised 11 April, 2019

Accepted 17 April, 2019