

국내산 곰취(*Ligularia fischen*) 추출물의 항산화 활성

임현지^{1,*} · 이해진² · 임미혜^{3,†} · 정문정⁴

¹대전대학교 미용의학과, 강사
²대전대학교 뷰티건강관리학과, 강사
³대전대학교 뷰티건강관리학과, 교수
⁴(주)피프틴디그리즈

(2021년 10월 22일 접수: 2021년 12월 24일 수정: 2021년 12월 24일 채택)

Antioxidant Activity of Korean Gomchwi (*Ligularia fischen*) Extracts

Hyun-Ji Lim^{1,*} · Hea-Jin Lee² · Mi-Hye Lim^{3,†} · Moom-Jung Jung⁴

¹Department of Beauty Medical, Daejeon University (Lecturer)
²Department of Beauty Healthcare, Daejeon University (Lecturer)
³Department of Beauty Healthcare, Daejeon University (Professor)
⁴15 Degrees Corporation

(Received October 22, 2021; Revised December 24, 2021; Accepted December 24, 2021)

요약 : 본 연구는 강원도 태백시에서 관리 재배된 국내산 곰취(*Ligularia fischen*)의 70% 에탄올 추출물(LFE)을 활용하여 항산화 활성을 확인하였다. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정하였으며, DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. 세포독성 측정 후, NO 생성량을 측정하였으며, 관련 유전자인 *NOS2*의 발현량을 측정하여 그 결과를 확인하였다. LFE의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 113.97 ± 0.37 mg GAE/g과 29.22 ± 2.06 mg QE/g으로 확인되었다. DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, LFE 25 μ g/ml $11.26 \pm 0.95\%$, 50 μ g/ml $17.12 \pm 0.63\%$, 100 μ g/ml $29.54 \pm 0.36\%$, 250 μ g/ml $68.31 \pm 0.28\%$, 500 μ g/ml $75.12 \pm 0.05\%$ 및 1000 μ g/ml $75.75 \pm 1.57\%$ 로 라디칼 소거능을 나타냈으며, ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과, LFE 25 μ g/ml $13.75 \pm 0.21\%$, 50 μ g/ml $26.71 \pm 0.20\%$, 100 μ g/ml $56.92 \pm 0.22\%$, 250 μ g/ml $91.30 \pm 0.12\%$, 500 μ g/ml 93.40 ± 0.02 및, 1000 μ g/ml $93.19 \pm 0.04\%$ 로 라디칼 소거능을 나타냈다. LFE의 유의한 세포독성은 나타나지 않았다. NO 생성량은 LFE 50 μ g/ml $79.40 \pm 2.64\%$, 100 μ g/ml $55.01 \pm 5.36\%$, 200 μ g/ml $30.93 \pm 3.11\%$ 로 유의적인 감소가 나타났으며, *NOS2* 유전자 발현량은 LFE 50 μ g/ml 0.94 ± 0.11 , 100 μ g/ml 0.59 ± 0.05 , 200 μ g/ml 0.32 ± 0.04 로 유의적인 감소가 나타났다. 본 결과는 곰취의 항산화 효능을 객관적으로 확인하였으며, 향 후 지속적인 심화 연구를 통해 본 곰취를 활용하여 화장품 및 기능성 식품 소재로서의 활용 가능성을 확립할 수 있을 것이라 사료된다.

주제어 : 곰취, 항산화, 활성산소, 천연화장품, 천연원료

[†]Corresponding author
(E-mail: beautyl@dju.kr)

Abstract : In this study, Gomchwi (*Ligularia fischen*) derived from Taebaek-si, Gangwon-do was extracted with 70% ethanol (LFE) and antioxidant activity was measured. The following experimental techniques were used to evaluate the antioxidant efficacy of LFE. Total phenolic contents, ABTS/DPPH radical scavenging analysis, cell viability assay, NO assay, and quantitative real-time PCR technique. The content of polyphenol and flavonoid was each 113.97 ± 0.37 mg GAE/g or 29.22 ± 2.06 mg QE/g in LFE. DPPH radical scavenging activity was measured to be 25 $\mu\text{g/ml}$ $11.26 \pm 0.95\%$, 50 $\mu\text{g/ml}$ $17.12 \pm 0.63\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ $29.54 \pm 0.36\%$, 250 $\mu\text{g/ml}$ $68.31 \pm 0.28\%$, 500 $\mu\text{g/ml}$ $75.12 \pm 0.05\%$, and 1000 $\mu\text{g/ml}$ $75.75 \pm 1.57\%$. In addition, ABTS radical scavenging activity was identified as LFE 25 $\mu\text{g/ml}$ $13.75 \pm 0.21\%$, 50 $\mu\text{g/ml}$ $26.71 \pm 0.20\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ $56.92 \pm 0.22\%$, 250 $\mu\text{g/ml}$ $91.30 \pm 0.12\%$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 93.40 ± 0.02 , and 1000 $\mu\text{g/ml}$ $93.19 \pm 0.04\%$. There was no significant cytotoxicity of LFE. NO production was significantly decreased to LFE 50 $\mu\text{g/ml}$ $79.40 \pm 2.64\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ $55.01 \pm 5.36\%$, and 200 $\mu\text{g/ml}$ $30.93 \pm 3.11\%$. Also, the *NOS2* gene expression was significantly reduced to LFE 50 $\mu\text{g/ml}$ 0.94 ± 0.11 , 100 $\mu\text{g/ml}$ 0.59 ± 0.05 , and 200 $\mu\text{g/ml}$ 0.32 ± 0.04 . This result objectively confirmed the antioxidant effect of Gomchwi. We will continue to conduct in-depth research. Therefore, it is believed that the possibility of using Gomchwi as a cosmetic and functional food material can be established.

Keywords : *Ligularia fischen*, Antioxidant, Free radical, Natural cosmetic, Raw material

1. 서론

국내에 자생하고 있는 식용 가능한 식물은 480여 종으로 식품학적으로 가치가 있는 산채로는 약 90여 종이 있으며, 이 중 재배가 이루어져 상업적으로 활용되고 있는 것은 약 37종으로 보고되어 있다[1]. 곰취(*Ligularia fischeri*)는 유럽과 아시아에 10여 종이 분포하는 가운데 9종이 우리나라의 품종으로 왕곰취, 큰곰취 또는 웅소(雄蔬)라고도 불리며, 국화과(菊花科)에 속하는 다년생 초본식물이다[2]. 곰취는 각종 비타민과 무기질을 고루 함유하고 있는데 특히 비타민A, β -carotene, 칼슘, 칼륨, 섬유소를 비롯하여 철분이 다른 산채 식물보다 매우 높게 함유하고 있다고 보고된 바 있다[3]. 또한 곰취의 아미노산 총량은 약 35.62 mg/g으로 glutamic acid, aspartic acid, glycine 및 alanine이 높은 비율을 차지하고, 8개의 필수아미노산 중 threonine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine 및 lysine은 전체 아미노산 함량 중 상당 부분을 구성하고 있다고 보고되었다[2, 4]. 한의학적인 측면으로 곰취는 기침, 가래 및 천식과 같은 기관지에 효험이 좋고 요통 및 두통과 같은 통증을 완화하고 혈액순환을 활발하게 한다고 알려져 있으며, 민간요법에서는 황달, 고혈압 및 세균에 감염되어 고름이

나오는 피부병에 사용되어 온 것으로 알려져 있다[5]. 곰취와 같은 산채는 산간 지역 기준으로 수익성이 높으며, 다양한 생리활성 기능 성분 연구가 활발하여 천연원료를 통한 기능성 식품, 천연 화장품 및 생약 의약품 등의 다양한 분야에서 활용되고 있다[1]. 그러나 같은 종의 식물이라도 재배 지역의 기후, 고도 및 토양의 품질 등에 따라 그 효능이 다르게 나타날 수 있으며, 같은 재배지의 환경이더라도 재배 방법과 인위적인 환경에 따라 차이를 나타내며도 불구하고 현재 연구의 경향은 품종에 대한 기능성에 집중되어 있으며[6-7], 원료의 표준화를 위한 고유 원료의 지속적인 연구에 대해서는 거의 이루어지지 않고 있다. 본 연구에 사용된 곰취는 대한민국 강원도 태백시의 농업회사법인태백농업(주)의 관리를 통해 일정한 환경에서 재배하였으며, 일관된 품질을 보유하여 향 후 화장품 및 식품 등의 안정적인 공급을 위한 신뢰를 향상시키기 위함과 동시에 곰취를 향산화 소재로 활용하고자 연구를 수행하였다.

식물에는 페놀 화합물과 비타민 등 약리작용이 우수한 성분이 있으며, 항산화에 효과적이라는 것이 밝혀짐에 따라 천연 항산화제 연구에 관심이 높아지고 있다[8-9]. 인간이 호흡하는 동안 에너지를 생산하는 과정에서 산소 중 일부가 활성산소로 전

환되기도 하고 습관적인 요인 또는 환경적인 요인에 의하여 활성산소가 생성되기도 한다[10]. 활성산소는 외부 항원으로부터 인체를 방어하고 세포의 성장을 돕는 역할을 하는 등의 정상적인 기능을 하는 필수적인 요소이지만, 과도한 발생 및 소거되지 못하여 축적되는 경우 잔존하게 되어 산화적스트레스를 야기하게 된다[11]. 산화적스트레스는 노화의 대표적인 원인으로 알려져 있으며, 그 밖에도 색소 침착, 단백질 손상, 대사활동의 이상 심혈관계질환 및 각종 암과 같은 질환을 야기하는 원인이 된다[10]. 또한 산화적 손상은 염증의 원인이 되어 산화질소(nitric oxide) 및 염증성 인자의 생성을 촉진시키며, 심한 경우 만성적인 염증단계로 악화시키게 된다[12]. 이를 해결하기 위하여 화장품, 식품, 의약품 등 다양한 제품이 개발되어 공급되었으나 합성 항산화제의 부작용이 밝혀지면서 점차적으로 천연 항산화제의 수요가 늘고 있다[13-14]. 천연 항산화제 연구의 관심은 높아지고 있고 다양한 국가적 지원에도 불구하고 천연물의 특성상 원료의 규격화가 어려워 일회성 연구에 국한되고 있는 실정이다[15]. 따라서 본 연구는 관리 재배된 곰취를 활용하여 원료를 규격화하여 신뢰도 높은 원료의 연구와 활용에 더하여 항산화 활성 기초연구를 진행하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 추출

본 실험에 사용한 곰취(*Ligularia fischen*)는 강원도 태백시 농업회사법인태백농업(주)의 정선을 통해 (주)피프틴디그리스로부터 원물을 공급받아 사용되었으며, 곰취 40 g 당 70% 에탄올 500 ml를 넣고 3시간 동안 환류 추출한 후, Whatman No.2를 이용하여 여과하였다. 여과액을 rotary vacuum evaporator (EYELA FDU-540, Japan)로 감압 농축하였으며, 농축된 용액을 freeze dryer (Ilshinbiobase, Korea)로 동결 건조하였다. 곰취 에탄올 추출물(*Ligularia fischen* ethanol extract 이하, LFE)은 3.84 g (수율 9.60%)의 분말을 획득하여 초저온 냉동고(-80°C)에서 보관하여 실험에 필요한 농도로 증류수에 희석해 사용하였다.

2.2. 총 폴리페놀 함량

LFE 20 mg/ml의 농도 1 ml에 50% foiln-

ciocalteu's phenol reagent (Merck, Germany) 0.5 ml를 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 반응용액에 Na₂CO₃ 포화용액 1 ml와 7.5 ml 증류수를 차례로 혼합하여 30분간 정치시킨 뒤, 14,000 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 760 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid (Sigma, USA)를 표준물질로 이용하여 작성한 검량선에 따라 함량을 구하였으며, 측정 단위로는 GAE (gallic acid equivalent)/g을 사용하였다.

2.3. 총 플라보노이드 함량

LFE 20 mg/ml의 농도 0.1 ml과 80% 에탄올 0.9 ml을 혼합한 혼합물 0.5 ml에 10% aluminium nitrate (Sigma, USA), 1M potassium acetate (Sigma, USA) 0.1 ml 및 80% 에탄올 4.3 ml을 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, quercetin (Sigma, USA)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였으며, 측정 단위로는 QE (Quercetin equivalent)/g을 사용하였다.

2.4. ABTS 라디칼 소거율 측정

ABTS 용액은 7.4 mM 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS; Sigma, USA)와 2.6 mM potassium persulphate (Sigma, USA)를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온(ABTS^{•+})을 형성시킨 다음 732 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하였다. 희석된 ABTS^{•+} 용액 150 μl와 LFE의 최종 농도가 25, 50, 100, 250, 500, 1000 (μg/ml)의 농도가 되게 5 μl씩 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$ABTS \text{ Radical Scavenging Activity}(\%) = 1 - \frac{(Control \ OD - Sample \ OD)}{Control \ OD} \times 100$$

2.5. DPPH 라디칼 소거율 측정

에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH; Sigma, USA) 용액 150 μl와 LFE의 최종 농도가 25, 50, 100, 250, 500, 1000 (μg/ml)의 농도가 되게 100 μl씩 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 517

nm에서 흡광도를 측정하였고 시료의 대조군은 증류수를 넣었으며, DPPH 용액의 대조군으로써는 에탄올을 넣어 보정값을 얻었다. DPPH 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{DPPH Radical Scavenging Activity(\%)} = \frac{(\text{Control OD} - \text{Sample OD})}{\text{Control OD}} \times 100$$

2.6. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 세포는 한국 세포주 은행(KCLB, Korea)에서 분양받아 10% 우태아혈청(FBS; Gibco, USA)과 1% antibiotics (A/A) (Gibco, USA)로 조성된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco, USA)으로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. Raw 264.7 세포는 96 well plate에 2×10⁴ cells/well씩 분주하여 24시간 동안 배양한 후, LFE를 50, 100, 200 및 400 (μg/ml)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea)을 사용하여 세포 생존율을 측정하였으며, 백분율로 값을 나타내었다.

2.7. NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 24 well plate에 4×10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 50, 100 및 200 (μg/ml) 농도의 LFE를 처리하고 2시간 후, 100 ng/ml의 LPS를 하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 96 well plate에 세포배양액 100 μl를 넣고 N1 buffer 50 μl를 추가하여 상온에서 10분간 반응시켰으며, 반응 후 N2 buffer 50 μl를 추가하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 반응 후, 540 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 생성량을 백분율로 표시하였다.

2.8. 유전자 발현량 측정

RAW 264.7 세포는 6 well plate에 2×10⁶

cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 50, 100 및 200 (μg/ml) 농도의 LFE를 처리하고 2시간 후, 100 ng/ml의 LPS를 하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 total RNA prep kit (Intronbio, Korea)의 매뉴얼에 따라 RNA를 추출하였고 accupower cyclescript RT premix (Bioneer, Korea)의 매뉴얼에 따라 역전사 반응을 수행하였다. 합성이 완료된 cDNA를 증폭시키기 위하여 real-time PCR을 진행하였으며, real-time 전용 tube에 cDNA 1 μl, 각 primer 2 μl, SYBR Green (Qiagen, Germany) 10 μl, DEPC-DW (Bioneer Co., Korea) 5 μl씩 넣어 95°C에서 2분 동안 반응한 다음 95°C에서 5초, 62.5°C에서 30초를 40회 반복하여 진행하였다. 사용된 primer는 Table 1과 같다. 반응 후 유전자 발현량은 대조군에 대한 상대값으로 계산하였다.

2.9. 통계처리

본 연구에서 얻어진 결과는 SPSS 21.0를 이용하여 mean ± standard error of mean으로 나타내었으며, ANOVA를 사용하여 다중 비교하였고 Tukey's HSD test를 통해 p<0.05, p<0.01 및 p<0.001 수준에서 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

페놀계 화합물은 특수한 색을 부여하는 것으로 한 분자 내에 phenolic hydroxyl (OH)를 2개 이상 가지고 있는 방향족 화합물이고 플라보노이드 등을 주성분으로 하며, 산화의 초기에 유리기들이 안정된 화합물을 형성하도록 하여 산화를 억제하는 작용을 한다[16]. 페놀 화합물은 그 종류와 함량에 따라 항산화 활성에 미치는 영향이 달라진다. 특히 폴리페놀은 산화 손상과 관련된 자유라디칼에 대한 소거제로 알려져 있고, 플라보노이드

Table 1. The Sequences of Primers

Gene name	F/R*	Sequences
NOS2	F	CGAAACGCTTCACTTCCAA
	R	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
ACTB	F	AACCGCATTGCCTCTGAAT
	R	CATGTTCCAGGAGGATGGAG

를 함유한 식물은 강력한 항산화 효능이 있는 것으로 보고되었으며, 각각 함량이 증가할수록 항산화 효능이 증가하는 것으로 보고되었다[17-18]. LFE의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정된 결과, 총 폴리페놀은 113.97 ± 0.37 mg GAE/g으로 측정되었으며, 플라보노이드는 29.22 ± 2.06 mg QE/g으로 측정되었다. 선행연구를 통해 국내 다른 지역 곰취의 폴리페놀과 플라보노이드 함량 비교를 하고자 하였으나 추출용매 또는 추출 방법 및 기준 시약의 차이로 인해 정확한 우열성을 나타내기는 객관성이 부족하다고 판단되며, 국내 재배하고 있는 곰취를 같은 조건에서 추출하여 함량 분석을 해야 할 필요성이 있다고 사료된다[19-20]. 그러나, 폴리페놀은 항산화 외에도 고혈압 억제, 항암 및 충치 예방 등의 다양한 생리활성 작용이 있는 것으로 알려져 있고 플라보노이드는 혈관질환을 비롯하여 동맥경화, 혈전증 및 각종 암에 관여하는 지질 과산화를 조절하는 2차 대사 산물로 알려져 있으므로 LFE의 함량 수준에서 추가적인 효능연구의 가능성을 확인할 필요가 있을 것으로 판단된다[21-22].

3.2. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능에 미치는 영향

LFE의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 25 $\mu\text{g/ml}$ $11.26 \pm 0.95\%$, 50 $\mu\text{g/ml}$ $17.12 \pm 0.63\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ $29.54 \pm 0.36\%$, 250 $\mu\text{g/ml}$ $68.31 \pm 0.28\%$, 500 $\mu\text{g/ml}$ $75.12 \pm 0.05\%$ 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ $75.75 \pm 1.57\%$ 로 농도가 증가할수록 라디칼 소거능이 증가하였으며(Fig. 1-A), LEF의

IC₅₀은 211.32 $\mu\text{g/ml}$ 로 확인되었다. ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과, 25 $\mu\text{g/ml}$ $13.75 \pm 0.21\%$, 50 $\mu\text{g/ml}$ $26.71 \pm 0.20\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ $56.92 \pm 0.22\%$, 250 $\mu\text{g/ml}$ $91.30 \pm 0.12\%$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 93.40 ± 0.02 및, 1000 $\mu\text{g/ml}$ $93.19 \pm 0.04\%$ 로 농도가 증가할수록 라디칼 소거능이 증가하였으며(Fig. 1-B), LEF의 IC₅₀은 94.34 $\mu\text{g/ml}$ 로 확인되었다. 본 결과는 농도에 따라 소거율이 증가하여 고농도에서는 대조군인 ascorbic acid 보다 라디칼 소거능이 높게 나타났다. 양양군에서 채취된 곰취 추출물 연구에서의 라디칼 소거능의 경우 이와 유사한 결과가 나타났으며[20], 이러한 경향성을 보았을 때, 곰취의 재배 지역의 차이보다는 곰취 품종 특성에 기인한 것으로 판단된다. 또한 라디칼의 감소율이 항노화의 척도로서 알려져 있는바 라디칼 소거율 결과에 따라 항노화 관련 인자의 활성에도 영향을 미칠 것이라는 가능성을 기대해 볼 수 있을 것으로 사료된다[23].

3.4. 세포 생존율에 미치는 영향

세포 생존율을 측정한 결과, LFE 50 $\mu\text{g/ml}$ $102.30 \pm 7.83\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ $101.40 \pm 6.10\%$, 200 $\mu\text{g/ml}$ $104.50 \pm 4.77\%$, 400 $\mu\text{g/ml}$ $94.16 \pm 1.25\%$ 로 세포 생존율이 확인되었다(Fig. 2). 세포 생존율이 90% 이하의 경우 독성이 있다고 판단하여 실험 조건에서 제외하고 있으나, 본 연구에서는 독성이 없는 농도에서의 효능만을 확인하기 위하여 LFE 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 연구를 수행하였다. 또한 ascorbic acid 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 함께 확인하여 비교군으로 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 2).

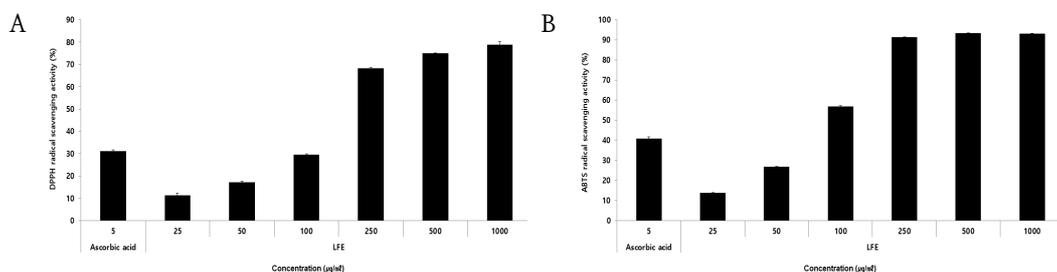


Fig. 1. DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activity of LFE. LFE were incubated at concentration of 5, 50, 100, 250, 500, and 1000 ($\mu\text{g/ml}$). The result were presented by the mean \pm S.D from three independent experiments.

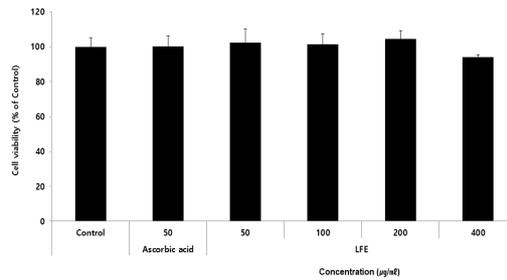


Fig. 2. Cell viability of LFE in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell were treated 50, 100, 200, and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LFE for 12 h. Cell viability were calculated as percentage relative to the control. The result were presented by the mean \pm S.D from three independent experiments.

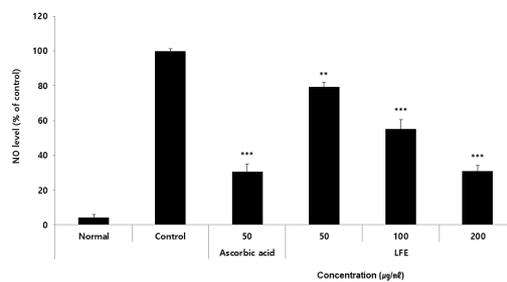


Fig. 3. Effect of LFE on NO level in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell were treated 50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LFE with 100 ng/ml LPS for 24 h. The result were presented by the mean \pm S.D from three independent experiments (Significance of results, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control).

3.5. NO 생성량에 미치는 영향

NO는 인체에서 세포내 신호분자로 작용하여 세균과 종양을 제거하며, 혈압을 조절하고 신경 전달을 매개하는 역할을 하는 인자이다[12]. 그러나 높은 수준에서의 NO는 유전자의 변이 및 조직의 손상과 같은 치명적인 영향을 미치며, 혈관 투과성을 증가시켜 부종을 유발하고 과도한 염증을 유발하여 장기적으로는 만성 염증으로의 발전에 관여하게 된다[24]. 산화적 환경이 지속되면 NO는 체내에서 높은 수준을 유지하게 되며, 산화적 손상과 더불어 과도한 염증을 심화시키는 역할을 하게 된다[16]. 본 연구에서 LFE에 의한 NO 생성량은 대조군은 기준으로 백분율로 계산하였으며, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 79.40 \pm 2.64%**, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 55.01 \pm 5.36%***, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 30.93 \pm 3.11%***로 농도에 따라 유의적인 감소가 나타났다(Fig. 3). NO의 경우 산화력이 뛰어난 물질이므로 NO 생성량을 억제할 수 있다는 점은 LFE가 라디칼 소

거능 결과를 뒷받침하여 항산화력이 있다는 점을 강조할 수 있으며, 나아가 NO는 염증 유발과 관련되어 있다는 점을 고려한다면 앞으로 LFE의 염증 억제 작용에 관한 연구가 요구될 것으로 판단된다.

3.6. NOS2 유전자 발현량에 미치는 영향

NOS2는 특정 자극이 있어야만 전사되어 발현되므로 inducible NOS (iNOS)라고 하기도 한다. 보통 때는 발현되어 있지 않으나 일단 발현되면 많은 양(micromole)의 NO를 수 시간에서 수일 동안 생성한다[25]. iNOS에서 생성된 NO는 주로 면역반응 조절 및 세포독성에 관여하는데 단독일 때 보다 superoxide (O_2^-)와 반응하여 peroxynitrite (ONOO^-)를 생성하게 될 경우, 세포독성이 더욱 크게 나타나며, superoxide의 경우도 NO와 반응하여 peroxynitrite를 형성할 경우, 세포독성이 더 크게 나타난다[26]. 그러나

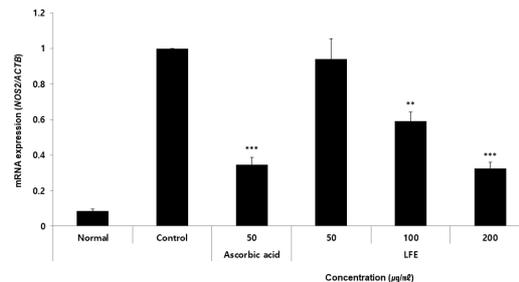


Fig. 4. Effect of LFE on *NOS2* mRNA expression level in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell were treated 50, 100, and 200 $\mu\text{g/ml}$ of LFE with 100 ng/ml LPS for 24 h. The result were presented by the mean \pm S.D from three independent experiments (Significance of results, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control).

superoxide 또는 NO 중 어느 한쪽을 감소시키면 peroxynitrite의 생성억제로 세포독성을 경감시킬 수 있으며, superoxide를 포함한 reactive oxygen species의 생성 역시 감소시킬 수 있다고 보고되었다[27]. 본 연구에서 LFE에 의한 *NOS2* 유전자 발현량은 대조군을 1로 하여 상대값으로 계산하였으며, LFE 50 $\mu\text{g/ml}$ 0.94 ± 0.11 , 100 $\mu\text{g/ml}$ $0.59 \pm 0.05^{**}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ $0.32 \pm 0.04^{***}$ 로 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 유의적인 감소가 나타났다 (Fig. 4). 결과를 통해 LFE는 NO 생성보다 전 단계인 *NOS2* 유전자 발현 단계에 더 큰 영향을 미치면서 효과적으로 항산화 효능을 보일 수 있을 것이라 사료되며, 항산화 관련 기전의 추가적인 연구를 통해 명확한 항산화 효능에 대한 객관적 자료가 보강되면 항산화 소재로서의 가능성은 더 높을 수 것으로 여겨진다.

본 연구에 사용된 곰취는 장기 공급 가능한 국내산 천연물 자원으로서 항산화 활성에 대한 객관적인 결과를 얻었다. 그러나 지속적인 품질 안정성과 재배환경 관리 및 정밀한 공정방법을 유지함을 비롯하여 추가적인 효능평가 연구가 이루어져야 더 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 지속적인 심화 연구를 통해 본 곰취를 활용하여 화장품 및 기능성 식품 소재로서의 활용 가능성을 확립할 수 있을 것이라 사료된다.

4. 결론

본 연구는 강원도 태백시에서 관리 재배된 국내산 곰취(*Ligularia fischen*)의 에탄올 추출물

(LFE)을 활용하여 항산화 활성을 확인하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다. LFE의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정한 결과 각각 113.97 ± 0.37 mg GAE/g과 29.22 ± 2.06 mg QE/g으로 측정되어 다른 지역의 곰취 추출물에 비하여 높은 함량을 나타냈다. LFE의 라디칼 소거능 측정 결과, 농도가 증가할수록 소거능이 증가되어 DPPH 라디칼 소거능은 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 $75.75 \pm 1.57\%$ (IC_{50} 211.32 $\mu\text{g/ml}$)로 나타났으며, ABTS 라디칼 소거능은 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 $93.19 \pm 0.04\%$ (IC_{50} 94.34 $\mu\text{g/ml}$)로 나타났다. 세포생존율을 측정한 결과 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지는 독성이 확인되지 않았으며, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 $94.16 \pm 1.25\%$ 약 6%의 미미한 감소가 있었으나 유의한 독성으로 나타나지 않았다. NO 생성량은 LFE 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 $30.93 \pm 3.11\%$ 로 ascorbic acid와 유사한 정도의 유의한 감소를 나타냈으며, *NOS2* 유전자 발현량 또한 LFE 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 ascorbic acid의 농도보다 더 높은 감소율을 나타내며 NO 생성량과 부합되는 결과를 얻었다. 기존의 선행연구들과의 비교를 통해 강원도 태백시에서 관리하여 재배된 국내산 곰취의 항산화 효능을 객관적으로 확인하였으며, 품질 안정성과 재배환경 관리 및 정밀한 공정방법을 유지하며, 지속적인 심화 연구를 통해 규격화된 곰취를 활용하여 화장품 및 기능성 식품 소재로서의 활용 가능성을 확립할 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

"본 연구는 2020년 대전대학교 LINC+ 산학공동개발과제를 통하여 진행되었음"

References

1. J. P. Baek, A. M. Mahmuda, I. L. Choi, H. S. Yoon, Y. S. Kim, W. G. Park, M. C. Kwon, H. M. Kang, "Comparison of Internal Quality and Volatile Aromatic Compounds in several Ligularia Spp. Protected Horticulture and Plant Factory", *Protected Horticulture and Plant Factory*, Vol.24, No.1 pp. 21-26, (2015).
2. B. H. Park, M. Kim, E. R. Jeon, "Quality Characteristics of Tofu Added Ligularia Fischeri Powder", *Journal of the Korean Society of Food Culture*, Vol.28, No.5 pp. 495-501, (2013).
3. S. D. Cho, G. H. Kim, "Food Product Development and Quality Characteristics of Ligularia Fischeri for Food Resources", *Korean Journal of Food Preservation*, Vol.12, No.1 pp. 43-47, (2005).
4. Y. J. Woo, S. R. Shin, J. Y. Hong, "Study on antioxidant and physiological activities of extract from Ligularia fischeri by extraction methods", *1. Korean Journal of Food Preservation*, Vol.24, No.8 pp. 1113-1121, (2017).
5. S. M. Kim, S. W. Kang, B. H. Um, "Extraction Conditions of Radical Scavenging Caffeoylquinic Acids from Gomchui(Ligularia Fischeri) Tea.", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.39, No.3 pp. 399-405, (2010).
6. H. Y. Lee, E. J. Jeong, S. Y. Jeon, M. S. Cho, W. J. Cho, H. D. Kim, Y. J. Cha, "Comparison of Volatile Flavor Compounds of Domestic Onions Harvested in various Regions", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.37, No.12 pp. 1609-1614, (2008).
7. J. P. Baek, "Comparisons of Concentration in Functional and Volatile Components of several Wild Baby Vegetables", *Journal of Agricultural, Life and Environmental Sciences*, Vol.32, No.1 pp. 11-19, (2020).
8. H. J. Lee, H. J. Lim, D. Kim, B. Y. Sim, M. H. Lim, "Anti-Inflammatory Effect of Cornus Officinalis Fruit Extract for Potential of Cosmetic Ingredient", *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology*, Vol.13, No.4 pp. 461-468, (2015).
9. H. Azaizeh, S. Fulder, K. Khalil, O. Said, "Ethnobotanical Knowledge of Local Arab Practitioners in the Middle Eastern Region", *Fitoterapia*, Vol.74, No.1-2 pp. 98-108, (2003).
10. B. Halliwell, J. M. Gutteridge, C. E. Cross, "Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Where are we Now?", *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Vol.119, No.6 pp. 598-620, (1992).
11. S. Pastore, L. Korkina, "Redox Imbalance in T Cell-Mediated Skin Diseases", *Mediators of Inflammation*, Vol.2010, pp. 1-9, (2010).
12. H. J. Lim, H. J. Lee, M. H. Lim, "Comparison of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Korean Houltuynia Cordata Thunb. Extracts", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.38, No.1 pp. 217-227, (2021).
13. J. S. Park, "Walnut Husk Ethanol Extract Possess Antioxidant Activity and Inhibitory Effect of MMP-1 Expression Induced by Tumor Necrosis Factor Alpha in Human Keratinocyte", *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology*, Vol.11, No.4 pp. 715-719, (2013).
14. S. C. Hong, J. A. Jun, D. H. Kim, "Comparative Study of Antioxidant Abilities on Prunus Yedoensis and Betula Platyphylla Var. Japonica.", *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*,

- Vol.27, No.4 pp. 391-399, (2013).
15. J. S. Hong, B. G. Kang, Y. S. Jang, S. H. Kim, Z. Wang, Y. H. Park, J. H. Park, S. S. Lim, "Studies on Standardization of Licorice Based on its Active Components with on-Line HPLC Bioassay System", *Korean Journal of Plant Resources*, Vol.27, No.5 pp. 401-414, (2014).
 16. H. J. Lee, H. J. Lim, M. H. Lim, "The Activity of Anti-oxidation of Cinnamomum loureiroi Extract", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.37, NO.6, pp. 1583-1590, (2020).
 17. L. R. Ferguson, M. Philpott, N. Karunasinghe, "Oxidative DNA Damage and Repair: Significance and Biomarkers", *The Journal of Nutrition*, Vol.136, No.10 pp. 2687S-2689S, (2006).
 18. R. Tripathi, H. Mohan, J. P. Kamat, "Modulation of Oxidative Damage by Natural Products", *Food Chemistry*, Vol.100, No.1 pp. 81-90, (2007).
 19. H. S. Nam, J. W. Jung, D. W. Kim, H. C. Ha, "Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Hot Water Extracts of *Ligularia Fischeri*", *Korean Journal of Food Preservation*, Vol.24, No.6 pp. 834-841, (2017).
 20. Y. j. Woo, S. R. Shin, J. Y. Hong, "Study on Antioxidant and Physiological Activities of Extract from *Ligularia Fischeri* by Extraction Methods", *Korean Journal of Food Preservation* Vol.24, No.8 pp. 1113-1121, (2017).
 21. R. A. A. Lelono, S. Tachibana, K. Itoh, "In Vitro Antioxidative Activities and Polyphenol Content of *Eugenia Polyantha* Wight Grown in Indonesia", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, Vol.12, No.24 pp. 1564-1570, (2009).
 22. J. Shi, J. Yu, J. Pohorly, C. Young, M. Bryan, Y. Wu, "Optimization of the Extraction of Polyphenols from Grapes Seed Meal by Aqueous Ethanol Solution.", *Journal of Food Agriculture and Environment*, Vol.1, pp. 42-47, (2006).
 23. H. J. Lee and M. H. Lim, "Whitening Activities of Extracts of *Seomaeyakssuk* (*Artemisia Argyi* H.)", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.37, No.2 pp. 241-249, (2020).
 24. H. J. Lee, B. Y. Sim, J. W. Bak, D. H. Kim, "Effect of Gami-Sopungsan on Inflammation and DNCB-Induced Dermatitis in NC/Nga in Mice.", *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*, Vol.28, No.2 pp. 146-153, (2014).
 25. M. Lechner, P. Lirk, J. Rieder, "Lechner M, Lirk P, Rieder J Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in Tumor Biology: The Two Sides of the Same Coin. *Semin Cancer Biol* 15:277-289", *Seminars in Cancer Biology*, Vol.15, No.4 pp. 277-289, (2005).
 26. J. Zhao, "Interplay among Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species: A Complex Network Determining Cell Survival Or Death", *Plant Signaling & Behavior*, Vol.2, No.6 pp. 544-547, (2007).
 27. C. Y. Yim, "Nitric Oxide and Cancer", *The Korean Journal of Medicine*, Vol.78, No.4 pp. 430-436, (2010).