

## Antioxidants and Anti-obesity Activities of Hot Water and Ethanolic Extracts from *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*)

Dae-Jung Kim<sup>1</sup>, Ji-Hoon Jung<sup>2</sup>, Sun-Gu Kim<sup>3</sup>, Hyo-Ku Lee<sup>3</sup>, Seong-Kap Lee<sup>4</sup>,  
Hee-Do Hong<sup>5</sup>, Boo-Yong Lee<sup>6</sup> and Ok-Hwan Lee<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>3</sup>Department of Food Science, Kongju National University, Yesan 340-800, Korea

<sup>4</sup>Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

<sup>5</sup>Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

<sup>6</sup>Department of Food Science and Biotechnology, CHA University, Seongnam 463-836, Korea

### 천년초의 열수 및 에탄올 추출물의 항산화 및 항비만 활성

김대중<sup>1</sup> · 정지훈<sup>2</sup> · 김선구<sup>3</sup> · 이효구<sup>3</sup> · 이성갑<sup>4</sup> · 홍희도<sup>5</sup> · 이부용<sup>6</sup> · 이옥환<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 식품공학과, <sup>2</sup>강원대학교 식품생명공학과, <sup>3</sup>공주대학교 식품공학과, <sup>4</sup>호서대학교 식품생물공학과,  
<sup>5</sup>한국식품연구원, <sup>6</sup>차의과학대학교 식품생명공학과

#### Abstract

Recent studies suggested that *Cheonnyuncho* is a significant source of bioactive phenolic compounds, comparable to phytochemicals, including green tea and onion. In this study, the hot-water and 80% ethanolic extracts of *Cheonnyuncho* were assessed as to their total phenol content, total flavonoids content, antioxidant activity (DPPH radical-scavenging activity and reducing power), and anti-obesity activity. The results showed that the total phenol contents of the hot water extract and the 80% ethanolic extract were 16.52±3.87 and 13.44±0.85 mg GAE/g, respectively. The total flavonoids content was detected only in the 80% ethanolic extract, however, with a 778.08 µg catechin equivalents/g content. The DPPH radical-scavenging activity and reducing power of the 80% ethanolic extract from *Cheonnyuncho* was significantly higher than those of the water extract ( $p < 0.05$ ). During the adipocyte differentiation, the 80% ethanolic extract of *Cheonnyuncho* more significantly inhibited lipid accumulation and ROS production than the 3T3-L1 cells that were treated with hot water extract. Furthermore, the 80% ethanolic extract of *Cheonnyuncho* suppressed the mRNA abundance of the adipogenic transcription factor, PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ), and its target gene, aP2 (adipocyte protein 2). These results indicate that *Cheonnyuncho* extracts can inhibit adipogenesis through a mechanism that involves direct down regulation of PPAR $\gamma$  gene expression or via modulation of ROS production associated with radical-scavenging activities.

Key words : *Cheonnyuncho*, total phenol content, total flavonoids content, antioxidant activity, anti-obesity activity

### 서 론

최근 경제적 수준 향상과 서구화된 식생활로 인한 육류 및 각종 패스트푸드의 섭취 증가는 비만을 비롯한 대사증후군을 유발하는 주요 원인이 되고 있다. 이들 대사증후군을 예방하고자 하는 노력들이 지속되고 있으며, 천연 항산화

식품에 대한 관심도가 증가하고 있다. 체내에서 생성되는 활성산소종은 세포내 항산화효소에 의해 조절되거나 식품으로부터 섭취되는 항산화성분(항산화비타민 및 폴리페놀 성분)에 의해 소거되는 것으로 알려져 있다(1). 과거에 주로 사용되어 왔던 *tert*-butylhydroxyanisole (BHA) 및 *tert*-butylhydroxytoluene (BHT)와 같은 합성 항산화제는 우수한 항산화효과 및 경제성에도 불구하고 안전성의 문제로 사용이 제한되어 있으며 이들 합성 항산화제를 대체할 수 있는

\*Corresponding author. E-mail : loh99@kangwon.ac.kr  
Phone : 82-33-250-6454, Fax : 82-33-241-0508

천연 항산화제에 대한 개발이 요구되어지고 있다(2-4). 비만은 과도한 에너지 섭취에 의한 체내 지방조직의 축적에 의한 것으로 지방조직을 구성하는 지방세포의 크기나 수가 비정상적으로 증가한 상태로써 비만을 예방하고자 하는 차원에서 다양한 생리활성 물질을 이용한 지방세포의 분화 조절 및 신호전달과정에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(5-8). 따라서 전지방세포(pre-adipocyte)로부터 지방세포(adipocyte)로 분화를 억제하는 식품성분을 이용한 예방의학적 차원에 서의 비만에 대한 연구가 진행 중에 있다(9).

전 세계적으로 4,000여종이 존재하고 있는 선인장은 건조한 기후에 적응력이 매우 뛰어난 식물로서 탄수화물과 비타민의 공급원으로 사용되어 왔으며 사막 여러 국가에서 기초식품으로서 가치를 인정받아 잼, 젤리, 주스 등과 같은 다양한 선인장 가공 식품이 개발되어 왔다(10). 또한 선인장 중 열매가 달린 것은 손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Makino)이라 불리며 선인장과(Cactaceae)에 속하는 열대성 식물로서 줄기가 손바닥처럼 평평한 것으로 가장 흔한 종류이다. 또한 우리나라에서 자생하는 'Opuntia'속 선인장 중 제주도 등지에서 자생하는 것을 제주도 기념물 제 35호인 백년초 선인장이라 하고 내륙에서 -20°C의 겨울에도 생존하는 다년생 선인장을 천년초 선인장으로 부르고 있다(11).

천년초 선인장은 예로부터 식용이나 식품 대용으로 사용되어 왔으며, 기관지, 천식, 기침, 폐질환, 위염, 변비, 장염, 신장염, 고혈압, 당뇨, 심장병, 신경통 및 관절염 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있고, 민간요법으로 이뇨효과, 장운동의 활성화, 식용증진, 피부질환, 류마티스 및 화상치료에 사용되어 왔다(12,13). 최근의 연구결과를 보면 Park 등(14)은 천년초 줄기의 물 추출물에 대한 항산화 활성 및 시토크롬 P-450로부터 간 손상을 예방하는 효과가 있다고 보고하였으며, Lee 등(15)은 천년초 선인장으로부터 분리한 flavanol 계열의 taxifolin이  $\alpha$ -tocopherol 보다 우수한 항산화 활성을 나타낸다고 보고하였다. 또한 천년초 추출물의 위궤양 치유 효과(16)와 접촉성 피부염 완화 효과(17) 등의 다양한 생리적 기능에 대한 연구가 보고되어 있으며 arabinan-cellulose 복합체(18), pectic polysaccharides의 특성(19) 및 arabinose, galactose, galacturonic acid, rhamnose 그리고 xylose등으로 이루어진 점성물질의 조성에 관한 연구(20) 등 구성 성분에 관한 연구도 보고되어 있다. 최근 들어 천년초 선인장에 대한 건강기능식품 소재로서의 국내외 사용빈도가 점차 높아지고 있는 실정이나 천년초 선인장의 식품소재화를 위한 연구는 아직 초기 단계에 있다. 따라서 본 연구에서는 천년초 선인장의 건강기능식품 소재화 시 기초 자료를 제공하고자 천년초 열수 추출물 및 80% 에탄올 추출물의 항산화 및 항비만 활성을 비교, 분석하고자 하였다. 천년초 추출물에 대한 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 분석한 후, 항산화 활성을 DPPH 라디칼 소거능

및 환원력으로 평가하였다. 또한, 3T3-L1 지방세포를 이용하여 지방세포 분화단계에서의 지방축적 및 이와 연관된 전사인자(PPAR $\gamma$  및 aP2)의 발현 정도를 측정하여 천년초 추출물의 항비만 활성도 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 천년초(*Opuntia humifusa*) 선인장의 줄기는 충남 아산 소재 천년초 농장에서 2009년에 수확한 것을 구입하여 사용하였다. 천년초 선인장의 줄기는 물로 잘 씻어 흙이나 먼지 등의 이물질을 제거하고 2~3 cm 크기로 절편 하여 동결건조 한 후, 분쇄기(IKA M20, IKA, Germany)로 20~30 mesh로 조분쇄하여 시료로 사용하였다. 본 연구에서 항산화성분 분석 및 항비만 활성 측정에 사용된 시약은 Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, (+)-catechin hydrate, L-ascorbic acid, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), insulin, Oil Red O, Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), N-acetyl cystein (NAC)은 Sigma (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), bovine serum (BS), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (P/S), phosphate-buffered saline (PBS) 및 trypsin-EDTA는 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 천년초 추출물의 제조

최근의 연구(14,15)에 따르면 천년초에 존재하는 주요 활성성분들은 플라보노이드계 화합물 또는 일부 페놀성 물질들로 알려져 있다. 본 연구에서는 식품에 사용할 수 있는 용매인 물과 에탄올을 이용하여 천년초 열수 추출물 및 80% 에탄올 추출물을 제조하여 이들 추출물의 항산화 및 항비만 활성을 비교, 분석하고자 하였다. 천년초 80% 에탄올 추출물은 분쇄한 천년초 분말에 80% 에탄올을 가한 뒤 상온에서 24시간 교반하면서(150 rpm, HY-HS11, Hanyang Science, Seoul) 유용 성분들을 추출하였고 Whatman No. 2 (Whatman Ltd, Maidstone, Kent, UK) 여과지를 이용하여 여과한 후, 회전진공농축기(EYELA N-1000, Tokyo, Japan)를 사용하여 40°C에서 감압 농축하였다. 농축된 추출물은 동결건조기(Modulyod-115, Thermo Electron Co, Waltham, MA, USA)를 이용하여 건조된 분말을 제조하였다. 또한 열수 추출물은 분쇄된 천년초 추출물에 10배(w/w)의 물을 가한 후, 100°C 수욕상에서 3시간동안 환류냉각(GLHMP-F200, Global Lab, Seoul)하면서 추출하여 조여과(Whatman No 2)한 후, 40°C에서 감압농축하여 동결건조하였다. 건조된 천년초 추출물들은 무게를 측정하여 추출

수율을 측정된 후, -20°C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 항산화 성분 함량 측정

천년초 열수 추출물 및 80% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Velioglu 등(21)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 천년초 추출물들을 일정한 농도를 DMSO에 녹인 후, 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 2 mL를 가하고 3분간 방치시킨 후, 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 µL를 첨가하였다. 30분 동안 반응시킨 후, 750 nm에서 흡광도 값을 측정하여 gallic acid를 표준물질로 한 표준 검량선에 대입하여 mg GAE (gallic acid equivalent)/g으로서 천년초 추출물들의 총 폴리페놀 함량을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 Jia 등(22)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 각 천년초 추출물에 증류수 1.25 mL를 가하고 5% NaNO<sub>2</sub> 용액 75 µL를 넣고 5분간 방치하였다. 10% AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 용액 150 µL를 가하고 다시 6분간 방치하였다. 위 반응액에 1 M NaOH 500 µL와 증류수 275 µL를 가한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 catechin을 사용하여 표준 검량선을 작성 후 추출물의 총 플라보노이드 함량은 µg CE (catechin equivalent)/g으로서 나타내었다.

#### 항산화 활성 측정

DPPH radical 소거활성은 Kim 등(23)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 200 µL에 0.2 mM DPPH 용액 800 µL를 가한 후, 520 nm에서 정확히 30분 후에 분광광도계 (UV-1650PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 흡광도의 변화를 측정하였다. 이때 전자공여능(EDA, Electron Donating activity)은 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 구하였다.

환원력은 Mau 등(24)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 250 µL 천년초 추출물에 250 µL의 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6), 250 µL의 1% potassium ferricyanide를 각각 가하고 이 혼합물을 50°C에서 20분간 반응시킨 후 250 µL의 1% trichloroacetic acid (TCA, w/v) 용액을 가하였다. 위 반응액을 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상침액 500 µL와 증류수 500 µL, 100 µL 0.1% ferric chloride 용액을 넣고 잘 혼합하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### XTT assay

천년초 추출물들의 항비만 활성 평가를 위한 3T3-L1 지방세포의 세포독성 평가는 XTT{2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carbox-anilide innersalt} assay kit를 이용하여 측정하였다. XTT에 electron coupling agent 역할을 하는 PMS (phenazine methosulfate)를 첨가하여 bioreduction을 증가시키게 한 후, 세포에 XTT와 PMS를 첨가하여 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase

에 의한 XTT의 tetrazolium ring이 분해시켜 formazan crystal을 형성하게 되면, formazan crystal은 수용액에 녹아 노란색을 나타내게 된다. 이 노란색을 ELISA로 측정하여 세포 독성 평가에 이용하였다. 즉 3T3-L1 세포는 실험전날 1×10<sup>5</sup> cell 농도로 96-well plate에 seeding하여 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 -20°C에 보관중인 XTT 및 PMS reagent를 37°C에서 완전히 해동시킨 후, 1 mL의 XTT reagent와 20 µL PMS reagent를 혼합하여 working solution을 준비하여 놓고, pipet을 이용하여 medium 부피의 20%되는 양 만큼 취하여 각 well에 조심스럽게 첨가하고 plate를 바닥에 붙인 상태로 전후좌우로 가볍게 흔들면서 혼합하였다. 혼합 후 4시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후, ELISA로 450 nm 흡광도 값에서 690 nm의 흡광도 값을 빼서 결과 값으로 계산하였다.

#### 항비만 활성 측정

천년초 추출물의 항비만 활성 평가를 위해 사용된 마우스 유래 3T3-L1 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, CL-173)으로부터 분양 받아 사용하였다. 3T3-L1 지방세포의 배양방법은 Blumberg 등(25)의 방법에 따라 고농도의 포도당을 함유한 DMEM에 10% BCS 및 1% P/S를 함유한 배지로 배양한 3T3-L1 전구지방세포(preadipocyte)가 100% confluence 하게 되면 이로부터 2일 후에, 분화유도 물질 (5 µg/mL insulin, 1 µM DEX, 0.5 mM IBMX) 및 천년초 추출물들을 처리하여 지방세포로 분화 유도하였다. 분화유도 물질을 처리한 후, 2일마다 지속적으로 여러 농도의 천년초 추출물 및 5 µg/mL insulin, 1% P/S, 10% FBS가 함유된 배지로 배양시키면서 분화과정 중의 지방축적량의 변화를 모니터링 하였다.

분화과정에 따른 지방세포의 지방 축적량을 측정하기 위하여 먼저 24-well에 배양 및 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후, 10% formalin 용액 500 µL를 첨가하여 5분간 실온에서 방치한 후, 동량의 formalin으로 1시간 이상 실온에서 incubation 하였다. 1시간 후, 세포에서 formalin을 제거하고 60% isopropanol 용액 500 µL로 세척한 후, 완전히 건조시켰다. 완전히 건조된 세포들은 미리 제조해 둔 Oil red O working solution으로 세포 내 축적된 지방성분들을 충분히 염색 시킨 후, 증류수를 이용하여 3-4회 세척하였고 100% isopropanol을 이용하여 세포 내 염색된 Oil red O들을 모두 용출 시켜 UV-Vis spectrophotometer (Milton Roy, Inc., Rochester, NY, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(25).

한편, 지방세포에서 분화에 영향을 미치는 주요 관련 유전자들의 발현 변화를 검토하기 위하여 지방세포에 존재하는 total RNA를 추출한 후, 역전사중합효소(reverse transcriptase)를 사용하여 complementary DNA (cDNA)를 만들고 합성된 cDNA와 primer로 RT-PCR을 이용하여 유전

자의 발현정도를 측정하였다. RT-PCR 산물은 2% 한천 (agarose) 겔에서 전기영동 후 EtBr (ethidiumbromide)로 염색하여 UV에서 증폭된 DNA band를 확인하였다.

### 통계분석

모든 실험결과는 SAS package (release 8.01)를 이용하여 one-way ANOVA 분석 및 student t-test를 수행하였고 평균 값의 통계적 유의성은  $p < 0.05$  수준에서 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 천년초 추출물의 추출 수율 및 항산화성분

본 연구에서 사용한 추출용매는 식품으로 사용가능한 에탄올 및 물을 사용하였다. 추출용매별 천년초 추출물의 추출 수율은 열수 추출물에서 44.70%로 80% 에탄올 추출물의 17.17%에 비하여 높은 수율을 나타내었다. Lee 등(26)의 결과에서도 물 추출물(64.4%)의 추출 수율이 70% 에탄올 추출물(12.2%)의 추출 수율에 비해 높게 나왔으며, 추출용매를 달리하여 천년초 추출물을 제조한 Lee 등(13)도 에탄올 추출물, 70% 에탄올 추출물, 물 추출물에서 각각 11.0, 12.2 및 16.0%의 추출 수율을 나타내 물 추출물의 추출 수율이 에탄올 추출물의 추출 수율에 비해 높게 나타났다.

천연물에 존재하는 폴리페놀계 화합물들은 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소 단백질과 같은 거대분자들과 결합하는 성질을 가지고 있기 때문에 항산화, 항심혈관질환, 항암, 항골다공증 및 항당뇨와 같은 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(27,28). Fig. 1에서 보는바와 같이, 천년초 열수 추출물 및 80% 에탄올 추출물에 함유된 총 페놀 함량은 각각  $16.52 \pm 3.87$  및  $13.44 \pm 0.85$  mg GAE/g로 나타났다. Yoon 등(29)의 보고에 의하면 천년초의 부위별

총 페놀 함량이 뿌리에서 4.69%, 과육에서 4.49%, 종자에서 4.46% 그리고 줄기에서 4.26%으로 보고하였으며 Han 등(30)의 보고에 의하면 천년초선인장의 총 폴리페놀 함량은 열매 3.14%, 줄기 2.93%로 나타내었다. 또한 Lee 등(31)은 백년초 선인장의 각 부위별 총 폴리페놀 함량을 추출 조건을 달리하여 측정한 결과 열매의 총 폴리페놀 함량이 0.4976%로서 48시간동안 80% 메탄올로 추출하였다고 보고하였다. 한편, 천년초 추출물들의 총 플라보노이드 함량은 80% 에탄올 추출물에서만  $778.08 \mu\text{g CE/g}$ 의 함량을 나타내었을 뿐, 열수 추출물에서는 총 플라보노이드가 검출되지 않았다.

이는 Lee(15)의 연구결과에서 보는 바와 같이, 천년초에는 taxifolin과 같은 flavanol 계열의 화합물이 존재하며, 이들 flavanol 화합물들은 용매추출 분획시 ethyl acetate와 같은 비교적 비극성 용매에 주로 이행되는 것으로 알려져 있어 본 연구에서 천년초 80% 에탄올 추출물에서만 총 플라보노이드 함량이 일부 검출된 결과와 비슷한 경향을 나타내었다(15). 한편, Yoon 등(29)의 연구에서는 천년초 선인장의 줄기, 뿌리, 열매 및 종자에 각각 2.59, 1.66, 1.31 및  $1.20 \text{ g/100 g}$ 의 총 플라보노이드가 함유되어 있다고 보고하였다.

### 항산화 활성

DPPH radical 소거능을 이용한 천년초 추출물들의 항산화 활성은 Fig. 2와 같이 80% 에탄올 추출물의 1000, 500 및  $250 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 19.17, 12.02 및 4.00%를 나타내었으며 동일한 농도의 열수 추출물에서는 각각 6.03, 4.09 및 2.50%의 DPPH 라디칼 소거능을 보여 80% 에탄올 추출물에서의 DPPH 라디칼 소거능이 열수 추출물에 비해 높게 나타났다. 또한, 80% 에탄올과 열수 추출물의 농도별 환원력을 측정된 결과 Fig. 3과 같이  $1000 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에

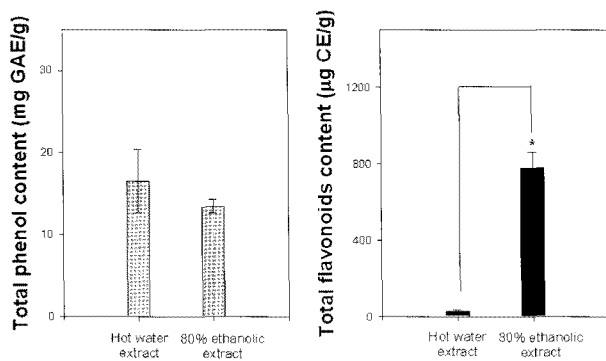


Fig. 1. Total phenol and total flavonoids contents of hot water and 80% ethanolic extracts obtained from *Cheonnyuncho*.

Total phenol content is milligrams of total phenol contents per gram of both extracts based on gallic acid as standard. Total flavonoids content is micrograms of total flavonoid contents per gram of both extracts based on catechin as standard. \*Significantly different at  $p < 0.05$  by student t-test. The values are means  $\pm$  SD from three replications.

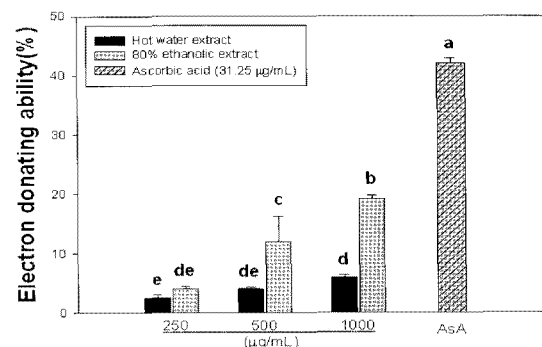
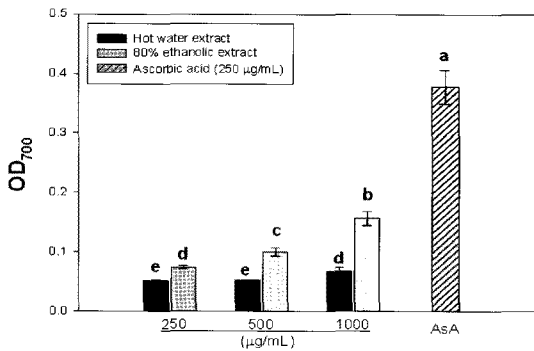


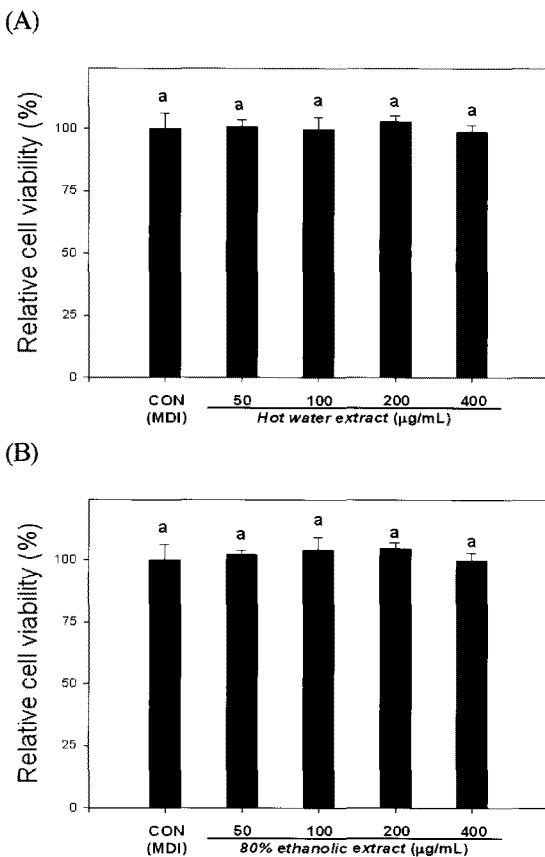
Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of hot water and 80% ethanolic extracts obtained from *Cheonnyuncho*.

The activity was evaluated by measuring the decrease of DPPH radical detected at 520 nm. AsA (ascorbic acid) was used as a positive control for DPPH radical scavenging activity. Means in the same column not sharing a common letter are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple test. All experiments were repeated three times.



**Fig. 3.** Reducing power of hot water and 80% ethanolic extracts obtained from *Cheonnyuncho*.

AsA (ascorbic acid) was used as a positive control for reducing power. Means in the same column not sharing a common letter are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple test. All experiments were repeated three times.



**Fig. 4.** Effect of hot water (A) and 80% ethanolic extracts (B) obtained from *Cheonnyuncho* on cell viability.

Cell viability was measured by XTT assay. The exponentially growing cells were plated into 96-well micro plates at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well in DMEM/BS medium and incubated for 24 h prior to treatment at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Cells were divided into a control group and the hot water (A) and 80% ethanolic extracts (B) obtained from *Cheonnyuncho* groups at concentration indicated. A each value is the mean  $\pm$  standard deviation of the results from six different plates ( $n=6$ ) and is representative of results from at least three different experiments. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).

서 80% 에탄올 추출물과 열수 추출물의 환원력이 각각 0.157(A700), 0.069(A700)로 나타나 80% 에탄올 추출물의

환원력이 열수 추출물에 비하여 약 2배정도 높게 나타났다.

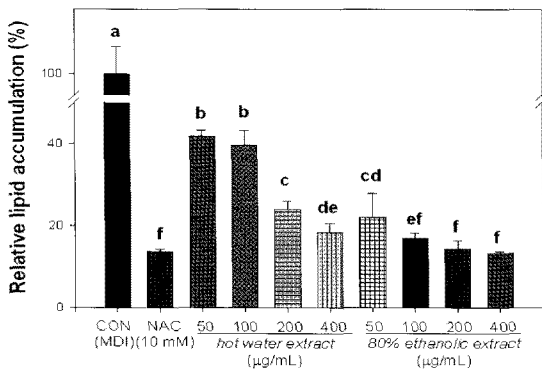
80% 에탄올 추출물에 비해 높은 총 페놀 함량을 보인 열수 추출물에서 항산화 활성(DPPH 라디칼 소거능 및 환원력)이 높게 나타날 것이라는 예상과는 달리 80% 에탄올 추출물에서 높은 항산화 활성을 보인 이유는, 총 페놀 및 총 플라보노이드 화합물의 상승작용에 기인된 것으로 사료되었다. Fig 1과 같이 80% 에탄올 추출물에서는 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량이 높게 검출된 반면, 열수 추출물에서는 총 플라보노이드가 미량 검출되었다. 곡물에서의 항산화 성분과 항산화 활성 간의 상관관계에 대하여 보고한 Seo 등(32) 및 Choi 등(33)의 연구에서와 같이 천연초에 존재하는 taxifolin과 같은 플라보놀(flavonol) 화합물들은 강력한 항산화 성분으로 알려져 있다. 이상의 결과로 비추어 볼 때, 추출 용매별 천연초 추출물들에 함유된 총 페놀 및 총 플라보노이드의 조성 및 함량의 차이가 이들 추출물의 항산화 활성에 주요한 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

**세포독성 및 항비만 활성**

항비만 활성 평가에 이용된 3T3-L1 세포에 대한 천연초 추출물들의 세포독성은 XTT시험법으로 측정하였다. 천연초 열수 및 80% 에탄올 추출물의 50, 100, 200 및 400 µg/mL 농도범위에서 세포독성을 측정된 결과(Fig. 4), 천연초 추출물의 400 µg/mL 농도까지 세포 생장에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 천연초 열수 추출물과 80% 에탄올 추출물을 50, 100, 200 및 400 µg/mL 농도로 하여 항비만 활성을 평가하였다.

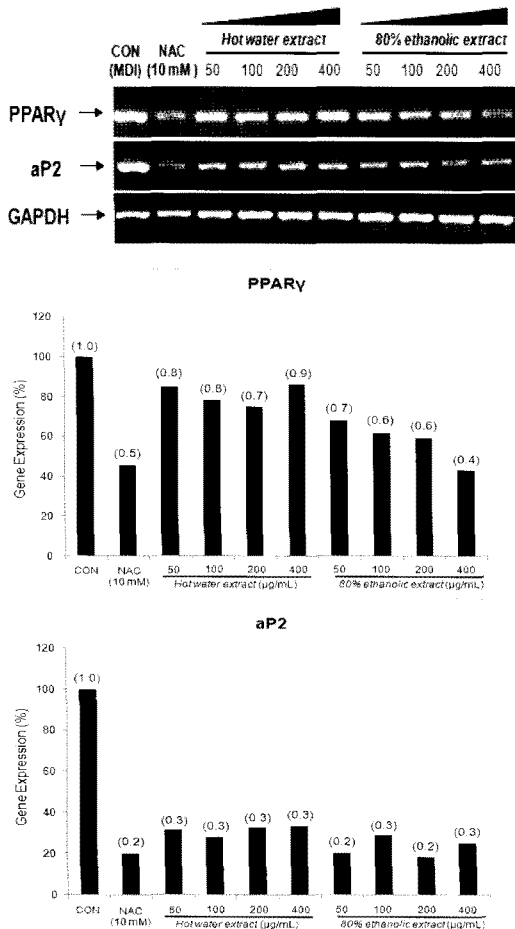
3T3-L1 지방세포의 분화과정에서의 천연초 열수 추출물 및 80% 에탄올 추출물에 의한 세포내 지방축적량을 비교하여 항비만 활성을 평가한 결과는 Fig. 5와 같다. 세포분화 8일째에 축적된 지방의 함량은 Oil red O staining 방법을 이용하여 측정하였고, 지방세포 분화에 연관된 주요 유전자(PPAR $\gamma$  및 aP2)의 발현은 semi-quantitative RT-PCR을 이용하여 조사하였다. 천연초 추출물을 처리한 지방세포는 모든 농도 범위에서 대조군과 비교하여 Oil red O 시약에 의하여 염색된 지방구는 유의적으로 적은 것으로 나타났다. 또한, 천연초 80% 에탄올 추출물의 지방축적 억제 효과는 열수 추출물에 비해 더욱 효과적인 것으로 관찰되었다.

지방세포 분화 및 지방축적과 연관된 주요 전사인자(PPAR $\gamma$ ) 및 타깃 유전자(aP2)의 발현 정도는 Fig. 6에서 보는바와 같이 대조군과 비교하여 천연초 추출물 처리군에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 지방의 축적량을 평가한 Oil red O의 결과에서와 같이, 80% 에탄올 추출물에 의한 PPAR $\gamma$  및 aP2 mRNA의 억제효과는 열수 추출물에 의한 억제효과 보다 유의적으로 큰 것으로 나타내었다. 지방조직에서 주로 나타나는 PPAR $\gamma$ 는 발현이 증가할수록 세포의 인슐린에 대한 감수성 및 전구지방세포에서 지방세



**Fig. 5.** Effect of hot water and 80% ethanolic extract obtained from *Cheonnyuncho* on adipose conversion during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes.

Oil red O staining at day 8 with or without hot water and 80% ethanolic extract obtained from *Cheonnyuncho*. Lipid accumulation determined by absorbance at 490 nm (Abbreviation: CON; Control (MDI), NAC; N-acetyl cystein). Values are the means  $\pm$  SD of three samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA.



**Fig. 6.** Effect of hot water and 80% ethanolic extract obtained from *Cheonnyuncho* on PPAR $\gamma$  and aP2 mRNA expression during the differentiation of 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were differentiated in the presence of hot water and 80% ethanolic extract (50, 100, 200, and 400  $\mu\text{g/mL}$ ) throughout differentiation. At day 8, total cellular RNA was extracted and subjected to RT-PCR. PPAR $\gamma$  and aP2 mRNA levels were quantified and normalized with to GAPDH. The band intensities were measured by the Image J program.

포로 분화를 크게 증가시키는 것으로 알려져 있어(34,35), 본 연구에서 관찰된 천년초 추출물의 3T3-L1 세포 지방생성 억제 효과는 PPAR $\gamma$ 의 발현과 크게 연관되어 있다고 판단되었다.

**요 약**

최근 천년초 선인장은 녹차 및 양파와 같은 피토케미칼 (phytochemical)에 함유된 페놀성 화합물의 중요한 소재로 보고되고 있다. 본 연구에서는 천년초 열수 및 80% 에탄올 추출물의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량, 항산화 활성 (DPPH 라디칼 소거능 및 환원력) 및 항비만 활성을 평가하였다. 총 페놀 함량은 천년초 열수 추출물 및 80% 에탄올 추출물에서 각각  $16.52 \pm 3.87$ 와  $13.44 \pm 0.85$  mg GAE/g로 나타난 반면, 총 플라보노이드 함량은 80% 에탄올 추출물에서만  $778.08$   $\mu\text{g CE/g}$ 의 수준으로 검출되었다. DPPH 라디칼 소거능 및 환원력과 같은 항산화 활성은 80% 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비하여 높게 나타났다. 3T3-L1의 분화 과정 중의 천년초 추출물들은 50, 100, 200 및 400  $\mu\text{g/mL}$  농도범위에서 세포독성을 보이지 않았으며, 세포내 지방의 축적량을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 특히 천년초 80% 에탄올 추출물은 열수 추출물에 비해 세포내 지방축적을 억제하는 효과가 큰 것으로 나타났다. 지방세포 분화에 관련된 전사인자(PPAR $\gamma$ ) 및 타깃 유전자인 aP2의 발현율도 천년초 추출물에 의해 유의적으로 감소하였다. 이들의 결과로 비추어 볼 때, 천년초 추출물에 함유된 페놀성 화합물 및 플라보노이드 화합물들은 PPAR $\gamma$ 의 유전자 발현을 억제하여 지방세포 분화를 억제하거나 항산화 활성이 연계된 항비만 활성을 갖는 것으로 나타났다.

**참고문헌**

1. Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A (2009) Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol rev*, 89, 21-71
2. Bae SM, Kim JH, Cho CW, Jeong TJ, Ha JU, Lee SC (2001) Effect of microwave treatment on the antioxidant activity of rice processed by-products. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 30, 1026-1032
3. Halliwell B (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*, 16, 33-49
4. Morrissey PA, O'Brien NM (1998) Dietary antioxidants in health and disease. *Int Dairy J*, 8, 463-472
5. Spiegelman BM, Flier S (1996) Adipogenesis and

- obesity; rounding out the big picture. *Cell*, 87, 377-389
6. Raylana S, Della-Fera MA, Baile CA (2008) Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutr Biochem*, 19, 717-726
  7. Hsu CL, Yen GC (2008) Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol Nutr Food Res*, 52, 53-61
  8. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee Jr RE (1999) Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol*, 10, 3-10
  9. Bray GA (2006) Obesity: The disease. *J Med Chem*, 49, 4001-4007
  10. Carmen S (2000) Processing technologies: An alternative for cactus pear (*Opuntia spp.*) fruits and cladodes. *J Aarid Environ*, 46, 209-225
  11. Yoon JA, Son YS (2009) Effects of *Opuntia ficus-indica* complexes B(OCB) on blood glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food and Nutr*, 22, 48-56
  12. Kim TJ (1996) A Pictorial Book of the Korean Flora. Publishing department of Seoul National University, Seoul, Korea, p 140-141
  13. Lee KS, Oh CS, Lee KY (2005) Antioxidative effect of the fractions extracted from a Cactus *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Sci Technol*, 37, 474-478
  14. Park MK, Lee YJ, Kang ES (2005) Hepatoprotective effect of *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*) extract in rats treated carbon tetrachloride. *J Korean Food Sci Technol*, 37, 822-826
  15. Lee KS (2004) Antioxidant, Antimicrobial Effect of the Extracts of Cactus *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*) and Identification of Activity Substance. Master degree thesis, Hoseo University, Asan, Korea.
  16. Kim YR, Lee MR, Kim YH, Jang BJ, Park SC, Han SH, Kim BH, Ryoo ZY, Kim KS (2005) Effect of *Opuntia humifusa* extract on indomethacin-induced gastric ulcer in Sprague Dawley rat. *Lab Anim Res*, 21, 375-378
  17. Kim KS, Ahn MJ, Kim GS, Park SC, Rhee MH, In JG, Kim BH, Kim HH, Han SH (2007) Effects of *Opuntia humifusa* extract on DNCB-induced allergic contact dermatitis in Balb/c mice. *Lab Anim Res*, 23, 169-173
  18. Vignon MR, Heux L, Malaininea ME, Mahrouz M (2004) Arabinan-cellulose composite in *Opuntia ficus indica* prickly pear spines. *Carbohydr Res*, 339, 123-131
  19. Habibi Y, Heyraud A, Mahrouzb M, Vignon MR (2004) Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus indica* prickly pear fruits. *Carbohydr Res*, 339, 1119-1127
  20. Trachtenberg S, Alfred MM (1981) Composition and properties of *Opuntia ficus indica* mucilage. *Phytochem*, 20, 2665-2668
  21. Velioglu YS, Mazza G, Cao L, Oomah BD (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruit, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem*, 46, 4113-4117
  22. Jia Z, Tang M, Wu J (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64, 555-559
  23. Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY (2002) Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem*, 50, 3713-3717
  24. Mau JL, Lin IIC, Song SF (2002) Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res Int*, 35, 519-526
  25. Blumberg JM, Tzamelis I, Astapova I, Lam FS, Flier JS, Hollenberg A (2006) Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*, 281, 11205-11213
  26. Lee KS, Kim MG, Lee KY. (2004) Antimicrobial effect of the extracts of Cactus *Chounnyuncho* (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 33, 1268-1272
  27. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 81, 215S-217S
  28. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177, 67-80
  29. Yoon JA, Hahm SW, Park J, Son YS (2009) Total polyphenol and flavonoid of fruit extract of *Opuntia humifusa* and its inhibitory effect on the growth of MCF-7 human breast cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 38, 1679-1684
  30. Han IH, Lee KA, Byoun KE (2007) The antioxidant activity of Korean cactus (*Opuntia humifusa*) and the quality characteristics of cookies with cactus powder added. *Korean J Food Cookery Sci*, 23, 443-451
  31. Lee YC, Hwang KH, Han DH, Kim SD (1997) Compositions of *Opuntia ficus-indica*. *Korean J Food Sci Technol*, 29, 847-859
  32. Seo SJ, Choi YM, Lee SM, Kong SH, Lee JS (2008) Antioxidant activities and antioxidant compounds of

- some specialty rices. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 129-135
33. Choi Y, Jeong HS, Lee J (2007) Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. Food Chem, 13, 130-138
34. Rosen ED (2005) The transcriptional basis of adipocyte development. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid, 73, 31-34
35. Evans RM, Barish GD, Wang YX (2004) PPARs and the complex journey to obesity. Nat Med, 10, 355-361
- 
- (접수 2010년 12월 8일 수정 2011년 5월 17일 채택 2011년 5월 21일)