

# 조릿대의 잎과 줄기 추출물 분획의 염증 및 비만 억제 효과 비교

하유빈<sup>#</sup> · 박재형<sup>#</sup> · 장준우<sup>1</sup> · 임동우<sup>1</sup> · 김재은<sup>1\*</sup>

1 : 동국대학교 한의과대학, 2 : 동국대학교 한의병리학교실

## Comparative Study for Anti-inflammatory and Anti-obesity Effect of Fractions from Leaf and Stem of *Sasa Borealis*

You Bin Ha<sup>#</sup>, Jae Hyoung Park<sup>#</sup>, Jun Woo Jang<sup>1</sup>, Dong Woo Lim<sup>1</sup>, Jai Eun Kim<sup>1\*</sup>

College of Korean Medicine, 1 : Department of Pathology, College of Korean Medicine, Dongguk University

*Sasa borealis* has long been used in folk remedies and traditional Korean medicine for analgesic, sedative and anticarcinogenic purposes. To excavate novel natural compounds for treating obesity, we separated leaf and stem and fractionated. We screened phenolic contents, anti-oxidative and anti-inflammatory properties with the fractions. Dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (EA) fraction from both leaf and stem exhibited high anti-oxidative properties demonstrated by DPPH, ABTS assay in accordance with their phenolic contents. In addition, DCM and EA fraction from leaf inhibited nitric oxide (NO) production as well as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in Raw 264.7 cell. Finally, DCM and EA fraction from both leaf and stem significantly inhibited 3T3-L1 preadipocyte differentiation and decreased intracellular lipid level. These results suggest that DCM and EA fraction from *Sasa borealis* may contain therapeutic agent for obesity by attenuating inflammation and oxidative stress.

keywords : *Sasa borealis*, fraction, preadipocyte differentiation, ROS, iNOS, COX-2

### 서 론

산화적 스트레스는 다양한 인자에 의한 유리기 또는 활성산소 (free radical, reactive oxygen species, ROS)의 생성과 항산화 물질에 의한 제거의 불균형으로 정의할 수 있다<sup>1)</sup>.

산화적 스트레스는 당뇨 및 합병증<sup>2)</sup>, 노화<sup>3)</sup>, 퇴행성 신경계 질환<sup>4)</sup> 등 다양한 질환에 관련되어 있다. 또한 산화적 스트레스는 혈관 내피조직의 기능이상을 유발하는데<sup>5)</sup> 혈관 내피조직에 축적된 지질이 ROS에 의해 과산화되며, 대식세포를 불러들이고 염증 cytokine을 분비하게 되어 만성적 전신 염증을 유발한다. 다시 염증반응으로 생성된 활성산소에 의해 산화 스트레스가 증가하면 면역 및 염증 반응을 유도시켜 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2) 등의 단백질 발현을 증가시킨다. 특히 iNOS가 분비하는 nitric oxide (NO)는 세포간의 신호 전달 역할을 하여 병리적으로 apoptosis를 유도하므로<sup>6)</sup> iNOS 발현 증가는 산화 스트레스를 증가시켜 염증에 의한 조직 손상을 일으킨다<sup>7)</sup>. 따라서 세포의 항산화 능력은 만성 염증성 질환의 예방과

치료와 관련성이 있으며 염증으로 인해 생성되는 ROS와 reactive nitrogen species (RNS)에 의한 산화적 스트레스를 감소시킬 수 있는 물질을 탐색하는 것이 중요하다.

비만은 지방전구세포의 분화 및 비대 이후의 지방세포 내 중성 지방 (triglyceride, TG)의 축적으로 발생하며 지방생성기전 조절과 분화 과정에서 발생하는 활성 산소를 제거하는 것이 비만 억제의 효과적인 방법으로 알려져 있다<sup>8)</sup>. 성숙한 지방 조직에서 생성되는 adipokine의 분비 조절 실지로 ROS를 생성하거나<sup>9)</sup> 비만으로 인해 증가된 fatty acid 수준은 다시 beta-oxidation의 메커니즘을 통해 과량 대사되면서 ROS를 생성하여 다시 악순환의 고리를 형성한다<sup>10)</sup>. 이와 같이 비만을 포함한 다양한 질환과 산화적 스트레스는 밀접한 관계를 가지고 있으며 서로 악순환의 관계를 가지고 있는데 비만과 당뇨 등을 포함하는 대사증후군(metabolic syndrome) 모델의 경우 간 조직 기능 평가 시 glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) 와 같은 환원 시스템의 불균형<sup>11)</sup> 과 함께 NO 등의 염증적 요소와 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다<sup>12)</sup>.

\* Corresponding author

Jai Eun Kim, Department of Pathology, College of Korean Medicine, Dongguk University, 32, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, Korea

E-mail : herbqueen@dongguk.ac.kr · Tel : +82-31-961-5829

Received : 2016/05/20 · Revised : 2016/06/30 · Accepted : 2016/07/28

# Both authors contributed equally to this work

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2016.08.30.4.229>

Available online at <http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm>

조릿대(*Sasa borealis*)는 벼과, 조릿대속의 작은 대나무로, 우리나라 중·남부 지방의 산에 무리지어 자란다<sup>13</sup>. 민간에서는 조릿대의 지하부를 진정, 진통 및 항암 효과를 기대하여 사용해 왔으며, 중국에서는 조릿대의 동속식물을吐血, 崩症 등의 여러 증상에 사용하였다<sup>14</sup>. 또한 한의학에서 조릿대의 잎은 竹葉이라 하여 清熱除煩, 生津, 利尿의 효능으로 사용되며<sup>15</sup> 동의보감에서는 涼膈散, 知母湯 등의 처방에서 활용된다. 국내에서 자생하는 대나무 4종 중에서 주로 맹종죽, 왕죽, 솜대에 대한 연구가 주로 이뤄지고 있으며, 조릿대에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 한편 네가지 대나무 중 조릿대는 비교적 뛰어난 항산화능을 나타내었다<sup>15</sup>. 또한 조릿대의 열수 추출물과 에탄올 추출물은 항균작용이 있다고 보고되었고<sup>16</sup> 뿐만 아니라 조릿대 추출물은 C2C12세포에서 당 섭취를 증가시키고, 쥐의 골격근에서 AMPK의 인산화반응을 강화시켰으며, Glut-4 발현을 증가시킨다고 보고되었다<sup>17</sup>. 그리고  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase의 탄수화물 효소의 활성을 저해하여 혈당을 낮춘다고 보고되었다<sup>18</sup>. 한편 조릿대잎 추출물에는 syringaresinol, tricinin<sup>19</sup>, luteolin<sup>20</sup>, isoorientin<sup>21</sup> 등의 물질이 함유되어 있다고 보고되었으나 조릿대의 분획별, 부위별 항염증, 항비만 효과와 기전에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 국내 자생 조릿대를 잎과 줄기로 나누고 70% 에탄올을 조추출물(SBE)을 각각 핵산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물의 용매별로 분별추출하여 5분획을 얻었다. 각 분획의 페놀함량을 분석하였으며, 양이온 및 음이온 소거능을 통해 항산화능력을 확인하였다. 이어서 Raw 264.7 세포주를 이용한 염증 관련 단백질 발현 확인을 통한 항염증 효과와 최종적으로 3T3-L1 세포 분화 억제제를 통한 항비만 효과를 Oil Red O 염색의 결과로 분석하였다. 본 연구를 통해 조릿대 부위별 조추출물의 분획별 효과에 대한 공통적인 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 샘플 추출

본 연구에 사용한 조릿대(*Sasa borealis*)는 2015년 8월 경상남도 진주 죽림원에서 동정된 후 300 g을 제공받아서 사용하였다. 조릿대는 음지에서 3일간 실온에서 자연건조 시킨 후 조릿대 잎과 줄기 부분으로 각기 분리한 후 세절하였다. 100 g의 잎과 줄기 각 부분의 조릿대를 70% 에탄올(v/v)에서 72시간 동안 자력교반기를 이용, 실온에서 추출하였다. 70% 에탄올 조추출물을 rotary evaporator (Buchii, Switzerland)에서 농축 후 증류수 500 ml에 용해시켰다. 용매의 극성차를 이용하여 비극성 용매로부터 극성 용매 순으로 분리하였다 (핵산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물). 얻은 각각의 분획을 감압농축하고 동결 건조한 후 각 분획 추출물을 -20°C에 냉동 보관하며 실험에 사용하였다.

### 2. 시약

항산화능과 총 페놀 함량 실험에 사용한 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzenothiazolin-6-sulfonic acid (ABTS),

hypoxanthine, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), xanthine oxidase, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), folin-ciocalteu, sodium bicarbonate, NO 소거능 실험의 sulfanilamide, naphthylethylenediamine, sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>), 비만 세포 분화억제 실험의 Oil red O, 3-isobutyl-1methylxanthine (IBMX), dexamethasone, insulin, dimethyl sulfoxide (DMSO)와 lipopolysaccharides (LPS)등 이상 모든 시약은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) 사의 제품을 구매하여 사용하였다.

세포 배양 및 계대에는 Hyclone사(Logan, UT, USA)의 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)을 사용하였다. iNOS, COX-2, beta-actin의 antibody와 anti-rabbit IgG peroxidase antibody는 Santacruz사(Dallas, TX, USA)의 제품을 사용하였다.

### 3. DPPH, ABTS 라디칼 소거능 (DPPH, ABTS assay)

조릿대 추출물의 DPPH radical 소거능은 free radical에 대한 환원력을 측정된 Bondet의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 에탄올에 녹인 0.3 mM DPPH 용액 760  $\mu$ l와 각 분획 샘플군, 비첨가군 또는 양성대조군 40  $\mu$ l를 가하여 잘 혼합한 후 30분간 실온에 방치하였다. 이후 DPPH 용액의 흡광도를 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 515 nm에서 측정하였다. 전자공여능은 시료첨가군과 비첨가군의 흡광도 비율을 백분율로 표시하였다. 양성 대조물질로는 BHT와 Ascorbic acid를 사용하였다.

조릿대 추출물의 ABTS radical 소거활성은 Van den Berg 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 증류수에 녹인 7.4 mM의 ABTS와 2.6 mM의 potassium persulfate를 혼합하여 실온의 암소에서 24시간 동안 반응시킨다. 24시간 후 ABTS 반응물을 sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 희석시켜 흡광도 값이 약 0.7이 되도록 하였다. 희석된 ABTS와 조릿대 분획 샘플 및 양성대조군 또는 비첨가군을 1 : 20 (v/v)으로 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조물질로 trolox를 사용하였으며 결과는 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \frac{(\text{비처리군 흡광도} - \text{시료군 흡광도})}{\text{비처리군 흡광도}} \times 100$$

### 4. Superoxide anion 소거능 (Superoxide anion assay)

조릿대 추출물의 superoxide anion 소거능은 xanthine oxidase에 의한 tetrazolium salt (NBT)의 푸른색 formazan dye 생성억제 능력을 측정하여 확인하였다. 3 mM hypoxanthine과 1.42 mM NBT, 30 mM EDTA와 조릿대 추출물 분획 시료를 혼합하여 3분간 반응시켰다. 이후 0.5 U/ml의 xanthine oxidase를 첨가하고 phosphate buffer를 최종 부피가 3 ml이 되도록 첨가하여 혼합하였다. 상온에서 20분간 반응 후 560 nm에서 흡광도를

microplate reader를 이용하여 측정하였다. 양성 대조물질로 ascorbic acid를 사용하였다.

5. 총 페놀함량 측정

조릿대 잎과 줄기 각 분획 추출물의 페놀 함량을 folin-ciocalteu 시약을 이용한 방법으로 측정하였다. 40 µl의 분획 추출물에 200 µl의 Folin-ciocalteu와 1160 µl의 증류수를 첨가하고 3분간 반응시켰다. 이후 600 µl의 2% sodium carbonate를 혼합하고 2시간 동안 암소에서 반응시켰다. 흡광도를 microplate reader를 이용하여 765 nm에서 측정하였다. 다양한 농도의 gallic acid를 기준선으로 작성하여 그 농도를 계산하였다.

6. 세포 배양 및 계대

쥐의 대식세포인 Raw 264.7 세포와 지방전구세포인 3T3-L1 세포를 한국세포주은행 (KCLB)에서 구매하여 계대배양하였다. 10%의 FBS와 1%의 penicillin-streptomycin을 함유하는 DMEM에서 배양하였다. 세포는 37°C, 5%의 CO<sub>2</sub>가 유지되는 항온 및 항습 incubator에서 배양하였다. 모든 세포는 60-70%의 밀도에서 계대하였으며, 계대 수가 10 passage가 넘지 않는 세포를 실험에 사용하였다.

7. 세포 생존률 측정

세포 생존률의 측정은 EZ-Cytox cell viability assay kit (Daeil Lab Service, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. 96 well culture plate에 Raw 264.7 세포를 well 당 1×10<sup>4</sup> 개의 밀도로 seeding 한 후 24시간 동안 DMEM에 배양하였다. 여러 농도의 분획 추출물을 24시간 동안 처리한 다음 10 µl의 Ez-Cytox를 medium에 가하고 2시간 동안 37°C에서 배양하였다. 결과는 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 비첨가군에 대한 시료 첨가군의 흡광도를 %로 계산하여 나타내었다.

8. 아질산염 생성 저해능 (NO assay)

조릿대의 줄기와 잎의 추출물의 아질산염 생성 억제능을 평가하였다. Raw 264.7 세포를 well 당 4×10<sup>5</sup> 개가 되도록 6 well plate에 seeding하였다. 24시간 배양 후 각 분획 추출물을 50 µg/ml 농도가 되도록 16시간동안 전처리하고, LPS (1.5 µg/ml)를 처리하여 24시간 동안 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 이후 세포 상등액 (50 µl)을 수거하여 동량의 griess reagent와 잘 혼합하였으며 5분 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다양한 농도의 nitric oxide standard와 흡광도 측정 결과를 비교하여 정량화하여 나타내었다.

9. Western blotting

Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도된 COX-2 와 iNOS 단백질의 발현에 대한 조릿대의 효과를 Western blot을 이용하여 관찰하였다. NO assay와 같은 조건의 처리를 한 세포를 수거 후 Radioimmuno-precipitation assay (RIPA) 용액으로 단백질을 분리하였다. 정제된 단백질은 BCA 정량 방법에 따라 정량하였다. 동

량의 단백질을 Mini-Protean tetra Cell (Bio-rad)를 이용하여 10% SDS-polyacrylamide gel에서 120V, 2시간동안 전기영동 후 1시간 동안 PVDF membrane으로 transfer하였다. 5% skim milk에서 1시간 동안 blocking 후 primary antibody (3% skim milk, 1:1000)를 처리하고 4°C에서 밤새 incubation 하였다. washing 후 secondary antibody (1% skim milk, 1:2000)에서 1 시간 incubation 후 ECL (neuronex, Seoul, South Korea)로 membrane을 감광하였다.

10. 지방전구세포 분화 억제능 및 Oil Red O 염색

1) 지방전구세포 분화

지방 전구세포(3T3-L1)를 well 당 4×10<sup>5</sup> 개가 되도록 seeding 한 후 1 µM dexamethasone, 0.5 mM IBMX, 10 µg/ml insulin 농도가 되도록 처리하여 48시간동안 배양하여 성숙 지방세포로 분화시켰다. 시료군에는 50 µg/ml의 농도로 시료를 처리하고 4 일간 배양하면서 분화를 관찰하였다.

2) Oil red O 염색

Oil red O 분말을 100% isopropanol에 녹이고 증류수와 6:4 비율로 혼합한 후 0.45 µm syringe filter로 여과하여 염색액을 준비하였다. 분화시킨 지방 세포를 10% formalin 용액으로 1시간 고정 한 후 미리 준비된 Oil red O 용액으로 15분간 염색한 후 증류수로 washing 하였다. 염색 결과는 현미경상으로 확인 후 isopropanol에 다시 Oil Red O를 녹여내어 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

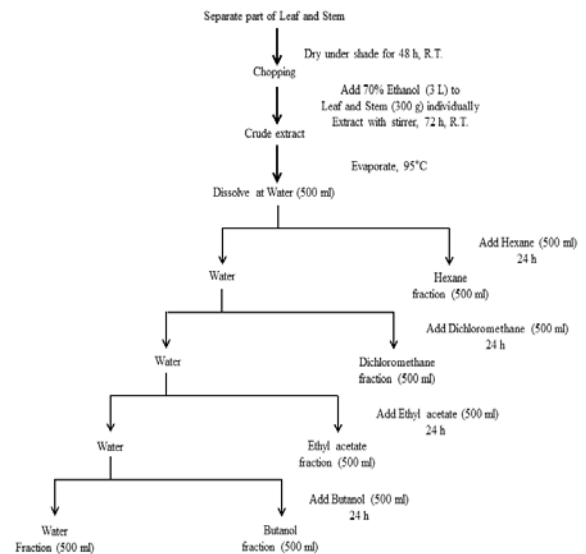


Fig. 1. Schematic diagram for preparation of crude extract and fractionation of *Sasa Borealis*.

11. Statistical analysis

실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, 유의성의 검증은 SigmaStat 3.5의 student's t-test (paired t-test) 검증을 사용하였으며 p<0.05, p<0.01 수준에 따라 유의성 수준을 나누었다. 기준선 작성과 분석에 Microsoft Excel, Graph Pad Prism (version

5.0) 을 이용하였다.

## 결 과

1. 조릿대 분획 추출물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거능 (DPPH, ABTS assay)

조릿대의 잎과 줄기의 5종 추출물의 DPPH 라디칼과 ABTS 라디칼 소거능을 0.25 mg/ml의 최종 농도에서 확인하였다. DPPH assay 결과 잎 추출물에서 에틸아세테이트 분획의 소거능은 81.57%로 양성대조군인 BHT의 소거능인 77.70% 보다 효과가 뛰어났다. 줄기 추출물에서는 디클로로메탄 분획과 부탄올 분획이 각각 69.43%, 67.24%의 소거능으로 가장 높았다(Table 1).

조릿대 분획별 ABTS assay 결과 잎 추출물의 경우 부탄올 분획에서 87.41%로 가장 뛰어난 소거능을 보여주었으며, 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획에서 85.46%, 86.25%로 비슷한 효과를 나타내었다. 줄기 추출물의 경우 부탄올 분획에서 85.64%로 가장 뛰어난 효과를 보였으며 다음으로 에틸아세테이트 분획이 80.69%의 소거능을 나타내었다(Table 1).

2. 조릿대 분획 추출물의 Superoxide anion 소거능(Superoxide anion assay)

조릿대의 잎, 줄기 추출물의 분획의 초과산화물 음이온 소거능은 약 0.167 mg/ml의 최종 농도에서 확인하였다. superoxide anion assay 결과 잎 추출물 분획 중 부탄올과 물 분획에서 70.60%, 65.64%의 음이온 소거능을 나타내었으며 줄기에서는 물 분획에서 71.11%, 디클로로메탄 분획에서 69.40%, 부탄올 분획에서 67.69%의 음이온 소거능을 나타내었다. 한편 같은 농도의 Ascorbic acid는 75.38%의 음이온 소거능을 나타내었다(Table 1).

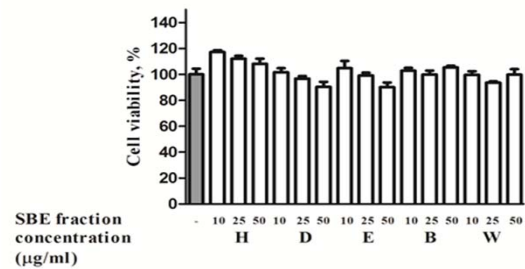
3. 조릿대 분획 추출물의 총 페놀함량

조릿대의 잎, 줄기 추출물의 5가지 분획의 총 페놀함량은 잎과 줄기 모두에서 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 부탄올 순으로 페놀함량이 높았다. 특히 잎과 줄기의 페놀 함량은 에틸아세테이트 분획에서 가장 높게 나타났으며 각각 8.79%, 8.06%로 우수한 함량으로 높게 나타났다. 또한 디클로로메탄 분획에서는 잎과 줄기에서 각각 3.79%, 5.17%로 함량에 차이가 있었다. 핵산과 물 분획에서는 상대적으로 적은 페놀 함량이 관찰되었다(Table 1).

4. 조릿대 추출물 분획의 세포 독성

Raw 264.7 를 이용한 cell viability 실험 결과 조릿대 잎추출물과 줄기추출물 모두에서 50 µg/ml 이하의 농도에서 24시간 처리 후 모든 샘플에서 대조군에 비하여 90% 이상의 viability를 나타내었으며 유의한 세포 독성을 나타내지 않았다(Fig. 2).

(A)



(B)

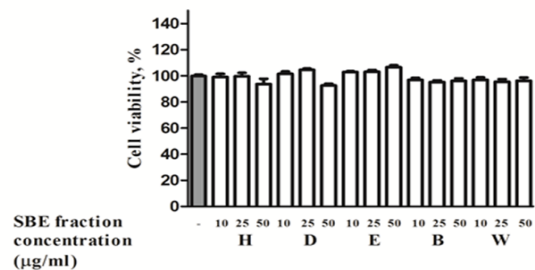


Fig. 2. Effect of fractions from *Sasa borealis* (A) Leaf and (B) Stem extraction on Raw 264.7 cell viability for 24 h. H; hexane, DCM; dichloromethane, EA; ethyl acetate, BU; buthanol, W; water extraction

5. LPS로 감작된 Raw 264.7 세포에서 NO 생성 억제능

조릿대의 줄기와 잎의 5종 추출물의 아질산염 억제능은 Nitric oxide standard와 흡광도 측정 결과를 비교하여 정량화하였으며 아래에 분획별 소거율을 나타내었다. Raw 264.7 세포는 LPS (1.5 µg/ml)을 처리한 군에서 음성대조군에 비해 7배 이상 NO 생성이 증가하였다. 한편 조릿대 추출물은 모든 분획에서 LPS에 의한 NO 생성을 유의하게 억제하였다. 특히 줄기와 잎의 구분없이 에틸아세테이트, 디클로로메탄 분획에서 뛰어난 NO 생성 억제능력을 나타내었다(Fig. 3).

Table 1. Antioxidant activities and total phenolic contents (TPC) of different fractions from leaf and stem of *Sasa borealis*

Fraction	DPPH Inhibition rate(%)		ABTS Inhibition rate(%)		NBT reduction rate(%)		TFC (mg CE/g extract)	
	Leaf	Stem	Leaf	Stem	Leaf	Stem	Leaf	Stem
Hexane	16.70±0.48	8.93±0.59	13.23±2.65	24.53±0.38	-	13.16±1.94	7.75±0.66	16.95±0.38
Dichloromethane	41.75±0.68	69.43±0.22	85.46±0.21	68.90±0.11	57.44±0.89	69.40±1.07	37.98±0.66	51.77±0.38
Ethyl acetate	81.57±0.22	52.86±1.28	86.25±0.18	80.69±0.28	59.83±0.30	60.68±1.29	87.91±1.74	80.68±2.01
Butanol	63.20±2.08	67.24±0.58	87.41±0.11	85.64±0.11	70.60±0.30	67.69±0.89	36.66±0.38	30.75±0.38
Water	22.86±1.83	27.75±2.22	51.24±1.02	35.17±0.69	65.64±0.51	71.11±0.30	8.41±0.38	12.35±0.38
BHT	76.69±0.58							
Ascorbic	89.34±0.11				75.38±0.51			
Trolox			46.20±0.39					

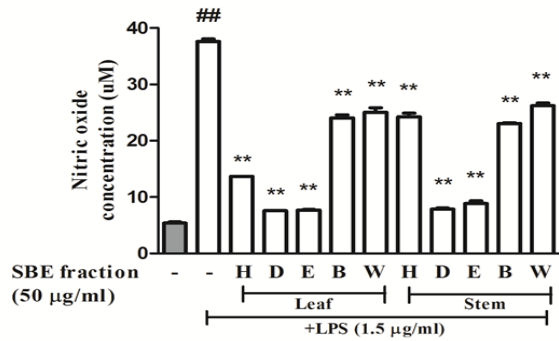


Fig. 3. Effect of Leaf and Stem fraction of *Sasa Borealis* extraction on nitric oxide production. H; hexane, D; dichloromethane, E; ethyl acetate, B; buthanol, W; water extraction

6. LPS로 감작된 Raw 264.7 세포에서 염증 단백질 발현 결과

조릿대의 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot을 실시하고 그 결과를 대조군의 발현과 비교하였다. LPS를 처리하였을 때 비처리군에 비해 iNOS의 발현이 7.2배로 증가하였으며, 잎에서는 디클로로메탄 분획이 1.2배로 iNOS 발현을 가장 현저하게 억제하였으며, 에틸아세테이트 분획은 2.4배로 나타났다. 줄기 추출물에서는 에틸아세테이트 분획이 0.8배로 현저한 억제능을 보여주었으며, 다음으로 핵산 분획이 2.4배로 양호한 효과를 보여주었다. 줄기 추출물이 잎 추출물에 비해 핵산, 물 분획에서 뛰어난 억제능을 나타냈다.

또한 COX-2의 경우, LPS 처리 군이 비처리군에 비해 2.8배가 증가하였으며, 잎 추출물에서는 핵산과 디클로로메탄 분획이 각각 2.3배, 1.6배로 억제 효과를 나타내었고, 줄기 추출물에서는 핵산 분획이 2.0배로 COX-2 발현을 억제하였다(Fig. 4).

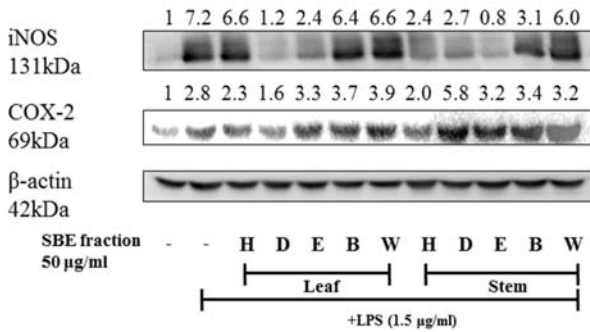


Fig. 4. Western blot image representing iNOS and COX-2 inhibitory effect of fractions from *Sasa Borealis* leaf and stem extraction. Fold change of protein level was normalized to the  $\beta$ -actin level.

7. 조릿대 분획 추출물의 지방전구세포 분화억제 효과

조릿대의 줄기와 잎의 5종 추출물의 비만 전구 세포에 대한 분화 억제 효과를 Oil Red O 염색을 통해 확인하였다. 그 결과 잎 분획의 경우 디클로로메탄, 에틸아세테이트 분획에서 유의한 분화 억제 효과를 보였다. 줄기 추출물의 경우 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획이 비슷한 정도로 분화를 억제하였으며 유의한 효능을 보여주었다(Fig. 5).

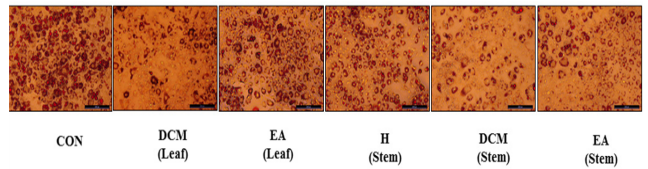
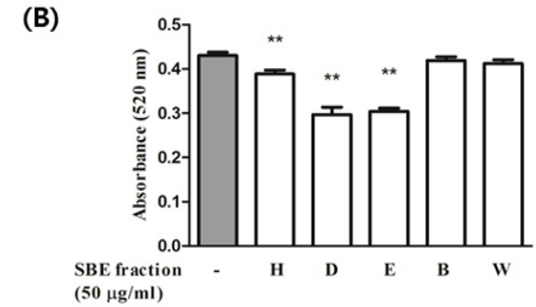
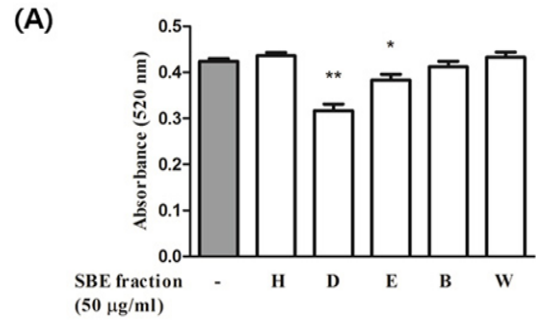


Fig. 5. Inhibitory effect of fractions from (A) Leaf and (B) Stem of *Sasa Borealis* extract on 3T3-L1 preadipocyte differentiation was investigated with Oil Red O staining.

고 찰

다양한 천연물 유래 추출물을 이용한 항산화 및 항비만 효과 연구가 관심을 얻고 있다. 본 연구에서는 조릿대 잎과 줄기에 포함된 성분을 핵산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획의 항산화 효과를 비교하고 LPS로 Raw 264.7 세포에 유발한 염증 상태에 미치는 영향을 파악하고, 나아가 3T3-L1 비만전구세포에 미치는 영향을 확인하였다. 이를 통해 다양한 조릿대의 잎과 줄기 분획 중에서 자유기에 의한 산화적 스트레스를 효과적으로 억제하고 염증상태를 완화시키며 지방세포 분화를 억제하는 분획을 선별하고자 하였다.

항산화 능력을 종합해볼 때, 잎과 줄기 분획의 에틸아세테이트 (EA) 및 디클로로메탄(DCM)에서 다른 분획에 비하여 뛰어난 항산화능을 나타내었다. 특히 잎 에틸아세테이트 분획은 DPPH와 ABTS 자유 라디칼 소거능이 뚜렷하게 나타났으며 이는 가장 높은 페놀 함량을 나타낸 결과와 일치한다. 페놀은 다양한 항알러지, 항염증, 항균 및 항산화 효과 등의 다양한 생리활성을 나타는 것으로 알려져 있다<sup>22)</sup>. 이런 점을 고려해볼 때, 항산화 능력이 뛰어난 조릿대 70% 에탄올 조추출물의 에틸아세테이트 분획에서 추가적인 효과를 기대해볼 수 있다.

Nitric oxide (NO)는 prostaglandin과 더불어 잘 알려진 염증

매개물질로 inducible nitric oxide synthetase(iNOS)에 의하여 다량 생성된다. 생성된 NO는 IL-6, TNF- $\alpha$ 와 같은 cytokine을 생산하여 병리적인 혈관확장과 세포독성, 조직손상 등의 유해한 작용으로 염증을 심화시키고 염증질환과 면역질환등 다양한 질환을 유발하므로 NO의 발현의 조절은 이후 proinflammatory cytokine의 조절<sup>23)</sup>과 염증의 종결<sup>24)</sup>에 있어 중요하다. 본 연구에서 LPS로 감작한 Raw 264.7 세포에서 잎과 줄기의 분획에서 공통적으로 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획에서 세포 독성을 가지지 않으면서 NO의 생성이 억제되는 것을 확인하였다. 또한 해당 세포에서 염증 관련 단백질 발현을 Western blot 방법을 통해 확인한 결과 잎과 줄기의 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획에서 억제된 iNOS 발현을 확인할 수 있었다. 또한 잎의 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획에서는 COX-2의 발현량 또한 감소한 것을 확인할 수 있었다.

분화된 지방세포에서는 triglycerides의 축적과 같은 형태적 특징과 함께 지방세포 특이적 유전자의 발현이 나타나며, 효과적인 비만억제를 위해서는 지방세포 분화과정에 관여하는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 를 포함하는 전사인자들의 활성을 억제하는 것이 매우 중요한 것으로 알려져있다. 또한 지질 과다축적과 지방세포 비대는 cytokine을 포함한 proinflammatory 인자와 관련된 것으로 보고되고 있으며<sup>25)</sup> 따라서 앞서 제시된 조릿대의 디클로로메탄층과 에틸아세테이트 분획이 COX-2와 iNOS 발현을 억제시킨 것을 근거로 항비만 효과를 나타낼 것으로 예상된다. 3T3-L1을 이용한 실험 결과 조릿대의 잎과 줄기의 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획은 지방전구세포의 분화와 지질 축적 양을 대조군에 비해 유의하게 억제하는 결과를 나타내었다.

조릿대의 잎에 포함된 성분으로 알려진 isoorientin과 isomer 형태인 orientin은 사람혈관내피세포 (HUVEC)에서 PMA와 LPS로 유도된 염증을 억제하고 chemokine의 발현을 감소시킨 보고가 있으며<sup>26)</sup> 또한 orientin이 3T3-L1 지방전구 세포의 분화를 억제하고 지방 축적을 억제한 효과를 보고가 있다<sup>27)</sup>. 한편, 조릿대의 줄기의 지방간 완화 효능에 대한 송 등의 연구<sup>18)</sup>에서, 항염증 및 항비만 효과가 알려진 luteolin 등의 phenol이 검출되었다. 이러한 사실들로 미루어 볼 때, 조릿대의 잎과 줄기에 함유된 생리 활성물질이 에틸아세테이트 또는 디클로로메탄 분획에 함유될 것으로 예상할 수 있다.

본 연구 결과 조릿대의 잎과 줄기의 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획이 항산화 및 항염증 효과가 뛰어난 것으로 나타났으며 지방분화세포의 분화 억제와 지질 축적 감소의 효과를 통해 잠재적인 항비만 효과 또한 관찰할 수 있었다. 향후 조릿대의 잎과 줄기 분획을 이용한 항산화, 항염증 및 항비만 연구를 통해 잠재적인 질환 치료물질의 개발이 기대된다.

## 결 론

조릿대의 잎과 줄기 70% 조추출물을 다양한 분획으로 나누어 항산화 및 항염증, 지방전구세포 분화 억제능을 관찰하였다. 그 결과 조릿대의 잎과 줄기 각각의 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획에서 높은 페놀 함량과 함께 강한 항산화능을 확인하였으며 Raw

264.7 세포에서 NO 생성을 효과적으로 억제하고, 염증 관련 인자인 iNOS 및 COX-2 발현을 감소시키면서 최종적으로 지방전구세포의 분화를 유의하게 억제하는 효과를 확인하였다. 따라서 다양한 질환에 대한 치료물질로서 조릿대의 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획의 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

## 감사의 글

본 연구는 2015년에 경상남도 진주 죽림원에서 조릿대를 공여받아 수행되었음.

## References

1. Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Bio Med* 49: 1603-1616, 2010.
2. Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B., 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 17: 24-38, 2003.
3. Finkel, T., Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247, 2000.
4. Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P., Mahajan, R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 7: 65-74, 2009.
5. Siti, H.N., Kamisah, Y., Kamsiah, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol* 71: 40-56, 2015.
6. Li, C.Q., Wogan, G.N. Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer letters* 226: 1-15, 2005.
7. Abramson, S.B., Amin, A.R., Clancy, R.M., Attur, M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Cl Rh* 15: 831-845, 2001.
8. Lee, Y.J., Yoon, B.R., Choi, H.S., Lee, B.Y., Lee, O.H. Effect of Sargassum micracanthum extract on lipid accumulation and reactive oxygen species (ROS) production during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Korean J. Food Preserv* 19: 455-461, 2012.
9. Adya, R., Tan, B.K., Randeva, H.S. Differential effects of leptin and adiponectin in endothelial angiogenesis. *J Diabetes Res* 2015: 648239, 2015.
10. Fernandez-Sanchez, A. et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 12: 3117-3132, 2011.
11. Demirtas, C.Y., Pasaoglu, O.T., Bircan, F.S., Kantar, S., Turkozkan, N. The investigation of melatonin effect on liver antioxidant and oxidant levels in fructose-mediated metabolic syndrome model. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*

- 19: 1915-1921, 2015.
12. Litvinova, L., et al. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome. *Front Physiol* 6: 20, 2015.
13. Park, Y.O., Lim, H.S. Antioxidant activities of bamboo (*Sasa borealis*) leaf extract according to extraction solvent. *J Korean Soc Food Sci and Nutr* 38: 1640-1648, 2009.
14. Ahn, M.J., Bae, J.Y., Park, J.H. Pharmacognostical Studies on the Folk Medicine 'JoRitDae'. *Korean J Pharmacogn* 40: 280-285, 2009.
15. Ko, M.S. Chemical components in stalks and leaves of *Sasa borealis* makino and antioxidative and antimicrobial activities of extracts. *Korean J. Food Preserv* 15: 125-132, 2008.
16. Lee, M.J., Moon, G.S. Antioxidative effects of Korean bamboo trees, Wang-dae, Som-dae, Maengjong-juk, Jolit-dae and O-juk. *Korean J of Food Sci Technol* 35: 1226-1232, 2003.
17. Park, Y.O., Lim, H.S. Antimicrobial activity of bamboo (*Sasa borealis*) leaves fraction extracts against food poisoning bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1745-1752, 2010.
18. Nam, J.S., et al. *Sasa borealis* extract exerts an antidiabetic effect via activation of the AMP-activated protein kinase. *Nutr Res Pract* 7: 15-21, 2013.
19. Hwang, J.Y., Han, J.S. Inhibitory effects of *Sasa borealis* leaves extracts on carbohydrate digestive enzymes and postprandial hyperglycemia. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 989-994, 2007.
20. Jeong, Y.H., et al. P-Glycoprotein Inhibitory Activity of Two Phenolic Compounds, (-)-Syringaresinol and Tricin from *Sasa borealis*. *Chem Biodivers* 4: 12-16, 2007.
21. Song, Y., et al. *Sasa borealis* stem extract attenuates hepatic steatosis in high-fat diet-induced obese rats. *Nutrients* 6: 2179-2195, 2014.
22. Park, H.S., Lim, J.H., Kim, H.J., Choi, H.J., Lee, I.S. Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *Sasa borealis*. *Arch Pharm Res* 30: 161-166, 2007.
23. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 99: 191-203, 2006.
24. Kobayashi, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 88: 1157-1162, 2010.
25. Peng, H.B., Spiecker, M., Liao, J.K. Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. *J Immunol* 161: 1970-1976, 1998.
26. Gustafson, B., Hammarstedt, A., Andersson, C.X., Smith, U. Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2276-2283, 2007.
27. Lee, W., Ku, S.K., Bae, J.S. Vascular barrier protective effects of orientin and isoorientin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Vascul Pharmacol* 62: 3-14, 2014.
28. Nagai, S., Wakai, E., Shibano, M., Fujimori, K. Anti-obesity effects of Asian dayflower, *Commelina communis*, in mice with high-fat diet-induced obesity and in 3T3-L1 cells. *J Funct Foods* 22: 490-503, 2016.