

영경귀 부위별 열수 추출물의 항비만 효과

윤홍화 · 조병옥 · 방승주 · 심재석¹ · 장선일*

전주대학교 보건관리학과, 1: 임실생약영농조합법인

Anti-Obesity Effects of Water Extracts from Different Organs of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*

Hong Hua Yin, Byoung Ok Cho, Chong Zhou Fang, Jae-Suk Shim¹, Seon Il Jang*

Department of Health & Science, Jeonju University, 1: Imsil Herbal Medicine Association

Cirsium japonicum var. *ussuriense* are often used in treatment of human diseases such as hemorrhage, blood congestion and inflammation in Korea. However, there was not report on the anti-obesity efficacy of water extracts from different organs of *C. japonicum* var. *ussuriense*. Here, we investigated the antioxidant effects of water extracts of flowers, leaves and roots from *C. japonicum* var. *ussuriense*. Total polyphenol amounts of the flower extract showed higher than those of leaf and root extract. Flower extract also showed the high antioxidant activities such as DPPH radical scavenging activity and reducing power. We also investigated the anti-obesity effects of water extracts of flowers, leaves and roots from *C. japonicum* var. *ussuriense* in 3T3-L1 cells and high fat diet-induced obesity mice. The mice were divided into four groups [high fat diet (HFD) control, HFD + leaf extract, HFD + flower extract and root extract] and administered with each extract (200 mg/kg) for 12 weeks. The flower and leaf extract significantly suppressed the levels of oil red O and triglyceride content. The flower and leaf extract also significantly reduced the triglyceride, total cholesterol and lower density lipoprotein levels of plasma as well as body and abdominal fat weight. Furthermore, oral glucose tolerance in the flower and leaf extract groups were significantly ameliorated in comparison to the high fat diet group. Therefore, these results indicate that the flower and leaf extract could ameliorate obesity and attenuate blood glucose level in high fat diet-induced obesity mice. We conclude that this study may provide positive insights into water extracts of flowers and leaves from *C. japonicum* var. *ussuriense* as a functional food ingredient for treatment of obesity.

keywords : *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*, Flowers, Leaves, Antioxidant, Anti-obesity

서론

비만은 제 2형 당뇨병을 비롯한 고혈압, 동맥경화, 암 및 심혈관계 질환 등 대사성 질환을 유발할 수 있는 주요 요인으로 현대인의 건강을 크게 위협하고 있다^{1,2)}. 이러한 비만을 해결하기 위해서는 식욕억제, 영양물질의 흡수저해, 에너지 소비촉진 및 체내지방 축적의 억제 등 효과가 있는 물질의 발굴이 필요하다^{3,4)}. 그러나 일반적으로 항비만 약물을 적용할 경우 두통과 구토 등을 유발하는 부작용이 있기 때문에 다이어트 시 고려해야할 사항으로 남아있다³⁾. 이러한 관점에서 최근 연구는 안전성이 확보된 식물유래 식용 기능성 물질들을 활용한 비만 개선 바이오 활성 소재 물질 발굴이 활발히 진행되고 있다⁵⁾. 특히 식물유래 polyphenol 중 flavonoid 계열의 바이오 활성 물질은 항산화뿐만 아니라 비만을 개선하는데 좋은 효과가 있는 것으로 알려져 있다^{5,6)}.

Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone)은 식품을 비롯한 여러 가지 한방소재를 비롯한 영경귀(*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*)에 함유된 yellow crystalline 바이오 활성물질로 최근 비만에 효과가 있는 것으로 알려졌다. Apigenin은 지방세포주인 3T3-L1 세포의 분화를 억제할 뿐만 아니라 비만모델동물에서 nicotinamide adenine dinucleotide+ (NAD+)를 증가시켜 global protein acetylation을 억제시켜 비만을 개선시키는 효과가 있다^{7,8)}.

영경귀(*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*)는 국화과 (Compositae)에 속하는 다년생 초본으로 뿌리, 잎, 줄기 및 꽃 부위를 약용으로 활용해왔다. 영경귀의 지상부인 잎, 줄기 및 꽃 등은 5-6월에 채취하고 뿌리는 가을에 채취하여 건조시킨 후 열수 또는 주정(알코올)을 활용하여 추출한 후 토혈, 혈뇨, 대하, 간염 및 고혈압 등 치료에 활용해왔다⁹⁾. 동의보감에 의하면, 영경귀의 성질은 평(平)하고 맛은 쓰며(苦) 독이 없고, 어혈이 풀리게 하고

* Corresponding author

Seon Il Jang, Department of Health & Science, Jeonju University, 303 Cheonjam-ro, Wansan-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, Korea

E-mail : sonjiang@jj.ac.kr Tel : +82-63-220-3124

Received : 2015/06/12 Revised : 2015/07/15 Accepted : 2015/07/20

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

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.08.29.4.322

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

피를 토하고 코피를 흘리는 것을 멎게 하며 응종과 음과 버짐을 낮게 하고 여자의 적.백대를 낮게 하고 정(精)을 보태 주며 혈을 보하는 효과가 있다고 하였다¹⁰⁾. 한방에서 영경귀 뿌리는 이뇨, 해독, 지혈 및 강장작용이 있어서 월경불순, 자궁근종, 빈혈, 요혈, 하혈 등의 치료에 쓰이고 있다. 또한 영경귀 꽃을 약용으로 사용하는데, 꽃이 누른 것은 황화지정(黃花地丁)이라 하고 꽃이 자줏빛인 것을 자화지정(紫花地丁)이라 하고 이들은 응종을 낮게 한다고 보고되어 있다¹¹⁾.

영경귀의 생리활성 물질은 apigenin, luteolin, myricetin, kaempferol, pectolinarin, 5,7-dihydroxy-6,4'-dimethoxyflavone, hispidulin-7-neohesperidoside flavonoid 등 flavonoid 계열의 화합물을 함유하고 있어 항염증, 항암, 항돌연변이, 항진균, 신경보호 및 면역 증진 활성을 가지고 있다¹¹⁻¹⁵⁾. 또한 영경귀 추출물은 지질과산화물을 억제하고 glutathione reductase의 활성을 증가시켜 알코올성 간질환을 개선하고¹¹⁾, 관절염을 억제시키는 효과가 있는 것으로 알려졌다^{16,17)}. 그러나 영경귀 부위별 추출물에 대한 항비만 효과에 대한 연구보고는 없는 실정이다.

그러므로 본 연구는 영경귀 부위별 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하고 부위별 추출물의 항산화효과를 검증한 후에 지방세포주인 3T3-L1 세포를 대상으로 지방 생성억제를 확인하고 고지방사료 투여에 의한 비만모델 마우스를 유도한 후 항비만 효과를 조사한 결과 흥미로운 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

Ascorbic acid, garlic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), butylated hydroxyanisole (BHA), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), dimethyl sulfoxide 및 기타 분석급 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 지질분석과 관련 있는 AM 202-K, AM 203-KTC 및 AM 157S-K kit 등은 아산제약(서울, 대한민국)에서 구입하였다.

2) 영경귀 재료

실험에 사용한 영경귀 부위 소재는 전라북도 임실생약영농조합법인으로부터 공급받았다. 건조된 영경귀 뿌리, 잎, 꽃은 각각 400 g으로 정량하여 증류수 4000 mL을 주입하고 1시간 끓인 후 얻어진 추출물을 0.45 µm 필터를 사용하여 여과 한 다음 동결건조기(EYELA FDU-2100, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)에서 건조하여 분말형태로 35-38 g을 회수하였다. 회수한 추출물은 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

3) 세포

마우스 배아에서 유래한 3T3-L1 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 전지방세포시기의 3T3-L1의 배양은 10% FBS, 0.15% sodium bicarbonate와 1% penicillin-streptomycin이 함

유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C에서 5% CO₂ 유지되는 배양기에서 배양하였으며, 지방세포분화를 유도하기 위해서 전지방세포시기의 배양액에 0.5 mM IBMX, 1 µM DEX 및 1 µM INS를 첨가하여 배양하면서 실험에 사용하였다.

4) 실험동물

비만 유도 실험동물은 무균환경에서 사육된 4주령 수컷 C57BL/6 마우스로 중앙실험동물사(서울, 대한민국)로부터 구입하였다. 일반 고형사료(Purina Lab. Rodent Chow(#38057), carbohydrates: 63.07%, fat: 12.41%, protein: 24.52%)와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 사육환경 온도 23±3°C, 밤낮주기(12시간)가 조절되는 환경에서 1 주일간 적응시킨 후 전주대학교 실험동물위원회의 실험 규정에 준하여 실행하였다(#JUU-IACUC-2014-04).

2. 방법

1) 총 폴리페놀의 측정

총 폴리페놀은 Mcdonal과 Prenzler의 방법에 따라서 정량하여 나타내었다¹⁸⁾. 영경귀 부위별 추출물 0.5 mL 또는 garlic acid (standard polyphenolic compound)를 0.2 M의 Folin-Ciocalteu reagent (5 mL)와 1 M Na₂CO₃ (4 mL)을 넣고 잘 혼합한 뒤 15 분 후 흡광도 765 nm에서 측정 하였다. Standard curve는 garlic acid를 사용하여 31.25-1000 µg/mL 농도로 제조한 후 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

2) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH 라디칼 소거 활성은 Blois¹⁹⁾의 방법으로 측정하였다. 영경귀 부위별 추출물을 500 µg/mL으로 정량하여 증류수에 녹여 96 well plate 에 각 시료를 100 µL를 주입하고, 동시에 0.3 mM DPPH 100 µL를 넣어 실온에서 20분간 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성 (%)=[1-(첨가군 흡광도/무첨가군 흡광도)]X100

3) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등²⁰⁾의 방법에 의하여 측정하였다. ABTS 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 혼합한 다음 실온, 암소에서 24시간 동안 방치하여 라디칼을 형성한 다음 ABTS 용액을 실험직전에 732 nm에서 흡광도가 0.70±0.03 (평균 ±표준오차)이 되도록 메탄올로 희석하여 사용하였다. 추출물의 최종 농도가 500 µg/mL 되도록 정량하여 50 µL에 준비된 ABTS 용액 950 µL를 첨가하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS의 소거활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거 활성 (%)=[1-(첨가군 흡광도/무첨가군 흡광도)]X100

4) 환원력 측정

환원력(reducing power)은 Oyaizu²¹⁾의 방법을 약간 변형하여

측정하였다. 엉덩귀 부위별 추출물을 500 µg/mL으로 정량하여 증류수에 녹인 후 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 500 µL를 각각 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시킨 후 실온에서 냉각하고 10% trichloroacetic acid 2.5 mL을 가하였다. 위 반응액을 1900 g 에서 10분간 원심분리하여 상층액 500 µL에 증류수 500 µL, 1% ferric chloride 100 µL를 가하여 혼합한 반응액의 흡광도 값을 700 nm에서 측정하였다.

5) 3T3-L1 지방세포의 triglyceride 함량 측정

분화된 3T3-L1 지방세포는 well 당 1×10^4 개를 24 well plate에 접종하고 24시간 후에 엉덩귀 잎, 꽃과 뿌리 추출물을 각각 200 µg/mL를 처리하였으며, 참고약물 대조군은 apigenin (10 µg/mL)을 처리하고 72시간 동안 배양한 후 PBS로 세척하고 lysis buffer (1% Triton X-100/PBS)를 주입하였다. 세포에서 총 triglyceride 함량은 triglyceride assay kit (아산제약, 서울, 대한민국). 단백질의 농도는 Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

6) Oil red O 염색

Oil red O 염색은 Ramírez-Zacarias 등²²⁾의 방법에 따라 수행하였다. 분화된 3T3-L1 지방세포는 well 당 1×10^4 개를 24 well plate에 접종하고 24시간 후에 엉덩귀 잎, 꽃과 뿌리 추출물을 각각 200 µg/mL를 처리하였으며, 참고약물 대조군은 apigenin (10 µg/mL)을 처리하고 72시간 동안 배양한 후 PBS로 세척하고 실온에서 20분간 10% 중성 포르말린용액(pH 7.2)을 주입하여 고정하였다. 그 후 포르말린용액을 제거하고 100% propylene glycol을 3분 동안 각 well에 넣고 다시 60% propylene glycol을 넣어 세포의 색소를 탈색한 다음 oil red O 용액을 주입하여 1시간동안 염색하였다. 그 후 세포의 잔여 oil red O를 제거하기 위해서 철저히 세척한 후 세포내 염색물을 well 당 1 mL의 isopropyl alcohol을 넣어 염색물을 용출시켰다. 용출된 염색액은 microplate readers (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 고지방식이 의한 비만 마우스 모델 제작

고지방식이(HFD)와 표준식이(STD)군의 사료(Table 1)는 Research Diet Inc. (New brunswick, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 표준식이(STD)군을 제외한 실험군들은 비만을 유도하기 위해 고지방식이를 8주간 급여하였다. 그 후 체중은 34-43 g과 혈당은 120-140 mg/dL의 마우스를 선별하여 실험군당 6마리를 무작위로 배정하였다. 실험 수행과정은 Fig. 1과 같다.

8) 실험군 선정 및 추출물 투여 계획

비만 C57BL/6 마우스를 각 실험군 당 6마리씩 나누고 표준식이군(normal control), 고지방식이군(HF control, 45% fat calories), 고지방식이와 엉덩귀 뿌리, 잎, 꽃 추출물을 투여하는 군으로 각각 나누고 고지방식이와 apigenin 투여군으로 나누어 12주간 사육하였다. 엉덩귀 부위별 추출물은 각각 200 mg/kg/body weight로 2.5 mL/kg씩 매일 경구투여용 존대를 사용하여 투여하였고 apigenin (10 mg/kg/body weight)도 같은 방법으로 경구 투여하였다.

9) 체중, 공복혈당 및 내당능 측정

체중은 실험 시작 일에 최초 측정 한 다음 2주 간격으로 실험 종료일까지 12주까지 측정 하였고, 공복혈당(fasting blood glucose)측정은 2주 간격으로 12주까지 12시간 이상 마우스를 금식 시킨 후 꼬리 정맥혈액을 채취하여 혈당측정기(Acu-Check, Roche Diagnostics Korea Co., Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. 복강 내당능(intraperitoneal glucose tolerance test) 검사는 실험종료 1주전 12시간 금식 시킨 후 포도당(1 g/kg/body weight) 용액을 복강에 주사한 후 0, 15, 30, 60, 120분에 마우스 꼬리 혈액을 채취하여 측정하였다.

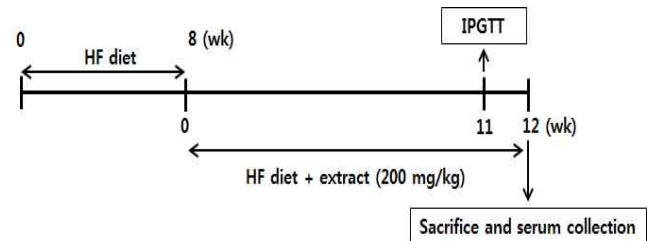


Fig. 1. Schedule for treatment of mice in the experiment. Mice were administration with only high fat diet (HFD) and then divided to 4 groups such as HFD control, HFD + leaf extract, HFD + flower extract and root extract and administered with each extract (200 mg/kg) for 12 weeks. Intraperitoneal glucose tolerance test IPGTT was performed at 11 weeks. The serum collection was performed at the last week before sacrificing mice.

Table 1. Ingredient and chemical composition of diets

Ingredient	Experimental groups ¹⁾	
	STD (g)	HFD (g)
Casein	200	200
L-Cystine	3	3
Corn starch	315	0
Maltodextrin 10	35	125
Sucrose	350	68.8
Cellulose	50	50
Soybean oil	25	25
Lard	20	245
Mineral mix S10026	10	10
Dicalcium phosphate	13	13
Calcium carbonate	5.5	5.5
Potassium citrate	16.5	16.5
Vitamin mix V10001	10	10
Choline bitartrate	2	2
	Gm%	Gm%
Protein	19.2	26.2
Carbohydrate	67.3	26.3
Fat	4.3	34.9
Kcal/gram	3.85	5.24

1) STD (standard diet with 10% fat calories); HFD (high fat diet with 45% fat calories).

10) 혈청 채취

12주간 추출물 투여 후 12시간 금식 시킨 후, 에테르 마취를 하고 심장에서 혈액을 채취한 후 채취한 혈액은 2500 rpm에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였으며 혈청의 생화학적 분석 전까지 -70°C에 보관 하였다.

11) 혈중 지질 농도 분석

혈청 지질 농도(lipid profile) 분석을 위해 측정용 kit (AM

202-K, AM 203-KTC, AM 157S-K)로 TC (total cholesterol), HDL (high density cholesterol), LDL (low density cholesterol) 및 TG (triglyceride)을 측정하였다. LDL 함량은 Friedewald 등²³⁾의 공식에 의해 {총콜레스테롤 -HDL콜레스테롤-(TG/5)}으로 계산하였다. 임상진단에서 순환계와 관련한 진단 지수인 동맥경화지수 (atherogenic index, AI)는 (total cholesterol - HDL cholesterol)/HDL cholesterol 식²³⁾으로 계산하고, 심장위험지수 (cardiac risk factor, CRF)는 total cholesterol/ HDL cholesterol 공식²³⁾에 의하여 산출하였다.

12) 통계처리

모든 실험값은 평균±표준편차(mean±SD)로 표시했으며, 통계 분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리하였으며, 유의성 한계는 p<0.05로 정하였다.

결 과

1. 엉겅퀴 부위별 추출물의 총 폴리페놀 및 항산화 효과

엉겅퀴 부위별 추출물의 총 폴리페놀 함량은 꽃, 잎 및 뿌리 추출물이 각각 6,758±15, 4,933±14, 708±14로 꽃 추출물이 가장 높았다(Table 2). 또한 DPPH와 환원력은 꽃 추출물이 각각 75.9±1.1%와 0.51±0.01(O.D.)로 다른 부위 추출물 보다 그 활성이 높았으며, 잎 추출물은 ABTS 라디칼 소거능이 61.7±0.6%로 가장 높은 활성을 보였다. 본 연구에서 사용된 엉겅퀴 부위별 추출물은 참고약물로 사용된 모든 물질에 비해서 그 활성이 낮았지만, 꽃 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 다른 부위에 비해서 매우 높은 활성을 보였으며, ABTS 라디칼 소거 활성은 잎 추출물이 가장 높았다.

Table 2. Total polyphenol contents and antioxidant effects of water extracts from different organs of *C. japonicum* var. *ussuriense*

Extract ¹⁾ or compound ²⁾	Total polyphenol (mg/100 g GAE)	Radical scavenging activity (%)		Reducing power (O.D.)
		DPPH	ABTS	
Flowers	6758±15	75.9±1.1	48.2±0.1	0.51±0.01
Leaves	4933±14	52.5±1.5	61.7±0.6	0.04±0.01
Roots	708±14	17.5±1.1	11.1±0.2	0.1±0.01
BHT	-	89.2±0.5	-	-
Trolox	-	-	94.6±0.2	-
Ascorbic acid	-	-	-	1.35±0.01

1) The extracts of the flowers, leaves and roots from *C. japonicum* var. *ussuriense* was prepared by extracting with water. 2) Reference compound: BHT (butylated hydroxyanisole), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), Ascorbic acid.

2. 엉겅퀴 부위별 추출물의 3T3-L1 세포 지방함량 억제 효과

엉겅퀴 부위별 추출물이 지방세포의 지방 함량을 억제하는지 알아보기 위하여 마우스 유래 지방세포주인 3T3-L1 세포를 활용하여 조사하였다. 먼저 3T3-L1 지방세포에 엉겅퀴 부위별 추출물을 각각 200 µg/mL을 처리하고 72시간 후에 oil red O로 염색한 결과 Fig. 2A와 같이 엉겅퀴 꽃 추출물은 대조군은 물론 다른 부위 추출물에 비해서 현저히 oil red O 염색상이 현저히 줄어는 효과가 있었다. 다음은 oil red O 함량과 중성지방함량을 조사한 결과 (Fig. 2B와 C) 대조군에 비해서 엉겅퀴 꽃 추출물은 각각 29.8%와

0.315 (O.D.)로 현저히 억제되었으며(p<0.001), 엉겅퀴 잎 추출물도 각각 66.7%와 0.53 (O.D.)로 유의하게 억제되었다(p<0.05). 그러나 엉겅퀴 뿌리 추출물의 경우 oil red O 염색상과 함량 및 중성지방의 변화에 영향을 미치지 못하였다. 특히 엉겅퀴 꽃 추출물의 oil red O 및 중성지방의 함량은 참고약물인 apigenin (각각 49.3%와 0.43 O.D.)보다 억제하는 효과가 우수하였다.

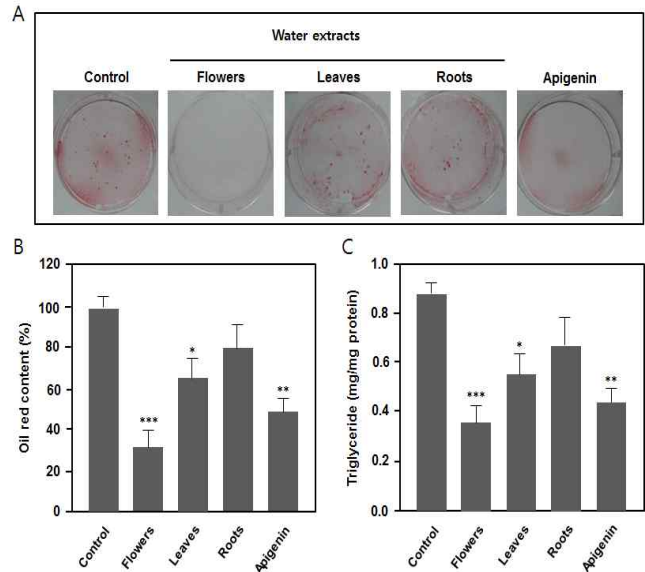


Fig. 2. Effect of water extracts from different organs of *C. japonicum* var. *ussuriense* on the inhibition of oil red O content and intracellular triglyceride production in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with 200 µg/mL flower, leaf or root extract for 72 h. (A) oil red O staining, (B) oil red O contents and (C) Triglyceride contents. Data are presented as the means±S.D. of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 vs. control.

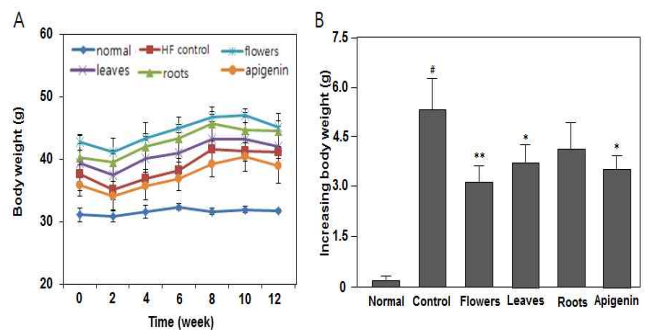


Fig. 3. Effect of water extracts from different organs of *C. japonicum* var. *ussuriense* on the inhibition of body weight in C57BL/6 obesity mice. Mice were administrated with standard (normal) diet (10% fat calories) or HF diet (45% fat calories) for 8 weeks and then divided to 6 groups such as Normal, HF, HF+Extract (flowers, leaves or roots) or HF+Apigenin. (A) Body weight for 12 weeks and (B) increasing body weight for 12 weeks. Data are presented as the means±S.D. of n=6 mice. #p<0.001 vs. normal group. *p<0.05 and **p<0.01 vs. control.

3. 엉겅퀴 부위별 추출물의 체중 감소에 미치는 효과

다음은 엉겅퀴 부위별 추출물이 비만 유도 C57BL/6 마우스의 체중 감소에 미치는 효과를 알아보기 위하여 엉겅퀴 부위별 추출물

을 투여하기 전 8주간은 모두 고지방사료를 투여하여 비만을 유도한 후 12주간 체중의 변화를 조사하였다. 대조군은 비만 유도 후 12주간 고지방사료를 투여하였고, 실험군은 고지방 사료와 영경귀 부위별 추출물(각각 200 mg/kg) 또는 참고약물인 apigenin (10 mg/kg)을 1일당 1회 경구투여하고 2주 간격으로 체중을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3와 같이 일반사료 투여 정상군에 비해서 고지방 투여 대조군은 현저히 체중의 증가를 보였다($p < 0.001$). 그러나 고지방 사료투여 대조군에 비해서 영경귀 뿌리 추출물은 체중감소에 효과는 없었지만, 꽃과 잎 추출물은 체중 감량이 유의한 효과가 있었다($p < 0.01$ 과 $p < 0.05$). 특히 영경귀 꽃 추출물은 잎과 apigenin 투여군 보다 더 체중감량의 효과가 있었다.

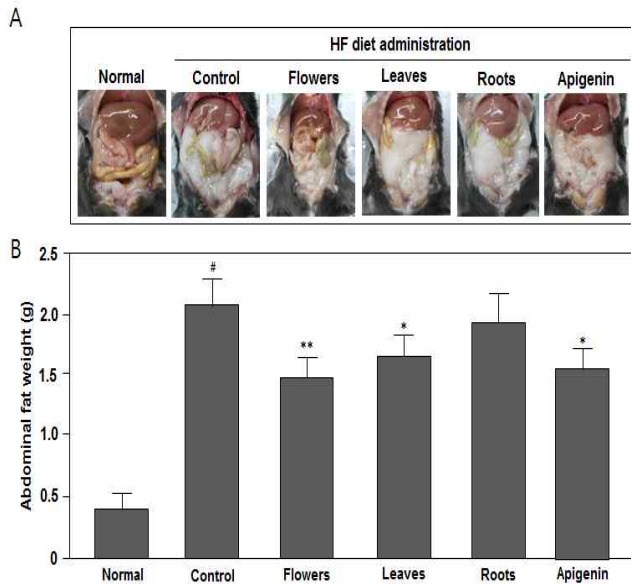


Fig. 4. Effect of water extracts from different organs of *C. japonicum* var. *ussuriense* on the inhibition of abdominal fat in C57BL/6 obesity mice administrated with high fat (HF) diet. Mice were administrated with standard (normal) diet (10% fat calories) or HF diet (45% fat calories) for 8 weeks and then divided to 6 groups such as Normal, HF, HF+Extract (flowers, leaves or roots) or HF+Apigenin. (A) Morphology of abdominal fat at 12 weeks and (B) weight of abdominal fat at 12 weeks. Data are presented as the means \pm S.D. of $n=6$ mice. # $p < 0.001$ vs. normal group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control.

4. 영경귀 부위별 추출물의 복부지방 감소에 미치는 효과

영경귀 부위별 추출물이 비만 유도 C57BL/6 마우스의 복부지방 감소에 미치는 효과를 알아보기 위하여 8주간은 모두 고지방사료를 투여하여 비만을 유도한 다음 영경귀 부위별 추출물을 12주간 투여한 후 복부지방을 측정하였다. 대조군은 비만 유도 후 12주간 고지방사료를 투여하였고, 실험군은 고지방 사료와 영경귀 부위별 추출물(각각 200 mg/kg) 또는 참고약물인 apigenin (10 mg/kg)을 1일당 1회 경구투여하고 최종 12주에 복부 지방을 측정하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 일반사료 투여 정상군에 비해서 고지방 투여 대조군은 현저히 복부지방의 증가를 보였다($p < 0.001$). 그러나 고지방 사료투여 대조군에 비해서 영경귀 뿌리 추출물은 복부지방 감소에 효과는 없었지만, 꽃과 잎 추출물은 복부지방 감량이 유의한 효과가 있었다($p < 0.01$ 과 $p < 0.05$). 특히 영경귀 꽃 추출

물은 잎과 apigenin 투여군 보다 더 체중감량의 효과가 있었다. 더불어 복부지방의 감소도 영경귀 꽃 추출물은 잎과 apigenin 투여군 보다 더 체중감량의 효과가 있었다(Fig. 4B).

5. 영경귀 부위별 추출물의 혈중 지방 감소에 미치는 효과

영경귀 부위별 추출물이 비만 유도 C57BL/6 마우스의 혈중 지방 감소에 미치는 효과를 알아보기 위하여 8주간은 모두 고지방사료를 투여하여 비만을 유도한 다음 영경귀 부위별 추출물을 12주간 투여한 후 혈액을 심장으로부터 채취하여 혈청에서 중성지방, 콜레스테롤과 고밀도지방(high density lipoprotein, HDL)과 저밀도 지방(low density lipoprotein, LDL)을 측정하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 일반사료 투여 정상군에 비해서 고지방 투여 대조군은 중성지방을 비롯한 모든 지방관련 지표가 현저히 상승하였다. 그러나 고지방 사료투여 대조군에 비해서 영경귀 뿌리 추출물은 복부지방 감소에 효과는 없었지만, 꽃과 잎 추출물은 중성지방과 총 콜레스테롤 및 LDL이 유의하게 감소되었다(Fig. 5A, B와 D). HDL의 경우 영경귀 부위별 추출물과 apigenin 투여군은 모두 대조군에 비해서 상승하는 효과가 있었다(Fig. 5C). 이러한 이유는 고지방 식이로 인한 결과로 사료된다.

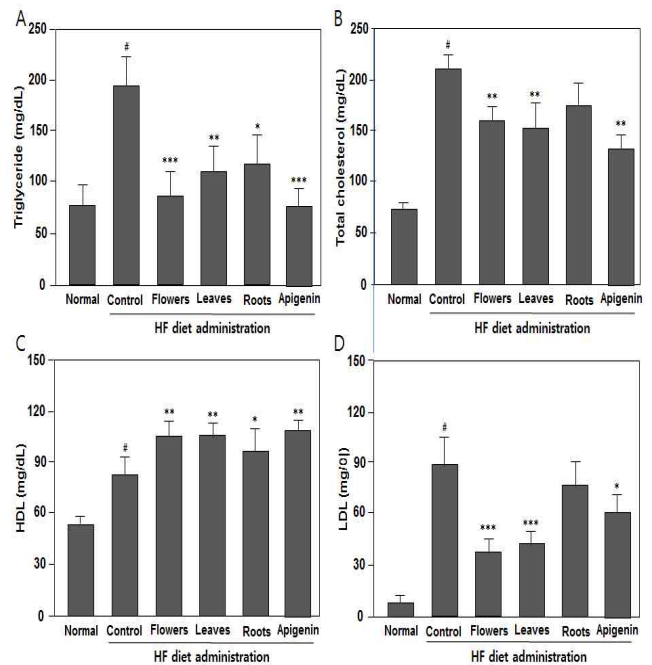


Fig. 5. Effects of water extracts from different organs of *C. japonicum* var. *ussuriense* on the serum lipid profile in C57BL/6 obesity mice. Mice were administrated with standard (normal) diet (10% fat calories) or HF diet (45% fat calories) for 8 weeks and then divided to 6 groups such as Normal, HF, HF+Extract (flowers, leaves or roots) or HF+Apigenin. (A) Triglyceride, (B) Total cholesterol, (C) HDL cholesterol and (D) LDL cholesterol. LDL cholesterol=[total cholesterol - HDL cholesterol - (triglyceride/5)] Data are presented as the means \pm S.D. of $n=6$ mice. # $p < 0.001$ vs. normal group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control.

6. 영경귀 부위별 추출물의 동맥경화 및 심장 위험지수에 미치는 영향

본 연구는 영경귀 부위별 추출물이 혈청의 동맥경화 지수 및

심혈관위험 지수에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 Table 3과 같이 동맥경화 지수와 심혈관위험 지수는 정상군이 0.31 ± 0.02 와 0.73 ± 0.03 인데 비해서 대조군은 1.62 ± 0.23 과 2.55 ± 0.21 으로 현저히 증가하였다($p < 0.001$). 그러나 영경귀 꽃 추출물과 잎 추출물은 대조군에 비해서 유의하게 감소되는 효과가 있었다. 이러한 결과는 비만에 의한 심혈관계 질환의 위험도 판정에 이용되는 동맥경화지수와 심혈관위험지수가 영경귀 꽃 추출물과 잎 추출물의 투여에 따라 체내의 지질대사를 개선하여 심혈관계 질환의 위험을 감소시키는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

Table 3. Effects of water extracts from different organs of *C. japonicum* var. *ussuriense* on atherogenic index (AI) and cardiac risk factor (CRF) in C57BL/6 obesity mice

Groups	Atherogenic index	Cardiac risk factor
Normal	0.31 ± 0.02	0.73 ± 0.03
Control	$1.62 \pm 0.23\#$	$2.55 \pm 0.21\#$
Flower extract	$0.49 \pm 0.19^{**}$	$1.50 \pm 0.18^{**}$
Leaf extract	$0.42 \pm 0.18^{**}$	$1.43 \pm 0.17^{**}$
Root extract	$0.77 \pm 0.21^*$	1.84 ± 0.19
Apigenin	$0.41 \pm 0.15^{**}$	$1.22 \pm 0.14^{**}$

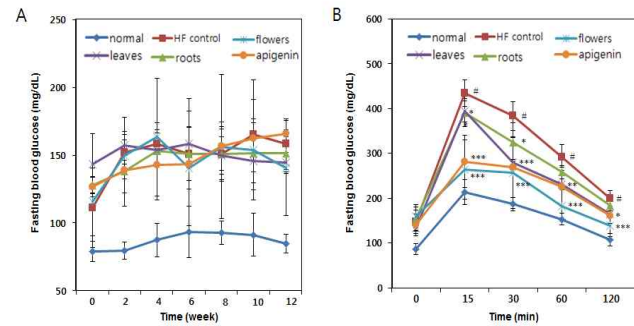


Fig. 6. Effects of water extracts from different organs of *C. japonicum* var. *ussuriense* on the inhibition of fasting blood glucose and oral glucose tolerance test in C57BL/6 obesity mice. Mice were administrated with standard (normal) diet (10% fat calories) or HF diet (45% fat calories) for 8 weeks and then divided to 6 groups such as Normal, HF, HF+Extract (flowers, leaves or roots) or HF+Apigenin. (A) Fasting blood glucose contents for 12 weeks per 2 weeks and (B) Fasting blood glucose contents at 12 weeks on oral glucose tolerance test. Data are presented as the means \pm S.D. of $n=6$ mice. $\#p < 0.001$ vs. normal group. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.01$ vs. control.

7. 영경귀 부위별 추출물의 혈당감소에 미치는 효과

영경귀 부위별 추출물이 비만 유도 C57BL/6 마우스의 혈당감소에 미치는 효과를 알아보기 위하여 8주간은 모두 고지방사료를 투여하여 비만을 유도한 후 꼬리정맥으로부터 혈당을 측정하여 120~140 mg/dL 범위의 마우스를 선별하여 실험군당 6마리씩 배정하여 영경귀 부위별 추출물을 12주간 투여하면서 2주 간격으로 꼬리정맥으로부터 혈당을 측정하였다. 그 결과 Fig. 6A와 같이 대조군을 비롯한 영경귀 추출물과 apigenin은 최초 혈당 수치보다 시간이 지날수록 높았으나, 그룹 간 큰 차이를 볼 수 없었다. 그러므로 본 연구는 영경귀 부위별 내당능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험 최종일에 내당능 검사를 하였다. 그 결과 Fig. 6B와 같이 glucose를 투여한 후 15분 후에 대조군에 비해서 영경귀 부

위별 추출물 투여군은 유의하게 혈당강하 효과가 있었다. 영경귀 꽃 추출물은 15분에서부터 30분까지 apigenin과 유사하였으나, 시간이 경과할수록 apigenin 보다 혈당강하 효과가 우수하였다. 또한 영경귀 잎 추출은 15분에는 apigenin 보다 혈당강하 효과가 낮았지만, 시간이 지날수록 apigenin과 유사한 혈당강하 효과가 있었다. 그러나 영경귀 뿌리 추출물은 15분에 영경귀 잎과 같은 혈당강하가 있었을 지라도 시간이 경과할수록 영경귀 꽃 추출물은 물론 영경귀 잎 추출물보다 혈당강하 효과가 낮았다.

고 찰

현재 대표적으로 항비만 용으로 활용되고 있는 치료제는 췌장 지방분해효소(pancreatic lipase)을 억제함으로써 내장지방을 감소시키는 orlistat (Xenical)²⁴와 식욕을 억제시키는 sibutramine (Reductil)²⁵가 알려졌다. 그러나 이들 약물은 혈압의 상승, 갈증, 두통, 변비 및 불면증 등 심한 부작용이 동반될 수 있어 문제점을 안고 있다²⁶. 그러므로 부작용이 없고 안전성이 확보된 비만 개선에 대한 천연물 소재를 대상으로 연구가 활발히 진행되고 있다^{3,5}. 본 연구는 이러한 관점에서 전통적으로 한방에서 사용하고 있는 영경귀 부위별 추출물을 대상으로 비만개선 효과가 있는 것으로 알려진 식물유래 apigenin과 항비만 효과를 조사하였다.

먼저 본 연구는 영경귀 부위별 추출물을 대상으로 총 폴리페놀 함량을 조사한 결과 영경귀 꽃 추출물(6758 ± 15 mg/100 g)은 잎과 뿌리 추출물에 비해서 각각 1.36배와 9.54배로 가장 높았다 (Table 1). 또한 영경귀 추출물은 DPPH 라디칼 소거 활성과 환원력도 다른 부위보다 항산화 활성이 높았다. 그러나 ABTS 라디칼 소거 활성은 잎 추출물이 $61.7 \pm 0.6\%$ 로 꽃 추출물($48.2 \pm 0.1\%$) 보다 높았다. 일반적으로 식품을 비롯한 한방에서 사용하고 있는 약용식물은 폴리페놀계 화합물을 포함하고 있는데, 이 계열의 물질은 항산화 활성 작용이 있다. 인체에서 비만으로 야기되는 당뇨병을 비롯한 심혈관계 질환은 염증을 동반하는데, 염증반응이 진행되면 필연적으로 ROS (reactive oxygen species)와 RNS (reactive nitrogen species)를 대량 생성됨으로써 정상조직을 손상시키는 것으로 알려져 있다²⁷. 그러므로 본 연구 결과 영경귀 꽃과 잎의 항산화 활성은 비만으로 야기될 수 있는 조직 손상을 개선시키는데 효과적으로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

다음은 본 연구결과에서는 보여주지 않았지만, 영경귀 부위별 추출물의 농도를 50-500 μ g/mL까지 24시간 처리한 결과 세포독성이 없음을 확인한 후 3T3세포의 지방 함량 농도를 정하여 실험하였다. 영경귀 부위별 추출물이 마우스 비만세포주인 3T3-L1 세포에서 oil red O와 triglyceride 함량에 미치는 영향을 조사한 결과 꽃 추출물은 대조군에 비해서 각각 68%와 57%를 감소시키는 효과로 잎과 뿌리 추출물보다 우수한 지방생성 억제 효과를 보였다. 특히 영경귀 꽃 추출물은 참고약물로 사용한 apigenin 보다 oil red O와 triglyceride 함량이 각각 18%와 10% 높은 감소효과를 보여주었다. Apigenin은 식품을 비롯한 한방에서 활용하고 있는 약용식물에 함유되어 있는 flavonoid계 천연물질로 항산화를 비롯한 항암, 항염증 및 항비만 작용이 있는 것으로 잘 알려졌다^{3,5}.

최근에 팔꽃나무(*Daphne genkwa*)를 비롯한 엉겅퀴 꽃으로부터 분리한 apigenin을 활용하여 바이오 활성에 대한 연구가 진행되고 있다^{8,28}). Apigenin은 p53과 RelA-p65의 acetylation 뿐만 아니라 global protein acetylation를 감소시키는 생화학적 신호전달을 억제시킴으로써 비만을 개선시키는 효과가 있고, 주요 조절 표적분자가 CD38로 알려져 있다⁸). 이와 같이 엉겅퀴 꽃 추출물은 apigenin을 비롯한 바이오 활성물질이 함유되어 지방생성을 억제하는 것으로 추정된다.

그 다음은 엉겅퀴 부위별 추출물이 고지방 사료 투여에 의한 비만 모델 마우스에서 체중 및 복부지방 감량에 효과가 있는지 알아보았다. 본 연구는 고지방 사료를 8주간 투여한 후 비만을 유도한 후 엉겅퀴 부위별 추출물을 12주간 투여한 후 비만 개선에 대한 효과를 확인하였다. 그 결과 엉겅퀴 꽃 추출물과 잎 추출물은 체중 및 복부지방 감소에 유의한 효과가 있음을 알 수 있었다. 12주간의 체중변화에서 0주에 군별 체중 차이를 보였는데 이는 8주간의 고지방식이 투여로 인하여 생긴 개체차이로 사료된다. 또한 엉겅퀴 꽃 추출물과 잎 추출물은 고지방사료에 의해 증가된 중성지방과 총 콜레스테롤 및 LDL의 함량을 유의하게 억제시키는 효과가 있었다. 동맥경화 지수는 임상에서 3.0 이상의 값을 나타냈을 때 동맥경화의 위험신호로 사용되고 있다²³). 본 연구에서 고지방 사료 (45% fat 함유)를 투여한 결과 대조군의 동맥경화 지수가 3.0에는 미치지 못하였지만 1.62로 정상군(0.32)에 비해서 5배 이상의 수치를 보였다. 그러나 엉겅퀴 꽃 추출물과 잎 추출물을 투여한 실험군은 대조군에 비해서 유의하게 감소되는 효과를 보였다. 또한 심혈관위험 지수 역시 대조군에 비해 엉겅퀴 꽃 추출물과 잎 추출물을 투여한 실험군은 현저히 억제되는 효과를 보였다.

마지막으로 비만은 제 2형 당뇨병을 유발할 수 있기 때문에 실험기간 동안 2주 간격으로 혈당을 조사하였다. 엉겅퀴 부위별 추출물은 대조군에 비해서 공복 혈당을 감소시키는 경향이 있었으나 유의한 차이가 없었다. 그러나 11주에 내당능을 검사한 결과 엉겅퀴 부위별 추출물은 혈당강하에 대한 유의한 효과가 있음을 검증하였다(Fig. 6). 특히 엉겅퀴 꽃 추출물은 내당능 검사 전 시간에 걸쳐 혈당강하 효과가 참고약물인 apigenin과 유사하거나 높았다.

비만은 제 2형 당뇨병, 고혈압, 골관절 및 심혈관계 질환을 유발할 수 있는 주요 요인으로 WHO는 1992년부터 질환으로 규정할 정도로 전 세계에서 현대인의 건강을 위협하는 요소로 인식하고 있다¹⁻⁵). 그러므로 비만을 치료할 수 있는 약물개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 현재까지 부작용이 없고 안전성이 확보된 치료약은 없는 실정으로 비만을 개선시킬 수 있는 천연물을 대상으로 연구가 활발히 전개되고 있다. 엉겅퀴는 모든 부위를 식용과 약용으로 사용할 수 있는 한국식품의약품안전처의 공시된 소재로 본 연구는 엉겅퀴 꽃, 잎과 뿌리를 대상으로 열수 추출하여 비만을 개선할 수 있는지 여부를 조사하였다. 그 결과 엉겅퀴 꽃과 잎 추출물은 항산화 효과는 물론 체지방 감소에 우수한 효과가 있는 소재임을 밝혔다. 더욱이 엉겅퀴 꽃과 잎 추출물은 혈당을 강하시킬 수 있는 좋은 소재임을 검증하였다. 그러므로 엉겅퀴 꽃과 잎 추출물은 비만을 개선하고 비만과 관련된 대사성 질환을 개선하는데 유용하게 사용할 수 있는 소재라 사료된다.

결론

본 연구는 엉겅퀴 부위별 열수 추출물을 대상으로 항산화 효과를 검증한 결과 엉겅퀴 꽃 추출물은 엉겅퀴 잎과 뿌리 추출물에 비해서 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거 활성 및 환원력이 가장 우수하였다. 그러나 ABTS 라디칼 소거 활성은 엉겅퀴 꽃 추출물에 비해서 엉겅퀴 잎 추출물이 높았다. 엉겅퀴 부위별 열수 추출물을 대상으로 3T3 지방세포에서 oil red O와 중성지방 생성능을 조사한 결과 엉겅퀴 꽃 추출물이 가장 우수한 억제 효과를 보였다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 엉겅퀴 부위별 추출물이 고지방사료로 유도된 비만 모델동물에서 체지방 감소에 어떠한 영향을 미치는지 조사한 결과 엉겅퀴 꽃 추출물과 잎 추출물은 체중과 복부지방 중량뿐만 아니라 중성지방, 총콜레스테롤 및 LDL를 현저히 억제시키는 효과가 있었다. 더불어 엉겅퀴 꽃 추출물과 잎 추출물은 HDL 함량을 유의하게 증가시켜 동맥경화 지수와 심혈관위험 지수를 억제시키는 효과가 있었다. 더욱이 엉겅퀴 꽃 추출물과 잎 추출물은 비만 모델동물에서 당부화에 의한 혈당을 효과적으로 억제하는 효과가 있었다. 그러므로 본 연구 결과는 엉겅퀴 꽃 추출물과 잎 추출물이 고지방 사료로 유도된 비만 모델동물에서 비만과 혈당을 개선시킬 수 있음을 제시했다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 엉겅퀴 꽃 추출물과 잎 추출물은 비만치료를 위한 기능성 소재로서 활용할 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

본 논문은 중소기업청에서 지원하는 2014년도 산학연협력 기술개발사업(C0187369)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

1. Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., Thun, M.J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England Journal of Medicine* 348(17):1625-1638, 2003.
2. Kannel, W.B., Cupples, L.A., Ramaswami, R., Stokes, J., Kreger, B.E., Higgins, M. Regional obesity and risk of cardiovascular disease: the Framingham Study. *Journal of Clinical Epidemiology* 44(2):183-190, 1991.
3. Bray, G.A., Tartaglia, L.A. Medicinal strategies in the treatment of obesity. *Nature* 404(6778):672-677, 2000.
4. Wang, C., Wang, L., Yang, Z. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in the type 2 diabetes and obesity. *Yi Chuan* 26(6):941-946, 2004.
5. González-Castejón, M., Rodríguez-Casado, A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharmacological Research* 64(5):438-455, 2011.
6. Yun, J.W. Possible anti-obesity therapeutics from nature - A review. *Phytochemistry* 71(14-15):1625-1641, 2010.

7. Kim, M.A., Kang, K., Lee, H.J., Kim, M., Kim, C.Y., Nho, C.W. Apigenin isolated from *Daphne genkwa* Siebold et Zucc. inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation through a modulation of mitotic clonal expansion. *Life Sciences* 101(1-2):64-72, 2014.
8. Escande, C., Nin, V., Price, N.L., Capellini, V., Gomes, A.P., Barbosa, M.T., O'Neil, L., White, T.A., Sinclair, D.A., Chini, E.N. Flavonoid apigenin is an inhibitor of the NAD⁺ase CD38: implications for cellular NAD⁺ metabolism, protein acetylation, and treatment of metabolic syndrome. *Diabetes* 62(4):1084-1093, 2013.
9. Lee, S.J. Korean folk medicine. Seoul National University Press, Seoul. pp 145-146, 1966.
10. Chung, C.J. Thistle plant as a resources of many utilizing value. The Korea Plant Conservation Society, Korea, p 372, 1993.
11. Chung, M.S., Um, H.J., Kim, C.K., Kim, G.H. Development of functional tea product using *Cirsium japonicum*. *Journal of the Korean Society of Food Culture* 22(2):261-265, 2007.
12. Liu, S., Luo, X., Li, D., Zhang, J., Qui, D., Liu, W., She, L., Yang, Z. Tumor inhibition and improved immunity in mice treated with flavone from *Cirsium japonicum* DC. *International Immunopharmacology* 6(9):1387-1393, 2006.
13. Lee, H.K., Kim, J.S., Kim, N.Y., Kim, M.J., Park, S.U., Yu, C.Y. Antioxidant, antimutagenicity and anticancer activities of extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* KITAMURA. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 11(1):53-61, 2003.
14. Kim, S.J., Kim, G.H. Identification for flavones in different parts of *Cirsium japonicum*. *Journal of Food Science and Nutrition* 8(4):330-335, 2003.
15. Lee, M.K., Moon, H.C., Lee, J.H., Kim, J.D., Yu, C.Y., Lee, H.Y. Screening of immune enhancing activities in medicinal herbs, Compositae. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 10(1):51-57, 2002.
16. Lee, J.H., Choi, S.I., Lee, Y.S., Kim, G.H. Antioxidant and anti-inflammatory activity of ethanol extract from leaves of *Cirsium japonicum*. *Food Science and Biotechnology* 17(1):38-45, 2008.
17. Park, J.C., Hur, J.M., Park, J.G., Kim, S.C., Park, J.R., Choi, S.H., Choi, J.W. Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. *Phytotherapy Research* 18(1):19-24, 2004.
18. Blainski, A., Lopes, G.C., de Mello, J.C. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 18(6):6852-6865, 2013.
19. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200, 1958.
20. Re, R., Pelligrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10):1231-1237, 1999.
21. Oyaizu, M. Studies on products of browning reactions. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* 44(6):307-315, 1986.
22. Ramírez-Zacarias, J.L., Castro-Muñozledo, F., Kuri-Harcuch, W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O. *Histochemistry* 97(6):493-497, 1992.
23. Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 18(6):499-502, 1972.
24. Thurairajah, P.H., Syn, W.K., Neil, D.A., Stell, D., Haydon, G. Orlistat (Xenical)-induced subacute liver failure. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 17(12):1437-1438, 2005.
25. Tziomalos, K., Krassas, G.E., Tzotzas, T. The use of sibutramine in the management of obesity and related disorders: an update. *Vascular Health and Risk Management* 5(1):441-452, 2009.
26. Karamadoukis, L., Shivashankar, G.H., Ludeman, L., Williams, A.J. An unusual complication of treatment with orlistat. *Clinical Nephrology* 71(4):430-432, 2009.
27. Singh, P.P., Mahadi, F., Roy, A., Sharma, P. Reactive oxygen species, reactive nitrogen species and antioxidants in etiopathogenesis of diabetes mellitus type-2. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 24(4):324-342, 2009.
28. Han, J.Y., Ahn, S.Y., Kim, C.S., Yoo, S.K., Kim, S.K., Kim, H.C., Hong, J.T., Oh, K.W. Protection of apigenin against kainate-induced excitotoxicity by anti-oxidative effects. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 35(9):1440-1446, 2012.