

한국인 다소비 채소의 에탄올 추출물이 LPS 처리된 대식세포에서 NO, TNF- α 와 MCP-1 분비에 미치는 영향

안은미^{1,2} · 강현주¹ · 박영희¹ · 김 영¹ · 강민숙^{1,*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부, ²전북대학교 식품영양학과

Effects of Ethanol Extracts from Commonly Consumed Vegetables by Koreans on NO, TNF- α and MCP-1 Production in LPS-stimulated RAW 264.7 Macrophages

Eun Mi Ahn^{1,2}, Hyun Ju Kang¹, Young-hee Park¹, Young Kim¹ and Min-Sook Kang^{1,*}

¹Dept. of Agrofood Resources, National Academy of Agricultural Sciences, Wanju 565-851, Korea

²Dept. of Food Science and Human Nutrition, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

ABSTRACT

Korean dishes, *Hansik* is characterized by healthful vegetable intake. The purpose of this study was to evaluate the inhibitory effect of commonly consumed vegetables by Koreans on obesity/metabolic disease-related inflammation. Through statistical analysis of the KNHANES database (1st 1998, 5th 2010, 2011) and a literature review, we selected vegetables for study. Among the vegetables, main or sub ingredients of *Kimchi* were excluded. Samples were prepared using only edible portions and freeze-dried. After grinding, samples were extracted with ethanol, evaporated and finally lyophilized. The cytotoxicity of samples was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, at various concentrations that do not affect cell viability. Raw 264.7 macrophages were treated with lipopolysaccharide (LPS) and 11 kinds of samples or positive control (troglitazone) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). After 24 hours, nitric oxide (NO), tumor necrosis factor α (TNF- α) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) production were determined. Excepts for young pumpkin and bracken, nine samples effectively reduced NO production compared with control treated with LPS and DMSO. NO levels of five samples (bean sprouts, leeks, eggplant, mugwort, and pumpkin) were similar to that of the positive control. These five samples showed significantly decreased TNF- α or MCP-1 compared to the control group. Our results suggest that consumption of commonly consumed vegetables contributes to partial prevention of obesity and related metabolic syndrome through reduction of NO, TNF- α , and MCP-1 production.

Key words: Commonly consumed vegetables, NO, TNF- α , MCP-1, RAW 264.7 macrophages

서 론

우리나라 전통 식생활은 곡류인 밥을 위주로 하여 반찬으로 두류, 채소류, 육류, 난류, 생선류 등을 사용하며, 전체적으로 식물성 식품 위주에 동물성 식품이 혼합된 구성이 특징이다. 식사의 에너지 밀도가 낮으며 동물성 지방과 콜레스테롤 섭취가 낮고, 다양한 식품군에 함유된 생리활성물질을 풍부하게 섭취할 수 있다(Kwon OR 2011). 또한 한식의 조리법 중 나물과 같이 데쳐서 무치는 방법은 많은 양의 채소를 적은 부피로 쉽게 섭취할 수 있는 장점이 있다. 최근 미비하지만 한식의 종합적 섭취를 기반으로 한 임상연구가 진행되었고, 건강증진에 긍정적인 결과를 얻고 있다(Fuller *et al* 2012;

Chae SW 2011). 그러나 한국의 급격한 경제발달과 맞물려 우리의 식사는 전통 한식의 상차림에서 벗어나, 점차 서구화, 간편화, 외식화 되고 있으며, 육류소비의 증가로 식물성 식품의 섭취는 1970년대 이후 지속적으로 감소하는 추세이다(Kwon *et al* 2009). 이러한 식품소비의 변화는 한국인의 만성 대사성질환의 증가와도 깊은 연관이 있다(Kim & Ryu 2009; Ahn *et al* 2007). 국민건강영양조사 자료를 토대로 한 Lim *et al* (2011)의 연구에서는 20세 이상의 대사증후군의 유병률은 1998년 24.9%에서 2007년에는 31.3%로 증가하였으며, 이는 전체의 약 1/3에 해당하는 수치로 3명 중 한 명 꼴로 질병의 위험에 노출되어 있을 정도로 높은 비율을 차지하고 있다.

한국인의 식사패턴과 대사증후군 발병 관련 국민건강영양조사 자료 분석연구에서는 전곡류, 채소, 생선으로 구성된 식사패턴이 건강에 이로운 영양소(필수 지방산, 식이섬유와 항

*Corresponding author : Min-Sook Kang, Tel: +82-63-238-3578, Fax: +82-63-238-3842, E-mail: mskang0803@korea.kr

산화 영양소 등)를 많이 섭취할 수 있기 때문에 한식의 다른 식사패턴에 비해 대사증후군의 위험을 약 20% 정도 감소시킨다고 보고하였다(Kim & Jo 2011). 그 중 채소류의 주요 활성 성분은 비타민과 무기질, 식물성 식이섬유와 식물화학물질로 다양한 생리기능과 대사과정 조절, 항산화와 항암효과의 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Hartley *et al* 2013). 또한 식이섬유는 대장 기능 개선, 담즙산 배설, 혈중 콜레스테롤 저하 등의 생리기능 조절을 통해 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 대장암 등을 예방한다(Lee YE 2005). 한국인 성인을 대상으로 한 연구에서는 전체 대상자의 채소섭취량을 기준으로 50분위 이상과 이하로 나누어 두 그룹을 비교하였을 때, 채소의 섭취량이 50분위 이상인 그룹에서 총콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 수치, 이완기 혈압이 낮아지는 것으로 보고되었다(Choi & Bae 2007).

비만을 비롯한 만성 대사성 질환은 단순히 지방세포의 크기와 수의 증가뿐만 아니라, 생체 내에서 만성적인 염증이 발생한다는 연구결과는 이미 여러 연구를 통해서 알려진 바 있다(Wellen & Hotamisligil 2005). 만성 염증물질 분비의 억제와 개선은 인슐린 저항성을 비롯하여 제 2형 당뇨와 심혈관계 질환의 발생을 억제하며, 진행 상태를 개선하는데 중요하다(Yu R 2005).

체내의 마크로파지는 면역반응에서 병원체에 반응하여 염증성 사이토카인을 생성하며, 비만상태의 지방세포에 침윤된 마크로파지는 과도한 영양적 스트레스를 내인성 위험인자로 인식하여 낮은 수준의 전신성 염증상태(low-grade systemic inflammatory state)를 유발한다(Emanuela *et al* 2012). Nitric oxide(NO)는 cytokine이나 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 내독소에 의해 유발되는 물질로 고혈압, 혈전, 죽상동맥경화증과 깊은 연관이 있으며(Fujiwara & Kobayashi 2005), 염증상태에서 생성된 NO는 prostaglandin과 같은 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(Park & Yang 2008). Tumor necrosis factor α (TNF- α)는 주로 급성 염증반응에 관여하고, 면역세포를 조절하며, 인슐린 저항성을 유도하여 당대사를 저해시킨다(Bradley JR 2008). 또한 Interleukin-6(IL-6)와 같은 다른 염증성 사이토카인을 증가시키는 반면, adiponectin과 같은 항염증 사이토카인을 감소시킨다(Emanuela *et al* 2012). Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)은 염증반응을 개시하는 중요한 요소로서 광범위한 염증성 질환에서 증가하며, 특히 비만과 2형 당뇨, 그와 관련된 합병증에서 생체 내 분비가 증가한다(Rull *et al* 2010). 비만(body mass index(BMI)>25 kg/m²)한 경우, 혈중 MCP-1 농도가 증가한다(Kim *et al* 2006). 거대한 지방 조직에서 MCP-1이 과분비되고, 이는 대식세포를 지방조직으로 끌어들이는 악순환을 초래한다(Di Gregoria *et al* 2005). 침윤되어

활성화된 대식세포는 proinflammatory cytokine인 TNF- α , IL-6 등을 분비하여 염증성 신호전달계에 해당하는 JNK, IKK- β , NF- κ B 경로의 활성화를 통해 인슐린 저항성을 유발한다(Kim *et al* 2007, Arkan *et al* 2005). 이것은 염증과 비만의 밀접한 관계를 입증한다.

본 연구는 한국인이 다소비하고 있는 나물류 채소류를 선별하고, 마크로파지에서 비만 및 대사증후군 질환 시 분비되는 염증물질인 NO, TNF- α 와 MCP-1의 분비에 미치는 영향을 평가하여 질환 예방과 개선의 가능성을 확인하고, 한식 우수성 연구의 기초데이터로 활용하고자 하였다.

연구방법

1. 시료의 선정

한국인 다소비 채소의 시료는 국민건강영양조사 1기(1998년)와 5기(2010, 2011년)의 데이터베이스를 분석하여 10여 년 전과 후의 결과를 비교분석하여 50위까지 선정하고, 채소섭취와 건강연관성에 관한 국내외 문헌고찰을 통해 대사성 질환의 예방과 개선 가능성이 있는 시료를 선정하였다. 김치의 주·부재료의 영양기능학적 연구는 다수 진행된 바 있어 김치로 소비되는 채소류는 제외하였다. 그 결과 [콩나물(bean sprout, 대두; *Glycine max*(L.) Merr.), 애호박(young pumpkin, *Cucurbita moschata*), 고사리(bracken, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum* (Desv.) Underw. ex Hell.), 부추(leeks, *Allium tuberosum* Rottler), 쑥갓(crown daisy, *Chrysanthemum coronarium* L.), 우엉(burdock, *Arctium lappa* L.), 연근(lotus root, 연; *Nelumbo nucifera* Gaertn.), 고구마줄기(sweet potato vines, 고구마; *Ipomoea batatas*(L.) Lam.), 가지(eggplant, *Solanum melongena* L.), 쑥(mugwort, *Artemisia princeps* Pamp.), 늪은 호박(pumpkin, 호박; *Cucurbita moschata* Duchesne)]으로 총 11종이 선정되었다(Table 1). 다소비 채소는 한 끼 당 섭취하는 채소별 g 중량으로 나타내었으며, 국민건강영양조사 자료 통계산출은 수분함량이 다른 별개의 식품 간의 섭취량 합산을 위해서 환산계수가 적용된 3차 식품코드를 사용하였다. Chu WM(2013)의 연구에서는 항당뇨 활성평가를 위해 한국의 상용채소·과일 50종을 선정하였다. 그 중 8종의 시료(콩나물, 애호박, 고사리, 부추, 우엉, 연근, 가지, 늪은 호박)가 본 연구의 시료와 일치하여 선정된 다소비 상용채소임을 재확인할 수 있었다. Chu WM(2013)의 연구는 항당뇨를 목적으로 당대사와 관련된 효소활성을 중심으로 평가하여 마크로파지에서 과분비되는 비만과 대사성 관련 질환 사이토카인의 분비억제를 목적으로 하는 본 연구의 목적 및 방법과는 차이가 있었다.

실험에 사용한 모든 농산물은 국내산이며, 늪은 호박은 주

Table 1. Selected samples from commonly consumed vegetables using Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES)

Number	1998 (1 st , N=10,400)			2010 (5 th , N=8,019)			2011 (5 th , N=7,704)		
	Rank	Vegetable	Intake (g/meal)	Rank	Vegetable	Intake (g/meal)	Rank	Vegetable	Intake (g/meal)
1	3	Bean sprout	10.72	4	Bean sprout	8.97	5	Bean sprout	7.81
2	8	Young pumpkin	5.84	7	Young pumpkin	7.35	7	Young pumpkin	7.33
3	19	Bracken	1.40	16	Bracken	2.40	16	Leeks	2.32
4	22	Leeks	0.73	18	Leeks	2.20	18	Bracken	1.98
5	25	Crown daisy	0.50	22	Eggplant	1.29	19	Eggplant	1.42
6	28	Burdock	0.42	25	Burdock	0.72	24	Burdock	0.71
7	33	Lotus root	0.22	29	Crown daisy	0.57	32	Pumpkin	0.51
8	37	Sweet potato vines	0.14	30	Pumpkin	0.54	33	Crown daisy	0.51
9	44	Eggplant	0.09	39	Sweet potato vines	0.35	35	Lotus root	0.38
10	45	Mugwort	0.08	40	Lotus root	0.32	36	Sweet potato vines	0.37
11	48	Pumpkin	0.05	47	Mugwort	0.15	47	Mugwort	0.17

These figure rounded off the numbers to three decimal places.

요 산지가 따로 없다는 전문가의 조언에 따라 농협 가락공판장에서 구매하였고, 콩나물은 국립식량과학원 두류유지작물과와 협의하여 콩나물 콩의 주요 품종으로 가장 많이 소비하는 회사를 고려하여 선정하였다. 선정된 국내산 나물류 채소의 품목별 생산지 선정은 농협 품목별전국협의회 담당자와 협의하고, 계절에 따른 산지 이동을 고려하여 구매하였다.

2. 시료처리 방법

고사리는 생시료의 구매가 계절적 이유로 어려웠다. 조리 시 데쳐서 건조하고 다시 삶는 전처리 과정을 감안하여 시판되는 열풍 건조된 제품을 구매하여 이용하였다. 이를 제외한 모든 시료는 생시료로 구매하였고, 실제 가식부만을 준비하였다. 세척 후 물기를 제거하고 잘라, -70°C 초저온 냉동고 (Operon, Ilshin, Korea)에 냉동한 후 동결건조기(Bondiro, Ilshin, Korea)에서 건조시켰다. 건조한 시료는 분쇄기를 이용하여 분말 처리하고, 20 mesh 체로 쳐서 분말 시료를 수집하였다. 시료 100 g에 80% 에탄올 1 L를 가한 후 상온($25\sim 28^{\circ}\text{C}$)에서 24시간 동안 교반 추출하여 감압 여과기로 여과하였다. 80% 에탄올을 혼합하여 교반 추출을 총 3회 반복하였다. 각 시료의 80% 에탄올 추출액은 진공회전농축기(N-1200B, EYELA, Japan)를 사용하여 에탄올을 휘발시킨 후 농축하여 동결 건조하고 분말화 하였다. 분말 시료는 -20°C 냉동고에 보관하며 이용하였고, 11가지 시료의 에탄올 추출물은 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich, USA)에 녹여서 배지에 농도 별로 희석한 후 세포에 처리하였다. 추출물의 용매인 DMSO

는 세포에 처리 시 농도가 0.1%로 모두 일정하였다.

3. 세포배양

RAW 264.7 macrophages는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 실험에 이용하였다. Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Sigma-Aldrich, USA)에 10% fetal bovine serum(Sigma-Aldrich, USA)과 1% penicillin streptomycin(Gibco, USA)을 혼합하여 37°C 의 5% CO_2 배양기(Autoflow IR Direct Heat CO_2 Incubator, NUAIRE, USA)에서 배양하였다.

4. 세포 생존율 측정

RAW 264.7 macrophages를 96 well plate에 1×10^5 cells/200 μL /well 농도로 분주하고, 2시간 동안 배양하여 세포가 플레이트 바닥에 잘 부착하여 자라는지 확인하였다. Opti-Mem(Gibco, USA)에 각 시료를 DMSO에 녹여 농도별로 희석하여 세포에 처리하고, 18시간 동안 세포 배양기 내에서 배양하였다. 그 후 0.5 mg/mL 농도의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) solution(Sigma-Aldrich, USA)을 20 μL /well로 가하여 2시간 동안 세포 배양기에서 배양한 뒤 배지를 버리고, DMSO 200 μL /well에 녹여 550 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 측정하였다.

5. 내독소 평가와 Nitric Oxide(NO) 측정

모든 시료가 LPS 처리 외 자체적인 내독소로 마크로파지의 NO를 활성화하는지를 평가하기 위하여 시료만을 가지고 내독소 평가(Limulus Amebocyte Lysate: LAL, Genscript, USA)를 실시한 후 실험을 진행하였다. 또한 마크로파지에 LPS를 처리하지 않고 시료만을 처리하여 시료 비처리군과 NO 분비량을 평가하였다. RAW 264.7 macrophages를 96 well plate에 1×10^5 cells/200 μ L/well 농도로 분주하고, 2시간 동안 배양하여 배양상태를 확인하였다. Opti-Mem(Gibco, USA)에 각 시료의 농도별 처리와 함께 LPS(Sigma-Aldrich, USA)를 100 nM/mL의 농도로 동시에 처리하였다. 이때 세포에 처리되는 DMSO의 농도는 0.1%로 모두 동일하게 처리하였다. 시료와 LPS 처리 후 24시간 동안 배양한 뒤 배지만을 회수하여 Griess 시약(Sigma-Aldrich, USA)으로 발색 후 570 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, USA)로 흡광도를 측정하여 NO의 분비량을 평가하였다. NO의 정량은 NaNO_2 의 표준곡선을 이용하여 측정하였다.

6. TNF- α 와 MCP-1 측정

TNF- α 와 MCP-1 분비량의 측정은 시료와 LPS처리 후 세포 배양기 내에서 24시간 배양 후 배지만을 이용하였다. 시판되고 있는 mouse TNF- α 와 MCP-1 키트(BD Pharmingen, USA)를 이용하여 sandwich elisa법으로 정량하였다. 양성 대조군은 Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ)의 작용물질이며 경구 당뇨병 치료제인 troglitazone(Sigma-Aldrich, USA)을 5 mM 농도로 세포에 처리하였다.

7. 자료의 통계처리

본 연구 자료의 통계분석은 SPSS(statistical package for social sciences, version 12.0, chicago, USA)를 이용하여 분석하였다. 평균과 표준편차로 산출하여 표시하였으며, 통계적 유의성 검증은 $P < 0.05$ 수준에서 Student's *t*-test를 실시하였다.

1. 시료의 내독소 평가와 세포 생존율 측정

내독소 평가는 시료를 LAL 시약과 혼합하여 응고현상으로 내독소의 유무를 평가하였으며, 모든 시료에서 내독소가 없음을 확인하였다(data not shown). 생리활성 평가의 적정농도를 결정하기 위하여 시료별로 0.005~0.2 mg/mL 사이의 농도로 마크로파지에 처리하였다. MTT assay로 세포생존율을 평가하였으며, 각 시료별로 세포생존율에 영향을 미치지 않는 농도를 결정하여 실험에 적용하였다(Data not shown). 그 결과, 콩나물, 고사리, 쑥은 0.01~0.1 mg/mL, 쑥갓과 고구마 줄기 0.005~0.05 mg/mL, 연근 0.01~0.02 mg/mL, 애호박, 부추, 우영, 가지, 늪은 호박은 0.02~0.2 mg/mL를 각 처리 적정농도로 정하였다.

2. 11가지 다소비 채소의 NO 분비억제효과

플레이트에 부착된 마크로파지는 LPS를 처리하여 비만, 대사성질환 시 세포상태를 재현하여 NO의 과분비를 유도하였다. 그 후 각 시료를 비사멸 적정농도로 처리하고, 24시간 후 흡광도를 이용하여 NO 값을 정량하고, MTT assay를 통하여 세포생존율을 측정하였다. 측정된 NO 값은 각 세포의 생존율로 보정하여 비교하였다(Fig. 1). NO는 염증의 중요한 지표로 측정이 용이하므로 첫 번째 선정 단계로 선택하였다. 전체 11가지 시료 중 9가지 시료에서 음성 대조군에 비하여 유의적인 NO 감소 효과를 확인하였다. 그중 콩나물 0.1 mg/mL, 부추 0.2 mg/mL, 가지 0.2 mg/mL, 쑥 0.1 mg/mL, 늪은 호박 0.2 mg/mL에서 NO의 분비량이 양성 대조군 수준으로 감소하는 효과를 보였다. 고사리와 애호박, 우영 0.2 mg/mL의 시료에서는 NO 억제 활성을 보이지 않았다. 우영의 저농도에 비해 고농도에서 효과가 크지 않은 것은 제약과 달리 식품의 특징이 반영된 것으로 사료된다. 콩나물 저농도(0.01 mg/mL)와 고사리 고농도(0.1 mg/mL)는 세포의 생존율로 농도를 결정하여 농도를 확인한 후에 시료를 처리하였으나, LPS와 함께 처리 시 세포의 생존율이 음성 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하여 제외하였다.

결과 및 고찰

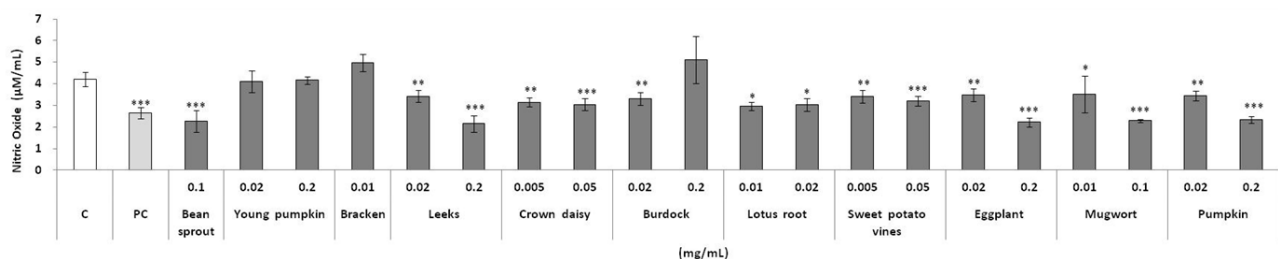


Fig. 1. Effects of commonly consumed vegetables on NO changes by LPS treated RAW 264.7 macrophages. The values are mean±S.D. of 4 testes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with C group (treated LPS and DMSO). These are adjusted by cell viability. PC treated 5 μ M Troglitazone. C: Control, PC: Positive control.

콩나물은 0.1 mg/mL 농도로 처리 시 음성 대조군에 비하여 46% NO 분비량이 감소하였고, 약물 처리군인 양성 대조군에 비하여 15% 감소하였다. 이러한 결과는 콩의 발아과정에서 생성된 생리활성물질의 영향으로 사료된다. 콩에 많이 함유되어 있는 이소플라본은 지질수치를 개선하고, 항염증 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(Cho *et al* 2007), 콩나물은 cyclooxygenase-2(COX-2)를 동시에 억제시킴으로써 항염 효과가 있었다(Kwon *et al* 2007). COX-2는 체내의 염증시에 증가하는 prostaglandin E₂(PGE₂)의 생성 초기에 발현되는 효소로써, isozyme 형태로 COX-1과 COX-2로 존재한다(Ricciotti *et al* 2013). COX-2는 발열, 통증, 염증과 같은 병리 현상과 직접 연관되고, 마크로파지에서 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 함께 COX-2의 발현을 차단하는 것이 염증질환 치료제의 개발에 있어서도 기초가 된다(Jung *et al* 2014). 이러한 결과를 Kwon *et al*(2007)은 발아과정 중에 생성되는 물질에 의한 긍정적인 영향으로 추정하였다.

호박은 애호박과 늙은 호박 모두 한국인 다소비 채소류로 선정되었다. 애호박은 0.02, 0.2 mg/mL에서 음성 대조군과 비교 시 각각 3%와 1% NO 분비량이 감소하여 차이가 없었지만, 늙은 호박은 0.02, 0.2 mg/mL에서 음성 대조군에 비하여 각각 18%, 45%의 감소 효과를 보였다. 특히 늙은 호박 0.2 mg/mL 농도에서는 양성 대조군에 비하여 12% 감소 효과가 있었다. 이 결과는 Oh *et al*(2010)의 연구에서 늙은 호박, 단호박, 애호박 세 가지의 효소분해물의 NO 소거활성을 평가하였을 때, 모두 약물처리군인 토코페롤보다 높은 NO 소거활성을 나타내며, 효소분해물이 NO 소거활성 효과에 늙은 호박보다 애호박이 더 효과적이었던 결과와 다르게 나타났다. 이는 시료 처리의 상이성, 80% 에탄올 추출물 처리와 효소분해 처리에서 오는 결과의 차이로 사료된다.

고사리의 에탄올 추출물(0.01 mg/mL)은 대식세포의 비만 관련 염증매개물질인 NO 생성의 억제효과가 없었다. 그러나 인간유래 비만세포(human mast cells; HMC-1 cells)에 고사리 에탄올 추출물(0.01, 0.1, 1.0 mg/mL)을 처리한 후 TNF- α , IL-6, IL-8 분비량을 측정하였을 때 과도한 염증반응을 억제하여 염증성 질환의 예방 혹은 치료를 위한 물질로서의 응용 가능성을 시사한 바 있어, 본 실험 결과와 다른 결과를 보였다(Ko *et al* 2013). 건고사리를 사용한 본 실험과 달리 생고사리 시료를 사용한 실험재료와 세포주가 비만세포라는 두 가지 상이성에서 온 결과의 차이로 사료된다.

부추의 에탄올 추출물은 저, 고의 두 농도(0.02, 0.2 mg/mL)에서 음성 대조군과 비교 시 각각 19%, 49% NO 분비량 감소효과가 있었으며, 고농도(0.2 mg/mL)에서는 양성 대조군보다 19% 감소하여 효과가 컸다. 부추는 백합과에 속하는 *Allium* 속 식물로 황 화합물을 함유하고 있어, 암 예방 및 심혈관계

질환 예방에 도움이 되는 것으로 알려져 있으며, 같은 속의 산부추(*Allium thunbergii* G. Don) 추출물은 iNOS의 발현을 억제하여 NO 억제효과가 있었다(Seo *et al* 2007). 상용채소인 부추의 항염증 효과는 보고된 바가 미비하여 본 실험의 결과는 부추의 항염증 효과를 보고하며, 연구의 가능성을 열어 주는 의미 있는 결과로 판단된다.

쑥갓 에탄올 추출물의 농도는 다른 시료에 비해 1/4~1/40 배 정도 낮음에도 불구하고, 강력한 NO 억제효과를 보였다. 0.005, 0.05 mg/mL에서는 음성 대조군에 비하여 각각 25%, 28% NO 감소효과를 보였다. 쑥갓 에탄올 추출물을 이용한 유사연구에서는 LPS에 의해 염증을 유발한 P338D1 마크로파지에서 NO와 TNF- α 의 분비를 감소하는 항염증 효과가 보고된 바 있다(Strzelecka *et al* 2005). Raw 264.7 macrophages를 이용한 본 연구에서도 쑥갓 에탄올 추출물이 NO 값을 낮추어 쑥갓 에탄올 추출물이 NO 분비의 억제에 효과가 있었다. 나물, 쌀, 탕 및 국류에도 첨가하여 섭취하는 한국인 다소비 채소로서 건강기능성 식품소재로 기대된다.

우엉 에탄올 추출물은 저농도인 0.02 mg/mL 농도에서 음성 대조군에 비하여 NO 분비량이 21% 감소하였으며, 고농도인 0.2 mg/mL에서는 NO 감소효과가 없었다. Kim *et al*(2012)의 연구에서는 A549 폐암세포에 TNF- α 로 염증을 유발하여 우엉 부탄올 추출물을 처리한 그룹이 시료를 무처리한 대조군보다 NO의 생성과 iNOS의 유전자 발현을 억제하였다. 본 연구에서는 추출용매와 세포주가 다름에도 우엉 에탄올 추출물이 NO 억제효과가 있었다.

연근은 0.01, 0.02 mg/mL 농도에서 음성 대조군에 비하여 각각 30%, 28% NO를 감소하였다. 연근의 껍질이나 마디에 함유된 탄닌은 점막조직의 염증을 억제한다(Mukherjee *et al* 2009). 본 연구에서는 나물류 섭취시를 고려하여 껍질을 제거하였으나, 음성 대조군에 비하여 유의적으로 NO 분비를 억제하였다. 연근은 한국인 다소비 채소로 선정되었음에도 불구하고, 청소년들을 대상으로 한 기호도 조사에서는 기호도가 낮게 평가되었다(Moon HO 2009). 기호도를 높일 수 있는 조리법 및 메뉴개발을 통해 맛과 기능성이 우수한 식품을 섭취할 수 있는 방안을 모색할 필요가 있다.

고구마 줄기는 0.005, 0.05 mg/mL 농도에서 음성 대조군에 비하여 각각 19%, 24% NO가 감소하였다. 고구마 줄기는 뿌리에 비하여 활용도가 낮아 관련된 연구도 매우 제한적이었다. 최근 연구에서 폴리페놀과 플라보노이드를 측정할 결과, 고구마 잎, 껍질을 벗기지 않은 줄기, 껍질 벗긴 줄기 순으로 폴리페놀과 플라보노이드가 많이 함유되어 있는 것으로 보고되었다. 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 많은 부위일수록 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능, 환원력 및 COX-2 활성저해율과 양의 상관관계를 보였다(Kwak

et al 2013). 본 연구에서는 고구마 줄기의 껍질을 제거 후 에탄올 추출을 하였음에도 NO 감소 효과를 보여, 고구마 줄기의 강한 항염증 효과를 확인할 수 있었다. 따라서 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 고려하여 고구마 잎과 껍질을 제거하지 않은 줄기를 섭취하는 것은 항염증 건강식에 도움이 될 것이다.

가지는 0.02, 0.2 mg/mL에서 각각 음성 대조군에 비하여 17%, 47% NO 감소효과를 보였다. 고농도인 0.2 mg/mL는 양성 대조군에 비하여 17% 감소하여 효과가 컸다. 가지는 안토시아닌 색소인 nasunin, delphinidin과 chlorogenic acid 등의 페놀성 성분, solamargin 등의 glycoalkaloid 성분을 함유하며 항암, 항산화 및 항비만 효과 등이 알려져 있다(Lee *et al* 2011, Roh KS 2008). 본 연구에서 가지 에탄올 추출물 첨가는 농도 의존적으로 NO 분비를 감소시켰다. 이것은 가지 안토시아닌계 색소 성분들에 의한 면역, 항산화 활성에 의한 영향으로 평가된다(Scalzo *et al* 2010).

쭈은 0.01, 0.1 mg/mL에서 음성 대조군에 비하여 17%, 46% NO 감소 효과가 있었다. 고농도인 0.1 mg/mL에서는 양성 대조군에 비하여 12% 감소하는 결과를 보였다. 쭈은 예로부터 식용과 약용으로 사용되며, 약용소재로써 많은 연구가 진행되었지만, 본 연구는 다소비 식품으로 선정된 식용소재로써 연구를 진행하였다. 쭈 열수추출물을 LPS와 함께 마크로파지에 처리하였을 때 LPS만 단독처리한 군에 비해 유의적으로 NO가 감소하였으며, 이는 iNOS 유전자 발현에서 기인된다(Kim *et al* 2013). 본 연구는 80% 에탄올을 용매로 쭈을 추출하였고, NO 값은 타 시료의 1/2배 농도에서도 양성 대조군 수준의 감소효과를 확인하였다.

3. 선정된 5가지 채소의 TNF- α 와 MCP-1 분비억제효과

11종 시료의 처리 중 과잉 분비된 NO의 감소효과가 양성 대조군 수준으로 감소한 콩나물, 부추, 가지, 쭈, 늙은 호박 5종을 선정하여 염증성 사이토카인과 케모카인, TNF- α 와 MCP-1을 측정하였다. TNF- α 의 분비는 음성 대조군과 비교 시, 쭈 0.01 mg/mL를 제외한 모든 시료의 농도에서 유의적인 감소를 보였다. 가지 0.2 mg/mL와 쭈 0.1 mg/mL는 양성 대조군 수준의 유의적 감소효과($P < 0.001$)를 보였고(Fig. 2) 쭈 0.1 mg/mL 처리 시 TNF- α 의 분비는 양성 대조군 처리보다 강한 분비억제효과를 보였다. MCP-1의 분비는 마크로파지에 LPS와 DMSO를 처리한 음성 대조군에 비하여 가지(0.2, 0.02 mg/mL), 쭈(0.1, 0.01 mg/mL), 늙은 호박(0.2 mg/mL)에서 유의적인 감소효과를 보였다. 가지와 호박의 두 고농도(0.2 mg/mL)와 쭈의 고·저(0.1, 0.01 mg/mL) 농도에서 통계적으로 양성 대조군 수준($P < 0.001$) 감소효과가 있었고, 쭈 0.1 mg/mL 처리 시 MCP-1의 분비도 양성 대조군 처리보다 강한 분비억제효과를 보였다(Fig. 3).

콩나물 0.1 mg/mL의 농도 처리 시 TNF- α 의 분비는 억제하였으나, MCP-1의 분비는 오히려 증가하는 결과를 나타냈다. 콩나물은 COX-2를 억제하는 기작으로 항염증 효과가 보고되었다(Kwon *et al* 2007). 본 연구에서 TNF- α 만의 감소는 PGE2의 생성억제 및 NF- κ B 전사인자에 의해 COX-2 억제 기전과 관련이 있으나, MCP-1 분비억제 기작과는 관련 없이 진행된 결과로 사료된다. 부추 에탄올 추출물의 처리 시에도 콩나물과 같이 TNF- α 의 분비만 억제하였다. Ko *et al*(2013)의 연구에서 비만세포에 부추 에탄올 추출물을 처리하였을 때 TNF- α 를 포함한 염증 관련 사이토카인의 분비가 감소하였다. 본 연구결과와 아울러 부추는 추출용매를 달리한 대식세포와 비만세포에서 염증지표 감소효과가 있었으며, MCP-1보다 TNF- α 분비 감소에 특이적인 기작을 가지고 있다고 평

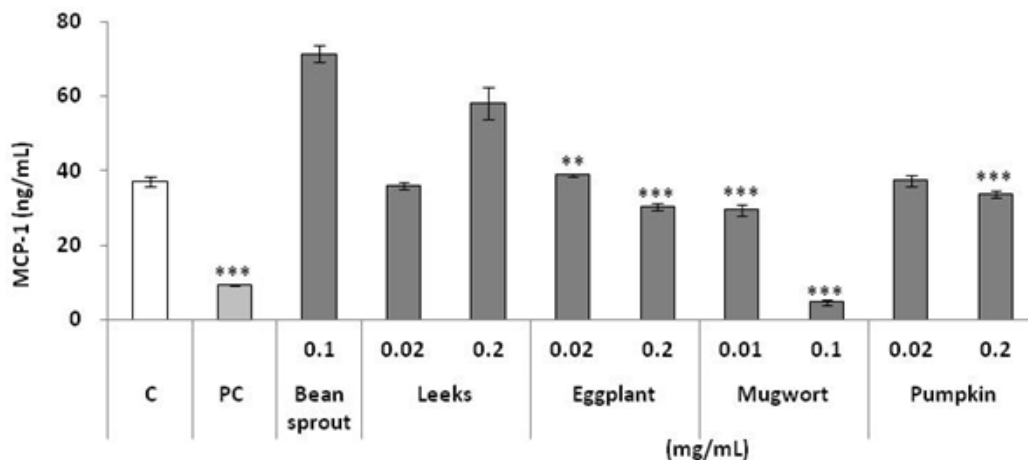


Fig. 2. Effects of commonly consumed vegetables on TNF- α changes by LPS treated RAW 264.7 macrophages. The values are mean \pm S.D. of 4 testes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with C group (treated LPS and DMSO). PC treated 5 μ M troglitazone. C: Control, PC: Positive control.

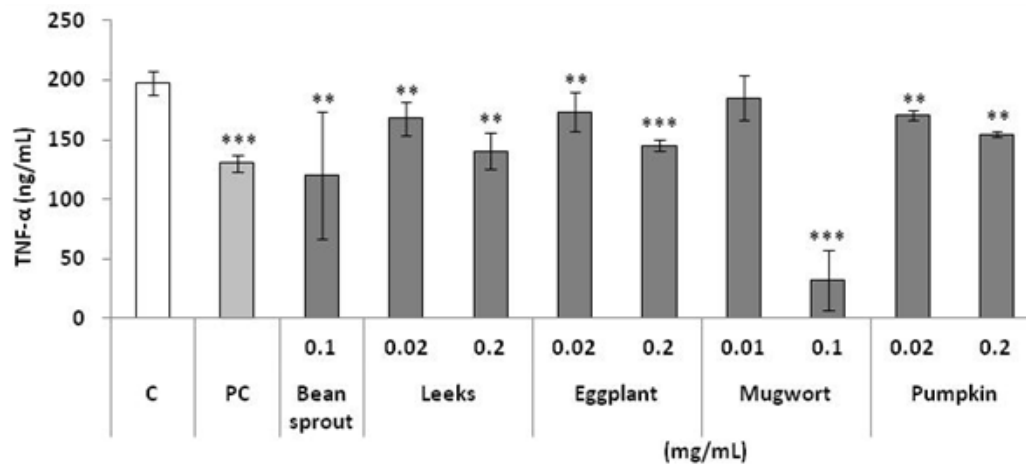


Fig. 3. Effects of commonly consumed vegetables on MCP-1 changes by LPS treated RAW 264.7 macrophages.

The values are mean±S.D. of 4 testes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with C group (treated LPS and DMSO). PC treated 5 μ M troglitazone. C: Control, PC: Positive control.

가되었다. 가지 에탄올 추출물은 TNF- α 와 MCP-1의 분비 모두 감소하였다. 트립신을 투여하여 발 부종을 유도한 마우스 염증모델에 가지의 물 추출물을 경구 투여했을 때, proteinase-activated receptor 2(PAR2) agonist-induced myeloperoxidase(MPO) 활성과 발조직의 TNF- α 발현을 감소시키고, 발 부종을 유의적으로 감소시켰다(Han *et al* 2003). 추출방법과 실험 모델의 차이점을 고려하여 가지의 다각적인 항염증 기전에 관한 추가연구가 필요한 것으로 사료된다. 쑥 에탄올 추출물은 0.1 mg/mL 농도에서만 TNF- α 분비를 강하게 억제하였으나, MCP-1의 분비는 0.1, 0.01 mg/mL 두 농도에서 유의적인 활성을 보여, TNF- α 와 MCP-1 모두 억제활성은 있으나 MCP-1에서 보다 효과적이라 판단되었다. 대식세포의 nitric oxide synthases(NOS)는 recombinant interferon- γ (rIFN- γ), TNF- α 와 같은 여러 가지 사이토카인의 영향을 받아 생성되는 것으로 쑥의 TNF- α 및 MCP-1의 감소효과는 NO 감소 및 iNOS 유전자 발현 감소(Kim *et al* 2013)와 연관되는 기전으로 사료되며, 더욱 심도 있는 연구가 필요한 것으로 판단되었다. 늪은 호박 에탄올 추출물은 0.2 mg/mL 농도에서만 MCP-1의 유의적인 분비억제를 보였으며, TNF- α 는 0.1, 0.01 mg/mL 두 농도에서 유의적으로 분비를 억제하였다. TNF- α 와 MCP-1 모두 억제활성은 있으나, TNF- α 에서 보다 효과적이라 판단되었다. 본 연구에서는 가식부인 과육만을 시료로 사용하였음에도 NO, TNF- α 와 MCP-1 분비의 유의적 감소효과가 있었다. 늪은 호박은 폴리페놀성분인 플라보노이드가 다량 함유되어 있고, 항산화, 항염증 효과가 알려져 있다. 시료의 부위별 함유량 차이를 보면 잎, 과피, 과육, 씨 순이다(Kim *et al* 2011). 과육뿐 아니라, 과피를 함께 섭취하는 방법을 재고하면 더 좋은 항염증 효과를 가질 것으로 기대된다.

본 연구결과, 11종 한국인 다소비 나물류 채소 에탄올 추출물의 NO 분비억제 평가로 5종을 선정하여 TNF- α 와 MCP-1 감소효과를 확인하여 특이적인 분비억제를 확인할 수 있었다. TNF- α 와 MCP-1의 과잉분비와 관련된 질환인 인슐린 저항성과 비만 등 대사성 질환과 관련하여 지속적으로 섭취하면 건강에 도움이 될 것으로 판단된다. 이 지표들은 대식세포의 염증지표중 하나로써 장기적으로 채소류를 많이 섭취하도록 구성된 한식의 식사패턴을 유지·권장할 경우, 비만 및 만성 대사성 증후군의 예방 또는 관리에 도움이 될 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구는 한국인 다소비 채소류를 시료로 선정하고, 비만 및 대사성 질환 시 대식세포에서 과잉 분비되는 염증물질의 억제효과를 측정하여 한식의 다소비 채소류의 건강향상성을 평가하고자 하였다. 활성화된 마크로파지에 선정된 11가지 시료의 에탄올 추출물을 처리하여 과잉 분비된 NO, TNF- α 와 MCP-1의 감소효과를 측정하였다. 애호박, 고사리를 제외한 콩나물, 부추, 쑥갓, 우엉, 연근, 고구마줄기, 가지, 쑥과 늪은 호박에서 LPS만을 처리한 음성 대조군과 비교시 유의적인 NO 감소효과가 있었다. 콩나물, 부추, 가지, 쑥과 늪은 호박은 약물 처리군인 양성 대조군과 유사하게 강력한 NO 감소효과를 보였다. 콩나물과 부추는 TNF- α 에서 음성 대조군보다 유의적인 분비억제효과를 보였으며, 가지, 쑥과 늪은 호박(고농도 처리군만 MCP-1 유의적 억제)은 TNF- α 와 MCP-1 모두에서 분비를 효과적으로 감소시켰다. 따라서 한국인 다소비 채소류의 비만 및 대사성 질환관련 3가지 염증지표의

개선효과를 확인하였다. 지속적인 섭취는 체내 염증성 물질의 분비를 저감하여 대사성 질환의 예방과 개선에 도움이 될 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구과제 농식품기초기반연구(PJ-009469)의 연구비 지원으로 수행된 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn Y, Park YJ, Min H, Kwak HK, Oh KS, Park C (2007) Dietary patterns and prevalence odds ratio in middle-aged adults of rural and mid-size city in Korean genome epidemiology study. *Korean J Nutr* 40(3): 259-269.
- Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M (2005) IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11(2): 191-198.
- Bradley JR (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214(2): 149-160.
- Chae SW (2011) Beneficial effects of Korean traditional diet in patients with hypertension and type 2 diabetes. *Food Industry and Nutrition* 16(2): 15-26.
- Cho HY, Yang JL, Noh KH, Kim JJ, Kim YW, Huh KH, Song YS (2007) Anti-atherogenic effect of isoflavone through hypolipidemic, anti-oxidative and anti-inflammatory actions in C57BL/6J mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36(3): 276-283.
- Choi MK, Bae YJ (2007) A study on blood lipids and blood pressure of adult men and women according to vegetable intake. *Korean J Community Nutr* 12(6): 761-772.
- Chu WM (2013) A study on evaluating *in vitro* antidiabetic activity of regularly consumed 50 vegetables and fruits in Korea. *MS Thesis* Kyungnam University, Changwon. pp 12.
- Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Lu T, Miles LM, Ranganathan G, Peterson CA, McGehee RE, Kern PA (2005) Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: Association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes* 54(8): 2305-2313.
- Emanuela F, Grazia M, Marco DR, Paola LM, Giorgio F, Marco B (2012) Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. *J Nutr Metab* 2012: 1-7.
- Fujiwara N, Kobayashi K (2005) Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4(3): 281-286.
- Fuller NR, Lau NS, Denyer G, Simpson AE, Gerofi J, Wu M, Holmes A, Markovic TP, Kang JH, Caterson ID (2012) A 12-week, randomised, controlled trial to examine the acceptability of the Korean diet and its effectiveness on weight and metabolic parameters in an Australian overweight and obese population. *Obes Res Clin Pract* 6(1): e71-e83.
- Han SW, Tae J, Kim JA, Kim DK, Seo GS, Yun KJ, Choi SC, Kim TH, Nah YH, Lee YM (2003) The aqueous extract of *Solanum melongena* inhibits PAR2 agonist-induced inflammation. *Clin Chim Acta* 328: 39-44.
- Hartley L, Igbinedion E, Holmes J, Flowers N, Thorogood M, Clarke A, Stranges S, Hooper L, Rees K (2013) Increased consumption of fruit and vegetables for the primary prevention of cardiovascular diseases. *Cochrane Database Syst Rev* 6: 1-54.
- Jung YS, Kim DH, Hwang JY, Yun NY, Lee YH, Han SB, Hwang BY, Lee MS, Jeong HS, Hong JT (2014) Anti-inflammatory effect of tricin 4'-O-(threo- β -guaiacylglyceryl) ether, a novel flavonolignan compound isolated from *Njavara* on in RAW 264.7 cells and in ear mice edema. *Toxicol Appl Pharmacol* 277(1): 67-76.
- Kim CS, Park HS, Kawada T, Kim JH, Lim D, Hubbard NE, Kwon BS, Erickson KL, Yu R (2006) Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes* 30: 1347-1355.
- Kim J, Jo I (2011) Grains, vegetables, and fish dietary patterns is inversely associated with the risk of metabolic syndrome in South Korean adults. *J Am Diet Assoc* 111: 1141-1149.
- Kim KJ, Ahn NY, Hong CB (2007) Effects of visceral obesity on metabolic syndrome. *Health & Sports Medicine; Official Journal of KACEP* 9(2): 41-48.
- Kim MJ, Hong CO, Nam MH, Lee KW (2011) Antioxidant effects and physiological activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Dcuh.) extract from different aerial parts. *Korean J Food Sci Technol* 43(2): 195-199.
- Kim OS, Ryu HS (2009) The study on blood lipid levels according to the food habits and food intake patterns in Korean elderly. *Korean J Food & Nutr* 22(3): 421-429.
- Kim TH, Lee SJ, Rim HK, Shin JS, Jung JY, Heo JS, Kim JB,

- Lee MS, Lee KT (2013) *In vitro* and *in vivo* immunostimulatory effects of hot water extracts from the leaves of *Artemisia princeps* Pampanini cv. Sajabal. *J Ethnopharmacol* 149(1): 254-262.
- Kim YH, Lee JH, Koo BK, Lee HS (2007) Isoflavone-rich bean sprouts improves hyperlipidemia. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36(10): 1248-1256.
- Kim YJ, Kang SC, Kamkoong S, Choung MG, Sohn EH (2012) Anti-inflammatory effects by *Arctium lappa* L. root extracts through the regulation of ICAM-1 and nitric oxide. *Korean J Plant Res* 25(1): 1-6.
- Ko YJ, Seol HG, Lee GR, Jeong GI, Ryu CH (2013) Anti-inflammatory effect and antioxidative activities of ingredients used in *Bibimbab*. *J Life Sci* 23(2): 213-221.
- Kwak CS, Lee KJ, Chang JH, Park JH, Cho JH, Park JH, Kim KM, Lee MS (2013) *In vitro* antioxidant, anti-allergic and anti-inflammatory effects of ethanol extracts from Korean sweet potato leaves and stalks. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42(3): 369-377.
- Kwon ES, Kim I, Kwon H (2007) Inhibitory effects on the enzymes involved in the inflammation by the ethanol extracts of plant foodstuffs. *Korean J Food Sci Technol* 39(3): 348-352.
- Kwon JH, Shim JE, Park MK, Paik HY (2009) Evaluation of fruits and vegetables intake for prevention of chronic disease in Korean adults aged 30 years and over: using the third Korea national health and nutrition survey (KNHANES III), 2005. *Korean J Nutr* 42(2): 146-157.
- Kwon OR (2011) Functionality of Korean food: science and practice. *Food Industry and Nutrition* 16(2): 11-14.
- Lee MK, Liu Q, Hwang BY, Kim SY, Lee JH (2011) Inhibitory effect of eggplant extract on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *J Pharm Soc Korea* 55(4): 309-313.
- Lim S, Shin H, Song JH, Kwak SH, Kang SM, Yoon JW, Choi SH, Cho SI, Park KS, Lee HK, Jang HC, Koh KK (2011) Increasing prevalence of metabolic syndrome in Korea: The Korean National Health and Nutrition Examination Survey for 1998-2007. *Diabetes Care* 34: 1323-1328.
- Lee YE (2005) Bioactive compounds in vegetables: Their role in the prevention of disease. *Korean J Food Cookery Sci* 21(3): 380-398.
- Moon HO (2009) A study on the preferences of the lotus menu in middle school food service and a suggestion to increase the demand for lotus. *MS Thesis* Mokpo National University, Jeonnam. pp 25.
- Mukherjee PK, Mukherjee D, Maji AK, Rai S, Heinrich M (2009) The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*)-phytochemical and therapeutic profile. *J Pharm Pharmacol* 61(4): 407-422.
- Oh CK, Kim MC, Oh MC, Yang TS, Hyun JS, Kim SH (2010) Antioxidant activities in enzymatic hydrolysates of pumpkin powder (*Cucurbita* spp.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39(2): 172-178.
- Park EY, Yang KS (2008) Inhibition of nitric oxide production by the extracts of *Hibiscus manihot*. *J Pharm Soc Korea* 52(4): 259-263.
- Ricciotti E, Yu Y, Grosser T, Fitzgerald GA (2013) COX-2, the dominant source of prostacyclin. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(3): E183.
- Roh KS (2008) Biochemical properties of eggplant fruit lecithin. *J Life Sci* 18(3): 350-356.
- Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J (2010) Insulin resistance, inflammation, and obesity: Role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism. *Mediators Inflamm* 2010: E326580.
- Scalzo RL, Fibiani M, Mennella G, Rotino GL, Sasso MD, Culici M, Spallino A, Braga PC (2010) Thermal treatment of eggplant (*Solanum melongena* L.) increases the antioxidant content and the inhibitory effect on human neutrophil burst. *J Agric Food Chem* 58(6): 3371-3379.
- Seo JS, Lee TH, Kim JY (2007) Methanol extract of *Allium thunbergii* G. Don inhibits LPS-induced nitric oxide on murine macrophage RAW 264.7 cells. *J Institute of life science and Resources* 26(2): 155-158.
- Strzelecka M, Bzowska M, Koziel J, Szuba B, Dubiel O, Nunez DR, Heinrich M, Bereta J (2005) Anti-inflammatory effects of extracts from some traditional Mediterranean diet plants. *J Physiol Pharmacol* 56(1): 139-156.
- Wellen KE, Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115(5): 1111-1119.
- Yu R (2005) Modulation of obesity-related pathologies based on inflammation theory. *Food Industry and Nutrition* 10(3): 5-9.

Date Received	Oct. 31, 2014
Date Revised	Dec. 19, 2014
Date Accepted	Dec. 28, 2014