

갯완두(*Lathyrus japonicus*) 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 효능

Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Lathyrus japonicus* ethanol extracts

박윤경¹, 이명석¹, 고석천², 이정민², 임미진², 김경우³, 김현수³, 김지율³, 김철환³, 원정혜⁴, 이대성⁵, 오건우^{3,*}

Yun Gyeong Park, Myeong Seok Lee, Seok-Chun Ko, Jeong Min Lee, Mi-Jin Yim, Kyung Woo Kim, Hyun-Soo Kim, Ji-Yul Kim, Chul Hwan Kim, Jung Hye Won, Dae-Sung Lee, Gun-Woo Oh*

¹주임연구원, 국립해양생물자원관, 서천, 충청남도, 33662, 대한민국
²선임연구원, 국립해양생물자원관, 서천, 충청남도, 33662, 대한민국
³전임연구원, 국립해양생물자원관, 서천, 충청남도, 33662, 대한민국
⁴책임연구원, 국립해양생물자원관, 서천, 충청남도, 33662, 대한민국
⁵수석연구원, 국립해양생물자원관, 서천, 충청남도, 33662, 대한민국

National Marine Biodiversity Institute of Korea, Seochun, Chungcheongnam-do, 33662, Republic of Korea

(Received 4 Mar 2023, Revised 13 Mar 2023, Accepted 13 Mar 2023)

Abstract In the present study, the antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts from *Lathyrus japonicus* at concentrations of 50, 100, and 200 µg/mL were investigated in LPS-stimulated, RAW264.7 cells. Antioxidant properties were determined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging assays and ferric reducing antioxidant power assay. In addition, the production of reactive oxygen species (ROS) was measured using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe by flow cytometry. To examine the anti-inflammatory activity of the extracts of *L. japonicus*, their effects on the levels of nitric oxide (NO); production of cytokines such as interleukin (IL)-1β, IL-10, and tumor necrosis factor-α (TNF-α); and the activities of enzymes such as inducible NOS (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were assessed. The IC₅₀ values of the DPPH and ABTS radical scavenging assays were 476.09 ± 1.50 and 34.91 ± 0.37 µg/mL, respectively. In addition, *L. japonicus* extracts not only inhibited ROS production, but also the production of NO, IL-1β, and IL-10, and the activity of iNOS in a dose-dependent manner. In summary, the ethanolic extracts of *L. japonicus* could be used as a functional food additive and an anti-inflammatory agent owing to their antioxidant and anti-inflammatory activities

Keywords : Antioxidant, Anti-inflammation, Ethanol extracts, *Lathyrus japonicus*, ROS

서론

연안환경(coastal environments)은 토양 수분,

영양분, 염분, 염수분무(salt spray) 등과 같은 열악한 환경으로 인해 식물성장이 제한되며, 그로 인해 제한된 수의 내염성을 가지는 종의 성장과 생존에

* Corresponding author
 Phone: +82-41-950-0938 Fax: +82-41-950-0931
 E-mail: ogwchobo@mabik.re.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

간접적으로 영향을 미치게 된다[1]. 염생식물은 해변이나 바다쪽 가장자리 지역에 서식하기 때문에 비래염분(airborne salt)과 토양의 높은 삼투압으로 인한 염분 스트레스에 노출되며, 이는 폴리페놀 합성과 축적에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[2]. 염생식물 중 갯완두(*Lathyrus japonicus*)는 유럽, 아시아, 북미, 칠레 등의 해안사구(coastal sand dunes)에 서식하는 다년생 콩과(Fabaceae) 식물이다[3]. 이 종의 종자는 해수에서 최대 5년 동안 생존할 수 있고, 가벼워 해류를 통해 연안 지역 전체에 퍼지며, 단단한 외피가 모래와 자갈과의 마찰을 통해 마모가 되면서 발아가 발생하게 된다[4]. 또한, 해당 종은 수명이 길며 해안의 변화나 인간에 의해 제거되지 않는 이상 사라지지 않는 것으로 알려져 있다[5]. 이러한 갯완두는 스크리닝 단계에서의 알도즈 환원효소 억제[6], 히스타민 분비 억제[7], 인슐린 저항성에 관련된 효소인 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) 억제[8], 관상심장 질환과 연관된 lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) 억제[9], nuclear factor of activated T cells (NFAT) 저해[10] 효능 등에 대한 연구만이 진행되어 있어, 갯완두 추출물의 항염증 및 항산화 효능에 대한 추가적인 연구가 필요한 실정이다.

비공유전자를 가지고 있는 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 슈퍼옥사이드 음이온($O_2^{\cdot-}$) 및 하이드록시 라디칼($\cdot HO$)을 포함하는 불안정하고, 반응성이 높은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 정상적인 조건에서는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (Gpxes) 및 catalase와 같은 효소와 저분자 항산화제에 의해 ROS 수준이 유지되며 세포의 신호전달물질로도 사용된다[11]. 하지만 자외선(UV)이나 화학물질과 같은 외부요인에 의해 과잉 생산된 ROS는 DNA, 세포막, 단백질 등을 손상시키는 산화적 스트레스(oxidative stress) 유발하여 암, 간손상, 심혈관 질환 등 여러 질병들과 노화를 유발한다고 알려져 있다[12,13]. 따라서 비타민 C, 카르티노이드 및 플라보노이드 등이 포함된 과일과 채소의 섭취는 건강에 도움을 주며, 상대적으로 가격이 저렴하고 대량생산이 가능한 합성항산화제의 발암성 및

독성과 같은 안전성 문제를 해결하기 위해 천연항산화제 개발이 많은 관심을 받고 있다[14,15].

염증(inflammation)은 급성 또는 만성으로 나뉘는데, 급성염증(acute inflammation)은 초기반응으로 손상된 조직으로 혈장(plasma)과 호중구(neutrophils) 및 대식세포(macrophages)와 같은 면역계 세포의 이동이 특징이며, 만성염증(chronic inflammation)은 손상된 조직의 파괴와 치유가 동시에 일어나며 세포의 점진적인 변화와 관련이 있다[16]. 염증반응에서 대식세포(macrophage)는 식균작용(phagocytosis)을 통해 신체를 보호하며, 이 과정에서 interleukins (ILs), tumor necrosis factor- α (TNF- α), 산화질소(nitric oxide, NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) 등과 같은 염증성 매개인자들을 분비하게 된다[17]. 이러한 염증은 미생물, 독소, 알레르기 등으로부터 신체를 보호하기 위한 반응의 일종이지만, 제어되지 않는 만성염증은 조직에 해로운 영향을 주며 이로 인해 다양한 염증성 질환을 유발하게 된다[18]. 이를 위해, 비스테로이드성 항염증제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs)가 치료에 사용되지만, 위장관 출혈(gastrointestinal bleeding), 심장마비(heart attack), 뇌졸중(stroke) 등을 유발할 수 있어 부작용이 없는 천연 항염증제 개발에 대한 관심이 높다[19].

따라서 본 연구에서는 염생식물 중 갯완두 주정추출물의 항산화 및 항염증 효과를 평가함으로써 기능성 식품소재 및 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

세포배양에 사용된 dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin (PS), phosphate-buffered saline (PBS), distilled water (DW)는 Gibco (Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. 갈릭산(gallic acid), sodium carbonate (Na_2CO_3), dimethyl sulfoxide (DMSO), ammonium persulfate, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammoniumsalt (ABTS), 아스코르브산(ascorbic acid),

트롤록스(trolox), lipopolysaccharide (LPS), 에탄올(EtOH)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Folin-Ciocalteu's phenol reagent는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였으며, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)는 Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

갯완두 에탄올 추출

갯완두는 2021년 6월 강원도 강릉시 주문진읍 주문진해수욕장 근처에서 확보하였다. 확보된 갯완두는 수세 후, 동결건조시켜 분쇄하고, 70% 에탄올을 사용하여 3회 초음파 추출하였다. 추출물은 여과 후 회전감압농축기를 사용하여 농축하고 동결건조시켜 분말화 하여 DMSO에 100 mg/ml의 농도로 제조한 후 실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 함량

갯완두 추출물의 총 폴리페놀 함량을 확인하기 위해, 갯완두 추출물 용액 20 μ L와 1 N Folin-Ciocalteu 페놀 시약 100 μ L를 96 웰 마이크로 플레이트에 분주하고, 상온 암실에서 반응 시켰다. 5분 후, 혼합용액에 7.5% 탄산나트륨(Na_2CO_3)용액 80 μ L를 넣고, 상온 암실에서 20분 동안 반응시키고 흡광도 765 nm에서 측정하였다. 검량선은 갈릭산(gallic acid)를 기준물질로 사용하여 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

항산화 효능

갯완두 추출물의 항산화 활성은 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성 및 FRAP assay로 확인하였다. 양성대조군으로는 아스코르브산과 트롤록스를 사용하였다.

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거 활성 시험은 농도별로 제조한 갯완두 추출물 100 μ L와 DPPH 용액 100 μ L를 96 웰 마이크로 플레이트에 혼합한 후, 암실에서 30분간 반응시킨 다음 분광광도계를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS 라디칼 소거 활성 시험은 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM 황산 암모늄 용액을 혼합한 후 상온

암실에서 16-18 시간 반응시키고, 흡광도 745 nm에서 흡광도 값이 0.700 ± 0.002 이 나오도록 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 150과 농도별로 제조한 갯완두 추출물 50 μ L를 96 웰 마이크로 플레이트에 혼합시키고, 상온 암실에서 20분 동안 반응 시킨 다음 745 nm에서 흡광도를 측정하였다.

FRAP assay는 sigma사 Ferric Reducing Antioxidant Power (MAK369) assay kit 매뉴얼에 나와 있는 방법으로 실험을 진행하였다. 농도별로 제조한 갯완두 추출물 10 μ L와 FRAP assay buffer, 염화철(FeCl_3) 및 FRAP probe로 혼합된 반응 용액 190 μ L를 96 웰 플레이트에 혼합하고 37°C에서 60분 동안 반응 시킨 후, 594 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포독성 및 NO 및 PGE₂ 생성 억제

갯완두 추출물의 세포독성을 확인 하기 위해 Cell Counting Kit-8 (CCK-8)을 사용하였다. RAW264.7 세포 3×10^5 cell/mL를 24 웰 플레이트에 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 세포배지에 농도별로 희석한 갯완두 추출물을 세포에 처리한 후, 1시간 뒤에 LPS를 처리하였다. 24시간 배양 후, CCK-8 용액을 첨가하여 4시간 동안 반응시키고, 흡광도 450 nm에서 플레이트를 측정하여, 무처리 그룹과 흡광도 값 비교를 통해 독성 정도를 확인하였다.

NO 생성 억제 효능을 확인하기 위해, 세포독성 확인 방법처럼 RAW264.7 세포를 24 웰 플레이트에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 세포배지에 농도별로 희석한 갯완두 추출물을 세포에 처리한 후, 1시간 동안 LPS를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후, Thermo사 Griess reagent kit의 N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (Component A)와 Sulfanilic acid (Component B)를 1:1로 혼합한 반응액 20 μ L과 증류수 130 μ L와 세포배양 상층액 150 μ L를 96 웰 마이크로 플레이트에 혼합한 후, 실온 암실에서 30분동안 반응시키고 흡광도 548 nm에서 마이크로 플레이트를 측정하여, LPS 처리 그룹과 흡광도 값 비교를 통해 NO 생성 억제 효능을 평가하였다. Nitrite standard solution (Component C)를 사용하여

표준농도 곡선을 구한 후 nitrite의 농도를 계산하였다.

PGE₂ 생성 억제를 평가하기 위해 RAW264.7 세포를 24 웰 플레이트에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 세포배지에 농도별로 희석한 갯완두 추출물을 세포에 처리한 후, 1시간 뒤에 LPS를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 상층액을 회수하여 PGE₂ ELISA kit (Enzo Life Sciences, US) 제조사 방법에 따라 실험을 진행하였다. PGE₂ 생성 정도는 흡광도 405 nm에서 측정하였다.

세포내 ROS 생성 억제

갯완두 추출물의 세포내 ROS 생성 억제 효능을 평가하기 위해, H₂DCFDA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 flow cytometry를 통해 측정하였다. 먼저 RAW264.7 세포 3×10⁵ cell/mL를 6 웰 플레이트에 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 세포배지에 농도별로 희석한 갯완두 추출물을 세포에 처리한 후, 1시간 뒤에 LPS를 처리하였다. 24시간 배양 후, PBS로 2번 세척 후에 회수하여 원심분리 시키고, 배지에 희석된 10 μM DCFDA로 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이후 PBS로 2번 세척하고 flow cytometry를 통해 ROS 생성 억제능을 평가하였다.

사이토카인 분비 억제

갯완두 추출물의 IL-1β (ab197742), IL-10 (ab100697), TNF-α (ab208348) 분비 억제에 대한 효능을 확인하기 위해 LPS로 자극된 RAW264.7 세포에 갯완두 추출물을 농도별로 처리하여 실험을 진행하였다. 먼저 RAW264.7 세포 3×10⁵ cell/mL를 6 웰 플레이트에 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 세포배지에 농도별로 희석한 갯완두 추출물을 세포에 처리한 후, 1시간 뒤에 LPS를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 상층액을 가지고 각각 ELISA kits 제조사에서 제시한 방법대로 96 웰 플레이트에 실험을 진행하여 분비 억제 정도를 흡광도 450 nm에서 측정하였다. 갯완두 추출물의 IL-1β, IL-10, TNF-α 생성 억제 정도는 각 kit에 포함된 standard solution을 사용하여 표준농도 곡선을 그린 후 농도를 계산하였다.

iNOS 및 COX-2 발현

갯완두 추출물의 iNOS (ab253219)와 COX-2 (ab210574) 단백질 활성화에 대한 효능을 알아보기 위해 LPS로 자극된 RAW264.7 세포에 갯완두 추출물을 농도별로 처리하고 세포 단백질 추출물을 확보하여 실험을 수행하였다. 먼저 RAW264.7 세포 3×10⁵ cell/mL를 6 웰 플레이트에 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 세포배지에 농도별로 희석한 갯완두 추출물을 세포에 처리한 후, 1시간 뒤에 LPS를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포를 회수하여 ELISA kits 제조사에서 제시한 방법대로 세포 추출 용액으로 세포 단백질을 추출하고 96 웰 플레이트에 실험을 진행하여 단백질 활성화 정도를 흡광도 450 nm에서 측정하였다. iNOS 및 COX-2 단백질 활성 정도는 kit에 있는 standard solution을 사용하여 표준농도 곡선을 그린 후 농도를 계산하였다.

통계처리

모든 실험을 통해 얻은 결과는 평균±표준편차(means ± SD)로 표시하였고, 통계학적 분석은 IBM SPSS Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 분석하였으며, 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산 분석(one way analysis of variance, ANOVA)과 함께 Duncan 방법을 통해 p < 0.05 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

갯완두 추출물의 총 폴리페놀 함량

일반적으로 페놀 화합물의 함량이 높을수록 항산화 및 항염증 활성이 우수하다고 알려져 있어, 이를 확인하기 위해 폴리페놀 함량을 측정하였다. 70% 에탄올을 사용하여 추출한 갯완두 추출물의 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과, 폴리페놀 함량은 37.31±2.60 mg/g으로 확인되었다. 갯완두 폴리페놀 함량에 대한 연구는 보고된 바가 없으며, 플라보노이드 함량은 시료 채집 위치마다 큰 차이를 보였으나, 내륙 및 해안 개체군 간의 큰 차이는 없다고 보고되어 있다[2]. 같은 *Lathyrus species*에 속하는 몇몇 식물에 대한 총 폴리페놀 함량에 대해 살펴보면, 종자와 지상부 메탄올 추출물 폴리페놀

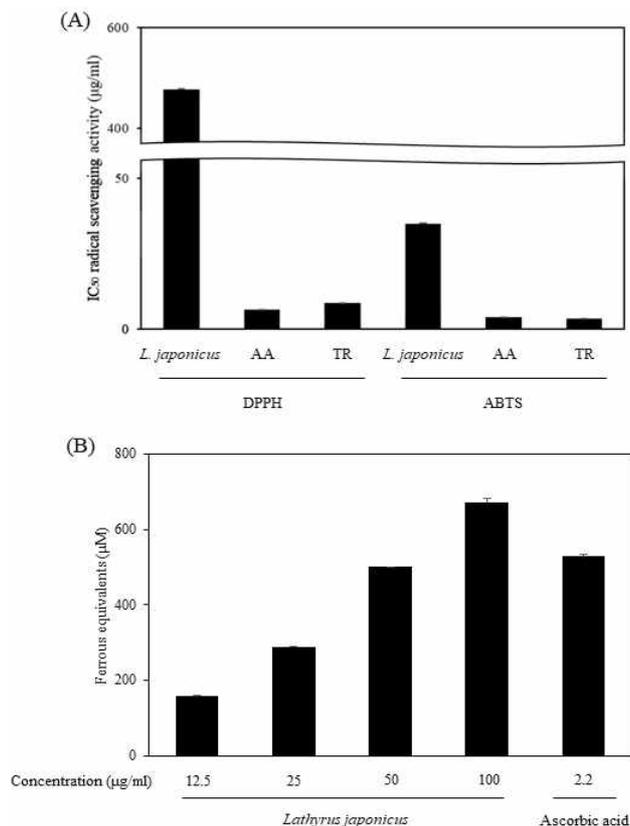
함량이 *L. aphaca*는 75.33 및 22.36, *L. aureus*는 29.90 및 67.60, *L. cicera*는 5.8 및 13.85, *L. sphaericus*는 288.89 및 273.16 mg/g으로 보고되었다[20]. Pastor-Cavada 등[21]에 따르면 스페인에 서식하는 15종의 *Lathyrus* species의 메탄올 추출물의 폴리페놀 함량을 확인한 결과 3.8에서 29.2 mg/g으로 보고되었다. 이전에 보고된 다른 열성식물에 대한 폴리페놀 함량을 살펴보면, 갯사상자(*Cnidium japonicum*)의 80% 에탄올, 80% 메탄올, 물 추출물의 경우 21.79, 22.14, 15.66 mg/g의 폴리페놀 함량을 보이는 것을 확인할 수 있었다[22]. 또한, 갯메꽃(*Calystegia soldanella*), 모래지치(*Messerschmidia sibirica*), 순비기나무(*Vitex rotundifolia*), 해당화(*Rosa rugosa*)의 잎과 줄기 메탄올 추출물의 경우, 각각 21.25 및 11.22, 63.52 및 22.63, 35.52 및 12.30, 110.20 및 65.71 mg/g의 폴리페놀 함량을 보이는 것을 확인하였으며[23], 이는 열성식물의 종류와 부위, 추출 용매에 따라 폴리페놀의 함량의 차이가 있음을 나타낸다. 그 외에도 이러한 총 폴리페놀 함량의 차이는 열성식물 채취 시기, 장소, 추출 방법 등에 따라 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

Figure 1. Antioxidant activities such as (A) DPPH, ABTS radical scavenging and (B) FRAP of *L. japonicus* 70% EtOH extracts.

갯완두 추출물의 항산화 효능

갯완두 추출물의 항산화 효능을 평가하기 위해, DPPH, ABTS 라디칼 소거능 및 FRAP assay를 수행하였다(Figure 1). DPPH 라디칼 소거능 활성에서 갯완두 추출물의 IC₅₀값은 476.09±1.50 µg/mL이었으며, 양성대조군으로 사용된 아스코르브산과 트롤록스의 IC₅₀값은 각각 6.36±0.03 및 8.68±0.11 µg/mL으로 나타났다. ABTS 라디칼 소거능의 경우 갯완두 추출물의 IC₅₀값은 34.91±0.37 µg/mL이었으며, 양성대조군인 아스코르브산과 트롤록스의 IC₅₀값은 각각 3.90±0.02 및 3.49±0.02 µg/mL으로 나타났다. 이러한 항산화 결과 값의 차이가 나는 이유는, DPPH와 ABTS는 각각 자유라디칼 소거와 양이온 라디칼을 소거하는 차이가 있어 측정결과 값이 다르게 나오는 것으로 보인다[24]. FRAP 환원능 결과에서는 갯완두 추출물 12.5, 25, 50, 100 µg/mL에서 157.44±0.67, 288.06±1.60, 499.83±0.48, 671.56±9.99 µM의 FRAP 값을 보여 농도의존적으로 높아지는 것을 확인하였으며, 양성대조군인 아스코르브산의 경우 2.2 µg/mL에서 528.56±4.42 µM의 FRAP 값을 나타냈다.

이전 연구를 살펴보면, 갯완두 잎과 줄기 80% 메탄올 추출물의 경우 50 µg/mL에서 20% 이하의 DPPH 라디칼 소거 효능을 나타냄을 확인하였으며[25], 다른 연구에서는 갯완두 메탄올 추출물 100 µg/mL의 농도에서 DPPH 및 ·HO 라디칼 소거능 활성이 81.12 및 89.30%으로 나타냄을 보고하였다[26]. Lee 등[27]은 갯완두를 다이클로로메탄(CH₂Cl₂)으로 1차 추출 후 남은 잔사를 메탄올로 2차 추출한 추출물은 100 µg/mL 농도에서 DPPH 라디칼 소거능이 각각 12.49 및 6.30%를 나타낸다고 보고하였다. 또 다른 연구에서는 갯완두 메탄올 추출물이 513 µg/mL 농도에서 50% DPPH 라디칼 소거능을 보였으며, linoleic acid 자동산화 저해활성은 없는 것으로 보고하였다[28]. 이러한 보고들을 바탕으로 갯완두의 항산화 효능은 추출방법, 시기, 부위에



따라 효능 결과가 다르게 나오는 것으로 판단된다.

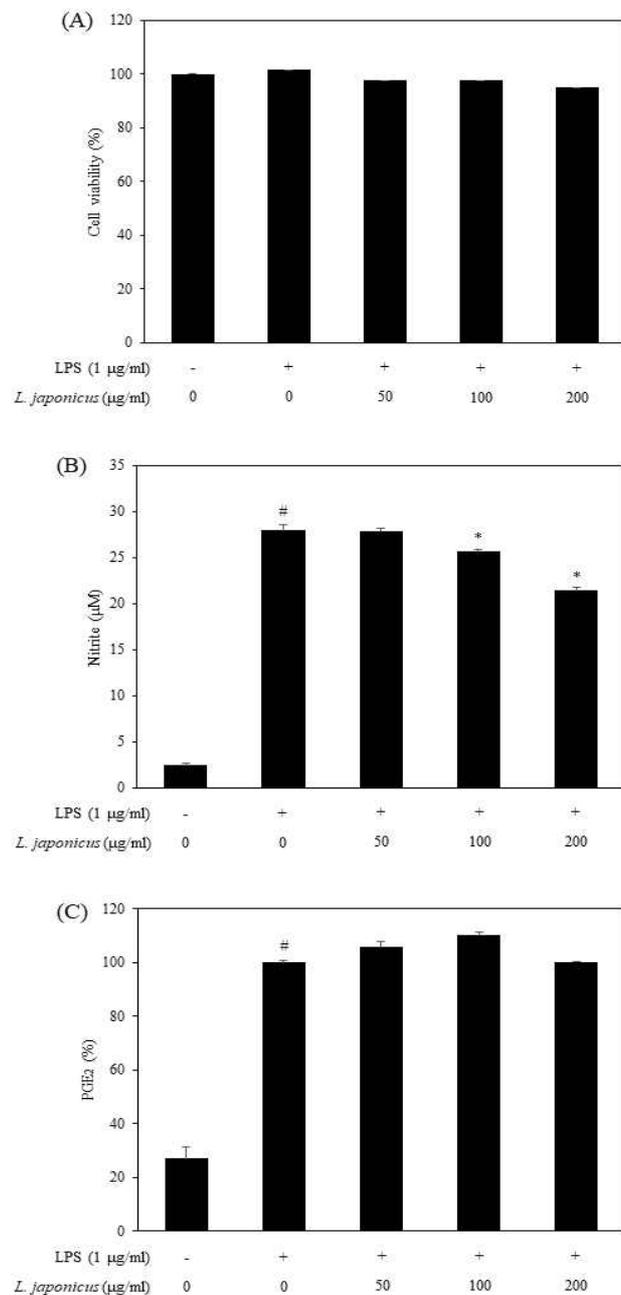


Figure 2. Effect of *L. japonicus* 70% EtOH extracts on (A) cell viability, (B) NO production, and (C) PGE₂ production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Data are mean ± SD of three independent experiments. #*p* < 0.05 vs. the non-treated group, **p* < 0.05 vs. the sample treated group.

갯완두 추출물의 세포독성, NO 및 PGE₂ 생성 억제 효능

NO는 신경계와 면역계에서 생리적 기능을 담당하며, 위장관 운동 조절과 전염병 및 종양에

대한 방어 메커니즘 등에 관여하지만, 과도한 NO의 생성은 염증을 유발하여 신경손상, 조직손상과 같은 다양한 문제를 초래하게 된다[29,30]. 먼저 갯완두 추출물의 세포내 독성유무를 판단하기 위해 RAW264.7 세포에 갯완두 추출물을 50, 100, 200 µg/mL로 처리하고, 24시간 뒤에 CCK-8을 활용하여 독성유무를 판단하였다(Figure 2A). 그 결과 RAW264.7 세포에서 LPS를 포함한 모든 추출물 처리군에서 독성이 나타나지 않음을 확인하였다. 다음으로 NO 생성에 대한 갯완두 추출물의 효능을 평가하기 위해 NO assay를 실시한 결과, nitrite 농도가 LPS를 처리하지 않은 그룹은 2.41±0.25 µM이었으며, LPS를 처리한 그룹은 27.96±0.57 µM로 증가된 것을 확인할 수 있었다(Figure 2B). 갯완두 추출물을 처리한 그룹은 50, 100, 200 µg/mL 농도에서 27.89±0.33, 25.67±0.23, 21.44±0.29 µM로 nitrite 농도가 갯완두 추출물 농도의존적으로 낮아지는 것을 확인하였다. 하지만, 갯완두 추출물의 경우 PGE₂ 생성 억제 효능은 없는 것으로 확인되었다(Figure 2C). 세포내에서 이전에 갯완두 추출물을 활용한 염증억제 활성을 연구한 결과는 없으나, NO 라디칼 소거능 활성에서 *L. aphaca*, *L. aureus*, *L. cicero*, *L. sphaericus*, *L. digitatus*, *L. setifolius* 등 6종의 종자 및 지상부 메탄올 추출물 모두 IC₅₀값이 1000 µg/mL 이상으로 NO 라디칼 소거능 활성이 저조한 것을 알 수 있었다[20].

갯완두 추출물의 세포내 ROS 생성 억제 평가

2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)는 ROS 또는 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)에 의해 형광성이 높은 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 산화되며, 이는 현미경, 유세포분석 등에 의해 ROS 형성 정도를 관찰할 수 있어 많은 연구에 사용되고 있다[31]. 따라서 세포내 ROS 생성에 대한 갯완두 추출물의 효능을 확인하기 위해, RAW264.7 세포에 LPS를 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 후 DCFDA 형광을 통해 세포내 항산화 정도를 측정하였다(Figure 3). RAW264.7 세포에 LPS를 처리하게 되면 ROS가 생성되어 fluorescence intensity가 처리하지 않은 그룹과 비교하여 오른쪽으로 이동된 것을 확인할 수 있었다. 하지만 LPS를 처리한 그룹에 갯완두 추출물을 50, 100, 200

μg/mL 농도로 처리하면 fluorescence intensity가 농도가 높아질수록 왼쪽으로 이동하는 것을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 양성대조군인 아스코르브산 100 μg/mL 또한 LPS 처리 그룹과 비교하여 fluorescence intensity가 확연하게 왼쪽으로 이동된 것을 확인할 수 있었다. fluorescence intensity를 그래프로 표현했을 때 LPS를 처리한 그룹과 비교하여 갯완두 추출물의 농도가 50, 100, 200 μg/mL로 높아질수록 81.19±0.27, 65.69±0.43, 63.38±0.41%로 ROS 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 아스코르브산의 ROS 생성 억제 효능은 44.62±0.11%으로 확인되었다. 이는 갯완두 추출물이 항산화 효능을 보이는 것처럼 세포내에서도 LPS에 의해 발생된 ROS를 억제하는 효능이 있음을 확인하였다.

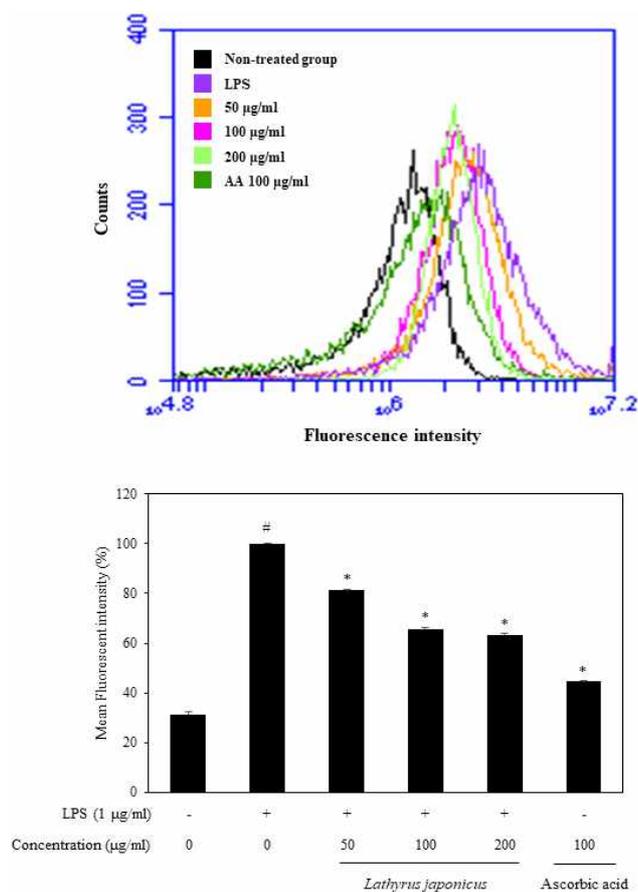


Figure 3. Effect of *L. japonicus* 70% EtOH extracts on ROS production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. DCF fluorescence was investigated using flow cytometry. AA, ascorbic acid. Data are mean ± SD of three independent experiments. #*p* < 0.05 vs. the non-treated group, **p* < 0.05 vs. the sample treated group.

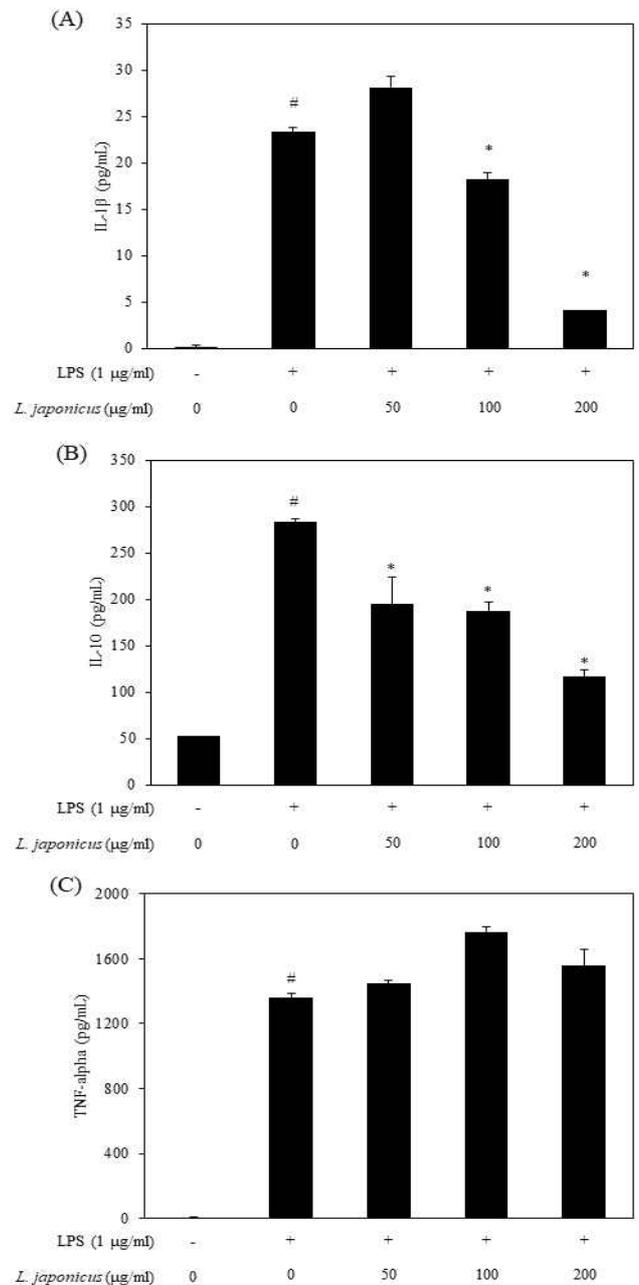


Figure 4. Effect of *L. japonicus* 70% EtOH extracts on (A) IL-1β, (B) IL-10, and (C) TNF-α production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Data are mean ± SD of three independent experiments. #*p* < 0.05 vs. the non-treated group, **p* < 0.05 vs. the sample treated group.

갯완두 추출물의 cytokines (IL-1β, IL-10 및 TNF-α) 생성 억제 효능

염증 반응에서 발생하는 IL-1β, TNF-α 등과 같은 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)과 IL-10 등과 같은 항염증성 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)은 다양한 염증성 질환에

관여한다고 보고되어 있다[32]. 따라서, 갯완두 추출물이 전염증성 사이토카인의 생성에 효과가 있는지 실험을 통해 확인하였다(Figure 4). 염증 유발 물질인 LPS를 RAW264.7 세포에 처리하였을 때, IL-1 β , IL-10 및 TNF- α 모두 무처리 그룹과 비교하여 전염증성 사이토카인이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다. LPS로 처리된 RAW264.7 세포에 갯완두 추출물을 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하고 IL-1 β 를 확인한 결과, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 LPS 처리 그룹(23.42 \pm 0.42 pg/mL)과 비교하여 각각 18.17 \pm 0.79 및 4.10 \pm 0.11 pg/mL 로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 IL-10의 경우에도 갯완두 추출물 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 결과, LPS 처리 그룹(283.83 \pm 3.00 pg/mL)과 비교하여 각각 194.51 \pm 29.41, 187.58 \pm 8.92, 117.22 \pm 6.24 pg/mL 로 농도의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었지만, TNF- α 의 경우 갯완두 추출물에 의해 농도가 감소하지 않는 것을 확인하였다. 이전 연구결과를 살펴보면 전염증성 사이토카인과 항염증성 사이토카인을 같이 억제하는 연구[33]와 항염증성 사이토카인의 생성을 유도하는 연구도 있으며[34], 다른 사이토카인들은 억제하나 항염증성 사이토카인은 영향을 주지 않는 연구가 있어[35], 항상 모든 전염증성 사이토카인이 효능물질에 의해 억제되지 않는 것을 알 수 있다[36,37]. 이러한 연구결과들을 바탕으로, 갯완두 추출물의 경우 LPS에 의해 생성된 TNF- α 에는 관여하지 않지만, IL-1 β 와 IL-10의 생성과 억제에는 관여하여 항염증 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

갯완두 추출물의 iNOS 및 COX-2 발현 억제 효능

NOS는 endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS)와 같은 3가지 타입의 단백질이 있으며, 특히 iNOS는 대식세포에서 LPS와 사이토카인과 같은 염증 인자에 의해 발현되고, NO 생성을 자극하게 된다[38]. Cyclooxygenase (COX)는 대부분의 정상 포유류 조직에서 발현되는 COX-1과 성장인자, 염증성인자와 같은 자극에 의해 발현되는 COX-2가 있으며, COX-2의 경우 PGE₂생성에 관여한다[39]. 따라서 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 대한 갯완두 추출물의 효능을 확인하기 위해, ELISA

kit를 사용하여 확인하였다(Figure 5A and B). LPS로 자극된 RAW264.7 세포 단백질 추출물은 LPS를 처리하지 않은 세포 단백질 추출물 285.63 \pm 2.65 pg/mL 보다 높은 9717.38 \pm 21.39 pg/mL 의 iNOS 활성을 나타냈다. 그러나 24시간 동안 갯완두 추출물을 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리했을 때, LPS로 증가된 iNOS 활성이 5892.38 \pm 69.47, 3811.13 \pm 56.39, 986.50 \pm 97.93 pg/mL 의 농도로 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. COX-2 활성 또한 LPS를 처리했을 때 24시간 뒤에 세포 단백질 추출물에서 현저하게 증가하였으나, 갯완두 추출물에 의해 COX-2 활성이 억제되지 않았다. 이러한 결과들을 바탕으로 갯완두 70% 에탄올 추출물은 항산화 효능과 더불어 iNOS 단백질 발현 억제를 통한 NO 생성 억제에 관여하는 것을 알 수 있었다.

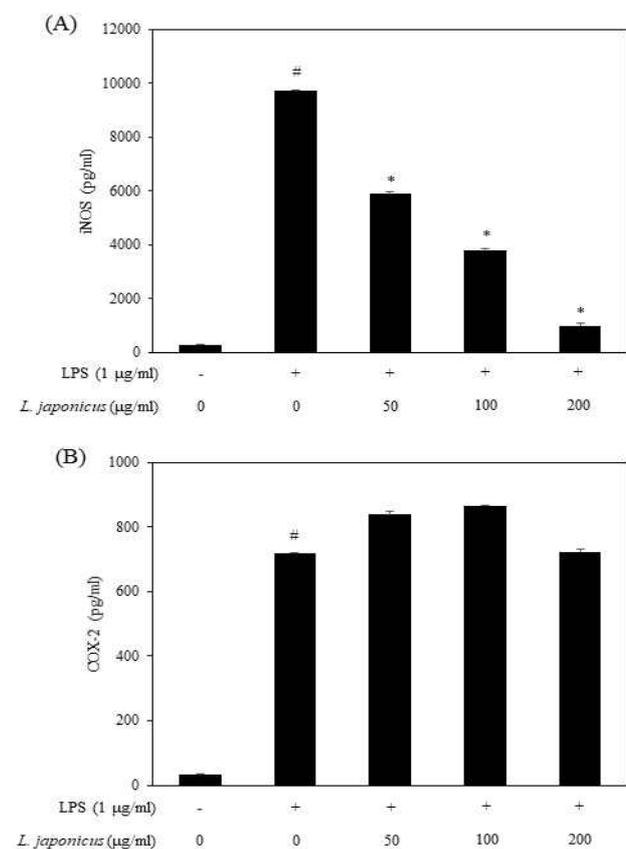


Figure 5. Effect of *L. japonicus* 70% EtOH extracts on (A) iNOS and (B) COX-2 concentration in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Data are mean \pm SD of three independent experiments. # p < 0.05 vs. the non-treated group, * p < 0.05 vs. the sample treated group.

결론

본 연구에서는 염생식물 중 하나인 갯완두 70% 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 효능을 평가하여 기능성 소재로의 가능성을 평가하였다. 갯완두 추출물은 항산화 DPPH, ABTS 라디칼 소거능과 FRAP assay를 통해 평가하였으며, RAW264.7 세포내에서 ROS 생성 억제능을 통해 항산화 효능이 있음을 증명하였다. 마찬가지로, LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서 NO 생성능, 사이토카인(IL-1 β , IL-10, TNF- α) 발현 억제와 iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 대한 연구를 통해 염증 억제에 대한 효능도 수행하였다. 그 결과 갯완두 추출물은 IL-1 β , IL-10과 iNOS 단백질 활성화를 저해시켜 염증 억제 효능을 보이는 것으로 판단된다. 따라서 갯완두 추출물은 기능성 식품소재 및 염증성 질환 예방 및 치료 소재로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2023년 국립해양생물자원관 재원으로 지원을 받아 수행된 연구임(2023M00500).

References

- Ohtsuki, T., Setoguchi, H. 2011. Geographical differentiation in leaf thickness between coastal and freshwater populations of the coastal plant *Lathyrus japonicus* (Fabaceae). Bull. Natl. Sci. Mus. Ser. B 37, 127-132.
- Ohtsuki, T., Murai, Y., Iwashina, T., Setoguchi, H. 2013. Geographical differentiation inferred from flavonoid content between coastal and freshwater populations of the coastal plant *Lathyrus japonicus* (Fabaceae). Biochem. Syst. Ecol. 51, 243-250.
- Nakai, Z., Kondo, T., Akimoto, S. 2011. Parasitoid attack of the seed-feeding beetle *Bruchus loti* enhances the germination success of *Lathyrus japonicus* seeds. Arthropod Plant Interact. 5, 227-234.
- Ohtsuki, T., Kaneko, Y., Setoguchi, H. 2011. Isolated history of the coastal plant *Lathyrus japonicus* (Leguminosae) in Lake Biwa, an ancient freshwater lake. AoB plants 2011.
- Randall, R. 1977. The past and present status and distribution of Sea Pea, *Lathyrus japonicus*, Willd., in the British Isles. *Watsonia* 11, 247-251.
- Kim, H. M., Han, S., Choi, K., Ku, J. J., Park, K. W., Cho, E. J., Lee, S. H. 2012. Aldose reductase inhibitory activity of the methanol extracts from Korean folk plants. Korean J. Agric. Sci. 39(2), 169-175.
- Lee, H. J., Kim, Y. A., Ahn, J. W., Na, H. J., Kim, H. M., Seo, Y. 2006. Screening of Korean marine plants for their inhibitory effect on histamine release from RPMC in vitro. Biotechnol. Bioprocess Eng. 11, 80-83.
- Lee, H. J., Kim, Y. A., Lee, J. I., Lee, B. J., Seo, Y. W. 2007. Screening of Korean marine plants extracts for inhibitory activity on protein tyrosine phosphatase 1B. J. Appl. Biol. Chem. 50(2), 74-77.
- Yu, H. N., Cho, K. H., Sok, D. E., Jeong, T. S. 2003. Inhibitory Effects of Natural Plant Extracts on Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂, Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase. Korean J. Pharmacogn. 34(1), 100-108.
- Lee, I. S., Dat, N. T., Cai, X. F., Shen, G. H., Kim, Y. H. 2003. Inhibitory effects of natural products against NFAT (nuclear factor of activated T cells) transcription factor. Korean J. Pharmacogn. 34(2), 150-155.
- Miao, L., Clair, D. K. S. 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. Free Radic. Biol. Med. 47(4), 344-356.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., de Lourdes Bastos, M. 2002. Antioxidant activity of *Hypericum androsaemum* infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. Biol. Pharm. Bull. 25(10), 1320-1323.
- Hamasaki, T., Kashiwagi, T., Imada, T., Nakamichi, N., Aramaki, S., Toh, K., Morisawa, S., Shimakoshi, H., Hisaeda, Y., Shirahata, S. 2008. Kinetic analysis of superoxide anion radical-scavenging and hydroxyl radical-scavenging activities of platinum nanoparticles. Langmuir 24(14), 7354-7364.
- Vrchovska, V., Sousa, C., Valentão, P., Ferreres, F., Pereira, J. A., Seabra, R. M., Andrade, P. B. 2006. Antioxidative properties of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) external leaves against DPPH, superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. Food Chem. 98(3), 416-425.
- Na, E. J., Jang, H. H., Kim, G. R., Na, E. J., Jang, H. H., Kim, G. R. 2016. Review of recent studies and research analysis for anti-oxidant and anti-aging materials.

- Asian J. Beauty Cosmetol. 14(4), 481-491.
16. de Cássia da Silveira e Sá, R., Andrade, L. N., de Sousa, D. P. 2013. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules* 18(1), 1227-1254.
 17. Park, C. M., Park, J. Y., Noh, K. H., Shin, J. H., Song, Y. S. 2011. *Taraxacum officinale* Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF- κ B modulation in RAW 264.7 cells, *J. Ethnopharmacol.* 133(2), 834-842.
 18. Mueller, M., Hobiger, S., Jungbauer, A. 2010. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chem.* 122(4), 987-996.
 19. Ahn, S., Singh, P., Jang, M., Kim, Y. J., Castro-Aceituno, V., Simu, S. Y., Kim, Y. J., Yang, D. C. 2018. Gold nanoflowers synthesized using *Acanthopanax cortex* extract inhibit inflammatory mediators in LPS-induced RAW264.7 macrophages via NF- κ B and AP-1 pathways. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 162, 398-404.
 20. EYİİŞ, E., PEKGÖZ, A. K. 2021. Radical Scavenging Activity of Some *Lathyrus* Taxa Distributed in Burdur-Isparta Regio. *Süleyman Demirel univ. fen bilim. enst. derg.* 25(1), 121-126.
 21. Pastor-Cavada, E., Juan, R., Pastor J. E., Alaiz, M., Vioque, J. 2009. Antioxidant activity of seed polyphenols in fifteen wild *Lathyrus* species from South Spain. *LWT-Food Sci. Technol.* 42(3), 705-709.
 22. Kim, J. Y., Lee, Y. J., Kim, W. S., Moon, S. K., Kim, Y. T. 2022. Antioxidant and Physiological Activities of Different Solvent Extracts of *Cnidium japonicum*. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* 55(3), 310-318.
 23. Kim, S. S., Cha, H. C. 2017. Comparison of the total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of four kinds of sand dune plants living in Taean, Korea. *Korean J. Plant Res.* 30(1), 8-16.
 24. Kim, D. G., Shin, J. H., Kang M. J. 2018. Antioxidant and anti-inflammatory activities of water extracts and ethanol extracts from *Portulaca oleracea* L. *Korean J. Food Preserv.* 25(1), 98-106.
 25. Yoon, M. H., Lim, C. H., Oh, J. H., Lee, J. C., Choi, Y. W. 1997. Screening of Inhibitors of platelet aggregation from edible plants. *Korean J. Agric. Sci.* 24(2), 267-274.
 26. Choi, J. M., Choi, J. Y., Kim, H. M., Choi, K., Ku, J., Park, K. W., Lee, S., Cho, E. J. 2011. Antioxidative Activity and Protective Effect from Gastric Cancer of Korean Folk Plants. *Cancer Prev. Res.* 16(4), 387-394.
 27. Lee, H., Kim, Y., Ahn, J., Lee, B., Moon, S. 2004. Screening of peroxynitrite and DPPH radical scavenging activities from salt marsh plants, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 19(1), 57-61.
 28. Lee, S. E., Sung, J. S., Jang, I. B., Kim, G. S., Ahn, T. J., Han, H. S., Kim, J. E., Kim, Y. O., Park, C. B., Cha, S. W. 2008. Investigation on antioxidant activity in plant resources. *Korean J. Crop Sci.* 16(5), 356-370.
 29. Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., Leung, S. W. 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* 129(2), 83-94.
 30. Lee, H. J., Jeong, D. E., Gang, J. E., Sim, M. O., Seong, T. K., Woo, K. W., An, B., Jung, H. K., Cho, H. W. 2018. Quantitative Analysis of Chemical Composition and In Vitro Anti-oxidant and Anti-inflammatory Properties of Asparagus oligoclonos. *Korean J. Pharmacogn.* 49(2), 138-144.
 31. Rastogi, R. P., Singh, S. P., Häder, D. P., Sinha, R. P. 2010. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397(3), 603-607.
 32. Lee, E. S., Ju, H. K., Moon, T. C., Lee, E., Jahng, Y., Lee, S. H., Son, J. K., Baek, S. H., Chang, H. W. 2004. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 27(5), 617-620.
 33. Kiemer, A. K., Hartung, T., Huber, C., Vollmar, A. M. 2003. *Phyllanthus amarus* has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF- κ B pathway. *J. Hepatol.* 38(3), 289-297.
 34. Chu, H., Tang, Q., Huang, H., Hao, W., Wei, X. 2016. Grape-seed proanthocyanidins inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator expression in RAW264.7 macrophages by suppressing MAPK and NF- κ B signal pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 41, 159-166.
 35. Zhu, J., Luo, C., Wang, P., He, Q., Zhou, J., Peng, H. 2013. Saikosaponin A mediates the inflammatory response by inhibiting the MAPK and NF- κ B pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Exp. Ther. Med.* 5(5), 1345-1350.
 36. Yen, J. H., Yang, D. J., Chen, M. C., Hsieh, Y. F., Sun, Y. S., Tsay, G. J. 2010. *Glycine tomentella* Hayata in-

- hibits IL-1 β and IL-6 production, inhibits MMP-9 activity, and enhances RAW264. 7 macrophage clearance of apoptotic cells. *J. Biomed. Sci.* 17(1), 1-9.
37. Chen, G., Li, K. K., Fung, C. H., Liu, C. L., Wong, H. L., Leung, P. C., Ko, C. H. 2014. Er-Miao-San, a traditional herbal formula containing Rhizoma Atractylodis and Cortex Phellodendri inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages through inhibition of NF- κ B pathway and MAPKs activation. *J. Ethnopharmacol.* 154(3), 711-718.
- 38 Sierra, A., Navascués, J., Cuadros, M. A., Calvente, R., Martín-Oliva, D., Ferrer-Martín, R. M., Martín-Estebané, M., Carrasco, M. C., Marín-Teva, J. L. 2014. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in microglia of the developing quail retina. *PLoS One* 9(8), e106048.
39. Eibl, G., Bruemmer, D., Okada, Y., Duffy, J. P., Law, R. E., Reber, H. A., Hines, O. J. 2003. PGE₂ is generated by specific COX-2 activity and increases VEGF production in COX-2-expressing human pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306(4), 887-897.