

방울양배추 추출물의 염증성 사이토카인 억제에 미치는 영향

이재혁¹, 박정숙^{2*}

¹남부대학교 응급구조학과 교수, ²남부대학교 간호학과 교수

Effect of Brussels Sprouts Extract on Inflammatory Cytokine Inhibition

Jae-Hyeok Lee¹, Jeong-Sook Park^{2*}

¹Professor, Dept. of Emergency Medical Rescue, Nambu University

²Professor, Dept. of Nursing, Nambu University

요약 본 논문은 Brussels Sprouts Extract의 염증성사이토카인의 억제에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 진행되었다. 염증반응은 활성산소와 같은 매개인자와 염증성 사이토카인인 TNF- α 나 IL-1 β , IL-8에 의해 나타난다. 이에 본 논문은 MTS assay를 이용하여 세포에 대한 생존율을 살펴보고, RAW264.7 대식세포에 lipopolysaccharide (LPS) 자극에 의해 생성된 NO와 TNF- α 나 IL-1 β , IL-8과 같은 염증성 사이토카인에 대한 억제를 살펴보았다. Brussels Sprouts Extract 10mg/mL, 100mg/mL, 1000mg/mL 농도로 처리 후 억제 정도를 살펴본 결과, Brussels Sprouts Extract은 세포 독성 없이 NO생성과 TNF- α , IL-8을 농도 의존적으로 억제하였으며, 특히 1000mg/mL 농도에서는 유의한 억제를 보였다. 염증성 사이토카인의 생성을 저해한 Brussels Sprouts Extract은 염증반응 감소와 염증조절의 가능성을 시사하고 건강기능성 식품이나 염증 예방 및 치료제로서 잠재력을 제공한다고 볼 수 있다.

키워드 : 방울 양배추, 염증성 사이토카인, NO, TNF- α , IL-8

Abstract This paper was conducted to examine the effect of Brussels Sprouts Extract on the inhibition of pro-inflammatory cytokines. The inflammatory response is manifested by mediators such as reactive oxygen species and inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , and IL-8. Therefore, this paper examined the toxicity to cells using the MTS assay, stimulated RAW264.7 macrophages with lipopolysaccharide (LPS), and stimulated reactive oxygen species such as NO and TNF- α , IL-1 β , and IL-8. Inhibition of inflammatory cytokines after treatment with 10 mg/mL, 100 mg/mL, and 1000 mg/mL of Brussels Sprouts Extract was investigated. As a result of the experiment, Brussels Sprouts Extract inhibited NO production, TNF- α and IL-8 in a concentration-dependent manner without cytotoxicity, and showed significant inhibition especially at a concentration of 1000 mg/mL. Brussels Sprouts Extract, which inhibits the production of inflammatory cytokines, suggests the possibility of reducing inflammatory response and controlling inflammation, and can be seen as providing potential as a health functional food or prevention and treatment of inflammation.

Key Words : Brussels sprouts, Inflammatory cytokines, NO, TNF- α , IL-8

This study was supported(in part) by research funds from Nambu University(2022).

*Corresponding Author : Jeong-Sook Park(pk0207@nambu.ac.kr)

Received June 7, 2023

Revised July 5, 2023

Accepted August 20, 2023

Published August 28, 2023

1. 서론

채식 위주의 식생활이 많은 종류의 암을 예방하는 것으로 보고가 되면서 질병예방을 위해 많은 채소섭취를 권고하고 있다[1]. 특히 십자화과 채소는 다양한 영양소를 함유하여 항산화, 항염, 항암에 기여하는 대표적인 채소로 양배추, 콜리플라워, 브로콜리 등이 있다[2]. 십자화과 채소에는 생리 활성을 나타내는 휘발성이 강하며 맵고 독특한 향을 띠는 황 화합물 glucosinolates 성분이 들어있다[3]. 특히 십자화과 채소의 항염, 항암효과는 glucosinolates의 종류인 Sinigrin 성분과 glucosinolates의 분해산물 중 한 성분인 isothiocyanates에 의한 것으로 보고되고 있다 [4,5]. 십자화과 채소 중 최근에 소비가 증가하고 있는 방울양배추(*Brassica oleracea* var. *gemmifera*)는 벨기에 브뤼셀지역에서 재배되어 Brussels sprouts라고 불리었다. 19세기 이후에 유럽과 미국으로 전파되었으며 모양은 양배추와 비슷하나 양배추에 비해 유연하고 맛과 품질이 우수하다. 또한 내한성이 강하고 저장성이 좋아 겨울철에 많이 이용된다[6,7]. 우리나라에서는 1990년대부터 소량 재배되었으나 최근에는 미니채소에 대한 소비가 늘어나면서 국내에서도 재배가 늘어나고 있다[8]. 방울양배추는 β -carotene, rutin과 같은 페놀성 화합물과 비타민 C의 성분이 일반 양배추에 비해 더 많이 들어있으며 glucosinolate 일종인 Sinigrin이 풍부하여 항염, 항산화 능력이 크다[9]. 또한 칼륨과 식이섬유가 풍부하여 꾸준히 섭취 시 고지혈증과 같은 대사성 질환과 폐암, 소화기 계암, 위암 등의 발생이 감소하는 것으로 보고되고 있다 [10,11].

유해한 내, 외부 자극에 대한 생체반응인 염증반응은 다양한 면역세포와 염증 매개인자들이 관여하는 생체 보호반응이며 생명체에 필요한 방어 시스템이다[12]. 면역반응의 종류인 염증반응은 세포의 손상을 저해하고 [13,14], 파괴된 조직 재생과 상처부위 및 괴사된 세포를 제거하는 자구적인 반응이다. 대식세포에서 cytokines, lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α 등의 일정 자극에 의해 염증 작용의 전사 인자를 활성화시키며 [15], 다양한 활성산소종과 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 등과 같은 염증 매개체가 관여한다[16]. 염증 매개체의 과잉생산은 질병의 많은 증상과 관련이 있으며 대식세포 매개 염증 반응을 조절시 잠재적으로 다양한 염증성 질환의 발병률을 줄일 수 있다[17,18]. 이에 본 연구에서는 근래에

소비가 많이 되고 있는 채소인 Brussels Sprouts의 염증성 사이토카인 억제에 미치는 영향을 살펴보고 염증기전에 대한 기초적인 생리 활성과 항염성을 객관적으로 입증하기 위해 실시되었다.

2. 연구방법

2.1 실험 재료와 시약

방울양배추는 광주광역시에서 재배된 것으로 유기농 원료를 구입하여 사용하였다. 각 시료는 상한 부분은 제거하여 세척 후 50°C에서 dry oven에서 건조 후 원료 질량의 5배에 준하는 100%에탄올을 첨가하였다. 50°C에서 24시간 추출 후 여과하고 농축한 후 동결 건조하여 시료로 사용하였다. 각 sample 3g을 80% ethanol에 녹여 5°C 이하에서 냉장 보관 후 사용하였다. 세포배양을 위해 클린벤치와 후드, 인큐베이터는 정기적으로 알콜을 이용하여 소독을 하며, 세포배양을 위해 Dulbecco's Modified Eagle Medium사용하였으며 Gibco BRL사(Grand Island, USA)에서 구입한 streptomycin-penicillin, fetal bovine serum(FBS)사용하였다. 세포생존율을 보기위해 Promega사에서 Cell Titer 96® AQueous One Solution을 사용하였고, 자극제는 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)에서 *Escherichia coli* O127:B8 유래 Lipopolysaccharide, iNtRON Biotechnology사 (Suwon, Korea)에서 NO detection kit을 구입하여 사용하였다. TNF- α 와 IL-1 β , IL-8 kit는 (San Diego, USA)BD Bioscience사에서 구입하여 매뉴얼대로 실험하였다.

2.2 세포배양

본 실험에 사용한 세포는 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7세포로 한국 세포주 은행((Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받았으며 세포배양을 위해 1% penicillin-streptomycin, 세포 성장과 영양을 위해 10% FBS를 첨가한 DMEM매지를 사용하였다. 대식세포는 37°C가 유지되는 5% CO₂인큐베이터에서 배양하였다.

2.3 세포 생존률 실험

Brussels Sprouts Extract의 RAW 264.7세포에 대한 생존률 실험은 MTS시약을 사용하여 RAW 264.7세포를 96 well plate에 1.0×10^5 Cell/well 분주한 후 20시간 동

안 배양하였다. Brussels Sprouts Extract을 10mg/mL, 100mg/mL, 1000mg/mL 농도로 처리하고 24시간 동안 배양 후 20ul의 MTS Solution을 처리하였다. 37°C가 유지되는 5% CO₂ 인큐베이터에서 반응시킨 후 흡광도를 450nm에서 측정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

2.4 NO assay

NO의 억제 정도는 Griess시약을 사용하여 측정하였다. RAW 264.7대식세포를 5.0×10^5 /well이 되도록 분주 후 20시간 동안 배양하였다. Brussels Sprouts Extract 10mg/mL, 100mg/mL, 1000mg/mL 처리하고 1시간 후에 LPS 10ug/mL을 첨가한 후 24시간 배양하였다. 배양액과 같은 양의 Griess 시약을 처리하고 10분간 반응을 유도한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium Nitrite를 이용하여 표준화 한 후 배양액의 NO농도를 결정하였다.

2.5 Cytokine Assay(TNF- α , IL-1 β , IL-8)

RAW 264.7대식세포를 5.0×10^5 /well이 되도록 96well에 분주한 후 18시간 동안 배양하였다. 배양 후 Brussels Sprouts Extract를 10mg/mL, 100mg/mL, 1000mg/mL 농도별로 처리하고 1시간이 지난 후에 LPS 10ug/mL를 첨가하여 자극한 후 24시간 동안 배양한 후 사용하였다. 세포배양액을 얻은 다음 배양액에 함유된 TNF- α , IL-1 β , IL-8을 ELISA Kit의 실험방법에 따라 측정하였다.

2.6 통계적 분석

모든 실험은 3번 반복하였으며 실험군의 통계적 차이는 SPSS software package(Version 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였으며 students' t-test를 이용하여 계산하였다. 유의성을 검정은 $p < 0.05$ 수준에서 진행하였다.

3. 연구 결과 및 고찰

3.1 Brussels Sprouts Extract의 RAW264.7세포에 대한 생존률

Brussels Sprouts Extract의 세포에 대한 생존율을 보 기위하여 RAW 264.7 대식세포에 Brussels Sprouts

Extract 10mg/mL, 100mg/mL, 1000mg/mL 농도 의존적으로 처리하였다. 세포생존율을 볼 수 있는 MTS assay를 이용하여 측정한 결과 세포독성은 없는 것으로 사료된다(Fig. 1).

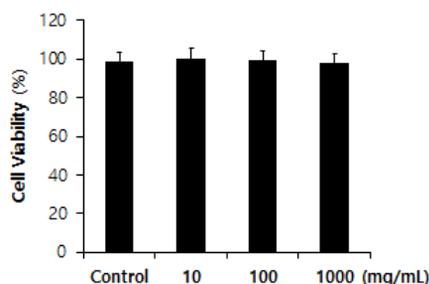


Fig. 1. Effects of brussels sprouts extract on the cell viability

3.2 Brussels Sprouts Extract의 NO 억제

NO는 무색, 무취의 기체로 인체에서도 발생되며 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생성되며 다양한 생리적 또는 병리적 역할을 하는 것으로 알려졌으며 [19]. NO의 중요한 기능은 세포독성, 혈소판 응집억제, 면역조절과 평활근의 이완을 통한 혈관의 이완 등이다. 활성 질소종인 NO, HNO₂와 같은 물질은 자극에 의한 염증반응 시 대개 세포들의 면역반응으로 인하여 NO, HNO₂가 다량 생성된다[20]. 본 실험에서 염증 자극물질로 많이 사용되는 LPS를 처리하여 RAW 264.7대식세포의 NO억제에 미치는 Brussels Sprouts Extract의 영향을 측정된 결과(Fig. 2), LPS를 처리한 군에서 NO의 농도가 현저히 증가되었으나, RAW 264.7대식세포만 배양한 군에서 NO의 농도는 매우 낮게 측정되었다. Brussels Sprouts Extract을 투여한 실험군은 농도 의존적으로 NO 억제가 관찰되었으며 특히 1000mg/mL에서 유의한 억제를 보였다.

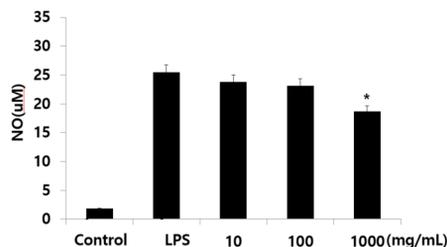


Fig. 2. Effects of brussels sprouts extract on inhibition of NO

3.3 Brussels Sprouts Extract의 TNF- α , IL-1 β , IL-8 억제

염증의 정도를 나타내는 중요한 지표인 염증성 사이토카인들을 이용하여 염증의 정도를 살펴보았다. 이에 Brussels Sprouts Extract이 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-8의 억제에 미치는 영향을 실험하기 위해 RAW 264.7대식 세포에 자극을 주는 LPS 10 μ g/mL를 첨가하고 Brussels Sprouts Extract을 10mg/mL, 100mg/mL, 1000mg/mL 농도별로 처리한 후 배지에 생성된 TNF- α , IL-1 β , IL-8의 억제 정도를 ELISA kit 메뉴얼에 따라 측정하였다. TNF- α 억제에 미치는 Brussels Sprouts Extract 영향을 조사한 결과(Fig. 3), TNF- α 억제는 Brussels Sprouts Extract 처리농도에 따라 의존적으로 억제를 보였으며 특히 1000mg/mL에서는 유의한 수준이었다. LPS에 의해 유도되는 IL-1 β 의 억제에 미치는 Brussels Sprouts Extract 영향을 조사한 결과(Fig. 4), IL-1 β 의 생성억제는 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였으나 유의한 수준은 아니었다. IL-8사이토카인의 억제에 미치는 Brussels Sprouts Extract 영향을 조사한 결과(Fig. 5), 농도 의존적으로 감소하는 경향은 보였으며 특히 1000mg/mL에서는 유의한 수준이었다. Hwang의 보고에 의하면 방울양배추의 추출용매에 따른 항산화활성 측정 시 물 추출물보다 80%에탄올 추출물에서 유효성분이 많이 추출되었으며 항산화력과 항염성도 높은 것으로 보고하였다[8]. Lee 등의 보고에 의하면 대식세포에 Brussels Sprouts의 주요성분인 sinigrin 처리시 MAPK 인산화 및 NF- κ B(nuclear factor-kappa B) 활성 억제를 통해 다양한 염증성 사이토카인의 생성이 억제됨을 보고하였다[21].

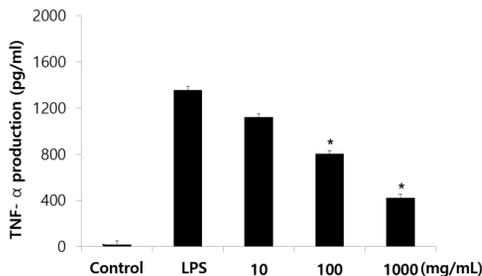


Fig. 3. Effects of brussels sprouts extract on inhibition of TNF- α

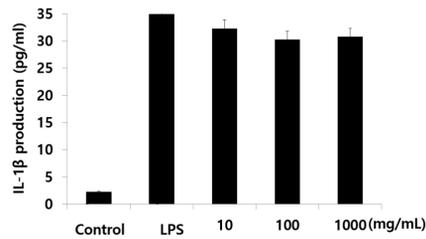


Fig. 4. Effects of brussels sprouts extract on inhibition of IL-1 β

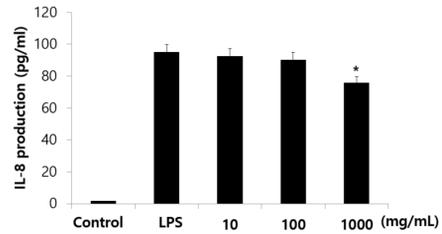


Fig. 5. Effects of brussels sprouts extract on inhibition of IL-8

4. 결론

염증 조절소재로 활용 가능성이 있는 Brussels Sprouts Extract에 대한 기초적인 생리 활성과 항염성을 측정하였다. 실험결과 실험에 사용된 Brussels Sprouts Extract은 세포생존율을 유지하며 독성을 나타내지 않았다. RAW 264.7대식세포에 자극제로 사용되는 LPS 처리 후 RAW 264.7세포에서 Brussels Sprouts Extract의 NO생성 억제에 대해 평가 결과 LPS를 처리한 대조군에서 NO의 농도는 증가되었으나, Brussels Sprouts Extract을 투여한 실험군은 처리 농도에 의존적으로 NO억제가 관찰되었으며 특히 1000mg/mL에서 유의한 억제를 보였다. 염증성 사이토카인 TNF- α 와 IL-1 β , IL-8 억제에 대한 영향을 살펴본 결과 LPS를 처리한 대조군에서 TNF- α 의 증가가 현저하게 나타났으며 Brussels Sprouts Extract을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 유의한 억제를 나타냈다. IL-1 β 억제에 미치는 영향을 조사한 결과, 처리한 Brussels Sprouts Extract의 처리농도에 따라 의존적으로 감소하는 경향은 보였으나 유의한 억제는 보이지 않았다. IL-8억제에 미치는 영향을 조사한 결과, 처리한 Brussels Sprouts Extract의 농도 의존적으로 감소하는 경향은 보였으며 1000mg/mL에서 유의한 억제를 보였

다. 이상과 같은 결과로 Brussels Sprouts Extract은 RAW 264.7대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성억제와 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-8의 분비량도 억제시켰다. 이러한 실험 결과들은 Brussels Sprouts Extract의 세포실험을 통해서 증명된 염증성 사이토카인 억제기전들이 건강기능성 식품이나 염증 예방 및 치료제로서 잠재력을 제공한다고 볼 수 있다.

REFERENCES

- [1] K. A. Steinmetz & J. D. Potter. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, 96, 1027-1039.
DOI : 10.1016/S0002-8223(96)00273-8
- [2] G. R. Fenwick & P. K. Heaney. (1983). Glucosinolates and their breakdown products in cruciferous crops, foods and feeding stuffs. *Food Chemistry*, 11, 249-271.
DOI : 10.1080/10408398209527361
- [3] G. van Poppel, D. T. Verhoeven, H. Verhagen & R. A. Goldbohm. (1999). Brassica vegetables and cancer prevention. Epidemiology and mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 472, 159-168.
DOI : 10.1007/978-1-4757-3230-6_14
- [4] T. M. Becker & J. A. Juvik. (2016). The role of glucosinolate hydrolysis products from Brassica vegetable consumption in inducing antioxidant activity and reducing cancer incidence. *Diseases*, 4, 22-31. DOI : 10.3390/diseases4020022
- [5] C. Gründemann & R. Huber. (2018). Chemoprevention with isothiocyanates - From bench to bedside. *Cancer Lett.*, 414, 26-34.
DOI : 10.1016/j.canlet.2017.10.033
- [6] W. Mun, J. G. Kim & J. W. Lee. (2014). Cabbage and vegetable. In Horticulture Crop Science. *Korea National Open University Publishing*, Seoul, Korea. p. 355.
- [7] M. H. Combs & M. Ernst. (2019). Brussels sprouts. *University of Kentucky College of Agriculture, Food and Environment*. Available from: <http://www.uky.edu/ccd/sites/>
- [8] E. S. Hwang. (2019). Effect of Cooking Methods on Bioactive Compound Contents and Antioxidant Activities of Brussels Sprouts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 48(10), 1061-1069.
DOI : 10.3746/jkfn.2019.48.10.1061
- [9] A. C. Kurilich, G. J. Tsau, A. Brown, L. Howard, B. P. Klein, E. H. Jeffery, M. Kushad, M. A. Wallig & J. A. Juvik. (1999). Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of Brassica oleracea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1576-1581.
DOI : 10.1021/jf9810158
- [10] E. Sikora, E. Cieřlik, T. Leszczyńska, A. Filipiak-Florkiewicz & P. M. Pisulewski. (2008). The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, 107, 55-59.
DOI : 10.1016/j.foodchem.2007.07.023
- [11] A. Podędek, D. Sosnowska, M. Redzyna & B. Anders. (2006). Antioxidant capacity and content of Brassica oleracea dietary antioxidants. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 49-58.
DOI : 10.1111/j.1365-2621.2006.01260.x
- [12] B. Rocca & G. A. FitzGerald (2002). Cyclooxygenases and prostaglandins shaping up the immune response. *International Immunopharmacology*, 2, 603-607.
DOI : 10.1016/s1567-5769(01)00204-1
- [13] C. Craing. (1994). Introduction to CNS Pharmacology. In Craing C. Stitzel R(eds.). *Modern Pharmacology*, 329-337.
- [14] R. MacSween & K. Whaley. (1992). Muir's Textbook of Pathology, 13th ed. London: Edward Arnold.
- [15] H. Kwqamata, H. Ochiai, N. Mantani & K. Terasawa. (2000). Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *The American Journal of Chinese Medicine*, 28, 217-226.
DOI : 10.1142/S0192415X0000026X
- [16] R. Weller (1997). Nitric oxide - a newly discovered chemical transmitter in human skin. *British Journal of Dermatology*, 137, 665-671.
- [17] M. Masaki M. Matsushita, & K. Wakitani. (1998). Inhibitory effect of JTE-522, a novel

prostaglandin H synthase-2 inhibitor, on adjuvant-induced arthritis and bone changes in rats. *Inflammation Research*, 47, 187-194.
DOI : 10.1007/s000110050316

- [18] J. H. Koh, H. Kim, J. H. Hwang & K. W. Yu. (2019). Anti-oxidative and Immunomodulating Activities of Solvent Extracts from Broccoli (*Brassica oleracea*) Sprouts. *Korean Journal of Food and Nutrition*, 32(1), 001-010.
DOI : 10.9799/ksfan.2019.32.1.001

- [19] R. SoRelle. (1998). Nobel Prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries. *Circulation*, 98, 2365-2366.

- [20] P.A.Brennan, I. P. Downie, J. D. Langdon & G. A. Zaki. (1999). Emerging role of nitric oxide in cancer. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 37, 370-373.
DOI : 10.1054/bjom.1999.0201

- [21] H. W. Lee, C. G. Lee, D. K. Rhee, S. H. Um & S. N Pyo. (2017). Sinigrin inhibits production of inflammatory mediators by suppressing NF- κ B/MAPK pathways or NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *International Immunopharmacology*, 45, 163-173.
DOI : 10.1016/j.intimp.2017.01.0

이재혁(Jae-Hyeok Lee)

[정회원]



- 1989년 2월 : 우석대학교 약학과 (약학석사)
- 2005년 2월 : 우석대학교 약학과 (약학박사)
- 2005년 2월~2018년 2월 : 남부대학교 한방 제약개발학과 교수

- 2018년 3월~현재 : 남부대학교응급구조학과 교수
- 관심분야 : 천연물
- E-Mail : jhlee@nambu.ac.kr

박정숙(Jeong-Sook Park)

[정회원]



- 1996년 2월 : 원광대학교 약학과 (약학석사)
- 2002년 2월 : 원광대학교 약학과 (약학박사)
- 2006년 3월~2014년 8월 : 남부대학교 대체의학과교수

- 2014년 9월~현재 : 남부대학교 간호학과교수
- 관심분야 : 생약학, 대체의학, 약물중독
- E-Mail : pk0207@nambu.ac.kr