

해너콩 (*Canavalia lineata* (THUNB.) DC.) 추출물의 항산화 효과 및 NO 생성 억제 효과

부희정 · 이해자¹ · 유은숙¹ · 정덕상 · 류기중² · 이선주*

제주대학교 화학과, ¹제주대학교 의과대학 약리학 교실, ²제주대학교 원예생명과학부

Antioxidant Effects and Inhibitory Effect on NO Synthesis by Extracts of *Canavalia lineata*

Hee-Jung Bu, Hye-Ja Lee¹, Eun-Sook Yoo¹, Duk Sang Jung, Key-Zung Riu², and Sunjoo Lee*

Department of Chemistry, ¹Department of pharmacology, College of Medicine,

²Division of Horticultural Life Science, Cheju National University, Ara 1 Dong Jeju, Jejudo 690-756, Korea

Abstract – Scavenging effects of DPPH radical and hydroxyl radical, inhibition of linoleic acid oxidation, inhibition of NO synthesis and iNOS expression were tested with extracts and chromatographic subfractions of *Canavalia lineata* obtained at Jeju island. Chloroform extract and its subfractions gave moderate effects on scavenging DPPH radical and hydroxyl radical. They also inhibited linoleic acid oxidation, and NO synthesis. Inhibition of NO synthesis resulted from the repression of iNOS gene expression. Ethyl acetate extract and its subfractions showed excellent effects on scavenging DPPH radical and hydroxyl radical, while they were cytotoxic.

Key words – *Canavalia lineata* (THUNB.) DC., DPPH, hydroxyl radical, linoleic acid oxidation, NO assay, iNOS

인간을 비롯한 모든 호기성 호흡을 하는 생물체들은 산소를 이용하여 생명유지에 필요한 에너지를 발생하는 과정에서 생성되는 활성산소들의 위해작용에 대한 근본적인 자기 방어기구를 가지고 있다. 조직의 방어기구에서 해소되지 못한 활성산소는 노화 등의 생리적 변화나 암, 관절염, 당뇨 등의 광범위한 생체 현상에 관여하여 직접 또는 간접적으로 생체의 장애를 일으키는 원인으로 알려져 있다.¹⁾

유해산소로 알려져 있는 활성산소는 산소 라디칼 및 이것으로부터 파생된 여러 가지 산소화합물을 통칭하는 것으로서 생체 내에서 산소는 그 화학적 성질로 인하여 환원되어 free radical인 superoxide anion radical (O_2^-)과 hydroxyl radical ($\cdot OH$) 같은 산소 라디칼로 될 수 있다. 일반적으로 활성산소종 (ROS, reactive oxygen species)이란 superoxide anion radical (O_2^-)과 hydroxyl radical ($\cdot OH$)과 같은 oxygen radical 뿐만 아니라 hydrogen peroxide (H_2O_2)와 singlet oxygen (1O_2)과 같은 몇 종류의 non-radical, 그리고 그 외에 피부에 이차적으로 생성된 것 ($ROO\cdot$, $RO\cdot$, $NO\cdot$,

$HOCl$ 등)을 말한다. 하지만 생체에는 계속해서 생기는 이러한 활성 산소종들을 제거하는 항산화 효소 (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase)와 비효소적 항산화제 (tocopherol, ascorbic acid, carotenoid, flavonoid, glutathione)들로 구성된 항산화 방어망을 통해 활성 산소종의 생성과 제거사이에서 세포 기능을 유지하고 있다.

활성 산소종이 너무 많이 생성되거나 항산화 시스템의 기능이 저하되는 상황에서 세포는 활성 산소종에 의해 유해작용을 받는데 이를 산화적 스트레스라고 한다. 결과적으로 계속된 산화적 스트레스는 생체 내에 가해져 노화나 암 등의 여러 가지 성인병의 원인이 되고 있다.²⁾ 또한 생체 내에서는 다량의 산소가 여러 활성산소의 생성기회를 제공하여 단백질, 효소, DNA 손상을 일으키고 세포의 생체막 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 과산화 지질이나 산화 분해물이 DNA나 RNA 단백질막 조직에 작용하여 질환을 유발한다고 알려져 있다.³⁾

그동안 많은 임상적 질환의 경우 산화적 스트레스에 의한 경우가 증가되었으며, 이들 질환에 항산화제를 투여 시 완화되는 결과가 계속 보고 되었다. 예를 들어, 당뇨병 환자

*교신저자(E-mail) : sunjoo@cheju.ac.kr
(FAX) : 064-756-3561

의 경우 산화적 스트레스가 정상인 보다 증가되어 있으며 항산화제를 투여 시 당뇨병 및 그 합병증이 경감되는 결과를 보였다.⁴⁾ 항산화 물질은 지방 및 지방을 함유한 식품의 산화를 억제해 줄 뿐만 아니라 생체 내에서 생성되는 활성 산소 및 활성산소에 의해 유도되는 지질 과산화 반응을 억제하는 생리활성 물질으로써 크게 각광을 받고 있다.^{5,6)} 또한 암 화학 예방 (chemoprevention)을 위한 물질의 항산화 효과에 대한 실험들이 방대하게 이루어지고 있다.⁷⁾

대기오염물질이며^{8,9)} 담배연기에 포함된 수많은 화학물질 중의 하나인¹⁰⁾ nitric oxide (NO)는 독성을 가진 매우 불안정한 기체이며 고농도에서는 세포의 기질적 손상을 초래하는 free radical 의 하나이다. Nitric oxide synthase (NOS)는 물리화학적 성질에 따라 Type I, II, III 등 3종류의 동종 효소로 분류된다. 즉, Type I (neuronal NOS, nNOS)과 Type III (endothelial NOS, eNOS)는 세포 속에 계속적으로 존재하기 때문에 지속적 NOS (constitutive NOS)로 분류되며, 상대적으로 일부 세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 Type II인 inducible NOS (iNOS)이 있다.¹¹⁾ 이러한 NOS에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되면서 NO가 형성된다.¹²⁾

자극에 의해 유도된 iNOS인 경우 오랜 기간동안 다량의 NO를 생성하게 되고, 생성된 NO는 guanylyl cyclase의 활성화와 동시에 주위 조직에 세포독성을 나타내는 것이 특징이다. NO는 매우 작으면서도 반응성이 있고 전기적으로 중성이기 때문에 합성된 곳에서 곧바로 확산되어 사망으로 퍼져 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.^{13,14)} 현재 NO에 대한 많은 연구 보고서들에 의해 생체에서 여러 가지 생리생화학적 현상의 messenger molecule로서 mediator, neurotransmitter 또는 regulator 등으로 다양하게 작용함이 밝혀지고 있다.¹⁵⁾ 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 정상세포의 손상을 초래하여 염증을 유발시키며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다.¹⁶⁻¹⁸⁾

해녀콩 (*Canavalia lineata*)은 6~8월에 개화하며, 10월에 결실하는 덩굴성 다년초로 바닷가에 드물게 자란다. 줄기는 길고, 탁엽은 난형이며, 꽃은 연한 홍자색이고, 화축은 길며, 마디는 통통하고 포엽은 난형이다. 열매는 협과이며 털이 있고, 긴 타원형으로 길이는 5~6 cm이다. 중국, 일본, 타이완 류큐에 분포되어 있으며 국내에서는 제주도에서 자라는 식물이다. 주로 가축사료로 사용되지만 독성이 있어 과거에는 민간에서 콩을 삶아 낙태용으로 사용되었다.¹⁹⁾

해녀콩에 대해서는 그동안 생리활성에 대한 연구보다는 자엽에 함유되어 있는 canavalin의 분해효소 혹은 특성들에

대한 연구들이 주로 되어져 왔다.²⁰⁾ 따라서 해녀콩의 종자에 들어있는 생리활성성분 연구 자료는 아직 전무한 관계로 본 연구에서는 해녀콩의 항산화 효과와, LPS (Lipopolysaccharide)로 자극을 준 세포에서 생성되는 NO의 생성 억제 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

시료추출 및 분리 - 제주도에 자생하고 있는 해녀콩 종자를 2003년 10월 중순경 채집하여 잘게 파쇄하여 메탄올로 3회 교반 추출 후 감압 농축하였다. 농축한 메탄올 추출물을 물에 현탁 시킨 후 비극성 용매부터 순차적으로 hexane, chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH), water (H₂O)을 사용하여 용매 분획 하였다. 여기서 얻은 각각의 분획물들은 일차적으로 항산화와 NO 생성 억제 효과를 측정하였으며, 그 중 CHCl₃, EtOAc 분획층에서 우수한 NO 생성 억제 효과와 항산화 효과를 보여 2차 분리를 하였다. CHCl₃ 추출물은 2.3916 g을 이동상 CHCl₃/MeOH (8:2) 비율로 하여 silica column chromatography로 1차 분리한 후 다시 fr.2~4을 CHCl₃/MeOH/H₂O (8:3:0.4)의 이동상으로 A~F까지 6개의 fractions으로 분리하였다. EtOAc 추출물에 대해 CHCl₃/MeOH/H₂O (8:3:0.4)의 이동상으로 A~E까지 5개의 fractions을 얻었다.

세포 및 시약 - Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 KCLB (Korean Cell Line Bank)로부터 분양받아 100 units/ml penicillin-streptomycin, 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다. Lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* serotype 0111:B4)와 시료의 항산화 효과를 측정하기 위하여 사용된 1,1-Diphenyl-2-picrihydrazyl (DPPH), 2-deoxyribose, trichloroacetic acid (TCA), thiobarbituric acid (TBA)와 linoleic acid는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그리고 Inetrferon- γ (iNFN- γ , recombinant *E. coli*)는 Roche (Swiss)에서 구입하였다.

DPPH radical 소거 활성에 의한 항산화 검색 - 시료의 항산화 활성 검색은 DPPH법을 이용하여 radical 소거효과를 측정하는 Blois법²¹⁾을 이용하였다. DPPH 시약을 EtOH에 녹여 0.1 mM 농도가 되게 제조하여 DPPH용액 450 μ l에 여러 농도의 시료용액 50 μ l를 넣어 잘 섞은 후 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 반응시킨 시료는 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 517 nm의 파장에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 DPPH 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (IC₅₀)로 표시하였다. Free radical 소거 활성 정도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Free radical scavenging activity(\%)} = [A - (B - C)]/A \times 100$$

A는 시료가 포함되지 않은 control의 흡광도이고, B는 DPPH와 시료 용액의 혼합액이며 C는 에탄올과 시료의 혼합액이다.

Hydroxyl radical 소거활성에 의한 항산화 검색 - Hydroxyl radical 소거능은 Chung 등^{22,23)}의 방법을 이용하여 hydroxyl radical에 의해 deoxyribose의 분해산물인 TBARS의 양을 측정하였다. Hydroxyl radical은 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 존재하에 Fenton 반응으로 생성시켰다. 반응용액은 10 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 용액, 10 mM EDTA 용액, 10 mM 2-deoxyribose 용액 각각 200 μl 와 시료용액 200 μl , 0.1 mM H_2O_2 200 μl 를 넣어 37°C에서 4시간 동안 반응을 진행시키고 나서 반응용액에 2.8% trichloroacetic acid 1 ml를 넣고 반응을 시킨 후 1% thiobarbituric acid 1 ml를 첨가하였다. Hydroxyl radical 소거능은

$$[1 - \text{시료 흡광도/대조군 흡광도}] \times 100$$

값에 의해 deoxyribose 분해 저해도를 계산하였다.

Linoleic acid 산화 저해능 - 예상되는 항산화 활성을 측정하기 위하여 linoleic acid의 자동산화를 저해하는 정도를 Esaki 등²⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다. 반응용액으로는 시료 추출물 1 ml, linoleic acid 0.13 ml, 99.8% EtOH 용액 10 ml, 0.2 M phosphate buffer 용액 (pH 7.0) 10 ml를 혼합한 뒤 증류수로 25 ml가 되도록 정량하여 사용하였으며, 4°C에서 8일간 incubation시켜 제조하였다. 제조한 반응용액 0.2 ml를 취하여 75% EtOH용액 10 ml, 30% ammonium thiocyanate 용액 0.2 ml를 가하고 3분 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성은 linoleic acid peroxidation에 대한 저해율로 나타내었고, 저해도 계산식은 다음과 같다.

$$100 - (\text{시료 흡광도/대조군 흡광도}) \times 100$$

Nitric oxide(NO) assay - RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 생성된 NO의 양은 Griess reagent로 측정하였다.²⁵⁾ 세포수를 1.5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24-well plate에 넣고 18시간 전배양 하였다. 이 후 배지를 제거하고, 시료농도 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 과 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 를 동시에 처리하여 24시간 배양 하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μl 와 Griess시약[1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) N-(1-naphthyl) ethylenediamine, 2.5% (v/v) phosphoric acid]100 μl 를 혼합하여 96-well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, sodium nitrite (NaNO_2)를 standard로 비교하였다.

Western blot analysis (Immunoblotting) - RAW 264.7

세포 (1×10^6 cells/ml)를 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO_2 항온기에서 18시간 전배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도 (1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)로 조제된 시험물질과 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)와 INF- γ (50 U/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건하에서 24시간 배양하였다. 세포를 2~3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척 후 1 ml의 lysis buffer를 첨가, 30분~1시간동안 lysis시킨 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 20~30 μg 의 lysate를 8% SDS-PAGE (Poly Acrylamid Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여 이를 PVDG membrane (BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 overnight 실시하였다. iNOS의 발현 양을 검토히기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS (1 : 1000) (Santa-Cruz)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse (Amersham)를 1 : 5000으로 희석하여 상온에서 40분간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham)과 1분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.²⁶⁾

실험결과 및 고찰

DPPH radical 소거 활성에 의한 항산화 효과 - 본 실험에 사용된 DPPH는 안정된 형태로 존재하는 라디칼 화합물로서, 시료에 의하여 라디칼이 제거되면 UV/Vis 분광광도계에서 517 nm의 흡수파장이 사라지게 된다. 생체 내 산화물질로 작용하는 활성산소종은 대표적 라디칼 물질로서, 라디칼 소거 활성물질은 항산화제로 인식되고 있다.

해녀콩의 free radical 소거력을 측정하기 위하여 MeOH로 추출하여 농축 후 Hexane층, CHCl_3 층, EtOAc층, BuOH층, 그리고 residue층으로 분획하여 각각의 층별로 DPPH용액을 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 각각의 분획층 시료들은 5개의 농도로 준비하여 DPPH 흡광도를 50% 감소시키는 농도를 측정하였고 IC_{50} 으로 표현하였다. 각 분획별 DPPH radical 소거력을 측정한 결과 EtOAc층 (IC_{50} : 1.75 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)과 BuOH층 (IC_{50} : 2.22 $\mu\text{g}/\text{m}^2$), 그리고 CHCl_3 층 (IC_{50} : 15.39 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)에서 대조군인 ascorbic acid (IC_{50} : 3.37 $\mu\text{g}/\text{m}^2$), BHA (IC_{50} : 10.36 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)보다 강하거나 비슷한 효과를 보였다.

Column을 통해 분리한 6개의 CHCl_3 fractions과 5개의 EtOAc fractions에서도 DPPH radical 소거 활성을 IC_{50} 값으로 구하였다. CHCl_3 층의 fraction에서는 E (IC_{50} : 16.60 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)와 F (IC_{50} : 14.04 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)가 비교적 대조군으로 쓰인 BHA

(IC₅₀:10.36 µg/ml)와 비슷한 효과를 보였다. EtOAc fraction에서는 대체로 높은 항산화 활성을 보였으며, 특히 B (IC₅₀: 2.53 µg/ml)와 C (IC₅₀:3.74 µg/ml)에서는 대조군인 ascorbic acid (IC₅₀:3.37 µg/ml)보다 높거나 유사한 효과를 확인할 수 있었다(Table I).

Hydroxyl radical 소거 활성에 의한 항산화 효과 - Hydroxyl 라디칼은 활성산소 중에서도 강력한 것으로서, hydroxyl 라디칼을 소거하는 효과는 항산화제로서 그 의의가 크다고 할 수 있다. 따라서 해녀콩 추출물로부터 분리한 분획물들의 hydroxyl 라디칼에 대한 포착효과 측정을 위하여 Fenton-type 반응으로 hydroxyl 라디칼을 생성시키고, 생성된 hydroxyl 라디칼에 의해 핵산의 구성당인 deoxyribose가 분해하는 정도를 TBA 발색법을 이용해 측정하였다. 해녀콩의 1차 용매분획별 소거능을 측정한 결과 EtOAc>BuOH>CHCl₃>residue>Hexane층 순으로 소거능력이 높았고, EtOAc층 (56.46%)은 대조군인 BHA (48.35%)보다 강한 소거력을 보였다. Hydroxyl 라디칼 소거능이 가장 우수한 EtOAc층에서 분리한 fractions과 CHCl₃층에서 분리한 fractions에서도 hydroxyl 라디칼 소거능을 시료농도 50 µg/ml에서 비교 분석 하였다. CHCl₃층에서 얻은 fractions 중에는 F (67.07%)가 가장 강한 효과를 보였으며 이는 대조군인 BHA (57.37%)보다 조금 높은 효과임을 확인 할 수 있었다. 그 다음으로

는 D (62.67%)와 E (56.27%)이 비교적 강한 효과를 보였다. EtOAc층에서 분리한 5개의 fractions은 A를 제외한 나머지 fractions의 hydroxyl 라디칼 소거능이 대조군인 BHA와 비교 시 높은 효과를 보였다. Fraction C (78.52%)가 가장 높은 효과를 보였고, B (78.29%), D (74.63%), E (71.22%) 순으로 강한 활성을 확인할 수 있었다(Table II). 따라서 hydroxyl radical 소거에 의한 항산화 효과를 보이는 물질은 CHCl₃층보다는 EtOAc에서 분리한 fraction에서 강한 효과를 찾을 수가 있었다.

Linoleic acid 산화 저해능 - 해녀콩 추출물이 지방질의 자동산화를 지연시키거나 억제하는 정도를 측정하기 위하여 linoleic acid를 이용하여 ferric thiocyanate로 과산화물 생성 저해율을 측정하였다. Linoleic acid 산화 저해능에 대한 결과는 Table III에 나타내었다. CHCl₃층에서 분리한 fractions 중에서는 F (52.40%)와 D (50.68%)의 활성이 대조군인 BHA (51.26%)와 비슷한 수준을 보였고, EtOAc층에서는 전반적으로 활성이 비슷하게 나왔으며, 대조군에 비해 우수한 효과는 보이지 않아 일반적인 라디칼 소거 효과와는 차별되는 결과를 얻을 수 있었다.

Nitric oxide 생성억제 활성 효과 - 활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide (NO) 생성에 대한 해녀콩 추출물의 효과를 알

Table I. The free radical scavenging effects of several subfractions of *Canavalia lineata*.

Fractions	IC ₅₀ (µg/ml)	Subfractions of CHCl ₃	IC ₅₀ (µg/ml)	Subfractions of EtOAc	IC ₅₀ (µg/ml)
Ascorbic acid	3.37	A	>100	A	31.17
BHA	10.36	B	>100	B	2.53
MeOH	15.58	C	>100	C	3.73
Hexane	>100	D	>100	D	11.14
CHCl ₃	15.39	E	16.60	E	11.48
EtOAc	1.75	F	14.04		
BuOH	2.22				
Residue	45.53				

Table II. The hydroxyl radical scavenging effects subfractions of *Canavalia lineata*.

fractions	Scavenging effect (%)	Sub fractions of CHCl ₃	Scavenging effect (%)	Sub fractions of EtOAc	Scavenging effect (%)
BHA	57.37	A	30.20	A	59.29
MeOH	21.50	B	33.16	B	78.29
Hexane	3.17	C	44.54	C	78.52
CHCl ₃	25.43	D	62.67	D	74.63
EtOAc	56.46	E	56.27	E	71.22
BuOH	44.45	F	67.07		
Residue	21.86				

The tested concentration was 50 µg/ml.

Table III. The linoleic acid peroxidation inhibition effects of several subfractions of CHCl₃ fraction and EtOAc fraction of *Canavalia lineata*.

Sub fractions of CHCl ₃	Inhibitory effect (%)	Sub fractions of EtOAc	Inhibitory effect (%)
A	25	A	33.14
B	0.42	B	24.48
C	0.88	C	29.46
D	50.68	D	17.58
E	33.14	E	17.10
F	52.40		

The tested concentration was 10 µg/ml.

Table IV. The scavenging effects of several subfraction of *Canavalia lineata* on the nitric oxide production in RAW 264.7 cell

Fractions	Scavenging effect (%)	First subfractions of CHCl ₃	Scavenging effect (%)
MeOH	38.07	fr. 1	49.30
Hexane	5.27	fr. 2	36.34
CHCl ₃	70.11	fr. 3	76.91
EtOAc	74.52*	fr. 4	74.26
BuOH	34.02		
Residue	4.86		

The production of NO was assayed from culture supernatants of RAW264.7 cells stimulated by LPS (1 µg/ml) in the presence of test sample (100 µg/ml).

* : This fraction showed cytotoxicity.

아보기 위하여 RAW264.7 세포에 LPS (1 µg/ml)를 처리하여 NO를 과량 발현 시키고, 해녀콩의 용매 분획물을 처리하였다. 생성 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. NO

억제율은 EtOAc층이 74.52%로 가장 높은 저해율을 보였으나 세포 독성을 보였고, CHCl₃층은 세포 독성이 나타나지 않으면서도 70.11%의 강한 저해율을 나타내었다(Table IV).

가장 NO 생성 억제율이 높은 CHCl₃층과 EtOAc층에서 분리해낸 각각의 fractions도 같은 방법으로 실험하였다. 우선 CHCl₃층을 1차적으로 분리한 fractions에서는 fr.3 (76.91%) 과 fr.4 (74.26%)에서 높은 효과를 보였고(Table IV), fraction 2, 3, 4층을 다시 2차 분리하여 얻은 6개의 fractions과 세포 독성이 있으나 강한 효과를 보인 EtOAc 층에서 분리한 5개의 fractions에서도 NO 억제 효과를 측정하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군에서 59.19 µM로 NO가 과량 생성되었으며, CHCl₃층의 F, B, C fractions에서는 각각 5.29 µM, 7.66 µM, 9.69 µM으로 NO의 생성량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 EtOAc 층에서 분리한 fractions 중에서는 B가 6.81 µM로 NO의 생성량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(Table V).

iNOS 발현에 미치는 영향 - RAW 264.7 세포에 LPS (1 µg/ml)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 해녀콩 분획물 중에서 세포독성이 없으면서 좋은 효과를 보인 CHCl₃층의 1차 fractions의 iNOS protein level에 미치는 억제 효과를 LPS (1 µg/ml) 및 INF-γ (50 U/ml)를 사용하여 단백질양에 대한 억제정도를 western blotting을 통해 알아보았다. 각각의 분획물을 처리한 결과 단백질 수준에서도 fr.3이 LPS 및 INF-γ 단독 처리군에 비해 강한 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2).

결론

활성산소는 체내에서 유해한 작용을 하여 각종 질병과 노화를 일으키는 주범일 뿐만 아니라 산패와 독성물질 생성

Table V. The scavenging effect of several subfractions of CHCl₃ fraction and EtOAc fraction of *Canavalia lineata* on the production of nitric oxid (NO) in RAW264.7 cells.

subfractions of CHCl ₃	NO production (µM)	Scavenging effect (%)	sub fractions of EtOAc	NO production (µM)	Scavenging effect (%)
Midium	2.92				
LPS (µg/ml)	59.19				
A	64.72	64.72	A	33.93	42.67
B	87.06	87.06	B	6.81	88.49*
C	83.62	83.62	C	22.92	61.28*
D	11.45	11.45	D	21.73	63.29
E	61.57	61.57	E	20.71	65.01*
F	91.07	91.07			

The production of NO was assayed from culture supernatants of RAW 264.7 cells stimulated by LPS (1 µg/ml) in the presence of test sample (100 µg/ml).

* : This fraction showed cytotoxicity.

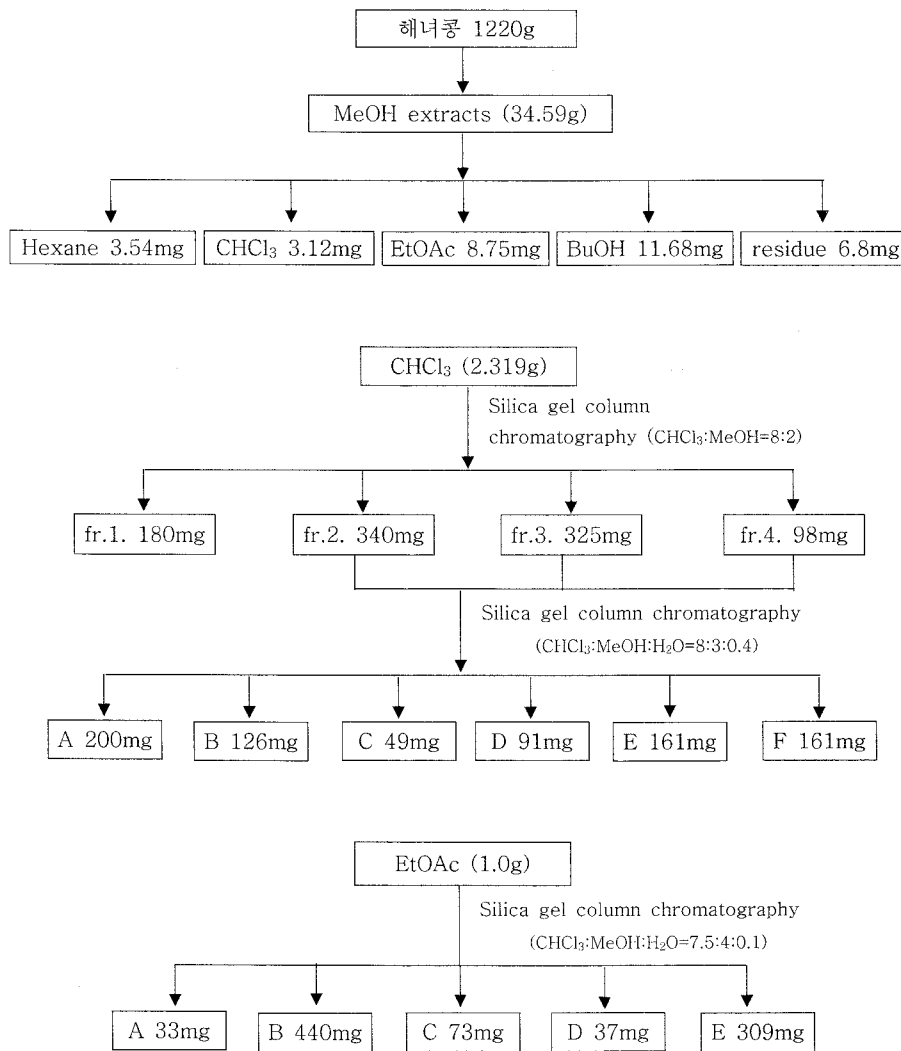


Fig. 1. Isolation of *Canavalia lineata*.

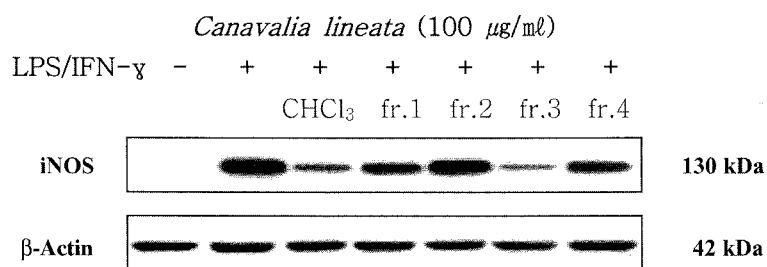


Fig. 2. The inhibition effect of several subfractions of CHCl₃ extract of *Canavalia lineata* on the level of iNOS in RAW264.7 cells. RAW264.7 (1×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated by LPS (1 µg/ml) with IFN-γ (50 U/ml) in the presence of *Canavalia lineata* (100 µg/ml) for 24 hr. iNOS protein was determined using immunoblotting method from the 24 hr cultures.

등 유해한 작용을 일으킨다. 따라서 활성산소의 생성을 억제하고 생성된 활성산소는 제거하기 위하여 인체에 무해한 항산화제에 대한 연구가 천연물을 이용하여 다양하게 시행되고 있다. 식품에서도 활성산소종에 의한 지질의 과산화

막기 위해 항산화제를 오래 전부터 이용해 왔는데 페놀계 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT)이나 butylated hydroxyanisole (BHA)를 이용하였다. 그러나 이들 제제의 경우 과량 섭취시 급성 독성과 만성 독성을 보인다

는 것이 알려짐에 따라²⁷⁾ 점점 천연 항산화제에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 제주도에서 자생하는 콩과 식물인 해녀콩을 채집하여 항산화 효능 실험을 하여 천연항산화제로서의 이용 가능성을 알아보았다. DPPH 라디칼 소거 효과와 hydroxyl 라디칼 소거능, linoleic acid 산화 저해능 그리고 NO 생성 억제 효과를 통해 해녀콩 추출물의 우수한 항산화 효과를 확인하였고, 해녀콩의 CHCl₃층 세부 분획에서 iNOS 발현 억제를 확인함으로써 해녀콩 추출물이 높은 항산화 효능을 보이고 있음을 확인할 수 있었다.

현재 국내에는 천연물에 대한 항산화 활성에 대한 연구가 활발히 진행되어지고 있어 제주지역과 같은 청정지역에서 자생하는 천연물의 항산화 효능에 대한 연구는 그 효용 가치가 높다고 여겨진다. 따라서 본 연구실에서는 항산화 효능과 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 NO 생성 억제 효과를 갖는 CHCl₃층에서 분리한 세부 분획으로부터 단일 물질에 대한 분리 작업과 함께 항염과 관련된 더 많은 활성 검색을 진행 중에 있다.

사 사

본 연구는 2003년 산업자원부 지역산업기술개발사업과 제주대학교 아열대원예산업연구센터(RRC)의 2004년 아열대 식물 유전자 연구의 학술연구사업의 일부를 지원 받아 수행하였으며, 2004년 과기부 과학재단지정 특수연구소재은행 아열대/열대 생물유전자은행에서 해녀콩 소재를 지원 받아 수행되었다. 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Halliwell, B. (1991) Drug antioxidant effects. *Drugs*. **42**: 596-605.
- Pyored, W. A. (1984) Free radicals in biology. *Academic Press*. VI 371.
- 김삼인 (1996) 농수산물에서 항산화활성 물질의 탐색. 단국대학교 석사학위논문.
- Ludvigsson, J. (1993) Intervention at diagnosis of type I diabetes using either antioxidants or photopheresis. *Diabetes Metab Rev*. **9**(4): 329-336.
- Fukuzawa, K. and Takaishi, Y. (1990) Antioxidants. *J. Act. Oxy. Free Rad.* **1**: 55-61.
- Frei, B. (1994) Novezymatic antioxidant defense systems. In Natural antioxidants in human health and disease, Briviba, K. and Sies, H.(eds), *Academic Press*, London, pp. 107-120.
- Beecher, C. (1995) Potential chemopreventive compounds in the diet. In chemoprevention of cancer Nixon, D. W. Ed., *CRC Press*, Florida, pp. 21-62.
- Goldsmith, J. R., Griffith, H. L., Detels, R., Beeser, S., and Neumann, L. (1983) Emergency room admissions, meteorologic variables, and air pollutants: a path analysis. *Am J Epidemiol (UNITED STATES)* **118**(5): 759-778
- Spicer, C. W. (1982) The distribution of oxidized nitrogen in urban air. *Sci Total Environ (NETHERLANDS)* **24**(2): 183-192.
- Hugod, C. (1981) Myocardial morphology in rabbits exposed to various gas-phase constituents of tobacco smoke-anultrastructural study. *Atherosclerosis (NETHERLANDS)* **40**(2): 181-190.
- Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051.
- Knowles, R. G. and Mocada, S. (1992) Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS*. **17**: 399.
- Scott, M. G. and Hancock, R. E. (2000) Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* **20**.
- Lee, H. J., Jeong, Y. S., Ryu, S. Y., and Ryu, J. H. (1998) Inhibition of nitric oxide synthesis by 8-epi-xanthatin in activated RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* **42**: 5.
- Kuo, P. C. and Schroeder, R. A. (1995) The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg* **221**(3): 220-235.
- Stuehr, H. H. J., Kwon, N. S., Weise, M., and Nathan, C. (1991) Purification of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD-and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Sci. USA.* **88**: 7771.
- McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Xie, Q. W. Nathan, C. F., and Wahl, S. M. (1993) Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**: 749.
- Weisz, A., Cicatiello, I., and Esumi, H. (1996) Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* **316**: 209.
- 이영노, 이경세, 신용만(2001) 濟州自生植物圖鑑, 여미지, 23.
- 권영명, 고석찬, 황인두(1995) Some Properties and Fate of Canavalin in the Cotyledons of Canavalia lineata, *한국생화학회지*, **28**(4): 578-584.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**: 1199.
- Chung, S. Y. (1997) Antioxidant nutrients and related biological activities of green yellow vegetable juice. Ph. D. thesis, Yonsei University.
- Chung, S. K., Osawa, T., and Kawakishi, S. (1997) Hydroxyl radical scavenging effect of spices and scavengers from brown mustard. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 118.
- Esaki, H. Onozaki, H., Kawakishi, S., and Osawa, T. (1996) New antioxidant isolated from Tempeh. *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 696.
- Ryu, J. H., Ahn, H., Kim, J. Y., and Kim, Y. K. (2003) Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in

- LPS-activated macrophage. *Phytother Res.* **17**: 485-489.
26. Hong, H., Hur, S. K., Oh, O. J., Kim, S. S., Nam, K. A., and Lee, S. K. (2002) Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide (iNOS) in cultured mouse macrophage cells., *J Thnopharmacol.* **83**: 153-159.
27. Branen, A. L. (1975) Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **52**: 59-64.

(2004년 11월 12일 접수)