

## 녹두 및 대두추출물의 항암 및 항염증 활성

임지영\* · 김석중<sup>1</sup>

국민대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>동덕여자대학교 식품영양학과

### Anti-cancer and Anti-inflammatory Effects of Mung Bean and Soybean Extracts

Jee-Young Imm\* and Seok Joong Kim<sup>1</sup>

Department of Foods and Nutrition, Kookmin University

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Dongduk Women's University

**Abstract** The quinone reductase (QR) inducing activities of mung bean and soybean solvent extracts were compared using murine hepatoma cells (Hepa 1c1c7). The mung bean extracts (ethylacetate and ethanol) showed higher chemoprevention index values (7.88-8.22) than those of soybean extracts (2.9-5.2) from four different cultivars. The mung bean extracts also had significantly higher inhibitory effects (47-62% at 100 µg/mL) than the soybean extracts (15-42% at 100 µg/mL) against the production of nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> in lipopolysaccharide stimulated macrophage RAW264.7 cells without cytotoxicity. Among seven recovered fractions of mung bean ethanol extract obtained by C 18 silica flash column chromatography, the most non-polar fraction exhibited the highest chemoprevention index of 10.4.

**Key words:** mung bean extract, quinone reductase, nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub>, cytotoxicity

## 서 론

우리가 섭취하는 식품에 포함된 화학적 성분(주로 phytochemicals)이 암 발생의 위험성을 유의적으로 감소시킬 수 있음이 알려져 따라(1) 식품의 항암 효과에 대한 관심이 지속적으로 높아지고 있다. 비록 한 가지의 기작이 독성이 낮은 천연물이나 합성물질에 의하여 나타나는 다양한 화학적 암예방(chemoprevention) 효과를 설명하기는 충분치 않으나 2상효소계(phase II enzyme)의 유도에 의한 암예방은 중요한 역할을 담당한다(2). Quinone reductase[QR; NAD(P)H oxidoreductase(EC11.6.99.2)]는 quinone을 hydroquinone으로 전환시키는 중요한 2상효소계의 하나로 glutathione S-transferase(GST)와 함께 cytochrome P-450의 작용에 의하여 유발되는 발암물질의 비활성화 및 배설에 기여한다(3). 지금까지 알려진 많은 항암물질들이 2상효소계의 활성화와 밀접한 관련이 있음이 입증되면서(4) 2상효소계의 활성변화를 이용하여 항암 활성 성분의 신속한 탐색이 이루어지고 있으며 브로컬리, 포도, 파, 마늘류로부터 각각 분리된 sulforaphane, resveratrol, organosulfides 등은 대표적인 2상효소계 유도물질 들이다(5-7).

만성 염증과 암 또는 다른 질병과의 상관 관계가 보고되면서 식이 섭취 변화(dietary intervention)를 이용하여 염증 반응을 감소시킴으로써 질병의 위험을 줄이려는 노력이 진행되고 있다(8). 염증 억제는 주로 염증 반응의 전사인자인 nuclear factor-κB(NF-

κB)의 활성화를 억제하여 nitric oxide(NO)나 cyclooxygenase-2(COX-2)가 생성하는 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 등과 같은 염증관련 인자들의 생성을 감소시키는 기작으로 알려져 있다(9). 또한, 최근의 보고에 의하면 2상효소의 활성을 유도하는 항산화반응요소(antioxidant response element, ARE)와 NK-κB의 상호 대화(cross talk)의 연관성이 제시되고 있다(10).

콩을 비롯한 두류는 훌륭한 단백질 급원으로서 특히 대두의 경우 된장, 간장, 청국장 등의 전통장류의 원료로 사용된다. 반면 지방 함량이 낮고 전분 함량이 높은 녹두는 주로 쌀과 함께 부식소재로 쓰이거나 숙주나물과 빈대떡의 원료로 사용되고 있다. 콩의 섭취에 의한 암 예방 효과는 국내외로 비교적 활발한 연구가 진행된 바 있다. Kennedy(11)는 동물실험 결과를 토대로 대두에 존재하는 단백질 분해효소 억제 물질(Bowman-Birk inhibitor), phytic acid(inositol hexaphosphate), β-sitosterol, saponins 및 isoflavones이 암발생을 억제하는 효과를 가지고 있다고 보고하였다. 국내에서 수행된 동물 실험 결과에 따르면 콩의 메탄올 추출물이 신장과 소장에서 QR의 활성을 유의적으로 증가시키고 benzo(a)pyrene으로 유발시킨 위와 폐암의 발생을 감소시켰다(12). 현재까지 대두의 암 예방 기작은 명확히 설명되고 있지는 못하다. 임상실험 결과를 유추하여 볼 때 식품에 포함 된 isoflavones이나 flavone의 함량이 암 발생율과 관계가 있는 것으로 판단되며 유사호르몬 효과(phytoestrogenic effect), 세포주기 억제(cell cycle arrest)와 세포사멸(apoptosis)유도, 산화억제, 2상효소계의 활성증가 및 생체 면역계의 조절효과 등이 다양하게 관여하는 것으로 추정된다(13). 최근 isoflavone이 염증과 관련된 생체 지표에 미치는 영향을 분석한 결과에 따르면 genistein은 lipopolysaccharide(LPS)에 의하여 유도된 염증매개 cytokine을 유의적으로 감소시켰으나 daidzein에서는 유사한 결과가 관찰되지 않았다고 보고된 바 있다(14).

\*Corresponding author: Jee-Young Imm, Department of Foods and Nutrition, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea  
Tel: 82-2-910-4772  
Fax:82-2-910-5249  
E-mail: jyimm@kookmin.ac.kr  
Received September 2, 2010; revised October 11, 2010;  
accepted October 18, 2010

한편 녹두의 생리활성에 관한 연구는 매우 제한적으로서 국내에서는 녹두의 이소플라본 함량과 항산화 및 혈전용해 활성이 조사되었으며(15,16) 녹두 나물 생즙이 카드뮴에 의한 흰 쥐 간 손상의 회복에 미치는 영향이 보고된 바 있다(17). 두류 에탄올 추출물(70%)의 항산화 활성, 항변이성 및 변이원성에 대한 비교 연구에서는 변이원 mitomycin C에 대하여 유의적인 항변이성을 나타냈으며 지시세포의 성장을 촉진하는 효과가 나타났다(18). 해외에는 녹두의 에탄올 추출물이 백내장, 동맥경화, Alzheimer's disease의 질환과 관련이 있는 진행성 당화 종말생성물(advanced glycation end products)의 생성을 억제하는 효과가 있음이 보고되었다(19). 대체 의학에 따르면 녹두의 삶은 즙을 마시면 열을 내리고 혈압을 낮추는데 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있으며 여드름이나 피부질환에도 효과가 있어서 한방화장품의 소재로도 활용되고 있다. 본 연구에서는 항암 및 항염증 소재로서 녹두의 활용가능성을 탐색하기 위하여 녹두추출물의 항암 및 항염증 활성을 몇 가지 대두 품종들과 비교분석 하였다.

## 재료 및 방법

### 시료

시료는 USDA soybean germplasm collection의 도움을 받아 대두 4종(*Glycine max*)을 얻었으며 녹두(*Vigna radiatae* L.)는 시판되는 것(Madison, WI, USA)을 별도로 구입하여 사용하였다. 연구에 사용한 시료의 특징은 Table 1과 같다.

### 용매추출물의 제조

마쇄된 시료 100 g을 cellulose thimble(Whatman, Maidstone, England)에 넣고 환류냉각추출 장치에 거치한 후 1000 mL의 hexane, ethylacetate, absolute ethanol, 증류수를 이용하여 순차적으로 용매추출을 실시하였다. 각 용매의 추출은 4시간 동안 지속하였으며 추출 후 시료로부터 남아있는 용매를 휘발시켜 제거한 후 thimble에 다시 시료를 충전 하여 다음 용매의 추출을 실시하였다. 증류수를 이용한 열수추출은 95°C에서 1시간 동안 실시하였으며 추출 후 1,764×g에서 10분간 원심분리하고 Whatman No. 1 filter paper로 진공 여과하여 추출물을 준비하였다. Ethylacetate와 ethanol 추출물은 감압회전농축기로 농축 후 동결 건조하여 분말시료를 제조하였다.

### Quinone reductase (QR) 유도활성

시료의 QR 유도 활성은 Prochaska 등(3)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. Murine hepatoma 1c1c7 세포(ATCC, Rockville, MD, USA)를 10% fetal bovine serum(FBS)와 항생제를 함유하는  $\alpha$ -MEM 배지( $\alpha$ -minimal essential medium; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였다. 세포를 세포배양 96 well plate에  $2.5 \times 10^4$ /well의 농도로 분주하고 48시간 동안 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 배양한 후 동결건조 된 시료를 다양한 농도 범위로 조정하여 첨가한 후 24시간 더 배양하였다. 시료가 배지에 충분히 용해되

지 않는 경우 0.1% hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin을 첨가하여 시료가 용해되도록 하였다. QR 유도 후에는 배지를 제거한 후 digitonin/EDTA 용액을 첨가하여 세포를 용해시켰으며 Prochaska and Santamaria(20)의 표준 기질 카테일 용액을 이용하여 QR 유도 활성을 측정하였다. QR 유도활성은 microtiter plate scanner (Spectramax plus Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 10분간 측정하였다. 모든 실험에서는 동일한 처리조건의 duplicate plate를 준비하여 직선적 증가구간에서 단백질 함량을 측정하여 계산하였다. 이때 단백질 함량은 동일한 세트의 well plate에 대한 crystal violet 염색방법으로 정량하였다. QR specific activity를 2배로 증가시키는데 필요한 시료의 농도를 CD value로 정의하였으며 QR활성의 농도-반응곡선으로부터 CD value를 계산하였다.

### 세포생존성(cell viability)

세포배양액을 제거한 후 Prochaska 등(3)이 제시한 방법으로 crystal violet 염색 및 세척을 실시하고 결합한 염색액을 SDS를 함유한 에탄올용액(50%, v/v)으로 추출하여 한 시간 배양 후 610 nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포단백질의 농도를 50% 감소시키는데 필요한 물질의 농도를 산출(IC<sub>50</sub>)하여 세포단백질 생존성의 지표로 사용하였다.

### NO 생성 저해 활성

마우스 대식세포주인 RAW264.7 cell(ATCC, Manassas, VA, USA)을 10% FBS와 antibiotic mixture가 함유된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium)배지에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건으로 배양하였다. LPS에 의하여 유도된 NO 생성 저해 활성을 측정하기 위하여 세포를 50,000 cells/well 수준으로 첨가하고 24 시간 동안 배양하여 96 well plate에 부착한 후 다양한 농도의 시료와 LPS(1  $\mu$ g/mL)를 동시에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 후에는 Marocci 등(21)의 방법에 따라 배양 상정액 100  $\mu$ L를 취하여 동량의 Griess 시약을 첨가하고 10분간 방치한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 nitrite의 농도는 sodium nitrite를 DMEM 배지에 용해한 후 작성한 표준곡선을 이용하여 계산하였으며 LPS를 처리한 대조군과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 nitrite 양의 차이를 기준으로 하여 각 시료의 NO 생성 저해활성을 구하였다.

### 세포독성

시료의 세포독성 평가는 RAW264.7 cell을 이용하여 3-(4,5)-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay를 실시하였다. 위와 동일한 조건으로 시료를 처리하고 24시간 동안 세포를 배양한 후 상정액을 제거하고 MTT 시약(100  $\mu$ L)을 각 well에 분주하여 4시간 동안 배양을 지속하였다. 배양 종료 후 잔여 MTT 시약을 제거하고 DMSO(200  $\mu$ L)를 이용하여 용해시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 대조구에 대한 백분율로 표시하였다.

Table 1. Characteristics of samples used in this study

Variety	Cultivar	Remark
Soy bean	Williams 82	Genotype that was selected for DNA sequence for soybean
Soy bean	LD00-3309	Recent high yielding release from University of Illinois
Soy bean	PI458091	Red brown seed coat color from Kangwon, Korea
Soy bean	PI458080	Black seed coat color from Chonnam, Korea
Mung bean	-	Obtained from local supermarket

**PGE<sub>2</sub> 농도 변화**

추출물의 염증억제효과의 지표로서 COX-2에서 유래한 PGE<sub>2</sub>의 농도 변화를 assay kit(Cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 측정하였다. RAW264.7 cell을 앞서 기술한 방법으로 24시간 배양한 후 추출물을 첨가하여 18시간 배양하고 배양액을 시료로 사용하였다. Assay는 시료의 PGE<sub>2</sub>와 첨가된 PGE<sub>2</sub>-peroxidase conjugate와의 경쟁반응을 이용하여 흡광도와 농도의 표준곡선으로 시료세포배양액에 함유된 PGE<sub>2</sub>의 함량을 산출하였다.

**통계분석**

모든 실험은 3회 이상 반복 측정하였으며, 결과의 통계분석은 SPSS 14.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 ANOVA를 이용하였다. 처리구간의 유의적 차이( $p < 0.05$ )가 관찰된 경우 Tukey의 다중비교검정법을 사용하여 유의성 검정을 실시하였다.

**결과 및 고찰**

**녹두 및 대두 용매추출물의 QR 유도활성**

식이 섭취에 의한 2상효소계의 활성 유도는 대표적 암 예방 기작이다. 2상효소계는 NAD(P)H: QR와 GST, UDP-glucuronosyl transferase 등으로 구성되어 있는데 이중 QR은 GST와 함께 유도되는 암예방 효소계의 지표효소로 보고되어 있으므로(22) 본 연구에서는 녹두에 존재하는 암 예방 활성 물질 탐색의 생체지표로서 QR 유도활성을 이용하였다.

시료의 용매추출물이 QR 유도활성에 미치는 효과를 측정하기 위하여 다양한 농도의 용매추출물을 제조하고 murine hepatoma Hc1c7 cell을 이용하여 추출물의 농도변화에 따른 QR 유도활성의 변화를 측정된 결과는 Table 2와 같다. Hexane 추출물은 주성분이 지질로서 QR 유도활성을 보이지 않았으며, 모든 시료의 열수추출물 역시 1,000 µg/mL의 첨가 수준에서도 CD value(QR 유도활성을 2배로 상승시키는데 필요한 시료의 농도)에 도달하지 못하였다. 전반적으로 ethylacetate 추출물은 ethanol 추출물과 비교하여 우수한 QR 유도활성을 보였으며 대두의 품종과 비교하여 녹두는 높은 QR유도 활성을 나타냈다. 일반적으로 추출물의 CD value가 <10 µg/mL일 경우 항암 효과에 긍정적인 결과를 나타낼 수 있는 것으로 간주할 수 있으나(23) CD value는 시료의 QR 유도능력의 지표일 뿐 시료 자체가 가지고 있는 세포 독성에 대한 정보는 제공하지 않기 때문에 암 예방 활성을 가진 기능성 식품 소재의 지표로서는 충분치 않을 수 있다. 따라서 본 연구에서는

IC<sub>50</sub> 값을 CD value로 나누어 구한 CI(chemoprevention index) value를 함께 표시하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 ethylacetate 추출물은 ethanol 추출물과 비교하여 CD value가 낮아 보다 낮은 농도에서 QR 유도활성을 나타낸 반면 IC<sub>50</sub>는 63-250 µg/mL 수준으로서 세포 독성이 ethanol 추출물보다 높았다. 시료 중에는 녹두의 ethylacetate 및 ethanol 추출물이 각각 7.88과 8.32의 CI value를 나타내어 대두 추출물과 비교하여 높은 활성을 보였다.

Ku 등(24)은 새로운 대두 종자인 아가콩3(Agakong3)의 methanol 추출물을 제조하고 다른 대두종자와의 QR유도활성을 비교하였다. 아가콩3은 다른 대두종에 비하여 높은 항산화능력과 QR유도활성을 보였는데 이와 같은 결과는 아가콩3이 다른 대두종자에 비하여 유의적으로 높은 isoflavone 함량(genistein+daidzein)을 가지고 때문이라고 보고하였다. 또한 총페놀함량과 QR유도활성과의 상관관계수(r)는 0.79이었으며 isoflavone과의 상관관계수는 0.84로 매우 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 QR이 유전자의 5'upstream 전사조절 부위에 다양한 항산화성분과 반응하는 ARE를 포함하고 있음을 고려할 때(25) 충분히 예상할 수 있다. Kwon과 Kim(26)은 isoflavone의 QR유도활성을 조사한 결과 isoflavone의 QR 유도활성은 기관에 따라 다르다고 보고하였으며 그 이유 중 하나는 isoflavone과 결합하는 estrogen 수용체의 분포가 기관마다 다르게 분포하기 때문이라고 추측하였다.

그러나, 최근 콩가루 에탄올 추출물을 가지고 진행된 QR 유도물질의 분리, 정제 결과에 따르면 isoflavone의 QR 유도 활성은 콩추출물이 가지는 전체 활성의 단지 일부분에 해당한다고 보고된 바 있다. 그 근거로서 대두 ethanol 추출물을 분획하여 QR 유도 활성을 비교한 결과 isoflavone이 함유된 분획의 QR유도 활성은 상대적으로 낮았으며 대부분의 QR유도활성은 가장 소수성이 강한 분획에서 나타났다(27,28). 대두(*Glycine Max*)는 종자, 재배 환경, 생산년도 등에 따라 차이를 보이는 하지만 isoflavone을 가장 많이 함유하고 있으며 평균함량은 diadzein 105-560, genistein 268-841 µg/g 인 반면 녹두의 경우 각각 0.09, 3.65 µg/g 정도의 isoflavone을 함유하여(29) 현격한 차이를 보이고 있다. 따라서, 녹두추출물의 높은 QR유도활성은 isoflavone에서 유래한 것으로 판단하기 어렵다.

녹두종피(mung bean hull)에는 대두와 비교하여 특징적인 flavonoid 성분인 vitexin과 isovitexin이 존재한다(30,31). 이와 같은 성분은 항산화, 항염증 효과(32) 이외에도 유방암, 전립선암, 간암, 난소암세포 등에 대한 억제효과(33)가 확인된 바 있어 녹두추출물의 높은 QR유도활성과 관련이 있을 것으로 추정된다. 또

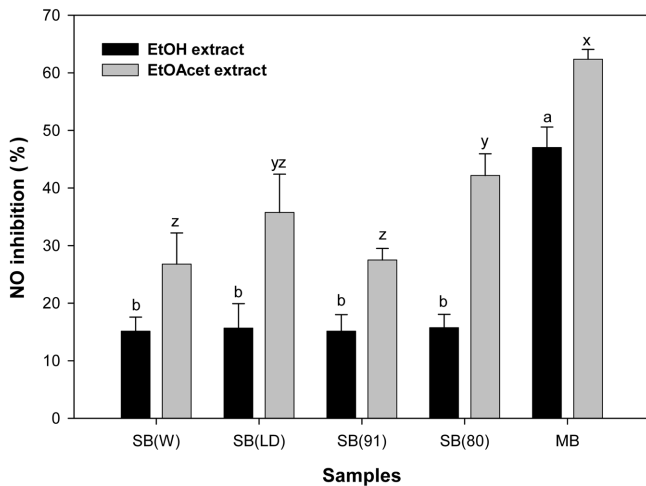
**Table 2. QR inducing activities of mung bean and four soybean extracts<sup>1)</sup>**

Solvent	Sample	CD (µg/mL) <sup>2)</sup>	IC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>2)</sup>	CI <sup>2)</sup>
Ethylacetate	Soybean (W) <sup>3)</sup>	48±5.5	250	5.20
	Soybean (LD)	40±4.2	200	5.00
	Soybean (91)	32±3.4	166	5.19
	Soybean (80)	20±4.7	92	4.60
	Mung bean	8±2.6	63	7.88
Ethanol	Soybean (W)	163±23	734	4.50
	Soybean (LD)	153±17	719	4.69
	Soybean (91)	>1,000	>1,000	-
	Soybean (80)	477±35	>1,000	2.09
	Mung bean	94±16	783	8.32

<sup>1)</sup>QR induction assay was carried out by Hepa 1c1c7 cells.

<sup>2)</sup>CD: concentration required to double QR activity, IC<sub>50</sub>: concentration required to inhibit cell growth by 50%, CI: IC<sub>50</sub>/CD, The highest tested concentration was 1,000 µg/mL. When IC<sub>50</sub> value is higher than 1,000 µg/mL 1,000 µg/mL was used for CI calculation.

<sup>3)</sup>W, soybean Williams 82; LD, soybean LD00-3309; 91, soybean PI458091; 80, soybean PI458080.

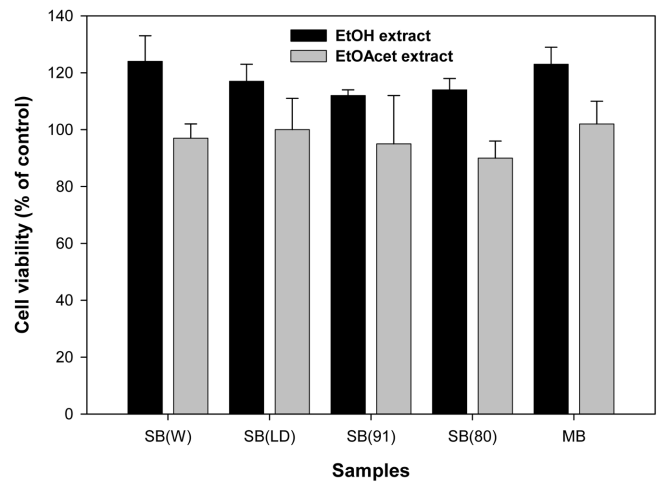


**Fig. 1. Effect of solvent extracts (100  $\mu\text{g/mL}$ ) on NO production.** SB(W), soybean Williams 82; SB(LD), soybean LD00-3309; SB(91), soy bean PI458091; SB(80), soybean PI458080; MB, mung bean. NO assay were carried out using macrophage cells (RAW264.7). Results are expressed as mean $\pm$ SD. Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

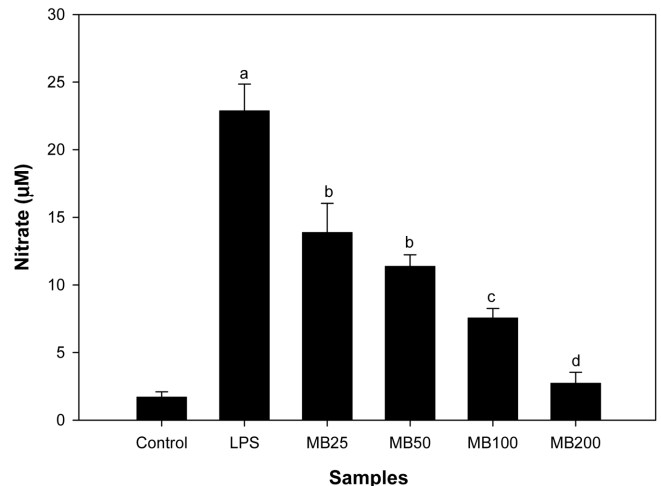
한 종자에 대한 결과는 아니지만, 항암효과가 알려진 quercetin(34)의 함량이 콩나물(78.5  $\mu\text{g/g}$ )에 비해 숙주(208  $\mu\text{g/g}$ )에서 상당히 높은 것도(35) 관련이 있을 것으로 생각된다. 또한, 활성산소가 조식손상, 염증발현은 물론 암의 발생에도 관여함을 고려할 때, 녹두의 ethanol과 ethylacetate 분획의 높은 항산화 활성(36)도 QR유도 활성에 관여하는 것으로 생각된다. 그러나 정확한 OR활성 유도물질의 확인을 위해서는 추가적인 연구가 필요하다.

#### 녹두 및 대두 용매추출물의 산화질소 생성 억제 효과

녹두 및 대두 용매추출물의 NO 생성 억제 효과를 마우스 대식세포인 RAW264.7 cell을 이용하여 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 전반적으로 ethylacetate 추출물이 ethanol 추출물과 비교하여 동일농도에서 NO 생성 억제 활성이 우수한 반면 hexane 및 열수추출물은 QR 유도 활성의 경우와 유사하게 시료의 처리 농도를 400  $\mu\text{g/mL}$  수준으로 증가시킨 경우에도 모든 처리구에서 NO의 생성을 억제하지 못하였다. 녹두의 ethylacetate 추출물과 ethanol 추출물의 NO억제활성은 대두용매추출물보다 유의적으로 높아 100  $\mu\text{g/mL}$  첨가 시 NO의 생성량은 각각 대조구의 47% 및 62%로 감소하였으며 모든 추출물은 200  $\mu\text{g/mL}$  수준까지 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 2). 녹두 ethanol 추출물의 NO 억제 활성의 농도의존성을 측정된 결과(Fig. 3) 시료에 LPS를 처리 시 NO의 생성량은 10배가량 증가하였으며 녹두 ethanol 추출물의 첨가 농도가 증가함에 따라 NO의 생성량은 유의적으로 감소하여 농도의존성이 관찰되었다. Kim 등(37)은 RAW264.7 cell을 이용하여 여러 종류의 flavonoids에 대하여 NO 생성 억제효과를 분석한 결과 대두의 주요성분 중 daidzein은 효과가 없고, genistein은 42.4%로 억제하는 반면, 녹두의 vitexin과 isovitexin은 효과가 없다고 보고하였다. 한편, Mian과 Mohamed(35)는 quercetin과 myricetin이 NO의 생성에 높은 억제활성을 가지고 있다고 보고하였으며 (50.1%와 53.1%) 이와 같은 성분은 종자의 경우는 아니지만 콩나물(quercetin: 78.5  $\mu\text{g/g}$ , myricetin: 미검출)보다 숙주나물(quercetin: 208  $\mu\text{g/g}$ , myricetin: 60  $\mu\text{g/g}$ )에 훨씬 다량으로 존재함이 확인되었다.

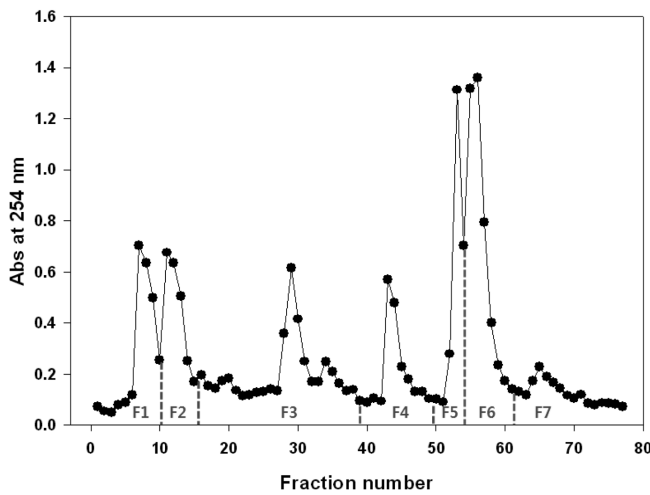


**Fig. 2. Effect of solvent extracts (100  $\mu\text{g/mL}$ ) on cytotoxicity.** SB(W), soybean Williams 82; SB(LD), soybean LD00-3309; SB(91), soy bean PI458091; SB(80), soybean PI458080; MB, mung bean. The cytotoxicity was evaluated by MTT assay.



**Fig. 3. Dose-dependent effect of mung bean ethanol extracts on NO production.** MB25, mung bean 25  $\mu\text{g/mL}$ ; MB50, mung bean 50  $\mu\text{g/mL}$ ; MB100, mung bean 100  $\mu\text{g/mL}$ ; MB200, mung bean 200  $\mu\text{g/mL}$ . NO assay were carried out using macrophage cells (RAW264.7). Results are expressed as mean $\pm$ SD. Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

염증반응은 생체나 조직이 외부 화학물질의 침입이나 세균반응에 대하여 손상부위를 회복 재생하려는 반응으로서 대식세포, 호중구 등과 같은 면역관련 세포들이 염증성 cytokine, NO, PGE<sub>2</sub> 등의 염증매개물질을 분비하여 발생한다. 염증상태에서는 COX-2와 NO synthase가 유도되어 과량의 PGE<sub>2</sub>, NO 등이 생성되며 여러 가지 질병 및 암화(carcinogenesis)가 촉진된다(38). NO는 L-arginine으로부터 NO synthase(NOS)에 의하여 합성되는 자유기로서 NOS는 체내 항상성 유지에 필요한 endothelial NOS(eNOS)와 산화제, LPS, 세균, 바이러스와 염증성 cytokine에 의하여 유도되는 inducible NOS(iNOS)로 분류된다(39). NO는 자체로도 독성을 나타낼 수 있지만 superoxide radical과 반응하여 과산화질산염(peroxynitrite)를 형성하는데 이것이 가장 반응성이 높은 고반응 질소종이 된다. NO, 고반응산소종, 고반응질소종의 과량생산은 DNA, 지방, 단백질, 탄수화물 등의 손상을 초래하여



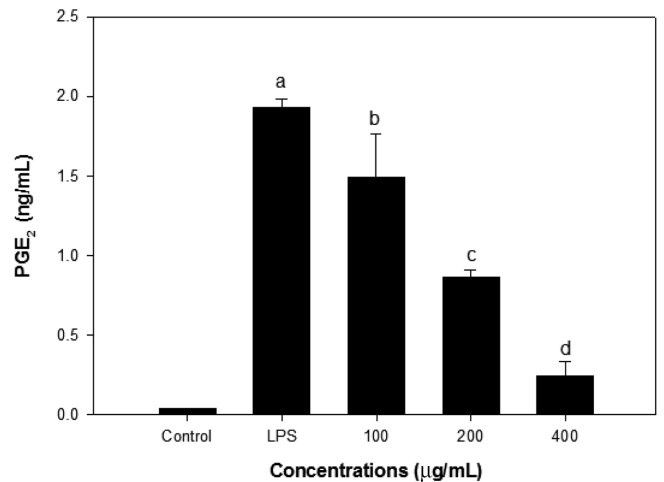
**Fig. 4.** C-18 silica flash fractionation of mung bean ethanol extract. Fractions were pooled according to absorbance at 254 nm. QR induction and NO bioassay were carried out using Hepa 1c1c7 cells and macrophage cells (RAW264.7), respectively.

정상적인 세포 기능을 훼손하고 염증반응을 상승시키게 된다(40). 이상의 결과를 종합하여 볼 때 녹두 ethanol 추출물은 NO생성 억제 활성을 가지고 있는 것으로 간주할 수 있으며 NO의 과다 생성이 체내 염증반응의 중요 매개경로임을 고려할 때 염증 반응을 억제할 수 있는 천연자원으로 활용할 수 있는 것으로 생각된다.

**녹두 ethanol 추출물로부터 QR유도성분 및 염증억제활성 성분의 분획화**

녹두의 ethylacetate 추출물과 ethanol 추출물은 모두 유의적인 QR 유도활성 및 NO생성 억제활성 효과를 나타내었으나 추출 수율(ethylacetate: 약 0.53%, ethanol: 약 2.66%)과 차후 기능성 소재로서의 응용 가능성(식품 제조에 사용 가능한 ethanol을 이용하여 추출된 녹두 ethanol 추출물)을 고려하여 일차적으로 ethanol 추출물의 부분적 정제를 시도하였다.

C18 silica flash column chromatography를 이용하여 녹두 ethanol 추출물의 분획을 실시한 결과 7개의 peak fraction으로 구분되었다(Fig. 4). 각 분획의 QR유도활성 및 NO생성 억제 활성을 측정된 결과 흥미롭게도 전체 수율의 5%에 해당하는 F7에서 상대적으로 높은 QR유도활성 및 NO생성억제 활성이 확인되었다. F7의 CD value는 분획 전 94에서 24 µg/mL으로 감소하여 CI는



**Fig. 5.** Effect of F7 of mung bean ethanol extract on PGE<sub>2</sub> production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The RAW264.7 cells were stimulated by LPS in the presence of designated concentrations of sample. The supernatant were collected after 24 hr and PGE<sub>2</sub> concentration was determined by ELISA method. Results are expressed as mean±SD. Means with different letters are significantly different at *p*<0.05.

8.3에서 10.4로 상승하였으며 NO생성억제 활성도 다른 분획에 비하여 상대적으로 높았다. 염증반응의 또 다른 체내 매개물질 중의 하나인 PGE<sub>2</sub> 생성에 대한 F7의 효과를 assay kit를 이용하여 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. F7분획의 첨가는 농도 의존적으로 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제하였는데 200 µg/mL의 첨가 시에는 대조구와 비교하여 약 42%가, 400 µg/mL의 첨가수준에서는 PGE<sub>2</sub> 생성의 약 83%가 억제되었다. 한편 F1-F6의 다른 분획들은 400 µg/mL의 첨가수준에서 유의적인 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 효과가 관찰되지 않았다.

염증반응에 의하여 arachidonic acid가 세포막 인지질로부터 유리되면 lipoygenase(LOX) 또는 COX-2의 작용에 의해 prostaglandin이 합성된다. COX-2는 정상적인 조직에서는 거의 발현 되지 않으며 대식세포에서 유도 되어 암세포의 증식은 물론 종양세포의 전이나 암세포 주변의 새로운 혈관신생(angiogenesis)에도 관여하고 자기사멸(apoptosis)를 억제하는 역할을 한다. 따라서 선택적 COX-2 저해 성분은 항염증 및 암 발생 예방 성분의 발견을 위한 중요한 표적으로 사용할 수 있다(41).

Kwon 등(42)은 30여종의 식물성 식품재료의 에탄올 추출물을 제조하고 염증반응에 관여하는 다양한 효소활성에 미치는 영향

**Table 3.** NO inhibition activities of mung bean ethanol extract fractionated by C-18 silica flash column chromatography<sup>1)</sup>

Fraction	Yield (%)	CD (µg/mL) <sup>2)</sup>	IC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>2)</sup>	CI <sup>2)</sup>	NO inhibition (%) (at 100 µg/mL)
F1	53	260±23	>500	1.9	13
F2	21	>500	>500	3.2	11
F3	12	>500	>500	-	28
F4	2	159±19	>500	3.1	4
F5	3	480±32	>500	1.0	9
F6	4	>500	>500	-	9
F7	5	24±11	250	10.4	42

<sup>1)</sup>QR induction and NO bioassay were carried out using Hepa 1c1c7 cells and macrophage cells (RAW264.7), respectively.  
<sup>2)</sup>CD: concentration required to double QR activity, IC<sub>50</sub>: concentration required to inhibit cell growth by 50%, CI: IC<sub>50</sub>/CD, The highest tested concentration was 1,000 µg/mL. When IC<sub>50</sub> value is higher than 500 µg/mL, 500 µg/mL was used for CI calculation.

을 조사하였다. 녹두 및 녹두의 발아형태인 숙주나물의 에탄올 추출물은 함께 비교 된 두류, 두류유래식품, 식물 뿌리류, 잎채소류, 해조류, 버섯류, 견과류 및 종실류 30여종 중 LOX, phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>) COX-2 등 여러 가지 염증 효소계의 활성을 전반적으로 억제하였으며 PLA<sub>2</sub>의 억제 활성이 매우 강하여 비선택적 저해제인 indomethacin과 유사하였다. 또한 LOX 및 COX의 기질인 arachidonic acid 생성을 억제함으로써 염증반응 초기단계에서 항염증 작용을 개시할 수 있는 것으로 보고하였다. 이와 같은 결과는 본 연구 결과와 상당부분 일치하는 것으로 판단된다.

## 요 약

본 연구에서는 녹두 및 대두의 용매추출물을 제조하고 hepatoma 1c1c7 세포 및 대식세포인 RAW264.7 배양을 이용하여 항암 및 항염증 효과를 비교분석하였다. 녹두추출물은 대두추출물 보다 ethylacetate 및 ethanol 추출물에서 모두 유의적으로 높은 QR 유도활성과 NO 및 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제 효과를 보였으며 농도 의존적 효과를 나타냈다. C18 silica flash column chromatography를 이용하여 회수된 녹두에탄올 추출물의 7개 분획 중 소수성이 가장 강한 분획은 24 µg/mL의 CD value와 783 µg/mL의 IC<sub>50</sub>를 보였다. 현재 다수의 염증 억제물질의 작용기전이 prostaglandin 합성 억제제이며 이는 COX-2의 생성 및 활성저해에 의한 것임을 근거로 할 때 녹두의 ethanol 추출물은 항염증 및 암 발생 예방 성분을 분리하기 위한 중요한 식품 자원으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2008년도 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구로 (KRF-2008-013-F00012)에 감사드립니다.

## 문 헌

- Park EJ, Pezzuto JM. Botanicals in cancer prevention. *Cancer Metast. Rev.* 21: 231-255 (2002)
- Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* 45: 1-8 (1985)
- Prochaska HJ, Santamaria AB, Talalay P. Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2394-2398 (1992)
- Song LL, Kosmeder JW II, Lee SK, Gerhauser C, Lantvit D, Moon RC, Moriarty RM, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. *Cancer Res.* 59: 578-585 (1999)
- Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. A major inducer of naticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2399-2403 (1992)
- Gerhauser C, You M, Liu J, Moriarty RM, Hawthorne M, Mehta RG, Moon RC, Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth N R, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220 (1997)
- Xiao H, Parkin KL. Isolation of potential cancer chemopreventive agents from methanolic extracts of green onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry* 68: 1059-1067 (2007)
- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochem. Pharmacol.* 72: 1605-1621 (2006)
- Surh YJ, Na HK. NF-κB and Nrf2 as prime molecular targets for chemoprevention and cytoprotection with anti-inflammatory and antioxidant phytochemicals. *Gene Nutr.* 2: 313-317 (2008)
- Liu H, Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Coordinate regulation of enzyme markers for inflammation and for protection against oxidant and electrophiles. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 15926-15931 (2008)
- Kennedy A. Cancer prevention by soy products. *J. Nutr.* 125: 733S-743S (1995)
- Kwon CS, Kim JS. Effect of soybean supplementation on murine drug-metabolizing enzymes and benzo(a)pyrene-induced lung cancer development. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 535-539 (1999)
- Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Therapeut.* 90: 157-177 (2001)
- Blay M, Espinel AE, Delgado MA, Baiges I, Blade C, Salvado LAJ. Isoflavone effect on gene expression profile and biomarkers of inflammation. *J. Pharmaceut. Biomed.* 51: 382-390 (2010)
- Oh HS, Kim JH, Lee MH. Isoflavone content, antioxidative and fibrinolytic activities of red bean and mung bean. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 19: 263-270 (2003)
- Kim OK, Gu YA, Jeong YJ. Characteristics of mung bean powders after various hydrolysis protocols. *Korean J. Food Preserv.* 14: 301-307 (2007)
- Choi JH, Kim SO, Kim KS, Lee MY. Effect of mung bean sprouts juice on cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 980-986 (1998)
- Chang SM, Nam SH, Kang MY. Screening of the antioxidative activity, antimutagenicity and mutagenicity of the ethanolic extracts from legumes. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 1115-1122 (2002)
- Peng X, Zheng Z, Cheng KW, Shan F, Ren GX, Chen F, Wang M. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food Chem.* 106: 475-481 (2008)
- Prochaska HJ, Santamaria AB. Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cell cultures in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.* 169: 328-336 (1988)
- Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT, Packer L. The nitric oxide-scavenging properties of ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 201: 748-755 (1994)
- Brooks JD, Goldberg MF, Nelson LA, Wu D, Nelson WG. Identification of potential prostate cancer preventive agents through induction of quinone reductase *in vitro*. *Cancer Epidem. Biomar.* 11: 868-875 (2002)
- Cuendet M, Oteham CP, Moon RC, Pezzuto JM. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. *J. Nat. Prod.* 69: 460-463 (2006)
- Ku KM, Kim MG, Hong MJ, Jeong YS, Kim JS, Lee IJ, Shin DH, Hwang YH, Kang YH. Antioxidant and QR inductive activities of novel functional soybean "Agakong3". *Food Sci. Biotechnol.* 18: 624-629 (2009)
- Xie T, Belinsky M, Xu Y, Jaiswal AK. ARE- and TRE-mediated regulation of gene expression; Response to xenobiotics and antioxidants. *J. Biol. Chem.* 270: 6894-6900 (1995)
- Kwon CS, Kim JS. Quinone reductase activity is regulated by isoflavones in an organ specific manner. *Food Sci. Biotechnol.* 11: 285-288 (2002)
- Bolling BW, Parkin KL. Phenolic derivatives from soy flour ethanol extract are potent *in vitro* quinone reductase (QR) inducing agents. *J. Agr. Food Chem.* 56: 10473-10480 (2008)
- Bolling BW, Parkin KL. Limited contribution of isoflavones to hepatocellular phase II enzyme-inducing activity of soybean (*Glycine max*) extract. *Food Chem.* 113: 1069-1075 (2009)
- Mazur WM, Duke JA, Wahala K, Rasku S, Adlercreutz H. Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans. *Nutr. Biochem.* 9: 193-200 (1998)
- Kim DK, Kim JB, Chon SU, Lee YS. antioxidant potentials and quantification of flavonoids in mung bean (*Vigna radiata* L.) seeds. *Korean J. Plant Res.* 8: 122-129 (2005)
- Kim DK, CHon SU, Lee KD, Kim JB, Rim YS. Variation of flavonoids contents in plant parts of mung bean. *Korean J. Crop Sci.* 53: 279-284 (2008)

32. Kim BJ, Kim JH, Hea Y, Kim HP. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the mung bean. *Cosmetics Toiletries Magazine* 113: 71-74 (1998)
33. Zhou YJ, Liu YE, Cao JG, Zng GY, Shen C, Li YL, Zhou MC, Chen Y, Pu W, Potter L, Shi YE. Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth. *Clin. Cancer Res.* 15: 5161-5169 (2009)
34. Choiprasert W, Dechsupa N, Kothan S, Garrigos M, Mankhetkorn S. Quercetin, quercetrin except rutin potentially increased pirarubicin cytotoxicity by non-competitively inhibiting the P-glycoprotein-and MRP1 function in living K562/adr and GLC4/adr cells. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 5: 24-33 (2010)
35. Miean KH, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants, *J. Agr. Food Chem.* 49: 3106-3112 (2001)
36. Chung IM, Yeo MA, Kim SJ, Moon HI. Protective effects of organic solvent fractions from the seeds of *Vigna radiate* L. wilczek against antioxidant mechanisms. *Human Exp. Toxicol.* (DOI: 10.1077/0960327110382565) (2010)
37. Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* 58: 759-765 (1999)
38. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12: 1063-1073 (1998)
39. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthase: roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918 (1994)
40. Dugasani S, Pichika MR, Nadarajah VD, Balijepalli MK, Tandra S, Korlakunta JN. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effect of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J. Ethnopharmacol.* 127: 515-520 (2010)
41. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, Subbaramaiah K. Cyclo-oxygenase-2: A pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol.* 2: 544-551 (2001)
42. Kwon ES, Kim H, Kwon H. Inhibitory effects on the enzymes involved in the inflammation by the ethanol extracts of plant foodstuffs. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 348-352 (2007)