

유기농 콩 추출물의 항염증 및 항알레르기 효과*

정은경*** · 서은혜**** · 박준호**** · 심혜림**** · 김경희***** · 이병용**

Anti-inflammatory and Anti-allergic Effect of Extracts from Organic Soybean

Chung, Eun-Kyung · Seo, Eun-Hye · Park, Jun-Ho ·
Shim, Hye-Rim · Kim, Kyung-Hee · Lee, Byung-Ryong

This study was carried out to investigate the biological effects of organic soybean extracts. Cellular and molecular analysis was performed to determine anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and anti-inflammatory effects of soybean extracts. First, we obtained various solvent extracts of soybean such as water, ethanol, and methanol. Molecular and cellular analysis were performed with 0.1 mg/ml concentration of each solvent extracts. The results of anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of organic soybean extracts were prominent. However, organic soybean extracts were not observed in anti-allergic effects determined by releasing histamine from rat mast cell line, RBL-2H3. Conclusively, organic soybean suppress inflammatory responses. In addition, organic soybean could be applied as a functional food ingredient for treatment of chronic inflammation, asthma, and atopic dermatitis with enhanced anti-inflammatory activities.

Key words : *soybean extracts, organic soybean, anti-oxidative effects, anti-inflammatory effects, anti-apoptotic effects, anti-allergic effects*

* 본 연구는 농촌진흥청 농업공동연구사업(유기농산물 생산기술개발)의 지원을 받아 수행한 “유기농산물을 활용한 가공식품개발” 과제의 결과의 일부입니다.

** 교신저자, 한림대학교 바이오메디컬학과 겸임교수(brlee@hallym.ac.kr)

*** Department of Genetic Engineering, College of Life Science and Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, Seocheon-dong, Kiheung-gu, Yong In, 446-701, Korea(chungek@gmail.com)

**** 주식회사 바이오웰스

***** 강원도 농업기술원 농산물이용시험장

I. 서 론

콩은 한국인에게 주된 단백질 공급원으로 이용되어 왔으며 다양한 형태로 섭취되고 있다. 또한 콜레스테롤 함량 저하, 심혈관 질환 개선 효과, 항산화 효과, 항암작용 및 골다공증 예방효과 등 여러 생리활성을 갖는 성분들을 다양하게 함유하는 기능성 식품이지만 식품 알레르기를 가장 흔하게 일으키는 식품 중 하나로도 잘 알려져 있다. 콩 알레르기의 유병율은 지역이나 식습관에 따라 다르지만 대체로 소아에서는 1~6% 정도 보고되며, 아토피 피부염 환자의 6%, 우유 알레르기 환자의 14%에서 콩 알레르기가 나타난다(정 등 2008). 식품 알레르기는 원인 식품을 철저히 회피하는 것이 알레르기 증상을 유일하고 가장 효과적인 치료지만, 이러한 철저한 회피가 힘들기 때문에 원인물질을 파악하고 저 알레르기성 식품의 탐색 및 개발이 활발하게 진행되고 있다.

염증은 생체 조직이 손상을 입었을 때에 체내에서 일어나는 방어적 반응으로 몸의 어떤 부분이 붉어지면서 붓고, 열이나 통증, 기능장애 등을 일으키는 것을 말하며 여러 가지 요인이 있으나 주로 섭취나 접촉에 의한 감염에 의해 유발되며 자가 면역질환이 원인으로 알려져 있다. 분자생물학적으로 볼 때, 체내 염증의 진행과정에는 그 원인으로 산화적 스트레스가 알려져 있는데 이와 관련된 활성산소종과 염증성 cytokine은 내독소 자극을 포함한 다양한 질병의 병리학적 측면에서 매개체로서 중요한 역할을 한다. 내독소 자극은 대식세포와 반응하여 내독소를 제거하는데 기여하나 대식세포가 과도하게 자극되면 염증성 cytokine인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 내독소의 매개체와 단백질분해효소 및 활성 산소종 생성을 통해 염증반응과 산화적 스트레스를 증가시키게 된다. lipopolysaccharide(LPS)에 의한 염증 매개체와 cytokine들의 생성은 nuclear factor kB(NF-kB)와 같은 전사인자의 활성화에 의한 cyclooxygenase-2(Cox-2)와 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 발현에 의존한다(Yamamoto 등 2004, Comalada 등 2006). 또한 아토피성 피부염 및 기관지 천식과 같은 제1형 알레르기 질환은 항원이 인체를 자극하여 항체인 면역글로블린 E(IgE)를 생성, 분비시키고, 분비된 IgE는 비만세포 표면에 있는 수용체에 결합하여 감각이 일어난다. 그런 후에 활성화된 비만세포의 탈과립화가 유도되고 히스타민 같은 세포내 과립물질과 프로스타글란딘(prostaglandin) 같은 지질매개물질 그리고 cytokine들이 분비된다. 이런 화학적 매개물질로 인해 말초혈관의 투과성 항진과 확장작용, 점막표면에 대한 점액질 분비 항진작용, 기관지 평활근의 수축작용 등의 알레르기 반응이 나타난다(Ennis 등 1980, Metcalfe 등 1981, Jones 등 1993, Miyajima 등 1997, Church 등 1997).

본 연구는 콩을 열수와 유기용매로 추출하여 그 추출물의 염증과 알레르기 관련 효과를 비교하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

콩은 “(주)지아이”로부터 구입하였으며, 친환경 유기농 인증을 받은 제품을 사용하였다. 그리고 본 실험에 사용한 시약으로서 dinitrophenylated-IgE(DNP-IgE), DNP-BSA, 소혈청알부민(BSA), sodium citrate buffer(pH 4.5) 등은 Sigma(USA)의 제품을 사용하였으며, dulbecco Eagle's minimal essential medium(DMEM), Fetal bovine serum(FBS), earl's balanced salt solution(EBSS) 등은 Gibco사 (USA)를 사용하였다. 또한 메탄올과 에탄올은 덕산화학제품을 사용하였다. Cox-2, iNOS, Bcl-xl, LC3-II 등의 항체는 Cell Signaling사(USA)의 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 콩의 용매 추출 및 분획

다양한 생리활성 물질을 추출하기 위하여 열수와 유기용매로 분획 추출하였다. 먼저 콩(100g)를 파쇄하여 둥근 플라스크에 넣고 10배량의 증류수를 가하여 60°C에서 4시간 동안 가열 추출하고 그 여액을 회전 증발농축기로 감압 농축한 후 농축물을 동결 건조하였다. 콩 열수추출물의 수율은 약 4%이었다. 메탄올, 에탄올을 이용한 용매추출은 파쇄한 콩에 10배의 각 유기용매를 가하여 60°C에서 4시간 환류 추출하고, 감압 농축한 후에 농축물을 동결 건조하여 사용하였다. 모든 시료는 0.1g/ml의 농도로 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

3. 항산화 능력 측정

분획물의 항산화 능력은 전자 공여능 측정과 superoxide dismutase(SOD) 효소활성화 정도를 측정하였다. 먼저 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)에 대한 전자 공여능을 측정하여 환원력으로 계산하였다(Yasusi 등 1999). 각 시료 0.8ml에 DPPH용액(150 μ M) 0.2ml를 넣고 암실에서 30분간 반응 후, 520nm에서 흡광도를 측정하였으며, 전자공여 효과는 시료 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다. 또한 SOD 효소활성은 알칼리 상태에서 xanthine oxidase 효소와 연계하여 nitroblue tetrazolium formazan(NBT-formazan)의 형성을 450nm에서 흡광도를 측정하였다(Fluka사 측정kit).

4. 항염증 효능 측정

항염증 효능 실험을 위하여 생쥐 면역세포인 Raw 264.7 세포를 사용하였다. Raw 264.7

세포(5×10^5 cells/well)에 각 콩 추출물 시료를 0.1mg/ml의 농도로 처리하고 약 3시간 반응 후 염증 유발물질인 LPS를 1 μ g/ml의 농도로 처리하였다. 그 후에 각각 6시간, 24 시간동안 37 $^{\circ}$ C CO₂ incubator에서 배양한 후, 세포를 취하여 lysis buffer(1x lysis buffer, 1% SDS)로 세포액을 얻었다. 각 세포액 20 μ g을 취하여 SDS-PAGE를 수행한 후 Cox-2와 iNOS 등 염증 관련 단백질의 항체를 이용하여 Western blotting을 수행하였다.

5. 대식세포의 세포 사멸 보호 효과 측정

대식세포 세포 사멸 보호 효과는 생쥐 면역세포인 Raw 264.7 세포를 사용하였다. 위의 항염증 효능 측정 실험 과정에서 획득한 단백질을 세포사멸 조절 단백질인 Bcl-x1의 항체를 이용하여 Western blotting을 수행하였다. 또한 1mM H₂O₂로 유도되는 대식세포의 세포사멸에 각 콩 추출물의 억제 효능을 세포 수 측정법으로 평가하였다. Raw 264.7 세포를 5×10^5 cells/well으로 배양한 후 각 콩 추출물 시료를 0.1mg/ml의 농도로 처리하고 약 3시간 반응 후에 세포사멸 유발물질인 H₂O₂를 1mM의 농도로 처리하여 세포사멸을 유도하였다. 각각 9시간, 24시간동안 37 $^{\circ}$ C CO₂ incubator에서 배양한 후, 세포를 취하여 trypan blue로 염색하여 살아있는 세포와 죽은 세포를 모두 세어 생존률을 계산하였다.

6. 항알레르기 효능 측정

쥐 비만세포인 RBL-2H3 세포주를 사용하여 Anti-DNP-IgE에 의해 유도되는 비만세포의 탈과립화를 통한 세포질 내의 히스타민 유리량을 측정하였다. 1×10^6 개의 흰쥐 RBL-2H3 세포를 6-well plate에 배양하고 각 콩 추출물을 0.1mg/ml의 농도로 첨가하였다. 약 3시간 후에 염증유발물질인 DNP-IgE를 72.2ng/ml로 처리하고 16시간 후에 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 washing한 후, 세포배양액을 1% BSA가 포함된 EBSS로 교체한다. 그 후 DNP-BSA 150ng/ml를 30분 동안 처리하여 탈과립화를 유도하고 세포배양액만을 따로 취해 히스타민 유리량을 o-phthalaldehyde(OPT) assay로 측정하였다. 유리된 히스타민과 OPT와 결합으로 형성된 형광은 413nm에서 측정하였다(Passante 등 2009).

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 항산화 능력

콩의 각 용매별 추출물의 전자공여능 실험 결과, 높은 항산화능력을 가지고 있었다. 각

콩 추출물을 1mg/ml의 농도를 처리하였을 때, 열수 추출물과 에탄올 추출물의 경우보다 메탄올 추출물의 항산화능력이 약 2배 정도 효과가 있는 것으로 확인되었다(Fig 1). SOD 항산화효소의 활성을 측정한 결과, 콩의 메탄올 추출물 분획에서는 1.1 배의 증가가 관찰되었으나, 에탄올 추출물에서는 오히려 감소되는 효과를 보였다(Fig 2). 따라서 각 분획물마다 항산화 효과가 다르다는 것을 알 수 있지만, 친환경 유기농 재배된 콩의 열수 추출물에서는 항산화 물질이 많이 포함되어 있을 것이라 기대할 수 있었다.

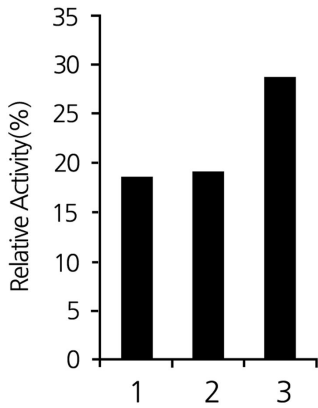


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of soybean extracts.

1: Water(D.W.), 2: Ethanol, 3: Methanol

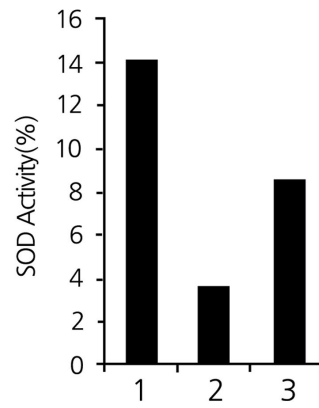


Fig. 2. Superoxide Dismutase activities of soybean extracts.

1: Water(D.W.), 2: Ethanol, 3: Methanol

2. 항염증 효과

유기재배 콩 추출물의 항염증 효과는 세포생물학적 방법을 사용하였다. 마우스 대식 세포주인 Raw 264.7 세포주에 다양한 용매의 추출물을 0.1mg/ml의 농도로 Raw 264.7 세포에 3시간 전 처리한 후, 염증 유도물질인 LPS(1µg/ml)를 처리하여 염증반응을 유도하였을 때 그 염증 반응이 예방되거나 억제되는 효과를 염증 관련 단백질인 Cox-2와 iNOS의 Western



Fig. 3. Effect of soybean extracts on LPS-induced production of iNOS, COX-2 in Raw 264.7 cell

0: LPS only(1µg/ml) 1: Water(D.W.), 2: Ethanol, 3: Methanol

blotting법으로 조사하여 측정하였다. 그 결과 유기농산물의 열수 추출물에 염증 반응 매개 물질인 NO의 합성효소인 iNOS의 발현량을 2배, 메탄올 추출물에서는 1.5배 감소시켰으며, 또한 Cox-2는 열수, 에탄올, 메탄올 추출물에서 모두 감소되었다(Fig. 3).

3. 대식세포의 세포 사멸 보호 효과 측정

대식세포주인 Raw 264.7 세포의 생존력을 생존조절 단백질인 Bcl-xl의 발현량을 Western blotting으로 조사하여 평가하였다. 그 결과 유기재배 콩의 열수, 에탄올 및 메탄올 추출물 모두에서 Bcl-xl의 발현이 증가하였다(Fig. 4).

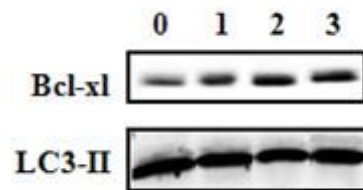


Fig. 4. Effect of soybean extracts on expression of Bcl-xl in Raw 264.7 cell

0: LPS only(1 μ g/ml) 1: Water(D.W.), 2: Ethanol, 3: Methanol

대식세포 보호 효과는 친환경 유기농 재배 콩의 열수, 에탄올, 메탄올 추출물의 3시간 전 처리를 한 대식세포에 1mM H₂O₂를 처리하여 세포에 세포사멸을 유도하여 세포사멸이 억제되는 정도를 세포수를 측정하여 평가하였다. 그 결과는 유기농 콩의 에탄올과 메탄올 추출물에서 열수추출물 보다 향상된 세포사멸 억제 효과가 관찰되었다(Fig. 5).

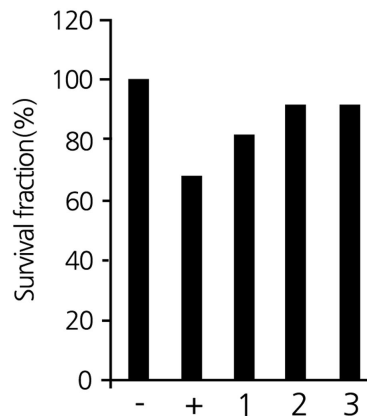


Fig. 5. Effect of soybean extracts on cell survival in Raw 264.7 cell

-: Nothing, +: 1 mM H₂O₂ 1: Water(D.W.), 2: Ethanol, 3: Methanol

3. 항알레르기 효과

유기 재배된 콩 추출물의 항알레르기 기능은 흰쥐의 비만 세포주인 RBL-2H3 세포주의 히스타민 탈과립화를 측정하여 분석하였다. 쥐의 비만 세포주인 RBL-2H3 세포주를 6 well plate에 배양한 후, 다양한 용매의 추출물을 0.1mg/ml의 농도로 3시간 전 처리하고 DNP-IgE 을 통한 비만세포의 탈과립화를 히스타민의 OPT assay를 통하여 측정하였다. 그 결과 친환경 유기농 콩의 열수, 에탄올, 메탄올 추출물 모두에서 IgE로 매개되는 히스타민 분비를 통한 알레르기 반응을 억제하는 효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 콩에는 많은 유용한 생리활성물질 뿐 만 아니라 알레르기 유발 물질도 존재하는 것으로 알려져 있지만 조추출물 상태에서는 특이적인 알레르기 유발보다 오히려 항알레르기 효과가 나타났다. 결론적으로, 만성 염증 및 천식, 그리고 아토피피부염과 같은 염증관련 질환에는 유기 재배된 콩이 좋은 억제 효과를 가지고 있다고 판단된다.

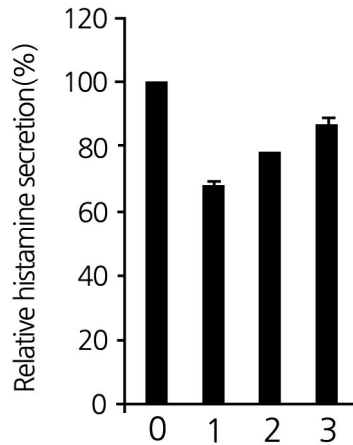


Fig. 6. Effect of soybean extracts on histamine release in RBL-2H3 cell

0: DNP-IgE only 1: Water(D.W.), 2: Ethanol, 3: Methanol

IV. 적 요

유기농재배 콩을 다양한 용매에서 추출하여 그 추출물에 대한 항산화 효과, 항염증 효과, 대식세포의 세포사멸 보호 효과, 그리고 알레르기 저해효과를 비교하였다. DPPH 법과 SOD 효소의 활성 측정으로 항산화 능력을 평가하였으며, 항염증 효과는 LPS로 유도시킨 Raw 264.7 세포주에서 염증 매개 단백질인 Cox-2와 iNOS의 발현량을 Western blotting으로 조사하여 분석하였다. 또한 대식세포 보호 효과를 세포사멸 조절 단백질인 Bcl-x1의 발현량

조사로 평가하였고, 1mM H₂O₂ 처리로 유도되는 세포사멸의 보호효과를 세포 수 측정법으로 조사하였다. 항알레르기 효과는 흰쥐의 비만세포인 RBL-2H3 세포주를 사용하여 IgE로 매개되는 비만세포의 탈과립화를 OPT assay로 측정하여 분석하였다.

그 결과, 유기 재배 콩의 다양한 추출물에서 항산화, 세포사멸 보호, 항염증 효과를 나타내었다. 특히 유기농 콩의 열수 추출물은 LPS로 유도시킨 염증반응을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 그러나 항알레르기 효과는 모든 추출물에서 히스타민 유리량이 약간 감소하는 것으로 나타나 유기농 콩의 특별한 효과를 확인할 수 없었다. 콩에는 많은 유용한 생리활성물질 뿐 만 아니라 알레르기 유발 물질도 존재하는 것으로 알려져 있지만 조추출물 상태에서는 특이적인 알레르기 유발보다 오히려 항알레르기 효과가 나타났다. 결론적으로, 만성 염증 및 천식, 그리고 아토피피부염과 같은 염증관련 질환에는 유기 재배된 콩이 좋은 억제 효과를 가지고 있다고 판단된다.

[논문접수일 : 2010. 5. 31. 논문수정일 : 2010. 11. 16. 최종논문접수일 : 2011. 6. 28]

참 고 문 헌

1. 정영희·권정현·정진아·이정옥·이광신·김지영·안강모·이상일·유충호. 2008. 발효과정에 따른 콩의 알레르기성 분석. 소아알레르기 호흡기학회지. 18(1): 37-45.
2. Ennis, M., F. L. Pearce, and P. M. Weston. 1980. Some studies on the release of histamine from mast cells stimulated with polylysine. *Br. J. Pharmacol.* 70: 329-334.
3. Metcalfe, D. D., M. Kaliner, and M. A. Donlon. 1981, The mast cell. *Crit. Rev. Immunol.* 3: 23-74.
4. Miyajima, I., D. Dombrowicz, T. R. Martin, J. V. Ravetch, J. P. Kinet, and S. J. Galli. 1997. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaR_{III}. *J. Clin. Invest.* 99: 901-914.
5. Church, M. L. and F. Levi-Schaffer. 1997. The human mast cell. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 99: 155-160.
6. Jones, D. A., D. P. Carlton, T. M. McIntyre, G. A. Zimmerman, and S. M. Prescott. 1993. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J. Biol. Chem.* 268: 9049-9054.
7. Passante, E., C. Ehrhadrdt, H. Sheridan, and N. Frankish. 2009. RBL-2H3 cells are an imprecise model for mast cell mediator release. *Inflamm. Res.* 58: 611-618.

8. Yamamoto, K., W. Kitayama, A. Denda, A. Morisaki, H. Kuniyasu, M. Inoue, and T. Kirita. 2004. Suppressive effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac, on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Exp. Toxicol. Pathol.* 56: 145-151.
9. Colmalada, M., I. Ballester, E. Bailon, S. Siera, J. Xaus, J. Galvez, F. S. de Medina, and A. Zarzuelo. 2006. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem. Pharmacol.* 72: 1010-1021.
10. Yasusi, S., N. Tsukase, S. Keiko, Y. Hiroe, and Y. Hisashi. 1999, Stopped-flow and spectrophotometric study on radical scavenging by tea catechins and model compound, *Chem. Pharm. Bull.* 47: 1369-174.