

## 팥콩나물 분획물의 수명연장 효과

이은별<sup>1</sup> · 김준형<sup>1</sup> · 박재준<sup>1</sup> · 신문기<sup>1</sup> · 이재승<sup>1</sup> · 형명명<sup>1,2</sup> · 차연수<sup>3</sup> · 김민아<sup>3</sup> · 송석보<sup>4</sup> · 김대근<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>우석대학교 약학대학, <sup>2</sup>中國 銅仁學院 材料與化學系, <sup>3</sup>전북대학교 식품영양학과,  
<sup>4</sup>농촌진흥청 국립식량과학원 기능성작물부 잡곡과

## Lifespan Extending Effects of Fractions of Red Bean Sprouts

Eun Byeol Lee<sup>1</sup>, Jun Hyeong Kim<sup>1</sup>, Jae Jun Park<sup>1</sup>, Moon Ki Shin<sup>1</sup>, Jae Seung Lee<sup>1</sup>, Ming Ming Xing<sup>1,2</sup>,  
Youn-Soo Cha<sup>3</sup>, Mina Kim<sup>3</sup>, Seuk Bo Song<sup>4</sup> and Dae Keun Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Woosuk University, Jeonju 565-701, Korea

<sup>2</sup>College of Materials and Chemistry Engineering, Tongren University, Guizhou 554300, China

<sup>3</sup>Dept. of Food Science and Human Nutrition, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

<sup>4</sup>Dept. of Functional Crop, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Miryang 627-803, Korea

**Abstract** – Recently, many studies have focused on the aging and oxidative stress. Several papers reported that *Vigna angularis* has various biological properties including antiaging, antioxidative and anti-inflammatory activities. Methanol extract from the red bean sprouts was successively partitioned as *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol and H<sub>2</sub>O soluble fractions. We had studied lifespan extending and stress resistant effects of the fractions using *Caenorhabditis elegans*. Superoxide dismutase (SOD), catalase activities, and intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were also investigated. Moreover, we had studied to find any significant change in aging-related factors such as reproduction, food intake, growth and movement of *C. elegans*. Our results represent that ethyl acetate fraction showed the most potent lifespan extending and stress resistant effects, and this fraction was able to elevate SOD and catalase activities of worms, and reduce intracellular ROS accumulation.

**Key words** – Red bean sprouts, *Vigna angularis*, *Caenorhabditis elegans*, Lifespan. Oxidative stress

최근 식생활 습관의 변화와 각종 스트레스의 증대로 각종 성인병과 노화를 야기하는 free radical과 활성 산소종(ROS, reactive oxygen species)에 대해 관심이 커지고 있다.<sup>1)</sup> ROS는 생물체 내에서 산소를 이용한 대사 부산물로서 다양한 산화적 스트레스 및 인체 내에서 여러 가지 효소반응에 영향을 미친다.<sup>2,3)</sup> ROS는 세포 구성 성분들인 탄수화물, 단백질, 지질 및 DNA 등과 반응하여 산화적 손상 및 효소활성을 변화시켜 뇌졸중을 비롯한 뇌질환과 심장질환, 동맥경화 및 암 등과 같은 질병들의 원인이 되기도 한다.<sup>4)</sup> 이와 같이 ROS는 생체조직을 손상시키고 노화를 촉진시키는 것으로 알려져 있어 ROS를 조절 할 수 있는 항산화 효능을 가지는 있는 항노화 관련 물질의 개발이 필요하다.

팥(*Vigna angularis* (Ohwi) Ohwi & Ohashi = *Phaseolus angularis* W. F. Wight, Leguminosae)은 비교적 지질 및 단

백질의 함량이 낮고 전분의 함량이 높은 것으로 알려져 있다.<sup>5)</sup> 팥은 껍질 중에 anthocyanin의 함량이 높고,<sup>6)</sup> 이 성분은 항산화 및 항종양 효과가 있음이 보고되어 있다.<sup>7)</sup> 팥의 메탄올 추출물의 항산화 성분으로는 polyphenol, flavonoid, anthocyanin 및 proanthocyanidin 등이 보고 되었다.<sup>2)</sup>

본 연구는 팥콩나물의 활용성을 탐색하는 일련의 연구로서 수명연장 실험모델인 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 사용하여 팥콩나물 추출물의 계통 분획물을 in vivo상에서 수명연장 효능과 열과 산화적 스트레스에 대한 저항성을 확인하고, 선충 내의 항산화 효소인 SOD와 catalase의 활성을 확인하며, 세포 내의 ROS의 축적 억제 효능을 확인하여 팥콩나물 추출물의 수명연장 효능에 대해 알아보 고자 하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료** – 본 실험에 사용한 팥은 2014년 경남 밀양시의

\*교신저자(E-mail): dkkim@woosuk.ac.kr  
(Tel): +82-63-290-1574

농촌진흥청 국립식량과학원 기능성작물부 잡곡과에서 제공하였으며, 이를 실험실에서 5 cm정도로 실온 재배 후 50°C에서 건조 후 세절하여 실험에 사용하였으며, 표준품은 우석대학교 약학대학 생약학 연구실에 보관하고 있다(WSU-15-010).

**추출 및 분획** - 팔콩나물을 건조하여 얻은 시료를 methanol로 진탕하면서 5시간씩 50°C에서 3회 온침 추출하였다. 그 추출액을 수욕상에서 감압농축하여 methanol 엑스 약 320 g을 얻었으며, 이 methanol 엑스를 증류수로 현탁시키고 상법에 따라 동량의 *n*-hexane(2.94g), methylene chloride(130.76g), ethyl acetate(1.90g) 및 *n*-butanol(19.40g)의 순으로 용매 분획하여 각각의 분획을 얻었다.

**예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)의 배양**<sup>8)</sup> - 본 연구에 사용된 *C. elegans* (N2 : wild type)는 Caenorhabditis Genetic Center(CGC; University of Minnesota, Minneapolis, MN)로부터 제공 받은 것을 사용하였다. *C. elegans*는 *Escherichia coli* OP50를 도말한 Nematode Growth Medium(NGM) agar plate에서 20°C의 온도로 배양하였다. 각각의 팔콩나물 분획은 DMSO를 용매로 한 stock solution 상태로 멸균된 NGM plate(50°C)에 첨가하였다. 최종 DMSO 농도는 모든 상태에서 0.1%(v/v)를 유지하였다.

**수명연장효능평가**<sup>9)</sup> - 수명분석은 20°C에서 독립적으로 3회 실행하였다. 선충의 성장단계를 일치시키기 위해 NGM plate로부터 알만을 분리하여 팔콩나물 분획 수용액(500 µg/mL)을 첨가한 각각의 plate에 옮겨 배양하였고 매일 생존을 확인하였다. 생존여부의 확인은 *C. elegans*를 platinum wire의 끝으로 자극했을 때의 반응을 통해 확인하였다.

**스트레스 저항성 평가**<sup>10,11)</sup> - 성장 단계가 동일한 선충을 각각의 분획별 plate에서 배양하였다(500 µg/mL). 온도에 의한 내성을 분석하기 위해 선충을 신선한 배지로 옮기고 성체가 된 후 4일째에 36°C에서 배양하여 시간 별로 생존율을 19시간 동안 측정하였다. 산화적 스트레스에 의한 내성은 기존의 방법을 약간 변형하여 평가하였으며, 성체가 된 후 7일째에 일시적으로 선충을 1 mM juglone이 함유된 M9 buffer가 담긴 96 well plate의 well에 옮기고 시간 별로 생존율을 확인하였다(500 µg/mL).

**선충 체내의 항산화 효소(SOD, catalase) 활성 측정**<sup>12,13)</sup> - 성장 단계가 동일한 N2 선충을 각각의 분획별 plate에서 배양하였다(500 µg/mL). 성체가 된 후 4일째에 선충을 모아 M9 buffer로 3회 세척 후 분쇄하여 효소활성 측정에 사용하였다(homogenization buffer: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5). SOD 활성은 Ibrahim 등의 방법을 응용하여 측정하였다. 먼저 10 mM phosphate buffer(pH 8.0)를 용매로 반응혼합물(1.6 mM xanthine과 0.48 mM NBT) 0.49 mL를 만든 뒤 sample 10 µL와 37°C에서 5분간 pre-incubation시켰다. 그 후 xanthine oxidase 1

mL(0.05 U/mL)을 첨가하고 37°C에서 다시 20분 동안 incubation시킨 다음 69 mM SDS로 반응을 멈추고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catalase activity는 Aebi의 방법을 응용하여 25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 시료 50 µL(500 µg/mL)를 3분 동안 반응시키고 240 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**선충 세포 내 활성 산소종(ROS) 분석**<sup>14)</sup> - 세포 내 활성 산소종은 2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA)를 사용하여 측정하였다. 성장 단계가 동일한 N2 선충을 각 분획별 plate에서 배양하였다(500 µg/mL). 성체가 된 후 4일째 50 µM juglone을 함유한 M9 buffer에 넣고 2시간 노출시킨 뒤 96 well plate에 담긴 50 µL M9 buffer에 5마리씩 옮겼다. 마지막으로 25 µM H<sub>2</sub>DCF-DA 50 µL를 첨가한 뒤 여기 485 nm, 방출 535 nm에서 흡광도를 각각 측정하였다.

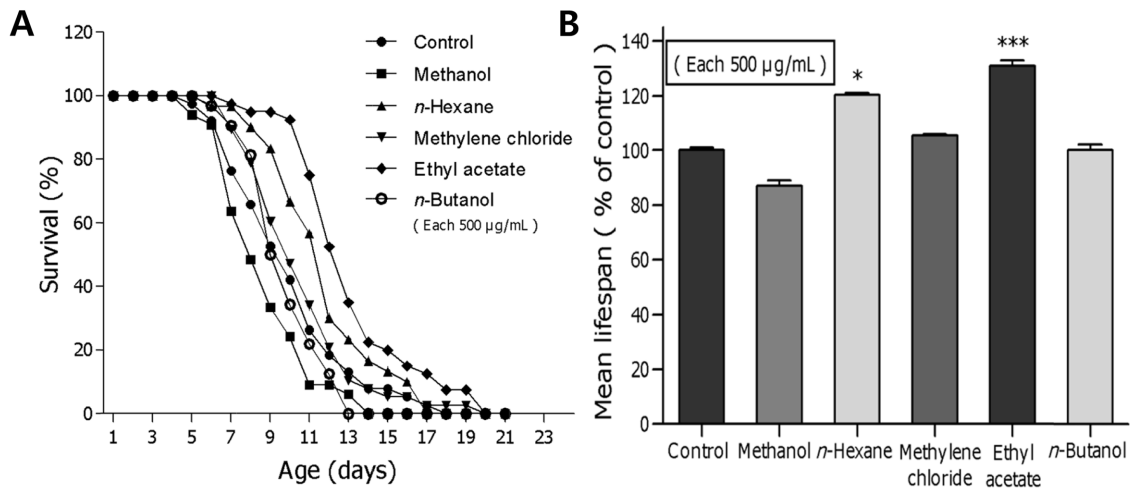
**형질 전환 선충 내 SOD-3::GFP와 HSP-16.2::GFP의 형광 측정** - 형질 전환된 선충 SOD-3::GFP를 가지고 있는 CF1553과 HSP-16.2::GFP를 가지고 있는 CL2070을 팔콩나물 분획이 투여된 배지에서 배양하였다. 성체가 된 후 4일째에 사용되었으며, 현미경 관찰 전 CL2070은 2시간 동안 36°C에서 열 스트레스를 가하고 4시간 동안 20°C에서 회복시켰다. 모든 개체의 선충은 sodium azide(2%)로 마취시켰고 GFP 발현은 형광 실체 현미경(Olympus, Japan)로 관찰하였다. 발현강도를 정량, 분석 하기 위해 현미경을 이용한 사진 촬영과 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 모든 실험은 3회에 걸쳐 반복하였다.

**노화 관련인자 분석** - 팔콩나물 분획 수용액을 처리한 plate에서 성장 단계가 동일한 N2 선충을 배양하였다. 생식 측정은 모체와 자손을 구별하기 위해 L4 유충을 개별적으로 매일 깨끗한 plate에 옮겼으며, 자손은 L2 또는 L3 단계에서 계산되었다. 그리고 선충의 식이량을 알아보기 위해 4, 8일이 된 성충을 깨끗한 NGM plate로 옮겨 1분 동안 인두의 움직임을 측정하였다. 또한 선충의 몸길이는 4일째, 운동량은 성체 4일, 8일째에 측정하였다. 몸길이와 운동량은 Olympus software(Olympus, Japan)를 이용해 분석하였고 모든 실험은 동일하게 수회 반복하였다. 모두 각 분획물 500 µg/mL 농도에서 실험을 진행하였다.

**통계 분석** - 통계 자료의 값은 평균값±표준오차(mean±S.E.M.)로 표시 하였다. 그룹 간의 통계적 유의성 검정은 Student's t-test를 통해서 분석하였고 선충의 연속적인 생존도는 Log-rank test분석 방법을 이용하였다. *p*값은 \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 결 과

**팔콩나물 분획의 *C. elegans* 수명 연장효능 - 야생형 N2**



**Fig. 1.** Effects of fractions from red bean sprouts on the lifespan of wild-type N2 nematodes. Worms were grown in the NGM agar plate at 20°C in the absence or presence of fractions from red bean sprouts. The number of worms used per each lifespan assay experiment was 30-40 and three independent experiments were repeated (N=3). (A) The mortality of each group was determined by daily counting of surviving and dead animals. (B) The mean lifespan of the N2 worms was calculated from the survival curves. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test. Error bars represent the standard error of mean (S.E.M.). Differences compared to the control were considered significant at \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  by one-way ANOVA.

**Table I.** Effects of fractions from red bean sprouts on the lifespan of *C. elegans*

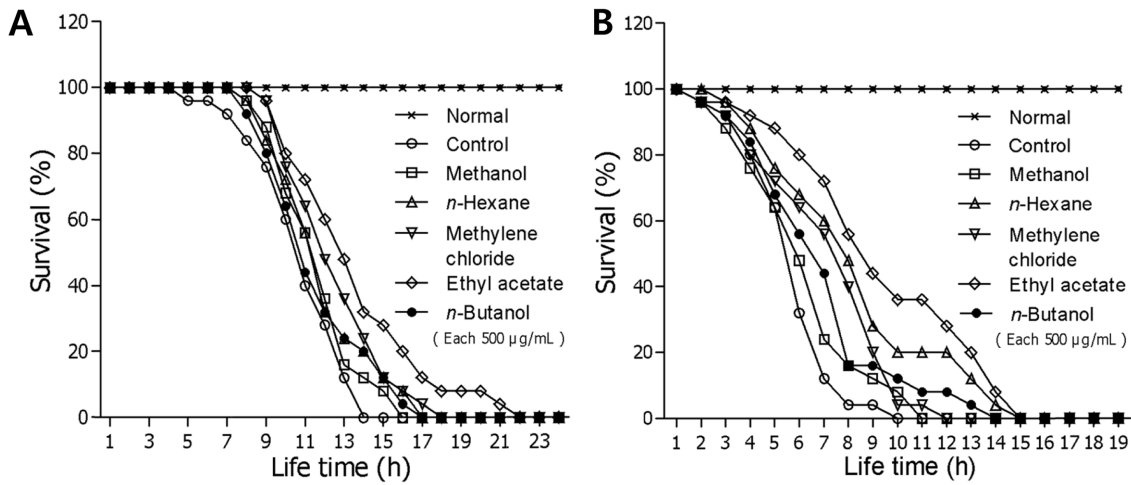
Fraction (500 µg/mL)	Mean Lifespan (day)	Maximum lifespan (day)	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
Control	10.0±0.4	18	-	-
Methanol	8.7±0.4	14	-12.9	-
n-Hexane	12.1±0.5	17	20.3	* $p < 0.05$
Methylene chloride	10.6±0.4	20	5.8	-
Ethyl acetate	13.2±0.4	20	31.7	*** $p < 0.001$
n-Butanol	10.0±0.4	13	0.1	-

Mean lifespan presented as mean±S.E.M data. Change in mean lifespan compared with control group (%). Statistical significance of the difference between survival curves was determined by log-rank test using the Kaplan-Meier survival analysis. Differences compared to the control were considered significant at \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

선충을 이용하여 팔콩나물 분획의 수명에 미치는 영향을 관찰하였으며, Fig. 1에서 보는 바와 같이 팔콩나물 분획 중 ethyl acetate분획이 가장 강하게 *C. elegans*의 수명을 연장시켰다. 대조군의 평균 수명 기간은 10.1±0.4일이었으나, ethyl acetate분획 처리군은 선충의 평균 수명을 13.2±0.4일로 팔콩나물의 ethyl acetate분획이 대조군과 비교하여 31.7% 수명을 연장시켰다(\*\*\* $p < 0.001$ )(Fig. 1, Table 1).

**스트레스 저항성 증가 효능** - 팔콩나물 분획이 선충의 스트레스 저항성에 미치는 영향을 알아보기 위해 고온 및 산화적 스트레스 조건에서 선충을 배양하여 생존율을 확인하였다. 선충에게는 고온 조건인 36°C에서 생존도를 관찰한 결과 대조군은 4시간 후부터 죽기 시작하여 13시간 만에 모

두 사멸한 반면, 팔콩나물 분획 처리군 중 ethyl acetate분획의 생존 기간이 가장 길었다. 대조군의 평균 생존시간이 9.8±0.4시간이었으나 ethyl acetate 분획 처리군은 평균 생존시간이 12.7±0.6시간으로 29.6%의 생존 시간을 향상시켰다 (\*\* $p < 0.01$ )(Fig. 2A, Table 2). 선충에 산화적 스트레스를 유도하기 위해서 1 mM juglone이 함유된 M9 buffer가 담긴 96 well plate에서 배양한 대조군 선충의 최고 생존시간은 9시간이었으나, ethyl acetate분획은 생존시간을 14시간으로 가장 크게 증가시켰으며, 평균 생존시간도 가장 높았다. 대조군의 평균 생존시간이 4.8±0.3시간이었으나 ethyl acetate분획 처리군은 평균 생존 시간을 8.5±0.7시간으로 76.0%의 생존 시간을 향상시켰다(\*\*\* $p < 0.001$ )(Fig. 2B, Table 2).



**Fig. 2.** Effects of fractions from red bean sprouts on the stress tolerance of wild-type N2 nematodes. (A) To assess thermal tolerance, worms were incubated at 36°C and then their viability was scored. (B) For the oxidative stress assays, worms were transferred to 96-well plate containing 1 mM of juglone liquid culture, and then their viability was scored. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test. All experiments were done in triplicates.

**Table II.** Effects of fractions from red bean sprouts on the stress tolerance of *C. elegans*

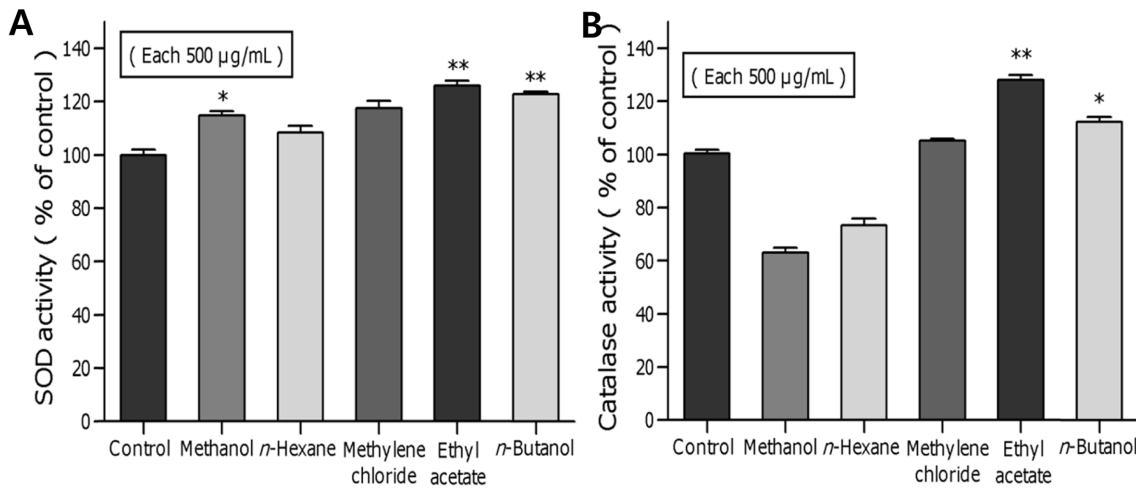
Stress condition	Fraction (500 µg/mL)	Mean lifespan (h)	Maximum lifespan (h)	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
36°C thermal tolerance	Control	9.8±0.4	13	-	-
	Methanol	10.8±0.4	15	9.7	-
	n-Hexane	11.0±0.4	16	12.1	-
	Methylene chloride	11.6±0.4	17	18.6	**p<0.01
	Ethyl acetate	12.7±0.6	21	29.6	**p<0.01
	n-Butanol	10.7±0.5	16	8.9	-
1 mM Juglone	Control	4.8±0.3	9	-	-
	Methanol	5.3±0.4	10	29.7	-
	n-Hexane	7.4±0.6	14	52.8	**p<0.01
	Methylene chloride	6.2±0.5	11	29.7	*p<0.05
	Ethyl acetate	8.5±0.7	14	76.0	***p<0.001
	n-Butanol	6.0±0.5	13	24.7	*p<0.05

Mean lifespan presented as mean±S.E.M data. Change in mean lifespan compared with control group (%). Statistical significance of the difference between survival curves was determined by log-rank test using the Kaplan-Meier survival analysis. Differences compared to the control were considered significant at p<0.05\* and \*\*\* p<0.001.

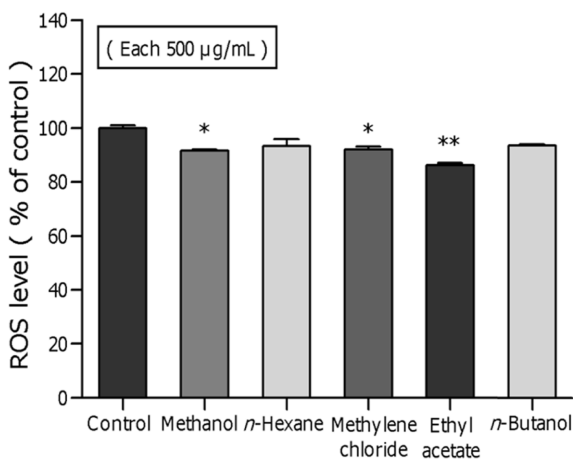
**선충 체내의 항산화 효소(SOD, catalase) 활성 증가 효능** - 본 연구에서는 xanthine을 기질로 xanthine oxidase의 효소반응 과정 중에 생성되는 superoxide anion을 활용하여 SOD의 활성을 측정하였다. Fig. 3A에서 보는 바와 같이 선충의 ethyl acetate분획 투여군이 SOD의 활성을 가장 높게 증가시켰으며, 팥콩나물 분획 중 ethyl acetate층 투여군은 대조군과 비교하여 SOD 활성을 약 26.0% 정도 증가시켰다(\*\*p<0.01)(Fig. 3A). 한편 SOD에 의해 생성된 hydrogen

peroxide 역시 강력한 반응성을 가진 활성 산소종으로 체내에서는 catalase에 의해 대사되는데, Fig. 3B에서 나타난 바와 같이 팥콩나물 분획 중 ethyl acetate분획 투여군이 대조군에 비해 유의성 있게 catalase활성을 약 26.3% 정도 증가시켰다(\*\*p<0.01)(Fig. 3B).

**선충 세포내 활성 산소종(ROS) 감소 효능** - 팥나물 분획의 세포 내 활성 산소종의 감소 효능을 알아보기 위해 H<sub>2</sub>DCF-DA와 선충 내부의 활성 산소종을 반응시켜 형광을



**Fig. 3.** Effects of fractions from red bean sprouts on the stress resistance proteins of wild type N2 nematodes. (A) The enzymatic reaction of xanthine with xanthine oxidase was used to generate  $\bullet\text{O}_2^-$  and the SOD activity was estimated spectrophotometrically through formazan formation by NBT reduction. SOD activity was expressed as a percentage of the scavenged amount per control. (B) Catalase activity was calculated from the concentration of residual  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as determined by a spectrophotometric method. Catalase activity was expressed in U/mg protein. Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments (N=3). Differences compared to the control were considered significant at \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 by one-way ANOVA.



**Fig. 4.** Effects of fractions from red bean sprouts on the intracellular ROS accumulation of wild type N2 nematodes. Intracellular ROS accumulation was quantified spectrometrically at excitation 485 nm and emission 535 nm. Plates were read every 30 min for 2 h. Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments (N=3). Differences compared to the control were considered significant at \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 by one-way ANOVA.

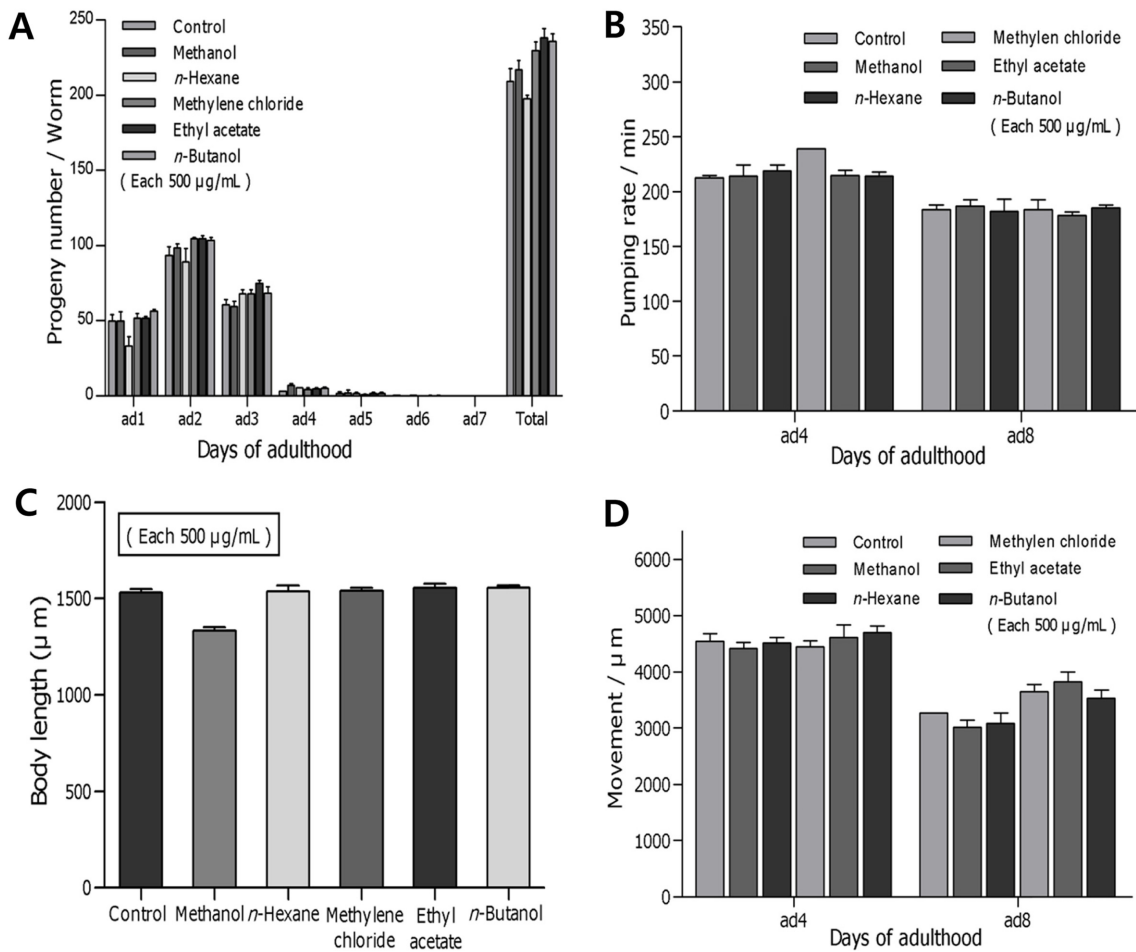
관찰하였다. 활성 산소종 형광의 감소 폭은 대조군과 비교하여 ethyl acetate분획 투여군에서 약 13.5% (\*\* $p$ <0.01)로 유의성 있게 관찰되어 가장 강한 활성 산소종 축적 억제효능 나타냈다(Fig. 4).

**형질 전환 선충 내 SOD-3, HSP-16.2 발현 증가 효능** – SOD 발현 유전자와 열 스트레스 조건 하에 내성 스트레스 반응 유전자의 증가 여부를 알아보기 위해, SOD-3 및 HSP-16.2를 포함한 형질 전환 선충 CF1553 및 CL2070을 사용하였다. CF1553 형질전환 선충에 팔콩나물 ethyl acetate분획을 투여한 군이 처리되지 않은 선충에 비해(Fig. 6A and 6C) 상당히 높은 SOD-3::GFP 발현율(17.2%, \*\* $p$ <0.01)을 보여주었다. CL2070 유전자를 포함한 선충을 2시간 동안 36°C에서 열처리를 가하고 4시간 동안 20°C에서 회복시킨 후 HSP-16.2::GFP 형광 강도를 정량한 결과, 팔콩나물의 ethyl acetate분획 투여군은 heat shock으로 유발된 HSP-16.2::GFP 발현을 약 9.8% (\* $p$ <0.05) 증가시켰다(Fig. 6B and 6D).

**노화 관련인자 분석** – 팔콩나물 분획 투여에 따른 선충의 수명 메커니즘에 미치는 영향을 확인하기 위해 생식, 섭식, 몸길이 및 운동량을 측정하였다. 대조군과 비교하여 선충의 생식, 4일과 8일째 식이량, 몸길이와 4일과 8일째 움직임 모두 유의성 있는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 5A-5D).

## 고찰

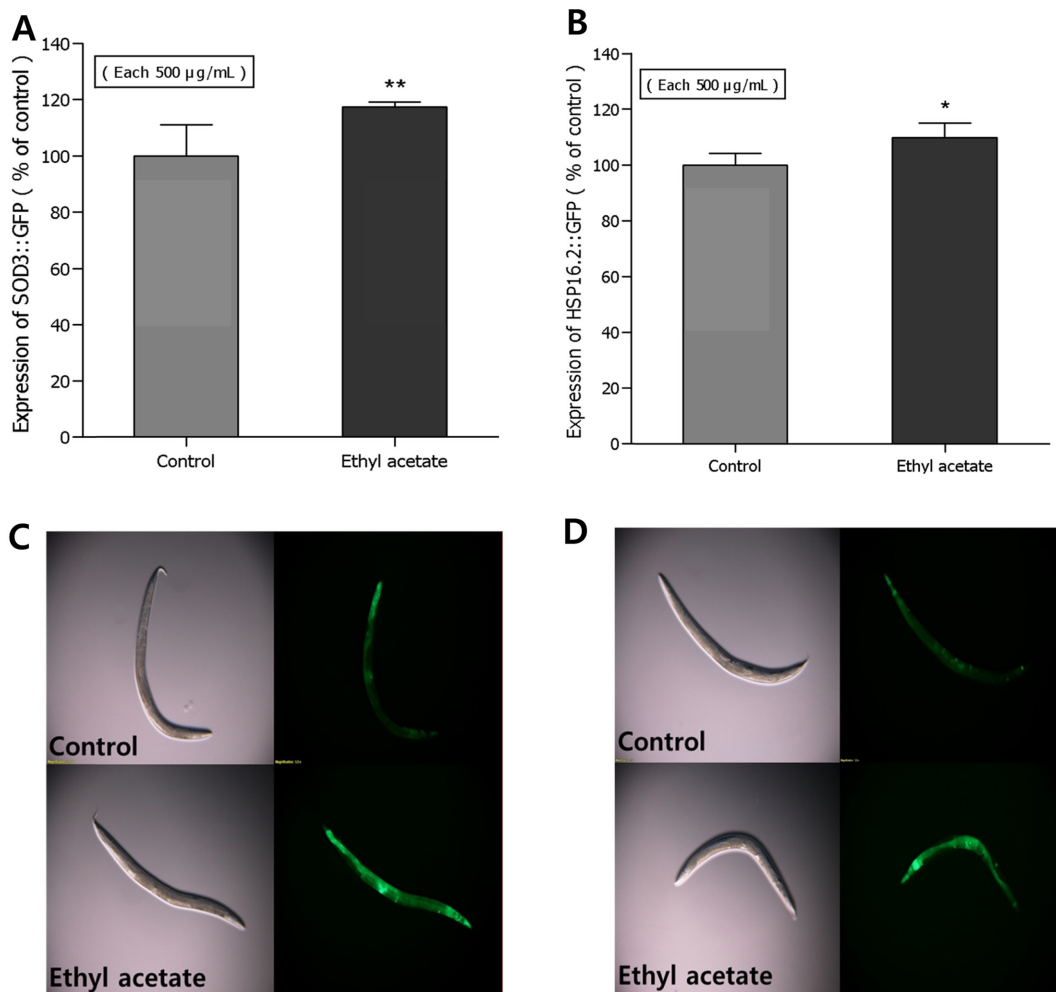
팥은 오랫동안 식품으로 이용되면서 항염증과 항산화 활성이 있는 약용식물로 알려져 있다.<sup>15-17)</sup> 본 연구에서는 예쁜꼬마선충을 모델로 사용하여 팔콩나물 분획에 대해 각각



**Fig. 5.** Effects of fractions from red bean sprouts on the various aging-related factors of wild-type N2 nematodes. (A) Daily and total reproductive outputs were counted. The progeny was counted at the L2 or L3 stage. (B) On the 4th days of adulthood, the pharyngeal pumping rates were measured. (C) For the growth alteration assay, photographs were taken of worms and the body length of each animal was analyzed. (D) The body movements were counted under a dissecting microscope for 10 seconds.

의 수명연장에 대한 실험을 하였다. 예쁜꼬마선충은 *E. coli* 를 먹이로 하며, 길이는 약 1 mm 정도이고 몸이 투명하여 별도의 염색과정 없이 실체 현미경으로 쉽게 관찰이 가능하다. 20°C에서 20일 정도의 짧은 수명을 가지며, 자웅동체와 수컷의 두 가지 성을 나타내고, 교배가 쉬우며 성충 한 마리가 약 300마리의 자손을 낳기 때문에 최근 천연물을 이용한 수명연장 실험에 활용되고 있다.<sup>18)</sup> 현재 팥을 팔콩나물로 재배시의 성분 변화는 보고되어 있지 않으며, 같은 두류인 일반 콩나물의 성분은 발아과정을 통해서 지방의 함량은 감소하고, 섬유질과 단백질은 증가하며 특히 비타민의 함량변화가 뚜렷하게 나타남이 보고되어 있다.<sup>19)</sup> 비타민 C는 콩에서는 관찰되지 않으나 콩나물에서는 발아과정에서 합성이 되고, soyasapogenol B 등의 미량성분의 함량도 증가하며,<sup>20)</sup> 항산화 활성을 나타내는 β-carotene 성분의 변화도 보고되어 있다.<sup>21-23)</sup>

팔콩나물 분획에 따른 수명비교실험을 위해 일반적인 배양환경에서 야생형 N2 선충을 이용하였으며, 시간에 따른 선충의 생존율을 확인하였다. 선충의 생존율을 측정된 결과 팔콩나물의 ethyl acetate 분획이 가장 높은 유의성 있는 생존율을 나타냈다. 선충의 수명 연장 효능은 선충의 생존과 수명에 영향을 주는 스트레스와 관련이 되어 있으므로 생존율과 수명연장에 영향을 미치는 열과 산화적 스트레스 조건에서 선충의 저항성을 측정 하였다.<sup>24)</sup> 열 스트레스 조건에서 팔콩나물 분획 중 ethyl acetate 분획을 처리한 선충군이 대조군에 비해 가장 높은 생존율을 보였으며, juglone으로 유발시킨 산화적 스트레스 조건에서도 같은 결과를 보였다. 이러한 결과는 팔콩나물의 ethyl acetate 분획이 선충의 수명연장 효능이 이러한 스트레스 저항능과 상당한 관련이 있음을 시사한다. 열 스트레스 조건하에서 heat shock protein-16.2(HSP-16.2)을 발현시키는 *C. elegans* mutant를



**Fig. 6.** Effects of red bean sprouts on the expression of SOD-3 and HSP-16.2 was determined using transgenic nematodes. Mean GFP intensity of CF1553 (A) and CL2070 (B) mutants were represented as mean±S.E.M. of values from 20 to 25 animals per each experiment. The GFP intensity was quantified using Image software by determining average pixel intensity. Images of SOD-3::GFP (C) and HSP-16.2::GFP (D) expressions of CF1553 worms in the presence or absence of red bean sprouts. Data are expressed as the mean±standard deviation of three independent experiments (N=3). Differences compared to the control were considered significant at \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  by one-way ANOVA.

이용하여 팥콩나물의 ethyl acetate분획이 이 단백질의 발현에 미치는 영향을 살펴보았다.<sup>25)</sup> 팥콩나물의 ethyl acetate분획의 열 스트레스 저항성을 살펴 본 결과 HSP-16.2 발현을 대조군과 비교하여 상당히 증가시킨 것이 확인되었다. 또한, GFP-fused transgenic strain CL2070을 이용하여 juglone으로 인한 산화적 스트레스 저항성에서도 형광 발현율이 상당히 증가함을 확인되어 산화적 스트레스에 저항성이 있는 단백질의 발현이 증가되었음을 확인하였다. 스트레스에 저항할 수 있는 능력은 노화방지 및 수명연장과 상당한 관련이 있다는 보고가 있으며, 팥콩나물 분획이 선충의 스트레스에 대한 저항력을 높여 선충의 수명연장에 영향을 미치는 것으로 추측할 수 있다.<sup>2,26-28)</sup> 기존의 보고에 따르면 ROS

는 세포의 호흡, 세포의 손상, phagocytosis 및 주변의 산화물 등에 의해 부산물로 생성하며, 산화적 스트레스는 항산화제의 결핍 및 방어할 수 있는 양 이상의 ROS의 수치가 원인으로 작용할 수 있음이 보고되어 있으며,<sup>29)</sup> 이러한 산화적 스트레스는 노화 및 암을 포함한 여러 질병의 원인으로 보고되어 있다.<sup>30)</sup> 팥콩나물 분획이 선충의 항산화 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 선충의 ROS 축적억제 능력을 측정된 결과 시료를 투여한 군에서 대조군과 비교했을 때 ethyl acetate분획이 가장 높은 ROS 축적을 억제하는 효능을 보여 주었다. 또한 ethyl acetate분획은 선충의 SOD와 catalase의 활성을 가장 크게 증가시켰다.

Ethyl acetate분획을 비롯한 팥콩나물 분획들은 선충의 구

조직, 기능적인 면에 미치는 영향을 실험하기 위해 생식, 인두의 움직임 횟수, 몸길기와 운동량을 측정 하였다. 4가지 구조적, 기능적인 변화를 대조군과 비교한 결과 모두 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 이러한 결과는 팔콩나물 분획이 노화관련인자에 영향을 주어 선충의 수명을 연장하는 것이 아님을 시사한다. 이 결과는 팔콩나물 ethyl acetate분획이 선충의 스트레스 및 ROS의 발생을 감소시키는 능력이 향상되어 lifespan에 유익한 효과를 나타내는 것으로 추측할 수 있다. 팥의 성분 중 flavonoid, polyphenol, anthocyanin, proanthocyanidin 등은 기존의 항산화 활성이 알려진 성분들로서 스트레스 저항능력을 향상시켜 선충의 수명연장에 영향을 주는 성분의 구성물질로 작용할 수 있을 것으로 생각되며, 앞으로 팔콩나물에도 이와 같은 물질들이 함유되어 있는지 또는 다른 물질에 의한 효능인지에 대해 더 많은 연구들이 이루어져야 할 것으로 사료된다.<sup>7,31)</sup>

## 결 론

팔콩나물의 수명연장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 예쁜꼬마선충을 실험동물로 사용하였다. 수명연장실험에서 팔콩나물 분획 중 ethyl acetate분획 투여군이 대조군에 비해 가장 높은 수명연장 효과를 나타냈으며, 열과 산화적 스트레스 조건하에서도 가장 높은 생존율을 보여 주었다. 선충 내에 존재하는 항산화 효소인 SOD와 catalase활성 평가와 선충 세포 내의 ROS측정에서도 ethyl acetate분획이 가장 높은 SOD와 catalase 효소의 증가와 ROS 축적량의 감소 효과를 보여 주었다. 이 외에 수명연장의 노화 관련 요소인 생식, 섭식, 몸길이, 운동능력 등을 측정한 결과 팔콩나물 분획들의 처리는 유의성 있는 영향을 미치지 않았다.

## 사 사

이 논문은 농촌진흥청 어젠다연구개발사업(Project No. PJ0092182015)의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. Kwon, G. J., Choi, D. S. and Wang, M. H. (2007) Biological activities of hot water extracts from *Euonymus alatus* leaf. *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**: 569-574.
2. Harman, D. (1956) Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**: 298-300.
3. Gutteridge, J. M. C. and Halliwell, B. (1994) Antioxidants in nutrition, health, and disease, 1-62, Oxford University Press, Oxford.
4. Li, H., Yashiki, S., Sonoda, J., Lou, H., Ghosh, S., Byrnes, J., Lema, C., Fujiyoshi, T., Karasuyama, M. and Sonoda, S. (2000) Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Cancer Sci.* **91**: 34-40.
5. Koh, K. J., Shin, D. B. and Lee, Y. C. (1997) Physico-chemical properties of aqueous extracts in small red bean, mung bean and black soybean. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**: 854-859.
6. Ryszard, A. and Ronald, B. P. (2006) Content of proanthocyanidins in selected plant extracts as determined via *n*-butanol/HCl hydrolysis and a colorimetric assay or by HPLC. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **56**: 319-322.
7. Woo, K. Song, S. and Ko, J. (2010). Antioxidant components and antioxidant activities of methanolic extract from Adzuki Beans. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**: 693-698.
8. Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
9. Lithgow, G. J., White, T. M., Melov, S. and Johnson, T. E. (1995) Thermo tolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 7540-7544.
10. Lee, E.Y., Shim, Y. H., Chitwood, D. J., Hwang, S. B., Lee, J. and Paik, Y. K. (2005) Cholesterol-producing transgenic *Caenorhabditis elegans* lives longer due to newly acquired enhanced stress resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**: 929-936.
11. Mekheimer, R. A., Sayed, A. A. A. and Ahmed, E. A. (2012) Novel 1,2,4-triazolo[1,5-a]pyridines and their fused ring systems attenuate oxidative stress and prolong lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *J. Med. Chem.* **55**: 4169-4177.
12. Ibrahim, H. R., Hoq, M. I. and Aoki, T. (2007) Ovotransferrin possesses SOD-like superoxide anion scavenging activity that is promoted by copper and manganese binding. *Int. J. Biol. Macromol.* **41**: 631-640.
13. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Method. Enzymol.* **105**: 121-126.
14. Kim, D. K., Jeon, H. and Cha, D. S. (2014) 4-Hydroxybenzoic acid-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *J. Funct. Foods* **7**: 630-640.
15. Yu, T., Ahn, H. M., Shen, T., Yoon, K., Jang, H.-J., Lee, Y. J., Yang, H. M., Kim, J. H., Kim, C., Han, M. H., Cha, S.-h., Kim, T. W., Kim, S. Y., Lee, J. and Cho, J. Y. (2011) Anti-inflammatory activity of ethanol extract derived from *Phaseolus angularis*. *J. Ethnopharm.* **137**: 1197-1206.
16. Kim, M. H. Jeoung, S. H. Lee, S. W. Kim, H. K. Park, C. S. Jeon, B. H., Oh, H. M. and Rho, M. C. (2012) Effect of *Vigna angularis* on toll like receptor activation and pro-inflammatory cytokine production. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* **26**: 511-518.
17. Koide, T., Hashimoto, Y., Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M. and Terabe, K. (1997) Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans *in vitro* and *in vivo*.



- Cancer Biother. Radiopharm.* **12**: 277-280.
18. Guha, S., Natarajan, O., Murbach, C. G., Dinh, J., Wilson, E. C., Cao, M., Zou, S. and Dong, Y. (2014) Supplement timing of cranberry extract plays a key role in promoting *Caenorhabditis elegans* healthspan. *Nutrients* **21**: 911-921.
  19. Kim, K. H. (1981) Studies on growing characteristics of soybean sprout. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **13**: 247-252.
  20. Rupasinghe, H. P. V., Jackson, C. J. C., Poysa, V., Berardo, C. D., Bewley, J. D. and Jenkinson, J. (2003) Soyasapogenol A and B distribution in soybean (*Glycine max* L. Merr.) in relation to seed physiology, genetic variability, and growing location. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 5888-5894.
  21. Kim, J. W. (2001) Methodology of carotenoids chemistry. *Kor. J. Food & Nutrition* **14**: 360-366.
  22. Stahelin, H. B., Gey, K. F., Eichholzer, M. and Ludin, E. (1991) Beta-carotene and cancer prevention: the Basel study. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**: 265S-269S.
  23. Lee, H. S., Kim, Y. N. (1997) Beta-carotene and lutein contents in green leafy vegetables. *J. East Asian Soc. Diet. Life* **7**: 175-180.
  24. Zhang, L., Jie, G., Zhang, J. and Zhao, B. (2009) Significant longevity-extending effects of EGCG on *C. elegans* under stress. *Free Radic. Biol. Med.* **46**: 414-421.
  25. Swindell, W. R. (2009). Heat shock proteins in long-lived worms and mice with insulin/insulin-like signaling mutations. *Aging (Albany NY)* **1**: 573-577.
  26. Berger, M. M. (2005) Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin. Nutr.* **24**: 172-183.
  27. Bokov, A., Chaudhuri, A. and Richardson, A. (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.* **125**: 811-826.
  28. Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-247.
  29. Saran, M. and Bors, W. (1990) Radical reaction in vivo – an overview *Radiat. Environ. Biophys.* **29**: 249-262.
  30. Sun, Y. (1990) Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **8**: 583-599.
  31. Wang H., Cao, G. and Prior, R. L. (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agri. Food Chem.* **45**: 304-309.
- (2015. 9. 10 접수; 2015. 9. 18 심사; 2015. 9. 21 게재확정)