

## 콜라비 추출물의 항산화 및 항염 효능

이미란<sup>1</sup> · 강창희<sup>1,2</sup> · 부희정<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 생명과학기술혁신센터, <sup>2</sup>제주대학교 화학·코스메틱스학부  
(2017년 5월 24일 접수: 2017년 6월 8일 수정: 2017년 6월 14일 채택)

### Antioxidant and anti-inflammatory activity of extracts from kohlrabi (*Brassica Oleracea* var. Gonglodes)

Mi-Ran Yi<sup>1</sup> · Kang Chang-Hee<sup>1,2</sup> · Hee-Jung Bu<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Regional Innovation Center, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Chemistry & cosmetics, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

(Received May 24, 2017; Revised June 8, 2017; Accepted June 14, 2017)

**요약** : 본 연구는 콜라비 추출물의 항산화 및 항염 효능을 조사하기 위하여 수행하였다. 콜라비는 70% 에탄올을 이용하여 조추출한 후 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올을 이용하여 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하였다. 항산화 활성은 총폴리페놀 함량 측정과 ABTS 라디칼 소거활성을 측정하여 평가하였다. 에틸아세테이트 분획물이 총폴리페놀 함량(27.33±0.26 mg GAE/g)과 ABTS 라디칼 소거활성(IC<sub>50</sub> 172.9±1.6 µg/mL)이 가장 높게 측정되었다. 항염 활성은 RAW 264.7 세포를 이용하였으며, 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 항염 활성을 보였다. 에틸아세테이트 분획물의 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 전염증성 매개인자들에 대한 저해효과를 농도별로 측정하여 확인하였다. 콜라비 에틸아세테이트 분획물은 NO, PGE<sub>2</sub> 생성과 iNOS와 COX-2 및 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 와 같은 전염증성 사이토카인들의 단백질 발현을 농도의존적으로 저해하였다. 이러한 결과들은 콜라비가 항산화 및 항염 효능을 가지는 소재로서의 개발 가능성이 있음을 시사한다.

**주제어** : 항산화, 항염, 콜라비, 사이토카인, 대식세포

**Abstract** - This study was designed to examine the in vitro antioxidant and anti-inflammatory effects of kohlrabi (*Brassica oleracea* var. gonglodes) extract. Kohlrabi was extracted using 70% ethanol and then fractionated sequentially with *n*-hexane, ethyl acetate and butanol. Antioxidative

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: tang000@nate.com)

ability was evaluated by bioassays using total polyphenol contents and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid diammonium salt) radical scavenging activity. Ethyl acetate fraction of kohlrabi was best on total polyphenol contents ( $27.33 \pm 0.26$  mg GAE/g) and ABTS radical scavenging effects ( $IC_{50} 172.9 \pm 1.6$   $\mu$ g/mL). For the anti-inflammatory activity in RAW 264.7 cells, the EtOAc fraction showed the highest inflammatory effect. Dose response studies were performed to determine the inhibitory effect of EtOAc fraction of kohlrabi on pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. The EtOAc fraction of kohlrabi inhibited the NO and PGE<sub>2</sub> production and the protein level of iNOS and COX-2, and protein expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ ), in a dose-dependent manner. These results suggest that kohlrabi has considerable potential as a ingredient with antioxidative and anti-inflammatory effects.

*Keywords* : antioxidant, anti-inflammation, Brassica Oleracea var. Gonglode, cytokine, macrophage

## 1. 서론

생체 내에서 호기성 생물체들은 끊임없이 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)을 생성하는데, 항산화 효소계인 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase, SOD), 카탈라제(catalase, CAT) 등의 방어 기구와 비타민, 플라보노이드 등의 비효소적인 항산화제에 의해 활성 산소종의 생성과 제거 사이에 균형을 이루어 정상적인 세포 기능을 유지하고 있다[1]. 그러나 염증과 관련된 인체질환이 야기되거나, 자외선, 공해물질, 화학약품, 스트레스 등의 환경적 요인들, 또는 비정상적인 대사 작용으로 인하여 활성 산소종이 너무 많이 생성되어 항산화시스템 기능이 저하되면 세포는 superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ )과 hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ), 과산화수소( $H_2O_2$ ), hypochlorous acid (HOCl) 등의 활성산소를 과도하게 생성하게 되면 세포 구성 성분과 강하게 반응하여 세포에 유해 작용을 가하게 된다. 그로 인하여 지질 과산화, 단백질 산화, 세포간질성분을 파괴시키는 단백질 분해효소의 활성화, DNA 산화와 같은 구성 성분들의 손상을 야기한다. 이러한 손상의 결과로 고혈압, 협심증, 당뇨병, 암, 동맥경화, 파킨슨병, 뇌졸중

등과 같은 성인병 및 아토피성 피부염과 같은 염증성 질환이 발생하게 된다[2, 3, 4]. 현재 상용되고 있는 합성 항산화제인 butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT)는 단용 혹은 혼용으로 일정수준 이상 섭취 시 심각한 여러 질병을 유발 시킬 수 있다[5]. 또한 합성 항산화제는 이취(異臭)가 있고 고온에서 불안정하며[6], 기형 발생인자 발암 물질이 될 수 있고[7], 특히 합성 항산화제의 과용은 간, 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 심각한 독성작용을 발생시킨다. 따라서 활성산소 소거활성을 갖는 항산화 소재는 매우 중요하고 다양하게 연구되어지고 있다.

활성산소의 하나이면서 독성을 가진 매우 불안한 기체이며 고농도에는 세포의 기질적 손상을 초래하는 nitric oxide(NO)는 염증 반응 시에 inducible NO synthase(iNOS)에 의해 과도하게 생성되어 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시켜 염증을 심화시키게 된다[8]. 염증반응은 1차적 면역반응으로서 상처나 감염 등으로 인해 손상된 조직에 대해 여러 염증 매개인자들이 만들어지고 이로 인하여 부종, 발열, 통증, 조직손상, 세포증식 등을 특징으로 하는 생체 조직의 국소적 반응이다[9]. 대식 세포는 염

증 반응에서 방어적인 역할을 수행하는 혈액 단핵세포로부터 분화된 조직 세포로서, 그람 음성 세균의 세포외막에 존재하는 내독소 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), 및 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 등과 같은 염증성 cytokine의 분비를 증가시킨다[10]. 또한 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 생성되는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 생성되는 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 등의 염증유발인자들도 생성된다[11,12]. 이러한 염증매개물질의 형성은 phospholipase A2의 활성화로 인해 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)으로 바꾸는 과정 및 NO 형성 과정으로 이어지게 된다[13,14]. 염증상태에서 inducible NO synthase (iNOS)에 의해 생성된 NO는 염증반응을 촉진시켜 염증을 심화시키게 된다[15,16]. 한편 cyclooxygenase-2 (COX-2)는 염증반응, 면역반응 등에 관여를 하는 PGE<sub>2</sub>를 생성하여 지속적인 염증반응을 일으킨다[17,18,19]. 염증유발인자들은 NO 및 ROS의 생성을 더 자극하게 되고 염증반응이 과도해지면 동맥경화증, 류마티스 관절염, 천식, 기관지염, 다발성 경화증 등 유발의 원인이 됨으로 이러한 만성질환의 예방 및 치료를 위하여 항산화 및 항염증 소재 개발이 중요시되고 있다[20].

콜라비(*Brassica Oleracea* var. *Gonglodes*)는 순무양배추라고도 하는데, 이름은 독일어 Kohl (양배추)과 rabic(순무)의 합성어로 만들어졌다. 양배추에서 분화된 두해살이풀로 원산지는 북유럽의 해안지방이며, 품종은 아시아군과 서유럽군으로 분류된다. 순무와 유사하며, 길이 자줏빛 또는 초록빛인 두 종류가 있으며, 속은 모두 하얗다. 수분함량이 90% 이상으로 줄기부분은 아삭하고 단맛이 있어 생으로 먹는 것이 일반적이며, 잎은 짙은 짙은 채소로 활용한다. 비타민 C와 칼슘이 풍부하고 칼로리는 낮아 건강식품으로 많이 활용된다. 기존 콜라비의 생리활성에 대한 연구는 착즙액이나 부위별 혹은 새싹추출물에 대한 항산화

활성, 암세포 증식 억제 효능, 새싹으로부터 sterol 화합물 분리 및 지방세포분화 억제 활성 등이 되어있다[21,22,23,24].

본 연구에서는 자색 콜라비 추출물을 대상으로 항산화 및 항염증 활성을 갖는 기능성 식품 소재 자원으로 활용 가치가 있는지 극성에 따라 순차적으로 용매 분획을 하여 시험에 사용하였다. 제작된 70% ethanol(EtOH) 추출물과 용매 분획물들의 총 폴리페놀 함량 및 ABTS 라디칼 소거 활성 평가를 통하여 항산화 효능을 갖는 분획물을 확인하였고, 염증성 매개인자인 NO, PGE<sub>2</sub>의 생성 억제 및 이를 합성하는 iNOS와 COX-2 단백질 발현 억제와 염증성 cytokine 억제 효과를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 기기

본 실험에서 시료의 추출 및 용매분획에 사용된 유기용매들은 Daejung (Korea)의 제품을, 항산화 실험에 사용된 시약들은 Sigma-Aldrich사 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, 흡광도의 측정에는 epoch spectrophotometer를 사용하였다(BioTek, USA). 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank)으로부터 구입하였고, 실험에 사용된 배지의 penicillin-streptomycin, fetal bovine serum (FBS), dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)은 GIBCO (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma-Aldrich Co. (USA)를 사용하였다. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 와 PGE<sub>2</sub>의 측정은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D system, USA)를 사용하였다. 단백질 발현 측정에 사용된 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane은 BIO-RAD (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)사 제품을 사용하였다. 단백질 발현은 Chemidoc (Fusion solo, VILBER

LOURMAT, Germany)을 이용하여 확인하였다.

## 2.2. 시료 추출

자색 콜라비는 2015년 2월에 유기농으로 재배되어 수확된 것을 제주도 친환경 농산물 유통업체인 생드르 영농조합법인에서 같은 해 3월에 구입한 것을 사용하였다. 입한 시료를 40°C에서 3일간 열풍 건조하여 얻어진 시료 79g 분말을 20배의 70% ethanol (EtOH)을 가하여 총 3회 추출하였으며, 감압 농축하여 70% EtOH 조추출물 45g 얻었다. 이 후 얻어진 조추출물을 증류수로 현탁시킨 후에 *n*-hexane 1 L씩 3회, ethyl acetate(EtOAc) 1 L씩 3회, 그리고 butanol(BuOH) 1 L씩 3회로 순차적으로 분획 및 농축하여 각각의 분획물을 확보한 후 동결 건조하고 -20°C에서 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다(Fig. 1).

## 2.3. 실험 방법

### 2.3.1 총 polyphenol 함량 분석

총 페놀 함량은 Folin-Denis 방법으로 측정하였다[25]. 실험 시료는 70% EtOH에 100 mg/mL의 농도로 제조하여 시료 용액 200  $\mu$ L와 증류수 1,800  $\mu$ L을 혼합하고, Folin-

Ciocalteau's phenol reagent 200  $\mu$ L을 가하여 잘 섞은 후 5분간 상온에서 반응시켰다. 여기에 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 400  $\mu$ L을 가하여 혼합한 다음 증류수를 가하여 4 mL로 조정하였다. 이 용액을 상온 암소에서 1시간 동안 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였고, gallic acid를 이용한 검량선과 비교하여 총 페놀함량을 mg gallic acid equivalents(GAE)/g로 나타내었다.

### 2.3.2. ABTS 자유유리기 소거활성

라디칼 소거활성 측정을 위해 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS)는 Roberta 등의 방법을 변형하여 측정하였다[26]. 시험 용액의 제조는 증류수에 7 mM ABTs와 2.45 mM potassium persulfate를 첨가하고, 상온에서 16시간 배양하여 ABTS 양이온(ABTS<sup>+</sup>)을 생성시켰다. 2.45 mM potassium persulfate buffer와 동량 혼합하였을 때, 734 nm에서 흡광도의 값이 0.70( $\pm$ 0.02)이 되도록 희석하여 제조하였다. 그 다음 시료의 여러 농도에 희석한 ABTS<sup>+</sup> 용액을 동량 가하여 6분 후에 흡광도 값을 측정하였다. 대조군(2.45 mM potassium persulfate buffer)의 흡광도와 비교하여 흡광도를 감소시키는 정도를 %로 나타내었으며, 양성대조군으로는 BHT(dibutyl hydroxy

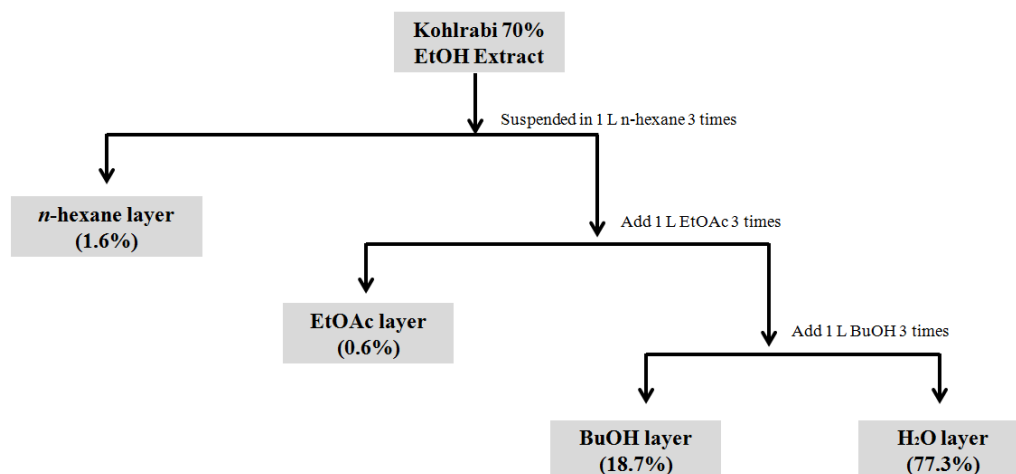


Fig. 1. Systematic purification using solvent partitioning from kohlrabi

toluene)를 사용하였다.

### 2.3.3. 세포배양

마우스 대식 세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 cell을 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건에서 배양하였으며, 2일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

### 2.3.4. 세포독성과 nitric oxide (NO) 생성 저해능 측정

24 well plate에 RAW 264.7 cells를  $2.5 \times 10^5$  cells/mL로 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건하에 18시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전 배양시킨 cells을 1 µg/mL LPS 가 포함된 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상층액 100 µL과 Griess 시약(1%(w/v) sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphyl) ethylenediamine (Sigma) in 2.5(v/v) phosphoric acid) 100 µL을 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)의 검량선과 비교하여 환산하였다.

세포독성 평가는 MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 법으로 세포 생존율을 3회 반복 측정하였으며, 시료의 농도에 대한 흡광도를 570 nm에서 측정 후 대조군의 흡광도와 비교하여 RAW 264.7 세포에 대한 독성 정도를 나타내었다.

### 2.3.5. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성 억제 효능 평가

RAW 264.7 cell을  $2.5 \times 10^5$  cells/mL 되도록 24-well plate에 깔고 18시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 전 배양한 다음 sample과 LPS 1 µg/mL와 함께 처리한 후 24시간 동안 배양 후 원심분리하여 상층액을 얻어 실험을 진행하

였다. PGE<sub>2</sub>의 측정은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D system, USA)를 이용하여 정량하였으며, standard에 대한 표준곡선의 r<sup>2</sup> 값은 0.99 이상 이었다.

### 2.3.6. iNOS 및 COX-2 발현 억제 효능 평가(western-blotting)

RAW 264.7 cell을  $5 \times 10^5$  cells/mL 되도록 6-well plate에 깔고 18시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 전 배양하였다. 이 후 sample 과 LPS 1 µg/mL와 함께 처리한 후 24시간 동안 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, lysis buffer로 세포를 용해하여 원심분리 (15000 rpm, 20 min, 4°C)하고 상층액을 얻은 다음 단백질농도를 측정하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 정량한 단백질을 4~12%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane에 1차 항체인 iNOS antibody, COX-2 antibody, β-actin antibody clone AC-74를 이용하여 반응시킨 후, 2차 항체와 반응시켰다. 단백질은 western blot detection system (WEST-ZOL, iNtRON) 용액을 이용해 ECL 기질과 반응시킨 후, Chemidoc을 이용하여 각각의 단백질 발현정도를 확인하였다.

### 2.3.7. 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-6, IL-1β) 생성 억제 효능 평가

RAW 264.7 cell을  $2.5 \times 10^5$  cells/mL 되도록 24-well plate에 깔고 18시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 배양한 다음 준비된 각각 농도의 sample과 LPS 1 µg/mL와 함께 처리한 후 24시간 동안 배양 후 얻어진 상층액의 pro-inflammatory cytokines 생성 함량을 측정 하였다. 사용하여 실험을 진행하였다.

Pro-inflammatory cytokines 정량은 mouse ELISA kit 를 이용하여 정량하였으며, standard 에 대한 표준곡선의  $r^2$  값은 0.99 이상이었다.

#### 2.4. 통계분석

모든 데이터는 평균±표준편차로 표기하였고, 각 군의 차이는 분산분석, 사후검정은 다중범위 검정 (Duncan's multiple range test)으로 실시하였고, 모든 통계자료는 SPSS 12 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 항산화 활성

##### 3.1.1. 총 폴리페놀 함량 분석

폴리페놀 화합물은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물로 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(-OH)을 가지고 있어 여러 화합물과 쉽게 결합하는 특징을 갖고 있으며, 항산화, 항균, 항암, 항염, 항당뇨 등 다양한 생리 활성을 가지고 있는 것으로 보고되어[27, 28] 천연물의 항산화 활성을 검색하는 기초자료로 활용될 수 있다. 따라서 레드 비트 뿌리 70%

EtOH 추출물을 용매 분획하여 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과 Table 1에서와 같이 EtOAc 분획물이 다른 분획물에 비해 각각 27.33 mg GAE/g으로 높게 확인되었다. 이러한 결과로부터 비트 뿌리에 함유되어 있는 phenolic 물질들이 용출되는 polarity를 확인할 수 있었다.

##### 3.1.2. ABTS 라디칼 소거 활성

폴리페놀 화합물들은 구조적인 특성상 생체 내 생성되는 활성산소를 제거하는 천연항산화물질로서 많이 연구되어지고 있다. 따라서 본 연구에서도 콜리비의 항산화 활성 효능 평가를 위하여 총 폴리페놀 함량과 연관하여 ABTS 라디칼 소거 효능을 측정하여 그 상관관계를 확인코자 하였다. 실험 결과 총 폴리페놀 함량의 결과와 같은 경향인 EtOAc>BuOH>70% EtOH>H<sub>2</sub>O>Hexane 순으로 라디칼 소거 활성을 나타냄을 확인(Table 2)함으로써 총 폴리페놀 함량이 높을수록 항산화 활성이 증가하는 비례적 상관관계를 확인할 수 있었다. 폴리페놀 함량이 가장 높게 측정되었던 EtOAc 분획물인 경우 1000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 98.7% 대조군으로 사용된 BHT의 250  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 활성(98.5%)과 거의 같은 수준의 활성을 보였다.

Table 1. Total polyphenol content of 70% EtOH extract and solvent fractions of kohlrabi

Sample	mg gallic acid equivalents(GAE)/g
70% EtOH extract	4.11±0.03 <sup>(1)2)</sup>
n-Hexane fraction	2.78±0.03 <sup>a</sup>
EtOAc fraction	27.33±0.26 <sup>e</sup>
BuOH fraction	7.65±0.06 <sup>d</sup>
H <sub>2</sub> O fraction	3.25±0.03 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Values are expressed as mean±SD of triplicate measurements.

<sup>2)</sup>Values with different letters (a-e) in the column are significantly different at  $p<0.05$  according to Duncan's multiple range test.

Table 2. Effects of 70% EtOH extract and solvent fractions of kohlrabi on ABTS radical scavenging activity

Sample	ABTS radical scavenging activity (%)		
	at 250 $\mu\text{g/mL}$	at 1000 $\mu\text{g/mL}$	IC <sub>50</sub> 값 ( $\mu\text{g/mL}$ )
70% EtOH extract	14.8 $\pm$ 1.0 <sup>b1)2)</sup>	37.5 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	1581.1 $\pm$ 24.3 <sup>e</sup>
n-Hexane fraction	19.5 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>	26.7 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	-
EtOAc fraction	61.2 $\pm$ 0.3 <sup>e</sup>	98.7 $\pm$ 0.8 <sup>d</sup>	172.9 $\pm$ 1.6 <sup>c</sup>
BuOH fraction	28.1 $\pm$ 1.0 <sup>d</sup>	62.7 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>	628.6 $\pm$ 3.4 <sup>d</sup>
H <sub>2</sub> O fraction	11.9 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	28.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	2192.7 $\pm$ 38.7 <sup>f</sup>
BHT <sup>3)</sup>	98.5 $\pm$ 0.1 <sup>f</sup>		57.4 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Values are expressed as mean $\pm$ SD of triplicate measurements.

<sup>2)</sup>Values with different letters (a-f) in the column are significantly different at  $p < 0.05$  according to Duncan's multiple range test.

<sup>3)</sup>Positive control: BHT (dibutyl hydroxy toluene).

### 3.2. 항염 활성

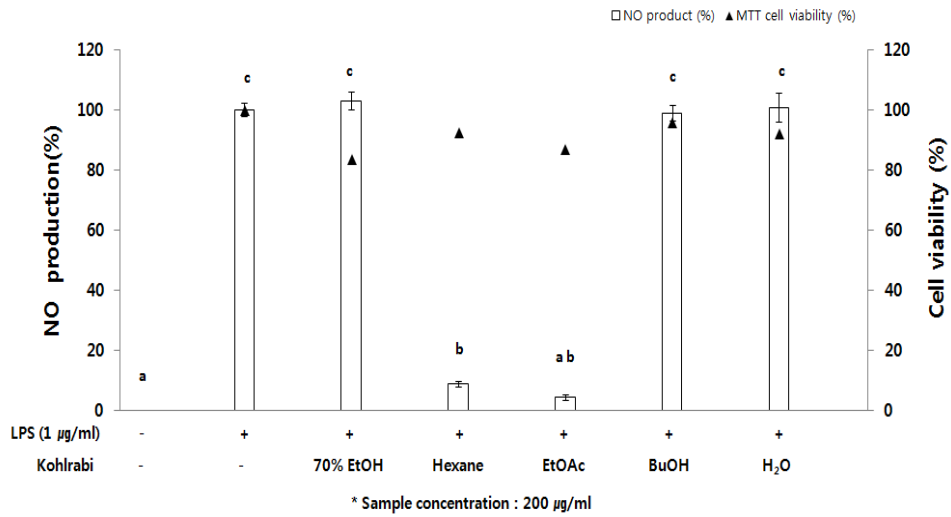
#### 3.3.1. 세포독성과 NO 생성 저해능

콜라비 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대하여 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell 에서 NO 생성 저해능을 확인하였다. Sample의 농도는 200  $\mu\text{g/mL}$ 로 하였으며, NO의 양은 Griess 시약을 사용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였다. 측정 결과 분획물 EtOAc 분획물이 95.7%로 가장 좋은 NO 생성을 저해(Fig. 2-A) 하였고, 추가적으로 수행한 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 55.0, 76.1%의 억제 효과를 보임으로써 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시키는 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 2-B). 이러한 결과는 최근 전 등[29]의 연구에서 70% EtOH 추출 후 EtOAc 분획물을 얻어서 실험한 수박 덩굴의 NO 억제 효능에서 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 보이는 억제 효과가 콜라비의 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서의 억제 효과와 비슷한 효능으로 콜라비 EtOAc 분획물이 더 낮은 농도에서 우수한 NO 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

또한 고 등[30]의 연구에서 누은분홍잎 EtOAc 분획물의 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 NO 억제 효능과도 유사한 효능이 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 콜라비의 항염 효능을 가지는 유효성분 분리 동정 및 염증 작용기전 연구에 중요한 기초연구 자료로 활용가치가 있을 것으로 여겨진다. 또한, 콜라비는 식용을 할 수 있는 소재로 화장품 소재로서 활용 가능성을 제시할 뿐만 아니라 향후 식품, 의약품 등 다양한 항염 소재로서 개발되기 위해서는 유효물질을 포함하는 안전한 추출방법에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

같은 처리 조건에서 세포독성을 알 수 있는 MTT를 동시에 측정한 결과 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 86.7%의 세포 생존율로 약간의 세포독성이 관찰되었다(Fig. 2-B). 따라서 향후 실험의 진행에 있어서 세포독성을 다소 보였던 고농도 300  $\mu\text{g/mL}$ 는 실험 농도에서 제외시켰다.

(A)



(B)

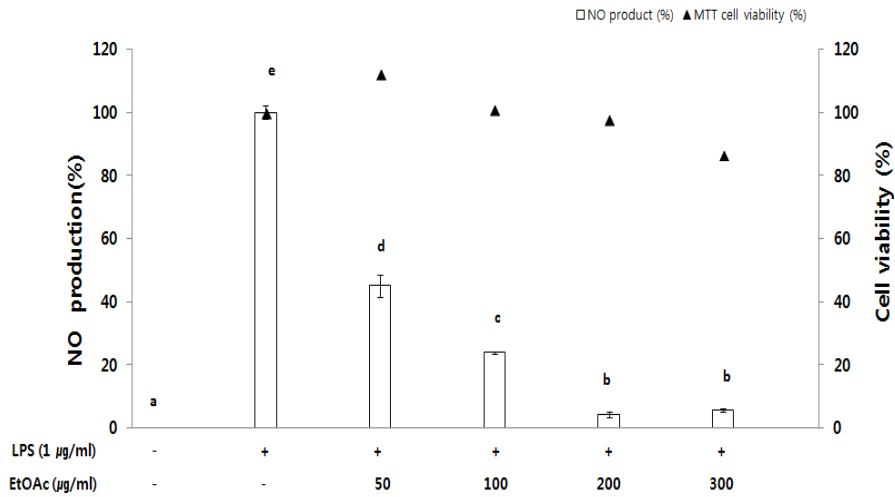


Fig. 2. Cell viability and inhibitory activity of nitric oxide production in RAW 264.7 cells. The production of NO was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence of the samples. Cell viability was determined using the MTT method. Values are expressed as mean ± SD of triplicate measurements. Values with different letters (a-e) are significantly different at p < 0.05 according to Duncan's multiple range test.



### 3.2.2. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성 억제 효과

Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)는 잘 알려진 염증유발 인자로서 통증 및 혈관의 확장과 대식세포 등 면역세포를 염증 부위로의 이동에 관여하는 것으로 알려져 있다. NO 억제 활성에서 가장 좋은 효능을 보였던 EtOAc 분획물에서 LPS에 의해 유도 증가된 PGE<sub>2</sub> 생성 억제효능을 확인하였다. 실험결과, LPS 단독처리군에 비해 가장 높은 처리농도인 200 µg/mL에서 82.7%의 억제 효과를 보였고, NO 억제 결과와 유사하게 농도 의존적으로 염증성 PGE<sub>2</sub>의 생성을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과들은 콜라비 EtOAc 분획 추출물이 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성 조절을 통해 항염증 효과를 나타낼 수 있다는 것을 보여준다.

### 3.2.3. RAW 264.7 세포에서 iNOS, COX-2 생성 억제 효과

염증반응에서 NO 및 PGE<sub>2</sub>의 생성은 염증반응에 관여하는 효소인 iNOS 및 COX-2에 의해 각각 조절된다. iNOS는 대표적인 염증자극에 반응하여 유도되

는 단백질로 iNOS 발현증가를 억제함으로써 항염증 반응에 관여할 수 있다. COX-2는 arachidonic acid로부터 PGE<sub>2</sub>를 생성하는데 관여하는 효소로서, 염증 반응을 조절하는 중요한 단계로 작용한다. 염증상태에서 iNOS와 COX-2에 의해 생성된 NO와 PGE<sub>2</sub>는 혈관 투과성, 부종 및 통증 등의 초기 염증반응을 촉진하고 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시켜 만성 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다[31, 32]. 현재 임상적으로 상용되고 있는 NSAID (non-steroidal inflammatory drug) 항염증 치료제들은 COX-2 발현 억제를 통해 항염증 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서도 콜라비 EtOAc 분획물에서 LPS에 의해 유도 증가된 NO 및 PGE<sub>2</sub> 생성에 대한 억제효과가 iNOS 및 COX-2 효소의 발현 조절에 의한 것인지 확인하기 위하여 단백질 수준에서의 발현을 western bolt analysis로 확인하였다. 실험 결과, iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 활성은 낮은 농도에서는 큰 억제 효과가 없었으나, 200 µg/mL 농도에서 iNOS 경우 세포 독성이 없이 75.6%의 억제 효과를, 같은 농도에서 COX-2는 55.8%의 억제

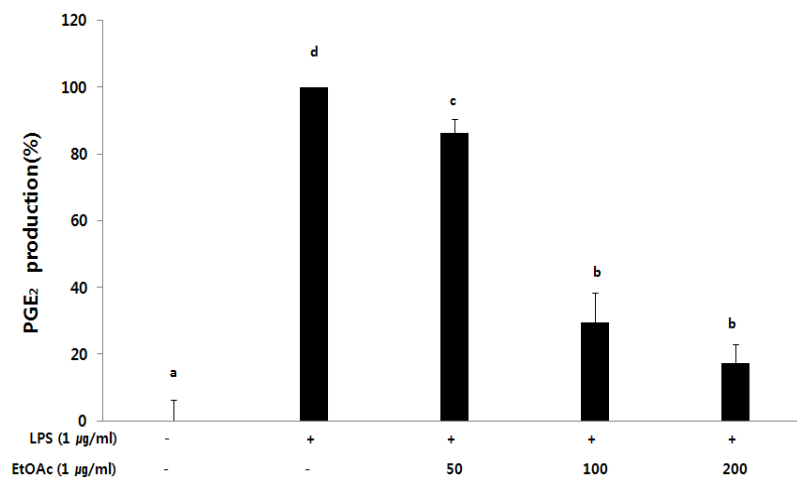


Fig. 3. Inhibitory effects of hexane and ethyl acetate fraction of kohlrabi on PGE<sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells. Cells ( $2.5 \times 10^5$  cells/mL) were pre-incubated for 18 h and then cells were stimulated by LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence of solvent fractions of kohlrabi. Supernatants was determined by ELISA. Values are mean  $\pm$  SEM of triplicate experiments.

효과를 보였다(Fig. 4). 이러한 결과들로부터 콜라비 EtOAc 분획추출물의 NO 및 PGE<sub>2</sub> 생성 억제제는 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 억제시킴으로써 나타나는 결과임을 알 수 있었고, COX-2에 의한 PGE<sub>2</sub> 합성 억제 보다는 iNOS 발현 억제를 통한 NO 생성 억제 효과가 더 큼을 확인할 수 있었다.

**3.2.3. 염증성 사이토카인(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) 생성 억제 효과**

Cytokine은 면역세포가 분비하는 단백질로서 면역세포의 활성화, 증식 및 분화를 조절하여 염증반응을 매개하는 인자이다. TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 는 대표적인 pro-inflammatory cytokine로 본 연구에

서는 콜라비의 EtOAc 분획물이 LPS에 의해 증가된 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 생성 억제 조절 효과를 측정하였다. 실험결과, 과잉 생산 시 여러 가지 면역 이상증, 염증성 질환, 림프계 종양의 발증과 깊은 관련이 있는 것으로 알려져 있는 IL-6에 대한 억제율이 가장 우수하게 농도의존적으로 나타났으며, 특히 200  $\mu$ g/mL의 농도에서는 93%의 우수한 억제 효과를 보였다(Fig. 5-B). TNF- $\alpha$ 는 농도의존적으로 저해 효과를 보였으나, 그 저해율이 미약하였고 가장 좋은 억제효과는 200  $\mu$ g/mL의 농도에서 48% 억제율로 측정되었다(Fig. 5-A). IL-1 $\beta$ 인 경우 도 전체적으로 농도 의존적으로 억제 효과는 보였으나 저농도에서는 저해율이 낮았고, 200  $\mu$ g/mL

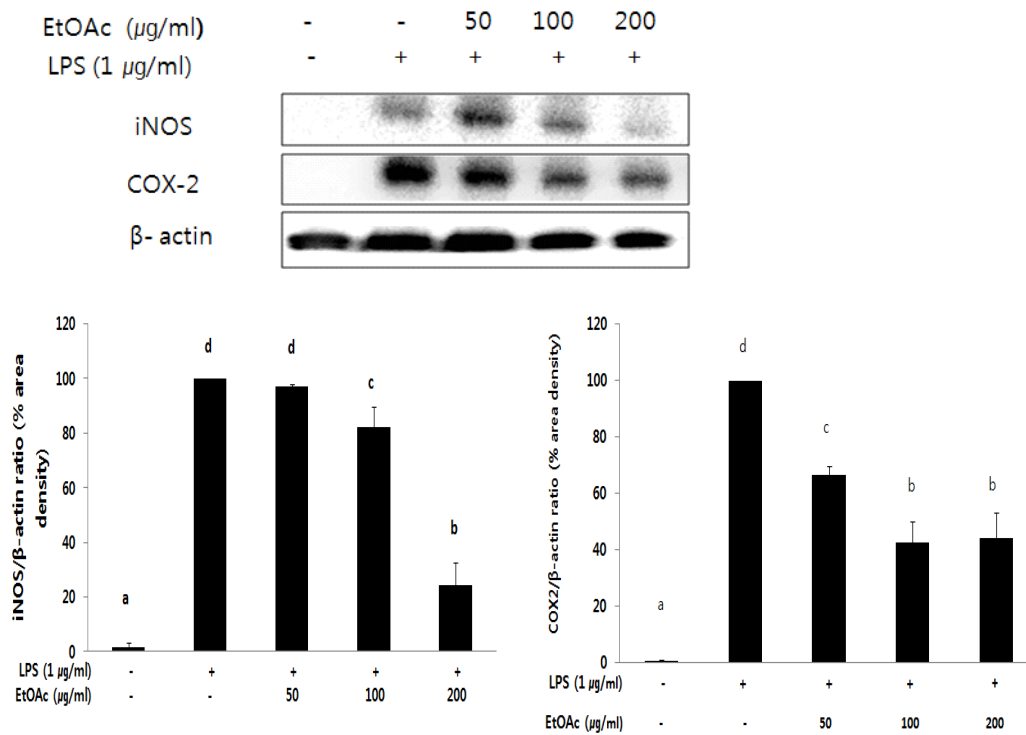


Fig. 4. Inhibitory effects of hexane and ethyl acetate fraction of kohlrabi on iNOS and COX-2 protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells ( $5 \times 10^5$  cells/mL) were pre-incubated for 18 h and then cells were stimulated by LPS (1  $\mu$ g/mL) for 24 h in the presence of EtOAc fraction of kohlrabi. The expression levels of iNOS and COX-2 protein were determined by immunoblotting. Values are the mean  $\pm$  SEM of triplicate experiments.

의 농도에서 55.6% 억제조절 효과를 나타내었다 (Fig. 5-C). 이러한 결과들로부터 콜라비 EtOAc 분획물이 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 에 비해 IL-6의 억제를 통한 항염 효능이 클 것으로 예측할 수 있었다. 종합적으로 콜라비가 식용으로 다양하게 사용되고 있는 채소류라는 점을 고려할 때, 안전성이 있으면서 항산화 및 항염증 효과를 가지고 있어 항산화 및 항염 효능을 가지는 건강식품 소재로서 활용 가능할 것

으로 여겨진다.

#### 4. 결론

본 연구는 제주도에서 재배된 자색 콜라비 (*Brassica Oleracea* var. *Gonglodes*)의 항염 활성을 알아보기 위하여 70% 에탄올 추출물과 순차적 용

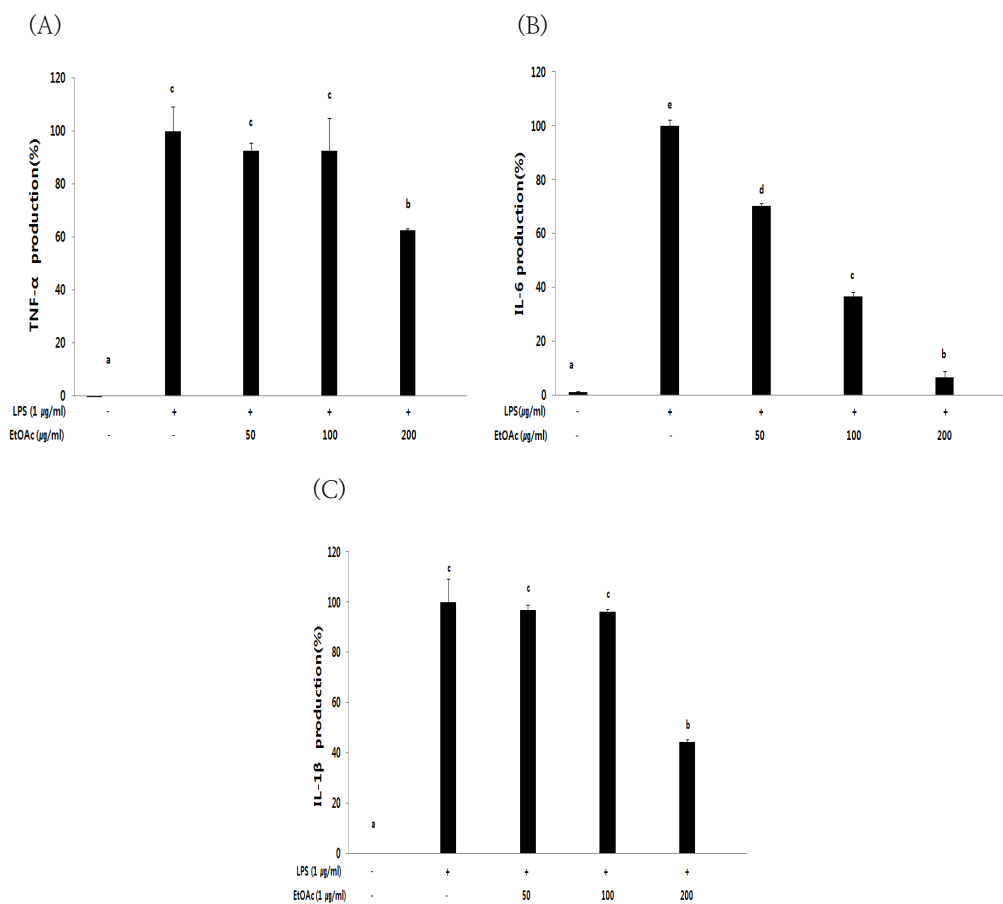


Fig. 5. Inhibitory effects of hexane and ethyl acetate fractions of kohlrabi on production of inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells ( $2.5 \times 10^5$  cells/mL) were pre-incubated for 18 h and then cells were stimulated with LPS (1  $\mu$ g/mL) for 24 h in the presence of hexane and ethyl acetate fractions of kohlrabi. Supernatants were collected, and the (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-6 and (C) IL-1 $\beta$  concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean  $\pm$  SEM of triplicate experiments.

매 분획물들을 확보하여 대식세포인 RAW 264.7 세포에 LPS를 자극한 후 NO, iNOS, COX-2 및 전염증성 cytokine을 유도하여 억제 효과를 알아보았다. 그 결과 EtOAc 분획물에서 농도 의존적으로 NO 억제 효과를 보였으며, PGE<sub>2</sub> 역시 농도 의존적으로 발현 억제함을 확인하였다. 또한, 콜라비의 EtOAc 분획물에서 iNOS와 COX-2 단백질 발현 억제 효과를 통해 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성 억제에 영향을 끼치고 있음을 확인하였고, COX-2는 낮은 농도에서도 33.6%의 억제율을 보인 반면, iNOS는 낮은 농도에서는 저해 효과가 미흡하였지만 고농도인 200 µg/mL의 농도에서는 75.6% 저해한 것으로 나타났다. 대표적인 전염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$  중에서는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 전체적으로 고농도인 200 µg/mL의 농도에서만 각각 48%, 55.6%로 효과적인 항염 활성을 나타냈으며, IL-6는 50, 100, 200 µg/mL의 처리 농도별로 30, 63, 93%로 농도 의존적으로 강하게 발현을 억제함으로써 전체적으로 항염 활성에 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들로부터 콜라비가 식용으로 사용하고 있는 점을 고려할 때 안정성이 있는 항산화 및 항염 소재로서 개발 가능성을 볼 수 있으며, 향후 유효 효과를 가지는 물질 동정을 통한 기전 연구를 하는 데도 기초자료로 활용할 수 있을 것이라 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업육성사업으로 수행된 연구결과입니다.

### References

1. J. Nordberg and E. S. J. Arnér, Reactive Oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(11), 1287 (2001).
2. Y. Duan, G. H. Kim, J. H. Seong, H. S. Chung, and H. S. Kim, Antioxidant activities of n-butanol and ethyl acetate extracts from Yam (*Dioscorea batatas* Decne). *J. of Korean oil Chemists' Soc*, 32(4), 599 (2015).
3. E. A. Decker, A. D. Crum, and J. T. Calvert, Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J. Agr. Food Chem*, 40, 756 (1992).
4. S. I. Jeong, H. S. Kim, I. H. Jeon, H. J. Kang, J. Y. Mok, C. J. Cheon, H. H. Yu, and S. I. Jang, Antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extracts from *Perilla frutescens*. *Korean J. Food Sci. Technol*, 46, 87 (2014).
5. S. H. You and J. S. Moon, A study on anti-oxidative, anti-inflammatory, and melanin inhibitory effects of chrysanthemum sibiricum extract. *J. of Koreac Oil Chemists's Soc*, 33(4), 762 (2016).
6. S. S. Chang, B. O. Matatijasevic, O. A. L. Hsieh, and C. H. Hwang, Natural antioxidants rosemary and sage. *J. Food Sci*, 42, 1102, (1977).
7. E. Schafer and L. Arnrich, Effects of dietary vitamin E on serum and pulmonary fatty acid as prostaglandins in rats fed excess linoleic acid. *J. Nutr*, 144, 1130 (1984).
8. J. H. Ryu, H. Ahn, J. Y. Kim, and Y. K. Kim, Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother. Res*, 17, 485 (2003).
9. W. J. Yoon, J. A. Lee, K. N. Kim, J. Y. Kim, and S. Y. Park, In vitro

- anti-inflammatory activity of the Artemisia fukudo extracts in murine macrophage RAW 264.7. *Korean J Food Sci Technol*, 39, 464 (2007).
10. T. Yayeh, H. Jung, H. Y. Jeong, J. H. Park, Y. B. Song, Y. S. Kwak, H. S. Kang, J. Y. Cho, J. W. Oh, S. K. Kim, and M. H. Rhee, Korean red ginseng saponin fraction downregulates proinflammatory mediators in LPS stimulated RAW264.7 cells and protects mice against endotoxic shock. *J. Ginseng Res*, 36, 263 (2012).
  11. S. H. Oh, S. Y. Choi, N. R. Lee, J. N. Lee, D. S. Kim, S. H. Lee, and S. M. Park, Cell migration and anti-inflammatory effect of red ginseng extracts fermented with laetiporus sulphureus. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, 40, 297 (2014).
  12. V. Willeaume, V. Kryus, T. Mijatovic, and G. Huez, Tumor necrosis factor- $\alpha$  production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *Journal of Inflammation*, 46, 1 (1996).
  13. D. Hwang, B. C. Jang, G. Yu, and B. Mary, Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide. *Biochem. Pharmacol*, 54, 87 (1997).
  14. J. Y. Kim, K. S. Jung, and H. G. Jeong, Suppressive effects of the kawool and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett*, 569, 321 (2004).
  15. J. H. Ryu, H. Ahn, J. Y. Kim, and Y. K. Kim, Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother. Res*, 17, 485 (2003).
  16. M. M. Mu, D. Chakravorty, T. Sugiyama, N. Koide, K. Takahashi, I. Mori, T. Yoshida, and T. Yokochi, The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Endotoxin. Res*, 7, 431 (2001).
  17. M. E. Assar and J. Angulo, Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic. Biol. Med*, 65, 380 (2013).
  18. R. Dubois, S. B. Abramson, L. Crofford, R. A. Gupta, L. S. Simon, L. B. A Van De Putte, and P. E. Lipsky, Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*, 9, 2045 (1998).
  19. W. L. Smith, G. R. Michael, and D. L. De-Witt, Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and 2. *J. Biol. Chem*, 271, 33157 (1996).
  20. S. K. Chang, W. C. Hyun, J. H. Kim, Y. J. Ko, S. M. Song, M. H. Ko, J. C. Lee, C. S. Kim, and W. J. Yoon, Anti-inflammatory effects on 80% ethanol extract and ethyl acetate fraction of *Acrosorium yendoi* Yamada in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Korean J. Plant Res*, 28, 574 (2015).
  21. D. B. Kim, J. W. Oh, J. S. Lee, I. J. Park, J. H. Cho, and O. H. Lee, Antioxidant activities of Green and Purple Kohlrabi Juices. *Korean J. Food. Sci. Technol*, 46, 601 (2014).
  22. M. J. Yang, S. S. Cha, and J. J. Lee, Effects of purple kohlrabi (*Brassica oleracea* var. gongylodes) flesh and peel ethanol extracts on the antioxidant activity and antiproliferation of human cancer cells. *Korean J Community Living Sci*, 26, 405 (2015).
  23. J. W. Lee, D. Y. Lee, J. G. Cho, N. I. Baek, and Y. H. Lee, Isolation and

- identification of sterol compounds from the red kohlrabi (*Brassica oleracea* var. gongyloides) sprouts. *J. Appl. Biol. Chem*, 53, 207 (2010).
24. Y. J. Lee, J. H. Kim, J. W. Oh, G. H. Shin, J. S. Lee, J. H. Cho, J. J. Park, J. H. Lim, and O. H. Lee, Antioxidant and anti-adipogenic effects of kohlrabi and radish sprout extracts. *Korean J. Food Sci. Technol*, 46, 531 (2014).
  25. Q. Zhang, J. Zhang, J. Shen, A. Silva, D. Dennis, and C. J. Barrow, A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J. Appl. Phycol*, 18, 445 (2006).
  26. R. Roberta, P. Nicoletta, P. Anna, P. Anath, Y. Min, and R. E. Catherine, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol. Med*, 26, 1231 (1999).
  27. H. J. Chei, H. J. Lee, B. G. Shin, I. C. Lee, and J. S. Hwang, Deoxypodophyllotoxin reduces skin pigmentation of brown guinea pigs. *Planta Medica*, 70, 378 (2004).
  28. C. Giovannini, B. Scazzocchio, R. Vari, C. Santangelo, M. D'Archivo, and R. Masella, Apoptosis in cancer and atherosclerosis: polyphenol activities. *Ann Ist Super Sanita*, 43, 406 (2007).
  29. A. L. Jeon, J. E. Kim and N. H. Lee, Whitening and anti-inflammatory constituents from the extract of *Citrullus lanatus* vines. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, 43(1), 53 (2017).
  30. C. S. Ko, W. C. Hyun, J. H. Kim, Y. J. Ko, S. M. Song, M. H. Ko, J. C. Lee, C. S. Kim and W. J. Yoon, Anti-inflammatory effects on 80% ethanol extract and ethyl acetate fraction of *Acrosorium yendoi* Yamada in murine macrophage raw 264.7 cells. *Korean J. Plant Res.* 28(5), 574 (2015).
  31. Y. Tezuka, S. Irikawa, T. Kaneko, A. H. Banskota, T. Nagaoka, Q. Xiong, K. Hase, S. Kadota, Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*. *J. Ethnopharmacol*, 77, 209 (2001).
  32. R. G Kim, K. M. Shin, S. K. Chun, S. Y. Ji, S. H. Seo, H. J. Park, J. W. Choi, K. T. Lee, In vitro anti-inflammatory activity of the essential oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji*, 46, 343 (2002).