

오크라(*Abelmoschus esculentus*) 추출물의 항염증 및 보습 효과 연구

유단희¹, 이인철^{2*}

¹서원대학교 융복합대학

²서원대학교 바이오코스메틱학과

Received: November 21, 2023 / Revised: January 29, 2024 / Accepted: January 30, 2024

Study on Anti-Inflammatory and Moisturizing Effect of Extracts from *Abelmoschus esculentus*

DanHee Yoo¹ and InChul Lee^{2*}

¹College of Fusion and Convergence, Seowon University, ²Department of Bio-Cosmetic Science, Seowon University, Cheongju 28674, Republic of Korea

In this study, we studied the anti-inflammatory and physiological activities *Abelmoschus esculentus* extracts by hot water (AEW) and 70% ethanol (AEE) and confirm the possibility to use it as a natural ingredient. For this study measure the antioxidative activity, total polyphenol content was measured, and DPPH and ABTS scavenging activity assays were conducted. Total polyphenol content of AEW and AEE was measured, and the results showed that they were 126.76 mg TAE/100 g and 144.21 mg TAE/100 g, respectively. DPPH and ABTS radical scavenging activities were measured to determine the antioxidative activity, and the results indicated that DPPH and ABTS radical scavenging activities increased in both extracts concentration-dependently. The moisturizing effect was measured by measuring the amount of hyaluronic acid (HA) produced within HaCaT cell using the ELISA kit. AEW and AEE increased the amount of HA production in a concentration-dependent manner. In order to determine the anti-inflammatory activity of AEW and AEE, the NO assay was conducted, and the inhibitory effects were found to be 11.46% and 25.28%, respectively in 100 µg/ml. In order to measure the anti-inflammatory activity, nitric oxide (NO) inhibitory activity was measured, and the inhibition of expression of iNOS, COX-2 proteins was measured and shown. Furthermore, inhibition of expression was found in inflammatory inducing factors iNOS and COX-2 proteins showing concentration-dependent inhibition. This study found the excellent effects of antioxidative, moisturizing effect, anti-inflammatory activity in *Abelmoschus esculentus* extracts, which indicates that can be used as functional materials for aesthetics, food and functional cosmetics.

Keywords: *Abelmoschus esculentus*, antioxidant, anti-inflammatory, moisturizing effect, natural material

서론

피부는 인체의 가장 외부에 존재하고 전체를 덮고 있는 기관으로 체내의 수분과 내부의 장기를 보호하고 외부에서 오는 침입인자로부터 내부를 보호하는 필수적인 장벽기능을 수행하는 기관이다[1]. 피부의 가장 외곽에 존재하는 각질층은 물리적으로 피부장벽기능을 수행하며 각질세포와 세포의 사이를 채우는 지질층으로 구성되어 있다. 이러한 지질층은 피부장벽 역할을 하며 주성분은 세라마이드, 콜레스테롤, 유

리지방산 등으로 구성되어 있고, filaggrin, involucrin, loricrin 등의 단백질이 교차 결합되어 형성된다. 또한 지질은 외부로부터 병원균을 포함하는 여러 물질의 자극으로부터 보호막 기능을 한다[2, 3]. 피부장벽 생성 과정은 다양한 사이토카인에 의해 영향을 끼치며 염증성 피부질환을 일으키는 원인이 되며, 자외선과 외부자극 등으로 형성된 활성산소로 인한 피부의 자극이 생기면 세포 안에서 신호 전달 체계에 자극이 전달되어 사이토카인과 염증인자들의 발현이 증가하여 염증성 피부질환과 가려움 등의 증상이 나타나 피부장벽의 기능을 저하시킬 수 있다[4].

염증은 외부로부터의 물리, 화학적 자극에 대한 신체 조직의 방어 작용으로 선천적으로 일어나는 면역 반응 중 하나이다. 이러한 염증 반응에 관련하는 대식세포는 신체에서 급

*Corresponding author

Phone: +82-43-299-8491, Fax: +82-43-299-8107
E-mail: 5229418@hanmail.net

성 염증반응을 인식하고 침입한 세균과 바이러스 등에 대항하는 이중세포나 암세포를 파괴하는 면역세포 중 하나이다. 면역자극물질인 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 자극되면 nuclear factor-kappa B 및 mitogen-activated protein kinase와 같은 신호 전달 경로가 활성화되어 다양한 염증 매개 인자와 염증성 사이토카인의 분비를 촉진시키는 것으로 알려져 있다[5-7]. 이러한 염증 매개인자들이 급성으로 생성되거나 과도한 반응이 일어나게 되면 신체에 치명적인 결과를 초래한다고 알려져 있다. 염증이 일어나는 초기에는 nitric oxide (NO)와 사이토카인을 생산하여 생체방어를 하여 기본적인 역할을 하지만, 과잉된 NO의 생성은 체내에 염증을 유발하여 유전자의 변이, 조직 및 신경의 손상의 원인이 된다고 보고되고 있다[8, 9]. 따라서, 염증성 매개물질의 활성조절은 염증반응을 조절하는데 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 염증반응을 조절함에 따라 이러한 반응을 완화시키는 천연소재를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[10].

오크라(*Albelmoschus esculentus*)는 열대와 아열대지역에서 주로 자라나며 아욱과에 속하는 종으로 외국에서 lady's finger 또는 Gumbo라고 알려져 있는 채소이다[11]. 오크라는 주로 어린잎을 먹기도 하며, 종자는 기름으로 추출하여 이용하기도 한다. 일반적으로 식용으로 먹는 부위는 털 성숙된 꼬투리 부분으로 품종에 따라 차이가 있지만, 꼬투리의 길이가 10 cm 이하일 때가 가장 적절하며, 그 이상이 되었을 경우 딱딱해져 식용으로 먹기 어려워진다[12]. 오크라는 영양학적으로 단백질, 비타민뿐만 아니라 미네랄 등이 풍부한 채소로 알려져 있다. 또한, 섬유질과 펙틴, 갈락탐 등이 혼합되어 있는 점액이 있는 형태이며, 이 점액은 자양강장에 효과적이며 혈중 콜레스테롤을 낮춰주는 효능이 있다고 알려져 있다[13, 14]. 오크라 씨의 단백질은 단백질의 효율이 우수하여 치료용 식품의 원료로 사용할 수 있는 연구가 보고되어 있으며[15], 폴리페놀 화합물을 함유하고 있으며, 높은 항산화력이 연구되었다[16]. 또한 오크라의 피부 미백에 관련 있는 멜라닌 생성 억제 연구도 진행되었다[17, 18].

오크라에 대한 다양한 재배방법 및 효능 검증에 대해 연구가 되고 있지만, 오크라에 대한 항염증에 관한 연구는 미흡한 실정이므로 본 연구에서는 오크라 추출물의 염증 매개 인자로부터 항염증 작용과 보습력에 대해 검증하여 천연 소재로서 사용 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 실험에 사용된 오크라는 민음농원에서 재배하여 수확한 것을 구매하여 사용하였으며, 오크라를 세척한 후 70℃에서 48시간 이상 열풍건조 시킨 뒤, 파쇄하여 사용하였다.

열수 추출물을 제조하기 위해 시료 무게의 10배 양의 증류수를 첨가하였으며, 100℃에서 3시간 동안 환류 냉각하여 추출하였다. 그 후, 실온에서 24시간 침지 시켰으며, 이후 1차 여과를 통해 상등액과 침전물을 분리하였다. 위의 방법으로 동일하게 3회 반복하여 추출하였다. 70% 에탄올 추출물을 제조하기 위해 시료 중량의 10배 양의 70% 에탄올을 첨가하여 24시간 동안 실온에서 교반 하였으며, 1차 여과를 통해 상등액과 침전물은 분리하는 과정을 3회 동일하게 진행하여 수득하였다. 그 후, 열수 및 70% 에탄올 추출을 통해 얻은 상등액은 여과지(Whatman No. 4, No. 5)를 이용해 진공펌프로 여과 후, rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압 농축하여 용액을 제거하였다. 그 후, 농축액을 동결 건조하여 powder 형태로 -20℃에서 보관하여 본 실험의 시료로 사용하였다. 오크라의 열수 및 70% 에탄올 추출물은 각각 수율은 7.5%, 10.73%를 확인하였다.

시약 및 기기

시료 내 폴리페놀 함량 측정을 위해 사용한 tannic acid, Sigma-Aldrich, USA)에서 구입하였으며, Na₂CO₃은 Kanto Chemical Co. (Japan)에서 구입하여 사용하였다. 항산화 활성 측정을 위해 사용한 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ethanol, ascorbic acid, 2,2'-azinobis-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 등은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 세포 관련 실험을 진행하기 위해 HaCaT과 RAW 264.7을 ATCC (VA, USA)에서 분양받아 실험에 사용하였으며, 배양에 사용된 dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovin serum (FBS), penicillin/streptomycin은 Cytiva hyclone (Amersham, England)에서 구입하여 사용하였다. 보습 효능 측정에 사용된 Hyaluronic acid ELISA kit는 R&D system (USA)에서 구입하였으며, 항염증 활성 측정에 사용된 griess reagent, LPS는 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 또한, 단백질 발현 량 측정에 사용된 β-actin과 염증 발현 인자인 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase (COX)-2의 1차 항체와 anti-mouse인 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA)에서 구입하여 사용하였으며, enhanced chemiluminescence (ECL)은 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate를 사용하였으며, Merck Millipore (USA)에서 구입하였다.

본 연구에 사용된 기기는 ELISA readers (Molecular Devices, China), rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), CO₂ incubator (Pantasonic Healthcare Co., Japan), micro refrigerated centrifuge (Hanil Scientific Inc., Republic of Korea), ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, USA) 등을 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해 Folin-Denis법[19]에 준하여 실험을 진행하였다. 먼저 추출물을 증류수에 희석하여 준비하여 시료로 사용하였고, 준비된 시료와 50% Folin-ciocalteu reagent을 동량(2 ml)을 혼합한 후 실온에 3분간 반응시켰다. 그 후 Na_2CO_3 을 10% 희석한 다음 2 ml을 혼합하여 상온, 암실에서 1시간 동안 방치하여 반응시켰다. 그 후, 흡광도 700 nm에서 측정하였으며, tannic acid를 표준물질로 사용하여 아를 표준곡선으로 나타낸 다음 환산하여 100 g 당 mg의 폴리페놀 함량으로 나타내었다.

DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH radical 소거 활성 측정 실험은 Blois의 방법[20] 변형하여 측정하였다. 시료는 농도별로 준비하였으며, 농도 별로 well 당 120 μl 씩 분주하고, 그 다음 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 시약을 60 μl 분주하여 혼합한 뒤 15분 암실 반응하였다. 그 후, ELISA readers를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, DPPH의 전자공여능은 시료첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료첨가군/무첨가군 흡광도}) \times 100$$

ABTS radical 소거능 측정

특정 시료의 ABTS 라디칼을 소거하는 원리를 이용하여 항산화력을 측정하고자 하였으며, ABTS assay의 방법[21]을 통해 측정하였다. ABTS⁺를 형성시키기 위해 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethyl-benthiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 24시간 동안 실온에서 반응시켜 사용하였다. 그 후 99.9% ethanol로 농도를 맞추어 사용하였으며, 농도별로 시료를 well에 분주한 뒤, 같은 양의 ABTS⁺을 분주하여 혼합한 뒤 흡광도 700 nm에서 측정하여 ABTS 라디칼 소거능을 확인하였다.

$$\text{ABTS radical 소거활성(\%)} = (1 - \text{시료첨가군/무첨가군 흡광도}) \times 100$$

세포 주 및 세포 배양

본 실험에서 사용된 HaCaT과 RAW 264.7의 세포주를 사용하였으며, 각 세포 배양은 DMEM 배지에 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 배지를 사용하였다. 이후 세포는 37°C, 5% CO_2 incubator에서 18시간 이상 배양한 후 계대하여 본 실험에 사용하였다.

세포 생존율 측정(MTT Assay)

시료에 대한 세포 생존율 측정을 위해 Carmichael의 방법

[22]을 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 HaCaT, RAW 264.7 세포를 1×10^4 cells/well을 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 시료를 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 조절하여 배양된 세포에 첨가한 뒤 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 또한, 대조군도 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 MTT 용액을 2.5 mg/ml 농도로 만든 후 각 well 당 40 μl 를 분주하였으며, 37°C, 5% CO_2 incubator에서 4시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 MTT 용액이 섞인 배양액을 제거하고 각 well 당 유기용매인 DMSO를 150 μl 씩 가하여 실온에서 30분간 혼합, 반응시킨 뒤 ELISA reader로 흡광도 540 nm에서 well을 측정하였다. 세포 생존율은 시료를 첨가하지 않은 무첨가군과 시료를 첨가한 첨가군의 흡광도를 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = (1 - \text{시료첨가군/무첨가군 흡광도}) \times 100$$

Hyaluronic Acid (HA) 생성량 측정

HaCaT을 1×10^4 cells/well씩 분주한 후, 세포 배양조건에서 24시간 배양하였다. 그 후, 배양액을 버리고 PBS로 세척한 다음 FBS를 포함하지 않은 DMEM 배지를 사용하여 세포를 기아상태로 만들어준 후, 일정농도의 시료를 처리하였다. 24시간 배양 후, 150 μl 의 상층액을 털어낸다. 13,200 rpm에 5분간 원심분리한 후, 100 μl 의 상층액을 수거하여 Hyaluronic acid ELISA를 이용하여 제조사에서 제공한 방법에 의해 실험을 진행하였다. 이후, HA양을 측정하기 위해 ELISA reader로 흡광도 450 nm에서 측정하여 나타내었다.

NO 생성 억제 활성 측정

대식세포 RAW 264.7에 자극제인 LPS로 유도시켜 생성된 배양액 내의 NO 농도를 Green 등의 방법[23]을 적용하여 배양액 내 존재하는 NO의 활성을 측정하였다. 6 well plate에 RAW 264.7를 2×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양한다. 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 LPS를 조절한 후, LPS 무처리구를 제외한 대조군과 시료 농도 구간에 처리한 후 2시간 이후 농도 별(5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 조절한 시료용액을 처리하여 18시간 배양한 후 96 well plate에 상층액을 분주한다. 상층액과 동일한 용량의 griess 시약을 첨가하여 상온에서 10분 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO 억제 활성 측정은 시료의 무첨가군과 첨가군을 비교하여 백분율로 표시하였다.

$$\text{NO 생성 억제능(\%)} = (1 - \text{시료첨가군/무첨가군 흡광도}) \times 100$$

Western blot을 통한 단백질 발현 측정

항염증 염증 발현에 관여하는 iNOS과 COX-2의 단백질 발현 억제를 확인하기 위하여 대식세포인 RAW 264.7을 100 mm tissue culture dish에 1×10^6 cells/well로 cell seeding 후 24시간 동안 세포배양조건에서 안정화 시켜 배양하였다. 이후, 배지를 제거하여 자극제인 LPS를 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 2시간 처리해준 후 시료를 농도별로 분주하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator 18시간 배양하였다. 그 후, 다시 배지를 제거하고 PBS로 세척해주고, Radio-immunoprecipitation assay buffer 10 ml에 complete mini 1 tab 100 μl 을 섞은 후 well에 용액을 가해 세포를 용해하였다. 그리고 수확한 뒤, 4°C에서 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하였으며, 정량된 양의 단백질을 20 μl 씩 넣어 10% SDS-PAGE사에서 전기영동으로 분리하였다. 전기영동으로 분리된 단백질은 polyvinylidene fluoride membrane에 transfer한 다음 blocking buffer (5% skim milk in Tris-buffered saline and tween 20(TBST))를 이용해 실온에서 1시간 배양시켰다. 1차 항체(iNOS, COX-2, β -actin)를 비율에 따라 희석하여 4°C에서 over night하여 반응시킨 다음, 이후 10분 간격으로 TBST로 3회 washing하였다. iNOS, COX-2의 2차 항체는 anti-rabbit을 사용하고, β -actin의 2차 항체는 anti-mouse를 사용하였으며, 각 항체는 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양한 후 다시 TBST로 10분 간격으로 3회 세척하였다. membrane을 ECL kit로 반응시킨 후 ChemiDoc Imaging System을 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

통계 처리

본 연구의 모든 실험 데이터는 동일한 조건으로 3회 반복 측정하였으며, 측정값의 평균치와 표준편차(means \pm standard deviation, SD)로 표기하였다. 또한 결과의 유의성 검사는 SPSS Statistics 23을 사용하여 t-test를 통해 유의값 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)을 나타내었다. 유의차 검증은 분산분석(analysis of variance: ANOVA)을 이용하여 분석하였으며, Duncan's multiple range test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량

식물에는 비타민이나 항산화 활성을 가진 화학물질들이 많이 함유되어 있고, phytochemical은 식물의 고유의 색과 특이한 맛을 내게 하는 물질이다. 페놀성 화합물은 식물의 2차 대사산물로서 한 개의 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl (-OH)기를 지닌 방향족 화합물을 말한다. 이러한 폴리페놀

Table 1. Total polyphenol contents in extracts from *Abelmoschus esculentus*.

Sample	Total polyphenol (mg TAE/100 g)
AEW	126.76 \pm 0.16
AEE	144.21 \pm 0.83

Results are means \pm SD from triplicate experiments. AEW, *Abelmoschus esculentus* extracted with distilled water at 100 °C; AEE, *Abelmoschus esculentus* extracted with 70% ethanol at room temperature.

화합물은 항산화, 항노화, 항염 같은 생리활성에도 효능을 나타내는 물질로 알려져 있다[24, 25].

오크라 추출물의 폴리페놀 함량 측정을 한 결과 Table 1과 같이 나타내었다. 표준물질로 Tannic acid를 사용하였으며, 각 시료의 100 g당 함유하고 있는 tannic acid의 양 (tannic acid equivalent; TAE)으로 환산하여 나타내었다. 오크라의 열수 추출물은 126.76 \pm 0.16 mg TAE/100 g이 나타났으며, 오크라의 70% 에탄올 추출물은 144.21 \pm 0.83 mg TAE/100 g의 총 폴리페놀 함량을 나타내었다. 두 추출물을 비교하였을 때, 에탄올 추출물에서 비교적 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다.

DPPH radical 소거능

DPPH는 free radical을 가지고 있는 화학적으로 안정화된 수용성 물질로 항산화 물질에 의해 환원되는 것을 확인

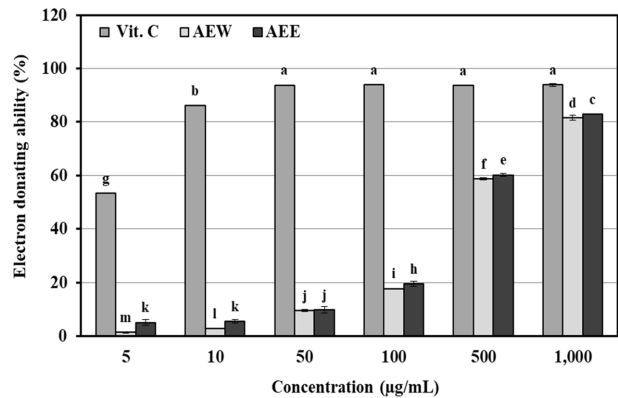


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of extracts from *Abelmoschus esculentus*.

■ Vit. C: L-ascorbic acid
 □ AEW: *A. esculentus* extracted with distilled water at 100°C
 ■ AEE: *A. esculentus* extracted with 70% ethanol at room temperature.

Results are expressed as means \pm SD from triplicate experiments and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$ by one-way ANOVA (a > b > c > d > e > f > g > h > i > j > k > l > m).

하는 방법으로, DPPH가 가지고 있는 특유의 색인 보라색이 탈색되어 노란색으로 변화하는 정도를 지표로 하여 항산화력을 측정하는 방법이다. 항산화 활성 정도를 지표로 하여 천연물로부터 항산화 물질을 탐색하는데 많이 이용되고 있다[26]. 오크라의 열수 및 70% 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 Fig. 1과 같이 나타내었다. 열수와 70% 에탄올 추출물은 농도가 증가할 수록 DPPH radical 소거능이 증가하는 것을 확인하였으며, 최종 농도인 1,000 µg/ml에서 열수 추출물은 81.49%, 70% 에탄올 추출물은 82.91%의 소거능을 나타내었다. Cha 등[27]의 연구에서 두릅 순 추출물의 DPPH radical 소거능 측정 결과, 두릅 순의 열수 및 70% 에탄올 추출물은 1,000 µg/ml 농도에서 각각 28.69%와 2.78%의 효과를 나타내는 결과와 비교하였을 때, 오크라 열수 및 70% 에탄올 추출물의 DPPH radical 활성이 다른 추출물에 비해 높은 활성을 나타내어 우수함을 확인하였다.

ABTS radical 소거능

ABTS radical 소거능 측정법은 DPPH를 이용한 측정법과 같이 항산화력을 측정하는 방법으로 많이 이용되고 있으며, ABTS는 항산화 물질과 반응하게 되면 양이온인 radical을 소거하여 청록색에서 탈색되어 무색으로 변화되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하는데 이용된다[28]. 오크라의 열수 및 70% 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과 Fig. 2와 같이 나타내었다. ABTS 라디칼 소거능은

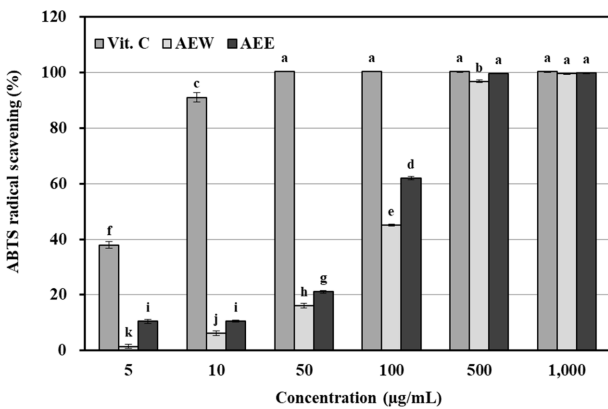


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of extracts from *Abelmoschus esculentus*.

■ Vit. C: L-ascorbic acid
 □ AEW: *A. esculentus* extracted with distilled water at 100°C
 ■ AEE: *A. esculentus* extracted with 70% ethanol at room temperature.

Results are means ± SD from triplicate experiments and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$ by one-way ANOVA (a > b > c > d > e > f > g > h > i > j > k > l > m).

농도 의존적으로 활성이 증가함을 확인하였으며, 오크라 열수 추출물은 최고 농도인 1,000 µg/ml 농도에서 99.44%의 radical 소거능을 보였으며, 70% 에탄올 추출물은 500, 1,000 µg/ml 농도에서는 각각 99.58%, 99.71%의 소거능을 나타내었으며, 이는 대조군인 Vit.C와 유의한 결과를 나타내어 오크라 열수 및 70% 에탄올 추출물은 우수한 항산화력을 나타냄을 확인하였다. Kim의 연구[29]에 의하면 브로콜리 잎 열수 및 에탄올 추출물은 10,000 µg/ml에서 99% 정도의 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었으므로 본 연구 결과와 비교했을 때 오크라 열수 및 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거능이 우수한 것으로 나타났다.

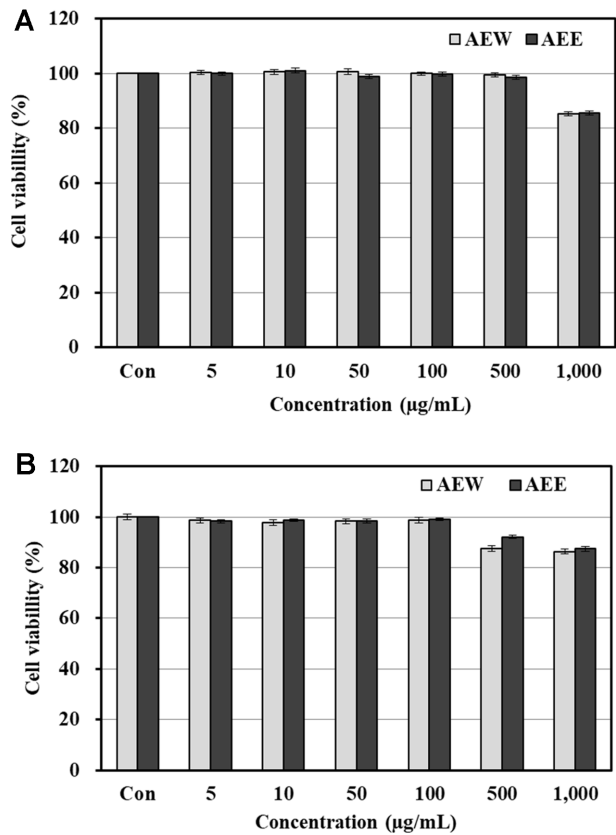


Fig. 3. Cell viability of extracts from *Abelmoschus esculentus* on cells.

(A) In order to measure the cell viability using the MTT assay, *A. esculentus* extracts were treated with each concentration (5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml) in HaCaT cells. (B) RAW 264.7 cells were stabilized by culturing them in a 96-well plate at 1×10^4 cells/well for 24 h. *A. esculentus* extracts were treated with each concentration (5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml) in RAW 264.7 cells.

Results are means ± SD from triplicate experiments.
 □ AEW: *A. esculentus* extracted with distilled water at 100°C
 ■ AEE: *A. esculentus* extracted with 70% ethanol at room temperature.

세포 생존율(MTT Assay)

세포 생존율에서 MTT 시약은 담황색의 기질로 살아있는 세포에 존재하는 미토콘드리아 내의 호흡연쇄 반응에 관여하는 효소에 의해 환원되어 formazan을 생성하게 되고, 이 formazan은 암적색을 띠고 있으며 죽은 세포에서는 이러한 반응이 일어나지 않는 원리를 이용해 측정한다. 따라서 MTT assay법은 생 세포내에서 생성된 formazan의 양에 따라 흡광도로 측정하는 시험법이다[30].

오크라의 열수 및 70% 에탄올 추출물을 MTT assay를 이용하여 각질형성세포인 HaCaT과 대식세포인 RAW 264.7 내의 세포 생존율을 측정할 결과를 Fig. 3에 나타내었다. HaCaT 세포에서 오크라 열수 및 70% 에탄올 추출물은 500 µg/ml 농도에서 99.51%, 98.69%의 생존율을 확인하였고, 1,000 µg/ml 농도에서는 85.22%, 85.61%의 생존율을 확인하였다. RAW 264.7 세포에서 오크라 열수 및 70% 에탄올 추출물은 100 µg/ml 농도에서 98.74%, 99.02%의 생존율을 확인하였고, 500 µg/ml 농도에서 87.53%, 92.13%의 생존율을 나타내었다. 그 결과, 이후 세포 실험에서는 세포 생존율이 95% 이상인 농도 구간에서 실험을 진행하였다.

HA 생성량

Hyaluronic acid는 고분자 화합물로서 피부의 외각인 표피의 수분 증발을 막아주는 역할을 하며, 피부의 탄력성을 유지하거나 영양분의 저장, 확산, 세포이동에도 관여한다. 이

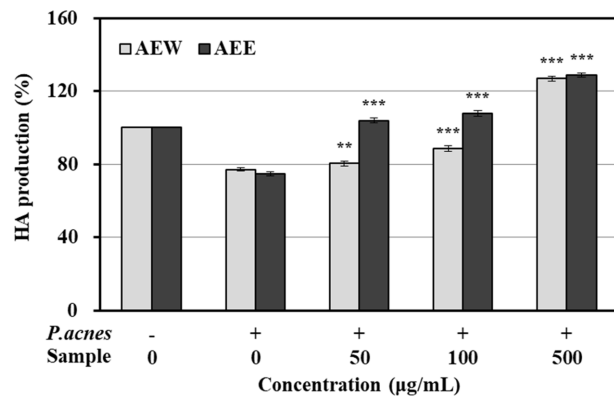


Fig. 4. The effect of extracts from *Abelmoschus esculentus* on hyaluronic acid (HA) production of HaCaT cells.

RAW 264.7 cells were distributed at 3×10^5 cells/well in a 6 well plate and cultured with DMEM for 24 h. Afterwards, LPS (10 µg/ml) was treated for 2 h, and then *A. esculentus* extracts were treated and cultured for 16 h. The supernatants were analyzed for the production of hyaluronic acid using an ELISA assay kit. Results are means \pm SD from triplicate experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs *p. acnes* alone-treated group)

□ AEW: *A. esculentus* extracted with distilled water at 100°C
 ■ AEE: *A. esculentus* extracted with 70% ethanol at room temperature.

러한 HA는 보습기능을 주로 하지만 이를 통해 항산화, 항염, 항균 등 다양한 기능을 한다고 알려져 있다[31, 32].

각질형성세포인 HaCaT 세포에서 HA 생성량을 확인하기 위하여 HA ELISA assay를 수행하였다. 자극제로 *p. acnes*을 처리하였으며, 각 시료를 농도별(50, 100, 500 µg/ml)로 처리하여 HA 생성량을 확인하였다. 오크라 열수 및 70% 에탄올 추출물은 자극제와 시료 무처리군과 비교하였을 때 최종 농도인 500 µg/ml에서 26.92%, 28.96%의 HA 생성을 증가를 확인하였다(Fig. 4).

NO 생성 억제 활성

NO는 면역자극물질인 LPS에 의해 자극된 세포가 염증반응을 유발할 때 분비되는 물질로서 L-arginine으로부터 NO synthase에 의해 생성되어진다. 이러한 NO의 발현은 체내 방어와 신호전달 기능을 주로 하며 여러 생물학적인 과정에 관여하고 세포의 각 기능을 조절하는 중요한 역할을 하기도 하지만, 과도하게 생성된 NO는 세포독성, 염증 유발, 조직 손상, 유전자 변의 등과 같은 다양한 질병을 유발하기도 한다[33, 34].

RAW 264.7 세포를 LPS로 활성화시킨 후, 오크라 줄기의 열수 및 70% 에탄올 추출물 처리하여 NO의 생성을 측정할 결과를 Fig. 5와 같이 나타내었다. LPS 단독 처리군은 LPS 무처리군에 비해 높은 NO 발현율이 나타났다. 각 추출물을 농

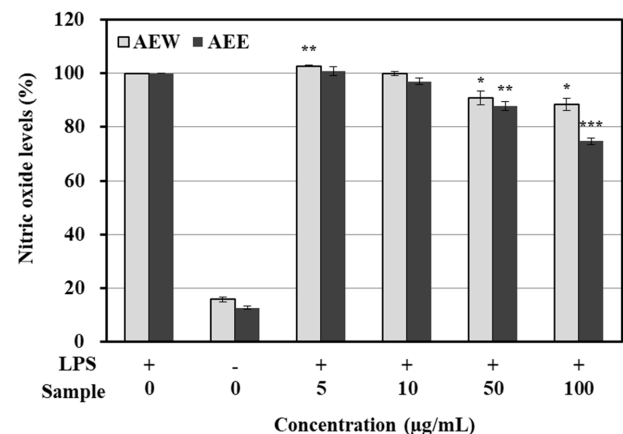


Fig. 5. Inhibitory effects of extracts from *Abelmoschus esculentus* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/well) were pretreated with LPS (10 µg/ml) for 2 h and then treated *A. esculentus* extracts at an appropriate concentration (5, 10, 50 and 100 µg/ml) for 16 h. NO production was determined in culture supernatant by griess reagent. Results are means \pm SD from triplicate experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone-treated group)

□ AEW: *A. esculentus* extracted with distilled water at 100°C
 ■ AEE: *A. esculentus* extracted with 70% ethanol at room temperature.

도별(5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하였을 때에도 농도 의존적으로 NO 생성량이 감소하는 것을 확인하였으며, LPS 처리군과 최종 농도인 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 NO 생성 저해를 비교하였을 때 오크라 열수 추출물은 11.46%, 오크라 줄기 70% 에탄올 추출물은 25.28%의 저해 효과를 나타내었다.

염증인자(iNOS, COX-2)에 대한 단백질 발현 억제 효과

염증은 인체의 면역반응으로 나타나며 조직의 손상을 재생하는 역할을 하는 반응이다. 염증반응이 심화되는 기전에는 NOS에 의한 L-arginine이 중요한 작용을 한다고 알려져 있으며, 특히 iNOS는 NO의 생성에 의해 염증반응을 일으

키며, 이로 인한 염증 반응 유발은 다양한 염증성 사이토카인의 분비를 증가시켜 염증 반응을 심화시키는 작용이 된다. COX라는 단백질에 의해 염증 조절 효소인 prostaglandin를 생성시키며, 그 중, COX-2는 염증을 심화시키는 원인으로 알려져 있다[35]. 염증의 매개 인자인 iNOS, COX-2의 단백질 발현량에 미치는 오크라 열수 및 70% 에탄올 추출물의 항염증 효과를 확인하였다(Fig. 6). RAW 264.7에 추출물을 5–100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하고 iNOS와 COX-2의 단백질 발현량을 측정된 결과, 오크라 열수 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 LPS 처리군과 비교하였을 때, 각각 67.43%, 26.13%의 단백질 발현 억제를 확인하였다. 또한 오크라 70% 에탄올

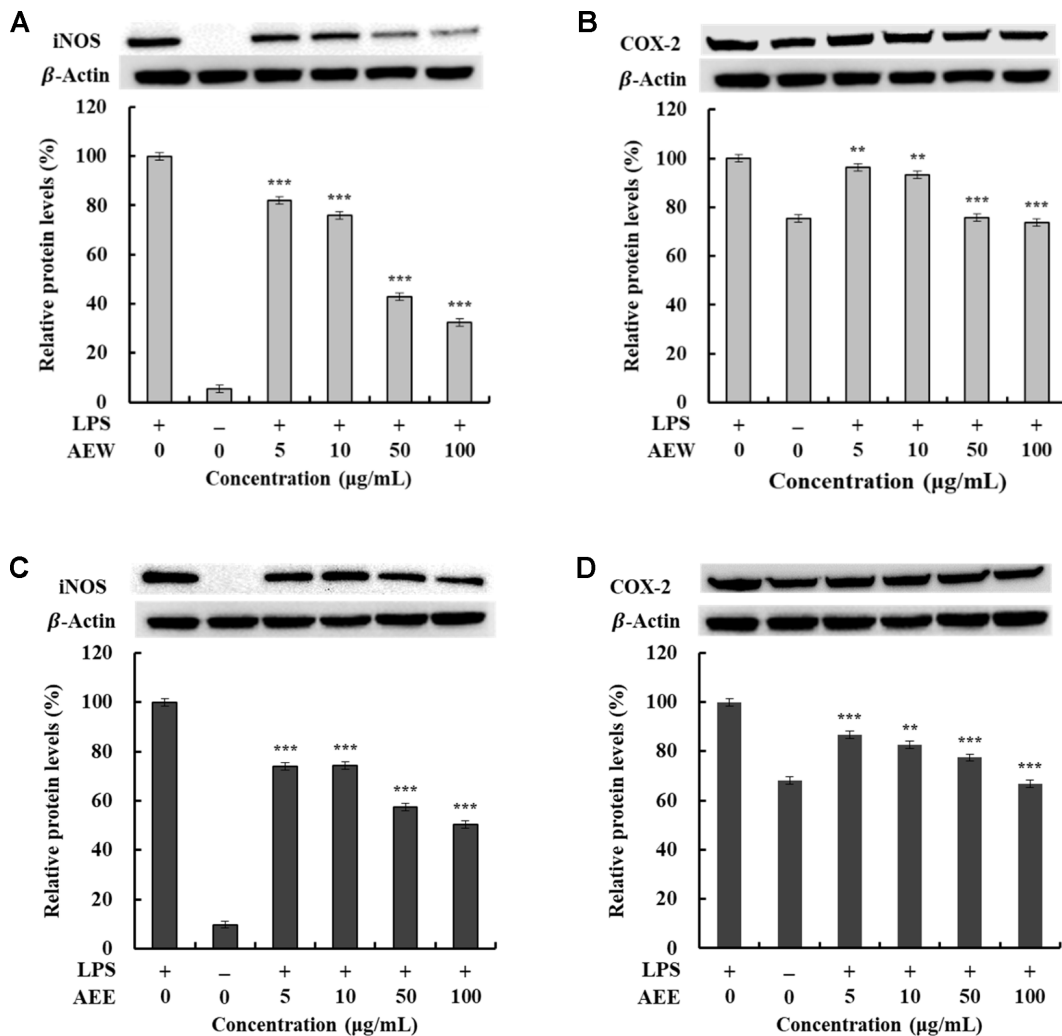


Fig. 6. Inhibitory effects of iNOS and COX-2 protein expression of samples in RAW 264.7 cells stimulated with LPS. RAW 264.7 cells (1×10^6 cells/well) were pretreated with LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) for 2 h and then treated water extracts from *Abelmoschus esculentus* at an appropriate concentration (5, 10, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$) for 16 h. Afterwards, proteins were extracted from the cells, and protein expression of iNOS and COX-2 was measured using western blot. (A) iNOS protein expression rate of AEW, (B) COX-2 protein expression rate of AEW, (C) iNOS protein expression rate of AEE, (D) COX-2 protein expression rate of AEE, Results are means \pm SD from triplicate experiments. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone-treated group)

추출물은 100 µg/ml 농도에서 LPS 처리군과 비교하였을 때, 각각 49.7%, 33.28% 저해하는 것을 확인하였다.

결론

본 연구는 오크라 추출물의 항산화, 보습, 항염증 활성을 검증하고, 천연 소재로서 활용 가능성을 확인하고자 하였다. 오크라 추출물은 열수 및 70% 에탄올을 이용하여 용매 추출한 뒤 농축과 동결건조의 과정을 거쳐 powder로 만들어 본 실험에 사용하였다. 항산화력을 측정하기 위해 폴리페놀 함량 측정, DPPH와 ABTS 라디칼 소거능 측정법을 이용하여 측정하였다. 오크라 열수 및 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과, 각각 126.76 ± 0.16 mg TAE/100 g, 144.21 ± 0.83 mg TAE/100 g의 함량을 나타내었다. 항산화력을 측정하기 위해 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과, 두 추출물 모두 농도의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 또한 오크라 열수 및 70% 에탄올 추출물을 비교하였을 때 70% 에탄올 추출물에서 항산화 활성이 더 우수함을 나타내었다.

각질형성세포와 대식세포 내에서 오크라 열수 및 70% 에탄올의 세포생존율을 MTT assay로 진행하였으며, 그 결과, 각질형성세포는 500 µg/ml에서 95% 이상의 생존율을 보였고, 대식세포는 100 µg/ml에서 95% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 이후 세포관련 실험은 독성이 나타나지 않은 농도 구간에서 실험을 진행하였다. 오크라 열수 및 70% 에탄올 추출물의 보습인자인 HA 생성량 측정 실험을 진행한 결과, 최종 농도인 500 µg/ml에서 각각 26.92%, 28.96%의 생성량 증가율을 확인하였다. 항염증 활성을 확인하기 위해 NO assay를 진행한 결과, 최종 농도인 100 µg/ml에서 각각 11.46%, 25.28%의 저해 효과를 확인하였다. 더 나아가 염증 유발 인자인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 저해를 확인하였으며, 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인하였다.

본 연구에서는 오크라 추출물의 항산화 및 항염증 활성의 우수한 효과를 확인하였고, 그 결과 오크라 추출물이 미용, 식품 및 기능성 화장품의 기능성 소재로서 활용 가능성을 확인하였다.

Acknowledgments

This research was supported by "Regional Innovation Strategy (RIS)" through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Education(MOE)(2021RIS-001).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Kim HJ, Shin JU, Lee KH. 2013. Atopic dermatitis and skin barrier dysfunction. *Allergy Asthma Respir. Dis.* **1**: 20-28.
- Lee DG, Kim MJ, Kang SH, Kim YJ. 2017. Novel *Sporichthyaceae* Bacterium strain K-07 skin barrier, moisturizing and anti-inflammatory activity. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **43**: 137-147.
- Oh JS, Jang HH. 2015. Epidermal differentiation and skin barrier. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **13**: 713-720.
- Kim Ch, Moon WS, Jang YA. 2023. Skin barrier and anti-inflammatory effect of petasites japonicus. *J. Korean Appl. Sci. Technol.* **40**: 258-267.
- Medzhitov R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**: 428-435.
- Noh KH, Jang JH, Min KH, Chinzorig R, Lee MO, Song YS. 2011. Suppressive effect of green tea seed coat ethyl acetate fraction on inflammation and its mechanism in RAW 264.7 macrophage cell. *J. Korean Soc. Food Sci. Nut.* **40**: 625-634.
- Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit. Rev. Neurobiol.* **10**: 291-316.
- Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. 2012. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Korean J. Plant Res.* **25**: 299-307.
- Hong HH, Lee KM, Park TJ, Chi WJ, Kim SY. 2021. Anti-inflammatory effect of *Distylium racemosum* leaf biorenovate extract in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages cells. *J. Appl. Biol. Chem.* **64**: 375-382.
- Jang JH, Cho HW, Lee BY, Yu KY, Yoon JY. 2016. Anti-inflammatory effects of *Oenanthe javanica* ethanol extract and its fraction on LPS-induced inflammation response. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **45**: 1595-1603.
- Tindall HD. 1983. *Vegetables in the Tropics*. pp. 325-327. McMillan AVI. London.
- Lamont W. 1999. Okra a versatile vegetable crop. *HortTechnology* **9**: 179-184.
- Majd NE, Tabandeh MR, Shahriari A, Soleimani Z. 2018. Okra (*Abelmoschus esculentus*) improved islets structure, and down-regulated PPARs gene expression in pancreas of high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell J.* **20**: 31-40.
- Olasantan FO, Bello NJ. 2004. Optimum sowing dates for okra (*Abelmoschus esculentus*) in monoculture and mixture with cassava (*Manihot esculenta*) during the rainy season in the south-west of Nigeria. *J. Agric. Sci.* **142**: 49-58.
- Uhiara NS, Onwuka G. 2014. Suitability of protein-rich extract from okra seed for formulation of ready to use therapeutic foods (RUTF). *Niger. Food J.* **32**: 105-109.
- Adelakun OE, Oyelade OJ, Ade-Omowaye BIO, Adeyemi IA, Van de Venter M. 2009. Chemical composition and the antioxidative properties of Nigerian okra seed (*Abelmoschus esculentus* Moench) flour. *Food Chem. Toxicol.* **47**: 1123-1126.
- Kim HS. 2018. Effect of *Abelmoschus esculentus* extract on anti-melanogenesis and skin barrier function. *Korean J. Food Sci.*

- Technol.* **50**: 344-348.
18. Yoo DH, Lee IC. 2021. Whitening effect of *Abelmoschus esculentus* on melanoma cells (B16F10). *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **49**: 485-492.
 19. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**: 152-178.
 20. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 1199-1200.
 21. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 1231-1237.
 22. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.
 23. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannerbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131-138.
 24. Choi SY, Lin SH, Ha TY, Kim SR, Kang KS, Hwang IK. 2005. Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medical plant. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**: 549-556.
 25. Lee JH, Lee SR. 1994. Analysis of phenolic substances content in Korean plant food. *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**: 310-316.
 26. Que F, Mao L, Zhu C, Xie G. 2006. Antioxidant properties of Chineses yellow wine, its concentrate, and volatiles. *LWT Food Sci. Technol.* **39**: 111-117.
 27. Cha JY, Ahn HY, Eom KE, Park BK, Jun BS, Cho YS. 2009. Antioxidative activity of aralia elata shoot and leaf extracts. *J. Life Sci.* **19**: 652-658.
 28. Fellegrini N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol.* **299**: 379-389.
 29. Kim MK. 2018. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities of broccoli leaf extracts. *J. Invest. Cosmetol.* **14**: 153-159.
 30. Ukeda H, Maeda S, Ishii T, Sawamura M. 1997. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* **251**: 206-209.
 31. Song HJ, Jin MH, Lee SH. 2013. Effect of ferulic acid isolated from *Cnidium Officinale* on the synthesis of hyaluronic acid. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **39**: 281-288.
 32. Dahiya P, Kamal R. 2013. Hyaluronic acid: a boon in periodontal therapy. *N. Am. J. Med. Sci.* **5**: 309-315.
 33. Madhu BP, Singh KP, Saminathan M, Singh R, Shivasharanappa N, Sharma A, et al. 2016. Role of nitric oxide in the regulation of immune responses during rabies virus infection in mice. *Virus-disease* **27**: 387-399.
 34. Kim JY, Jung KS, Jeong HG. 2004. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett.* **569**: 321-326.
 35. Lee DS, Kim KS, Ko W, Li B, Keo S, Jeong GS, et al. 2014. The neoflavonoid latifolin isolated from MeOH extract of *Dalbergia odorifera* attenuates inflammatory responses by inhibiting NF- κ B activation via Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression. *Phytother. Res.* **28**: 1216-1223.