

해너콩 추출물의 항알레르기 및 항암 효과

부회정·박수영¹·김상철¹·강희경¹·이선주*

제주대학교 방사선응용과학연구소, 의과대학 약리학교실¹

요약

제주도에서 자생하는 해너콩 추출물의 항알레르기와 항암효과에 대한 생리활성을 검색하였다. 해너콩 CHCl₃층에서 분리한 분획들의 hyaluronidase 활성 억제 효과를 통하여 항알러지 효능을 검색하였고, HL-60 세포를 통해 항암효과를 검색하였으며 좋은 효과를 확인하였다.

1. 서론

우리 민족은 예로부터 콩을 이용하여 쌀 중심의 식생활을 보완하는 식품을 많이 섭취하여 왔다¹⁾. 콩은 단백질과 지질의 우수한 급원일 뿐만 아니라 여러 가지 생리 활성물질도 함유하고 있다. 실제로 서양인에 비해 콩 섭취량이 많은 동양인들이 유방암과 전립선암의 발병률이 낮다는 연구 조사들이 이루어지고 있다²⁾. 콩 속의 isoflavones은 여성호르몬인 estrogen과 유사한 구조와 활성을 가지며 tyrosine kinase, 신생혈관 생성억제 등의 작용으로 항암활성을 가질 뿐만 아니라 골다공증 예방, 항산화 활성에 의한 심혈관질환 억제에도 영향을 미친다. 또한 콩에는 변비완화, 항신부전, 항알레르기, 항비만, 담석증 예방, 이노작용, 치매예방, 항콜레스테롤혈증, 동맥경화 억제 등의 생리활성 성분이 함유되어 있어 성인병 예방과 치료에 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다³⁻⁴⁾. 콩의 여러 가지 생리활성 중 가장 활발하게 연구가 이루어지고 있는 부분은 암예방과 관련되어 있으며 특히 genisteind의 항암작용에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있다⁵⁾.

Hyaluronidase는 hyaluronic acid 형의 mucopolysaccharide를 가수분해 하는 효소로 혈관투과성과 염증 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. Hyaluronidase는 처음으로 미생물에서 단리되었으며⁶⁾ 포유류의 고

환에서도 얻는다. 고환에서 얻은 hyaluronidase는 뱀독, 벌독, 많은 동물조직 및 사람 혈청 등으로부터 얻은 hyaluronidase와 유사한 성질을 가지며, 조직에 있는 hyaluronidase 대부분이 lysosomes으로부터 유래한다고 알려져 있다⁷⁻⁹⁾. 본 실험에 항알레르기 효과를 측정하기 위하여 사용된 hyaluronidase는 알레르기 과정에서 효소 활성이 증가되어진다고 보고 되어있으며, disodium cromoglycate(DSCG), tranilast 등의 항알레르기 약물에 의해 효소의 활성을 감소시킨다는 보고가 있다^{9, 10)}. 또한 기질인 hyaluronic acid가 비만세포에 다량으로 존재하며, 불활성형으로 존재하던 효소가 칼슘등의 금속 이온에 의해 활성화된다는 보고에 의해 hyaluronidase는 비만세포 탈과립 과정에서 칼슘이온의 표적효소일 것이라고 고려되고 있다¹⁰⁾. 따라서 hyaluronidase 저해 활성 검색법은 현재 항알레르기 활성을 위한 시험관내 enzyme assay법으로 이용되고 있다.

난치병으로 분류되어 그 치료에 난항을 겪고 있는 암에 대한 치료법은 수술이나, 방사선 치료, 화학약물 요법¹¹⁾ 등이 행해지고 있지만 완전한 치료에 대한 효과는 아직 이루어지지 못하고 있다. 수세기 동안 천연물을 이용한 항암활성 물질 연구를 통해 인체에 부작용이 적고 효능이 좋은 새로운 물질에 대한 많은 연구가 진행되고 있다¹²⁻¹⁴⁾. 본 연구자는 제주에서 자생하고 있는 콩과 식물로 현재까지 그 생리활성에 대한 연구가 되어 있지 않은 해너콩을 대상으로 항암, 항알레르기 활성에 대한

연구를 시행하였다.

해너콩 추출물의 항알레르기 효과를 확인하기 위하여 hyaluronidase 저해 활성 실험을 하였고, 항암 효과 성분 검색을 위하여 human leukemia cell인 HL-60 세포를 대상으로 MTT assay를 실시하였다.

II. 실험방법

1. 시료의 추출

제주도에서 자생하고 있는 해너콩을 2003년 10월 중순경 채집하여 잘게 파쇄하여 메탄올로 3회 교반 추출 후 감압 농축하였다. 농축한 메탄올 추출물을 물에 현탁 시킨 후 비극성 용매부터 순차적으로 hexane, chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH), water (H₂O)을 사용하여 용매 분획 하였다. 여기서 얻은 각각의 분획물들은 일차적으로 DPPH법을 이용하여 항산화 효과를 측정하였으며, 그 중 CHCl₃ 분획층을 세부적으로 분리하였다. CHCl₃ 추출물 2.3916g을 이동상 CHCl₃ / MeOH (8:2) 비율로 하여 silica column chromatography로 1차 분리한 후 다시 fr.2~4을 CHCl₃ / MeOH / H₂O (8:3:0.4)의 이동상으로 A~F까지 6개의 fractions으로 분리하였다.

2. 세포 및 시약

급성전골수성 백혈병 환자에서 유래한 HL-60 세포와 human lung fibroblast인 HEL 299세포는 KCLB (Korean Cell Line Bank)로부터 분양받아 100 units/ml penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다. Hyaluronidase와 hyaluronic acid, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-gel)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 그리고 DPPH는 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다.

3. DPPH radical 소거 활성에 의한 항산화 검색

시료의 항산화 활성 검색은 DPPH법을 이용하여 radical 소거효과를 측정하는 Blois법¹⁵⁾을 이용하였다. DPPH 시약을 EtOH에 녹여 0.1 mM 농도가

되게 제조하여 DPPH용액 450 µl에 여러 농도의 시료용액 50 µl를 넣어 vortex 시킨 후 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 반응시킨 시료는 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 517nm의 파장에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 DPPH 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (RC₅₀)로 표시하였다. free radical 소거 활성 정도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{free radical scavenging activity}(\%) \\ = [A - (B - C)] / A \times 100$$

A는 시료가 포함되지 않은 control의 흡광도이고, B는 DPPH와 시료 용액의 혼합액이며 C는 에탄올과 시료의 혼합액이다.

3. Hyaluronidase 활성 측정

Hyaluronidase 억제 효과는 기질로서 hyaluronic acid를 사용하여 반응시킨 후 생성된 N-acetylglucosamine의 양을 Morgan & Elson의 방법을 약간 개량한 류 등의 방법으로 측정하였다¹⁶⁾. 0.1M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronidase (7.900 unit/ml)의 50 µl를 여러 개의 농도로 준비된 20 µl의 시험 시료 용액과 함께 혼합시킨 후 37°C 항온수조에서 20분간 배양시켰다. 대조군은 추출물 대신에 buffer을 넣고 같은 방법으로 배양하였다. 이 때 hyaluronidase의 활성을 위해 12.5 mM의 CaCl₂ 100 µl를 함께 첨가 하였다. Ca²⁺에 의해 활성화된 hyaluronidase는 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronic acid (12mg/5ml) 250 µl를 첨가하여 다시 항온 수조에서 40분간 배양시켰다. 0.4 N sodium hydroxide 100 µl와 0.4 M potassium tetraborate 100 µl를 반응 혼합물에 첨가하여 끓는 water bath에서 3분간 반응시킨 후 냉각시켰다. 여기에 dimethylaminobenzaldehyde 용액 3 ml (4 g의 p-dimethylaminebenzaldehyde를 350 ml의 100% acetic acid와 10 N hydrochloric acid 50 ml의 혼합액)를 반응 혼합물에 첨가한 후 37°C 항온수조에서 20분간 배양하여 분광광도계로 585 nm에서 측정하였다.

$$\text{Hyaluronidase Inhibition}(\%) \\ = [(OD_c - OD_s) / OD_c] \times 100$$

여기서 OD_c(optical density)는 대조군의 585 nm에서의 OD이고 OD_s는 시료의 585 nm에서의 OD이다.

4. HL-60 세포에 대한 세포독성 실험

MTT 정량은 Mosmann의 방법을 변형하여 실시하였다¹⁷⁾ HL-60 세포를 3×10^5 cells/ml의 농도로 96 well plate에 분주하고 100 μ g/ml의 농도로 시료를 첨가하였다. 이를 4일간 배양한 다음, MTT 100 μ g을 첨가하여 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide(DMSO) 150 μ l를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포 성장억제정도를 조사하였다.

5. HEL 299 세포에 대한 세포독성 실험

HEL 299 세포를 1×10^5 cells/ml의 농도로 96 well plate에 분주하고 HL-60 세포에서 처리한 방법과 동일하게 하여 측정하였다.

III. 실험결과 및 고찰

1. 항산화 활성 검색

해녀공의 free radical 소거력을 측정하기 위하여 MeOH로 추출하여 농축 후 Hexane층, CHCl₃층, EtOAc층, BuOH층, 그리고 residue층으로 분획하여 각각의 층별로 DPPH용액을 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 각각의 분획층 시료들은 5개의 농도로 준비하여 50% 환원되는 농도를 측정하였고 RC₅₀으로 표현하였다. 각 분획별 DPPH radical 소거력을 측정한 결과 EtOAc층(RC₅₀: 1.75 μ g/ml)과 BuOH층(RC₅₀: 2.22 μ g/ml), 그리고 CHCl₃층(RC₅₀: 15.39 μ g/ml)에서 대조군인 Vit.C (RC₅₀: 3.37 μ g/ml), BHA(RC₅₀: 10.36 μ g/ml)보다 좋거나 비슷한 효과를 보였다(Table 1).

2. Hyaluronidase 활성 억제 효과

해녀공 CHCl₃층을 2차 분리하여 얻은 6개의 fractions에 대하여 hyaluronidase 활성 억제 효과를 측정하였다. 대조군으로 DSCG와 ursolic acid를 사용하였으며 각 시료는 5개의 농도를 준비해서 각각

Table 1. The free radical scavenging effects of several fractions of *Canavalia lineata*

Fraction	RC ₅₀ (μ g/ml)
Vit. C	3.37
BHA	10.36
MeOH	15.58
Hexane	>100
CHCl ₃	15.39
EtOAc	1.75
BuOH	2.22
Residue	45.53

Table 2. Effect of several subfractions of CHCl₃ fraction of *Canavalia lineata* on hyaluronidase activity.

Fraction	IC ₅₀ (μ g/ml)
DSCG	12.28
ursolic acid	181.67
CHCl ₃ - A	147.42
CHCl ₃ - B	402.24
CHCl ₃ - C	156
CHCl ₃ - D	55.90
CHCl ₃ - E	85.54
CHCl ₃ - F	93.93

3번씩 실험하여 평균값을 구하고, 효소 활성을 50% 저해하는 농도를 구하여 IC₅₀으로 나타내었다. 분획 E에서 IC₅₀값이 55.90 μ g/ml로 가장 좋은 억제 효과를 보였고, 이것은 대조군인 DSCG (12.28 μ g/ml) 보다는 아니지만 ursolic acid의 181.67 μ g/ml보다 훨씬 좋은 효능이었다. B 분획층을 제외하고는 모두 ursolic acid보다 좋은 효능을 보이고 있어 항알레르기 효능이 있는 물질이 비교적 비극성 성질을 띠고 있는 물질임을 추측할 수 있었다(Table 2).

3. HL-60 세포 증식에 미치는 효과

해녀공의 CHCl₃층에서 1차적으로 분리한 4개 분획들의 항암 효과 정도를 알아보기 위하여 암세포 성장 재해 정도를 MTT법을 이용하여 측정하였다. 암세포는 전골수성 백혈병 세포주인 HL-60 세포를 이용하여 시료 농도 100 μ g/ml를 처리하였다. 그 결과 대체적으로 유효한 세포증식 억제 효과를 보였고, 특히 fr. 3(76.04%)과 fr. 4(73.75%)에서 암세포 증식을 현저하게 억제시키고 있음을 확인할 수 있었다.

Table 3. Effect of several subfractions of CHCl₃ fraction of *Canavalia lineata* on the growth of HL-60 cells.

Fraction	Inhibition(%)
CHCl ₃	34.74
fr.1	38.44
fr.2	40.40
fr.3	76.04
fr.4	73.75

Table 4. Effect of several subfractions of CHCl₃ fraction of *Canavalia lineata* on the growth of HEL 299 cells.

Fraction	Inhibition(%)
CHCl ₃	-16.9
fr.1	-9.5
fr.2	-1.8
fr.3	-18.8
fr.4	-13.4

4. HEL 299 세포 증식에 미치는 효과

해너콩의 CHCl₃층에서 1차적으로 분리한 시료들의 암세포가 아닌 정상세포의 증식 억제에도 작용하는 지 확인하기 위하여 사람의 정상 섬유아세포를 이용하여 MTT법으로 세포증식 억제 효과를 측정하였다. 그 결과 모두 세포 증식을 활성화시키고 있어 본 실험에 사용된 시료들은 암세포만을 선택적으로 억제하고 있음을 확인할 수 있었다.

IV. 결론

제주에서 자생하는 식물들 중에 콩과 식물인 해너콩을 채집하여 현대인들에게 많은 질병인 알러지와 암에 관한 유효 효과를 측정하였다. 1차적으로 5개의 용매분획을 하여 DPPH법을 이용해 항산화 활성을 측정하였고, 비교적 효과가 좋은 CHCl₃층을 선택하여 세부적으로 분리하여 항알러지 효과와 항암 효능을 확인하였다. 분리한 처음 4개의 분획에서 모두 백혈암 세포증식을 억제시키고 있음을 확인하였고, 그중 fr.3과 fr.4가 좋은 효과를 보였다. 일반 세포에서도 세포 독성이 있는 지 여부를 확인하기 위하여 HEL 299 세포를 이용하여 세포

증식 억제 효과를 측정하였으나 오히려 모든 분획에서 세포 증식을 시키고 있음을 확인하였다. 현재 사용하고 있는 모든 항생제들은 암세포와 정상세포에 대한 선별력이 부족하여 정상세포에 미치는 독성으로 인한 한계가 많이 나타나고 있는데^{18, 19)} 해너콩 추출물은 암세포만 선택적으로 억제하는 효과를 보이고 있어 우수한 천연 항암제로서의 가능성을 예측할 수 있었다. CHCl₃ 층 1차 분리층 중 항암효과가 좋게 나온 fr.2에서 fr. 5을 다시 2차 분리하여 얻은 6개의 분획에 대해 항알러지 효과를 측정하여 분획 D, E, F에서 좋은 항알러지 효능을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 in vitro에서의 항알러지 검색과 항암 효능에 대해서 검색하여 해너콩 추출물의 유효한 효능을 검증하였으며, 천연 추출물에서의 우수한 항알러지, 항암 효과 물질을 검색하는 효과를 얻을 수 있었다. 현재 실험실에서는 이들에 대해서 더 많은 연구와 함께 활성성분 분리과정을 진행 중에 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2003년 산업자원부 지역산업기술개발사업의 연구비 일부와 제주대학교 아열대원예산업연구센터(RRC)의 2004년 아열대 식물 유전자 연구의 학술연구비, 2004년 과기부 과학재단지정 특수연구소재은행 아열대/열대 생물유전자은행의 연구비 일부지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. 권태완 (2000) 콩과 21세기의 과제. 한국콩연구회지, 17(1): 1-4.
2. 손현수, 이윤심, 신해철, 정형근 (2000) 질환의 예방과 치료에서 대두의 생리적 기능에 대한 최근의 연구. 한국콩연구회지, 17(1): 37-60.
3. 권태완, 송영선, 김정상, 문갑순, 김정인, 홍정화 (1998) 콩 식품의 생리활성에 관한 국내연구동

- 향. 한국콩연구회지, 15(2): 147-160.
4. Hendric. S. K., Lee. W., Xu. X., Wang. H. J. and Murphy. P.A. (1994) Defining food components as new nutrient. *J. Nutr.*, 124: 1789S-1792S.
 5. Alegria. B Caragay.(1992) Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technology*, April : 65-68.
 6. Meyer. K. Dubos. R., Smyth. E. M. (1937) The hydrolysis of the polysaccharide acids of vitreous humor of umbilical cord. and of streptococcus by the autolytic enzyme of *Pneujococcus*. *J. Biol. Chem.*, 118. 71.
 7. Aronsonja. N. N., Davidson. E. A. (1967) Lysosomal hyaluronidase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 242. 437-440.
 8. Asboe-Hansen. G. (1950) The origin synovial mucin(Ehrlich's mast cell)-A secretary element of the connective tissue. *Ann. Rheum. Dis.*, 9. 149.
 9. Sakamoto. K., Nagai. H., and Koda. A. (1980) Role of hyaluronidase in immediate hypersensitivity reaction. *Immunopharmacology*, 2. 139-146.
 10. Kakegawa. H., Matsumoto. H., and Satoh. H. (1985) Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem. Pharm. Bull.*, 33. 642-646.
 11. Ahn. B. Z., Lee. Y. H and Kim. S. I. (1992) Isolation of cytotoxicity potentiating substances from red ginseng. *J. Kor. Cance Assoc.*, 24. 795.
 12. Suffness. M. and Douros. J. (1982) Current status of the NCI plant and animal product program. *J. Nat. Prod* 45: 1-14.
 13. Itokawa. H. (1988) Research on antineoplastic drugs from natural sources. *Yakugaku Zashi* 108: 825-841.
 14. Kosuge. T., Yokota. M., Sugiyama. M., Okamoto. K., Saito. M and Yamamoto. T. (1986) Studies on Chinese medicines used for cancer III Cytotoxic constituent against HeLa cells in the fruit of *Trapa bispinosa* Roxb. *Yakugaku Zasshi*, 106: 183-185.
 15. Blois. M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181. 1199.
 16. 류재천, 박종세, 송윤선. (1990) 한국과학기술연구원 도핑컨트롤센터 : 항알러지 및 항염증 작용의 시험관내 1차 스크리닝법. 한국 생화학회.
 17. K. Meada. M. Fukuda.(1991). In vitro effectiveness of whitening cosmetic ocmponents in human melanocyte. *J Soc Cosmet Chem* 42:361-8 .
 18. Parker. S. L., T., Bolder. S. and Wing해. P. A. (1996) Cancer Statistic. *Cancer J. Clin.*, 46.5.
 19. Bailer. JC and Gorrick. HL (1997) Cancer underfeated. *N. Eng. J. Med.*, 336. 1569.