

능실 열매의 부위별 추출물 및 캘러스배양 추출물의 항산화, 항염증 효과 연구

장혜인[†]

세명대학교 화장품뷰티생명공학부
(2019년 12월 3일 접수: 2019년 12월 29일 수정: 2019년 12월 30일 채택)

Study on the Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Extracts of Callus Cultures, pericarp, flesh, fruit of *Trapa Japonica*

Hye In Jang[†]

*School of Cosmetic Science and Beauty Biotechnology, Semyung University 65,
Semyeong-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea 27136*
(Received December 3, 2019; Revised December 29, 2019; Accepted December 30, 2019)

요약 : 본 연구는 *Trapa Japonica*를 껍질을 벗긴 알맹이와 껍질, 그리고 알맹이와 껍질, 캘러스배양물을 추출한 추출물의 항산화, 항염증 효과를 평가하였다. RAW 264.7 세포와 HaCaT 세포를 사용하여 조사한 각각의 독성은 껍질 추출물에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 $45.8 \pm 1.5\%$ 와 $51.1 \pm 1.0\%$ 의 세포 생존율을 보였으며 그 이상의 농도에서 더 낮은 세포 생존율을 나타내었다. 총폴리페놀 함량은 껍질과 캘러스배양 추출물에서 각각 $213.20 \pm 15.78 \text{ mg/g}$, $205.20 \pm 18.97 \text{ mg/g}$ 의 함량을 보였으며 플라보노이드 함량도 껍질 추출물은 $29.30 \pm 3.24 \text{ mg/g}$, 캘러스배양 추출물은 $37.4 \pm 7.43 \text{ mg/g}$ 으로 다른 추출물에 비해 높은 함량을 나타내었다. 세포 독성은 알맹이 추출물과 캘러스배양 추출물에서는 세포 독성이 거의 나타나지 않았다. 항산화 활성을 확인하기 위한 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 라디칼 감소는 추출물 농도 0.005 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위에서 껍질 추출물 $67.53 \pm 1.5\% \sim 75.75 \pm 0.5\%$ 의 소거능을 보였으며 캘러스배양 추출물은 $3.1 \pm 0.1\% \sim 77.32 \pm 0.5\%$ 의 감소효과를 보였다. 모든 추출물을 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 LPS로 유도된 Nitric Oxide (NO) 생성량을 측정한 결과 유의한 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)의 감소가 나타났다.

주제어 : 능실 열매, 능실알맹이, 능실껍질, 능실캘러스배양, 항산화, 항염증

Abstract : The purpose of this study was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory effects of extracts of callus cultures, pericarp, flesh, fruit of *Trapa Japonica*. The toxicity of extracts from *Trapa Japonica* pericarp investigated using the RAW 264.7 cell showed $45.8 \pm 1.5\%$ of cell survival rate. And the results of investigation using HaCaT cells showed a $51.1 \pm 1.0\%$ cell viability at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the pericarp extract and lower cell viability at

[†]Corresponding author
(E-mail: inijjang7@naver.com)

higher concentrations. The total content of polyphenol pericarp extract was 213.20 ± 15.78 mg/g, while the total content of flavonoid was 29.30 ± 3.24 mg. And the total content of polyphenol callus cultures extract was 205.20 ± 18.97 mg/g, while the total content of flavonoid was 237.4 ± 7.43 mg. With a concentration level of $0.005 \sim 1000$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ extract of *Trapa Japonica* pericarp the range of removal of 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radicals was 67.53 ± 1.5 % $\sim 75.75 \pm 0.5$ % respectively and the range of removal of extract of *Trapa Japonica* callus cultures extract was also 3.1 ± 0.1 % $\sim 77.32 \pm 0.5$ % respectively.

As a result of measuring the Nitric Oxide(NO) generation amount of all *Trapa Japonica* extract 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration exhibited significant ($p < 0.05$, $p < 0.01$) decreases.

Keywords : *Trapa Japonica* Flesh, *Trapa Japonica* Pericarp, *Trapa Japonica* Callus cultures, Antioxidant, Anti-inflammatory,

1. 서론

염증은 전염성 물질, 항원 공격, 물리적, 화학적 또는 외상성 손상으로 인한 광범위한 부상을 막기 위한 복잡한 생물학적 반응으로 외상, 감염, 조직 손상 또는 유해한 자극에 반응하여 다양한 면역 세포의 활성화에 의해 조절되는 보호 작용이다[1-4]. 염증이 일어난 부위에서는 홍반, 부종, 수포 및 열감과 소양증 등의 증상이 관찰되기도 한다[5]. 이렇게 염증반응은 외부 자극으로부터 인체를 보호하는 중요한 역할을 하지만 이러한 과정이 반복되거나 정도가 과도할 경우 피부에 2차적인 손상을 입힐 수 있다.

RAW264.7과 같은 대식세포들이 활성화되면 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2) 및 cytokine등 다양한 염증반응을 유발하는 매개물질을 분비한다[6,7] Inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 세포 내에 존재하지 않으나 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin 1 β (IL-1 β)에 의해 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다. NO는 세포내 항상성 유지, 항암 작용과 세포독성에 관여하는 신호전달자이지만, 과량으로 존재할 경우 세포 손상이나 염증반응으로 이어져 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 또한, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 통증, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[8,9]

능실(*Trapa japonica*)은 마름과의 한해살이 수생식물로서 열대 및 아열대 아시아국가의 연못이

나 얇은 습지, 늪 등에서 자라는 부유성 식물이다[10]. 껍질의 안쪽에는 흰색 과육이 있고 과육은 주로 조리해서 소비하며 약 80%의 분과 5% 단백질 그리고 소량의 비타민으로 이루어져 있다[11]. 껍질은 많은 식이섬유와 폴리페놀이 함유되어 있으며[12] 예전부터 중의학에서 사용되어 왔다. 최근 화장품 소재에 대한 천연물, 한방 소재에 대한 관심으로 능실에 대한 연구도 지속적으로 이루어지고 있어서 능실 추출물의 항산화 효과를 비롯하여 항비만, 항염, 피부 광노화 억제 등 다양한 연구가 진행되고 있다[10, 13-19].

천연물 내 생리 활성 물질인 식물의 2차 대사산물을 이용하기 위해서는 많은 양의 식물이 필요하지만 식물의 생산에는 지리적 불안정성과 가뭄, 병해충과 같은 환경적인 요인의 영향뿐만 아니라 파종에서 수확까지의 긴 재배기간 및 고수익을 갖는 품종 선택의 어려움 등의 문제가 따른다[20] 캘러스 배양은 식물의 기관에서 분리해낸 상처받은 절편체 조직으로부터 세포 분열 증식시키는 것을 말한다. 이러한 캘러스는 식물세포 배양의 한 종류로 이용되며 유래된 식물로 자라나 대량 생산을 가능하게 한다. 다양한 식물 캘러스 추출물은 항염증, 항산화 및 항비만 효과에 관한 연구가 보고되어 있다[21,22].

이에 본 연구에서는 항염증 효과가 있음이 이미 밝혀진 능실 열매를 껍질, 과육, 껍질과 과육으로 분리하여 각각의 효능, 효과를 확인하였으며 좀 더 나아가 능실 열매의 캘러스배양 추출물의 효능, 효과도 확인하여 다양한 형태로 분화된 능실추출물의 항산화 및 항염 효과에 대해서 확인하여 기능성을 갖는 화장품의 천연 소재로서의

이용 가능성을 살펴보고자 하였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 시료의 추출방법

농실은 홍익제원(천안, Korea)에서 구입하였다. 농실을 알맹이, 껍질, 껍질+알맹이로 구분하여 각각 50 g에 70 % 에탄올(C_2H_5OH) 500 mL 을 넣고 3시간 동안 환류 추출 후 여과액을 얻었으며, 얻어진 여과액을 회전진공농축기 (Büchi B-480 Co., Flawil, Switzerland) 에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 동결건조기 (EYELA FDU-540 Co., Tokyo, Japan)로 동결 건조하여 분말로 만들었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 ($-80^{\circ}C$)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다. 캘러스배양 추출물은 캘러스배양에 성공한 GFC 생명과학 (Korea)에서 받아서 사용하였다.



Fig. 1. Classification of *Trapa Japonica*.
(a) *Trapa Japonica* (b) *Trapa Japonica* Flesh (c) *Trapa Japonica* Pericarp (d) *Trapa Japonica* Callus cultures

2.2. 세포배양

세포독성 및 항염 효과 확인을 위해 RAW264.7 대식세포와 HaCaT 세포를 배양하여 사용하였으며 배양 조건은 다음과 같다.

RAW 264.7 대식세포와 HaCaT 세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 세포배양을 위한 Fetal bovine serum (FBS; Welgene, Korea)과 penicillin/streptomycin (Invitrogen, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Welgene)을 RAW 264.7 대식세포와 HaCaT 세포 배양에 사용했다. RAW 264.7 대식세포와 HaCaT 세포는 5% CO_2 , $37^{\circ}C$, 습도 100% 조건의 인큐베이터에서 배양하였다.

2.2.1 세포 독성 실험

HaCaT 세포 및 RAW 264.7 세포의 세포독성이 나타나지 않는 최대 처리 농도 결정을 위해 cell counting kit-8 (CCK-8, Dogen, Korea) assay를 진행하였다. 24 well-plate에 세포를 5.0×10^4 cell/well로 분주한 후 하루 동안 안정화시켰다. 이 후 기존의 배양액을 제거한 후 ficin을 농도별로 세포에 처리하여 $37^{\circ}C$ 온도 조건에서 24 시간 동안 반응시켰다. 배양액을 제거한 후 DMEM : EZ-Cytox를 10:1로 희석한 용액을 각 well 마다 $100 \mu L$ 씩 처리하고 약 30 min 동안 반응시킨 후 ELISA reader (BioTek Instruments Inc., USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포가 첨가되지 않은 대조군의 흡광도를 기초로 하여 세포 생존율을 계산하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 백분율로 표기하였다.

Cell viability (%) =

$$\frac{\text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \times 100$$

Abs control : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs sample : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

2.3. 항산화 활성 측정

2.3.1 총 polyphenol 함량 측정

각 부위별 농실 추출물 및 농실캘러스 배양추출물의 polyphenol 함량은 Gutfinger의 방법[23]을 응용하여 측정하였다. 추출 시료용액 1 mL에 50% Foiln-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL를 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 반응용액에 Na_2CO_3 포화용액 1 mL와 7.5 mL 증류수를 차례로 혼합하여 30분간 방치시킨 뒤, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 760

nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 polyphenol 함량은 gallic acid를 표준물질로 이용하여 작성한 검량선에 따라 함량을 구하였으며 측정단위로는 GAE (Gallic acid equivalent)/g을 사용하였으며 모든 실험은 3회 반복하여 평균값을 사용하였다.

2.3.2 총 flavonoid 함량 측정

각 부위별 능실 추출물 및 능실켈러스 배양추출물의 flavonoid 함량은 Nieva Moreno[24] 등의 방법을 응용하여 측정하였다. 각 샘플 0.1 ml와 80% 에탄올 0.9 ml을 혼합한 혼합물 0.5 ml에 10% aluminium nitrate와 1M potassium acetate 0.1 ml 그리고 80% 에탄올 4.3 ml을 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균값을 사용하였다.

2.3.3 DPPH radical 소거능 측정

각 부위별 능실 추출물 및 능실켈러스 배양추출물의 항산화 활성을 확인하기 위해 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 radical 소거능을 평가하였다. 100 μ M DPPH 용액 200 μ l에 ficin 용액 100 μ l를 첨가한 후 37°C 온도 조건에서 약 30분간 반응한다. 이후 517nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도의 감소 정도를 관찰하였다. DPPH 라디칼 소거능은 sample 자체의 흡광도 (blank)와 시료무첨가군 (control), 시료첨가군 (sample) 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균값을 사용하였다.

DPPH scavenging (%)

$$= \left[1 - \frac{\text{sample} - \text{blank}}{\text{control}} \right] \times 100$$

2.4. Nitric Oxide(NO) 측정

RAW 264.7 세포를 24well-plate에 1.0×10^6 cell/well로 분주한 후 24 시간 동안 plate에 안정화하였다. Lipopolysaccharide(LPS, Sigma-aldrich, USA) 1 μ g/ml과 각각의 추출물들을 농도별로 동시에 처리하고 24 시간 동안 세포를 배양하며 반응을 유도하였다. 상등액을 96 well plate로 100 μ L씩 옮긴 후에 Griess 용액 (G4410, Sigma-aldrich, MO, USA)을 100 μ L씩 1:1 비율로 섞어 30 min 간 실온에서 반응시

킨 후 540 nm에서 ELISA reader (EPOCH; BioTek, USA)로 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균값을 사용하였다.

2.5. 통계처리

모든 통계처리는 Student' t-test를 이용하여 유의 수준 0.05, 0.01 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) 수준에서 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포독성 검사

3.1.1 RAW 264.7 세포에 대한 독성 검사

능실의 각 부위별 추출물과 능실켈러스배양 추출물의 세포독성이 나타나지 않는 최대 처리 농도 결정을 위해 cell counting kit-8 (CCK-8, Dogen, Korea) assay를 진행하여 24시간 동안 다양한 농도로 처리하여 세포의 생존율을 측정하였다. 대조군은 시료를 처리하지 않았고 각 추출물은 0.1 ~ 100 μ g/mL의 농도로 처리하여 세포 생존율을 측정하였다(Fig. 1). 그 결과 RAW 264.7 대식세포에서는 능실 껍질추출물의 경우엔 1.0 μ g/ml이상의 농도에서 세포독성이 관찰되었으며, 껍질과 알맹이를 동시에 추출한 추출물의 경우엔 10 μ g/ml 이상의 농도에서 세포 독성이 관찰되었다. 반면에 껍질을 제거한 알맹이만을 추출한 추출물의 경우엔 1000 μ g/ml에서만 세포독성이 나타났으며 능실켈러스배양 추출물은 1000 μ g/ml의 농도에서도 세포독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다.

3.1.2 HaCaT 세포에 대한 독성 검사

HaCaT 세포에서는 RAW 264.7 세포에서의 독성보다는 조금 더 높은 농도에서 세포 독성이 관찰되었다. 특히 껍질을 제거한 알맹이와 켈러스 배양 추출물의 경우엔 1000 μ g/ml에서도 세포독성이 관찰되지 않았으며, 껍질만 추출한 추출물의 경우엔 각 추출물 중 가장 낮은 농도인 100 μ g/ml 이상의 농도에서 세포독성이 관찰되었다. RAW 264.7 세포에서의 독성결과와 유사하게 껍질이 포함되는 추출물의 경우에 조금 더 낮은 농도에서 독성이 나타나는 것을 확인하였다.

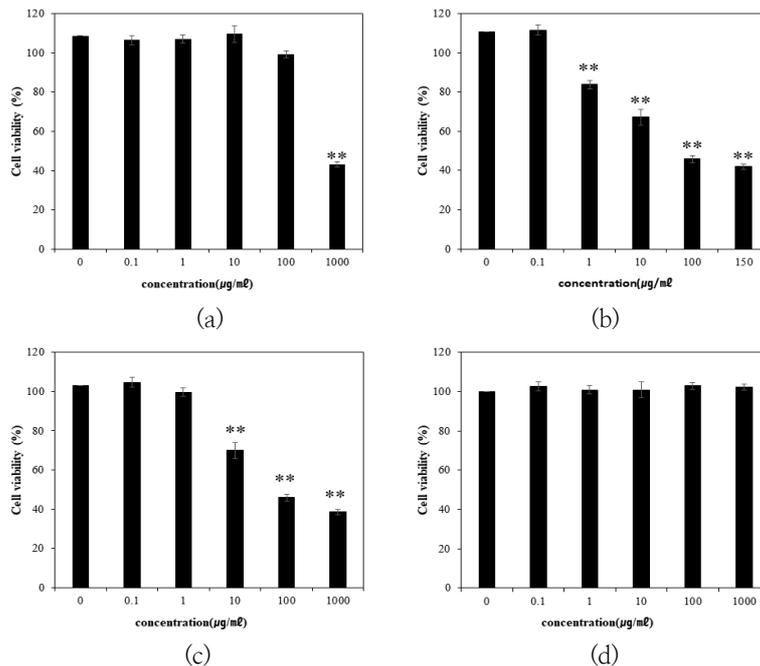


Fig. 1. Cell viability of *Trapa japonica* extract in RAW 264.7 cells.

Each cell was treated with 0.1 ~ 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of *Trapa japonica* extract for 24hr. Cytotoxicity was measured using an CCK-8 assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. (Significance of results, ** : $p < 0.01$).

(a) *Trapa Japonica* flesh Extract

(b) *Trapa Japonica pericarp* Extract

(c) *Trapa Japonica* Extract

(d) *Trapa Japonica* callus cultures Extract

3.2. 항산화 활성에 미치는 영향

3.2.1. 총 polyphenol 함량

각각의 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 함량은 3회에 걸쳐 실험한 후 나온 값의 평균값과 표준편차값을 계산하였고 gallic acid 표준용액의 표준검정곡선을 통해 추출물 및 용매 분획물의 중량 1 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 측정되었다. Gallic acid를 표준물질로 하여 측정한 결과, <Table 1>와 같이 능실알맹이 추출물은 19.04 ± 0.58 mg/g, 능실껍질추출물은 213.20 ± 15.78 mg/g, 능실알맹이+껍질 추출물은 174.33 ± 10.69 mg/g으로 나타났으며 능실캘러스배양 추출물은 205.2 ± 18.97 mg/g 으로 나타났다. 능실 추출물 중에서는 껍질 부분에 많은 폴리페

놀(213.20 ± 15.78 mg/g GAE)을 함유하고 있었으며 능실캘러스배양 추출물의 폴리페놀 함량도 매우 높게 나타났다.

3.2.2. 총 flavonoid 함량

각각의 추출물에 존재하는 총 플라보노이드 함량은 3회에 걸쳐 실험한 후 나온 값의 평균값과 표준편차값을 계산하였고 quercetin 표준용액의 표준검정곡선을 통해 추출물 및 용매 분획물의 중량 1 g당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 측정되었다. quercetin을 표준물질로 하여 측정한 결과, <Table 2>와 같이 능실알맹이 추출물은 8.24 ± 0.01 mg/g, 능실껍질추출물은 29.30 ± 3.24 mg/g, 능실알맹이+껍질추출물은 27.24 ± 1.98 mg/g으로 나타났으며 능실캘러스배양추출물은 $37.4 \pm$

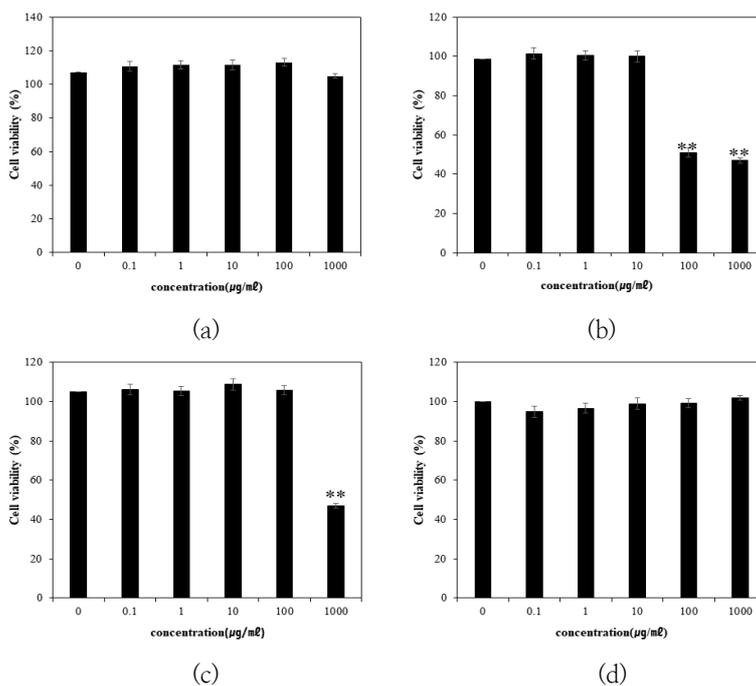


Fig. 2. Cell viability of *Trapa japonica* extract in HaCaT cells

Each cell was treated with 0.1 ~ 1000 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of *Trapa Japonica* extract for 24hr. Cytotoxicity was measured using an CCK-8 assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. (Significance of results, ** : $p < 0.01$).

- (a) *Trapa Japonica* flesh Extract
- (b) *Trapa Japonica* pericarp Extract
- (c) *Trapa Japonica* Extract
- (d) *Trapa Japonica* callus cultures Extract

Table 1. Total Polyphenol Contents of *Trapa Japonica* Extracts

Sample	Total polyphenolics (mg/g ext.)
TJFE ¹⁾	19.04 \pm 0.58
TJPE ²⁾	213.20 \pm 15.78
TJE ³⁾	174.33 \pm 10.69
TJCE ⁴⁾	205.2 \pm 18.97

- ¹⁾TJFE= *Trapa Japonica* flesh Extract
- ²⁾TJPE= *Trapa Japonica* pericarp Extract
- ³⁾TJE = *Trapa Japonica* Extract
- ⁴⁾TJCE= *Trapa Japonica* callus cultures Extract

Table 2. Total flavonoid Contents of *Trapa Japonica* Extracts

Sample	Total polyphenolics (mg/g ext.)
TJFE ¹⁾	8.24 \pm 0.01
TJPE ²⁾	29.30 \pm 3.24
TJE ³⁾	27.24 \pm 1.98
TJCE ⁴⁾	37.4 \pm 7.43

- ¹⁾TJFE= *Trapa Japonica* flesh Extract
- ²⁾TJPE= *Trapa Japonica* pericarp Extract
- ³⁾TJE = *Trapa Japonica* Extract
- ⁴⁾TJCE= *Trapa Japonica* callus cultures Extract

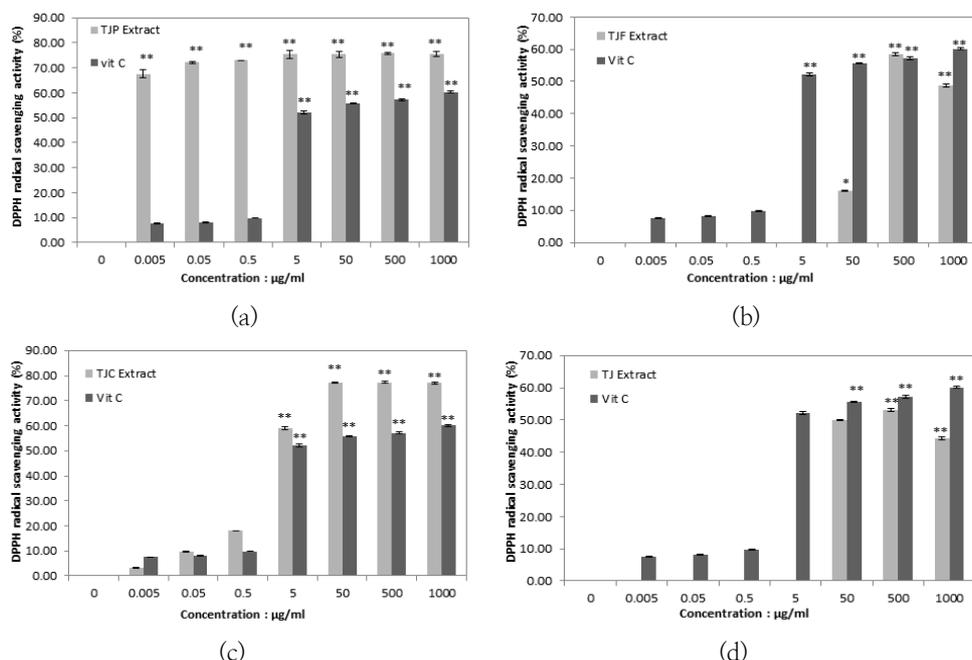


Fig. 3. DPPH free radical scavenging activity of *Trapa japonica* extract at various concentration. Extract was incubated with DPPH solution at 37°C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments. (Significance of results, ** : p < 0.01, * : p < 0.05).

- (a) *Trapa Japonica* flesh Extract
- (b) *Trapa Japonica* pericarp Extract
- © *Trapa Japonica* Extract
- (d) *Trapa Japonica* callus cultures Extract

7.43 mg/g 으로 나타났다. 총 플라보노이드 함량도 총 폴리페놀 함량과 마찬가지로 농실추출물 중에서는 껍질과 캘러스 배양 추출물에서 함량이 높게 나타났다.

3.2.3. DPPH radical 소거능

각 추출물의 DPPH 소거율을 측정하였다. 농실알맹이 추출물은 0.005 ~ 1,000 µg/ml의 농도에서 실험한 결과 5 µg/ml의 농도 이하에서는 라디칼 소거능이 없었으나 50 µg/ml의 농도에서는 16.01 ± 5.2 %, 500 µg/ml의 농도에서는 58.42 ± 4.1%, 1000 µg/ml의 농도에서는 48.71 ± 4.2 %로 대조군인 Vitamin C와 비교했을 때 500 µg/ml의 농도에서는 오히려 더 우수한 소거능을 보여주는 것을 확인할 수 있다. 농실껍질

추출물의 경우엔 0.005 µg/ml의 농도에서도 67% 이상의 라디칼 소거능을 보여주어 매우 항산화 활성이 우수함을 확인하였다. 농실껍질 추출물의 경우엔 세포의 종류에 따라 다르긴 하나 RAW 264.7 세포에서 1.0 µg/ml 이상의 농도에서 세포독성을 보였다. 하지만 그 이하의 농도에서도 우수한 항산화 활성을 보여주기에 농실껍질 추출물의 경우엔 세포독성이 나타나지 않는 농도에서 기타 생리활성을 다시 한 번 더 살펴보면 좋을 것으로 사료되는 바이다.

농실알맹이+껍질을 한 번에 추출한 추출물의 경우엔 50 µg/ml이상의 농도에서 Vitamin C와 유사한 정도의 라디칼 소거능을 보여주며 그 이하의 농도에서는 라디칼 소거능이 없음을 확인하였다. 농실캘러스배양 추출물의 경우엔 라디칼 소

거능이 매우 우수하여 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 대조군인 Vitamin C 보다 훨씬 우수한 라디칼 소거능을 보여주어 항산화 효과가 매우 우수하며 앞서 세포독성 실험에서도 능실캘러스배양 추출물의 경우엔 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서도 세포독성이 없어 기타 피부와 관련된 생리활성을 좀 더 연구해볼 가치가 있다고 생각되는 바이다.

3.3. 항염증 효능에 미치는 영향

체내에서 NO는 세균과 종양을 제거하고 신경 전달을 매개하거나 혈압을 조절하는 등 다양한 역할을 담당하는 중요한 인자로 알려져 있다[25]. 그러나 높은 수준으로 생성되는 NO는 조직과 신경의 손상을 유발하고, 유전자의 변이를 유도하거나, 부종을 유발하는 등 과도한 염증반응을 일으킨다[26-28].

각각의 추출물의 항염증 작용을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에서 LPS 자극에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 대조군을 $100.0 \pm 0.0\%$ 로 나타내고 각각의 추출물을 6.25, 12.5, 25, 50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도로 처리했을 때의 효능을 살펴본 결과 각각의 농도에서 능실알맹이 추출물은 $179.2 \pm 4.93\%$, $172.5 \pm 4.36\%$, $162.6 \pm 4.58\%$, $154.1 \pm 7.14\%$ 의 NO 생성율을 보인다. LPS에 의해 유도된 값은 $189.0 \pm 8.29\%$ 로 나타나, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 유의성 있는 감소를 보여주었으며 능실껍질 추출물은 $158.1 \pm 4.25\%$, $151.5 \pm 4.04\%$, $100.0 \pm 3.51\%$, $92.9 \pm 1.96\%$ 이며 LPS에 의해 유도된 값은 $205.5 \pm 9.43\%$ 으로 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 전농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다. 능실알맹이+껍질 추출물은 $83.3 \pm 5.69\%$, $167.6 \pm 7.79\%$, $110.7 \pm 4.87\%$, $95.3 \pm 1.02\%$ 이며 LPS에 의해 유도된 값은 $202.4 \pm 0.95\%$ 로 나타나, 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다. 능실캘러스배양 추출물은 각 농도에서 $160.1 \pm 2.89\%$, $146.8 \pm 2.56\%$, $110.8 \pm 4.98\%$, $101.5 \pm 3.45\%$ 이며 LPS에 의해 유도된 값은 $203.8 \pm 5.61\%$ 로 나타나, 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 4). 위의 결과에서 보듯이 능실 각 부위별 추출물 및 캘러스배양 추출물 모두 NO 생성을 억제하는 효과를 가지고 있으며 특히 능실껍질 추출물과 능실캘러스배양 추출물은 저농도에서도 NO저해 효과가 우수한 것으로

보인다. 하지만 능실껍질 추출물의 경우엔 세포독성이 우려되기 때문에 세포독성 측면에서 보았을 때 매우 우수한 결과를 보이는 능실알맹이 추출물 및 능실캘러스 배양 추출물을 사용하는 것이 안전성이 확보된 화장품 소재로 좋을 것으로 사료되는 바이다.

4. 결론

능실을 껍질, 알맹이, 껍질과 알맹이, 캘러스 배양으로 다양화 한 후 그 추출물의 항산화 및 항염증에 미치는 영향에 관한 연구를 진행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 능실의 껍질, 알맹이, 껍질 추출물의 RAW 264.7 세포와 HaCaT 세포에 대한 독성은 모두 캘러스 배양 추출물의 경우 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지 세포 생존율이 있는 것으로 나타났으나, 껍질 추출물의 경우는 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 세포독성이 나타났다.
2. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 능실의 껍질 추출물에서 각각 $213.20 \pm 15.78 \text{ mg}/\text{g}$ 와 $29.30 \pm 3.24 \text{ mg}/\text{g}$ 로 능실캘러스 배양 추출물에서 각각 $205.2 \pm 18.97 \text{ mg}/\text{g}$ 와 $37.4 \pm 7.43 \text{ mg}/\text{g}$ 로 알맹이 추출물에 비해 높게 나타났다.
3. 각 추출물의 DPPH radical 소거능을 0.005 ~ 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 확인한 결과 능실 껍질 추출물은 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서도 $75.56 \pm 0.8\%$ 이상의 라디칼 소거능을 보여 전체 농도에서 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소를 나타내었고 능실 캘러스배양 추출물도 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소를 나타내는 것을 확인하였다.
4. 항염증 측정결과, LPS로 유도된 NO 생성량과 비교하여 부위별 능실 추출물 및 능실캘러스배양 추출물을 6.25, 12.5, 25.0, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 알맹이 추출물을 제외한 모든 추출물이 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 전체 농도에서 유의성 있는 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) 감소를 나타내었다.

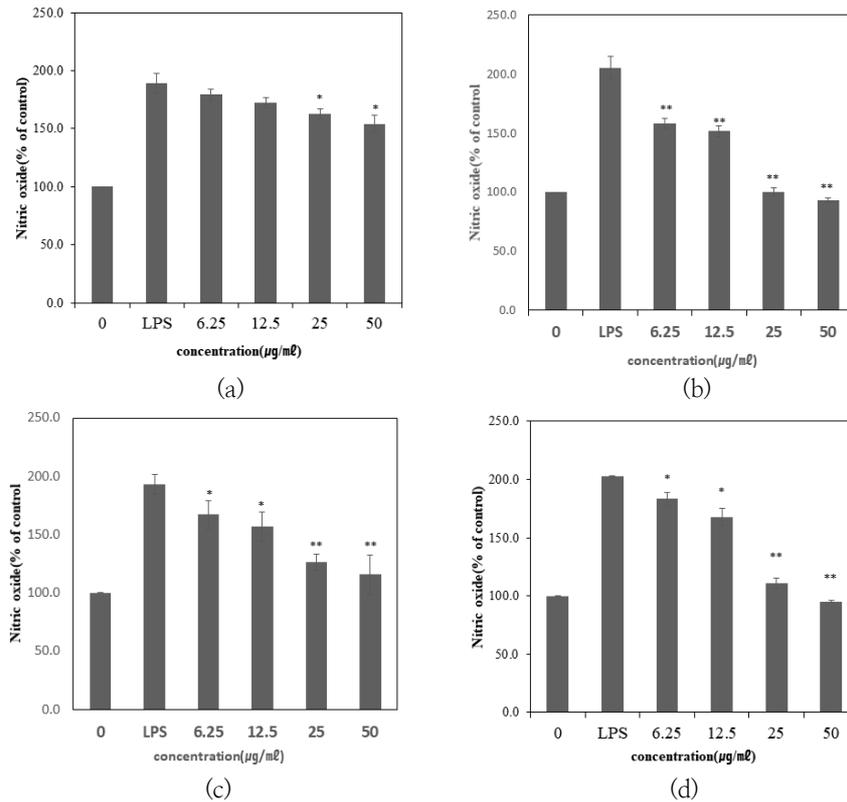


Fig. 4. Effect of *Trapa Japonica* extract on LPS-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells RAW 264.7 cell was treated with 6.25 ~ 50 (µg/ml) of *Trapa Japonica* extract and LPS(1µg/ml) for 24hr. The amount of nitric oxide in supernatant was measured using Griess reagent. The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments (Significance of results, *** : p < 0.001, * : p < 0.05).

- (a) *Trapa Japonica* flesh Extract
- (b) *Trapa Japonica* pericarp Extract
- (c) *Trapa Japonica* Extract
- (d) *Trapa Japonica* callus cultures Extract

본 연구에서는 능실 껍질추출물의 경우 1000 µg/ml 농도에서도 세포독성이 매우 우수할 뿐 아니라 항산화 및 항염 효과도 우수하게 나타나 화장품 원료로서의 가능성을 확인해볼 수 있는 기회였으며 능실의 각 부위에 따른 효능, 효과를 확인하여 화장품 및 피부질환에 관련된 천연 소재로서의 활용성을 제고함과 동시에 향후 기타 천연 소재 개발 시 효과적인 기초 자료 제공 기회가 될 것으로 사료되는 바이다.

추후 연구를 통해 우수한 효능을 보이는 능실

껍질 추출물과 능실껍질추출물의 성분 분석을 통한 지표성분의 확인 및 분리, 동정 등의 과정을 통해 심화된 소재 개발에 박차를 가하고자 하며 특히, 실험 방법에 따라 차이가 있지만 저농도에서 세포독성을 보이는 능실껍질 추출물의 경우 그 보다 더 저농도에서도 우수한 항산화 효과를 나타냈기에 성분분석과 독성의 원인파악, 독성 제거 후 항산화, 항염증 효과의 확인 등 다양한 효능을 확인하여 버려지는 소재에 대한 재 활용까지 시도해보고자 한다.

감사의 글

이 논문은 2019학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

References

1. S.-H. Kim, H. Jeong, Y.-K. Kim, S.-H. Cho, K.-U. Min, Y.-Y. Kim, "IgE-mediated occupational asthma induced by herbal medicine, Banha (*Pinellia ternata*)", *Clinical Experimental Allergy*, Vol.31, No.5 pp. 779-781, (2001).
2. S. Zedler, E. Faist, "The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation", *Current Opinion in Critical Care*, Vol.12, No.6 pp. 595-601, (2006).
3. S. Mariathasan, D. M. Monack, "Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation", *Nature Reviews Immunology*, Vol.7, No.1 pp. 31-40, (2007).
4. H. S. Kwon, J. H. Park, D. H. Kim, Y. H. Kim, H. K. Shin J. K. Kim, "Licochalcone A isolated from licorice suppresses lipopolysaccharide-stimulated inflammatory reactions in RAW264.7 cells and endotoxin shock in mice". *Journal of Molecular Medicine*, Vol.86, No. 11 pp. 1287-1295, (2008).
5. Matsumura and H. N. Ananthaswamy, "Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin", *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol.195, No.3 pp. 298, (2004).
6. Noël W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A, "Alternatively activated macrophages during parasite infections", *Trends in Parasitology*, Vol.20 pp. 126-133, (2004).
7. Mosser DM, Edwards JP, "Exploring the full spectrum of macrophage activation", *Nature Reviews Immunology*, Vol.8 pp.958-969, (2008).
8. S. J. An, H. O. Pae, G. S. Oh, B. M. Choi, S. Jeong, S. I. Jang, H. Oh, T. O. Kwon, C. E. Song, H. T. Chung, "Inhibition of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 productions and NF- κ B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae)", *International Immunopharmacology*, Vol.2, pp. 1173-1181, (2002).
9. W. K. Alderton, C. E. Cooper, R. G. Knowles, "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition", *Biochemical Journal*, Vol.357, Pt3 pp. 593-615, (2001).
10. D. J. Lee, O. H. Lee, G. P. Choi, J. D. Kim, "Antioxidant and Anti-Adipogenic Activities of *Trapa japonica* Shell Extract Cultivated in Korea", *Preventive nutrition and food science*, Vol.22, No.4 pp. 327-334, (2017).
11. M. J. Kang, S. K. Lee, J. H. Song, M. E. Kim, M. J. Kim, J. I. Kim, J. S. Jang, J. H. Lee, "Water Chestnut (*Trapa japonica* Flerov.) Exerts Inhibitory Effect on Postprandial Glycemic Response in Rats and Free Radical Scavenging Activity in vitro", *Food science and biotechnology*, Vol.18, No.3, pp. 808-812, (2009).
12. A. J. Parr, K. W. Waldron, A. Ng, M. L. Parker, "The Wall-Bound Phenolics of Chinese Water Chestnut (*Eleocharis dulcis*)", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol.71, No.4 pp. 501-507, (1996).
13. Y. S. Kim, J. W. Hwang, Y. K. Han, H. J. Kwon, H. O. Hong, E. H. Kim, S. H. Moon, B. T. Jeon, P. J. Park, "Antioxidant activity and protective effects of *Trapa japonica* pericarp extracts against tert-butylhydroperoxide-induced oxidative damage in Chang cells". *Food and Chemical Toxicology*, Vol.64 pp. 49-56, (2014).
14. H. M. Han, Y. S. Kwon, M. J. Kim,

- “Antioxidant and Antiproliferative Activity of Extracts from Water Chestnut (*Trapa japonica* Flerow)”, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, Vol.24, No.1 pp. 14–20, (2016).
15. H. I. Jang, “Study on the antioxidant, anti-inflammatory and Preservative features Water Chestnut”, *Journal of Oil & Applied Science*, Vol.35, No.3 pp. 633–642, (2018).
 16. B. R Kim, J. E. Kim, B. K. Choi, H. S. Kim, “Anti-Inflammatory Effects of Water Chestnut Extract on Cytokine Responses via Nuclear Factor- κ B-signaling Pathway”, *Biomol Ther (Seoul)*. Vol.23, No.1 pp. 90–97, (2015).
 17. J. J. Nam, Y. J. Ki, “Fractionated *Trapa japonica* Extracts Inhibit ROS-induced Skin Inflammation in HaCaT keratinocytes”, *Journal of Society Cosmetic Science. Korea*, Vol.41, No.1, pp. 45–55, (2015).
 18. Y. S. Kim, J. W. Hwang, J. H. Jang, S. K. Son, I. B. Seo, J. H. Jeong, E. H. Kim, S. H. Moon, B. T. Jeon, P. J. Park, “*Trapa japonica* Pericarp Extract Reduces LPS-Induced Inflammation in Macrophages and Acute Lung Injury in Mice”, *Molecules*, Vol.21, pp. 392–408, (2016).
 19. J. J. Nam, K. E. Lee, J. E. Park, S. J. Moon, J. K. Youm, “Inhibitory Effect of Fractionated *Trapa Japonica* Extracts on UVB-induced Skin Photoaging”, *Journal of Society Cosmetic Science. Korea*, Vol.40, No.4 pp. 321–330, (2014).
 20. Dicosmo, F, Misawa, M, “Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production”, *Biotechnology Advances*. Vol.13, No.3, pp. 425–453, (1995).
 21. M. U. Kim, “Optimization of suspension cultivatation of *Aloe vera* callus and characteristics of cultured products from suspension culture”, Kangwon University, (2011).
 22. I. S. Kim, “Characteristics of cells derived from *Artemisia annua* L. cambium and anti-inflammatory activity of cell extracts”, Jeonbuk Univerity, (2011).
 23. Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, Vol. 58, No.11, pp. 966–968, (1981).
 24. MI Moreno, MI Isla, AR Sampietro ,MA Vattuone. “Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina”, *Journal of ethnopharmacology*. Vol.71, No.1, pp. 109, (2000).
 25. H. J. Lee, B. Y. Sim, J. W. Bak, D. H. Kim, “Effect of Gami-sopungsan on inflammation and DNCB-induced dermatitis in NC/ Nga in mice. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*, Vol.28, No.2 pp.146–153, (2014).
 25. C. Gabay, “Interleukin-6 and chronic inflammation”, *Arthritis Research & Therapy*, Vol.8, S2, (2006).
 26. D. Y. Im, “Volatile compounds analysis of the extract from dried bark of *Prunus sargentii* and physiological activity of the main compound, benzaldehyde”, *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol.12, pp 155–162, (2014)
 27. J. J. Van Triel, J. H. Arts, H. Muijsers, C. F. Kuper, “Allergic inflammation in the upper respiratory tract of the rat upon repeated inhalation exposure to the contact allergen dinitrochlorobenzene (DNCB)”, *Toxicology*, Vol.269, pp. 73–80, (2010).