



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

제주해마를 활용한 기능 특성 및  
식품 적합성 연구

濟州大學校 大學院

食品營養學科

徐 偉

2021年 2月

# 제주해마를 활용한 기능 특성 및 식품 적합성 연구

指導教授 朴 晟 秀

徐 偉

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2020 年 12 月

徐 偉의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

채 인수



委 員

김현정



委 員

박성수



濟州大學校 大學院

2020 年 12 月



# Study on Functional Characteristics and Food Suitability using Seahorse Cultured in Jeju

XU WEI

(Supervised by Professor Sung-Soo Park)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement  
for the degree of Master of Science

2020. 12.

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE & NUTRITION

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

Abstract .....	V
List of Abbreviations .....	VI
List of Tables .....	VIII
List of Figures .....	IX
I. 서론 .....	1
II. 이론적 배경 .....	3
1. 해마 .....	3
2. 항산화와 염증 .....	3
1) 항산화 .....	3
2) 염증 .....	4
III. 재료 및 방법 .....	6
1. 시료준비 .....	6

1) 해마의 Etoh추출 및 water추출 .....	6
2. 시료의 기능적 특성 .....	7
1) 단백질 함량 측정 .....	7
2) 항산화 측정 .....	7
(1) DPPH 라디칼 소거능 측정 .....	7
(2) ABTS 라디칼 소거능 측정 .....	8
(3) Total polyphenol 함량 측정 .....	9
3) 항염 측정 .....	9
(1) 세포 배양 .....	9
(2) 세포 생존율 측정 (MTT Assay) .....	9
(3) Nitric oxide (NO) 생성량 측정 .....	10
(4) 염증 관련 사이토카인 생성량 측정 .....	10
- TNF- $\alpha$ 생성량 측정 .....	10
- IL-6 생성량 측정 .....	12
3. 통계 분석 .....	13
IV. 연구결과 .....	14

1. 단백질 함량 측정 .....	14
2. 항산화 측정 .....	17
1) DPPH 라디칼 소거능 측정 결과 .....	17
2) ABTS 라디칼 소거능 측정 결과 .....	18
3) Total polyphenol 함량 측정 결과 .....	19
3. RAW264.7 대식세포에서의 세포 생존율 측정 결과 .....	26
4. RAW264.7 대식세포에서의 Nitric oxide (NO) 생성량 측정 결과 .....	29
5. 염증 관련 사이토카인 생성량 측정 결과 .....	32
1) TNF- $\alpha$ 생성량 측정 결과 .....	33
2) IL-6 생성량 측정 결과 .....	35
V. 고찰 .....	37
VI. 요약 및 결론 .....	39
VII. 참고문헌 .....	41



<Abstract>

# Study on Functional Characteristics and Food Suitability using Seahorse Cultured in Jeju

XU WEI

Department of Food Science and Nutrition

Graduate school

Jeju National University

Supervised by Professor Sung-Soo Park

The hippocampus (*Hippocampus coronatus*) is a fish belonging to the Syngnathidae family of the Greaterosteiformes and about 54 species are known worldwide. Widely distributed in tropical and subtropical shallow waters with high medicinal and therapeutic health value. Its main pharmacological activities include sex hormone-like effects, anti-inflammatory, anti-oxidation, anti-tumor and improving immunity. Recently, research on the hippocampus is limited to the research on fat-soluble components, while the research on water-soluble components is relatively small. In addition, the development of foods using the ingredients of the seahorse has not been promoted conspicuously. In this study, water and ethanol extracts of Jeju cultured hippocampus were prepared, and functional characteristics were examined through antioxidant and anti-inflammatory experiments on RAW cells, and this study was conducted for use in food development and health food processing.

In order to evaluate the antioxidant effect, we carried out DPPH, ABTS free radical scavenging determination and polyphenol content determination. The results showed that the DPPH and ABTS free radical scavenging activity of the hippocampal water extract with the same protein concentration was about twice higher than that of the ethanol extract, and the total phenol content was also higher than that of the ethanol extract. It can be concluded that the antioxidant capacity of hippocampal water extract is higher than that of ethanol extract.

In order to evaluate the anti-inflammatory activity, we used LPS to induce RAW264.7 macrophages to establish an inflammatory model; the amount of NO secretion and the amount of cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6) released as indicators were used for experiments. Different solvent extracts of hippocampus have no obvious cytotoxicity to cells at the concentration of 0-1 $\mu$ g/ml. Compared with the modelgroup, HW and HE can inhibit the NO secretion of macrophages induced by LPS. In the cytokine experiment, HE inhibited LPS-induced RAW264.7 macrophages to secrete TNF- $\alpha$  and IL-6 at various concentrations (100ng/ml, 500ng/ml, 1 $\mu$ g/ml) at various concentrations of the reagents than HW.

This research proves that the antioxidant effect of HW is better than that of HE, and HE has a better anti-inflammatory effect, providing basis and reference for the subsequent development of hippocampal-related health food.

## List of Abbreviations

Abbreviation	Full name
HW	Hippocampus Water extract
HE	Hippocampus EtOH extract
BCA	Bicinchoninic acid
DPPH	1, 1 - diphenyl - 2-picrylhydrazyl
ABTS	2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FBS	Fetal Bovine Serum
P/S	Penicillin-Streptomycin
DMSO	Dimethyl sulfoxide
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium Bromide
LPS	Lipopolysaccharide
NO	Nitric oxide
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
IL-6	Interleukin-6

## List of Table

Table 1. Protein concentration of hippocampus extract. ....	9
Table 2. DPPH radical scavenging activities of hippocampus extract. ....	21
Table 3. ABTS radical scavenging activities of hippocampus extract. ....	22
Table 4. Total polyphenol content of hippocampus extract. ....	26
Table 5. Effect of hippocampus extract on cell viability RAW264.7 cells. ....	27
Table 6. Effect of hippocampus extract on NO production in the LPS-stimulated RAW264.7 cells. ....	28
Table 7. Effect of hippocampus extract on TNF- $\alpha$ production in the LPS-stimulated RAW264.7 cells. ....	26
Table 8. Effect of hippocampus extract on IL-6 production in the LPS-stimulated RAW264.7 cells. ....	26

## List of Figures

Figure 1. Protein concentration of hippocampus extract. ....	7
Figure 2. DPPH radical scavenging activities of hippocampus extract. ....	11
Figure 3. ABTS radical scavenging activities of hippocampus extract. ....	12
Figure 4. Total polyphenol content of hippocampus extract. ....	13
Figure 5. Effect of hippocampus extract on cell viability RAW264.7 cells. .....	15
Figure 6. Effect of hippocampus extract on NO production in the LPS-stimulated RAW264.7 cells. ....	16
Figure 7. Effect of hippocampus extract on TNF- $\alpha$ production in the LPS-stimulated RAW264.7 cells. ....	29
Figure 8. Effect of hippocampus extract on IL-6 production in the LPS-stimulated RAW264.7 cells. ....	30

## I. 서론

해양 중의 생물학적 다양성과 구조적으로 화학적 다양성은 활성 2차 대사 산물 연구에 흥미로운 틀을 제공한다[1, 2]. 지금까지 9개의 승인된 에이전트와 12개의 현재 임상 시험 에이전트는 어떤 의미에서 해양 환경에서 파생된다[3]. 해양 대사산물 또는 합성 유사체가 1981 ~ 2002년 동안 미국 FDA 승인 약물의 약 50%를 차지하는 것으로 밝혀졌다[4]. 해양 생물 다양성은 새로운 천연 제품을 위한 잠재적 자원을 제공한다.

해마 (*Hippocampus coronatus*)는 큰가시고기목 (Gasterosteiformes) 실고기과 (Syngnathidae)에 속하는 어종으로 전 세계적으로 약 54종이 알려져 있다[5]. 높은 의약 및 치료 건강 가치로 열대 및 아열대 얕은 물에 널리 분포한다[5]. 자연이 따뜻하고 맛이 달콤하며 간과 신장 경락에 속하며 신장을 따뜻하게 하고 양을 튼튼하게 하고 종괴를 쫓아내고 부종을 줄이는 등의 효과가 있다. 발기 부전, 야뇨증, 신장 결핍 및 천식, 낙하 떨림 부상, 옹종 및 통증 치료에 사용된다[6].

최근 약리학 연구에 따르면 해마는 호르몬과 같은 효과를 가지며 조혈 기능을 향상시킬 뿐만 아니라 항암, 항노화, 항종양, 항피로, 학습 및 기억력 향상 및  $Ca^{2+}$  차단 효과를 나타낸다. 해마의 화학 성분 분석을 통해, 해마에는 스테롤, 다양한 지방산, 단백질, 아미노산, 미량 원소, 인지질 및 기타 성분이 풍부하여 해마의 기능적 역할에 대한 과학적 설명을 제공하는 것으로 밝혀졌다[7].

염증은 외부 자극 하에서 신체가 생성하는 일련의 복잡한 생리적 변화이다[8]. 합성 항염증제의 내성과 부작용의 출현으로 사람들은 풍부한 자원, 적은 부작용, 좋은 치료 효과를 가진 한약을 개발하기 시작했으며, 당연히 항염증제의 개발은 다양한 연구의 대상이 되었다[9].

현대에 와서 생명 과학 관련 연구에 따르면 인체 조직에서 활성 산소 클러스터 / 질소 클러스터가 생성되면 산화 손상과 노화 및 암과 같은 일부 퇴행성 질환을 유발할 수 있다[10]. 항산화제는 자유 라디칼을 제거하는 물질로 간주된다. 최근

에는 천연물로부터 천연 항산화제를 습득하여 사람들의 큰 관심을 불러 일으켰고, 의학, 영양, 식품 산업에서 널리 주목을 받고 있다. 현재 다양한 식물과 동물의 수용성 성분을 분석하여 다양한 항산화 활성 성분을 얻었다. 현재 해마에 대한 지용성 성분에 대한 연구[11]는 있으나, 수용성 성분에 대한 연구는 상대적으로 적다. 또한 해마의 성분을 활용한 식품의 개발은 눈에 띄게 추진된 것이 없는 형편이다.

본 연구에서는 제주양식 해마의 물, 에탄올 추출물을 시키고 RAW264.7 세포에 대한 항산화, 항염 실험을 통해 기능 특성을 검토하며, 식품 개발 및 건강식품 가공에 이용하기 위해 본 연구를 수행하였다.

## II. 이론적 배경

### 1. 해마

해마 (*Hippocampus coronatus*)는 큰가시고기목 (Gasterosteiformes) 실고기과 (Syngnathidae)에 속하는 어종으로 전 세계적으로 약 54종이 알려져 있다[5]. 한국에는 빅벨리해마(*Hippocampus abdominalis*), 산호해마(*Hippocampus mohnikei*), 가시해마(*Hippocampus histrix*), 점해마(*Hippocampus trimaculatus*), 그리고 북해마(*Hippocampus kuda*) 5종이 있다[12].

해마는 높은 의약 및 치료 건강 가치로 열대 및 아열대 얇은 물에 널리 분포한다[5]. 한방에서 해마는 양기(陽氣)를 보하는 요약으로 생식 기능을 높인다. 노인과 허약한 자의 정신쇠약과 피로에도 쓰인다. 기의 순환을 조절하고 혈액 순환을 촉진시키는 효능도 있어 기혈이 원활치 않아 생기는 부인의 징가(癥瘕) 아랫배에 생기는 단단한 덩어리와 난산(難産)에 적용된다. 그리고 등에 생기는 정창(疔瘡)을 치료한다[13]. 유럽은 18세기에 해마를 약으로 사용하였다[14]. 신체에는 주로 스테로이드, 인지질, 아미노산 등 다양한 생물학적 활성 물질이 포함되어 있으며 [15] 그 효과는 항 피로[16], 항 관절염[17], 항균이다[18]. 현대 생명 과학 연구에 따르면 인체에서 활성 산소 종 / 질소 클러스터의 생성은 산화 손상과 노화 및 암과 같은 일부 퇴행성 질환을 유발할 수 있다[19]. 해마의 의학적 사용에 대한 관련 보고서가 있다. 또한 사회적 경제가 발달함에 따라 해마는 공예 기념품 감상 및 만들기와 같은 다른 분야에서 점차적으로 사용되었다[20,21].

### 2. 항산화와 염증

#### 1) 항산화

인간의 정상적인 세포 대사는 하이드록실 라디칼 ( $\cdot\text{OH}$ ) 및 슈퍼 옥사이드 음이

은 유리 라디칼 ( $O_2^-$ )과 같은 자유 라디칼을 생성한다. 체내의 자유 라디칼 생성 및 제거가 비평형 상태일 때 어느 정도 촉발될 수 있다. 관절염, 당뇨병, 심혈관계 질환, 암, 노화 등의 질병으로[22,23] 인체는 항산화제를 섭취하여 건강을 유지할 수 있다. 연구에 따르면 해마 추출물 (유기 용매 및 물 추출물)은 천연 항산화 활성을 가지며 배양된 해마의 항산화력은 야생 해마와 동일하지만 암컷 해마의 항산화력은 수컷 해마보다 높으며 항산화력도 추출물과 비슷하다[24]. 액체 농도, 유기 용매의 종류, 프로테아제의 종류 및 정제된 제품의 분자량은 밀접한 관련이 있다. 앞서 언급한 ACE 억제 펩티드는 고혈압 치료에 사용될 수 있을 뿐만 아니라 항산화 효과도 있다[22].

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, 즉 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 벤젠 고리의 접합 및 입체 장애와 니트로 그룹의 전자적 작용으로 인해 안정한 자유 라디칼이다. 에탄올 용액은 보라색이다. DPPH 용액에 자유 라디칼 제거제를 첨가하면 DPPH의 단일 전자가 쌍을 이루어 보라색이 더 밝아지고 흡수 광도가 작아지고 흡수 광도가 자유 라디칼 소거 정도와 선형이 된다[25,26].

ABTS 방법은 생물학적 시료의 항산화 능력을 결정하기 위해 Miller 등이 처음 개척하였다[27]. ABTS는 활성 산소에 의해 산화되어 안정된 청록색 양이온 라디칼인  $ABTS^{+\cdot}$ 를 생성하고, 시험 물질을 첨가하여 물질에 항산화 성분이 있으면  $ABTS^{+\cdot}$ 와 반응하여 반응계를 퇴색시킨다. 그러면  $ABTS^{+\cdot}$ 이 자유 라디칼의 최대 흡수 파장 (일반적으로 734 nm가 선택됨)에서 흡수광도의 변화를 감지하고, Trolox가 포함된 대조 표준 시스템과 비교하여 시험 물질의 총 항산화 능력이 변환되어 결과가 대부분 일정 수준에 도달한 것으로 표현된다. 농도는 물질의 동등한 항산화 능력에 필요한 Trolox의 농도를 테스트하므로 이 방법을 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) 방법[28]이라고도 하며 일부 연구자들은 아스코르브산을 참조 표준으로 사용하도록 제안했으며 이 방법을 VCEAC 또는 AEAC 방법이라고 한다[29].

## 2) 염증

사이토카인(cytokine)은 세포에서 분비되는 생물학적 활성을 가진 저분자 단백

질의 일반적인 용어이다. 인터루킨, 인터페론, 종양 괴사 인자, 집락 자극 인자, 성장 인자 및 화학 주성 사이토카인의 6가지 범주로 나눌 수 있다. 사이토카인은 또한 전 염증 인자와 항염증 인자의 두 가지 유형으로 나눌 수 있다. 인터루킨-1 (IL-1), IL-6, IL-8, 종양 괴사 인자- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 같은 전 염증 인자 및 인터루킨 수용체 길항제 IL-1Ra와 같은 항염증 인자, IL-4, IL-10, IL-13은 균형 잡힌 상태로 균형을 잃으면 질병을 유발한다[30].

IL-6는 단핵구와 대 식세포에서 생산되는 다 방향 사이토카인으로 활성화된 T 세포, B 세포, 섬유 아세포, 내피 세포 등에 의해 생산 될 수있어 말단 B 세포의 분화를 강화하고 면역을 매개 할 수 있다. 글로불린의 분비는 또한 T 세포의 활성화 신호를 증가시키고 세포를 용해시키는 세포 독성 T 세포 및 NK 세포의 능력을 촉진 할 수 있다[31].

종양 괴사 인자 (TNF)는 주요 염증 매개체이며 IL-1과 많은 전 염증 활성을 공유한다. 분비된 TNF- $\alpha$ 는 주로 단핵구, 대 식세포 및 T 세포에 의해 생성되는 17kD 비당 단백질이다. TNF- $\alpha$ 는 면역과 다른 세포 사이에 신호를 전달하며, 세포 사멸 또는 세포 사멸, 대사, 염증, 혈전증 및 섬유소 용해를 포함한다[30].

### Ⅲ. 재료 및 방법

#### 1. 시료의 준비

##### 1) 해마의 Etoh추출 및 water추출

본 실험에서 사용한 해마는 Nerina 회사에서 제공한 양식 해마를 사용하였다.

건조된 해마를 마쇄기로 1분간 마쇄 후 분말 14g을 취하여 100ml 3차중류수와 90% 에탄올 각각 첨가하였다. 이것을 Polytron 균질기(Wheaton, Miliville, NJ, USA)로 균질화 하며 실온에서 60분 동안 추출함, 추출액은 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 그 상등액을 0.45 $\mu$ m 필터(Millipore, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan)를 이용하여 여과한 후 단백질 함량을 측정하여 동일한 농도의 HE와 HW를 동결건조 시키고 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

## 2. 시료의 기능적 특성

### 1) 단백질 함량 측정

먼저 BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, Waltham MA, USA)를 이용하여 diluted albumin(BSA) standard와 BCA working agent을 준비하고, 각각의 표준시료와 sample(HE, HW)을 따로 각각 micro plate well에 50 $\mu$ L를 피펫으로 옮겨 담았다. 각각의 well에 BCA working agent 100 $\mu$ L를 추가하고 30초간 plate를 잘 흔들어 섞은 다음, 커버 플레이트를 덮고 30분간 37 $^{\circ}$ C에서 보온 처리하였다. 보온 후에는 상온까지 plate를 식히고, 평판 리더로 562nm에서의 흡광도를 측정하여 작성한 표준 곡선으로 함량을 계산하였으며 모든 실험군은 3회 반복하였다.

### 2) 항산화 측정

#### (1) DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, 즉 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 벤젠 고리의 접합 및 입체 장애와 니트로 그룹의 전자적 작용으로 인해 안정한 자유 라디칼이다. 에탄올 용액은 보라색이다. DPPH 용액에 자유 라디칼 제거제를 첨가하면 DPPH의 단일 전자가 쌍을 이루어 보라색이 더 밝아지고 흡수 광도가 작아지고 흡수 광도가 자유 라디칼 소거 정도와 선형이 된다[25,26].

시료의 DPPH 라디칼 소거능 측정은 Wei & Shibamoto등[32]의 방법을 응용하여 측정하였다. 시료 10 $\mu$ L에 에탄올에 녹여 제조한 0.2 mM 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 용액 190  $\mu$ L를 첨가하여 혼합한 후 암소에서 30분간 반응시킨 뒤 microplate reader (Versa Max, Orleans, USA)를 사용하여 517nm에서 흡광도 값을 측정하여 ascorbic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 같은 농도로 사용하여 대조

군의 흡광도로 측정하였다.

각 시료의 DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식에 따라 계산하였으며 모든 실험군은 3회 반복하였다.

DPPH radical scavenging activity(%) = [1-(시료의 평균 흡광도/대조군의 평균 흡광도)] \* 100

## (2) ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS는 활성 산소에 의해 산화되어 안정된 청록색 양이온 라디칼인  $ABTS^{+\cdot}$ 를 생성하고, 시험 물질을 첨가하여 물질에 항산화 성분이 있으면  $ABTS^{+\cdot}$ 와 반응하여 반응계를 퇴색시킨다. 그러면  $ABTS^{+\cdot}$ 이 자유 라디칼의 최대 흡수 파장(일반적으로 734nm가 선택됨)에서 흡광도의 변화를 감지하고, trolox가 포함된 대조 표준 시스템과 비교하여 시험 물질의 총 항산화 능력이 변환되어 결과가 대부분 일정 수준에 도달한 것으로 표현된다[28].

ABTS 라디칼 소거능은 Roberta 등[33]의 방법을 응용하여 측정하였다. 메탄올에 녹인 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 12시간 이상 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 생성하였다. 형성 후, 용액을 증류수로 희석하여 735nm에서 흡광도 값 1.2-1.3를 얻었다. 10  $\mu$ L의 시료와 190  $\mu$ L의 ABTS 용액을 넣고 혼합한 후 젯소에 30분간 방치하고 마이크로 플레이트 리더(Versa Max, Orleans, USA)를 사용하여 735nm에서 측정하여 ascorbic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 같은 농도로 사용하여 대조군의 흡광도로 측정하였다.

각 시료의 ABTS 라디칼 소거능은 아래의 식에 따라 계산하였으며 모든 실험군은 3회 반복하였다.

ABTS radical scavenging activity(%) = [1-(시료의 평균 흡광도/대조군의 평균

흡광도] \* 100

### (3) Total polyphenol 함량 측정

폴리페놀은 자유 라디칼 제거, 항암, 항 방사선, 항균, 혈중 지질 저하, 노화 방지, 신경 보호, 신체 면역력 향상 및 인체 건강에 대한 기타 유익한 효과와 같은 항산화와 같은 다양한 생물학적 활동과 생리적 기능을 가지고 있다[34-41]. 폴리페놀은 동물과 식물의 광범위 함, 풍부한 매장량, 다양한 생리적 기능으로 인해 천연물과 인간의 건강 및 영양에 대한 연구 대상으로 다양하게 사용되고 있다 [42].

폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법[43]을 사용하여 측정하였다. 시료 40 $\mu$ L, 증류수 580 $\mu$ L, Folin & Giocalteu's phenol reagent (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 80 $\mu$ L, 25% sodium carbonate 용액 300 $\mu$ L를 순서대로 넣고, 잘 흔들어 섞은 다음 암소에서 1시간 방치 후 microplate reader (Versa Max, Orleans, Louisiana, USA) 사용하여 725nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량 분석은 gallic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 이용하여 작성한 표준 곡선으로 계산하여 3회 반복하였다.

### 3) 항염 측정

#### (1) 세포 배양

본 실험에 사용한 RAW264.7 대식세포는 America Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA.)에서 받고 사용하였다. 배지는 DMEM (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)에 1% penicillin-streptomycin (Capricorn, Ebsdorfergrund, Germany)과 10% H·FBS (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)을 첨가하였으며, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 에서 계대 배양하였다.

#### (2) 세포 생존율 측정 (MTT Assay)

배양 세포를 Trypan blue(Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 이용하여 cell counting한 후, 24-well plate에 한 well 당 cell 수  $1 \times 10^5/\text{ml}$ 로 희석 후 500 $\mu\text{l}$  씩 seeding 하였다. Cell이 70% 자란(24h) 후 각 농도(0, 500ng/ml, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 시료를 처리하여 24시간 incubation 하였다. 24h 후 암소에서 5mg/ml MTT (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)시약을 50  $\mu\text{l}$  seeding(4시간 incubation) 석션 후 DMSO (Bio basic, Ontario, Canada) 150  $\mu\text{l}$  씩 seeding 후 20분 incubation한 후 microplate reader (Versa Max, Orleans, Louisiana, USA) 사용하여 540nm 파장에서 흡광도 측정 하였다. 모든 실험군은 3회 반복하여 세포 생존율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{cell Viability(\%)} = \text{시료의 평균 흡광도/대조군의 평균 흡광도} * 100$$

### (3) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

배양 세포를 counting하고 24-well plate에 한 well 당 cell 수  $1 \times 10^5/\text{ml}$ 로 희석 후 500 $\mu\text{l}$  씩 seeding 하였다. Cell이 70% 자란(24h) 후 각 농도(100ng/ml, 500ng/ml, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )sample처리하여 6시간 후 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 염증 유도하고 incubation 하였다. 24h 후 상등액 50 $\mu\text{l}$ 에 Griess reagent(Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)을 동량 처리하여 15분간 암소에서 반응시켰다. Microplate reader (Versa Max, Orleans, Louisiana, USA)를 사용하여 548nm 파장에서 흡광도 측정하였다.  $\text{NaNO}_2$  (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 이용하여 작성한 표준 곡선에 대입하여 나타내었다. 모든 실험군은 3회 반복 하였다.

### (4) 염증 관련 사이토카인 생성량 측정

-  $\text{TNF-}\alpha$  생성량 측정

배양 세포를 counting하고 24-well plate에 한 well 당 cell 수  $1 \times 10^5$ /ml로 희석 후 500 $\mu$ l 씩 seeding 하였다. Cell이 70% 자란(24h) 후 각 농도(100ng/ml, 500ng/ml, 1 $\mu$ g/ml)로 sample 처리하여 6시간 후 LPS(1 $\mu$ g/ml)를 염증 유도하고 incubation 하였다. 24h 후 상등액을 받았다. ELISA kit(TNF- $\alpha$ , IL-6: BD PharMingen, CA, USA)를 따라서 실험을 진행하였다.

① Capture Antibody1 : 250을 Coating Buffer에 희석하고 희석된 Capture Antibody 웰당 100 $\mu$ l로 microwell을 코팅합니다. 플레이트를 밀봉하고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하였다.

② 웰을 흡인하고 Well Wash Buffer(300 $\mu$ l)로 3회 세척하였다.

③ Well Assay Diluent(200 $\mu$ l)가 포함된 Block plate를 실온에서 1시간 동안 배양하였다.

④ 단계 ②와 같이 흡인과 세척하였다.

⑤ Assay Diluent에 표준액과 시료 희석액을 준비하였다. 각 표준 물질, 샘플 및 대조군의 100 $\mu$ l를 적절한 웰에 피펫하였다. 플레이트를 밀봉하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다.

⑥ 단계 ②에서와 같이 흡인 그리고 세척하되 총 5회 세척하였다.

⑦ 검출 항체를 Assay Diluent에 1 : 250으로 희석하고 희석된 검출 항체 100 $\mu$ l를 각 well에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다.

⑧ 스텝 ②와 같이 흡인 그리고 세척하되 총 5회 진행하였다.

⑨ Assay Diluent에 Enzyme Reagent를 1 : 250으로 희석하고 각 well에 희석된 Enzyme Reagent 100 $\mu$ l를 추가하였다. 플레이트를 밀봉하고 실온에서 30분 동안 배양하였다.

⑩ 단계 ②와 같이 흡인 그리고 세척하되 총 7번 반복하였다.

⑪ 각 웰에 TMB 기질 용액 100 $\mu$ l를 추가하였다. 어두운 곳에서 실온에서 30분

동안 플레이트를 배양하였다.

⑫ 각 웰에 Stop Solution 50 $\mu$ l를 추가하였다.

⑬ 반응 정지 후 30분 이내에 450nm, 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 450nm에서 파장 보정까지 570nm에서의 흡광도를 빼 주었다. 표준액을 이용하여 작성한 표준곡선에 대입하여 나타내었다. 모든 실험군은 3회 반복하였다.

- IL-6 생성량 측정

배양중인 세포를 counting하고 24-well plate에 한well 당 cell 수  $1 \times 10^5$ /ml로 희석후 500 $\mu$ l 씩 seeding 하였다. Cell이 70% 자란(24h) 후 각 농도(100ng/ml, 500ng/ml, 1 $\mu$ g/ml)sample처리하여 6시간 후 LPS(1 $\mu$ g/ml)를 염증 유도하고 incubation 하였다. 24h 후 상등액을 받았다. ELISA kit(TNF- $\alpha$ , IL-6: BD PharMingen, CA, USA)를 따라서 실험을 진행 하였다.

① 마이크로 웰을 코팅 버퍼에 희석 한 Capture Antibody 웰당 100 $\mu$ l로 코팅하였다. 플레이트를 밀봉하고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하였다.

② 웰을 흡인하고 Well Wash Buffer(300 $\mu$ l) 3회 세척하였다.

③Well Assay Diluent(200 $\mu$ l)가 포함된 Block plate. 실온에서 1시간 동안 배양하였다.

④ 단계 ②와 같이 흡인과 세척하였다.

⑤ Assay Diluent에 표준액과 시료 희석액을 준비하였다. 각 표준 물질, 샘플 및 대조군의 100 $\mu$ l를 적절한 웰에 피펫하였다. 플레이트를 밀봉하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다.

⑥ 단계 ②에서와 같이 흡인 그리고 세척하되 총 5회 세척하였다.

⑦ 각 Well에 100 $\mu$ l의 Working Detection을 추가하였다. 플레이트를 밀봉하고 실

온에서 1시간 동안 배양하였다.

⑧ 스텝 ②와 같이 흡인 그리고 세척하되 총 7번의 반복하였다.

⑨ 각 웰에 기질 용액 100 $\mu$ l를 추가하였다. 어두운 곳에서 실온에서 30분 동안 플레이트를 배양하였다.

⑩ 각 웰에 Stop Solution 50 $\mu$ l를 추가하였다.

⑪ 반응 정지 후 30분 이내에 450nm, 570nm에서 흡광도를 읽었다. 흡광도 450nm에서 파장 보정까지 570nm에서 흡광도를 빼었다. 표준액을 이용하여 작성한 표준 곡선에 대입하여 나타내었다. 모든 실험군은 3회 반복하였다.

### 3. 통계분석

본 실험은 독립적으로 3회 반복하여 실시하였으며, 모든 실험 결과는 통계 프로그램 SPSS Version 25.0을 이용하여 평균  $\pm$  표준편차 (mean  $\pm$  SD)로 나타내었다. One-way ANOVA 분석 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 각 실험군의 유의적 차이를 검증하였다.

## IV. 연구 결과

### 1. 단백질 함량 측정

HE와 HW의 단백질 함량 측정 결과는 Table 1 및 Figure 1에 나타내었다.

HE의 단백질농도는  $0.48\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , HW의 단백질농도는  $2.97\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 나타내었다. 이에 보면 해마의 물 추출물은 EtOH추출물보다 단백질 함량이 훨씬 많게 보였다.

다음 실험을 위하여 동일한 단백질농도( $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )의 HE와 HW를 설정하여 동결 건조 시키고  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였다.

Table 1. Protein concentration of hippocampus extract

sample	단백질농도( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
HE	0.4759 $\pm$ 0.0516 <sup>b</sup>
HW	2.9723 $\pm$ 0.0092 <sup>a</sup>

Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Dunnett's test; Letters indicate significant differences among samples determined( $p < 0.05$ ).

- 1) HE: Hippocampus EtOH extract
- 2) HW: Hippocampus Water extract

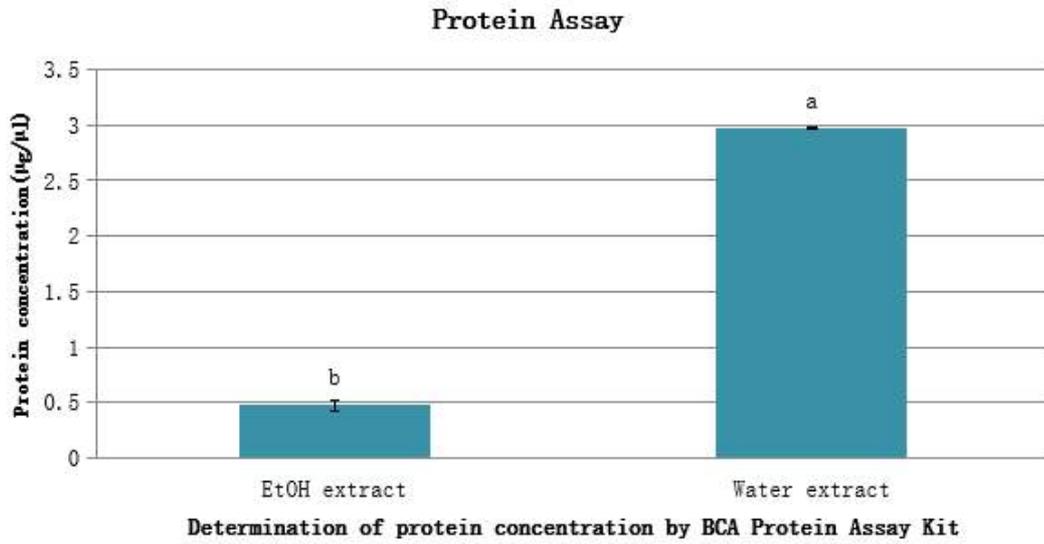


Figure 1. Protein concentration of hippocampus extract. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Dunnett's test; Letters indicate significant differences among samples determined ( $p < 0.05$ ).

## 2. 항산화 실험

### 1) DPPH 라디칼 소거능 측정 결과

본 연구에서는 각 시료의 DPPH 라디칼 소거능 활성을 ascorbic acid를 컨트롤로 또한 시료용액의 무첨가군과 대조하여 진행하였다.

DPPH 라디칼 소거능 활성은 Table 2 및 Figure 2에 나타내었다.

단백질농도  $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 HE와 HW를 DPPH 라디칼 소거능 측정하고 HE 4.81%에서 HW 8.47%로 관찰 되었고, HW는 HE와 비교하여 약 2배로 나타내었다. HW는 HE보다 높은 라디칼 소거능을 가지고 있지만 ascorbic acid에 비해 라디칼 소거능이 모두 낮은 것으로 보였다.

Table 2. DPPH radical scavenging activities of hippocampus extract

sample(0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	DPPH Radical 소거능%
HE	8.47 $\pm$ 2.07 <sup>b</sup>
HW	4.81 $\pm$ 1.50 <sup>c</sup>
Ascorbic acid	9.59 $\pm$ 2.97 <sup>a</sup>

Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined( $p < 0.05$ ).

1) HE: Hippocampus EtOH extract

2) HW: Hippocampus Water extract

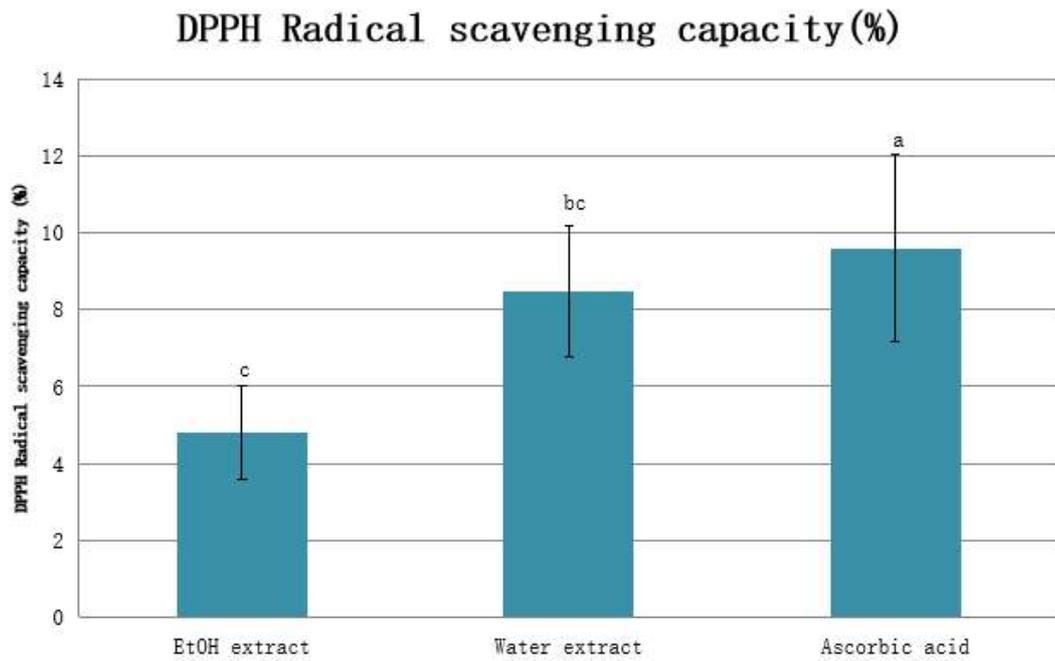


Figure 2. DPPH radical scavenging activities of hippocampus extract. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined ( $p < 0.05$ ).

## 2) ABTS 라디칼 소거능 측정 결과

본 연구에서는 각 시료의 ABTS 라디칼 소거능 활성을 ascorbic acid를 컨트롤로 또한 시료용액의 무첨가군과 대조하여 진행하였다.

ABTS 라디칼 소거능 활성은 Table 3 및 Figure 3에 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능과 같아 단백질농도  $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. HE는 22.21%, HW는 44.41%로 관찰되었고, HW는 HE와 비교하여 약 2배 높게 나타내었다. Ascorbic acid 비해 라디칼 소거능이 모두 높은 것으로 보였다.

Table 3. ABTS radical scavenging activities of hippocampus extract

sample(0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	ABTS Radical 소거능%
HE	22.21 $\pm$ 1.11 <sup>b</sup>
HW	44.41 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>
Ascorbic acid	16.07 $\pm$ 0.74 <sup>c</sup>

Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined( $p < 0.05$ ).

- 1) HE: Hippocampus EtOH extract
- 2) HW: Hippocampus Water extract

### ABTS Radical scavenging capacity (%)

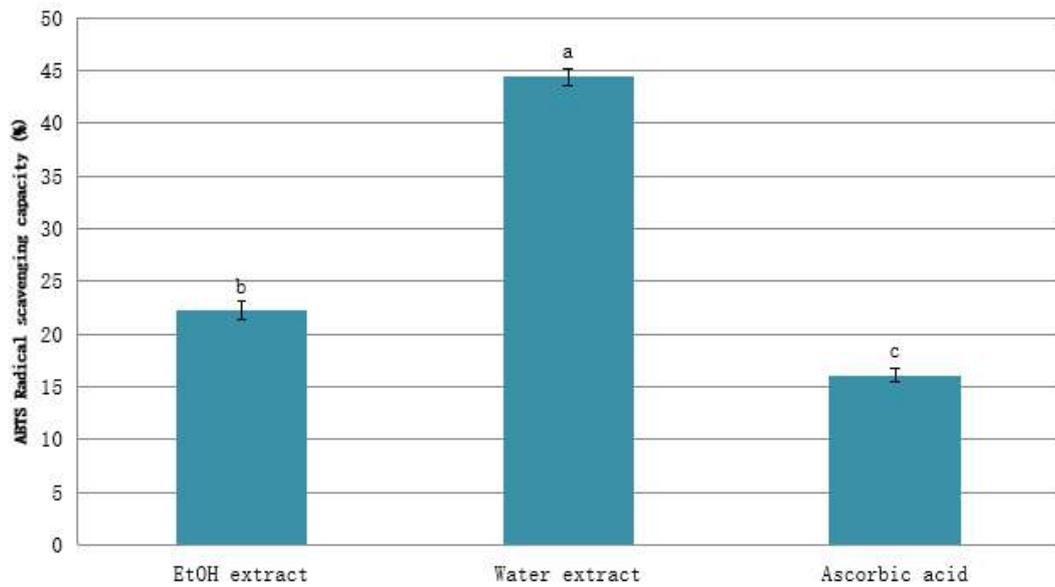


Figure 3. ABTS radical scavenging activities of hippocampus extract. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined ( $p < 0.05$ ).

### 3) Total polyphenol 함량 측정 결과

Total polyphenol 함량 측정 결과는 Table 4 및 Figure 4를 통하여 나타내었다.

물 추출물은 EtOH추출물보다 높은 폴리페놀 함량을 보였다. 물 추출물은 0.4244mg/ml, EtOH추출물 0.1165mg/ml로 나타났다(Table 4, Figure 4).

Table 4. Total polyphenol content of hippocampus extract

sample	Total polyphenol contents(mg/ml)
해마 EtOH추출물	0.1165±0.0003 <sup>b</sup>
해마 수용액	0.4244±0.4244 <sup>a</sup>
해마 수용액 6배희석	0.1116±0.1115 <sup>b</sup>

Data are represented as mean ± SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined( $p < 0.05$ ).

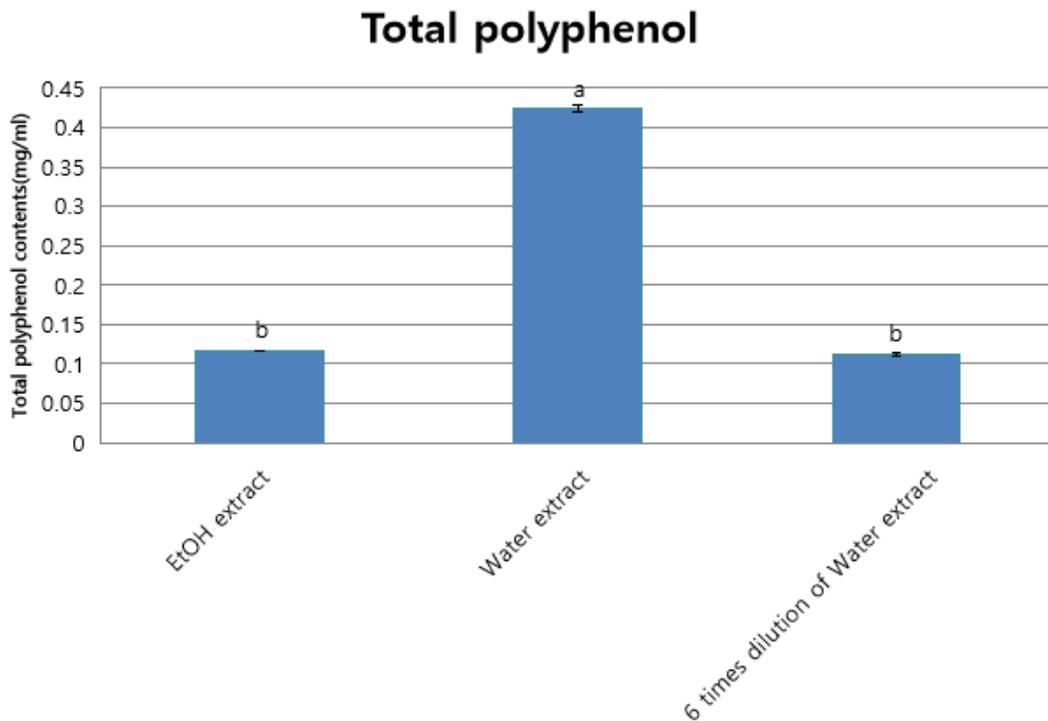


Figure 4. Total polyphenol content of hippocampus extract. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined ( $p < 0.05$ ).

### 3. RAW264.7 대식세포에서의 세포 생존율 측정 결과

각 농도(0, 500ng/ml, 1 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 15 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml)의 시료를 24 시간 처리하여 유의적으로 세포 생존율이 감소하는 것으로 관찰하였다(Table 5, Figure 5).

0~1 $\mu$ g/ml에서 모두 생존율 70%이상으로 나타나 세포 사멸에 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단하여 본 실험에서는 0~1 $\mu$ g/ml의 농도로 설정하여 항염 실험을 수행하였다.

Table 5. Effect of hippocampus extract on cell viability RAW264.7 cells

Sample 농도	생존율%	
	HE	HW
0ng/ml	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>
500ng/ml	81.44±5.71 <sup>b</sup>	72.45±6.45 <sup>bcd</sup>
1µg/ml	79.44±5.44 <sup>bc</sup>	67.73±5.63 <sup>d</sup>
5µg/ml	70.10±1.28 <sup>cd</sup>	53.09±3.80 <sup>e</sup>
10µg/ml	64.58±8.19 <sup>d</sup>	41.13±2.39 <sup>fg</sup>
15µg/ml	49.61±10.34 <sup>ef</sup>	14.56±1.87 <sup>h</sup>
20µg/ml	38.09±12.06 <sup>g</sup>	9.75±1.56 <sup>h</sup>

Data are represented as mean ± SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined(p<0.05).

1) HE: Hippocampus EtOH extract

2) HW: Hippocampus Water extract

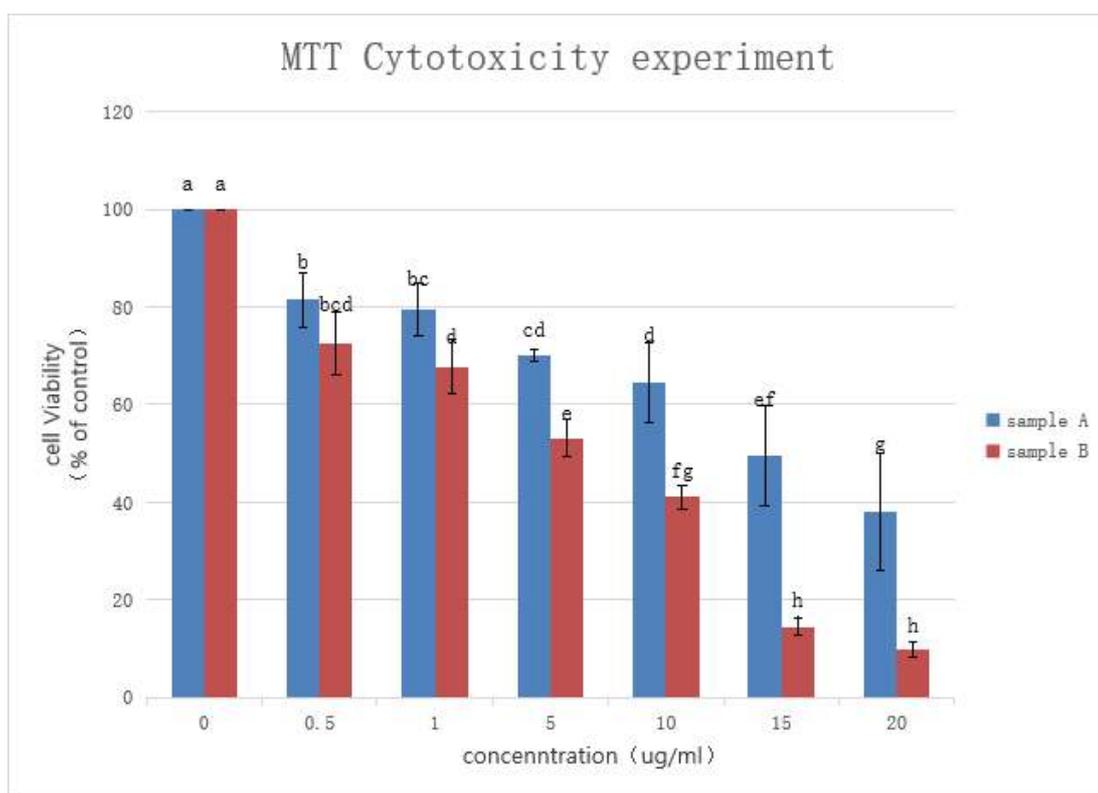


Figure 5. Effect of hippocampus extract on cell viability RAW264.7 cells. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined ( $p < 0.05$ ).

- 1) Sample A = HE: Hippocampus EtOH extract
- 2) Sample B = HW: Hippocampus Water extract

#### 4. RAW264.7 대식세포에서의 Nitric oxide (NO) 생성량 측정 결과

RAW264.7 대식세포에 각 농도 시료를 처리하여 6시간 후 LPS(1 $\mu$ g/ml)를 염증 유도하고 배지 내에 NO농도를 비교한 결과 농도 증가할수록 NO 생성량이 감소하는 것으로 나타났다.

Table 6. Effect of hippocampus extract on NO production in the LPS-stimulated RAW264.7 cells

Sample 농도	NO 생성량(uM)	
	HE	HW
LPS	3.66±0.10 <sup>c</sup>	3.66±0.10 <sup>c</sup>
LPS+100ng/ml	3.58±0.02 <sup>d</sup>	3.76±0.03 <sup>b</sup>
LPS+500ng/ml	3.45±0.01 <sup>ef</sup>	3.90±0.02 <sup>a</sup>
LPS+1μg/ml	3.38±0.02 <sup>f</sup>	3.64±0.03 <sup>cd</sup>
LPS+2.5μg/ml	3.26±0.03 <sup>g</sup>	3.16±0.03 <sup>h</sup>
LPS+5μg/ml	3.07±0.04 <sup>i</sup>	2.42±0.06 <sup>j</sup>
control	2.40±0.02 <sup>j</sup>	2.40±0.02 <sup>j</sup>
100ng/ml	2.37±0.05 <sup>j</sup>	3.39±0.05 <sup>ef</sup>
500ng/ml	2.35±0.03 <sup>j</sup>	3.47±0.08 <sup>e</sup>
1μg/ml	2.35±0.01 <sup>j</sup>	3.40±0.05 <sup>ef</sup>
2.5μg/ml	2.39±0.01 <sup>j</sup>	3.06±0.09 <sup>i</sup>
5μg/ml	2.35±0.04 <sup>j</sup>	2.35±0.04 <sup>g</sup>

Data are represented as mean ± SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined(p<0.05).

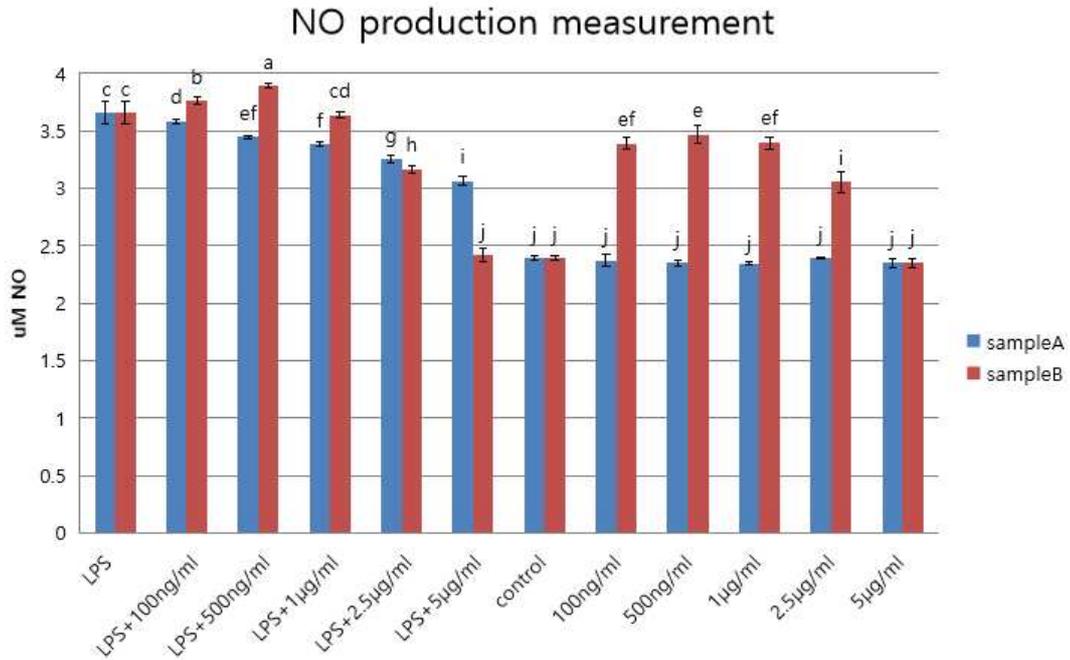


Figure 6. Effect of hippocampus extract on NO production in the LPS-stimulated RAW264.7 cells. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined ( $p < 0.05$ ).

- 1) Sample A = HE: Hippocampus EtOH extract
- 2) Sample B = HW: Hippocampus Water extract

## 5. 염증 관련 사이토카인 생성량 측정 결과

HE와 HW시료의 각 농도별 (100ng/ml, 500ng/ml, 1 $\mu$ g/ml) 처리 하였을 경우 LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포의 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 생성량이 감소하여 항염 효과가 있는 것으로 나타났다.

LPS처리하지 않는 군에 HW의 사이토카인 생성량이 증가한 것을 보면 HW는 독성이 있다고 추측 되었다.

Table 7. Effect of hippocampus extract on TNF- $\alpha$  production in the LPS-stimulated RAW264.7 cells

Sample 농도	TNF- $\alpha$	
	HE	HW
control	0.0544 $\pm$ 0.0010 <sup>h</sup>	0.0544 $\pm$ 0.0010 <sup>h</sup>
100ng/ml	0.0590 $\pm$ 0.0030 <sup>h</sup>	0.8346 $\pm$ 0.0055 <sup>b</sup>
500ng/ml	0.0699 $\pm$ 0.0015 <sup>h</sup>	0.7702 $\pm$ 0.0250 <sup>c</sup>
1 $\mu$ g/ml	0.0681 $\pm$ 0.0009 <sup>h</sup>	0.6586 $\pm$ 0.0178 <sup>ef</sup>
LPS	0.8982 $\pm$ 0.0987 <sup>b</sup>	0.8982 $\pm$ 0.0987 <sup>b</sup>
LPS+100ng/ml	0.7297 $\pm$ 0.0006 <sup>cd</sup>	1.0182 $\pm$ 0.0090 <sup>a</sup>
LPS+500ng/ml	0.7014 $\pm$ 0.0026 <sup>de</sup>	0.8787 $\pm$ 0.0192 <sup>b</sup>
LPS+1 $\mu$ g/ml	0.5591 $\pm$ 0.0383 <sup>g</sup>	0.6105 $\pm$ 0.0159 <sup>fg</sup>

Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined(p<0.05).

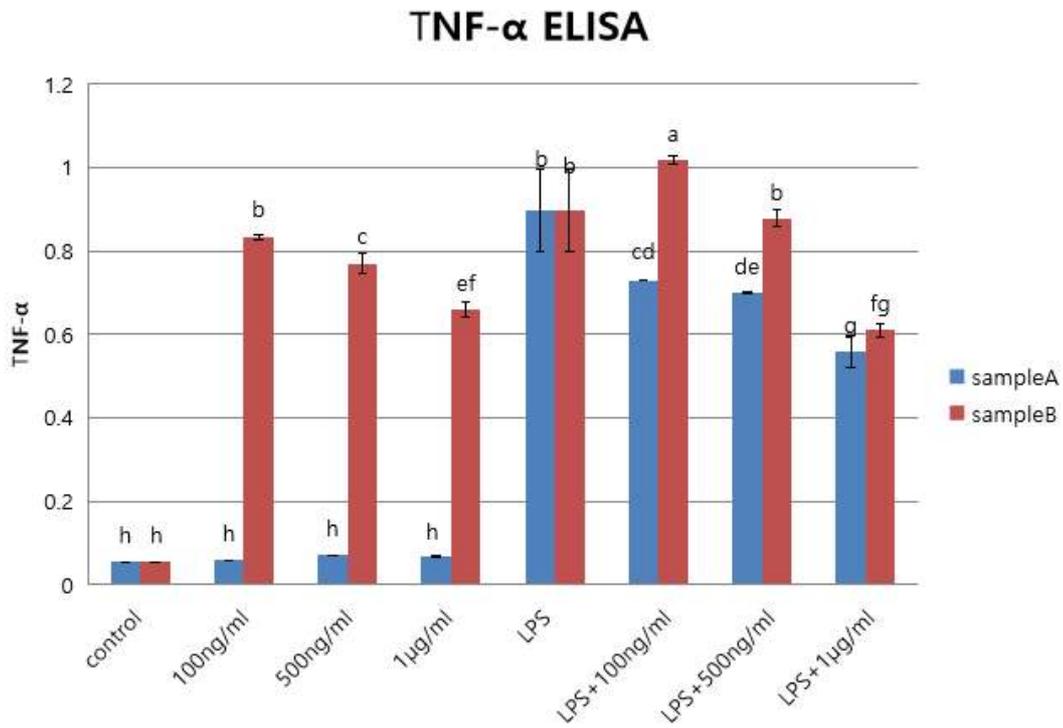


Figure 7. Effect of hippocampus extract on TNF- $\alpha$  production in the LPS-stimulated RAW264.7 cells. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined ( $p < 0.05$ ).

- 1) Sample A = HE: Hippocampus EtOH extract
- 2) Sample B = HW: Hippocampus Water extract

Table 8. Effect of hippocampus extract on IL-6 production in the LPS-stimulated RAW264.7 cells

Sample 농도	IL-6	
	HE	HW
control	0.0538±0.0239 <sup>g</sup>	0.0538±0.0024 <sup>g</sup>
100ng/ml	0.0507±0.0090 <sup>g</sup>	0.1389±0.0030 <sup>d</sup>
500ng/ml	0.0513±0.0192 <sup>g</sup>	0.1236±0.0095 <sup>e</sup>
1µg/ml	0.0496±0.0059 <sup>g</sup>	0.1008±0.0043 <sup>f</sup>
LPS	0.2349±0.0127 <sup>b</sup>	0.2349±0.0127 <sup>b</sup>
LPS+100ng/ml	0.1871±0.0064 <sup>c</sup>	0.2744±0.0067 <sup>a</sup>
LPS+500ng/ml	0.1787±0.0020 <sup>c</sup>	0.2269±0.0061 <sup>b</sup>
LPS+1µg/ml	0.1422±0.0046 <sup>d</sup>	0.1801±0.0065 <sup>c</sup>

Data are represented as mean ± SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined (p<0.05).

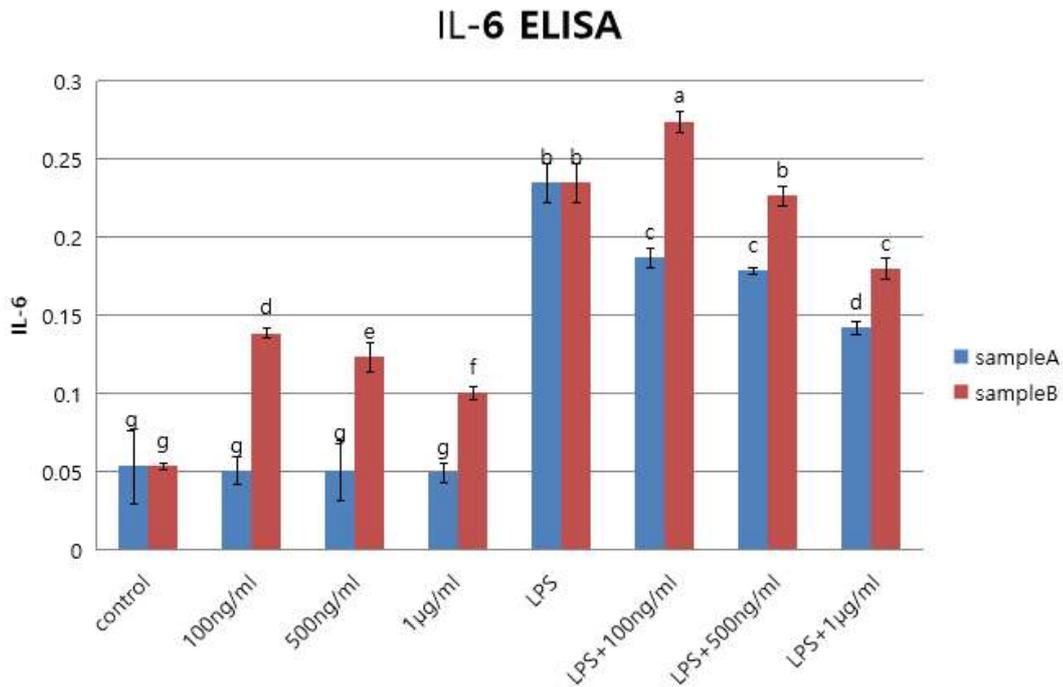


Figure 8. Effect of hippocampus extract on IL-6 production in the LPS-stimulated RAW264.7 cells. Data are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments with a one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test; Letters indicate significant differences among samples determined ( $p < 0.05$ ).

- 1) Sample A = HE: Hippocampus EtOH extract
- 2) Sample B = HW: Hippocampus Water extract

## V. 고찰

해마의 물 추출물은 EtOH추출물보다 DPPH, ABTS radical 소거능이 약 2배로 나타났다. 물 추출물은 EtOH추출물보다 높은 폴리페놀 함량을 나타냈다. 이에 EtOH추출물보다 물 추출물이 항산화 능력이 높게 확인되었다. 페놀 화합물은 해마에서 강력한 항산화 활성을 갖는 성분이다. 연구에 따르면 항산화 활성은 활성 산소를 흡수 및 중화하고 단일 항 산소와 삼중항산소를 소멸하거나 분해할 수 있는 산화 환원 특성에 기인한다[44]. 해마의 다양한 극성 추출물의 항산화 활성은 전체 페놀 함량, 페놀 화합물의 분포 및 극성과 관련이 있으며 극성이 더 많은 수용성 성분이 항산화 활성이 더 강함을 보여준다[45,46]. 해마 수용성 추출물의 항산화 활성은 해마의 DPPH, 소거율, 총 환원력,  $\cdot\text{OH}$  소거율 및 철 킬레이트 능력을 측정하여 평가하였다. 총 아미노산과 작은 펩타이드의 함량과 유형은 밀접한 관련이 있다. 이 실험의 결과와 일치한다. 해마가 항산화능을 가지고 있으며 총 페놀 함량과 관련이 있음을 미리 확인할 수 있다.

염증은 종양과 같은 많은 질병의 발생 및 발달과 밀접한 관련이 있다. 당뇨병 및 신경 퇴행성 질환, 현재 스테로이드 및 비스테로이드성 항염증제는 심각한 부작용이 있어 임상적 적용을 제한하고 있다. 최근에는 한약 자원에서 새로운 항염증제를 개발하는 것에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[47,48]. 본 실험에 LPS로 유도된 RAW264.7 세포의 NO 생성량이 해마의 물 추출물과 EtOH추출물의 각 농도별(100ng/ml, 500ng/ml, 1 $\mu$ g/ml, 2.5 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml) 증가할수록 NO농도를 감소하는 것으로 나타났다. 시료의 각 농도별 (100ng/ml, 500ng/ml, 1 $\mu$ g/ml) 처리 하였을 경우 LPS로 유도된 RAW264.7 세포의 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 생성량이 감소하여 항염 효과가 있는 것으로 나타났다. 물 추출물 처리 하였을 경우 초기에 조금 증가하지만, 시료의 농도가 증가할수록 감소하여 항염 효과가 있는 것으로 나타났다. 해마에서 분리한 Paeonol은 in vitro에서 좋은 항염증 효과를 나타내며, LPS (lipopolysaccharide)에 의해 유도된 iNOX 및 COX-2 유전자의 활성화를 억제하고 NF- $\kappa$ B 및 MAPK 신호 경로를 조절하여 NO를 감소시킬 수 있다.

프로스타글란딘 E2 (PGE2) 및 IL-6와 같은 전 염증성 사이토카인의 방출이 연구의 결과는 해마에서 분리된 파에 오 놀이 후속 발달을 위한 잠재적인 신경 염증 약물로 사용될 수 있음을 나타낸다[49]. 또한, 해마 석유 에테르 추출물에서 분리된 지질은 시험관 내에서 명백한 항염증 효과가 있으며, 그 결과 대 식세포 RAW264.7에서 LPS에 의해 유도된 전 염증성 사이토카인의 방출을 억제할 수 있음을 보여준다[50]. 이것은 실험 결과와 일치한다.

이에 해마 추출물의 항산화 능력과 항염 능력을 확인하였다. 해마는 광범위한 약리학적 효과와 명확한 임상적 효과를 가지고 있으며 다양한 중국 특허 의약품 및 강장제 건강 제품에 널리 사용되고 있으며 광범위한 응용범위를 가지고 있다 [51].

## VI. 요약 및 결론

본 연구는 해마의 EtOH추출물 (HE= Hippocampus EtOH extract)와 해마의 물추출물(HW= Hippocampus Water extract)에 의해 기능적 특성을 비교하기 위해 항산화 실험을 실시하였으며, 시료 처리하였을 경우 LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포의 NO 생성량과 사이토카인 생성량을 측정하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. EtOH추출물의 단백질농도는  $0.48\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 물 추출물 $2.97\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 나타났다. 이에 물 추출물은 EtOH추출물보다 단백질 함량이 훨씬 많게 보였다.
2. 물 추출물은 EtOH추출물보다 DPPH, ABTS radical 소거능이 약 2배로 나타났다. 물 추출물은 EtOH추출물보다 높은 폴리페놀 함량을 나타냈다. 이에 EtOH추출물보다 물 추출물이 항산화 능력이 높게 확인되었다.
3. 시료 처리 후 24시간 관찰한 결과 시료  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $15\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 군에서(특히 물추출물 처리군) 유의적으로 세포 생존율이 감소하는 것으로 나타났다.  $0\sim 1\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위에서 생존율 70%이상으로 나타나 세포 사멸에 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단하여 본 실험에서는  $0\sim 1\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 설정하여 항염실험을 수행하였다.
4. 배지 내에 NO농도를 비교한 결과 시료의 각 농도별( $100\text{ng}/\text{ml}$ ,  $500\text{ng}/\text{ml}$ ,  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 증가할수록 LPS로 유도된 RAW264.7 세포의 NO 생성량이 감소하는 것으로 나타났다.
5. 시료를 각 농도별 ( $100\text{ng}/\text{ml}$ ,  $500\text{ng}/\text{ml}$ ,  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 처리 하였을 경우 LPS로 유도된 RAW264.7 세포의 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 의 생성량이 감소하여 항염 효과가 있는 것으로 나타났다.

본 연구 결과 해마의 물 추출물은 높은 항산화능을 가지며 해마 EtOH추출물은 더 좋은 항염 효과를 나타냈다. 물 추출물로 처리하였을 경우 LPS로 유도된 세포의 사이토카인 생성량이 초기에 조금 증가하지만 시료의 농도가 증가할수록 감소하여 항염 효과가 있는 것으로 나타났다. 이유가 명확하지 않고 추가 연구가 필요하나, 제시된 여러 데이터에 따르면 해마 추출물은 항산화, 항염 효과를 가지고 있는 건강식품 개발 및 가공에 사용할 수 있음을 확인하였다.

## VII. 참고문헌

1. J Grant Burgess. New and emerging analytical techniques for marine biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012, 23, 29 - 33.
2. William H.Gerwick, Bradley S.Moore. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chemistry & Biology*. 2012, 19, 85 - 98.
3. William H.Gerwick, Amanda M.Fenner. Drug discovery from marine microbes. *Microbial Ecology*. 2013, 65, 800 - 806.
4. Vinothkumar Saradavey, Parameswaran, P.S.. Recent advances in marine drug research. *Biotechnology Advances*. 2013, 31, 1826 - 1845.
5. Yan Zhenzhen, Guo Quanyou, Lin Tingting, Lin Xin, Zhang Dong, Xiao Dongxue. Research on applications of Hippocampus: Progress and prospect. *Marine Fisheries*. 2018, 040(006):752-762.
6. Chen Chengbo, Yuan Xuanhui, Chen Zheng, et al. Study on extraction and antioxidant activities of liquefied protein of three-spot hippocampus. *China Tropical Medicine*. 2011, (03):329-331.
7. Jiang Sufen, Ji Aiguo, Liang Hao, et al. Research progress of hippocampus in China. *Chinese Medicinal Materials*. 2007, 30(7): 884-887.
8. Yang Qiaofang, Meng Qinggang, Discuss the animal model about inflammation. *Chin Arch Tradit Chin Med*. 2008 :516-517.
9. Hou Xiaoli, Sun Mingxue, Gao Huanhuan, et al. Progress on anti-inflammatory natural products. *The J Pharm Pract*. 2015, (01):20-27.

10. Zhang Ning, Xu Bin, Mou Chunyan. Molecular profile of the unique species of traditional Chinese medicine. Chinese seahorse (*Hippocampus kuda* Bleeker). *Febs Letters*. 2003, 550 : 124-134.
11. Toren Finkel, Nikki J.Holbrook. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature*. 2000, 408 : 239-247.
12. IkSoo Kim, WanOk Lee. First record of the seahorse fish. *Hippocampus trimaculatus* (Pisces: Syngnathidae) from Korea. *Kor J Zool* 1995. 38, 74-77.
13. 이시진. <<본초강목>>. 1596
14. Liu Qi, Dong Meiling, Zhang Hong, et al. Marine medicine—study on the activity of hippocampal hydrolysate. *Hebei Fisheries*, 2015, 000(009):10-15.
15. Lu Chena, Xiaoyu Wang a b, Baokang Huang. The genus *Hippocampus*—A review on traditional medicinal uses, chemical constituents and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015, 162 : 104-111.
16. Hu Jianying, Li Bafang, Li Zhijun, et al. Preliminary study of the antifatigue effect of eight kinds marine crude drugs. *Journal of China marine drugs*. 2000, 2 : 56-58.
17. BoMi Ryua, Qian Zhongji, SeKwon Kim. SHP—1, a novel peptide isolated from seahorse inhibits collagen release through the suppression of collagenases 1 and 3, nitric oxide products regulated by NF-kB/p38 kinase, *Peptides*. 2010, 31 : 79-87
18. Xu Donghui, Xu Shibo. Antithrombotic pharmacological study on hippocampus extract. *Journal of China marine drugs*. 1995, 18 : 573.
19. Zhang Ning, Xu Bin, Mou Chunyan. Molecular profile of the unique species of traditional Chinese medicine. Chinese seahorse(*Hippocampus kuda*

Bleeker), Febs Letters. 2003, 550 : 124-134.

20. Guo Wenchang, Liu Jiahe, Li Hongwei. The species, breeding and utilization of Chinese-made Hippocampus(3). Special Economic Animal and Plant. 2017, 20( 2) : 11-14.

21. Yan Jiabin, Ma Rundi, Yu Lijian. Medicinal values of Hippocampus. Chinese Journal of Marine Drugs. 2002, 21( 6) : 48-52.

22. Xu Kehan, Study on ACE-inhibitory and antioxidant activities of three-spot Hippocampus hydrolysis peptides. Haikou: Hainan University. 2015.

23. Qian Zhongji, BoMi Ryu, Kim MoonMoo, et al. Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of the extracts from seahorse, Hippocampus kuda, Bleeler, Biotechnology & Bioprocess Engineering. 2008, 13( 6) : 705-715.

24. Sanaye S.V., Pise N.M., Pawar A.P., et al. Evaluation of antioxidant activities in captive-bred cultured yellow seahorse. Hippocampus kuda ( Bleeker, 1852), Aquaculture. 2014 ( 434) :100-107.

25. Hao Xiaoli, Xu Shenhong. Two methods are used to evaluate the antioxidant activity of four food antioxidants. Food Science. 2003, 24(2): 127-129.

26. Ding Yusong, Ma Long. Experimental study on the effect of different drying methods on the antioxidant activity of grape seed extracts. Journal of Xinjiang Medical University. 2007, 30(6): 578-560.

27. Nicholas J.Miller, Catherine RiceEvans, Michael J.Davies, Vimala Gopinathan, Anthony Milner. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates.

Clinical Science. 1993, 84 :407-412.

28. Mariken J.T.J.Arts, et al. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. Food Chemistry. 2003, 80 :409-414.

29. DaeOk Kim. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry. 2003, 81 :321-326.

30. Lin Ping, Wu Yang, Huang Hua, et al. Cytokines and ulcerative colitis. Journal of Hubei University for Nationalities : Medical Edition. 2003.

31. Fu Hangyu, He Yuzhuo, Zhou Aixiang, etc. The pharmacokinetics of antipyretics on the pharmacokinetics of Mahuang Decoction, Guizhi Decoction, Yinqiao Powder and Sangjuyin. Pharmacology and Clinics of Traditional Chinese Medicine. 1992, 38:1-4.

32. Wei Alfreda, Shibamoto Takayuki. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007, 55 :1737-1742.

33. Marino B.Arnau. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends in Food Science & Technology. 2000, 11(11):419-21.

34. Fang Yunzhong, Yang Sheng, Wu Guoyao. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition, 2002, 18(10): 872-879

35. Harold E.Seifried , Darrell E.Anderson , Evan I.Fisher, et al. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. Journal of Nutritional Biochemistry, 2007, 18(9): 567-579.

36. Saleem Mohammad, Asim Mohammad, et al. Tea beverage in chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. Acta Pharmacologica

Sinica, 2007, 28(9): 1392-1408.

37. Gemma ChivaBlanch, Mireia UrpiSarda, Rafael Llorach, et al. Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis: a randomized clinical trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2012, 95(2): 326-334.

38. Weng Chiajui, Yen Gowchin. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, 2012, 38(1): 76-87.

39. Robert J. Williams, Jeremy P.E. Spencer. Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, 52(1): 35-45.

40. DongYoung Choi, YoungJung Lee, JinTea Hong, et al. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, 2012, 87(2/3): 144-153.

41. Khan Naghma, Afaq Farrukh, Mukhtar Hasan. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008, 10(3): 475-510.

42. Lu Yumiao, Ma Huiling. Bibliometric Analysis of SCI Papers on Plant Polyphenol Published during 2002-2012 and the Hot Topics in Biological Activity. *Food Science*. 2013, 34: 23-375.

43. Balunkeswar Nayak, Farid Dahmoune, Kamal Moussi, Hocine Remini, Sofiane Dairi, Omar Aoun, Madani Khodir. Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from Citrus sinensis peels. *Food Chemistry*. 2015, 189:507-516.

44. Ding Wu, Kou Liping, Ren Jian. Effects of different phosphates on pork tenderness and water retention. *Food Science*. 2009, 30(21): 56-58
45. Geoffrey R.Skurray, Dawn L.Perryman. The effects of alkaline hydrogen peroxide treatment on the nutritional value of tripe. *Meat science*. 1980, 4(4) : 313-318.
46. Gao Feifei. Research on processing characteristics of bovine gastric smooth muscle. Nanjing: Nanjing Agricultural University. 2012.
47. Libby Peter. Inflammatory mechanisms: The molecular basis of inflammation and disease. *Nutrit Rev*. 2007, 65(3): 140-146.
48. Fu Dexing, Feng Yufei. Study on the safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Chinese General Practice*. 2008, 11(2): 136-138.
49. Himaya S.W.A, BoMi Ryu, Qian Zhongji, et al. Paeonol from *Hippocampus kuda* Bleeler suppressed the neuro-inflammatory responses in vitro via NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Toxicol In Vitro*. 2012, 26(6): 878-887.
50. Chen Liping, Shen Xuanri, Chen Guohua, et al. A Comparative study of the effects upon LPS induced macrophage RAW264. 7 inflammation in vitro of the lipids of *Hippocampus trimaculatus* Leach. *J Oleo Sci*. 2015, 64(12): 1273-1281.
51. Yuan Xianling. Research overview of hippocampus medicinal materials in my country. Proceedings of the Second Clinical Chinese Medicine Symposium of the Basic Theory of Chinese Medicine Branch of the Chinese Society of Chinese Medicine. Beijing: Chinese Society of Chinese Medicine. 2009.

<국문초록>

제주해마를 활용한 기능 특성 및 식품 적합성 연구

徐 偉

濟州大學校 大學院 食品營養學科

指導教授 朴 晟 秀

해마(*Hippocampus coronatus*)는 큰가시고기목 (Gasterosteiformes) 실고기과 (Syngnathidae)에 속하는 어종으로 전 세계적으로 약 54종이 알려져 있다. 높은 의약 및 치료 건강 가치로 열대 및 아열대 얕은 물에 널리 분포한다. 주요 약리학적 효능에는 성호르몬 유사 효과, 항염증, 항산화, 항종양 및 면역 개선이 포함된다. 현재 기존 해마 연구는 지용성 성분의 분석과 연구에 치중되고 있는 반면, 수용성성분에 대한 연구는 상대적으로 적다. 또한, 해마의 성분을 활용한 식품의 개발은 눈에 띄게 추진되지 못하고 있는 형편이다. 본 연구에서는 제주 양식 해마의 물, 에탄올 추출물을 시료로 하여 RAW264.7 세포에 대한 항산화, 항염 실험을 통해 기능 특성을 검토하였으며, 식품 개발 및 건강식품 가공에 이용하기 위해 본 연구를 수행하였다.

항산화 효과를 평가하기 위해 DPPH, ABTS 라디칼 소거능 측정 및 폴리페놀 함량 측정을 수행하였다. 그 결과 동일한 단백질 농도를 가진 해마 물 추출물의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능은 에탄올 추출물보다 약 2배 높았으며, 총 페놀 함량도 에탄올 추출물보다 높았다. 해마 물 추출물의 항산화 능력은 에탄올 추출물보다 높다는 결론을 내릴 수 있다.

항염증 활성을 평가하기 위해 LPS를 사용하여 RAW264.7 대식세포를 유도하여 염증 모델을 확립했다. NO 분비량과 사이토카인 (TNF- $\alpha$ 와 IL-6) 방출량을 실

험 지표로 사용했다. 해마의 다른 용매추출물은 0 ~ 1  $\mu\text{g/ml}$  의 농도에서 세포에 대한 세포 독성이 명백하게 나타나지 않았다. 모델그룹에 비하여 HW와 HE는 LPS에 의해 유도된 대식세포의 NO분비를 억제할 수 있었다. 사이토카인 실험에서 HE는 LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포를 억제하여 HW보다 다양한 농도(100ng/ml, 500ng/ml, 1 $\mu\text{g/ml}$ )에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-6을 분비했다.

기존 자료는 HW의 항산화 효과가 HE보다 우수하고 HE가 항염 효과가 우수하다는 것을 예비적으로 증명하여 해마관련 건강식품의 후속개발에 대한 근거와 참고 자료를 제공한다.