Korean J. Food Preserv.
Vol. 15, No. 5. pp. 749-753, October 2008

사단법인 한국식품저장유통학회
THE KOREAN SOCIETY OF FOOD PRESERVATION

청도반시 추출물에 의한 라디칼소거 활성과 면역조절 활성의 상호 비교

허진철 · 채장희[1] · 이숙희[1] · 이윤래 · 문광덕 · 정신교 · 이상한†
경북대학교 식품공학과, [1]경북농업기술연구원

Comparison of Radical Scavenging and Immunomodulatory Activities Exhibited by an Aqueous Extract of *Diospyros kaki* Thunb. Fruit (Persimmon)

Jin-Chul Heo, Jang-Heui Chae[1], Sook-Hee Lee[1], Yun-Rae Lee, Kwang-Deog Moon, Shin-Kyo Chung and Sang-Han Lee†
Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
[1]Gyeongsangbukdo Agricultural Research & Extension Services, Daegu 702-708, Korea

Abstract

To assess the relationship between anti-oxidant and immunomodulatory activities of *Diospyros kaki* Thunb. fruit, we harvested persimmons on the first Friday of every month from July to October, and conducted a DPPH assay, a T-bet promoter assay, and an ELISA for IL-4 determination. Anti-oxidant activity increased as fruit weight rose. When the fruit was extracted with five different solvents, and the extracts examined for radical scavenging activity, such activity exhibited a pattern similar to that seen when anti-oxidant activity was assessed. T-bet promoter activity decreased on ripening, whereas IL-4 expression increased, as tested in a DNFB-induced animal model. Collectively, the results suggest that inflammation-inhibitory activity, valuable in treatment of some immune diseases, rises as persimmons ripen.

Key words : *Diospyros kaki* Thunb., anti-oxidant activity, immuno-modulatory activity, T-bet, IL-4

서 론

감(Persimmon)은 학명이 *Diospyros kaki* Thunb.으로 전 세계에 걸쳐 널리 분포되어 있는 감나무속 식물로 약 1,000여종이 있는데, 대부분 열대나 아열대 지방에 분포되어 있다. 온대에 분포되어 있는 것은 식용으로 많이 이용되어 한국, 중국, 일본을 원산지로 하고 있다(1). 우리나라에서는 경상도, 전라도 지역에서 많이 재배되고 있지만, 최근 재배 면적이나 생산량이 감소 추세에 있지만, 여전히 과실 중 중요한 위치를 차지하고 있다(2). 국내에서 재배되는 감의 종류에는 단감과 떫은 감의 두 품종으로 나뉘며, 단감의 경우는 남부 지역에서 많이 재배되고 높은 소득으로 인하여 재배 면적 및 생산량이 확대되고 있는 반면, 떫은 감의 경우는 전국적으로 재배는 되고 있지만 떫은 맛으로 재배 면적 및 생산량이 감소 추세에 있다(3). 떫은 감은 둥시, 반시가 약 59%로서 경북, 전북 등에서 주로 많이 재배되고 있으며, 탈삽 또는 연화 과정을 거쳐야 할 뿐 아니라 떫은 맛이 잔존하거나 갈변하는 문제점과 기호적으로 단감에 비하여 선호도가 낮고 수확 시기에 일시적으로 출하되어 단점이 있고, 홍시로 먹어야 하는 취약점을 가지고 있다(4). 그러나 최근 항산화성, 항동맥경화 활성, 알코올 분해촉진, 항혈전 등의 생리활성이 보고되고 있으며, 비타민 A와 프로비타민 C가 풍부하게 함유되어 있어서 열이나 물, 공기 등에 노출되어도 쉽게 파괴되지 않는 특성을 가지고 있으며, tannin의 경우는 강한 수렴작용 으로 인하여 위궤양이나 설사 등의 소화기 질환에 좋으며, 지혈 작용이 있어 뇌일혈 증세 및 모세혈관 강화작용으로 인한 고혈압 등 순환기계 질환의 예방과 치료에 매우 우수하다고 알려져 있다(5).

이에 본 연구에서는 청도반시를 이용한 면역 활성능을

†Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

연구함으로서 감의 고부가가치화와 활용성의 증대방안을 강구하고자 본 연구를 시작하게 되었다. 경상북도 청도군에서 주로 재배되고 있는 청도반시는 총 재배면적 1,729ha이고 총 생산량은 24,874톤으로 전국에서 유일하게 감에 씨가 없으며 육질이 연한 것이 특징이다. 이러한 특성을 지닌 청도반시 추출물의 라디칼 소거 활성과 T-bet promoter 활성의 상관관계를 비교함으로서 청도반시의 추출물이 면역활성의 조절 가능성이 있는지를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

실험에 사용한 감은 경상북도 청도군에서 재배하는 감나무에서 수확한 것으로서, 청도군 농업기술센터의 전문가 동행하에 2006년 7, 8, 9, 10월의 첫째 주에 직접 청도군 이서면의 한 농가에서 수확하였다. 청도반시는 감의 꼭지를 제거한 가식부를 세척하여 분쇄 후, 감 열매 30g에 물, 50% ethanol, 50% methanol, 50% acetone, DMSO (dimethylsulfoxide) 등의 각 용매 300 mL와 혼합하여 추출하였다. DW의 경우 60℃에서 24시간 동안 열수 추출하였고, 그 외 50% ethanol, 50% methanol, 50% acetone, DMSO는 24시간 동안 shaking하여 3회 반복 추출하여 동결건조시켰으며 분말을 용매에 녹여 최종 각 월별 감 추출물로 사용하였다.

시 약

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 Sigma (St. Luois, MO, USA), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)은 BioWhittaker (Walkersville, MD, USA), IL-4의 정량은 Mouse IL-4 Immunoassay kit (R&D systems, Mineapolis, MN, USA)를 사용하였다. 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

DPPH radical scavenging activity

항산화 활성 측정 시험은 기존에 알려져 있는 여러 가지 방법 중 대표적인 DPPH free radical scavenging assay를 시행하였다(6,7). 0.2 mM DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; Sigma Co.)를 methanol에 녹인 용액을 96 well plate에 190 μL 분주 후 각각의 추출물을 10 μL씩 3회 반복하여 분주하여 약 30분 정도 실온에서 방치 후 VICTOR 3 spectrophotometer (1420 Multiabel counter; PerkinElmer, Turku, Finland)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하고 측정된 수치는 전자공여능을 % DPPH radical scavenging = 〔1-(ABS_{sample} / $ABS_{control}$)〕 × 100으로 계산하였다.

세포 배양 및 stable cell line

사용한 모든 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% feral bovine serum (FBS)을 혼합한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90%의 confluent한 조건이 되면 계대배양을 하였으며, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다. Murine macrophage cell line 인 Raw264.7 cell은 경북대학교 식품효소생물공학연구실에서 보유하고 있는 세포를 사용하였으며 T-bet promoter가 삽입된 stable cell line을 구축하였다. T-bet promoter 활성 검증용 세포는 T-bet promoter 영역의 -1836에서 +192 위치의 유전자를 클로닝하여 *XhoI*과 *Hind*III의 절단부위를 지닌 pGL2-neo vector에 삽입하여 pGL2 luciferase reporter vector (Promega, Madison, WI)로 재클로닝하였으며 pGL2-neo/T-bet promoter vector는 Lipofectamine 2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 Raw264.7 세포로 transfection 시켜 G418(700 μg/ml)을 첨가시켜 96 well에서 single cell로 seeding하여 선별하여 PMA, LPS, ConA으로 자극하여 반응하는 정도에 따라 stable cell line화 하였다(8).

Luciferase assay

각 세포는 96 well plate에 각 well 당 2×10^3 으로 T-bet promoter가 삽입된 stable cell을 분주하고 무처리군, LPS처리군, 수확 시기별 감 추출물에 LPS를 처리한 3가지 군으로 나누어 처리한 뒤, 24시간 후에 plate의 media를 제거하고 PBS (phosphate buffer saline)로 3회 세척하고, lysis buffer를 각 well 일정량 분주 후 실온에서 30분 정도 방치 한 후에 luciferase용 96 well로 옮긴 후 luciferase solution을 동량으로 처리 한 후 ELISA reader (1420 Multilabel counter, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다(9).

동물모델 실험

생후 6주된 수컷 BALB/c 마우스(효창사이언스)를 1주일간 순화시킨 후, 제1일째에 0.5% DNFB(di-nitro phenyl benzene; Sigma)를 acetone : olive oil = 4:1의 비율로 만들어서 용액 50 μL를 복부에 개시 감작하여 면역반응을 유도하였으며, 제5, 9, 13일에 0.2% DNFB (acetone : olive oil = 4:1) 용액 25 μL를 총 3회 등 부위에 도포하여 재감작시켰다. DNFB 처리 후 감 추출물을 제7, 9, 11, 13, 15일에 피부 표면에 25 μL씩 2일 간격으로 총5회 도포하고, 제16일에 마우스를 희생시켜 혈액에서의 IL-4의 측정을 수행하였다(10).

IL-4 측정

항체가 붙어있는 각 well (Mouse IL-4 Microplate 890408, R&D system, Mineapolis, MN, USA)에 coating buffer (Mouse IL-4 conjugate 892701) 50 μL를 첨가하여 4℃에서 24시간 방치 후, 각 well에 IL-4 standard와 시료 100 μL를 각각 첨가하여 실온에 2시간 방치한 후, wash buffer (Wash

Buffer Concentrate 895023) 200μL로 3회 세척하였다. 이어서, 각 well에 항체로 Mouse IgG-HRP 50 μL를 넣고 상온에서 2시간 방치 후, 제거하고 3회 세척하였다. 각 well에 기질용액 (Assay diluent RD1-18) 50 μL를 넣고 30분 방치 후, 반응정지액(Stop solution 895174) 50 μL를 첨가하여 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다(11).

결과 및 고찰

감 열매는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 7월에서 10월까지 과실의 개당 무게가 약 3.2그램에서 13.8그램으로 매월 무게가 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

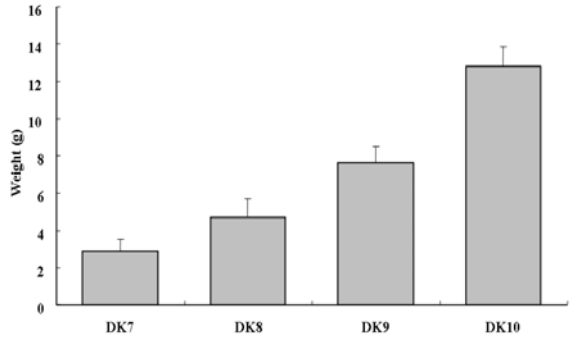

Fig. 1. Weight change of *Diospyros kaki* Thunb.

DK7, DK8, DK9, and DK10 denote the persimmon fruits which are harvested on the first week of July, August, September, and October 2006, respectively.

감 추출물의 항산화 활성 측정은 DPPH free radical scavenging activity 측정을 통해 조사하였다. DPPH는 화학적으로 매우 안정화된 프리라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 515~525 nm 부근에서 최대 흡광도를 가지며, 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 라디칼이 소멸되고 그로 인하여 색깔이 변화한다. 보라색의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)이 항산화물질과 반응하여 무색으로 탈색되는 특징을 이용하여 항산화 능력을 측정 할 수 있다. 감을 각각 DW, 50% ethanol, 50% methanol, 50% acetone, DMSO 추출물로 조제하고 이에 대한 항산화 능력을 측정한 결과, 7월 감 열매 DW 추출물이 다른 용매에 비하여 가장 높은 69.56%의 항산화 활성을 보였으며, 7월 감 열매 50% ethanol, 50% methanol, DMSO 추출물은 평균 55~65% 정도의 항산화 활성을 보였다(Fig. 2). 시기별로 측정한 결과는 모든 용매 군에서 7월 감 열매 추출물 (DK7)이 평균 50~70% 정도를, 8월 감 열매 추출물 (DK8)이 평균 40~55% 정도를, 9월 감 열매 추출물 (DK9)이 평균 30~45% 정도를, 10월 감 열매 추출물 (DK10)이 평균 20~40% 정도로 미숙과에서 완숙과로 진행되면서 항산화 활성이 저하됨을 확인하였으며, 활성 저하의 원인은 수확시기에 따라 감내에 존재하는 polyphenol성분과 같은 항산화성 물질이 감소하기 때문으로 예상된다(Fig. 3).

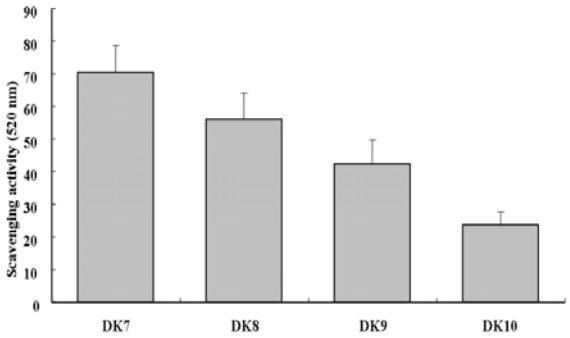

Fig. 2. Radical scavenging activity by aqueous extract using a DPPH assay.

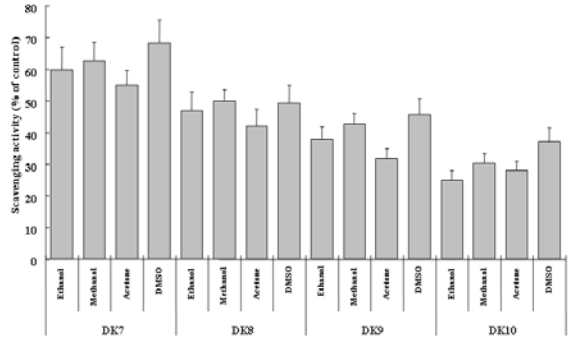

Fig. 3. Radical scavenging activity by various extracts using a DPPH assay.

다음에는 감 추출물 처리에 따른 면역조절활성의 변화를 검토하기 위하여 T-bet promoter 활성을 검토하였는데, T-bet promoter가 삽입된 Raw 264.7 세포를 이용하여 reporter assay를 시행하였다. T-bet (T-box family transcription and differentiation factor)은 Th1 세포의 분화를 유도하고 Th2 세포의 분화를 억제하는 특징이 있고, 항원에 대한 과민반응과 유전적으로 연관성이 있다고 알려져 있으며 11번 염색체에 위치하는 천식과 깊은 관련이 있는 분자로 알려져 있다(12,13). T-bet이 삽입된 Raw 264.7 cell을 이용하여 luciferase 활성을 측정한 결과, Fig. 4에서 보는 바와

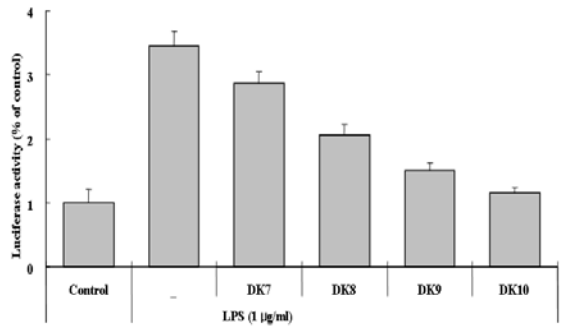

Fig. 4. T-bet promoter activity by a luciferase assay.

같이 LPS를 처리하였을 때는 대조구에 비하여 야 3.5배의 활성이 증가하는 경향을 보였고, DK7에서 DK10으로 과일이 성숙하면서 luciferase 활성이 저하되는 것으로 보아 미숙과에서 가장 높은 T-bet promoter 활성 능력을 보이는 것으로 확인되었다. 이를 통하여 면역활성 특히 T-bet promoter의 조절능에는 감 열매 추출물의 polyphenol성분이 억제능력이 있으며, 완숙과로 진행되면서 polyphenol 성분과 같은 항산화물질이이 저하됨에 따라 억제 능력이 저하되는 것으로 추정된다(자료 미제출).

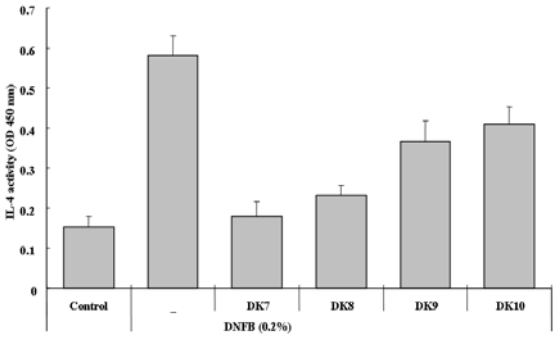

Fig. 5. Comparison of IL-4 expression in DNFB-induced animal model during persimmon ripening.

한편, IL-4는 Th2 세포의 분화를 촉진하며, B 림프구의 증식 및 분화인자와 비만세포의 증식인자, 대식세포의 활성화 인자로서 작용하며 IL-1이나 TNF의 합성을 억제한다(14,15). 따라서 T-bet promoter 활성의 변화를 재확인하기 위하여 아토피 유발인자인 DNFB를 처리한 동물모델을 이용하여 혈청 중 IL-4의 양적 차이를 ELISA로 비교하였다. 0.5% DNFB를 반복적으로 도포하였을 때, DNFB 무처리군에 비하여 약 3.2배 높은 IL-4 발현량을 보이는 것으로 보아 아토피 피부염이 유발된 것으로 판단되었다. DNFB군을 100%로 하여 DK7에서 DK10의 샘플을 처리한 결과, IL-4 발현량이 대조구에 비교하여 DK7의 경우 30% 정도의 발현량을 보이는 것으로 보아, DK7이 아토피 억제 능력이 가장 뛰어난 것으로 확인되었다. 또한, DK7에 비하여 DK10의 IL-4 발현량이 증가하는 것을 통하여 미숙과에서 완숙과로 갈수록 아토피 억제 능력이 저하됨을 다시금 확인 할 수 있었다.

미성숙된 T helper cell은 성숙이 되면서 2가지 subset을 가지게 된다. Th1과 Th2 type의 형태로 나누어지는데 T-bet(T-BOX21, TBX21)은 Th1-specific T-box transcription factor로서 T cell의 분화를 유도한다. 분자염증과 관련하여서, 일반적으로 면역제어가 불규칙적인 경우는 Th1 cell과 Th2 cell의 비율이 다르게 나타난다. 즉 각종 면역반응을 일으키는 Th2 cell의 비율이 높게 나타나는 현상을 보이는데 이들의 밸런스가 유지되어야만 면역세포의 homeostasis가 유지된다고 볼 수 있다(16,17). 이 경우 밸런스를 맞추어 주는 방법이 2가지가 있는데 하나는 Th2 세포의 분화를 억제하는 것이고, 나머지 하나는 Th1 cell의 분화를 적절히 촉진하는 것이다. 본 연구에서는 T-bet이 Th1 transcription factor인 것을 이용하여 T-bet의 활성을 높여주고자 하였다. 그 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 DK7에서 DK10으로 진행됨에 따라 T-bet promoter 활성이 비례적으로 감소하며, 상대적으로 IL-4의 발현은 증가함을 나타내었다. 이로서 LPS에 활성화된 분자염증 상태의 세포는 T-bet promoter와 IL-4의 발현과의 상관관계를 분석함으로서 추정하여 볼 수 있다는 점에서 이 연구결과의 중요성이 있다고 본다.

요 약

청도반시 추출물로부터 라디칼 소거활성, T-bet promoter 활성, IL-4 발현 활성의 상관관계를 분석하고자 7월부터 10월까지 감을 시기별로 수확하여 분자염증 활성 여부를 확인하였다. 감의 무게는 시기가 경과할수록 무거워지면서 항산화 활성에 있어서는 감이 미숙과일수록 항산화활성이 우수하였다. 4가지의 용매로 추출한 감의 항산화 활성도 유사한 양상을 보였다. T-bet promoter 활성은 추숙이 될수록 억제되는 양상을 보였는데, 이에 반하여 IL-4의 발현정도는 숙성함에 따라 증가하는 것을 알 수 있었다. 이로 미루어 보아 수확시기에 따라 이러한 분자염증에 관련한 일련의 활성의 억제 효과는 감이 미숙과일수록 활성이 상승하였다.

감사의 글

본 연구는 청도군농업기술센터의 지원에 의하여 수행되었습니다. 또한 본 연구결과의 일부(T-bet assay)는 농림기술관리센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

1. Cha, H.S. (1999) Studies on the Utilization of astringent persimmon. Report of Korea Food Research Institute, pp1-76.
2. Hong, J.S., Chae, K.Y. (2005) Physicochemical characteristics and antioxidant activity of astringent persimmon concentrate by boiling. Korean J. Food Culinary Sci., 21, 709-716
3. Seo, J.H., Jeong, Y.J., Kim, K.S. (2000) Physiological characteristics of tannins isolated from astringent persimmon fruits. Korean J. Food Sci., 32, 212-217

4. Jung, H.S., Jeong, H.S., Lee, J.B., Sung, J.H., Choi, J.U. (2001) Effects of storage conditions on quality change after storage of deastringencied persimmons. Korean J. Food Preserv., 8, 1-8
5. Kang, W.W., Kim, K.Y., Kim, J.K., Oh, S.R. (2000) Quality characteristics of the bread added persimmon leaves powder. Korean J. Food Culinary Sci., 16, 336-341
6. Park, J.Y., Heo, J.C., An, S.M., Yoon, E.Y., Han, S.M., Hwang, J.S., Kang, S.W., Yun, C.Y., Lee, S.H. (2005) High through-put screening of anti-oxidant activity by medicinal insect libraries. Korean J. Food Preserv., 12, 482-488
7. Heo, J.C., Park, J.Y., An, S.M., Lee, J.M., Yun, C.Y., Shin, H.M., Kwon, T.K., Lee, S.H. (2006) Anti-oxidant and anti-tumor activities of Gastrodia elata Blume extracts. Korean J. Food Preserv., 13, 83-87
8. Heo, J.C., Woo, S.W., Kweon, M.A., Park, J.Y., Lee, H.K., Son, M., Rho, J.R. and Lee, S.-H. (2008) Aqueous extract of a seed from *Helianthus annuus* alleviates asthmatic symptoms in vivo. Int. J. Mol. Med., 21, 56-61
9. Woo, K.J., Lee, T.J., Lee, S.H., Jeong, Y.J., Park, J.W., and Kwon, T.K. (2007) Elevated gadd153/chop expression during resveratrol-induced apoptosis in human colon cancer cells. Biochem. Pharmacol., 73, 68-76
10. Woo, S.U. Anti-inflammation activities of *Diospyros kaki* extracts using an atopy-induced animal model and T-bet promoter assay. Feb. 2008. MS thesis, Kyungpook National University, Daegu, Korea.
11. Neis, M.M., Peters, B., Dreuw, A., Wenzel, J., Bieber, T., Mauch, C., Krieg, T., Stanzel, S., Heinrich, P.C., Merk, H.F. (2006) Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol., 118, 930-937
12. Finotto, S. (2008) T-cell regulation in asthmatic diseases. Chem. Immunol. Allergy, 94, 83-92
13. Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., Glimcher, L.H. (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell, 100, 655-669
14. Calcagni, E., Elenkov, I. (2006) Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. Ann. NY Acad. Sci., 1069, 62-76
15. Bellanti, J.A. (1998) Cytokines and allergic diseases: clinical aspects. Allergy Asthma Proc., 9, 337-341
16. Matsumoto, M., Kotani, M., Fujita, A., Higa, S., Kishimoto, T., Suemura, M., Tanaka, T. (2002) Oral administration of persimmon leaf extract ameliorates skin symptoms and transepidermal water loss in atopic dermatitis model mice, NC/Nga. Br. J. Dermatol., 146, 221-227
17. Zheng, Q.L., Nakatsuka, A., Itamura, H. (2006) Involvement of negative feedback regulation in wound-induced ethylene synthesis in 'Saijo' persimmon. J. Agric. Food Chem., 54, 5875-5879

(접수 2008년 6월 25일, 채택 2008년 10월 2일)