

## 포도가지 추출물의 산화방지, 항염증 및 항가려움 효과

조병욱<sup>1,2</sup> · 윤홍화<sup>1</sup> · 체 데니스 창<sup>2</sup> · 김상준<sup>3</sup> · 유 철<sup>4</sup> · 장선일<sup>1,2,5,\*</sup>

<sup>1</sup>(주)아토크엔에이 기업부설연구소, <sup>2</sup>전주대학교 보건관리학과, <sup>3</sup>(재)전주농생명소재연구원,  
<sup>4</sup>(주)향미원, <sup>5</sup>전주대학교 농생명치유산업연구소

### Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-pruritic effects of grape branch extract

Byoung Ok Cho<sup>1,2</sup>, Hong Hua Yin<sup>1</sup>, Denis Nchang Che<sup>1</sup>, Sang Jun Kim<sup>3</sup>, Cheol Ryu<sup>4</sup>, and Seon Il Jang<sup>1,2,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Research Institute, Ato Q&A Corporation

<sup>2</sup>Department of Health Care & Science, Jeonju University

<sup>3</sup>Jeonju AgroBio-Materials Institute

<sup>4</sup>Hyangmiwon Corporation, Gimje

<sup>5</sup>Agro-Bio Institute, Jeonju University

**Abstract** This study was designed to investigate the antioxidant activities of the ethanol extracts (GBE) of grape branches (Campbell Early). The total polyphenol and flavonoid content of GBE was 201.42±4.16 and 11.85±0.44 mg GAE/g, respectively. The antioxidant activity of GBE was measured using the ABTS and DPPH assays, and the IC<sub>50</sub> values were 45.60±0.09 and 299.13±0.22, respectively. GBE inhibited the production of pro-inflammatory mediators (NO, iNOS, PGE<sub>2</sub>, COX-2, IL-1β, and IL-6) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages in a dose-dependent manner. Moreover, GBE treatment significantly suppressed the production of TNF-α and IL-6 cytokines in phorbol 12-myristate 13-acetate plus calcium ionophore A23187-stimulated HMC-1 human mast cells. Furthermore, the administration of GBE markedly inhibited the scratching behavior induced by the compound 48/80 in ICR mice. These results suggested that GBE has potential as a therapeutic agent against inflammation and itch-related skin diseases.

**Keywords:** Grape branch, antioxidant, anti-inflammation, mast cells, scratching behavior

## 서 론

최근 산업화된 나라는 환경오염과 생활방식의 변화에 따른 아토피 피부염과 같은 알레르기성 피부질환이 급증하고 있다(1). 이러한 알레르기성 아토피 피부염은 과도한 면역세포 작용으로 인해서 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor-α, TNF-α), 인터류킨-1베타(interleukin-1β, IL-1β), 인터류킨-6(IL-6) 등 일련의 전염증성 사이토카인(2)을 생산하게 되어 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical, ·OH), 과산화음이온(superoxide anion, O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 과산화수소(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 이산화질소(nitrogen dioxide, NO<sub>2</sub>), 삼산화이질소(dinitrogen trioxide, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 등 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)을 대량 생산하기 때문에 주변 조직의 손상을 야기한다(3,4). 특히 산화질소(nitric oxide, ·NO)와 O<sub>2</sub>가 함께 반응할 경우 매우 반응성이 높은 reactive oxidant peroxy nitrite anion (ONOO<sup>-</sup>)을 생산하여 심각한 조직손상을 야기한다(5). 이러한 활성산소종과 활

성질소종은 생체가 정상적인 상태라면 체내에 존재하는 초과산화제거효소(superoxide dismutase, SOD), 카탈레이스(catalase), 글루타치온 과산화효소(glutathione peroxidase) 등과 같은 산화방지 효소와 글루타치온(glutathione), 비타민 E 등과 같은 산화방지 물질에 의하여 제거된다. 그러나 체내에서 과도하게 염증반응이 진행된다면, 체내에 존재하는 산화방지 물질이 고갈되어 효과적으로 활성산소종과 활성질소종을 제거하는데 실패할 수 있다. 그러므로 염증을 동반하는 아토피 피부염과 같은 피부질환을 개선하기 위해서는 활성산소종과 활성질소종을 효과적으로 제거할 수 있는 산화방지 물질의 발굴이 필요하다(6).

포도는 안토시아닌(anthocyanin), 카테킨(catechin), 퀘세틴(quer-cetin) 및 레스베라트롤(resveratrol) 등의 폴리페놀을 다량 함유하고 있다(7). 특히 포도에 함유되어 있는 레스베라트롤은 외부환경으로부터 자신을 보호하기 위해 스스로 생성하는 저분자 파이토케미칼(phytochemical)의 일종으로 노화 방지(8), 항암(9), 항당뇨(10) 효과가 있을 뿐만 아니라 동맥경화 예방(11) 및 혈행 개선(12)에도 효과가 있는 것으로 알려지면서 이 분야의 연구자들에게 주목받고 있다.

현재 우리나라에서 재배되고 있는 포도는 미국종(*Vitis labrusca* L.), 유럽종(*Vitis vinifera* L.) 및 이들 상호 간의 교잡종(*Vitis labruscana* L.) 등 3종으로 크게 나눌 수 있는데, 구미지역에서 도입한 품종은 대부분 도태되었고, 1909년에 도입한 캠벨어얼리(Campbell Early) 품종이 우리나라 환경에 가장 잘 적응하여 가

\*Corresponding author: Seon Il Jang, Research Institute, Ato Q&A Corporation, Jeonju, Jeonbuk 55069, Korea  
E-mail: sonjjang@ij.ac.kr  
Tel: 82-63-220-3124  
Fax: 82-63-220-2054  
Received June 7, 2016; revised July 7, 2016;  
accepted July 7, 2016

장 많이 재배된 품종이다. 최근 캠벨어얼리를 비롯한 5가지 포도 품종에서 부위별 추출물의 폴리페놀 함량과 산화방지 활성을 조사한 바 있는데(13), 캠벨어얼리의 포도가지 추출물에는 다른 부위 추출물보다 레스베라트롤 함량이 가장 높을 뿐만 아니라 다른 품종의 포도가지 추출물보다 그 함량이 높은 것으로 알려졌다. 그러나 캠벨어얼리의 포도가지 추출물을 대상으로 항염증과 가려움증 억제에 대한 연구는 없는 실정이다.

그러므로 본 연구는 캠벨어얼리의 포도가지 추출물을 대상으로 자체의 산화방지 효능을 검증 한 후 활성화된 설치류 유래 큰 포식세포인 RAW 264.7 세포와 인간 유래 비만세포인 HMC-1 세포에서 항염증 효과를 검증하고 ICR계 마우스를 대상으로 가려움 억제에 대한 효능을 조사하여 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 추출물 재료

본 실험에 사용된 캠벨어얼리 포도가지는 전라북도 김제시 백구면 여씨포도농장에서 2015년 11월 11일에 구입하였다. 구입한 재료는 수도물에서 잘 세척한 다음 증류수에 간단히 침지시켜 불기를 제거한 후 40°C 건조기에서 충분히 건조하였다. 건조된 포도가지는 분쇄하여 각각 400 g으로 정량한 후 80% 에탄올 용액을 8,000 mL을 주입하고 3일간 상온에서 방치하고 1시간 초음파 추출하였다. 각 추출용액은 3,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 취한 다음 0.45 µm 필터를 사용하여 여과하고 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 회수한 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 시약 재료

프로스타글란딘(Prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>), 중앙괴사인자-알파, 인터류킨-6, 인터류킨-1베타 ELISA kit는 R&D systemes사(Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. 1차 항체 iNOS는 BD Pharmingen사(San Diego, CA, USA)에서, COX-2는 Cayman Chemical 사(Ann Arbor, MI, USA)로부터 구입하였고, 베타액틴(β-actin)과 2차 항체 goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. 갈산(Gallic acid), 퀘세틴, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 그리스 시약(Griess reagent)과 지방질다당류(lipopolysaccharide, LPS), NP40 cell lysis buffer, protease inhibitor cocktail, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), calcium ionophore A23187 및 기타 분석급 시약은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

### 총 폴리페놀(Total polyphenol)

총 폴리페놀은 폴린-시오칼토(Folin Ciocalteu) 법(14)에 따라서 정량하여 나타내었다. 포도가지추출물 0.5 mL 또는 갈산(standard polyphenolic compound)를 0.2 M의 폴린-시오칼토 시약(5 mL)와 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 mL)을 넣고 잘 혼합한 뒤 15분 후 흡광도 765 nm에서 측정하였다. 표준곡선(standard curve)는 갈산을 사용하여 31.25-1000 µg/mL 농도로 제조한 후 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 보정선으로부터 시료 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

### 총 플라보노이드 함량(Total flavonoid content)

총 플라보노이드는 Moreno 등(15)의 방법에 따라 1 mg/mL 농

도의 시료액에 10% 질산알루미늄(aluminum nitrate) 0.1 mL, 1 M 아세트산포타슘(potassium acetate) 0.1 mL 및 에탄올(ethanol) 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 방치한 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 퀘세틴을 표준물질로 하여 0-100 µg/mL 농도 범위에서 얻은 표준 보정선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

### DPPH 라디칼(radical) 소거 활성 측정

DPPH 라디칼 소거 활성은 Blois(16)의 방법으로 측정하였다. 포도가지 추출물을 500 µg/mL로 정량하여 증류수에 녹여 96 well plate에 각 시료를 100 µL를 주입하고, 동시에 0.3 mM DPPH 100 µL를 넣어 실온에서 20분간 반응시킨 후 ELISA 판독기(reader)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

#### DPPH 라디칼 소거 활성(%)

$$= \{1 - (\text{첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도})\} \times 100$$

### ABTS 라디칼(radical) 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등(17)의 방법에 의하여 측정하였다. ABTS 7.4 mM과 과황산칼륨(potassium persulphate) 2.6 mM을 혼합한 다음 암소에서 24시간 동안 방치하여 라디칼을 형성한 다음 ABTS 용액을 실험직전에 732 nm에서 흡광도가 0.70±0.03(평균 ±표준오차)이 되도록 메탄올로 희석하여 사용하였다. 추출물의 최종 농도가 500 µg/mL 되도록 정량하여 50 µL에 준비된 ABTS 용액 950 µL를 첨가하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS의 소거활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

#### ABTS 라디칼 소거 활성(%)

$$= \{1 - (\text{첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도})\} \times 100$$

### 세포배양

본 실험에 사용된 세포는 마우스 유래 큰포식세포주인 RAW 264.7 세포로 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 10% FBS (fetal bovine serum, Life Technology, Carlsbad, CA, USA)와 100 units/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Life Technology) 배지를 사용하였고, 인간유래 비만 세포주인 HMC-1 세포는 10% FBS와 glutamax가 첨가된 IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium, Life Technology) 배지를 사용하여 각각 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 산화질소(NO) 분석(assay)

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 최종농도가 2×10<sup>5</sup> cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양한 후 25, 50, 75, 100 µg/mL의 포도가지추출물을 처리한 다음 1시간 후 지방질다당류 (1 µg/mL)를 처리하여 16시간 배양하였다. 세포배양액 100 µL와 그리스시약 100 µL를 혼합하여 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 마이크로플레이트 판독기(Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 질산나트륨(sodium nitrate)으로 표준곡선을 작성하여 산화질소 생성량을 산출하였다.

### ELISA 분석

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 최종농도가  $2 \times 10^5$  cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양한 후 25, 50, 75, 100 µg/mL의 포도가지추출물을 처리한 다음 1시간 후 지방질다당류(1 µg/mL)를 처리하여 16시간 배양하였다. 세포배양 상층액을 취하여 프로스타글란딘 E<sub>2</sub>, 인터류킨-6, 인터류킨-1베타 cytokine의 생산량 측정은 R&D systemes (Minneapolis, MN, USA)사에서 구입한 ELISA kit를 사용하여, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다. 또한 HMC-1 세포를 6 well plate에 최종농도가  $5 \times 10^5$  cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양한 후 25, 50, 75, 100 µg/mL의 포도가지추출물을 처리한 다음 1시간 후 PMA (30 nM)와 A23187 (1 µM)로 동시에 자극하고 16시간 후에 세포 상층액으로부터 중앙괴사인자-알파와 인터류킨-6에 대한 ELISA kit를 활용하여 R&D system사가 제공하는 방법으로 중앙괴사인자-알파와 인터류킨-6을 측정하고 정량하였다.

### 총 단백질 추출(Total protein extraction)

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 최종농도가  $2 \times 10^5$  cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양한 후 25, 50, 75, 100 µg/mL의 포도가지추출물을 처리하였다. 1시간 후 지방질다당류(1 µg/mL)를 처리하여 16시간 배양한 후, PBS로 세척하고 세포를 원심분리 하여 얻은 pellet에 NP40 cell lysis buffer를 첨가하여 얼음에 30분 동안 배양 후 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었고, Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 시약을 사용하여 단백질을 정량하였다.

### 웨스턴블롯(Western blot)

단백질 50 µg을 sample buffer와 섞어 100°C에서 5분간 끓인 후, 10% SDS-PAGE로 분리한 다음, PVDF 막(membrane)으로 옮긴 뒤 5% 탈지우유(skim milk)에서 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체(iNOS, COX-2, 베타액틴)는 4°C에서 overnight 시킨 후 TBS-T (tris-buffered saline and tween-20) 완충용액(buffer)으로 10분간 3회 세척하였고, 2차 항체는 1:5,000으로 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. TBS-T로 10분간 3회 세척한 후 PVDF 막에 ECL (Pierce Biotechnology) 시약을 처리하여 측정하였다.

### 실험동물

무균환경에서 사육된 4주령의 수컷 ICR 마우스는 중앙실험동물(주)(Seoul, Korea)에서 구입하였고, 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 낮과 밤의 주기를 12시간씩 하였고, 온도(20-22°C)와 습도(50-60%)는 일정하게 유지하였으며, 전주대학교 실험동물위원회의 규정에 준하여 실험하였다.

### 가려움증 억제 효과

포도가지추출물의 가려움증 억제 효과를 확인하기 위하여 ICR 마우스를 실험군당 5마리씩 각각 투명 아크릴 케이지(20×26×13 cm)에 한마리씩 넣고, 30분 동안 동일 환경에서 방치하여 안정시켰다. 그 후 대조군으로서 생리식염수를 경구투여 하였고, 실험군으로서 포도가지 추출물을 50 mg/kg, 양성대조군으로 프레드니솔론(prednisolone) 5 mg/kg씩 경구투여하고, 60분 후에 compound 48/80을 50 µg/site 농도로 0.1 mL씩 마우스 등의 양쪽 어

깨 사이 높이에 피하주사(s.c.injection) 하여 가려움증을 유발하였다. 가려움증 유발물질을 주사한 마우스는 곧바로 Mihara의 방법(18)을 따라 micro-camera (ONCCTV, Seoul, Korea)를 사용하여 60분 동안 녹화하였으며, 뒷발로 가려움증 유발물질이 주입된 부위를 굽는 횟수를 이중맹검법으로 계수하여 평가하였다.

### 플라보노이드 화합물의 HPLC 분석

분석을 위한 검액을 제조하기 위해 포도가지 추출물을 취하여 70% 메탄올수용액(MeOH aqueous solution, v/v)을 이용하였다. 원심분리 후 상층액을 0.45 µm filter로 여과하고 검액으로 사용하였다. HPLC 분석기기는 Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며, column은 AegisPak C18 (4.6×150 mm, 3 µm pore size), 온도는 35°C로 하였다. 검출기는 Agilent DAD를 사용하였고, 파장(wavelength)은 260 nm로 하였다. 유속은 0.5 mL/min, 15 µL를 injection volume으로 설정하였다. 이동상은 0.1% 폼산(formic acid) 수용액(A)과 아세토나이트릴(acetonitrile) (B)로 20% B-5 min, 30% B-12 min, 60% B-20 min, 80% B-30 min, 80% B-34 min, 60% B-37 min, 20% B-40 min까지 기울기(gradient) 조건으로 분석하였다. 외부표준물질(External standard)는 트랜스-레스베라트롤(trans-resveratrol), 케세틴(querctetin), 루틴(rutin)을 사용하였으며, 각 표준물질의 정성 및 정량은 머무름시간(retention time)과 고유의 표준품과 비교하여 보정선으로부터 추출물의 함량 결과를 얻었다.

### 통계분석

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 대조군과 실험군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Microsoft Excel program의 Student's *t*-test를 사용하여 실시하였으며, 조사 항목들 간의 유의성 검증은  $p < 0.05$  수준에서 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 포도가지 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

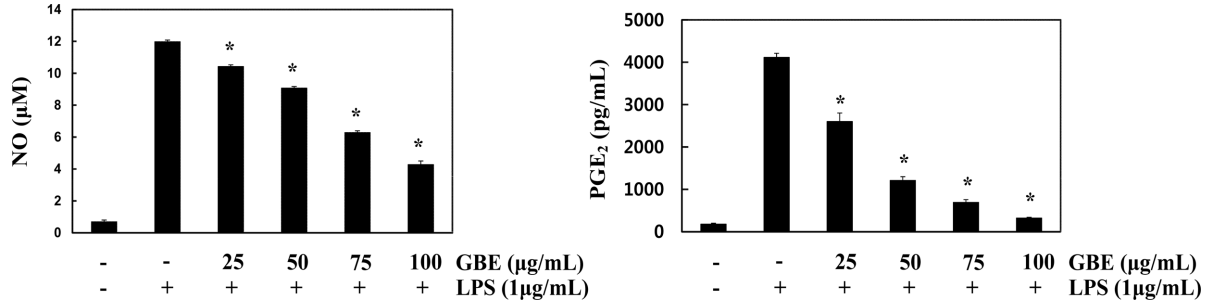
포도가지 추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 분석하여 Table 1에 나타내었다. 그 결과 포도가지 추출물(GBE)의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 201.42±4.16 mg/g과 11.85±0.44 mg/g을 나타내었다. 최근 Chang 등(13)에 의하면 캠벨어얼리 포도가지 추출물의 총 폴리페놀 함량이 22.12±0.62 mg/g으로 보고하였으며, 본 연구 결과가 약 9.1배 더 높은 함량을 나타내었다.

### 포도가지 추출물의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능

항산화 활성을 평가하는 방법으로 DPPH와 ABTS를 이용하여 확인하였다. 캠벨어얼리 포도가지 추출물의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 알아본 결과 Table 1에 나타낸 바와 같이 DPPH 라디칼 소거 활성 IC<sub>50</sub>은 45.60±0.09 µg/mL을 나타내었고, ABTS 라디칼 소거 활성 IC<sub>50</sub>은 299.13±0.22 µg/mL을 나타내었다. Kim 등(19)에 따르면 캠벨어얼리 품종의 포도 잎에서 산화방지 효능을 측정된 결과, DPPH 소거능이 125 µg/mL의 농도에서 전엽기에서 성숙기까지 약 59.9%에서 73.3%를 나타내었고, ABTS 소거능은 2 mg/mL의 농도에서 38.0%에서 61.5%까지 나타내었다. 이러한 결과와 비교해 볼 때 겨울에 전정 시 버려지는 포도가지의 효능이 더욱 우수한 것을 나타내므로 부산물로서 포도가지를 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

**Table 1. Total polyphenol, total flavonoid content of GBE and DPPH, ABTS radical-scavenging activities**

Sample	Total polyphenol (mg GAE/g)	Total flavonoid (mg QE/g)	DPPH (IC <sub>50</sub> )	ABTS (IC <sub>50</sub> )
grape branch extract	201.42±4.16	11.85±0.44	45.60±0.09	299.13±0.22



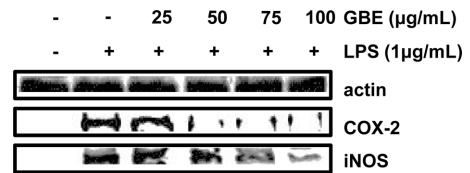
**Fig. 1. Effect of GBE on NO and PGE<sub>2</sub> production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. \*p<0.01 vs. LPS.**

**포도가지 추출물의 산화질소 및 프로스타글란딘 E<sub>2</sub> 생성 억제 효과**

포도가지 추출물이 산화질소 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 포도가지 추출물(0, 25, 50, 75, 100 µg/mL)을 농도별로 처리하고 1시간 후에 지방질다당류(1 µg/mL)로 자극하여 16시간 배양한 다음 산화질소 및 프로스타글란딘 E<sub>2</sub> 생성량을 확인하였다 (Fig. 1). 그 결과 지방질다당류를 처리한 군에서 산화질소 및 프로스타글란딘 E<sub>2</sub> 생성량이 무처리군과 비교하여 크게 증가하였지만, 포도가지 추출물을 전처리한 군에서는 지방질다당류 처리군과 비교하여 산화질소 및 프로스타글란딘 E<sub>2</sub> 생성량이 농도 의존적으로 감소하였으며, 프로스타글란딘 E<sub>2</sub> 생성 억제 효능이 매우 우수하였다. 산화질소는 반응성이 높은 생체 가스로 산화질소 합성효소(synthase)에 의해 L-arginine으로부터 생성되어지며, 빠르게 산화되면서 활성질소종을 유도하면서 염증반응을 더욱 가속시켜 조직손상을 야기한다(20). 또한 프로스타글란딘 E<sub>2</sub>는 cyclooxygenase-2 (COX-2)로부터 생산되어 염증반응에 관여하는 매개물로 작용한다(21). 그러므로 본 연구결과 산화질소, 프로스타글란딘 E<sub>2</sub>와 같은 염증 매개물을 억제하는데 있어 캬뵐어얼리 포도가지 추출물은 산화질소 및 프로스타글란딘 E<sub>2</sub> 억제를 통하여 염증반응을 제어할 수 있을 것으로 사료된다. 지금까지 포도를 비롯한 포도씨, 포도 껍질, 포도 잎 등을 활용한 추출물 및 폴리페놀 성분이 세포 및 동물 실험에서 산화질소, 프로스타글란딘 E<sub>2</sub>, COX-2, 종양괴사인자-알파 같은 염증 인자들을 억제함으로써 우수한 항염 효능을 보인다고 보고되었다(22-26). 이러한 결과와 비교해 볼 때 포도가지 추출물은 항염증 효능이 뛰어난 소재라 생각되며, 향후 활용가치가 우수한 소재라 판단된다.

**포도가지 추출물의 iNOS 및 COX-2 발현 억제 효과**

다음은 캬뵐어얼리 포도가지 추출물이 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제를 통하여 산화질소와 프로스타글란딘 E<sub>2</sub> 생성을 억제하는지 알아보기 위하여 웨스턴블롯을 수행하였다. 그 결과 Fig. 2에 보이는 것처럼, 지방질다당류를 처리한 군에서 iNOS와 COX-2의 발현양이 무처리군과 비교하여 크게 증가하였지만, 포도가지 추출물을 처리한 군에서는 지방질다당류 처리군과 비교하여 iNOS와 COX-2의 발현양이 농도 의존적으로 뚜렷한 감소 효능을 보였으며, 이것은 산화질소와 프로스타글란딘 E<sub>2</sub> 생성 억제 효과와 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 포도가지 추출물 처리 시 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제를 통하여 산화질소와 프

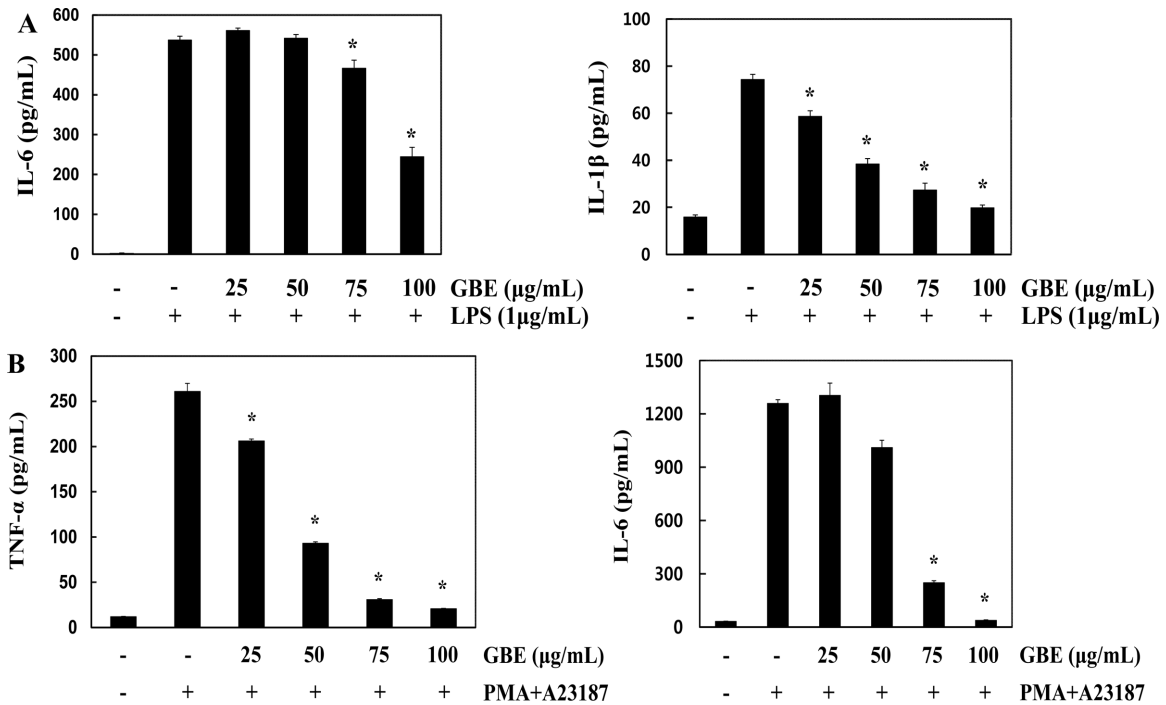


**Fig. 2. Effect of GBE on iNOS and COX-2 production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.**

로스타글란딘 E<sub>2</sub> 생성을 억제함으로써 항염증 효능을 나타내는 것으로 사료된다. 생체에서 iNOS는 nNOS와 eNOS와 달리 면역반응에서 많은 양의 산화질소를 생성시키는 효소로 알려져 있으며(20), COX-2도 COX-1과 달리 염증반응에 프로스타글란딘 E<sub>2</sub>를 대량으로 생산할 수 있는 유도성 효소로 작용한다(27). 그러므로 iNOS와 COX-2 발현의 억제는 산화질소 및 프로스타글란딘 E<sub>2</sub>의 생성 억제로 이어지기 때문에 이들의 제어는 염증반응을 제어하는 데 효과적이다. 따라서 본 연구에서 포도가지 추출물은 이들 분자 발현을 효과적으로 제어할 수 있는 우수한 소재라 판단된다.

**포도가지 추출물의 염증성 사이토카인 생성 억제 효과**

포도가지 추출물을 처리할 경우 종양괴사인자-알파, 인터류킨-6, 인터류킨-1베타 같은 전염증성 인자의 생성을 억제하는지 알아보기 위하여 포도가지 추출물(0, 25, 50, 75, 100 µg/mL)을 농도별로 처리하고 1시간 후에 지방질다당류(1 µg/mL) 또는 PMA (30 nM)와 A23187 (1 µM)로 동시에 자극하고 16시간 배양한 다음 상층액을 얻어 ELISA 분석을 수행하여 알아본 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 Fig. 3A에 보이는 것처럼 RAW 264.7 세포에서 지방질다당류를 처리한 군에서 인터류킨-6와 인터류킨-1 베타 사이토카인 생성양이 무처리군과 비교하여 크게 증가하였지만, 포도가지 추출물을 농도별로 처리하였을 경우 지방질다당류에 의해 증가한 인터류킨-6, 인터류킨-1베타 사이토카인을 억제하였고, 인터류킨-1베타 사이토카인 억제 효능이 보다 더 낮은 농도에서 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 3B에 나타난 바와 같이 HMC-1 세포에서 PMA와 A23187 처리군과 비교하여 포도가지 추출물이 처리된 경우 종양괴사인자-알파와 인터류킨-6 사이토카인 생성을 억제하였으며, 종양괴사인자-알파 사이토카인 억제 효능이 보다 더 우수한 것을 확인할 수 있었다.

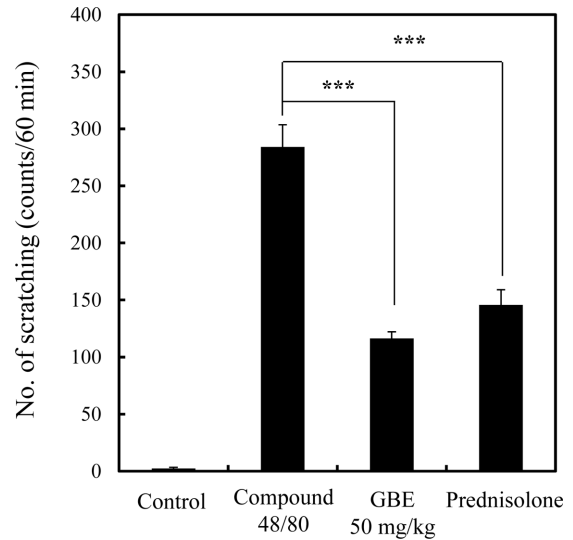


**Fig. 3.** Effect of GBE on IL-6, IL-1β levels in LPS-stimulated RAW 264.7 cells (A). \**p*<0.01 vs. LPS. Effect of GBE on TNF-α and IL-6 in PMA/A23187 stimulated HMC-1 human mast cells (B). \**p*<0.01 vs PMA/A23187.

종양괴사인자-알파, 인터류킨-1베타 및 인터류킨-6는 큰포식세포와 CD4<sup>+</sup> 세포 중 Th1 세포에서 생성되는 전염증성 사이토카인으로 아토피 피부염을 가속화시켜 활성산소종과 활성질소종 등 산화적 스트레스 물질을 대량생산하여 주변 조직을 파괴한다(28-30). 이러한 전염증성 사이토카인의 억제는 급성 및 만성 염증을 억제하는데 효과적이다. 그러므로 본 연구에서 얻은 캠펠포도가 지 추출물은 활성화된 큰포식세포에서 종양괴사인자-알파, 인터류킨-1베타 및 인터류킨-6를 효과적으로 제어할 수 있는 우수한 천연물 소재라 판단된다.

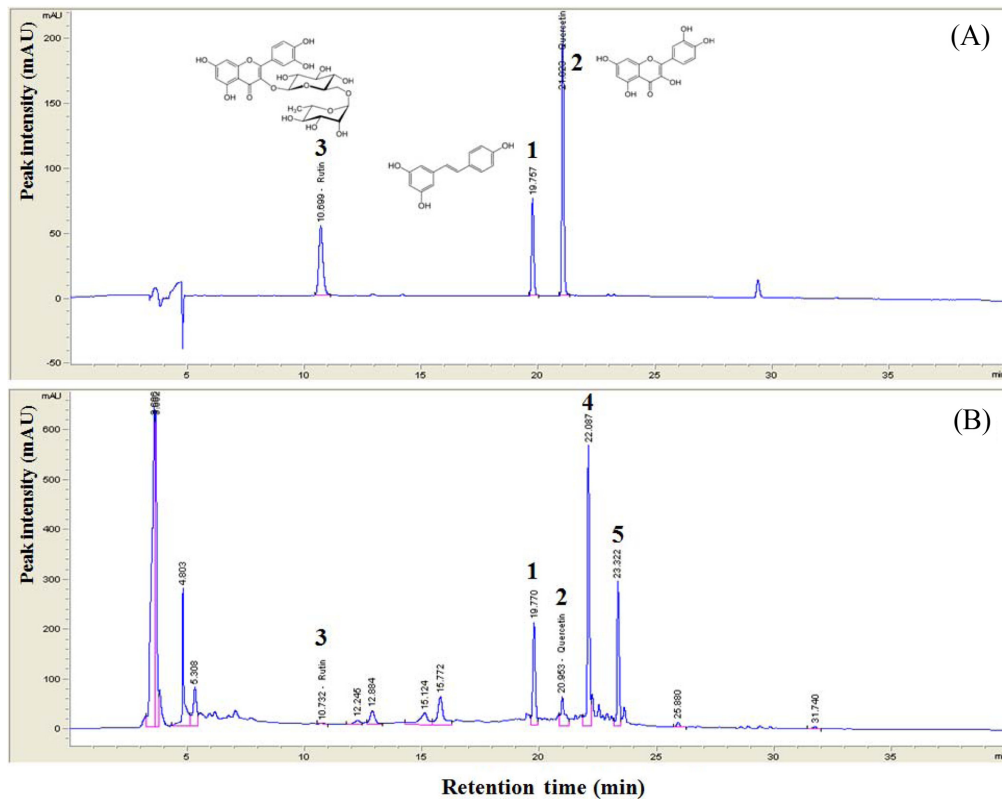
**포도가지 추출물의 가려움증 억제 효과**

아토피 피부염은 만성 피부염증과 함께 심한 가려움증(pruritus)을 동반한다(28). 가려움증은 히스타민과 같은 가려움 매개 물질에 의해서 유도되는데, 정상인의 경우 긁으면 그 증상이 쉽게 완화되지만, 아토피 환자의 경우 긁으면 긁을수록 더욱 긁고 싶은 감정이 형성되어 심하게 긁게 되어 피부장벽 붕괴를 통한 2차 감염을 유발하여 염증반응을 더욱 악화시킨다. 그러므로 아토피 피부염을 개선하는 데는 효과적으로 가려움증을 억제해야 한다(31,32). 본 연구는 포도가지 추출물이 피부 가려움증 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 포도가지 추출물(50 mg/kg body weight (BW))과 프레드니솔론(10 mg/kg BW)을 ICR 마우스에 경구 투여하고 1시간 후에 가려움 유발 물질을 마우스 등의 양쪽 어깨 높이 사이에 피하 주사하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 compound 48/80을 피하에 주입한 실험군은 284.1±19.4회/60분으로 정상 대조군(2.4 ±1.0회/60분)에 비해서 긁는 횟수가 현저히 증가하였다(*p*<0.001). 그러나 포도가지 추출물을 처리한 실험군은 compound 48/80이 유도하는 가려움증을 억제하는 효과가 매우 우수하였으며, compound 48/80이 유도하는 가려움 횟수가 116.4±5.7/60분으로 약 41% 억제 효과가 있었다(*p*<0.001). 항가려움증 효과가 우수한 약물로 알려진 프레드니솔론(145.8±13.2회/60



**Fig. 4.** Anti-pruritic effects of GBE on the scratching behavior induced by compound 48/80 in ICR mice. GBE (50 mg/kg) and prednisolone (10 mg/kg) were treated 1 hr before compound 48/80 (50 μg/site) treatment. The scratching of the injected site by the hind paw was counted for 60 min. Values represent the means±SD of 5 individuals. #*p*<0.001 versus normal group. \*\*\**p*<0.001 versus compound 48/80 alone control group.

분)과 비교하였을 때 포도가지 추출물의 효과는 프레드니솔론 보다 효과가 높았다. 앞으로 포도가지 추출물을 대상으로 가려움 억제에 대한 분자적 기전을 규명할 필요가 있으며, 본 연구 결과 포도가지 추출물의 우수한 항가려움증 효과는 아토피 피부질환과 같은 피부 가려움증에 사용될 수 있는 매우 우수한 소재라 판단된다.



**Fig. 5. Representative HPLC chromatogram of standard compounds (A) and ethanol extract of grape branch extract (B).** Each sample was eluted by AegisPak C18 (4.6×150 mm, 3 μm pore size) and scanned from UV 254 to 370 nm. Peaks: 1, *trans*-resveratrol; 2, quercetin; 3, rutin

#### 포도가지 추출물에서 플라보노이드 화합물 레스베라트롤과 퀘세틴의 정량

마지막으로 캠벨어일리 포도가지에 함유되어 있는 염증억제 활성 물질을 검증하고자 HPLC를 이용하였으며 각 시료의 주요 성분들에 대한 크로마토그램(chromatogram) 결과는 다음과 같이 제시하였다. 분석 시료의 추출물 분석에 사용한 표준성분으로서 루틴(3)은 표준용액에서 머무름시간(min)이 약 10.7분에 검출되었으며, 트랜스-레스베라트롤(1)은 약 19.8분에, 퀘세틴(2)은 약 21.0분에 검출되었다. 포도가지추출물에서의 성분 검출에 대한 HPLC 크로마토그램은 Fig. 5에서 나타났다. 해당 성분에 대한 분석 결과 루틴(3)은 검출되지 않았으며, 각 성분별 함량(μg/g)은 Table 2에서 제시하였다. 포도가지 추출물에서 트랜스-레스베라트롤 함량은 898.18 μg/g이었으며, 퀘세틴 함량은 130.60 μg/g으로 확인되었다. 최근 Chang 등(13)은 캠벨어일리의 레스베라트롤 함량을 부위별로 조사한 결과 포도가지에 함유된 레스베라트롤의 함량이 63.99±1.79 μg/g으로 과피, 씨, 잎 및 송이가지 보다 매우 높고 다른 품종의 포도가지 추출물보다 레스베라트롤 함량이 매우 높은 것으로 보고하였다. 그러나 본 연구결과는 약 14배 레스베라트롤 함량이 높은 것으로 확인되었다. 이러한 결과들을 종합하면 플라보노이드류 성분이 다량 포함된 포도가지 추출물은 산화방지, 항염증 및 가려움증 억제 효능이 우수할 것으로 추측할 수 있다. 본 연구에서 함량 분석에 사용된 플라보노이드류 화합물 이외에 포도가지 추출물의 주성분으로 확인된 4번과 5번 peak는 HPLC 상에서 주요 성분으로서 추가 연구를 통해 분리정제 및 구조 동정을 해야 할 필요성이 제기되었다.

**Table 2. Contents (μg/g) of the standard compounds in grape branch extract**

Sample	Final results <sup>†</sup> (μg/g)		
	1	2	3
grape branch extract	898.18	130.60	N.C.

<sup>†</sup>: The concentration was expressed as free form.

1: *trans*-resveratrol; 2: quercetin; 3: rutin; N.C.: not calculated.

## 요 약

본 연구에서는 우리나라에서 가장 많이 재배되고 있는 캠벨어일리 포도 품종에서 포도가지를 대상으로 산화방지, 항염증 및 항가려움증 효과를 검증하고 활성물질을 나타내는 지표물질을 추적 조사하였다. 그 결과 포도가지 추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 각각 201.42±4.16과 11.85±0.44 mg GAE/g으로 조사되었다. 또한 캠벨어일리 포도가지 추출물의 ABTS와 DPPH 라디칼 소거 활성은 각각 45.60±0.09 (IC<sub>50</sub>)과 299.13±0.22 (IC<sub>50</sub>)으로 나타나 산화방지 활성이 우수하였다. 게다가 캠벨어일리 포도가지 추출물은 지방질다당류로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 전염증성 매개물인 산화질소와 프로스타글란딘 E<sub>2</sub>를 iNOS와 COX-2 분자 발현 억제를 통하여 억제하였고, 전염증성 사이토카인인 인터류킨-1베타와 인터류킨-6를 농도 의존적으로 억제하는 효능이 있었다. 더욱이 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 calcium ionophore A23187로 활성화된 인간 유래 비만세포인

HMC-1 세포에서 종양괴사인자-알파와 인터류킨-6를 농도 의존적으로 억제하는 효능이 있었다. 마지막으로 Compound 48/80으로 유도되는 마우스 가려움증을 캄벨어일리 포도가지 추출물은 효과적으로 억제하였다. 이러한 캄벨어일리 추출물에서 활성을 나타내는 물질을 추적한 결과 레스베라트롤의 함량이 높게 검출되었다. 그러므로 본 연구의 결과를 종합해 볼 때 캄벨어일리 포도가지 추출물은 아토피 질환에서 나타나는 염증과 가려움증을 효과적으로 제어할 수 있는 효과적인 소재임을 제시하였다.

## 감사의 글

본 연구는 2015년도 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역주력산업육성사업 창의융합R&D(과제번호: R0004345)으로 수행된 연구결과입니다.

## References

- Finlay AY. Quality of life in atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45: S64-S66 (2001)
- Shishido T, Nozaki N, Takahashi H, Arimoto T, Niizeki T, Koyama Y, Abe J, Takeishi Y, Kubota I. Central role of endogenous Toll-like receptor-2 activation in regulating inflammation, reactive oxygen species production, and subsequent neointimal formation after vascular injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345: 1446-1453 (2006)
- Okayama Y. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 4: 517-519 (2005)
- Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J. Invest. Dermatol.* 126: 2565-2575 (2006)
- Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB, Laval F, Nims RW, Laval J, Cook J, Pacelli R, Liebmann J, Krishna M, Ford PC, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Regulation and protective and toxic mechanisms. *Curr. Top. Cell Regul.* 34: 159-187 (1996)
- Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants-double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid. Med. Cell Longev.* 3: 228-237 (2010)
- Iacopini P, Baldi M, Storchi P, Sebastiani L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. *J. Food Compos. Anal.* 21: 589-598 (2008)
- Baxter RA. Anti-aging properties of resveratrol: Review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *J. Cosmet. Dermatol.* 7: 2-7 (2008)
- Bishayee A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: From rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev. Res.* 2: 409-418 (2009)
- Lee SM, Yang H, Tartar DM, Gao B, Luo X, Ye SQ, Zaghouni H, Fang D. Prevention and treatment of diabetes with resveratrol in a non-obese mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 54: 1136-1146 (2011)
- Azorin-Ortuno M, Yanez-Gascon MJ, Pallares FJ, Rivera J, Gonzalez-Sarrias A, Larrosa M, Vallejo F, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan F, Espin JC. A dietary resveratrol-rich grape extract prevents the developing of atherosclerotic lesions in the aorta of pigs fed an atherogenic diet. *J. Agr. Food Chem.* 60: 5609-5620 (2012)
- Kang HJ, Kim HS, Jeon IH, Mok JY, Han KS, Jang SI. Effects of antioxidant and blood flow improvement of grape leaf extract and resveratrol from vitis romaneti. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1736-1743 (2013)
- Chang EH, Jeong SM, Park KS, Lim BS. Contents of phenolic compounds and trans-resveratrol in different parts of Korean new grape cultivars. *Korean J. Food Sci. Technol.* 45: 708-713 (2013)
- Blainski A, Lopes GC, de Mello JC. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 18: 6852-6865 (2013)
- Moreno DA, Carvajal M, Lopez-Berenguer C, Garcoa-Viguera C. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41: 1508-1522 (2006)
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200 (1958)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Mihara K, Kuratani K, Matsui T, Nakamura M, Yokota K. Vital role of the itch-scratch response in development of spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *Br. J. Dermatol.* 151: 335-345 (2004)
- Kim JH, Choi SK, Yu YS, Yoon KS, Seo JS. Physiologically active components and antioxidant capacity of grapevine leaves at growth stages. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 772-778 (2012)
- Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* 1: 1397-1406 (2001)
- Giroux M, Descoteaux A. Cyclooxygenase-2 expression in macrophages: Modulation by protein kinase C-alpha. *J. Immunol.* 165: 3985-3991 (2000)
- Marchi P, Paiotti AP, Artigiani Neto R, Oshima CT, Ribeiro DA. Concentrated grape juice (G8000™) reduces immunorexpression of iNOS, TNF-alpha, COX-2 and DNA damage on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced-colitis. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37: 819-827 (2014)
- Bak MJ, Truong VL, Kang HS, Jun M, Jeong WS. Anti-inflammatory effect of procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013: 409321 (2013)
- Filip GA, Postescu ID, Bolfa P, Catoi C, Muresan A, Clichici S. Inhibition of UVB-induced skin phototoxicity by a grape seed extract as modulator of nitrosative stress, ERK/NF-kB signaling pathway and apoptosis, in SKH-1 mice. *Food Chem. Toxicol.* 57: 296-306 (2013)
- Yoon CS, Kim DC, Ko WM, Kim KS, Lee DS, Kim DS, Cho HK, Seo J, Kim SY, Oh H, Kim YC. Anti-neuroinflammatory effects of quercetin-3-O-glucuronide isolated from the leaf of *Vitis labruscana* on LPS-induced neuroinflammation in BV2 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* 45: 17-22 (2014)
- Greenspan P, Bauer JD, Pollock SH, Gangemi JD, Mayer EP, Ghaffar A, Hargrove JL, Hartle DK. Antiinflammatory properties of the muscadine grape (*Vitis rotundifolia*). *J. Agr. Food Chem.* 53: 8481-8484 (2005)
- Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E<sub>2</sub>. *J. Immunol.* 188: 21-28 (2012)
- Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: A disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol. Rev.* 242: 233-246 (2011)
- Numerof RP, Asadullah K. Cytokine and anti-cytokine therapies for psoriasis and atopic dermatitis. *BioDrugs* 20: 93-103 (2006)
- Heo KS, Fujiwara K, Abe J. Disturbed-flow-mediated vascular reactive oxygen species induce endothelial dysfunction. *Circ. J.* 75: 2722-2730 (2011)
- Eichenfield LF, Ellis CN, Mancini AJ, Paller AS, Simpson EL. Atopic dermatitis: Epidemiology and pathogenesis update. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 31: S3-S5 (2012)
- Tominaga M, Takamori K. Itch and nerve fibers with special reference to atopic dermatitis: Therapeutic implications. *J. Dermatol.* 41: 205-212 (2014)