

## 제조방법에 따른 뽕은감 (*Diospyros kaki Thumb.*)의 대사체 프로파일링과 중성지질/콜레스테롤 대사 관련 유전자발현 연구 : *in vitro* 및 *in vivo* 연구\*

박수연<sup>1\*\*</sup> · 오은경<sup>1\*\*</sup> · 임예니<sup>1</sup> · 신지윤<sup>2</sup> · 정희아<sup>3</sup> · 박송이<sup>3</sup> · 이진희<sup>3</sup> · 최정숙<sup>4</sup> · 권오란<sup>1,2†</sup>

이화여자대학교 식품영양학과<sup>1</sup>, 이화여자대학교 임상보건융합대학원<sup>2</sup>, 차의과학대학교 식품생명공학과<sup>3</sup>, 농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부<sup>4</sup>

### Metabolites profiling and hypolipidemic/hypocholesterolemic effects of persimmon (*Diospyros kaki Thumb.*) by different processing procedures: *in vitro* and *in vivo* studies\*

Park, Soo-Yeon<sup>1\*\*</sup> · Oh, Eun-Kyung<sup>1\*\*</sup> · Lim, Yeni<sup>1</sup> · Shin, Ji-Yoon<sup>2</sup> · Jung, Hee-Ah<sup>3</sup> · Park, Song-Yi<sup>3</sup> · Lee, Jin Hee<sup>3</sup> · Choe, Jeong-Sook<sup>4</sup> · Kwon, Oran<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>Department of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, Seoul 03760, Korea

<sup>2</sup>Ewha Graduate School of Converging Clinical&Public Health, Seoul 03760, Korea

<sup>3</sup>Department of Food Science and Biotechnology, CHA University, Pocheon, Gyeonggi 11160, Korea

<sup>4</sup>Department of Agrofood Resources, Rural Development Administration National Institute of Agricultural Sciences, Jeonju, Jeonbuk 55365, Korea

#### ABSTRACT

**Purpose:** Our previous study demonstrated that persimmon (*Diospyros kaki Thumb.*) at different stages of ripening provided different protective effects against high-fat/cholesterol diet (HFD)-induced dyslipidemia in rats. In this study, we compared the metabolites profile and gene expressions related to triglyceride (TG)/cholesterol metabolism *in vitro* and *in vivo* after treating with persimmon water extracts (PWE) or tannin-enriched persimmon concentrate (TEP). **Methods:** Primary and secondary metabolites in test materials were determined by GC-TOF/MS, UHPLC-LTQ-ESI-IT-MS/MS, and UPLC-Q-TOF-MS. The expression of genes related to TG and cholesterol metabolism were determined by RT-PCR both in HepG2 cells stimulated by oleic acid/palmitic acid and in liver tissues obtained from Wistar rats fed with HFD and PWE at 0, 150, 300, and 600 mg/d (experiment I) or TEP at 0, 7, 14, and 28 mg/d (experiment II) by oral gavage for 9 weeks. **Results:** PLS-DA analysis and heatmap analysis demonstrated significantly differential profiling of metabolites of PWE and TEP according to processing of persimmon powder. *In vitro*, TEP showed similar hypolipidemic effects as PWE, but significantly enhanced hypocholesterolemic effects compared to PWE in sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2), HMG-CoA reductase (HMGCR), proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1), and low density lipoprotein receptor (LDLR) gene expression. Consistently, TEP and PWE showed similar hypolipidemic capacity *in vivo*, but significantly enhanced hypocholesterolemic capacity in terms of SREBP2, HMGCR, and bile salt export pump (BSEP) gene expression. **Conclusion:** These results suggest that column extraction after hot water extraction may be a good strategy to enhance tannins and long-chain fatty acid amides, which might cause stimulation of hypocholesterolemic actions through downregulation of cholesterol biosynthesis gene expression and upregulation of LDL receptor gene expression.

**KEY WORDS:** *Diospyros kaki Thumb.*, metabolites profiling, Hep G2 cells, diet-induced hyperlipidemic rats

#### 서론

에 널리 분포하고 있다. 이중 과수로 이용되는 것은 10여 종에 불과한데, 우리나라에서는 단감 (부유시, 차란시, 선시환, 부사시, 평무핵, 의문시 등)과 뽕은감 (고종시, 반시, 감나무는 세계적으로 약 190여종이 열대부터 온대 지역

Received: June 18, 2018 / Revised: July 6, 2018 / Accepted: July 9, 2018

\* This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ01169502)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

\*\* Equally contributed to this work as the first author

† To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-2-3277-6860, e-mail: orank@ewha.ac.kr

© 2018 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

사곡시, 분시, 울하시, 대봉시 등이 재배되고 있다. 감에는 polyphenol, terpenoid, steroid, flavonoid, carotenoid, mineral, fiber 등 다수의 활성성분이 함유되어 있다. 특별히 감에서 유래된 proanthocyanidin과 탄닌에 대해서는 항산화,<sup>1</sup> 항당뇨,<sup>2</sup> 중성지방 및 콜레스테롤 저하 효능<sup>3,4</sup> 이 동물 및 세포 실험에서 보고되고 있다. 또한 다수의 활성 성분이 함유되어 있는 감 추출물에 대해서도 항산화<sup>5</sup> 및 지질 저하<sup>6,7</sup> 효능이 동물시험에서 보고된 바 있다. 본 연구진은 이전 연구에서 고지방/고콜레스테롤 식이로 이상지질혈증을 유도한 흰쥐에게 뽕은감 청도반시 (*Diospyros kaki Thumb.*)를 분말화 하여 식이 무게의 7% 수준으로 7주간 공급한 후 중성지질 및 콜레스테롤의 대사 변화를 비교 분석하였다.<sup>8</sup> 연구 결과, 미성숙감은 중성지방 합성을 억제하였으나 성숙감은 담즙산 생성을 통한 콜레스테롤 배출을 증가시키는 것으로 나타나 같은 종의 감이라도 성숙도에 따라 서로 다른 기전을 통해 항고지혈 효능을 나타내는 것으로 고찰되었다. 이는 미성숙감과 성숙감에 함유된 1, 2차 대사물질의 함량이나 프로파일링이 다르기 때문으로 여겨지지만, 아직까지 이를 뒷받침할 수 있는 근거가 확보되지 않은 상태이다.

따라서 본 연구는 제조공정이 다른 두 시료는 화학적 특성과 생물학적 특성이 다를 것이라는 가정하에, 미성숙 뽕은감 청도반시 분말을 감압 열수 추출 및 칼럼 정제하는 과정에서 획득한 시험물질의 탄닌 함량 및 대사체 프로파일링을 분석하였으며, *in vitro* 및 *in vivo* 시험으로 중성지질 및 콜레스테롤 대사와 관련된 유전자 발현을 비교하였다. 대사체 프로파일링은 질량 분광 분석과 결합한 액체크로마토그래피/기체크로마토그래피 방법을 사용하여 분석하였으며, 세포 실험은 유리지방산으로 lipoapoptosis를 유도한 간세포 (human hepatoma cells, HepG2)를 사용하여 시험물질이 중성지질과 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 마지막으로, 세포 실험에서 얻어진 결과가 생물학적으로 의미 있는 지를 검증하기 위해 고지방/고콜레스테롤 식이로 고지혈증을 유도한 흰쥐의 간에서 시험물질의 섭취가 중성지질 및 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 비교하였다.

## 연구방법

### 시험 물질의 제조

뽕은감 중 청도반시 (*Diospyros kaki Thumb.*)를 구입하여 열풍건조하여 분말화 하였다. 뽕은감은 통상적 수확 시기인 10월부터 약 2~3개월 이전에 수확한 미성숙 감을 사용하였다. 미성숙 감의 꼭지를 제거하고 60°C에서 열풍

건조하여 감 분말 (Persimmon dried powder, PDP)을 제조하였다. 감 열수 추출물 (Persimmon water extract, PWE)은 PDP 100 g에 증류수를 넣고 고압멸균기 (SH-26A, Biofree, Seoul, Korea)로 가압 열수 추출하고, 여과한 후, 회전식 진공농축기 (EYELA N-1200B, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)로 농축하여 제조하였다. 탄닌 강화 감 농축물 (Tannin-enriched persimmon concentrate, TEP)은 흡착수지 (Diaion-HP20, Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan)를 이용하여 PWE의 탄닌 함량을 강화하고 동결건조기 (FD5518, Ilshin Lab, Seoul, Korea)로 건조하여 제조하였다. PDP는 농촌진흥청 (Jeonju, Korea)에서 제공받았으며, PWE와 TEP는 차의과학대학에서 제공받았다.

### 시험 물질의 탄닌 함량 및 대사체 프로파일링 분석

시험 물질의 탄닌 함량은 Bubba (2009)법과 AOAC (1990)법을 참고하여 분석하였다.<sup>9,10</sup> 각 시료에 0.5 M HCl 용액을 넣고 60°C의 진탕항온수조에서 30분간 추출하였다. 5분 냉각 후 3,500 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 여과하여 사용하였다. 이 과정을 3반복하여 얻은 상층액에 Folin-denis 시약과 포화 탄산나트륨 용액을 넣고, 암실에서 1시간 동안 반응시킨 후 흡광광도계 (GENESYS 10S UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 760 nm에서 흡광값을 측정하였다. 탄닌 함량은 표준물질인 tannin acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 시료 g 중의 mg tannin acid equivalent (TAE)로 나타내었다.

대사체 프로파일링 분석을 위해 PDP는 메탄올을 넣고 초음파 추출한 후 농축하여 사용하였으며, PWE는 메탄올에 녹인 후 농축하여 사용하였다. TEP는 메탄올에 녹여 직접 사용하였다. 가스크로마토그래피 (Agilent 7890A, Palo alto, CA, USA)-질량 분석기 (Pegasus III, Leco, St. Joseph, MI, USA) 로 구성된 GC-TOF/MS, 액체크로마토그래피 (LTQ XL-ion trap-mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific)-diode array detector로 구성된 UHPLC-LTQ-ESI-IT-MS/MS, 그리고 UPLC ACQUITY system (Micromass QTOF Premier, Waters, Milford, MA, USA) 으로 구성된 UPLC-Q-TOF-MS가 대사체 프로파일링 분석에 사용되었다. 가스크로마토그래피용 칼럼은 Rtx-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였고, 헬륨 가스의 유속은 1.5 mL/min으로 하였다. 액체크로마토그래피용 칼럼은 Thermo Scientific Synchronis C18 UHPLC column Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2.1 mm × 1.7 μm, Waters)과 ACQUITY UPLCBEH C18

column (100 mm × 2.1 mm × 1.7 μm, Waters)을 사용하였다. 결과는 ChromaTOF software (LECO Corporation)와 Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

### 세포배양과 유리지방산/시험물질의 처리

실험에 사용된 HepG2 세포 (HB-8065, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)는 High-glucose Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)과 1% Penicillium (Gibco)을 첨가하여 배양 후 사용하였다. 실험을 위해 HepG2 세포를 12 well plate에  $1 \times 10^4$  cell/well 농도로 분주하여 5% 이산화탄소가 공급과 37°C가 유지되는 배양기에서 90% 이상 배양하였다. 세포 밀도가 약 70%에 도달했을 때, serum free DMEM (Gibco)으로 교체하고 24시간 배양하여 더 이상 세포가 자라지 못하도록 한 뒤 실험에 사용하였다. Lipoapoptosis 유도를 위해서 Ricchi 등<sup>11</sup>의 방법에 따라 예비시험 후 조건을 정하여 유리 지방산 1 mM (0.66 mM 올레인산 + 0.33 mM 팔미트산) 및 농도 0.25, 0.5, 1 mg/mL의 시료를 24시간 처리하였다. 올레인산과 팔미트산은 Sigma-Aldrich에서 구입하였으며, 0.1 M NaOH에 녹여서 사용하였다.

### 실험동물의 사육 및 처리

실험 동물은 4주령 Wistar계 수컷 흰쥐이며, 중앙실험동물 (Seoul, Korea)로부터 공급받았다. 실험 동물은 항온 22 ± 2°C, 항습 45 ± 5%, 12시간 주기로 명암 조절을 자동 유지하며 사육하였다. 7일 동안 물과 표준식이 (5L79 Purina rat & mouse 18% chow, Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA)를 자유롭게 공급하며 환경에 적응시킨 후, 난괴법으로 10마리씩 나누어 9주간 사육하였다. 실험군은 4군으로 나누어 고지방/고콜레스테롤 식이로 사육하며 PWE (실험 1) 또는 TEP (실험 2)를 매일 경구투여 하였다. 고지방/고콜레스테롤 식이는 AIN-93G 식이 (D10012G, Research Diets, New Brunswick, NJ, USA)를

기반으로 하여 총 열량의 45% 라드와 1% 콜레스테롤을 추가하도록 조성을 변경하여 Research Diets에서 구매하였다. PWE는 증류수에 녹여서 0 (HF), 150 (HL), 300 (HM), 또는 600 (HH) mg/day 수준으로 경구투여 하였다. TEP는 증류수에 녹여서 0 (HF), 7 (HL), 14 (HM), 또는 28 (HH) mg/day 수준으로 동일한 방법으로 투여하였다. 실험 동물은 9주간의 사육을 마치고 희생 전 12시간 절식 후, CO<sub>2</sub> 가스로 호흡 마취하여 희생하였다. 간은 적출 후 생리식염수로 세척하고 수분을 제거하여 액체 질소에 넣어 급속 동결하고 분석 시까지 -70°C에 냉동보관 하여 사용하였다. 본 연구는 이화여자대학교 동물실험윤리위원회 승인을 받아 수행하였다 (IACUC No. 16-021, 17-020).

### Oil-Red-O staining

HepG2 세포의 지방 축적은 Oil-Red-O staining을 이용하여 측정되었다. 유리지방산 및 시료를 처리한 세포를 10% formaldehyde (Sigma, USA)로 1시간 실온에서 고정시킨 후 3차 증류수로 2회 세척하였다. 세포를 60% Oil-Red-O (Sigma, USA)로 1시간 실온에서 염색하고 현미경 (Nikon ECLIPSE, TS100, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 이어 100% isopropanol (Sigma, USA)을 넣고 10분 동안 상온에서 교반 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포 및 조직의 유전자 발현 분석

HepG2 세포, 간 조직에서 TRIzol (Ambion, Austin, TX, USA)을 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 template로 cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 single stranded cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 SYBR Green PCR master mix와 타겟 유전자별 primer를 넣어 real-time PCR (Applied Biosystems) 방법을 이용하여 mRNA 발현을 측정하였다. 타겟 유전자의 primer는 Table 1에 제시하였다. mRNA 발현 수준은  $\Delta\Delta$ CT 방법으로 계산하였으며, 데이터는 GAPDH 및 β-actin 값에 대한 상대적인 양으로 제시하였다.

**Table 1.** Primer sequences used for real-time PCR

|       | Gene   | GenBank accession | Sequence (5'-3')                                   |
|-------|--------|-------------------|--|
| Human | FAS    | NM_000043         | F: GCTCCGAGATCCATCCTACG<br>R: GCAGTCAGGCTCACAAACGA |
|       | SREBP2 | NM_004599         | F: CCCTGGGAGACATCGACGA<br>R: CGTTGCACTGAAGGGTCCA   |
|       | LDLR   | NM_000527         | F: TGTCCAAGGGGACAGTAGC<br>R: CGCAGT TTCTCGTCAGAT   |
|       | PCSK9  | NM_174936         | F: AGGGGAGGACATCATTGGTG<br>R: CAGGTTGGGGTCACTACC   |

**Table 1.** Primer sequences used for real-time PCR (continued)

|                   | Gene           | GenBank accession | Sequence (5'-3')                                       |
|-------------------|----------------|-------------------|--|
| Human (continued) | HMGCR          | NM_000859         | F: ACTTATGGCAGCATTGGCAG<br>R: ACTGTCGGGCTATTCAGGCT     |
|                   | CYP7A1         | NM_000780         | F: CATTGGGCACAGAAGCATTG<br>R: AGGCAGCGGTCITGAGTTAG     |
|                   | BSEP           | NM_003742         | F: GGCACACTCCTTGTTCCTGG<br>R: GTCCAATGCCTGCGACAGAT     |
|                   | ABCG5          | NM_022436         | F: GTGGATACCCAAAGCAAGGA<br>R: TGAAAGGAACCATGGTAACG     |
|                   | GAPDH          | NM_002046         | F: AGGCAACTAGGATGGTGTGG<br>R: TGGACTCCACGACGACTACTCA   |
| Rat               | SREBP1C        | NM_001033694      | F: CATGGACGAGCTACCCCTTCG<br>R: GAAGCATGTCTTCGATGTCGG   |
|                   | FAS            | NM_139194         | F: CAACATTGACGCCAGTCCG<br>R: TTCGAGCCAGTGTCTCCAC       |
|                   | SREBP2         | NM_001033694      | F: CCGGAAGAAGAGAGCTGTG<br>R: CAGACGACATCGGGACCAAG      |
|                   | LDLR           | NM_175762         | F: AGGAGTGCAAGACCAACGAG<br>R: TATCTCACACTGGTGGCCG      |
|                   | HMGCR          | NM_013134         | F: GAAACCCTCATGGAGACGCA<br>R: AGCAAGCTCCCATCACC AAG    |
|                   | CYP7A1         | NM_012942         | F: TGCCGGTACTAGACAGCATC<br>R: CGTCCTCAAGATGGAGAGTG     |
|                   | BSEP           | NM_031760         | F: TGAAGGCATGGTGACTCTGG<br>R: GTGGTGGAGAACAGAACGG      |
|                   | ABCG5          | NM_053754         | F: GGCCAGACCATGTGCATCTT<br>R: CCAGAGATGGCGTCCAGC       |
|                   | ABCG8          | NM_130414         | F: GATGCTGGCTATCATAGGGAGC<br>R: CTCTGCCTGTGATAACGTCGAG |
|                   | NPC1L1         | NM_001002025      | F: AACAGCGAGAGGCTCACAIT<br>R: AGTGGCGTTCATGCCTGCCT     |
|                   | $\beta$ -actin | NM_031144         | F: GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG<br>R: ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA  |

## 통계분석

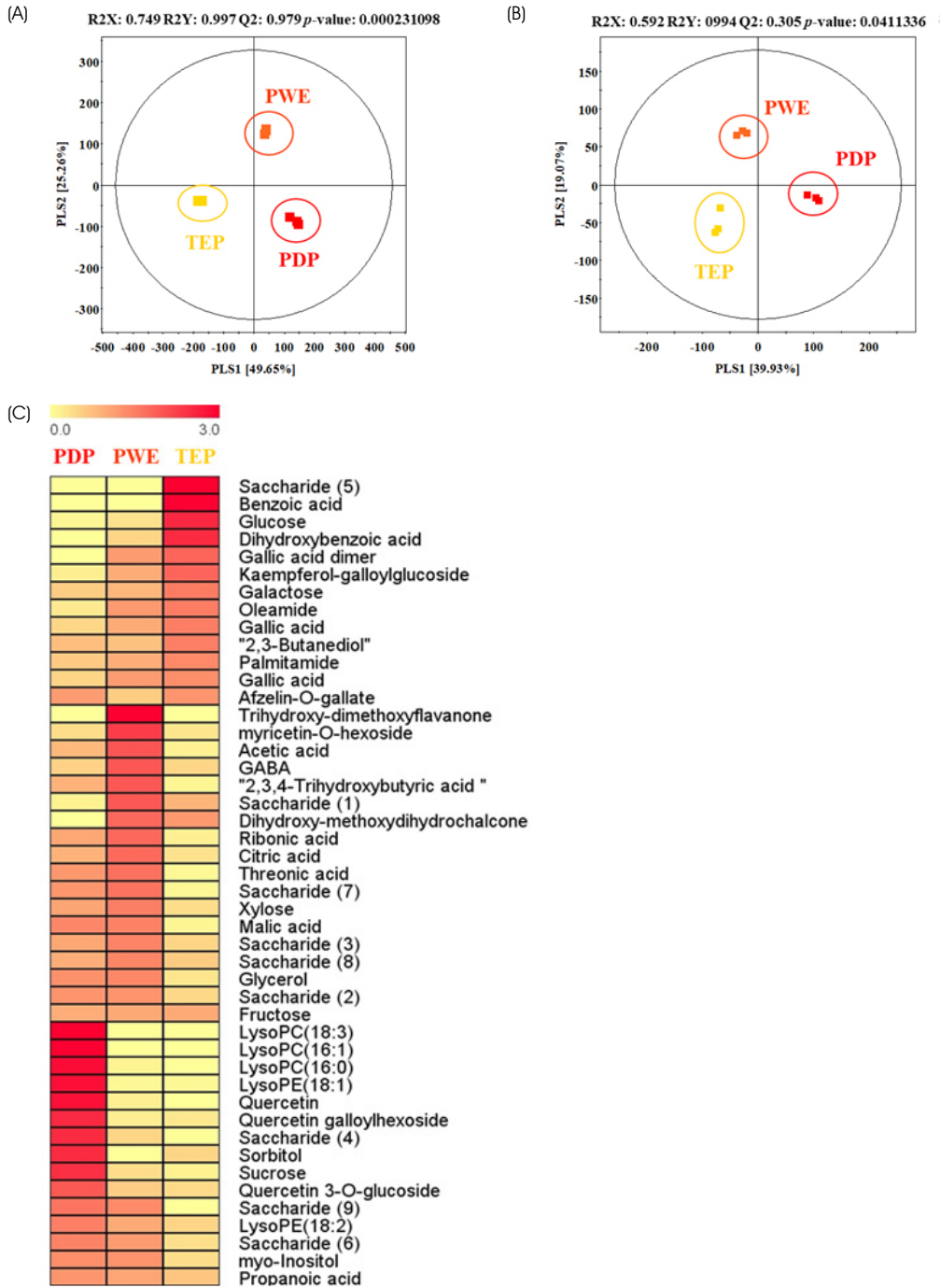
모든 실험 결과는 평균  $\pm$  표준오차 (SE)로 표기하였다. 실험군간 차이는 일원배치 분산분석 (One-way analysis of variance, ANOVA)과 Dunnett 다중비교검정법을 사용하여 통계분석 하여,  $p < 0.05$ 인 값을 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다. 모든 통계는 Statistical analysis systems package version 9.4 (SAS Institute, Cary, NY, USA)을 이용하여 분석하였다. 대사체 데이터는 SIMCA-P+를 이용한 다변량통계분석 (Partial least square-discriminant analysis, PLS-DA)을 사용하여 분석하였다.

## 결 과

### 탄닌 함량 및 대사체 프로파일링 비교

탄닌 함량은 제조과정을 거치면서 점차 증가하여 PDP 1.44 mg (TAE)/g, PWE 31.97 mg (TAE)/g, 그리고 TEP 523 mg (TAE)/g로 증가하였다. 각 시험 물질을 GC-TOF-MS,

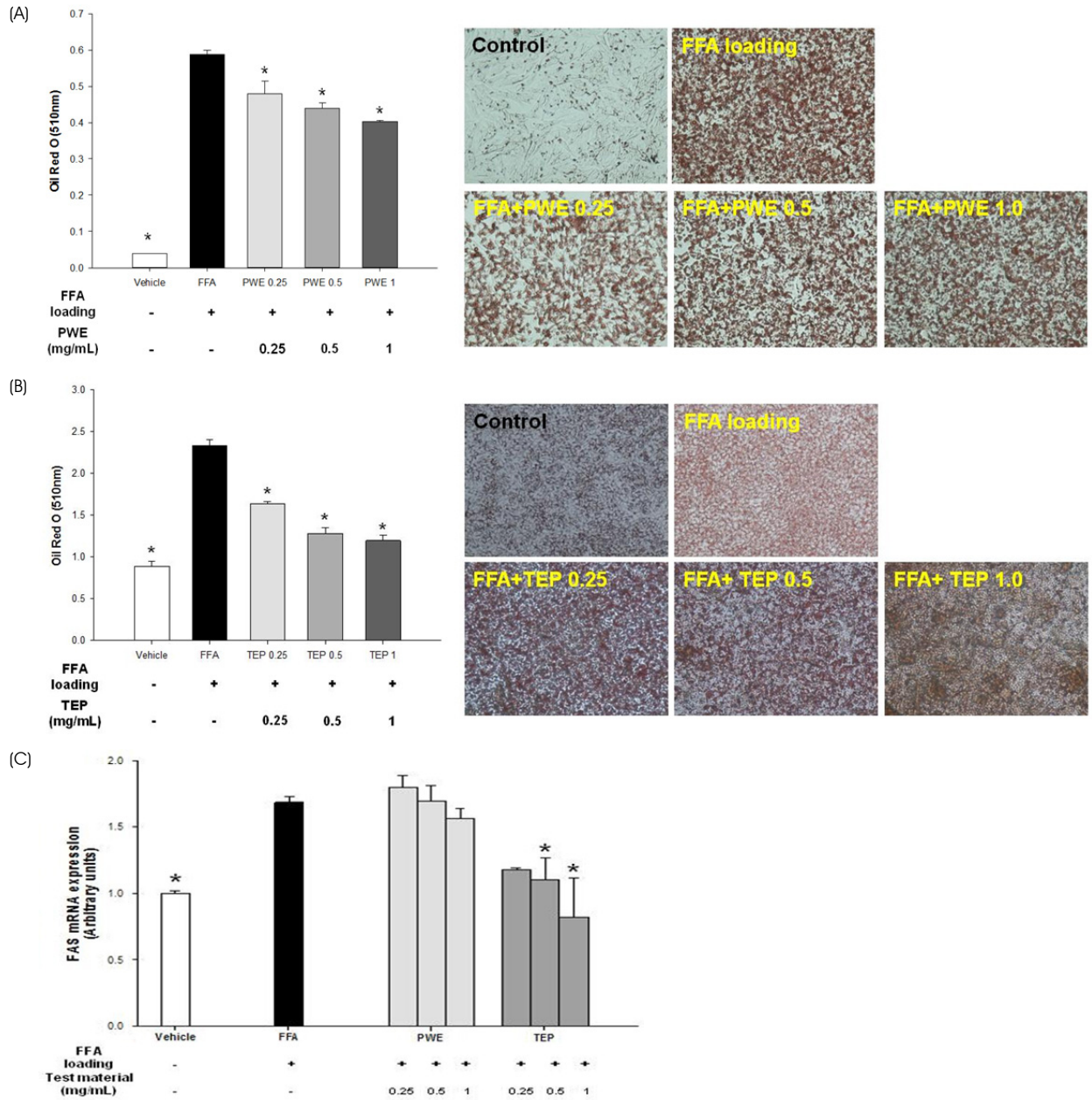
UHPLC-LTQ-ESI-IT-MS/MS 및 UPLC-Q-TOF-MS로 분석하고 SIMCA-P+ 프로그램으로 PLS-DA 다변량 분석한 결과, 각 시험 물질의 대사체 프로파일링 간에 뚜렷한 구분을 확인할 수 있었다. 일차대사체의 경우 49.6%와 25.2% 다양성을 (Fig. 1A), 이차대사체의 경우 39.9%와 19.0%의 다양성을 (Fig. 1B) 나타냈다. Fig. 1C에 제시된 heatmap은 p-value와 VIP 분석을 바탕으로 PDP, PWE, TEP의 metabolite 함량을 비교한 것으로 매우 구별되는 대사체 프로파일링을 나타냈다. PDP는 7개의 일차대사체 (Saccharide (4), Sorbitol, Sucrose, Saccharide (9), Saccharide (6), *myo*-Inositol, Propanoic acid)와 8개의 이차대사체 (LysoPC 18:3, LysoPC 16:1, LysoPC 16:0, LysoPE 18:1, Quercetin, Quercetin galloylhexoside, Quercetin 3-O-glucoside, LysoPE 18:2)의 함량이 유의하게 높았다. 또한, PWE는 15개의 일차대사체 (Acetic acid, GABA, 2,3,4-Trihydroxybutyric acid, Saccharide (1), Ribonic acid, Citric acid, Threonic acid, Saccharide (7), Xylose, Malic acid, Saccharide (3),



**Fig 1.** Partial least-squares discrimination analysis (PLS-DA) score plots using the GC-TOF-MS (A) and UHPLC-LTQ-ESI-IT-MS/MS/UPLC-Q-TOF-MS (B) data sets and heat map of specific metabolites in PDP, PWE, and TEP (C). PDP, persimmon dried powder; PWE, persimmon water extract; TEP, tannin-enriched persimmon concentrate. R2X and R2Y were the cumulative modeled variation in X and Y matrix, respectively. Q2 were the cumulative predicted variation in Y matrix.

Saccharide (8), Glycerol, Saccharide (2), Fructose)와 3개의 이차대사체 (Trihydroxy-dimethoxyflavanone, Myricetin-O-hexoside, Dihydroxy-methoxydihydrochalcone)의 함량이 높았다. 반면에 TEP는 6개의 일차대사체 (Saccharide (5),

Benzoic acid, Glucose, 2,3-Butanediol, Galactose, Gallic acid) 그리고 7개의 이차대사체 (Dihydroxybenzoic acid, Gallic acid dimer, Gallic acid, Kaempferol-galloylglucoside, Oleamide, Palmitamide, Afzelin-O-gallate) 함량이 높았다.



**Fig 2.** Effects of PWE and TEP on intracellular lipid accumulation (A and B, respectively) and FAS gene expression (C) in HepG2 cells stimulated by free fatty acids (0.66 mM oleic acid + 0.33 mM palmitic acid). PWE, persimmon water extract; TEP, tannin-enriched persimmon concentrate. HepG2 cells were grown in serum-free medium overnight and incubated in 1mM OA/PA-BSA complex in the absence or presence of PWE (A) or TEP (B) for an additional 24h. Values are means from three independent experiments conducted with triplicate treatments, with standard error represented by vertical bars. \*Significantly different at  $p < 0.05$  by Dunnett's test compared with FFA loading.

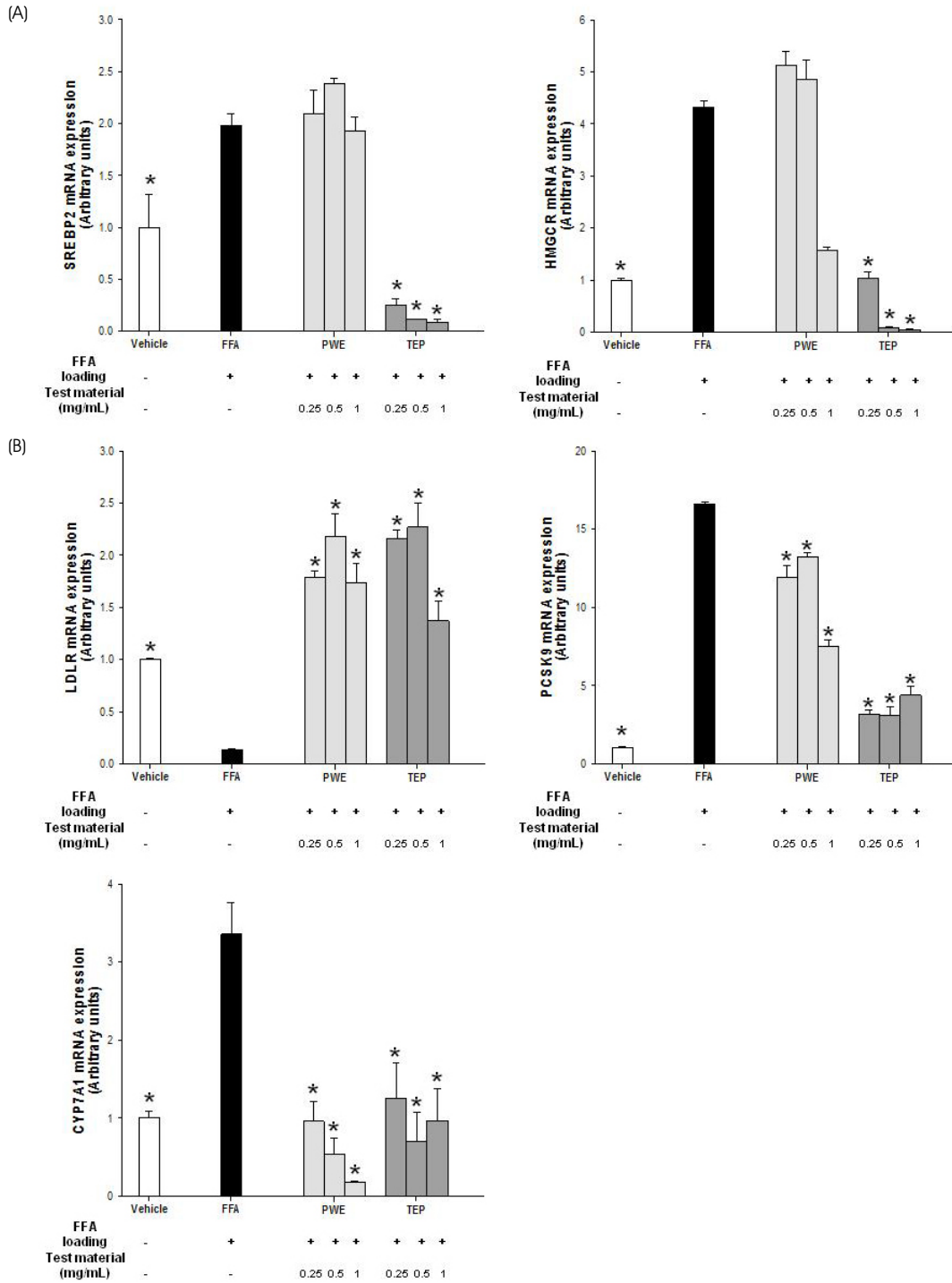
**In vitro 모델에서 탄닌 함량을 달리한 뽕은감 시료가 지질 대사 및 관련 유전자 발현에 미치는 영향**

HepG2 세포에 유리지방산을 처리한 결과 세포내 증성 지질 축적이 유도되었음을 Oil-Red-O staining으로 확인하였다. 그러나 지방산과 함께 PWE (Fig. 2A) 또는 TEP (Fig. 2B)를 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL 수준으로 처리하면 농도

의존적으로 지방 축적이 감소하였다. Oil-Red-O staining 결과와 유사하게, PWE와 TEP는 모두 농도의존적으로 fatty acid synthase (FAS) 발현을 억제하였으나, TEP 처리 군에서만 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었다 ( $p = 0.004$ ) (Fig. 2C).

HepG2 세포에서 콜레스테롤 합성, 유입, 및 담즙산 합

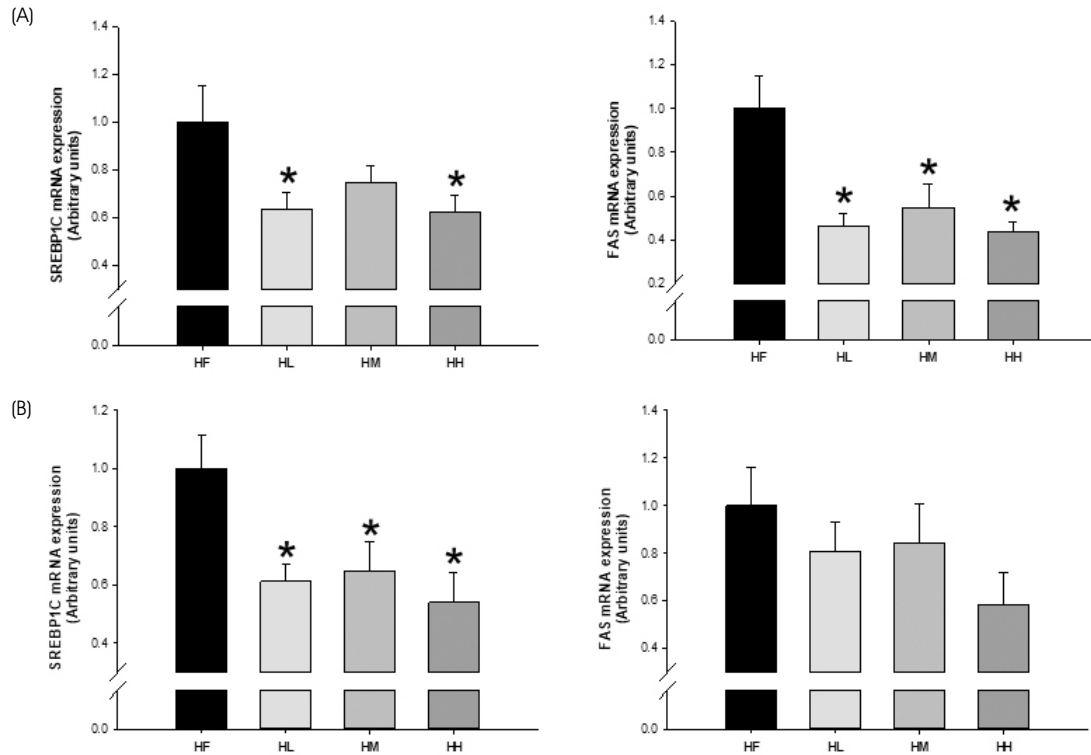




**Fig 3.** Effects of PWE and TEP on cholesterol synthesis (A) and cholesterol metabolism (B) in HepG2 cells stimulated by free fatty acids (0.66 mM oleic acid + 0.33 mM palmitic acid). PWE, persimmon water extract; TEP, tannin-enriched persimmon concentrate. HepG2 cells were grown in serum-free medium overnight and incubated in 1mM OA/PA-BSA complex in the absence or presence of PWE (A) or TEP (B) for an additional 24h. Values are means from three independent experiments conducted with triplicate treatments, with standard error represented by vertical bars. \*Significantly different at  $p < 0.05$  by Dunnett's test compared with FFA loading.

성과 관련된 유전자 발현을 측정하였다. 콜레스테롤 합성에 관여하는 전사인자인 sterol regulatory element-binding

protein 2 (SREBP2) 유전자의 발현은 지방산 처리로 유의하게 증가하였으나, TEP 처리로 유의하게 감소하였다 (p



**Fig 4.** Effects of PWE (A) and TEP (B) on hepatic lipogenesis (SREBP1c and FAS) in rats fed a high-fat/cholesterol diet. PWE, persimmon water extract; TEP, tannin-enriched persimmon concentrate, HF, high-fat/cholesterol control; HL, HF + low-dose PWE/TEP; HM, HF + middle-dose PWE/TEP; HH, HF + high-dose PWE/TEP. Values are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 10 for each group). \*Significantly different at  $p < 0.05$  by Dunnett's test compared with HF group.

< 0.0001). SREBP2의 타깃 유전자이며 콜레스테롤 합성 속도를 조절하는 HMG-CoA reductase (HMGCR) 유전자의 발현도 지방산 처리로 유의하게 증가하였으나, TEP 처리군에서 농도의존적으로 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 3A). 혈중 콜레스테롤을 간 조직으로 이동시키는 low density lipoprotein receptor (LDLR) 유전자 발현은 지방산 처리로 유의하게 감소하였으나, PWE 또는 TEP를 처리하여 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.0001$ ). 간세포 표면에 존재하는 LDLR과 결합하여 lysosome degradation을 유도하는 PCSK9 유전자의 발현은 지방산 처리로 유의하게 증가하였으며, PWE와 TEP 처리로 유의하게 감소되었다 ( $p < 0.0001$ ). 특히 TEP 처리군은 지방산을 처리하지 않은 수준까지 억제되었다. 한편 담즙산 합성 조절인자인 cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) 유전자 발현은 지방산 처리로 유의하게 증가하였으나, PWE와 TEP 처리로 모두 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 3B).

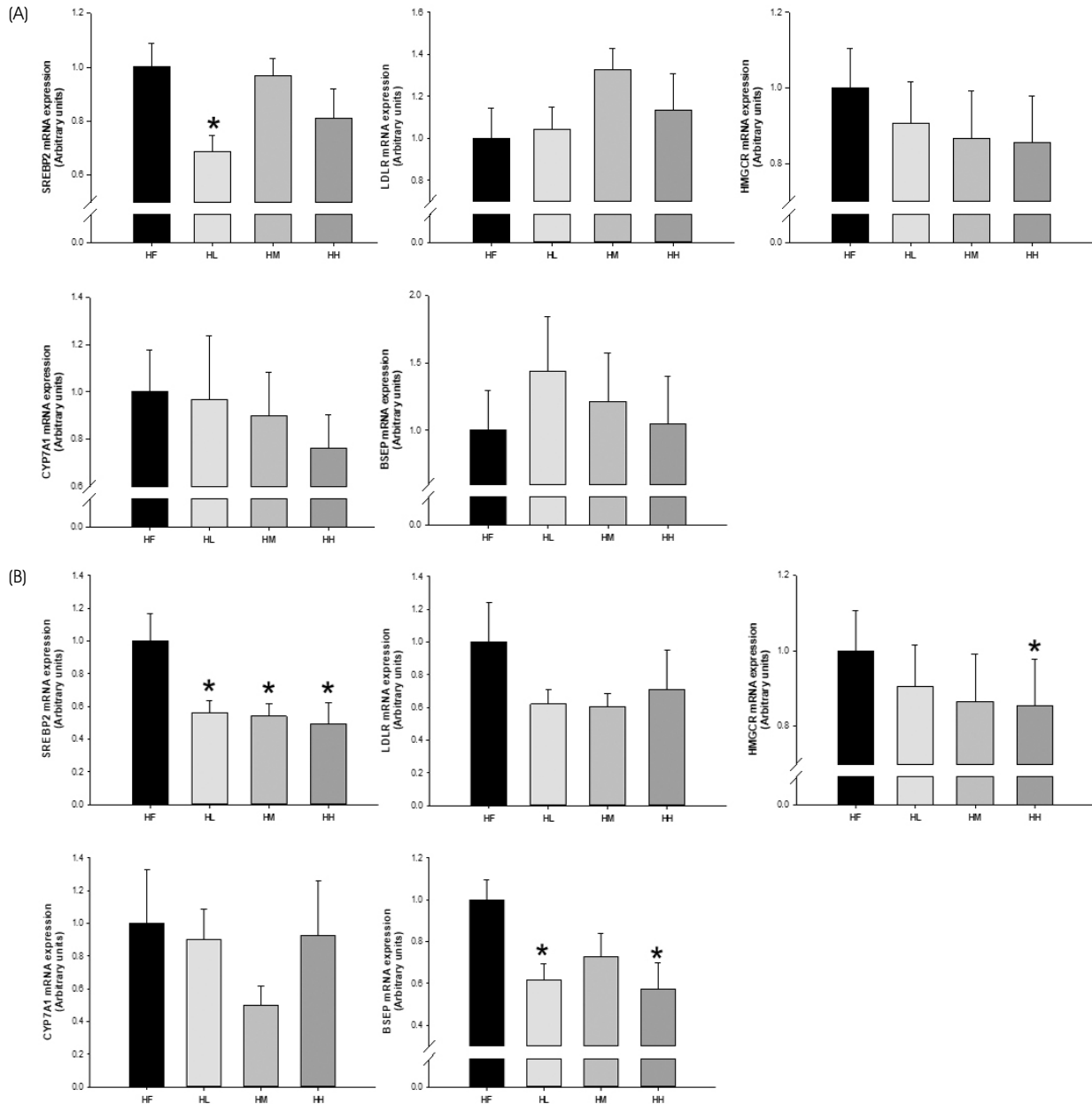
#### ***In vivo* 모델에서 탄닌 함량을 달리한 뚝은감 시료가 지질 대사 관련 유전자 발현에 미치는 영향**

고지방/고콜레스테롤 식이로 고지혈증을 유도한 흰쥐를

대상으로 PWE (실험1) 또는 TEP (실험2)를 9주간 섭취시킨 결과, 식이 섭취 수준에는 유의한 차이가 없었다. 그러나 간 조직에서 측정된 중성지질 및 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현은 대조군에 비해 유의하게 변화되었다 (Fig. 4). 지방산과 중성지방 대사에 관여하는 전사인자인 SREBP1c는 HF군에 비해 PWE ( $p = 0.0353$ ) 또는 TEP ( $p = 0.0086$ )를 섭취한 모든 군에서 유의적으로 감소하였다. SREBP1c의 타깃 유전자인 FAS의 발현은 HF군 대비 PWE를 섭취하였을 때 유의하게 억제되었으나 ( $p = 0.0009$ ), TEP를 섭취하였을 때는 통계적인 유의성을 보이지 않았다.

간 조직에서 측정된 콜레스테롤 대사 전사인자, 합성, 유입, 및 담즙산 합성 관련 유전자 발현은 Fig. 5와 같다. 콜레스테롤 대사를 조절하는 전사인자인 SREBP2 유전자 발현은 TEP 섭취군에서 모두 유의하게 감소하였으나 ( $p = 0.0148$ ), PWE 섭취군은 일관성 있는 결과가 나타나지 않았다. SREBP2의 타깃 유전자이며, 콜레스테롤의 간 유입에 관여하는 LDLR 유전자 발현은 PWE 또는 TEP 섭취에 유의적인 변화를 나타내지 않았다. SREBP2의 또 다른 타깃 유전자이며 콜레스테롤 합성을 조절하는 효소인 HMGCR 유전자 발현은 TEP 섭취군에서 농도의존적으로 감소하여





**Fig 5.** Effects of PWE (A) and TEP (B) on hepatic cholesterol metabolism (SREBP2, LDLR, HMGCR and CYP7A1, BSEP) in rats fed a high-fat/cholesterol diet. PWE, persimmon water extract; TEP, tannin-enriched persimmon concentrate, HF, high-fat/cholesterol control; HL, HF + low-dose PWE/TEP; HM, HF + middle-dose PWE/TEP; HH, HF + high-dose PWE/TEP. Values are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 10 for each group). \*Significantly different at  $p < 0.05$  by Dunnett's test compared with HF group.

서 고용량군에서 유의하게 발현이 억제되었으나 ( $p = 0.0258$ ), PWE 섭취군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 콜레스테롤 배출의 다른 경로인 담즙산 합성 조절인자인 CYP7A1 유전자 발현은 PWE와 TEP 섭취군에서 모두 통계적 유의성을 보이지 않았다. 그러나 담관으로 담즙을 배출될 때 이용되는 bile salt export pump (BSEP) 유전자 발현은 PWE를 섭취한 군에서는 유의적이지 않았으나 높

아졌고, TEP 섭취군에서는 유의적으로 감소되었다 ( $p = 0.0276$ ).

## 고 찰

본 연구는 뽕잎 분말 PDP로부터 열수추출한 PWE와 이를 다시 칼럼추출한 TEP를 사용하여 탄닌 함량, 대사체

프로파일링, 그리고 중성지질 및 콜레스테롤 대사에 관련된 유전자 발현을 분석하여 제조공정이 다른 두 가지 시료는 화학적/생물학적 특성이 다름을 밝히고자 수행되었다. 질량 분광 분석과 결합한 액체크로마토그래피/기체크로마토그래피 방법을 사용하여 대사체학적 접근으로 화학적 특성을 비교한 결과, PWE와 TEP는 탄닌 함량뿐 아니라 대사체 프로파일이 매우 뚜렷이 구분됨을 확인하였다. 또한 중성지질 및 콜레스테롤 대사와 관련된 생물학적 특성을 규명하기 위해 유리지방산으로 lipoapoptosis를 유도한 HepG2 세포 그리고 고지방/고콜레스테롤 식이로 이상지질혈증을 유도한 흰 쥐의 간세포를 사용하여 시험한 결과 PWE와 TEP는 모두 SREBP1, FAS 등 중성지질 대사 및 관련 유전자 발현에 유사한 수준으로 영향을 미치지만, SREBP1C, SREBP2, HMGCR, BSEP 등 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현에 대해서는 PWE에 비해 TEP 처리군이 우세한 것으로 나타났다.

감 열매는 폴리페놀, 테르페노이드, 스테로이드, 플라보노이드, 카로티노이드, 미네랄과 식이섬유 등 다양한 생물 합성 화합물을 함유하고 있다.<sup>12,13</sup> 여러 성분 중 특별히 페놀류, 스테롤류, 플라보노이드류 성분을 중심으로 만성질환 예방 및 조절 기능이 계속하여 보고되고 있으므로,<sup>12,14</sup> 이들 성분을 함유한 감 열매의 섭취는 인체 건강에 유익한 효과를 줄 것으로 기대되고 있다. 본 연구진은 식이로 고지혈증을 유도한 흰쥐에게 성숙도가 다른 뚱뚱감을 섭취시킨 이전연구에서 뚱뚱감의 성숙도에 따라 항고지혈 효능의 작용기전이 서로 달라진 것은 화학적 특성이 달라지기 때문으로 고찰한 바 있다.<sup>8</sup> 이번 연구에서는 제조방법을 달리한 두 가지 시료 PWE와 TEP를 준비한 후, 탄닌 함량을 흡광광도계로 분석하였을 뿐 아니라 대사체학적 접근으로 대사체 프로파일을 분석하여 비교하였다. 대사체학적 접근 방법으로는 핵자기공명과 같은 분광기법과 질량 분광 분석과 결합한 액체크로마토그래피/기체크로마토그래피 기법이 있는데,<sup>15</sup> 본 연구에서는 1차 대사체 분석을 위해 가스크로마토그래프-질량분석법 (GC-TOF/MS)을 그리고 2차 대사체 분석을 위해 액체크로마토그래프-질량분석법 (UHPLC-LTQ-ESI-IT-MS/MS 및 UPLC-Q-TOF-MS)을 사용하였다. PDP와 비교할 때, PWE는 지질 (LysoPC 18:3, LysoPC 16:1, LysoPC 16:0, LysoPE 18:1) 과 당 (saccharide (4), sucrose, xylose)의 함량이 현저히 감소하였으며, 활성성분 중에서는 Quercetin, Quercetin galloxyhexoside, Quercetin 3-O-glucoside 함량이 감소하고 Trihydroxy-dimethoxy flavanone, Myricetin-O-hexoside 함량은 증가하였다. 그러나 PWE를 걸름 추출하여 얻은 TEP는 매우 특이한 대사체를 구성하여 다른 성분들은 거의 대

부분 감소하고 Saccharide (5), Glucose, Galactose, Benzoic acid, Dihydroxybenzoic acid, Gallic acid monomer/dimer, Kaempferol-galloyl glucoside, Oleamide, Palmitamide, Afzelin-O-gallate 함량이 선택적으로 증가되었다. TEP에서 극대화된 탄닌 화합물은 양쪽성 물질 (amphoteric substance)로 지질 표면에 흡착되어 지방 분해 활성을 억제하는 것으로 알려지고 있다.<sup>16</sup> Gallic acid는 탄닌 화합물의 일종으로 항고지혈<sup>17,18</sup> 및 지방간 억제 효과<sup>18</sup>가 알려지고 있으며, 콜레스테롤 흡수 저해<sup>19</sup> 및 항산화<sup>18</sup> 등의 작용기전이 보고되고 있다. 또한 Oleamide와 Palmitamide는 장쇄지방산아미드로 항고콜레스테롤혈증 효능이 있는 것으로 알려져 왔다.<sup>20</sup>

유리지방산을 처리한 HepG2 세포와 식이로 고지혈증을 유도한 흰쥐의 간조직에서 PWE와 TEP 처리가 중성지질 및 콜레스테롤 대사에 미치는 영향을 유전자 발현으로 비교하였다. 타깃 유전자로는 SREBPs, ACC, FAS, SCD1, LDLR, HMGCR, CYP7A1, PCSK9을 사용하였다. SREBP 유전자는 SREBP1과 SREBP2로 나누어지는데, SREBP1은 전사인자로서 ACC, FAS 및 SCD1과 같은 중성지방 합성과 관련된 유전자를 조절한다. 즉, 지방산합성이 일어나는 동안에는 SREBP1 과 FAS 유전자 발현이 증가한다.<sup>21,22</sup> 한편 SREBP2는 콜레스테롤 합성과 관련된 유전자 조절에 관여한다. SREBP2는 LDLR의 발현을 증가시켜 LDL-C이 간 내로 유입하게 하여 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 역할을 한다.<sup>23</sup> 또한 SREBP2 발현의 증가는 콜레스테롤 합성 효소인 HMGCR의 발현을 증가시키고, 콜레스테롤이 담즙산으로 전환하는 속도제한 효소인 CYP7A1의 발현을 증가시킨다.<sup>24</sup> CYP7A1 유전자는 담즙산 생성에 중요한 역할을 하여, 콜레스테롤 섭취가 많아지면 활성화되고 담즙산에 의해 억제되어 콜레스테롤이 간에 축적되는 것을 막아준다.<sup>25</sup> PCSK9은 세포막에서 LDLR와 결합하여 lysosome으로 LDLR을 유도하여 분해하는 방법으로 receptor recycling을 촉진시켜 콜레스테롤 항상성을 유지하는 중요한 역할을 한다.<sup>26</sup> 본 연구에서 수행된 *in vitro* 시험에서 PWE와 TEP를 처리한 군은 모두 Oil-Red-O staining에서 유의한 효과를 나타냈으며 중성지질 대사와 관련된 FAS 유전자 발현도 억제되었다. 콜레스테롤 대사와 관련된 CYP7A1 및 LDLR 유전자 발현도 PWE와 TEP 군에서 모두 유의하게 억제 또는 상승하였다. 그러나 SREBP2 유전자 발현은 TEP 처리군에서만 유의하게 감소하였으며, 하위 유전자인 HMGCR, PCSK9의 발현도 PWE 군에 비해 TEP군의 효과가 우세하였다. *In vitro* 시험을 검증하기 위해 실시된 *in vivo* 시험에서도 *in vitro* 시험과 일치되는 방향으로 TEP 시료 투여군에서 SREBP2와 HMGCR

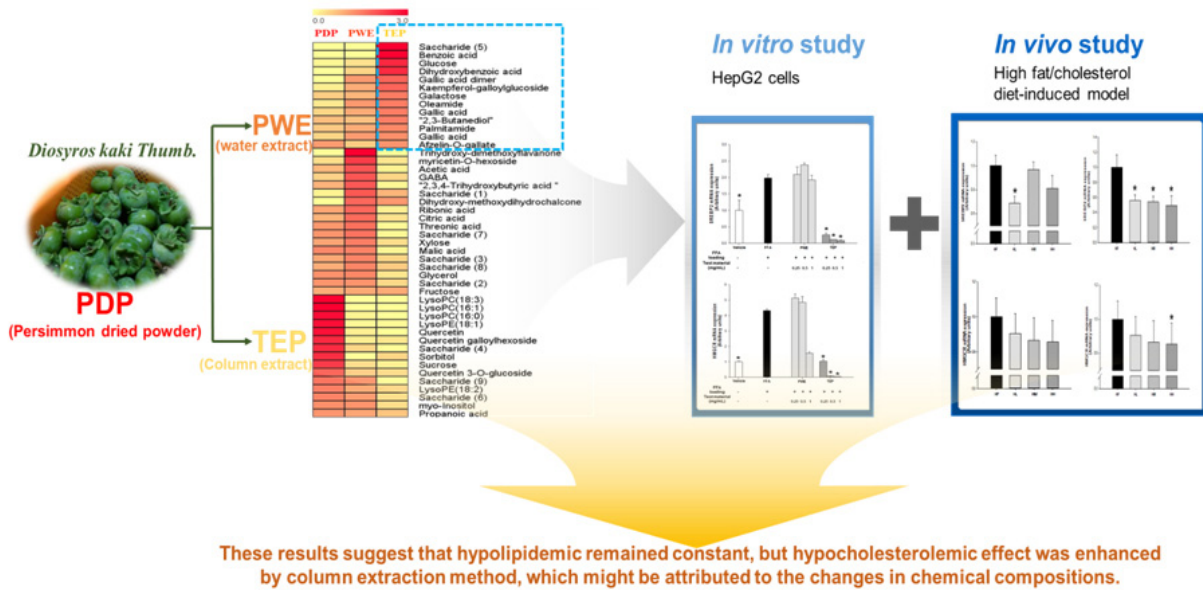


Fig 6. Overview diagram of research scope and flow

유전자 발현이 유의하게 억제됨을 확인하였다.

이상의 결과로 미루어, Gallic acid, Oleamide, Palmitamide 등 함량을 극대화한 TEP는 PWE에 비교하여 SREBP2 전사인자 조절, 콜레스테롤 합성 억제, 그리고 세포막에 위치하는 LDLR 조절의 기전을 통해 콜레스테롤 대사에 미치는 영향이 강화되는 것으로 사료된다 (Fig. 6). 본 연구에서 TEP의 주요 타깃 유전자로 도출된 HMGCR와 LDLR은 동맥경화관련 질환이나 제2형 당뇨병 등 심장 순화기계질환 치료제를 개발할 때 사용되는 중요한 타깃임을 감안할 때,<sup>27</sup> 膵은감을 열수 추출하고 칼럼 정제하는 제조방법은 증성지질 대사 조절 기능을 유지하면서 콜레스테롤 대사 조절 기능을 강화하는 중요한 전략이 될 수 있을 것으로 생각된다.

### 요 약

본 연구는 膵은감 청도반시의 분말을 열수 추출하고 칼럼 추출하는 과정에서 획득한 PWE와 TEP에 대한 대사체 프로파일을 분석하고, 유리지방산을 처리한 HepG2 세포와 식이로 고지혈증을 유도한 Wistar계 흰쥐의 간조직을 사용하여 증성지질 및 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현을 측정하였다. 대사체 분석은 가스크로마토그래프-질량 분석법과 액체크로마토그래프-질량분석법을 사용하였으며, PLS-DA 분석과 heatmap 분석을 실시한 결과 PWE는 膵은감 분말과 비교적 유사한 대사체 프로파일을, 그리고 TEP는 膵은감 분말과 매우 다른 대사체 프로파일을 가지

고 있음을 확인하였다. 세포실험과 또한 세포실험에서 얻어진 결과를 검증하기 위해 수행된 동물실험에서 PWE와 TEP는 모두 SREBP1c와 FAS 유전자 발현을 감소하여 간의 지방축적을 감소시키는 것으로 관찰되었으나, 콜레스테롤 축적을 억제하는 효능은 PWE에 비해 TEP에서 우세하게 증가하는 것이 관찰되었다. 특별히 TEP는 SREBP2, HMGCR 유전자 발현을 억제하고 LDLR 유전자 발현을 촉진하는 것으로 나타났다. TEP는 탄닌 중 Gallic acid 그리고 장쇄지방산아미드인 Oleamide와 Palmitamide 함량이 유의하게 증가되었으므로, 향후 이들 성분과 타깃 유전자의 상관성을 분석하고, 이를 통해 시스템네트워크로 나타내어 대사체 프로파일에 따른 지질 및 콜레스테롤 대사 간 상호 영향을 추가적으로 연구해야 할 것으로 사료된다.

### ORCID

- 박수연: <https://orcid.org/0000-0003-0710-8316>
- 오은경: <https://orcid.org/0000-0002-4661-5209>
- 임예니: <https://orcid.org/0000-0001-6882-1719>
- 신지윤: <https://orcid.org/0000-0003-3258-1623>
- 정희아: <https://orcid.org/0000-0002-7064-4130>
- 박송이: <https://orcid.org/0000-0001-9623-9128>
- 이진희: <https://orcid.org/0000-0003-2222-7663>
- 최정숙: <https://orcid.org/0000-0002-2380-0591>
- 권오란: <https://orcid.org/0000-0002-2031-7238>

## References

1. Yokozawa T, Park CH, Noh JS, Roh SS. Role of oligomeric proanthocyanidins derived from an extract of persimmon fruits in the oxidative stress-related aging process. *Molecules* 2014; 19(5): 6707-6726.
2. Lee YA, Cho EJ, Tanaka T, Yokozawa T. Inhibitory activities of proanthocyanidins from persimmon against oxidative stress and digestive enzymes related to diabetes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2007; 53(3): 287-292.
3. Zou B, Ge ZZ, Zhang Y, Du J, Xu Z, Li CM. Persimmon tannin accounts for hypolipidemic effects of persimmon through activating of AMPK and suppressing NF- $\kappa$ B activation and inflammatory responses in high-fat diet rats. *Food Funct* 2014; 5(7): 1536-1546.
4. Zou B, Li CM, Chen JY, Dong XQ, Zhang Y, Du J. High molecular weight persimmon tannin is a potent hypolipidemic in high-cholesterol diet fed rats. *Food Res Int* 2012; 48(2): 970-977.
5. Jang IC, Jo EK, Bae MS, Lee HJ, Jeon GI, Park E, Yuk HG, Ahn GH, Lee SC. Antioxidant and antigenotoxic activities of different parts of persimmon (*Diospyros kaki* cv. Fuyu) fruit. *J Med Plant Res* 2010; 4(2): 155-60.
6. Matsumoto K, Yokoyama S, Gato N. Hypolipidemic effect of young persimmon fruit in C57BL/6.KOR-ApoEshl mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; 72(10): 2651-2659.
7. Matsumoto K, Yokoyama S, Gato N. Bile acid-binding activity of young persimmon (*Diospyros kaki*) fruit and its hypolipidemic effect in mice. *Phytother Res* 2010; 24(2): 205-210.
8. Ahn Y, Gebereamanuel MR, Oh EK, Kwon O. Inhibitory effects of persimmon (*Diospyros kaki* Thumb.) against diet-induced hypertriglyceridemia/hypercholesterolemia in rats. *J Nutr Health* 2017; 50(3): 225-235.
9. Del Bubba M, Giordani E, Pippucci L, Cincinelli A, Checchini L, Galvan P. Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth and ripening and in response to different postharvest treatments. *J Food Compos Anal* 2009; 22(7-8): 668-677.
10. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 15th edition. Arlington (VA): Association of Official Analytical Chemists; 1990.
11. Adams MA, Bobik A, Korner PI. Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function. *Hypertension* 1989; 14(2): 191-202.
12. Karaman S, Toker ÖS, Yüksel F, Çam M, Kayacı A, Dogan M. Physicochemical, bioactive, and sensory properties of persimmon-based ice cream: technique for order preference by similarity to ideal solution to determine optimum concentration. *J Dairy Sci* 2014; 97(1): 97-110.
13. Dauchet L, Amouyel P, Hercberg S, Dallongeville J. Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. *J Nutr* 2006; 136(10): 2588-2593.
14. Zhao D, Zhou C, Sheng Y, Liang G, Tao J. Molecular cloning and expression of phytoene synthase, lycopene beta-cyclase, and beta-carotene hydroxylase genes in persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Plant Mol Biol Report* 2011; 29(2): 345-351.
15. Santos AD, Fonseca FA, Dutra LM, Santos MF, Menezes LR, Campos FR, Nagata N, Ayub R, Barison A. <sup>1</sup>H HR-MAS NMR-based metabolomics study of different persimmon cultivars (*Diospyros kaki*) during fruit development. *Food Chem* 2018; 239: 511-519.
16. Bitou N, Ninomiya M, Tsujita T, Okuda H. Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids* 1999; 34(5): 441-445.
17. Latha RC, Daisy P. Insulin-secretagogue, antihyperlipidemic and other protective effects of gallic acid isolated from Terminalia bellerica Roxb. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2011; 189(1-2): 112-118.
18. Hsu CL, Yen GC. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *Br J Nutr* 2007; 98(4): 727-735.
19. Ngamukote S, Mäkynen K, Thilawech T, Adisakwattana S. Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed. *Molecules* 2011; 16(6): 5054-5061.
20. Roth BD, Blankley CJ, Hoeffle ML, Holmes A, Roark WH, Trivedi BK, Essenburg AD, Kieft KA, Krause BR, Stanfield RL. Inhibitors of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. 1. Identification and structure-activity relationships of a novel series of fatty acid anilide hypocholesterolemic agents. *J Med Chem* 1992; 35(9): 1609-1617.
21. Seo JB, Moon HM, Kim WS, Lee YS, Jeong HW, Yoo EJ, Ham J, Kang H, Park MG, Steffensen KR, Stulnig TM, Gustafsson JA, Park SD, Kim JB. Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression. *Mol Cell Biol* 2004; 24(8): 3430-3444.
22. Chen W, Yang CC, Sheu HM, Seltmann H, Zouboulis CC. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor and CCAAT/enhancer binding protein transcription factors in cultured human sebocytes. *J Invest Dermatol* 2003; 121(3): 441-447.
23. Lee SM, Han HW, Kim Y. JNK-mediated SREBP-2 processing by genistein up-regulates LDLR expression in HepG2 cells. *Nutr Food Sci* 2014; 4: 308.
24. Russell DW, Setchell KD. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 1992; 31(20): 4737-4749.
25. Hashimoto K, Cohen RN, Yamada M, Markan KR, Monden T, Satoh T, Mori M, Wondisford FE. Cross-talk between thyroid hormone receptor and liver X receptor regulatory pathways is revealed in a thyroid hormone resistance mouse model. *J Biol Chem* 2006; 281(1): 295-302.
26. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH Jr, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 2006; 354(12): 1264-1272.
27. Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, Gao B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Shaw RJ, Cohen RA, Zang M. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2011; 13(4): 376-388.