

지방질다당류로 자극한 RAW 264.7 세포에서 청도반시 땀감 에틸 아세테이트 분획물의 항염증 효과

박예빈^{1,2} · 정하람^{1,2} · 이승환³ · 김태완³ · 김대옥^{1,2,*}

¹경희대학교 식품생명공학과, ²경희대학교 피부생명공학센터, ³안동대학교 식품생명공학과

Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction of unripe astringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi) on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells

Ye Bin Park^{1,2}, Ha-Ram Jeong^{1,2}, Seung Hwan Lee³, Taewan Kim³, and Dae-Ok Kim^{1,2,*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University

²Skin Biotechnology Center, Kyung Hee University

³Department of Food Science and Biotechnology, Andong National University

Abstract Unripe astringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi) is a by-product produced when thinning out the superfluous fruit of persimmon. We investigated whether unripe astringent persimmon has antioxidative and anti-inflammatory effects. Unripe astringent persimmon extract was fractionated sequentially in *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, and water. The ethyl acetate fraction had the highest total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant capacity compared to those of the other fractions. Pretreatment of lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages with the ethyl acetate fraction reduced nitric oxide, interleukin-6, and intracellular oxidative stress in a dose-dependent manner. Ultra-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis revealed gallic acid, protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, quercetin-3-*O*-glucoside, quercetin, and *p*-coumaric acid as the phenolic compounds of the ethyl acetate fraction. Collectively, these findings suggest that unripe astringent persimmon is a source of functional materials that can promote antioxidative and anti-inflammatory effects.

Keywords: antioxidant capacity, by-product, cytokine, oxidative stress, phenolic compound

서 론

감(*Diospyros kaki*)은 감나무과(*Ebenaceae*)에 속하는 섬유질이 풍부한 과일로서 중국, 한국, 일본, 브라질, 터키, 이탈리아 등의 온대 지역에서 재배된다(Butt 등, 2015). 감은 바이타민 C (vitamin C), 카로테노이드(carotenoids), 테르페노이드(terpenoids), 파이토스테롤(phytosterols), 나프토퀴논(naphthoquinones) 등과 같은 생리활성물질을 함유하고 있다(Mallavadhani 등, 1998). 감의 페놀 화합물(phenolic compounds)로는 타닌(tannins), 퀘르세틴(quercetin), 캄페롤(kaempferol), 에피카테킨(epicatechin), 페룰산(ferulic acid), 갈산(gallic acid), 프로토키테추산(protocatechuic acid), 바닐산(vanillic acid), 파라-쿠마르산(*p*-coumaric acid) 등이 존재하는 것으로 보고되었다(Butt 등, 2015; Jeong 등, 2018).

염증 반응(inflammatory response)은 병원균에 대한 주요한 방어 기작이며, 인체 내에서 미생물, 바이러스 감염으로부터 보호

하는 주요 반응이다(Azad 등, 2008). 일반적으로 염증 반응은 병리학적으로 손상된 조직 제거 또는 복구하는 역할을 하지만, 만성 염증 반응은 염증세포에서 활성 산소/질소(reactive oxygen/nitrogen species)를 과도하게 발생시켜 산화 스트레스(oxidative stress)를 유발하고, 이로 인해 단백질, 지질, DNA, RNA의 변형을 초래하며 세포 구조와 기능의 손상을 야기한다(Ryter 등, 2007). 산화 스트레스는 당뇨병, 고혈압, 심혈관 질환, 퇴행성 신경 질환, 알코올 간 질환, 만성 신장 질환, 암, 노화 등 많은 만성 질환의 발생과 관련이 있다(Biswas, 2016). 염증과 산화 스트레스는 서로 밀접한 병리학적 연관성을 가지고 있으며, 염증 반응 완화와 산화 스트레스 조절은 만성질환 예방의 중요한 요소이다.

페놀 화합물은 식물의 2차 대사산물 중 하나로 산화 스트레스와 염증을 저해하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Bennett와 Wallsgrove, 1994; Hussain 등, 2016). 일반적으로 페놀 화합물은 과일, 채소 등에 함유되어 있으며, 재배 또는 가공 과정에서 발생하는 씨, 껍질, 과육과 같은 농업 부산물도 역시 다양한 페놀 화합물, 바이타민, 식이섬유를 가지고 있다(Schieber 등, 2001). 농업 부산물은 제조 공정을 통해 생리활성 효능이 향상될 수 있으며, 천연 산화방지제(antioxidant)로서 적용 가능한 잠재적 가치를 가지고 있다(Schieber 등, 2001; Torres 등, 2002).

전 세계 감의 약 87%를 중국, 한국, 일본에서 생산하고 있으며, 2007년 기준 우리나라의 감 생산 규모는 중국에 이어 세계

*Corresponding author: Dae-Ok Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Korea
Tel: +82-31-201-3796

Fax: +82-31-204-8116

E-mail: DOKIM05@khu.ac.kr

Received December 28, 2018; revised February 1, 2019;

accepted February 2, 2019

2위를 차지하고 있다(Butt 등, 2015). 상품성을 가지는 감이 생산되기 위해서는 미숙과인 땀감의 상태에서 적과의 과정을 거치는데, 이 과정 중에 생기는 부산물은 대부분 폐기되어 땀감의 활용성이 요구되고 있는 실정이다(Shin 등, 2000). 감으로부터 각종 유기용매를 이용하여 얻은 분획물(fraction)에는 산화방지능, 항염증, 간세포 보호능이 있다고 보고 되었으며(Kim 등, 2011a; Lee 등, 2014), 감잎, 감껍질, 감꼭지 등과 같은 비가식 부분을 활용한 산화방지능, 항염증 및 신경세포 보호능에 대한 연구도 보고되고 있다(Hossain 등, 2018; Jeon 등, 2014; Jeong 등, 2018). 하지만 적과 과정에서 발생되어 버려지는 땀감에 대한 연구는 미미하다. 따라서 본 연구는 각종 유기용매를 이용하여 적과한 청도반시 땀감(unripe *Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi)의 분획물을 확보한 후, 가장 높은 산화방지능을 갖는 에틸 아세테이트(ethyl acetate) 분획물을 이용하여 지방질다당류(lipopolysaccharide; LPS)로 자극한 RAW 264.7 세포에서 항염증 효과를 평가하였다. 에틸 아세테이트 분획물에 존재하는 페놀 화합물은 ultra-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS)를 이용하여 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 청도반시 땀감은 경북 청도군에서 2017년도 8월말에 적과하여 실험재료로 사용하였다. 동결 건조한 후 분쇄기(FM-909W; Hanil Electric, Seoul, Korea)를 이용하여 분쇄하여 -20°C 에서 보관하였다.

시약

폴린-시오칼토 페놀 시약(Folin & Ciocalteu's phenol reagent), 2,2'-아지노-바이스(3-에틸벤조사이아졸린-6-설폰산)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); ABTS), 2,2-다이페닐-1-피크릴 하이드라질(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH), 바이타민 C, 염화 알루미늄(aluminium chloride), 2,2'-아조바이스(2-메틸프로피온아마이드) 다이하이드로클로라이드(2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride; AAPH), 갈산, 카테킨(catechin), 아질산 소듐(sodium nitrite), 3-(4,5-다이메틸싸이아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT), 다이메틸 설펡사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO), 2',7'-다이클로로플루오레세인 다이아세테이트(2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA), 인산완충 식염수(phosphate buffered saline; PBS), 지방질다당류, 그리스 시약(Griess reagent), 폼산(formic acid)은 Sigma-Aldrich Co., LLC. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 트윈 20(polyoxyethylene sorbitan monolaurate; Tween 20)은 Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)에서 구입하였다. 에탄올(ethyl alcohol, 95%), 노말-헥세인(n-hexane, 95%), 클로로폼(chloroform, 99.5%), 에틸 아세테이트(99%), 노말-부탄올(n-butanol, 99%), 아세토나이트릴(acetonitrile, HPLC grade), 수산화 소듐(sodium hydroxide)은 Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. (Siheung, Korea)로부터 구입하였다. 탄산 소듐(sodium carbonate)은 Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd. (Kyoto, Japan)에서 구입하였다. Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), 돌베코의 인산완충 식염수(Dulbecco's phosphate buffered saline; DPBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin), 소태아 혈청(fetal

bovine serum; FBS)은 Welgene Inc. (Gyeongsan, Korea)에서 구입하였다. 인터류킨-6(interleukin-6; IL-6) 효소 결합 면역 흡착 검사(enzyme linked immunosorbent assay; ELISA) 키트, 3,3',5,5'-테트라메틸벤자이드(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; TMB)은 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

추출 및 분획

동결 건조한 땀감 3g과 40% (v/v) 에탄올-물 혼합 용액 100 mL를 각각 섞은 후 균질기(PT 10/35; Kinematica, Kriens-Luzern, Switzerland)를 이용하여 15,000 rpm에서 2분 동안 균질화하였다. 그 후 원심분리기(VS-6000CFi; Vision Science Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 이용하여 10분 동안 2,200×g에서 원심분리하였다. 원심분리 된 상층액은 와트만 no. 2(Whatman International Limited, Kent, England) 여과지를 이용하여 여과하였으며, 여과막은 동일한 조건으로 1회 더 반복 추출했다. 여과액은 회전식 진공 농축기(N-1000; Eyla, Tokyo, Japan)를 사용하여 항온수조 40°C 에서 감압 농축하였다. 200 mL의 증류수를 가한 후, 노말-헥세인, 클로로폼, 에틸 아세테이트, 노말-부탄올, 물(water)의 순으로 동일한 양으로 가해주어 액체-액체 추출(liquid-liquid extraction)법으로 분획을 시행하여 분획물을 얻었다. 각 분획물은 회전식 진공 농축기(N-1000)로 농축한 후 -20°C 에 저장하여 실험에 사용하였다.

총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 산화방지능 측정

땀감 분획물들의 총 페놀 함량은 폴린-시오칼토 페놀 시약을 이용한 발색법(Singleton과 Rossi, 1965)으로 측정하였다. 200 μL 의 각 분획물 용액에 2.6 mL의 증류수를 넣은 후 폴린-시오칼토 페놀 시약 200 μL 를 혼합하여 6분간 상온에서 반응시켰다. 이후에 7% (w/v) 탄산 소듐 용액 2 mL를 첨가한 후 84분 동안 반응시킨 다음 분광광도계(SPECTRONIC 200; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 땀감 분획물들의 총 페놀 함량은 갈산을 사용하여 표준곡선(standard curve)을 작성한 후 정량하였으며, mg 갈산 당량(gallic acid equivalents)/100 g 분획물로 나타내었다.

땀감 분획물들의 총 플라보노이드 함량은 변형된 Kim 등(2003)의 방법으로 측정하였다. 500 μL 의 각 분획물 용액과 3.2 mL의 증류수 첨가한 후, 5% (w/v) 아질산 소듐 150 μL 를 혼합하여 5분간 반응시켰다. 10% (w/v) 염화 알루미늄 용액 150 μL 를 첨가하여 1분간 추가로 반응시킨 후, 1 M 수산화 소듐 용액 1 mL를 넣고 혼합하여 510 nm에서 분광광도계(SPECTRONIC 200)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 플라보노이드 함량은 카테킨을 이용하여 표준 곡선으로 정량하였으며, mg 카테킨 당량(catechin equivalents)/100 g 분획물로 나타내었다.

산화방지능은 라디칼 소거능에 기반한 ABTS법과 DPPH법을 이용하여 측정하였다. ABTS법을 이용한 산화방지능은 Kim 등(2002)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 100 mL 인산완충 식염수에 1.0 mM AAPH와 2.5 mM ABTS가 되도록 혼합한 후, 70°C 항온수조에서 30분 동안 반응시켜 ABTS 라디칼 용액을 만들었다. ABTS 라디칼 용액은 734 nm에서 0.650 ± 0.020 의 흡광도가 되도록 인산완충 식염수로 희석하였다. ABTS 라디칼 용액 980 μL 와 각 분획물 용액 20 μL 를 혼합하고, 항온수조 37°C 에서 10분간 반응 후, 734 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 산화방지능은 바이타민 C의 표준 곡선을 이용하여 정량하였고, mg 바이타민 C 당량(vitamin C equivalents)/100 g 분획물로 나타내었다.

DPPH 라디칼을 이용한 산화방지능은 Brand-Williams 등(1995)의 방법을 변형하여 측정하였다. 200 mL 80% (v/v) 메탄올-물 혼

합 용액을 사용하여 1.0 mM DPPH 라디칼 용액을 제조한 후, 517 nm에서 0.650 ± 0.020 의 흡광도가 되도록 DPPH 라디칼 용액을 80% (v/v) 메탄올-물 혼합 용액으로 희석하였다. 각 분획물 용액 50 μ L에 DPPH 라디칼 용액 2.95 mL를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후, 517 nm 흡광도 감소를 측정하였다. 산화방지능은 바이타민 C의 표준 곡선을 이용하여 정량하였고, mg 바이타민 C 당량/100 g 분획물로 나타내었다.

세포 배양

본 실험에 사용한 RAW 264.7 세포는 설치류 유래 대식세포주인 Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양을 위해서 10% (v/v) 열 불활성 FBS, 100 units/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기(CO₂ incubator BB 15; Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Germany)에 배양하였다.

세포 생존율 측정

땀감 에틸 아세테이트 분획물의 RAW 264.7 대식세포에 대한 독성은 Heo 등(2001)의 MTT법을 변형하여 측정하였다. 땀감 에틸 아세테이트 분획물의 세포 독성 평가를 위해 96-well plate에 RAW 264.7 세포를 5.0×10^3 cells/well로 분주하여 24시간 배양하였으며, 배지 제거 후, 땀감 에틸 아세테이트 분획물이 포함된 배지를 10, 20, 50, 100 μ g/mL의 농도로 100 μ L씩 분주하여 다시 24시간 동안 배양하였다. MTT 시약 100 μ L를 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후, DMSO를 50 μ L씩 분주하여 보라색의 포마잔(formazan)을 용해시켰으며, 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200; Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)의 세포 생존율 대비 90% 이상의 생존율을 보인 땀감 에틸 아세테이트 분획물의 최대무독성 농도 이하에서 세포 실험을 수행하였다.

산화 질소(NO) 측정

산화 질소 측정은 그리스 시약 반응을 통해서 측정하였다. RAW 264.7 대식세포를 48-well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 배양하였다. 배지 제거 후, 땀감 에틸 아세테이트 분획물이 포함된 배지로 처리하고 100 ng/mL의 지방질다당류로 자극하여 24시간 동안 추가로 배양하였다. 48-well plate에 포함된 배지 상층액들은 96-well plate에 50 μ L씩 옮긴 후 50 μ L 그리스 시약을 처리하여 23°C 암실에서 15분간 반응시켰으며, 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지방질다당류로 자극한 RAW 264.7 대식세포에서 발생된 배지 내 아질산염 농도를 확인하기 위해 아질산 소듐의 표준 곡선을 이용하여 정량하였다.

전염증성 사이토카인 분비량 측정

세포 배양액 내의 IL-6의 분비량은 ELISA 키트를 사용하여 샌드위치 ELISA (sandwich ELISA) 방식으로 측정하였다. ELISA를 위한 96-well microplate에 100 μ L의 포획 항체(capture antibody)를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 정치하였다. 그 후 0.05% 트윈 20이 포함된 인산완충 식염수(phosphate buffered saline with 0.05% (v/v) Tween 20; PBS-T, pH 7.4 \pm 0.1)로 각 well을 세척해주었다. 10% (v/v) FBS가 포함된 인산완충 식염수 200 μ L씩 분주하여 1시간 동안 블로킹(blocking)하고 PBS-T로 세척한 후 배양 상층액을 100 μ L씩 분주하였다. 2시간 뒤에 PBS-T로 5회 세

척 후, 검출 항체(detection antibody)와 아비딘-양고추냉이 과산화 효소 집합체(avidin-horseradish peroxidase conjugate) 100 μ L를 분주한 후에 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척한 다음, 기질 용액인 TMB를 100 μ L 처리하였다. 상온에서 30분 동안 암반응시킨 후, 2 N 황산 50 μ L씩 분주하여 반응을 종결시켰으며, 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 내 산화 스트레스 측정

세포 내 산화 스트레스 측정은 DCFH-DA를 이용한 형광 탐침법(fluorescence probe method)을 사용하였다. RAW 264.7 대식세포를 96-well plate에 5.0×10^3 cells/well로 분주하여 24시간 배양하였다. 배지 제거 후, 땀감 에틸 아세테이트 분획물을 전처리하여 24시간 동안 추가로 배양한 뒤, 50 μ M DCFH-DA가 포함된 HBSS를 100 μ L씩 분주하여 1시간 동안 처리하였다. HBSS를 제거한 후, 다시 20 μ M AAPH가 포함된 HBSS를 100 μ L를 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후에 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 들뜸(excitation)은 485 nm, 방출(emission)은 530 nm에서 측정하였다. 세포 내 산화 스트레스는 대조군(100%)과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

UPLC-ESI-MS/MS 이용 페놀 화합물 동정

땀감 에틸 아세테이트 분획물에 존재하는 페놀 화합물을 UPLC-ESI-MS/MS (ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S micro IVD System; Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 분리하는 C₁₈ 역상 컬럼(Polar C18 Luna Omega, 150 \times 2.1 mm, 2.7 μ m; Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 이용하였다. 이동상 용매는 0.1% (v/v) 폼산이 포함된 증류수(A)와 0.1% (v/v) 폼산이 포함된 아세트오나이트릴(B)을 이용하였으며, 2 μ L의 시료를 주입하여 이동상 용매 조건에 따라 0.2 mL/min의 유속으로 흘러주었으며, 컬럼 오븐의 온도는 25°C로 설정하였다. ESI의 조건은 음이온 모드(negative ion mode)를, 커튼 가스(curtain gas)는 질소 가스를, 건조 가스(dry gas)는 350°C로 가열된 질소 가스를 사용하였다. 이동상 용매 A와 B를 98% A/2% B에서 시작하여 5분 98% A/2% B, 20분 10% A/90% B, 23분 10% A/90% B, 26분 98% A/2% B, 30분 98% A/2% B와 같은 조건으로 흘러주며 사용하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며 통계 분석은 SPSS 프로그램(version 23.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 각 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원 배치분산분석(one-way analysis of variance)을 실시하였고, $p < 0.05$ 유의수준에서 던컨다중검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의차를 검증하였다.

결과 및 고찰

총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 산화방지능

적과한 청도반시 땀감 분획물들의 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 산화방지능을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 총 페놀 함량은 에틸 아세테이트>노말-부탄올>물>클로로포름>노말-헥세인 순서로 낮아졌다. 에틸 아세테이트 분획물은 유의적으로 ($p < 0.05$) 가장 높은 총 페놀 함량을 보였으며, 이는 가장 낮은 함량을 나타낸 노말-헥세인 분획물보다 약 37배 높은 값이었다.

Table 1. Total phenolic and flavonoid contents, and antioxidant capacities of five fractions of unripe astringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi)

	Total phenolic content (mg gallic acid equivalents/100 g fraction)	Total flavonoid content (mg catechin equivalents/ 100 g fraction)	Antioxidant capacity (mg vitamin C equivalents/100 g fraction)	
			ABTS ¹⁾	DPPH ²⁾
<i>n</i> -hexane	110.1±23.5 ³⁾⁴⁾	7.7±3.3 ^b	69.7±38.2 ^c	82.9±53.7 ^b
chloroform	415.7±82.6 ^{cd}	40.0±17.3 ^b	661.6±103.4 ^c	385.0±113.5 ^b
ethyl acetate	4,121.0±571.1 ^a	1,539.2±519.4 ^a	12,716.5±2,362.9 ^a	13,191.5±3,504.4 ^a
<i>n</i> -butanol	1,889.4±161.1 ^b	494.1±270.5 ^b	4,420.7±633.9 ^b	2,810.6±1,100.8 ^b
water	706.2±231.4 ^c	206.0±65.4 ^b	1,728.2±232.1 ^c	1,039.8±176.7 ^b

¹⁾2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical scavenging assay

²⁾2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay

³⁾Data are expressed as means±standard deviations (n=3).

⁴⁾Mean with different superscripts in the same column indicate significant difference by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

땀감 각 분획물의 총 플라보노이드 함량은 에틸 아세테이트>노말-부탄올>물>클로로폼>노말-헥세인 순서로 낮아졌다. 에틸 아세테이트 분획물의 총 플라보노이드 함량은 가장 낮은 값을 보인 노말-헥세인 분획물보다 약 200배 높았다.

ABTS법과 DPPH법을 이용한 산화방지능은 땀감 각 분획물에서 에틸 아세테이트>노말-부탄올>물>클로로폼>노말-헥세인 순서로 낮아졌다. 에틸 아세테이트 분획물이 유의적($p<0.05$) 차이를 보이며 가장 높은 활성을 보였으며, 에틸 아세테이트 분획물의 산화방지능은 노말-헥세인 분획물보다 ABTS법에서 약 182배, DPPH법 약 159배 더 높은 수치를 보였다.

꽃감과 꺾은 감의 여러 분획물 중에서 에틸 아세테이트 분획물이 가장 높은 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 산화방지능을 가졌다고 보고되었다(Kim 등, 2011a; Lee 등, 2014). Jeong 등(2018)은 감 껍질의 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 산화방지능 역시 에틸 아세테이트 분획물에서 가장 높았다고 보고하였다. 본 연구에서도 땀감을 이용한 각 분획물 중에 에틸 아세테이트 분획물이 가장 높은 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 산화방지능을 보였다. 이는 감 유래 소재들의 페놀 화합물이 다른 분획물에 비해 에틸 아세테이트 분획물에 많이 존재하는 것을 의미한다. 본 연구에서 사용한 적과한 청도반시 땀감 에틸 아세테이트 분획물의 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 산화방지능은 기존에 보고된 꺾은 감 및 꺾은 감 에틸아세테이트 분획물에 비해 상대적으로 낮은 결과치를 보였다(Kim 등, 2011a; Lee 등, 2014). 이는 상이한 품종, 가공 조건, 재배지역 차이 등의 요인에서 비롯된 것으로 판단된다.

세포 생존율

적과 땀감의 에틸 아세테이트 분획물이 RAW 264.7 대식세포에 미치는 독성을 확인하기 위해 여러 농도(10, 20, 50, 100 µg/mL) 분획물을 처리한 후, MTT법을 이용해 세포 독성을 평가하였다. 처리한 각 농도에서 에틸 아세테이트 분획물은 무처리군인 대조군과 비교하여 모두 유의적($p<0.05$) 차이가 없는 세포 생존율을 보여 독성이 없는 것을 확인하였다(data not shown). 따라서 이후 실험에서는 에틸 아세테이트 분획물의 최대 농도 100 µg/mL 범위 내에서 진행하였다.

산화 질소 측정

지방질다당류로 자극한 RAW 264.7 대식세포 내의 산화 질소 측정 결과는 Fig. 1과 같다. 지방질다당류만 처리한 RAW 264.7 대식세포에서 12.8 µM 산화 질소가 생성되었다. 땀감 에틸 아세

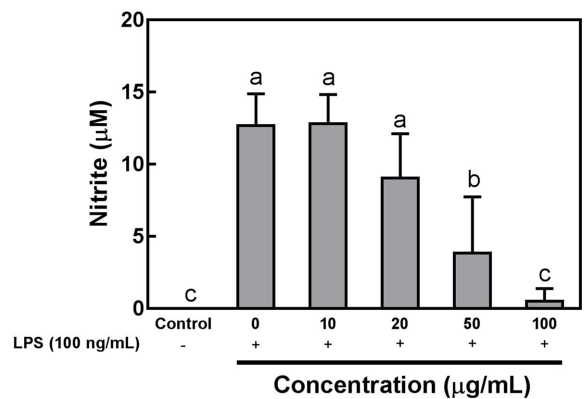


Fig. 1. Inhibitory effects of the ethyl acetate fraction from unripe astringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi) on nitrite production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. Each bar represents the mean±standard deviation of three replicates. Different letters on the bars represent significant difference of the means by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

테이트 분획물을 처리하였을 때 산화 질소는 농도 의존적으로 생성이 억제되었다. 50 µg/mL의 농도로 땀감 에틸 아세테이트 분획물을 처리한 군에서는 지방질다당류만 처리한 군과 비교했을 때 약 44%까지 산화 질소 생성이 유의적($p<0.05$)으로 감소하였다. 특히, 땀감 에틸 아세테이트 분획물 100 µg/mL의 농도로 처리한 군에서는 대조군과 대비하여 산화 질소 생성이 유의적($p<0.05$) 차이를 보이지 않았다.

산화 질소는 세포 사이의 신호 전달 물질 또는 독성을 유발하는 물질로서 다양한 조직에서 생성되며, 포유류에서는 혈관 이완제, 신경전달물질 및 혈소판 결합 억제제 등으로 작용한다(Coleman, 2001). 생체 내에서 합성 효소에 의해 레보-아르지닌(L-arginine)으로부터 생성된 산화 질소는 일련의 활성 질소의 발생에 관여하여 염증 반응을 가속화시키고 조직 손상을 야기할 수도 있다(Coleman, 2001). Jeon 등(2014)은 감껍질, 감잎 및 감꼭지 추출물이 산화 질소 생성을 억제한다고 보고하였으며, 이는 감의 각 부위에 존재하는 플라보노이드에 기인하는 것으로 여겨진다. 본 연구에서도 지방질다당류로 자극한 RAW 264.7 세포에서 산화 질소 생성 저해는 청도반시 땀감 에틸 아세테이트 분획물에 존재하는 플라보노이드와 같은 페놀 화합물의 작용에 의한 것으로 판단된다.

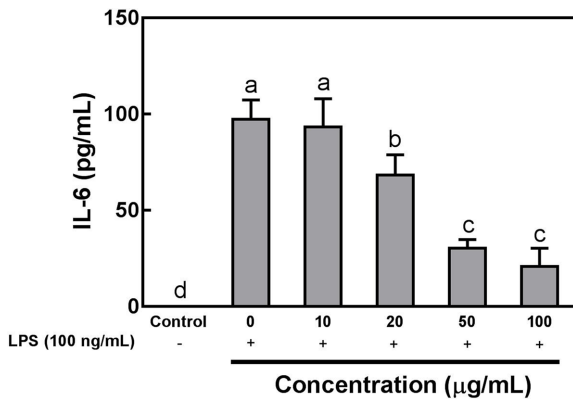


Fig. 2. Inhibitory effects of the ethyl acetate fraction from unripe astringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi) on inflammatory cytokine interleukin 6 (IL-6) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. Each bar represents the mean±standard deviation of three replicates. Different letters on the bars represent significant difference of the means by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

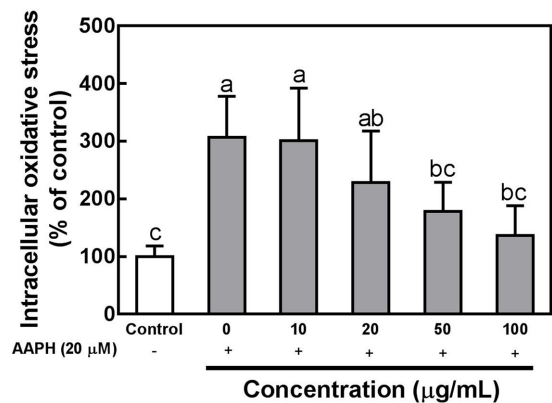


Fig. 3. Effects of the ethyl acetate fraction from unripe astringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi) on intracellular oxidative stress in RAW 264.7 cells against oxidative stress induced with AAPH using the DCFH-DA assay. Each bar represents the mean±standard deviation of three replicates. Different letters on the bars represent significant difference of the means by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

전염증성 사이토카인 분비량 측정

지방질다당류로 자극한 RAW 264.7 대식세포에서의 IL-6의 생성 저해능 결과는 Fig. 2와 같다. 지방질다당류만 처리한 군에서 IL-6는 97 ng/mL를 보였다. 팽감 에틸 아세테이트 분획물을 처리한 군에서는 농도 의존적으로 IL-6 생성이 저해되었다. 팽감 에틸 아세테이트 분획물을 50과 100 µg/mL 농도로 처리한 군에서 지방질다당류만을 처리한 군과 비교했을 때, 각각 69%와 79% 수준까지 IL-6 생성이 유의적($p < 0.05$)으로 감소하였다.

지방질다당류는 단세포, 수지상세포, 대식세포, B세포 등에서 유사 수용체 4 (Toll-like receptor 4)에 결합하여 염증반응을 유도하는 것으로 알려져 있다. 지방질다당류는 다양한 전염증성 사이토카인의 조절을 위해 세포의 전염증성 전사 인자인 핵 인자- κ B (nuclear factor κ B; NF- κ B)를 활성화시켜 프로스타글란딘 E₂ (prostaglandin E₂), 산화 질소와 같은 염증 인자와 IL-6, 종양 괴사 인자-알파(tumor necrosis factor- α) 등의 전염증성 인자를 생성시켜 염증 반응을 유도한다(Janssens와 Beyaert, 2003). Kim 등(2011b)은 청도반시 감과 감꼭지 추출물이 IL-6의 생성을 저해한다고 보고하였다. 본 연구에서 지방질다당류에 의해 유도되는 주요 염증성 사이토카인 IL-6의 생성량이 팽감 에틸 아세테이트 분획물에 의해 저해되었으며, 팽감 에틸 아세테이트 분획물이 항염증 효과를 가지는 것을 확인하였다.

세포 내 산화 스트레스 측정

RAW 264.7 대식세포에서 팽감 에틸 아세테이트 분획물이 AAPH로 유도된 산화 스트레스에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. AAPH를 20 µM을 처리한 군에서는 AAPH를 처리하지 않은 대조군 대비 약 206%까지 산화 스트레스가 증가하였다. 팽감 에틸 아세테이트 분획물을 처리하였을 때, RAW 264.7 세포 내 산화 스트레스는 농도 의존적으로 감소하였다. 50과 100 µg/mL의 농도로 팽감 에틸 아세테이트 분획물을 처리한 군에서 AAPH만을 처리한 대비하여 산화 스트레스는 각각 128%와 170% 감소하였으며, 대조군과는 유의적($p < 0.05$) 차이를 보이지 않았다.

RAW 264.7 대식세포 내 산화 스트레스의 완화는 팽감 에틸 아세테이트 분획물에 존재하는 페놀 화합물 같은 산화방지제가

세포 내에 생성된 활성 산소를 제거하였기 때문으로 판단된다. 또는 항염증 작용에 의하여 활성 산소의 생성이 억제되는 것으로 미루어 보아(Hussain 등, 2003), 팽감 에틸 아세테이트 분획물이 염증성 사이토카인 분비를 저해하고 활성 산소/질소의 생성을 억제하여 RAW 264.7 대식세포 내 산화 스트레스의 완화에 기여했을 것으로 여겨진다. 본 연구에 사용한 팽감 에틸 아세테이트 분획물은 산화 질소 및 IL-6의 생성을 저해하여 항염증 효과를 가지는 것으로 나타났다.

UPLC-ESI-MS/MS 이용 페놀 화합물 동정

청도반시 팽감에서 얻어진 에틸 아세테이트 분획물에 존재하는 페놀 화합물을 분석하고자 UPLC-ESI-MS/MS를 이용하였다. UPLC-ESI-MS/MS 분석을 통해 팽감 에틸 아세테이트 분획물에서 갈산, 프로토키테추산, 4-하이드록시벤조산, 퀘서틴-3-O-글루코사이드(querctin-3-O-glucoside), 파라-쿠마르산, 퀘서틴을 확인하였다(Fig. 4, Table 2).

감은 갈산의 영향에 의해 상대적으로 높은 산화방지능을 가지는 과일 중 하나로 알려져 있다(Chen 등, 2008; Suzuki 등, 2005). Chen 등(2008)에 따르면 중국 감인 *D. kaki* L. cv. Mopan에서 갈산 함량이 상대적으로 다른 페놀 화합물에 비해 더 많다고 보고하였다. Park(2010)의 연구에 따르면 지방질다당류에 의해 활성화된 마우스 대식세포에서 갈산이 인터루킨 생성을 저해함으로써 연관된 염증질환에 대한 예방 소재로 활용할 수 있다고 보고하였다. Winter 등(2017)은 프로토키테추산이 지방질다당류에 의해 유도되는 산화 질소 생성을 저해하여 항염증 효과를 가진다고 보고하였으며, Comalada 등(2005)은 퀘서틴과 퀘서틴-3-O-글루코사이드가 핵 인자- κ B 경로를 억제함으로써 항염증 효과를 가진다고 보고하였다. Comalada 등(2006)은 지방질다당류로 자극한 BALB/c 마우스의 골수유래 대식세포(bone marrow-derived macrophages)에서 핵 인자- κ B 경로 저해와 관련이 있는 산화 질소 및 종양 괴사 인자-알파의 생성을 퀘서틴이 저해하여 항염증 작용을 한다고 보고하였다. 본 연구에서 사용한 적과 청도반시 팽감 에틸 아세테이트 분획물에 존재하는 퀘서틴과 같은 페놀 화합물들은 산화방지능 및 항염증 효과에 기여하는 것으로 판단된다.

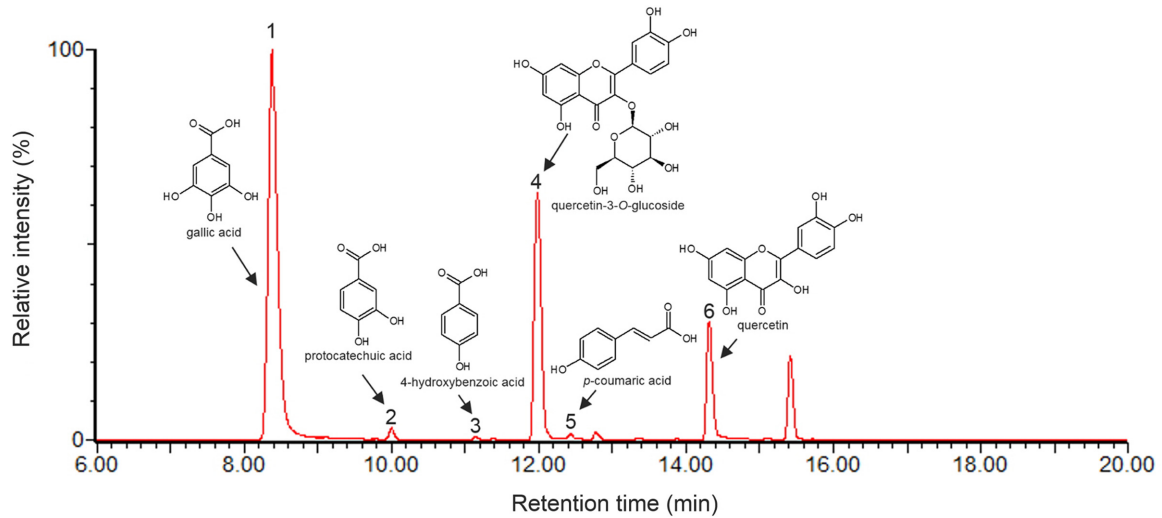


Fig. 4. UPLC-ESI-MS/MS chromatogram of the ethyl acetate fraction from unripe astringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi). Peak 1, gallic acid; peak 2, protocatechuic acid; peak 3, 4-hydroxybenzoic acid; peak 4, quercetin-3-*O*-glucoside; peak 5, *p*-coumaric acid; peak 6, quercetin.

Table 2. Identification of phenolic compounds in the ethyl acetate fraction of unripe astringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi) using UPLC-ESI-MS/MS

Peak number ¹⁾	Retention time (min)	Molecular ion (m/z, [M+H] ⁺)	Formula ([M+H] ⁺)	Identification
1	8.37	169	C ₇ H ₅ O ₅	gallic acid
2	9.99	153	C ₇ H ₅ O ₄	protocatechuic acid
3	11.14	137	C ₇ H ₅ O ₃	4-hydroxybenzoic acid
4	11.98	463	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	quercetin-3- <i>O</i> -glucoside
5	12.42	163	C ₉ H ₇ O ₃	<i>p</i> -coumaric acid
6	15.42	301	C ₁₅ H ₉ O ₇	quercetin

¹⁾Peak number is assigned on the chromatogram of Fig. 4.

요 약

본 연구에서는 적과한 청도반시 땀감을 40% (v/v) 에탄올-물 혼합 용액으로 추출하고, 이 추출물을 액체-액체 추출법으로 5개 분획물(노말-헥세인, 클로로폼, 에틸 아세테이트, 노말-부탄올, 물)을 얻었다. 5개 분획물 중에서 에틸 아세테이트 분획물이 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 산화방지능이 가장 높았다. 에틸 아세테이트 분획물은 지방질다당류로 자극한 RAW 264.7 세포에서 산화 질소, IL-6, 산화 스트레스를 감소시켰다. UPLC-ESI-MS/MS를 이용하여 땀감 에틸 아세테이트 분획물에서 페놀 화합물로 갈산, 프로토크테추산, 4-하이드록시벤조산, 퀘르틴-3-*O*-글루코사이드, 파라-쿠마르산, 퀘르틴을 동정하였다. 본 연구를 통해서 적과 과정에서 부산물로 버려지는 청도반시 땀감이 산화방지능 및 항염증 효과를 보유한 기능성 소재로서 활용될 가능성을 제시하였다. 그러나 향후 적과한 청도반시 땀감의 산화방지능에 기반한 항염증 효과를 좀 더 명확하게 밝히기 위해서는 청도반시 땀감에 존재하는 개별 생리활성물질의 정량 분석 및 항염증에 대한 분자생물학적 메커니즘을 규명할 필요가 있다.

감사의 글

본 연구는 산림청(한국임업진흥원) 산림과학기술 연구개발사업(과제번호: 2016017D10-1819-AB02)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

References

Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* 11: 1-15 (2008)

Bennett RN, Wallsgrove RM. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* 127: 617-633 (1994)

Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016: 5698931 (2016)

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28: 25-30 (1995)

Butt MS, Sultan MT, Aziz M, Naz A, Ahmed W, Kumar N, Imran M. Persimmon (*Diospyros kaki*) fruit: hidden phytochemicals and health claims. *EXCLI J.* 14: 542-561 (2015)

Chen XN, Fan JF, Yue X, Wu XR, Li LT. Radical scavenging activity and phenolic compounds in persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Mopan). *J. Food Sci.* 73: C24-C28 (2008)

Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* 1: 1397-1406 (2001)

Comalada M, Ballester I, Bailón E, Sierra S, Xaus J, Gálvez J, Sánchez de Medina F, Zarzuelo A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem. Pharmacol.* 72: 1010-1021 (2006)

Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Gálvez J, Zarzuelo A. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-κB pathway. *Eur. J. Immunol.* 35: 584-592 (2005)

- Heo H-J, Cho H-Y, Hong B, Kim H-K, Kim E-K, Kim B-G, Shin D-H. Protective effect of 4',5-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against A β -induced oxidative stress in PC12 cells. *Amyloid-J. Protein Fold. Disord.* 8: 194-201 (2001)
- Hossain A, Moon HK, Kim J-K. Antioxidant properties of Korean major persimmon (*Diospyros kaki*) leaves. *Food Sci. Biotechnol.* 27: 177-184 (2018)
- Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3: 276-285 (2003)
- Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016: 7432797 (2016)
- Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 637-646 (2003)
- Jeon IH, Kang HJ, Lee H-S, Shin JH, Park YG, Jeong S-I, Jang SI. Antioxidant and anti-inflammatory activities of water-soluble extracts from different parts of Kojongsi persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 505-510 (2014)
- Jeong D-W, Cho CH, Lee JS, Lee SH, Kim T, Kim D-O. Deastrin-gent peel extracts of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi) protect neuronal PC-12 and SH-SY5Y cells against oxidative stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1094-1104 (2018)
- Kim D-O, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81: 321-326 (2003)
- Kim D-O, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3713-3717 (2002)
- Kim EO, Lee H, Cho CH, Kim YJ, Kim D-O. Antioxidant capacity and anti-inflammatory effect of the ethyl acetate fraction of dried persimmon (*Diospyros kaki* Thumb.) on THP-1 human acute monocytic leukemia cell line. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54: 606-611 (2011a)
- Kim H-J, Park T-S, Jung M-S, Son J-H. Study on the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of sarcocarp and calyx of persimmon (Cheongdo Bansi). *J. Appl. Biol. Chem.* 54: 71-78 (2011b)
- Lee MS, Lee II, Kim Y, Kim YJ, Heo HJ, Kim D-O. Inhibitory effect of the ethyl acetate fraction from astringent persimmon on H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Food Sci. Biotechnol.* 23: 1247-1252 (2014)
- Mallavadhani UV, Panda AK, Rao YR. Pharmacology and chemotaxonomy of diospyros. *Phytochemistry* 49: 901-951 (1998)
- Park W. Inhibitory effect of gallic acid on production of interleukins in mouse macrophage stimulated by lipopolysaccharide. *J. Pharmacopuncture* 13: 63-71 (2010)
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AMK. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 9: 49-89 (2007)
- Schieber A, Stintzing FC, Carle R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends Food Sci. Technol.* 12: 401-413 (2001)
- Shin D-J, Kim K-H, Son G-M, Lee S-C, Hwang Y-I. Changes of physicochemical properties during preparation of prepersimmon pickles. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 420-424 (2000)
- Singleton VL, Rossi JA, Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158 (1965)
- Suzuki T, Someya S, Hu F, Tanokura M. Comparative study of catechin compositions in five Japanese persimmons (*Diospyros kaki*). *Food Chem.* 93: 149-152 (2005)
- Torres JL, Varela B, García MT, Carilla J, Matito C, Centelles JJ, Cascante M, Sort X, Bobet R. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7548-7555 (2002)
- Winter AN, Brenner MC, Punessen N, Snodgrass M, Byars C, Arora Y, Linseman DA. Comparison of the neuroprotective and anti-inflammatory effects of the anthocyanin metabolites, protocatechuic acid and 4-hydroxybenzoic acid. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017: 6297080 (2017)