

## 국내산 구아바(*Psidium guajava* L.) 잎 추출물의 항산화 활성 및 간세포 보호효과

천원영 · 서동연\* · †김영화\*\*

경성대학교 식품생명공학과 대학원생, \*국립농산물품질관리원 시험연구소 안전성분석과 연구원,  
\*\*경성대학교 식품응용공학부 조교수

### Antioxidative and Hepatocyte Protective Effects of Guava (*Psidium guajava* L.) Leaves Cultivated in Korea

Wonyoung Cheon, Dongyeon Seo\* and †Younghwa Kim\*\*

Master's Student, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungsoo University, Busan 48434, Korea

\*Researcher, Safety Analysis Div., Experiment Research Institute, National Agricultural Products Quality Management Service, Gimcheon 39660, Korea

\*\*Assistant Professor, School of Food Biotechnology and Nutrition, Kyungsoo University, Busan 48434, Korea

#### Abstract

The purpose of this study was to evaluate the antioxidant and hepatocyte protective effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaves cultivated in Korea. The contents of the total polyphenol of the extract was 271.57 mg gallic acid equivalent (GAE)/g residue. Antioxidant activities of leaf extract were evaluated by examining the free radical scavenging ability. 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and  $\alpha$ - $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activities of the extract were 1133.23 mg trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)/g residue and 721.68 mg TEAC/g residue, respectively. The hepatocyte protective effect of guava leaf extract was examined in HepG2 cells. Against *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP), the viability of HepG2 cells were increased by the treatment of leaf extract. In addition, guava leaf extract led to the inhibition of reactive oxygen species (ROS) generated in HepG2 cells. The leaf extract increased the activity of glutathione (GSH), glutathione reductase (GR), and glutathione peroxidase (GPx) against oxidative stress. These results suggested that guava leaves might be regarded as a potential source natural antioxidant and a hepatoprotective material.

Key words: guava (*Psidium guajava* L.) leaf, antioxidative activity, hepatocyte protection, reactive oxygen species, antioxidant enzymes

#### 서 론

활성산소종(Reactive Oxygen Species: ROS)은 생명체가 산소를 이용하여 호흡하는 중 생겨나는 부산물로서 반응성이 높아 세포내에 단백질 및 지질성분과 반응하여 이들의 기능을 손상하는 것으로 알려져 있다(Halliwell & Gutteridge 1999). 이러한 손상으로 인하여 유도되는 대표적인 질병으로 조직

및 기관의 노화, 심장병, 당뇨, 관절염 등과 뇌와 관련된 알츠하이머 등 다양한 질병에 영향을 주며, DNA 손상으로 인한 암의 발생 및 진행에도 관여하는 것으로 보고되어 있다(Valko 등 2007). 간은 에너지 대사, 호르몬 분비, 해독 등 다양한 기능을 수행하는 핵심장기로서 외부로부터 유입된 여러 유해 화합물을 분해하는 기관으로 유해물질로부터 다른 기관을 보호하는 역할 또한 수행한다. 그러나 과도한 유해물질 중독,

† Corresponding author: Younghwa Kim, Assistant Professor, School of Food Biotechnology and Nutrition, Kyungsoo University, Busan 48434, Korea. Tel: +82-51-663-4652, Fax: +82-51-622-4986, E-mail: younghwakim@ks.ac.kr

만성적인 알코올섭취 및 감염 등으로 인하여 간 기능에 손상이 갈 수 있으며, 산화적 스트레스로 인하여 생성된 활성산소 역시 간 손상에 영향을 미칠 수 있다(Paul LW 1999; Cederbaum 등 2009; Yoon & Jo 2010). 체내에는 이러한 활성산소를 억제하기 위하여 superoxide dismutase(SOD), catalase (CAT) 등과 같은 다양한 항산화 효소가 존재하며(Sies H 1999), 건강한 상태일 경우 이들 효소의 기능으로 적정 수준의 ROS 농도를 유지하지만, 환경오염, 외부의 스트레스 등의 요인으로 체내 활성산소가 증가되기도 한다(Rees 등 2008). 불균형한 ROS의 농도로 인하여 체내에서 발생하는 산화적 스트레스를 방지하는 화합물을 항산화 물질(antioxidant)이라고 하며, 이러한 화합물 중 대표적인 것으로 Vitamin C, Vitamin E, 플라보노이드와 같은 폴리페놀 계열 화합물 등이 있다(Halliwell & Gutteridge 1999; Rees 등 2008).

구아바(*Psidium guajava* L.)는 멕시코, 중앙아메리카 원산의 다년생 나무로 현재는 세계 각지에서 널리 재배되는 대표적인 열대과일 중 하나이다(Jeong 등 2012). 민간요법에서의 구아바 잎은 이질, 경련 완화, 복부 팽만 및 설사 등의 치료로 이용되었으며, 최근에도 설사, 통기, 산통, 위통을 치료하기 위해서도 이용되고 있다(Lozoya 등 2002). 또한, 일본에서는 구아바 잎을 이용한 차를 ‘특정보건용 식품’으로 허가하였고, 미국 FDA는 구아바 잎 추출물을 EAFUS(Everthing Added to Food in the United States) 목록에 2003년 정식으로 등록하여 사용할 수 있도록 하였다(Jo 등 2009). 또한, 국내에서도 식후 혈당상승 억제효과를 인정받아 식품의약품안전처 건강기능식품공전에 고시형 원료로 등록되었다(MFDS 2016). 구아바 잎에는 catechins, quercetin, rutin, kaempferol, naringenin 및 gallic acid 등과 같은 다양한 폴리페놀 화합물이 함유되어 있다고 보고되어 있다(Hsieh 등 2007; Nanititanon 등 2010). 이러한 특성으로 인하여 구아바 잎의 식중독 균에 대한 항균효과(Jo 등 2009), *in vitro* 실험에서의 항산화 효과와 tyrosinase 활성 저해효과(Park & Onjo 2008; Nanititanon 등 2010)에 대한 연구가 진행되었으며, 인간 제대 정맥 내피 세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cell: HUVEC)에서 세포사멸 억제(Hsieh 등 2007) 및 발효 구아바 잎 추출물이 mouse에서 고혈당을 억제하는 실험(Jin 등 2006) 등 다양한 방면에서의 연구가 이루어지고 있다. 그러나 구아바 잎의 메탄올 추출물이 인간의 간세포에서의 항산화 활성 및 다양한 항산화 효소 활성 작용에 관한 연구는 불충분한 실정이다. 따라서 본 연구는 구아바 잎의 추출물의 항산화 활성과 HepG2 세포에서의 산화적 스트레스에 대한 세포보호 효과를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 및 시약

실험에 사용한 구아바(*Psidium guajava* L.) 잎은 충북 음성 재배농가에서 2016년 4월에 구매하였다. 실험에 사용한 시약 중 Folin-Ciocalteu's reagent, catechin, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS), potassium persulfate, trolox, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT), *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP), glutathione, glutathione reductase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)는 Sigma-Aldrich Co.(Sigma Co, St. Louis, MO, USA)에서 구매하였으며, gallic acid는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구매하였다. 세포 배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), 0.05% trypsin-0.02% EDTA, 100  $\mu$ unit/mL penicillin-streptomycin, Hank's balanced salt solution(HBSS)은 Gibco사(Lafayette, CO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 구아바 잎 추출물 제조

구아바 잎은 흐르는 물에 세척하여 음건한 후 동결 건조한 뒤  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 사용하였다. 메탄올 추출물을 만들기 위해 동결 건조한 잎을 분말화한 뒤 2.5 g을 메탄올 150 mL와 함께 상온( $25^{\circ}\text{C}$ ) 15시간동안 150 rpm에서 진탕하여 추출하였다. 상등액은 여과지(Whatman filter paper No. 2, Whatman, Maidstone, UK)를 이용하여 여과한 뒤 감압농축기(EYELA N-1000, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 동결건조하고 DMSO에 녹여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며 실험에 사용하였다.

### 3. 총 폴리페놀 함량 측정

구아바 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다(Folin & Denis 1912). 구아바 잎 추출물 50  $\mu$ L를 2%  $\text{NaHCO}_3$  500  $\mu$ L와 충분히 혼합한 후 50% Folin-Ciocalteu's 시약 50  $\mu$ L를 가하여 진탕하고 96 well plate에 200  $\mu$ L 옮겨 ELISA reader기(Thermo Scientific Ltd, Lafayette, CO, USA)에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 폴리페놀의 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 mg GAE(gallic acid equivalent)/g residue로 나타내었다.

### 4. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Zhishen 등의 방법에 따라 실험하였다(Zhishen 등 1999). 시료 추출물 250  $\mu$ L에 증류수 1,250  $\mu$ L를 첨가하고, 5%  $\text{NaNO}_2$  75  $\mu$ L와 혼합한 후 6분간 암소에 방치하고 10%  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 150  $\mu$ L 첨가한 뒤 암소에 5분간 방치한 뒤 1 M NaOH 1 mL를 첨가한 후 잘 혼합하

여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 잔사 중 플라보노이드의 함량은 catechin을 표준품으로 사용하여 검량선을 작성해 계산하였으며, mg CE(catechin equivalent)/g residue로 나타내었다.

#### 5. ABTS 라디칼 소거능을 통한 항산화력 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등(1999)의 실험방법을 일부 변형하여 진행하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합 후 상온, 암소에서 12시간 동안 방치하여 radical을 형성하고, 실험 직전 735 nm에서 흡광도가  $1.000 \pm 0.1$ 이 되도록 증류수로 희석하였다. 시료 25  $\mu$ L에 희석된 ABTS 용액 0.5 mL를 e-tube에서 잘 혼합하고, 30분간 암소에서 방치한 후 96 well plate에 200  $\mu$ L씩 옮겨 735 nm에서 흡광도를 측정하였다. Trolox를 이용하여 검량선을 작성하였고, 라디칼 소거능은 mg TEAC(trolox equivalent antioxidant capacity)/g residue로 나타내었다.

#### 6. DPPH 라디칼 소거능을 통한 항산화력 측정

DPPH 라디칼에 대한 전자공여능은 Blois 등의 방법을 응용하여 측정하였다(Blois MS 1958). 희석된 시료 25  $\mu$ L에 0.2 mM DPPH(Sigma Co.)-용액 500  $\mu$ L를 넣고, 암소에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader기로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 trolox를 사용하였으며, mg TEAC/g residue로 소거능을 나타내었다.

#### 7. 세포배양

HepG2 세포는 ATCC(American Type Culture Collection, CL-173, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 세포는 1% antibiotics와 10%의 FBS를 함유한 DMEM을 사용하여 37°C 온도 하에 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며, 2일 간격으로 배지를 교체하여주었다.

#### 8. 시료 독성 및 TBHP로부터 보호효과 측정

배양된 HepG2 세포를 96 well plate에 각 well당  $2 \times 10^4$ 로 seeding하여 incubator에서 18시간 동안 배양한 후 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지에 시료와 TBHP를 희석하여 200  $\mu$ L씩 분주한 뒤 6시간 동안 산화적 스트레스를 유발시켰다. 배양 후 세포의 생존을 측정은 MTT assay를 통해 실시하였으며, 각 well에 4 mg/mL로 희석된 MTT 시약을 10  $\mu$ L씩 분주하고 2시간 동안 배양하였다. 이때 형성된 formazan은 DMSO에 녹여 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(Yeon 등 2013; Lee 등 2017).

#### 9. 활성산소종 생성량 측정

세포 내에서 생성된 ROS의 양을 측정하기 위해서 DCFH-

DA를 이용한 Lee 등(2017)의 방법을 변형하여 실험하였다. 배양 중인 세포를 black 96 well plate에  $5 \times 10^4$ 의 농도로 각 well에 분주하고 18시간 후 구아바 잎 추출물을 다양한 농도로 serum-free DMEM에 녹여 4시간 동안 전처리하였다. 이후 각 well에 TBHP를 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가하였다. 1시간 후 배지를 제거하고 DCFH-DA 20  $\mu$ L를 함유한 DMEM 200  $\mu$ L를 30분간 처리하였다. 반응 후 PBS로 세포를 세척한 후 세포에 HBSS를 분주하고, synergy HTx(BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용해 여기파장 485 nm와 방출파장을 530 nm에서 ROS 함량을 측정하였다.

#### 10. Glutathione(GSH) 함량 및 항산화 효소 활성 측정

배양한 HepG2 세포를 6 well plate에  $1 \times 10^6$  농도로 각 well에 분주하였다. 24시간 후 serum-free DMEM에 시료를 희석한 후 세포에 처리하고 18시간 배양 후 1 mM TBHP를 함유한 DMEM으로 배지를 교체하여 산화적 스트레스를 유도하였다. 6시간 후 cell scraper로 취하여 얼음에 보관하였다. 세포는 Vibra-Cell VCX 750 sonicator(Sonic & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)를 사용하여 10초간 lysis하였으며, 용해물은 4°C에서 10분간 10,000 rpm으로 원심분리하고, 상등액은 -70°C에 보관하며, GSH 및 효소 활성 분석에 이용하였다. 세포 내의 총 GSH는 Baker 등의 방법에 따라 측정하였다(Baker 등 1990). 세포 용해물에는 단백질을 침전시키기 위해 5% sulfosalicylic acid를 첨가한 후 4°C에서 10분간 10,000 rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 20  $\mu$ L에 3 mM DTNB, 400  $\mu$ units/mL glutathione reductase 그리고 2.5 mM NADPH가 포함된 반응 혼합물(180  $\mu$ L)을 첨가하여 412 nm에서 ELISA reader를 사용하여 10분 동안 30초 간격으로 측정하였다. GSH의 농도는 표준 곡선을 이용하여 계산하였고, 단백질 농도를 BCA protein assay kit(Thermo Scientific Ltd., Waltham, WA, USA)로 정량하여 단백질 mg당 nmol GSH로 표현하였다. 세포 내에 GR의 활성평가는 DTNB를 사용하여 결정하였고, thiobenzoic acid를 생성시켜 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glutathione peroxidase(GPx)의 활성은 GPx의 GSH의 산화 능력에 근거하여 glutathione reductase에 의한 NADPH의 소멸에 결합하는 기질로서 cummen hydroperoxide를 사용하여 측정하였다(Yeon 등 2013).

#### 11. 통계처리

실험결과는 SAS 9.2(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 사용하여 평균 $\pm$ 표준편차 또는 표준오차를 산출하였고, 시료 처리구 간의 차이 유무를 분산분석(ANOVA)을 시행한 후, Duncan's multiple range test를 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 추출 수율 및 폴리페놀 화합물 함량

국내 재배 농가로부터 구입한 구아바 잎은 동결건조를 실시하여 분말화하고 메탄올로 추출하였으며, 추출한 잔사의 수율은 33.39%로 나타났다. 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 Table 1에 나타내었다. 식물에 존재하는 다양한 페놀 화합물은 항산화, 항염 및 항균 등의 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 특성 때문에 페놀성 화합물의 함량과 항산화 활성사이 연관성에 관하여 다양한 연구가 이루어지고 있다. 추출물의 총 페놀화합물 함량은  $271.57 \pm 3.59$  GAE mg/g residue로 나타났으며, 플라보노이드 계열 화합물의 양은  $166.04 \pm 5.70$  CE mg/g residue로 측정되었다. 파인애플 구아바 잎을 에탄올로 추출하여 진행한 Mosbah 등(2018)의 연구에 의하면 폴리페놀 함량은 179.43 mg GAE/g extract, 플라보노이드 함량은 210.18 mg CE/g extract로 보고하였다. 본 연구결과는 국내산 구아바 잎 추출물은 선행연구보다 높은 함량의 총 폴리페놀 화합물을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

### 2. 라디칼 소거능 측정

구아바 잎 추출물의 라디칼 소거능은 Table 2와 같다. ABTS, DPPH 라디칼에 대한 시료의 소거능은 각각  $1,133.23 \pm 2.19$ ,  $721.68 \pm 4.65$  TEAC mg/g residue로 나타났다. Tachakittirungrod 등의 실험에 따르면 구아바 잎을 methanol로 추출하였을 때 butanol, ethyl acetate, hexane을 이용하여 추출한 것보다 폴리페놀 화합물이 2배 이상 추출되었으며, 라디칼 소거능 실험에서도 methanol로 추출한 구아바 잎이 다른 용매를 이용한 추출물보다 라디칼 소거능이 높다고 평가하고 있다 (Tachakittirungrod 등 2007). 또한, Maisuthisakul 등의 논문에서

서는 플라보노이드 등과 같은 폴리페놀 화합물이 불안정한 라디칼에 전자를 공여함으로써 라디칼을 소거한다고 보고하고 있다(Maisuthisakul 등 2007). 그러므로 본 연구에서 진행한 구아바 잎 추출물의 라디칼 소거능은 catechins, quercetin 등과 같은 폴리페놀에 의한 효과인 것으로 사료된다.

### 3. 시료 독성 및 산화적 스트레스에 대한 세포보호 효과

시료가 HepG2 세포의 증식에 미치는 영향과 TBHP로 산화적 스트레스가 유도된 세포에 대한 보호능을 알아보기 위하여 MTT assay를 진행하였다(Fig. 1A, 1B). 실험한 농도(20, 10, 5, 2.5  $\mu\text{g/mL}$ )의 시료는 HepG2 세포에서 독성을 나타내지 않았기 때문에 이후 실험을 진행하였다. TBHP로 산화적 스트레스가 유도된 HepG2 세포에서는 TBHP 처리구(31.66%)에 비하여 20  $\mu\text{g/mL}$ 의 시료를 처리하였을 때는 62.37%로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 시료의 농도가 증가함에 따라 세포 생존율 역시 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 식물체에 존재하는 폴리페놀 화합물의 다양한 세포 보호 기능 때문이라 판단된다(Pandey & Rizvi 2009).

### 4. 활성산소종 생성 억제 효과

스트레스, 노화 등으로 인하여 체내 활성산소종의 양이 증가하면 세포막지질, 단백질 및 유전자에 손상을 일으켜 노화 및 성인병 발병을 촉진한다(Aruoma OI 1998). 세포내 활성산소의 농도는 세포가 받는 산화적 스트레스의 주요 지표이기 때문에 세포에서 생성된 활성산소의 양을 알기 위하여 DCFH-DA를 이용한 실험을 진행하였다(Fig. 2). TBHP를 단독으로 처리한 비교군은 대조군 대비 352%가 증가된 ROS의 형성이 관찰되었으나, 시료를 함께 처리함으로써 ROS의 생성량이 감소하는 것을 알 수 있었다. 최저농도인 2.5  $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하였을 때는 대조군 대비 193%로 측정되었고, 최고 농도

**Table 1. Total polyphenols and flavonoid contents of the methanolic extract of *Psidium guajava* L. leaf.** (n=3)

	Total polyphenol (GAE mg/g residue) <sup>1)</sup>	Total flavonoid (CE mg/g residue) <sup>2)</sup>
<i>Psidium guajava</i> L. leaf methanol extracts	$271.57 \pm 3.59$	$166.04 \pm 5.70$

Each value is expressed as a mean±standard error.

<sup>1)</sup>GAE: gallic acid equivalent.

<sup>2)</sup>CE: catechin equivalent.

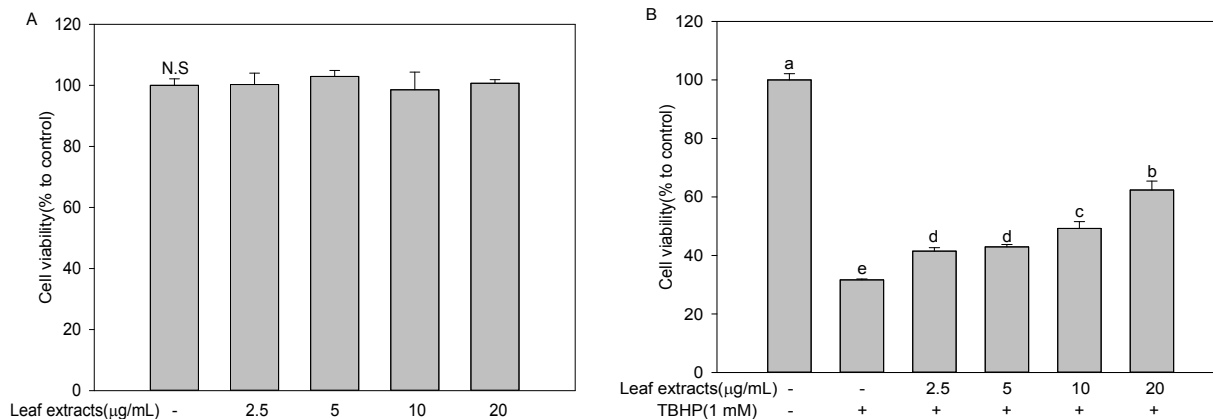
**Table 2. ABTS and DPPH free radical scavenging activity of the methanolic extract of *Psidium guajava* L. leaf.**

(n=3)

	ABTS (TEAC mg/g residue) <sup>1)</sup>	DPPH (TEAC mg/g residue)
<i>Psidium guajava</i> L. leaf methanol extracts	$1,133.23 \pm 2.19$	$721.68 \pm 4.65$

Each value is expressed as a mean±standard error.

<sup>1)</sup>TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity.



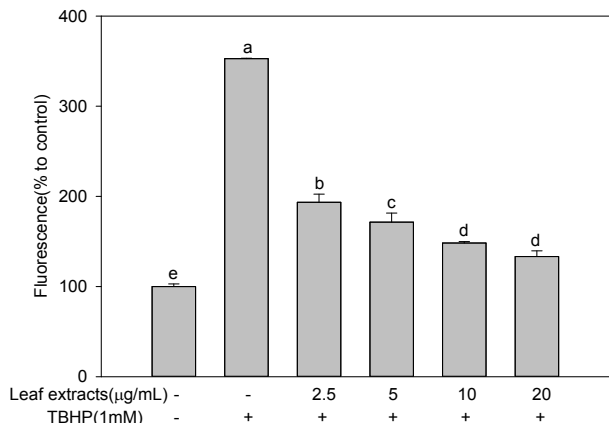
**Fig. 1. (A) Cytotoxicity and (B) cell protective effect of methanol extract from *Psidium guajava* L. leaf methanol extracts in HepG2 cells.** Oxidative stress was induced by 1 mM *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP). Each value is expressed as the mean±standard error (n=3). Blots are representative of at least 3 independent experiments. N.S means no significant difference between all treatment group and <sup>a-c</sup> Means with different letters are significantly different (*p*<0.05) compared to control.

인 20 µg/mL의 시료를 처리하였을 때는 133%로 TBHP 단독 처리에 비하여 유의적으로 ROS의 형성이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

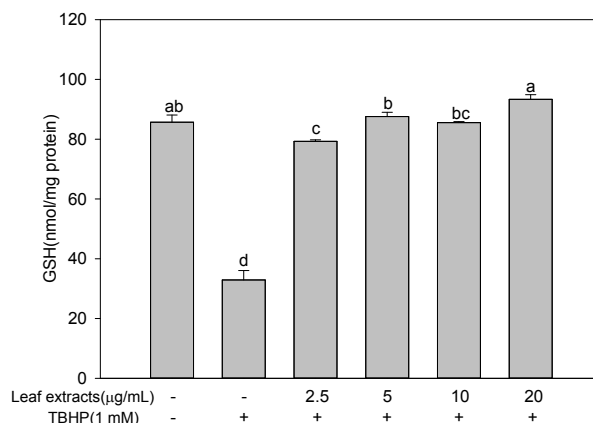
**5. 세포 내 glutathione(GSH) 함량 및 항산화 효소 활성**

GSH는 glutamate, cysteine, glycine이 결합된 트리펩타이드로서 환원형태인 GSH와 산화형태인 GSSG로 존재한다. GSH의 대부분이 세포질에 존재하면서 생체 내의 산화, 환원반응에 중요한 역할을 한다. GSH는 산화 스트레스나 생체 내 free radical을 제거하는 능력을 보유하고 있으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 지질과

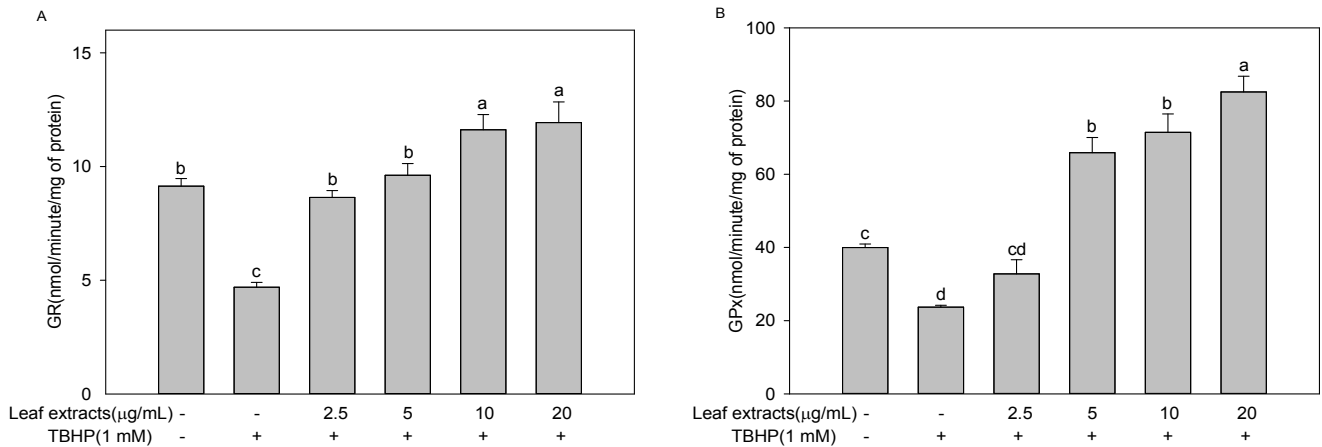
산화물을 대사하는 효소인 GPx, GST에 대한 전자공여체로 세포방어체계에 중요한 역할을 한다(Zhang 등 2009). 실험에 사용한 TBHP는 세포 내 항산화 기작의 불균형을 일으켜 세포내에 GSH의 수준을 감소시킨다(Nishida 등 1997). 따라서 구아바 잎 추출물의 항산화 효과에 의한 세포보호효과를 명확히 하기 위해서 TBHP로 독성을 유도한 세포 내 GSH량의 변화를 측정하였다(Fig. 3). TBHP를 처리한 비교군은 32.91 nmol/mg protein으로 대조군 85.67 nmol/mg protein보다 유의적으로 감소하였다. 그러나 구아바 잎 메탄올 추출물을 함께 처리하였을 때 5 mg/mL 농도에서는 정상세포와 유사한 수준



**Fig. 2. Effect of methanol extract from *Psidium guajava* L. leaf on the intracellular reactive oxygen species (ROS) formation induced by *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP).** Each value is expressed as the mean±standard error (n=3). Blots are representative of at least 3 independent experiments. <sup>a-c</sup> Means with different letters are significantly different (*p*<0.05) compared to control.



**Fig. 3. Effect of methanol extract from *Psidium guajava* L. leaf on *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP)-induced cellular redox state impairment.** Each value is expressed as the mean± standard error (n=3). Blots are representative of at least 3 independent experiments. <sup>a-d</sup> Means with different letters are significantly different (*p*<0.05) compared to control.



**Fig. 4. Antioxidant enzyme activity of glutathione reductase (A) and glutathione peroxidase (B) were evaluated in HepG2 cells treated with 1 mM *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP).** Each value is expressed as the mean±standard error (n=3). Blots are representative of at least 3 independent experiments. <sup>a-d</sup> Means with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) compared to control. GR, glutathione reductase; GPx, glutathione peroxidase; TBHP, *tert*-butyl hydroperoxide.

의 GSH 함량을 나타냈으며, 최고농도인 20 mg/mL를 처리하였을 때는 93.33 nmol/mg protein으로 대조군에 비해서도 유의적으로 증가한 GSH 농도가 관찰되었다. 이는 구아바 잎 메탄올 추출물에 함유된 페놀성 화합물의 강력한 항산화 작용과 항산화 효소의 활성 증가로 인해 세포내 GSH가 GSSG로 전환되지 않았기 때문에 상대적으로 GSH의 농도가 증가한 것으로 보인다. Moskaug 등의 분석에 의하면 폴리페놀 화합물은 세포 및 동물실험에서 GSH의 농도를 증가시킨다고 언급하고 있으며(Moskaug 등 2005), Jiao 등의 연구에 의하면 TBHP에 의해 감소된 GSH의 농도가 catechin을 처리하였을 때 증가한다고 보고하여 본 연구와 비슷한 연구 결과를 나타냈다(Jiao 등 2003).

## 요약 및 결론

본 연구에서는 국산 구아바 잎 추출물의 항산화 작용 및 간 세포 보호효과에 대하여 연구를 수행하였다. 본 연구를 위해 총 폴리페놀 함량, 항산화 활성 및 간세포의 산화적 스트레스에 대한 보호 효과를 알아보았다. 구아바 잎 추출물의 폴리페놀 함량은 271.57 mg GAE/g residue로 나타났으며, DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능이 우수하였다. 또한, 구아바 잎 추출물은 간세포를 산화적 스트레스로부터 보호하는 것으로 나타났다. 구아바 잎 추출물은 HepG2 세포에서 TBHP로 유도한 산화적 스트레스로부터 세포 생존율을 증가시켰고, ROS의 형성 또한 대조군에 비하여 유의적으로 감소시켰다. 또한, 구아바 잎 추출물은 GSH, GR 및 GPx 등과 같은 항산화 작용에 관련된 물질의 활성을 증가시켰다. 따라서 구아바 잎은 항

산화 작용과 관련된 효소의 활성화를 유도하고, ROS의 생성을 억제함으로써 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 것으로 생각되어진다. 본 연구를 통해 국내산 구아바 잎은 간 세포 보호 작용이 우수함을 보여주었고, 새로운 간 기능성 개선 식품 개발을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

이 성과는 2017년도 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구이고(No. 2017R1C1B1008236), 본 논문의 일부는 2018년도 BB 21+ 사업에 의하여 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

## References

- Aruoma OI. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* 75:199-212
- Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* 190: 360-365
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. 2009. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol* 83:519-548

- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12:239-243
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. 3<sup>rd</sup> ed. pp.105-350. Oxford University Press
- Hsieh CL, Huang CN, Lin YC, Peng RY. 2007. Molecular action mechanism against apoptosis by aqueous extract from guava budding leaves elucidated with human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) model. *J Agric Food Chem* 55: 8523-8533
- Jeong EJ, Kim KP, Bang BH. 2012. Quality characteristics of cookies added with guava (*Psidium guajava* L.) leaf powder. *Korean J Food Nutr* 25:317-323
- Jiao HL, Ye P, Zhao BL. 2003. Protective effects of green tea polyphenols on human HepG2 cells against oxidative damage of fenofibrate. *Free Radical Biol Med* 35:1121-1128
- Jin YJ, Kang SH, Choi SY, Park SY, Park JG, Moon SW, Park DB, Kim SJ. 2006. Effect of fermented guava (*Psidium guajava* L.) leaf extract on hyperglycemia in low dose streptozotocin-induced diabetic mice. *Korean J Food Sci Technol* 38:679-683
- Jo YH, Ok DL, Lee SC. 2009. Antimicrobial characteristics of different parts of guava against food-borne bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:1773-1778
- Lee KM, Kwon TY, Kang U, Seo EK, Yun JH, Nho CW, Kim YS. 2017. Tussilagonone-induced Nrf2 pathway activation protects HepG2 cells from oxidative injury. *Food Chem Toxicol* 108:120-127
- Lozoya X, Reyes-Morales H, Chavez-Soto MA, Martinez-Garcia MDC, Soto-Gonzalez Y, Doubova SV. 2002. Intestinal antispasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava folia* in the treatment of acute diarrheic disease. *J Ethnopharmacol* 83:19-24
- Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R. 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem* 100:1409-1418
- Ministry of Food and Drug Safety. 2016. Health Functional Food Code. p.2,11,96. Ministry of Food and Drug Safety
- Mosbah H, Louati H, Boujbiha MA, Chahdoura H, Snoussi M, Flamini G, Ascrizzi R, Bouslema A, Achour L, Selmi B. 2018. Phytochemical characterization, antioxidant, antimicrobial and pharmacological activities of *Feijoa sellowiana* leaves growing in Tunisia. *Ind Crops Prod* 112:521-531
- Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad MCW, Blomhoff R. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* 81:277-283
- Nantitanon W, Yotsawimonwat S, Okonogi S. 2010. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *LWT—Food Sci Technol* 43:1095-1103
- Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. 1997. Modulating role of endogenous reduced glutathione in *tert*-butyl hydroperoxide-induced cell injury in isolated rat hepatocytes. *Free Radical Biol Med* 23:453-462
- Pandey KB, Rizvi SI. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2:270-278
- Park BJ, Onjo M. 2008. Antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf. *Korean J Plant Resour* 21:408-412
- Paul LW. 1999. Biochemical diagnosis of liver disease. *Indian J. Clin Biochem* 14:59-90
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 26:1231-1237
- Rees MD, Kennett EC, Whitelock JM, Davies MJ. 2008. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radical Biol Med* 44:1973-2001
- Sies H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biol Med* 27:916-921
- Tachakittirungrod S, Okonogi S, Chowwanapoonpohn S. 2007. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chem* 103:381-388
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84
- Yeon SH, Ham H, Sung J, Kim Y, Namkoong S, Jeong HS, Lee J. 2013. Antioxidant activities of hot water extract from *Cornus walteri* Wanger against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide in HepG2 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42:1525-1532
- Yoon TJ, Jo SY. 2010. Effect of acanthopanax senticosus extracts on alcohol degradation and anti-inflammatory activity in mice. *Korean J Food Nutr* 4:542-548
- Zhang XH, Choi SK, Seo JS. 2009. Effect of dietary grape pomace on lipid oxidation and related enzyme activities in rats fed high fat diet. *Korean J Nutr* 42:415-422

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64:555-559

---

Received 03 January, 2019

Revised 07 January, 2019

Accepted 24 January, 2019