



Original Article / 원저

C2C12 근육세포에서 과산화수소로 유도된 산화 스트레스에 대한 시체(柿蒂)의 보호효과

박정환^{1,2*}, 임진영², 이민아², 성은정², 이준수²

¹한국한의학연구원 한의약데이터부

²충북대학교 식품생명공학과

Protective Effects of the Calyx of *Diospyros kaki* Thunb. on H₂O₂-induced Oxidative Stress in C2C12 Myoblasts

Jeong Hwan Park^{1,2*}, Jinyeong Lim², Mina Lee², Eunjeong Seong², Junsoo Lee²

¹KM Data Division, Korea Institute of Oriental Medicine

²Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University

ABSTRACT

Objectives : The calyx of *Diospyros kaki* Thunb. has usually been used to treat obstinate hiccup. This study investigated the protective effects of *Diospyros kaki* using C2C12 myoblasts of H₂O₂-induced oxidative stress.

Methods : Cell viability and cytotoxicity were determined by MTT assay. The level of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), and reduced glutathione (GSH) were measured by using optical properties.

Results : The calyx of *Diospyros kaki* Thunb. extract showed no toxicity to C2C12 myoblasts until 20 µg/mL concentration and increased cell viability compared to the H₂O₂ treated group. The calyx of *Diospyros kaki* Thunb. extract inhibited the production of ROS and MDA at all concentrations. In addition, the calyx of *Diospyros kaki* Thunb. extract increased the concentration of GSH.

Conclusion : This study provides that the calyx of *Diospyros kaki* Thunb. can be used as a potential material that exhibit antioxidative and protective effects on H₂O₂-induced oxidative stress in C2C12 Myoblasts.

Key words : *Diospyros kaki* Thunb., C2C12 myoblasts, antioxidant activity, oxidative stress, reactive oxygen species.

I. 서론

생체내에서 산화 스트레스는 과도한 ROS(reactive oxygen species)를 생성시킨다. ROS는 슈퍼옥사이드 라디칼(O_2^-), 하이드록실 라디칼(OH·), 과산화수소(H_2O_2) 등의 여러 물질들을 포함하며 DNA 손상, 단백질과 지질의 산화, 세포 및 조직의 손상, 노화를 촉진시킨다¹⁾. 근육과 관련해서는 ROS는 근육 기능의 장애를 일으키는 중요한 요인이 된다. 근육 세포의 거대분자인 단백질과 지질, DNA 등을 손상시켜 세포사멸(apoptosis)을 유도하며 나아가 근감소증(sarcopenia), 근위축(muscle atrophy) 등의 질병을 유발하기도 한다²⁻⁴⁾. 특히, 과량의 과산화수소는 세포막을 통과해 세포 내의 ROS 수준을 증가시키고, 근아세포(myoblast) 및 근관세포(myotube)의 미토콘드리아 기능부전(mitochondrial dysfunction), 자가포식(autophagy), 세포사멸(apoptosis) 등을 일으킨다고 알려져 있다⁵⁾. 따라서 산화 스트레스로부터 혈관 내피 세포를 보호할 수 있는 식물성 항산화제의 역할의 중요성이 대두되어 최근 천연물에서 항산화제를 찾는 연구에 초점이 맞춰지고 있다⁶⁻⁹⁾

감은 전 세계에서 재배되고 있으며, 한국, 중국, 일본에서 많이 재배되고 있다. 시체(柿蒂, calyx of *Diospyros kaki* Thunb.)는 감나무의 열매에 붙어있는 묵은 꽃받침으로 가을에 열매가 성숙했을 때 감의 꼭지를 채취하여 햇볕에 말린 것을 말한다. 시체(柿蒂)의 외형은 가장자리가 얇게 4조각으로 갈라진 넓적한 꽃받침으로 난원형 또는 삼각형, 넓은 난형의 모양이다. 위쪽으로 대개 말려있고 지름 1.5~3cm, 두께 0.1~0.4cm이다. 질은 얇고 가벼우며 쉽게 부서진다¹⁰⁾. 한의학에서는 식물의 다양한 부위를 한약재로 사용하는데, 시체(柿蒂)는 식물의 부위 중 열매의 꼭지를 사용하는 특이하고 대표적인 한약재이다. 시체(柿蒂)는 이기약(理氣藥)에 속하는 본초로, 성미(性味)는 평(平)하고 고삽(苦澁)하며 강역하기(降逆下氣) 효능으로 큰 병을 앓고 나서 위한기역(胃寒氣逆)으로 생긴 난치성 애역(呃逆)의 증상 등에 상용되고 있다¹¹⁾. 폐암, 위암, 대장암, 유방암, 간암 등의 질병으로 항암 화학요법을 받은 후 애역(呃逆)이 발생한 환자 36명을 대상으로 한 임상 연구에서 시체(柿蒂) 15~30g을 우린 물 200g을 하루에 2번씩 3일간 복용시

킨 후에 28명의 환자(77.8%)에서 증상이 호전되었다¹²⁾. 최근 시체(柿蒂)의 *In vitro* 와 *in vivo* 실험에서는 항산화 효과 및 간 보호효과, 피부 미백 및 보호 효과, 항염증 효과, 항혈액응고 효과, 항혈전 효과, 항암 효과 등이 보고되고 있다¹³⁻¹⁸⁾. 시체(柿蒂) 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 231.28 mg/g, 총 플라보노이드 함량은 5.62 mg/g으로 나타났으며 전자공여능은 시체(柿蒂) 500 μ g/ml 농도에서 91%로서 같은 농도의 ascorbic acid와 유사한 활성이 있음이 보고되었다¹⁹⁾. 또한 시체(柿蒂) 메탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성 IC_{50} 은 58.76 μ g/mL, ABTS 라디칼 소거 활성 IC_{50} 은 19.45 μ g/mL으로 나타나 ascorbic acid보다 비슷하거나 2배 정도 낮은 활성을 나타내었다²⁰⁾. 그러나 산화 스트레스로 유발된 과량의 ROS 생성에 의한 근육세포 손상에 대한 시체(柿蒂)의 보호 효과는 아직 보고된 바 없다. 이에 본 연구에서는 증가된 산화 스트레스에 대한 시체(柿蒂)의 개선 효과를 확인하기 위하여 과산화수소로 자극을 받은 C2C12 세포에서 시체(柿蒂) 메탄올 추출물을 처리한 후 항산화 활성을 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 추출물 제조

본 실험에 사용된 시체(柿蒂)는 옴니허브(Daegu, Korea)에서 구입한 것을 대한민국약전 규격에 적합한 것만을 선택하여 사용하였다. 추출물 제조를 위해 500 mL 플라스크에 분쇄된 시체(柿蒂) 5 g과 메탄올 150 mL을 넣고 실온에서 24시간 교반추출기(VS-8480, Vision Scientific, Daejeon, Korea)를 이용하여 추출하였다. 추출물은 Whatman No. 5(Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과한 후 37° C에서 감압농축하였고 최종 추출 수율은 9.5%로 나타났다. 농축액을 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 이용하여 100 mg/mL로 재용해한 뒤 0.22 μ m의 멸균 필터로 여과하고 -20° C에 보관하며 실험에 사용하였다.

2. 세포 배양 및 추출물 독성 측정

C2C12 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

*Corresponding author : Jeong Hwan Park, KM Data Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672, Yuseongdae-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34054, Republic of Korea

Tel : +82-42-868-9358, E-mail : siegfried@kiom.re.kr

•Received : September 10, 2021 / Revised : October 22, 2021 / Accepted : November 15, 2021



10% heat-inactivated fetal bovin serum(FBS), 100 unit/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지를 사용하여, 배양기(Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan)에서 37° C, 5% CO₂ humid air로 배양하였다. C2C12 세포를 96-well plate에 2×10⁴ cells/well 농도로 분주하였다. 24시간 배양 후 시체(柿蒂) 추출물을 FBS가 없는 배지에 5, 10, 20 μ g/mL 농도로 희석하여 24시간 배양하였다. 이후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, 5 mg/mL) 용액 20 μ L를 각 well에 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 생성된 청색 결정을 DMSO로 가용화시켜 microplate reader(BioTek Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 세포 보호 효과 측정

C2C12 세포를 96-well plate에 2×10⁴ cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양 후 시체(柿蒂) 추출물(5, 10, 20 μ g/mL)과 양성 대조군인 quercetin(30 μ M)을 FBS가 없는 배지에 희석하여 2시간 동안 전처리하였다. 이후 시체(柿蒂)추출물, quercetin을 600 μ M H₂O₂와 함께 FBS가 없는 배지에 희석하여 24시간 배양하였다. 세포 생존율은 MTT assay를 이용한 세포 독성 실험과 동일하게 진행하였다.

4. ROS 생성량 측정

세포내 ROS 생성량은 dichloro-dihydro-fluorescein diacetate(DCFH-DA)를 이용하여 측정하였다. C2C12 세포를 96-well black plate에 2×10⁴ cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양 후 시체(柿蒂) 추출물과 quercetin을 FBS가 없는 배지에 일정 농도로 희석한 후 5시간 배양하였다. 이후 세포를 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후 10 μ M의 DCFH-DA로 처리하여 37° C에서 1시간 배양시켰다. 다시 DCFH-DA를 PBS로 세척한 후 600 μ M H₂O₂로 산화스트레스 유발하여 세포내 ROS 생성량을 측정하였다. ROS는 fluorescent spectrophotometer(LS-55, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)로 90분 동안 여기파장(excitation wavelength) 485 nm와 발광파장(emission wavelength) 530 nm에서 fluorescent intensity를 측정하였다.

5. Malondialdehyde(MDA) 측정

C2C12 세포를 6-well plate에 4×10⁵ cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양한 후 시체(柿蒂) 추출물과 quercetin을 FBS가 없는 배지에 일정 농도로 희석한 후 4시간 동안 배양하였다. 이후 시체(柿蒂)추출물, quercetin에 600 μ M H₂O₂로 산화스트레스 유발하여 FBS가 없는 배지에 희석하여 24시간 배양하였다. 세포를 PBS로 세척하고 0.1 M의 potassium phosphate buffer(pH 7)를 증류수에 2배 희석한 용액에 세포를 모은 후 Vibra-Cell VCX 750 sonicator(Sonic & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)를 사용하여 세포를 10초간 용해시켰다. 세포용해물은 4° C, 10,000×g 조건에서 5분간 원심분리하고 상등액은 즉시 MDA 함량 분석에 사용하였다. 원심분리된 세포용해물 200 μ L에 TBA solution(TBA 0.375%, trichloroacetic acid 15%, HCl 0.25 N) 200 μ L를 첨가한 후 15분간 수욕 상에서 가열하였다. 가열한 세포용해물은 다시 13,000×g에서 5분간 원심분리한 후 535 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하였다. 결과는 단백질 mg당 MDA의 nmol로 나타내었다.

6. Glutathione(GSH) 측정

C2C12 세포를 6-well plate에 4×10⁵ cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양 후 시체(柿蒂) 추출물과 quercetin을 FBS가 없는 배지에 일정 농도로 희석한 후 4시간 동안 배양하였다. 이후 시체(柿蒂)추출물, quercetin에 600 μ M 농도의 H₂O₂로 산화스트레스를 유발하여 FBS가 없는 배지에 희석하여 24시간 배양하였다. 세포를 PBS로 세척하고 0.1 M의 potassium phosphate buffer(pH 7)를 증류수에 2배 희석한 용액에 세포를 모은 후 Vibra-Cell VCX 750 sonicator(Sonic & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)를 사용하여 세포를 10초간 방치하여 용해시켰다. 세포용해물은 4° C, 10,000×g 조건에서 5분간 원심분리하고 상등액은 즉시 GSH 함량 분석에 사용하였다. 원심분리된 세포용해물 180 μ L에 5% sulfosalicylic acid 20 μ L를 첨가한 후 4° C, 10,000×g 조건에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액 20 μ L와 3 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) 및 400 units/mL glutathione reductase가 포함된 반응 혼합물 150 μ L을 10분간 37° C에서 반응시킨 후 0.2 mM NADPH 50 μ L을 첨가하여 microplate reader를 사용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. GSH의 농도는 표준 곡선을 이용

하여 계산하였고 단백질 mg당 GSH의 nmol로 나타내었다.

7. 통계처리

통계분석은 GraphPad Prism 7(GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 소프트웨어를 이용하여 실시하였다. 데이터 간의 유의차는 one-way ANOVA의 Tukey-Kramer method를 통해 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

III. 결과

1. 세포 독성 및 과산화수소 자극에 대한 보호효과

시체(柿蒂) 추출물이 C2C12 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 이용한 세포 생존율을 측정하였다. 시체(柿蒂) 추출물의 농도를 각각 5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 후 세포 생존율을 측정하고 결과 농도별로 처리한 구간 내 세포 생존율은 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도까지 세포 독성은 없었다(Fig. 1A).

C2C12 세포에 H_2O_2 로 산화 스트레스를 유도했을 때 시체(柿蒂) 추출물의 농도별 보호효과를 알아보았다. 세포에 시체(柿蒂) 추출물을 농도별(5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$)로 전처리한 후, 600 μM 농도의 H_2O_2 에 노출시킨 결과 시체(柿蒂) 추출물이 처리되지 않은 세포에서는 세포 생존율이 74.48%로 감소하였으나, 시체(柿蒂) 추출물이 전처리된 세포에서는 세포 생존율이 크게 증가했다(Fig. 1B). 시체(柿蒂) 추출물은 600 μM 농도의 H_2O_2 로 유도된 산화 스트레스에 대해 세포 보호효과가 있는 것으로 판단되었다.

2. ROS 생성량에 미치는 영향

산화 스트레스에 의해 발생하는 ROS 생성에 시체(柿蒂) 추출물의 효과를 알아보기 위해 C2C12 세포에 H_2O_2 로 산화 스트레스를 유도한 후 ROS의 생성량을 측정하였다. 600 μM 농도의 H_2O_2 을 처리하여 산화 스트레스가 유도된 세포는 정상세포에 비해 ROS의 생성이 빠르게 증가하였으나, 시체(柿蒂) 추출물을 전처리한 세포는 ROS 생성이 억제되는 결과를 보여주었다(Fig. 2A). H_2O_2 로 산화 스트레스를 유발한 후 60분이 경과한 시점의 ROS 생성량을 비교한 결과, 시체(柿蒂) 추출물은 양성 대조군인 30 μM 농도의 quercetin과 유사한 ROS 생성량을 나타내어 시체(柿蒂) 추출물이

ROS 생성 억제에 활성이 있음을 보여주었다(Fig. 2).

3. MDA 생성량에 미치는 영향

시체(柿蒂) 추출물의 지질과산화 억제활성을 알아보기 위해 C2C12 세포의 MDA 농도를 측정하였다. 시체(柿蒂) 추출물을 5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 결과 지질과산화 반응은 매우 잘 억제되어 세포의 MDA 농도가 감소하는 경향을 보였으며, 이는 시체(柿蒂) 추출물이 MDA 생성 억제에 활성이 있음을 보여주었다(Fig. 3A).

4. GSH 생성량에 미치는 영향

시체(柿蒂) 추출물의 세포 보호효과를 보기 위해 세포 내 항산화제인 GSH의 변화를 측정하였다(Fig. 3B). C2C12 세포에 600 μM 농도의 H_2O_2 로 산화 스트레스를 유도한 세포에서 GSH의 농도는 대조군에 비해 현저하게 감소하였다. 그러나 시체(柿蒂) 추출물을 5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 전처리한 후 C2C12 세포에 600 μM 농도의 H_2O_2 를 처리한 결과 세포의 GSH의 함량은 증가하는 경향을 보였다. 특히, 시체(柿蒂) 추출물은 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 양성 대조군인 30 μM 농도의 quercetin보다 좋은 GSH 생성 증가 효과를 확인할 수 있었다.

IV. 고찰

본 연구에서는 산화 스트레스로 유도된 근육 세포 손상에 대하여 시체(柿蒂)의 항산화 활성을 통한 보호 효과를 살펴보았다. 과일과 채소에 널리 분포되어 있는 강력한 항산화 플라보노이드이며 산화 스트레스로 유발된 골격근 위축에 대한 보호 효과를 나타내는 quercetin이 양성 대조군으로 사용되었다²¹⁾.

ROS는 세포 내의 미토콘드리아 등에서 생성되며 신호 전달에 중요한 역할을 한다. ROS는 운동 등으로 근육 세포내에서 증가하며 운동 훈련과 관련된 골격근 적응에 핵심적인 역할을 한다. 그러나, 비정상적으로 축적되면 골격근의 산화 스트레스를 촉진시키며 근육의 노화, 근감소증(sarcopenia) 등을 유발할 수 있다^{3,22)}. ROS의 한 종류인 과산화수소는 직접적으로 사람의 근육세포 내에서 산화 스트레스를 유도하고 근위축(muscle atrophy)을 일으킬 수 있다²³⁾. 본 연구에서 시체(柿蒂) 추출물은 C2C12 세포에 독성이 없었으며 H_2O_2 로 유도된 산화



스트레스에 대해 세포 생존율을 유의적으로 증가시켜 보호 효과가 있는 것으로 확인되었다. C2C12 세포에 H₂O₂를 처리한 결과 ROS가 과다 증가하였으나 시체(柿蒂) 추출물의 전처리로 인해 이러한 ROS의 생성이 억제됨을 보였다. 이는 H₂O₂로 유도된 산화 스트레스로 C2C12 세포 내의 ROS가 증가하였으나 강황 열수 추출물 전처리로 인해 농도 의존적으로 감소하였다는 보고와 유사하였다²⁴⁾. 이러한 ROS 생성 억제 결과는 C2C12 세포에서 H₂O₂로 인해 생성된 자유 라디칼이 시체(柿蒂) 추출물에 의해 소거되는 것으로 보인다²⁵⁾.

GSH는 산화적 손상을 보호하는 항산화 시스템을 유지하는 매우 강력한 항산화 물질이다. C2C12 세포에 H₂O₂를 처리하여 산화 스트레스를 유도한 세포에서 GSH의 농도는 감소하였으나 시체(柿蒂) 추출물을 전처리한 후 세포의 GSH의 함량은 증가하는 경향을 보였다. 이는 H₂O₂를 처리한 C2C12 세포 환경에서 유청 단백질이 대조군에 비해 GSH 생성을 3.5배 이상 증가시켰다는 보고와 유사하였다²⁶⁾. 또한, 에탄올을 처리하여 산화 스트레스를 유도한 HepG2 세포에서 GSH의 농도는 대조군에 비해 현저하게 감소하였으나 시체(柿蒂) 추출물 전처리한 결과 세포의 GSH의 함량은 시체(柿蒂) 추출물 농도에 비례하여 증가하였다는 보고와도 같은 경향이었다¹²⁾. 이러한 결과는 시체(柿蒂) 추출물이 라디칼에 전자를 공여하며 세포에서는 자유 라디칼을 중화시키는 glutathione peroxidase의 기질로서 활동하는 항산화제인 GSH의 작용에 영향을 미치는 것으로 이해할 수 있다²⁷⁾.

시체(柿蒂)에서 분리된 성분으로는 플라보노이드인 catechin, kaempferol, quercetin, rutin과 페놀산인 vanillic acid, gallic acid, coumaric acid 등 다양한 생리활성 성분이 있다고 알려졌다^{15,28)}. 시체(柿蒂)의 플라보노이드 중 함량이 가장 많은 catechin은 강력한 항산화제로서 직접적으로 ROS를 소거하거나 금속 이온 킬레이터로 작용한다. 간접적으로는 항산화 효소의 유도, 산화 촉진 효소의 억제, 스트레스 관련 신호 경로를 억제하는 등의 작용을 하는 것으로 보고되었다²⁹⁻³⁰⁾. 이러한 결과들로 볼 때 시체(柿蒂)는 근육세포의 과도한 산화 스트레스를 개선하는 데 도움을 주는 소재가 될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구에서는 시체(柿蒂) 메탄올 추출물이 과산화수소로 유도된 C2C12 세포의 보호효과와 ROS 생성량, MDA 및 GSH 함량에 미치는 영향을 살펴보았다. 시체(柿蒂) 추출물은 C2C12 세포에서 20 μg/mL 농도까지 세포 독성이 나타나지 않았고, 과산화수소 처리군에 비해 농도에 비례하여 세포 생존율을 증가시켰다. 시체(柿蒂) 추출물은 5, 10, 20 μg/mL의 모든 농도에서 ROS의 생성과 MDA 생성을 억제하였다. GSH 함량 분석 결과 시체(柿蒂) 추출물은 GSH를 증가시켰는데, 시체(柿蒂) 추출물 20 μg/mL의 농도에서는 양성 대조군인 30 μM 농도의 quercetin보다 효과적으로 GSH 생성을 증가시켰다. 이러한 결과들로 시체(柿蒂) 추출물이 과산화수소로 유도된 산화 스트레스부터 근육 세포를 보호할 수 있는 약재로 활용될 수 있을 것으로 보인다.

References

1. Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*. 2004;52:794-804.
2. Meng SJ, Yu LJ. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int J Mol Sci*. 2010;11(4):1509-26.
3. Mason S, Wadley GD. Skeletal muscle reactive oxygen species: a target of good cop/bad cop for exercise and disease. *Redox Rep*. 2014;19(3): 97-106.
4. Powers SK, Smuder AJ, Judge AR. Oxidative stress and disuse muscle atrophy: cause or consequence?. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012;15(3):240-5.
5. Mankhong S, Kim S, Moon S, Kwak HB, Park DH, Kang JH. Experimental models of sarcopenia: bridging molecular mechanism and therapeutic strategy. *Cells*. 2020;9(6):1385.
6. Kang JS, Kim SO, Kim GY, Hwang HJ, Kim BW, Chang YC, Kim WJ, Kim CM, Yoo YH, Choi YH. An exploration of the antioxidant effects of garlic saponins in mouse-derived C2C12

- myoblasts. *Int J Mol Med*. 2016;37(1):149-56.
7. Kim YS, Yuk HJ, Kim DS. Effect of Jakyakgamcho-Tang extracts on H₂O₂-induced C2C12 myoblasts. *Molecules*. 2021;26(1):215.
 8. Kerasiotti E, Stagos D, Priftis A, Aivazidis S, Tsatsakis AM, Hayes AW, Kouretas D. Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chem*. 2014;155:271-8.
 9. Yoon BR, Lee YJ, Hong HD, Lee YC, Kim YC, Rhee YK, Kim KT, Lee, OH. Inhibitory effects of *Panax ginseng* CA Mayer treated with high temperature and high pressure on oxidative stress. *Korean J. Food & Nutr*. 2012;25(4):800-6.
 10. Korea Institute of Oriental Medicine. Korean medicinal materials, Vol. 2. Daejeon : Korea Institute of Oriental Medicine. 2016:210.
 11. The co-textbook publishing committee of Korean oriental medicine school. The herbal medicine. Seoul: Younglimsa. 2007:405-6.
 12. Hu Z, Gan N. Observation on the effect of the calyx of *Diospyros kaki* on hiccup caused by cancer chemotherapy. *J Pract Tradit Chin Med*. 2013;29(10):819.
 13. Cho YH, Kim NH, Khan I, Yu JM, Jung HG, Kim HH, Jang JY, Kim HJ, Kim DI, Kwak JH, Kang SC, An BJ. Anti-inflammatory potential of quercetin-3-O-β-D-(2"-galloyl)-glucopyranoside and quercetin isolated from *Diospyros kaki* calyx via suppression of MAP signaling molecules in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *J Food Sci*. 2016;81(10):C2447-56.
 14. Jo KJ, Lee JM, Lee SC, Park HR. Anticancer activity of persimmon (*Diospyros kaki* L.) calyx extracts on human cancer cells. *J Med Plant Res*. 2011;5(12):2546-50.
 15. Hong S, Heo H, Lee H, Lee M, Lee J, Park JH. Protective effects of the methanol extract from calyx of *Diospyros kaki* on alcohol-induced liver injury. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2021;50(4):339-46.
 16. Jeong T, Heo H, Lim J, Lee J, Park, JH. Protective effects of the calyx of *Diospyros kaki* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblast. *Korean Herb Med Inf*. 2021;9(1):57-66.
 17. Kim DU, Park JH, Kang Y. New insight of Korean traditional medicinal perspective in *Diospyros kaki* Thunb. based on herbal medicinal formula. *Korean Herb Med Inf*. 2018;6:91-103.
 18. Park JH. Review on pharmacological efficacy and clinical study of the calyx of *Diospyros kaki*. *Korean Herb Med Inf*. 2018;6:267-77.
 19. Kim HJ, Park TS, Jung MS, Son JH. Study on the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of sarcocarp and calyx of persimmon (Cheongdo Bansi). *J. Appl. Biol. Chem*. 2011;54(2):71-8.
 20. Jang IC, Jo EK, Bae MS, Lee HJ, Jeon GI, Park EJ, 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.
 21. Chen C, Yang JS, Lu CC, Chiu YJ, Chen HC, Chung MI, Wu YT, Chen FA. Effect of quercetin on dexamethasone-induced C2C12 skeletal muscle cell injury. *Molecules*. 2020;25(14):3267.
 22. Fulle S, Protasi F, Di Tano G, Pietrangelo T, Beltramin A, Boncompagni S, Vecchiet L, Fanò G. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp Gerontol*. 2004;39(1):17-24.
 23. Scicchitano BM, Pelosi L, Sica G, Musarò A. The physiopathologic role of oxidative stress in skeletal muscle. *Mech Ageing Dev*. 2018;170:37-44.
 24. Jeong HJ, Kim S, Park J, Kim KH, Kim K, Jun W. Antioxidant activities and protective effects of hot water extract from *Curcuma longa* L. on oxidative stress-induced C2C12 myoblasts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2017;46(11):1408-13.
 25. Kang JS, Han MH, Kim GY, Kim CM, Chung HY, Hwang HJ, Kim BW, Choi YH. Schisandrae semen essential oil attenuates oxidative stress-induced cell damage in C2C12 murine skeletal muscle cells through Nrf2-mediated upregulation of *HO-1*. *Int J Mol Med*. 2015;35(2):453-9.



26. Xu R, Liu N, Xu X, Kong B. Antioxidative effects of whey protein on peroxide-induced cytotoxicity. *J Dairy Sci.* 2011;94(8):3739-46.
27. Choe H, Lee H, Lee J, Kim Y. Protective effect of gamma-aminobutyric acid against oxidative stress by inducing phase II enzymes in C2C12 myoblast cells. *J Food Biochem.* 2021;45(4):e13639.
28. Cha BC. Ingredients of antioxidant activity from calyx of *Diospyros kaki* Thunberg. *Kor J Pharmacogn.* 2014;45:35-40.
29. Bernatoniene J, Kopustinskiene DM. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. *Molecules.* 2018;23(4):965.
30. Yun YP, Park JB, Heo MY. Protective effects of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate on reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Yakhak Hoeji.* 2001;45(1):101-7.

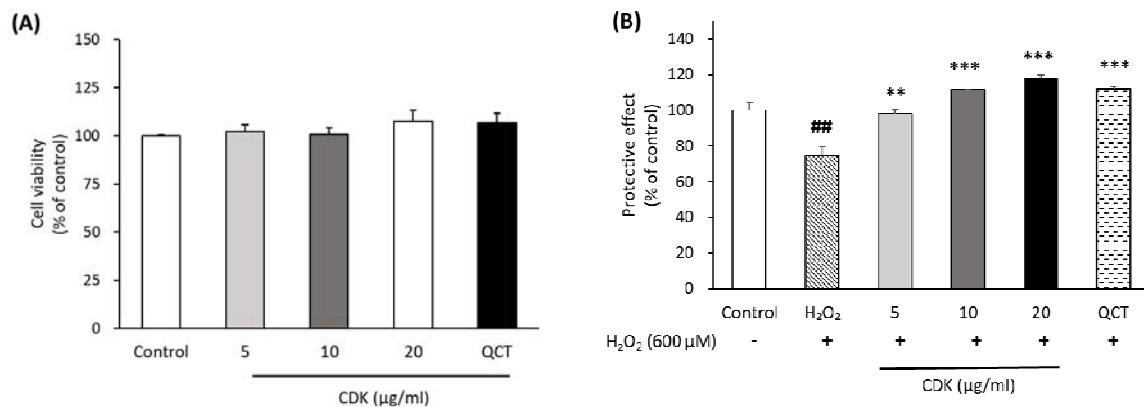


Fig. 1. Cytotoxicity (A) and protective effect (B) of the CDK (calyx of *Diospyros kaki* Thunb.) extract in untreated and H₂O₂ (600 μM) treated C2C12 cells. Quercetin (QCT, 30 μM) was used as a positive control. Each value is expressed as the mean ± standard error (n=3). ##P<0.01 versus control. **P<0.01, and ***P<0.001 versus H₂O₂ (600 μM) by ANOVA and the Tukey–Kramer method.

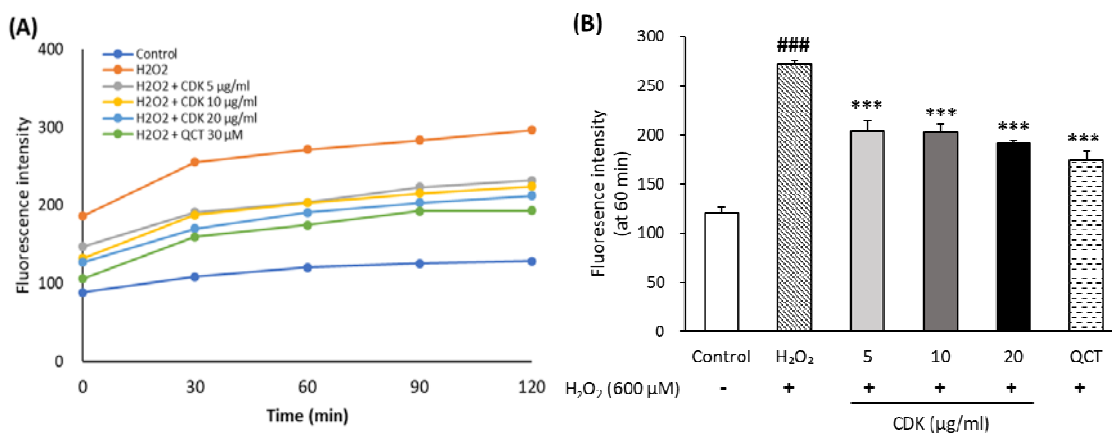


Fig. 2. Effects of the CDK (calyx of *Diospyros kaki* Thunb.) extract on time course of ROS generation (A) and ROS production at 60 min (B) in H₂O₂ (600 μM) treated C2C12 cells. Quercetin (QCT, 30 μM) was used as a positive control. Each value is expressed as the mean ± standard error (n=3). ###P<0.001 versus control and ***P<0.001 versus H₂O₂ (600 μM) by ANOVA and the Tukey–Kramer method.

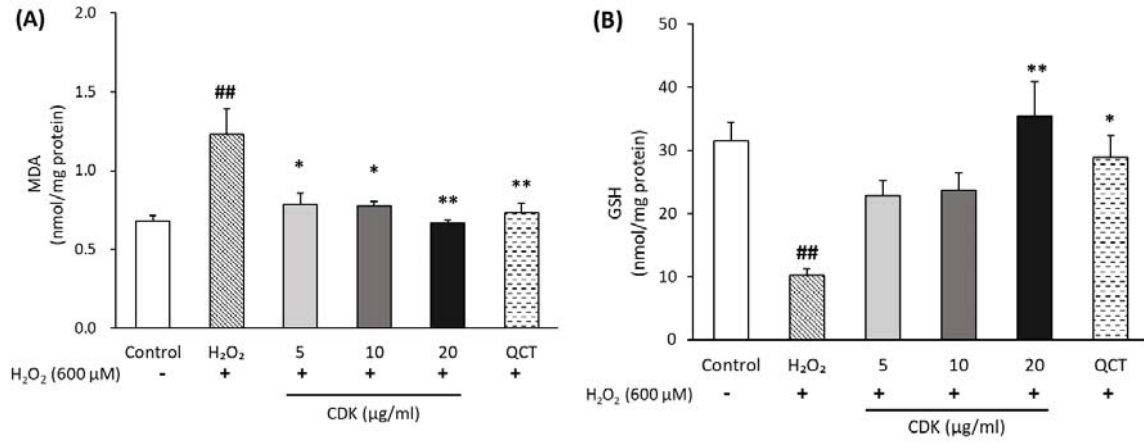


Fig. 3. Effects of the CDK (calyx of *Diospyros kaki* Thunb.) extract in H₂O₂ (600 μM) treated C2C12 cells. (A) Cellular lipid peroxidation was determined by the levels of MDA. (B) Cellular GSH levels were determined by DTNB-GSSG reductase recycling assay. Quercetin (QCT, 30 μM) was used as a positive control. Each value is expressed as the mean ± standard error (n=3). ##*P*<0.01 versus control, **P*<0.05 and ***P*<0.01 versus H₂O₂ (600 μM) by ANOVA and the Tukey-Kramer method.