

## Anti-inflammatory Activities of Apple Extracts and Phloretin

Geun-Ho Kim<sup>1†</sup>, Eun-Joo Lee<sup>1†</sup>, Seung-Min Ryu<sup>1</sup>, Ho-Yong Sohn<sup>2</sup> and Jong-Sik Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences and Biotechnology, Andong National University, Andong 36729, Korea

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 36729, Korea

Received September 24, 2020 / Revised October 30, 2020 / Accepted November 2, 2020

In the present study, we prepared hot water extracts of green apple (GAHW) and unripe apple (UAHW), and ethanol extract of green apple (GAE), and investigated their anti-inflammatory activities in LPS-activated RAW264.7 cells. All extracts dramatically suppressed nitric oxide (NO) production in a dose-dependent manner in LPS-stimulated RAW264.7 cells without affecting cell viability. In addition, all extracts decreased the expression of iNOS, whereas UAHW only reduced the expression of COX-2. All extracts suppressed the phosphorylation of MAPKs (p38, ERK, and JNK) indicating all extracts show their anti-inflammatory activities via regulating MAPK pathway. Furthermore, all extracts reduced the production of reactive oxygen species in a dose-dependent manner and they increased the expression of heme oxygenase-1 (HO-1) whereas UAHW could not. We also investigated whether apple flavonoids phloretin and phloridzin can have their anti-inflammatory activities in same *in vitro* model. Phloretin dramatically decreased NO production in a dose dependent manner without affecting cell viability, whereas phloridzin have no effects. Phloretin also reduced the expression of iNOS as well as COX-2, whereas phloridzin could not. Overall, these results suggest that apple extracts have their anti-inflammatory activities via regulating MAPKs and HO-1 pathways, and apple flavonoid phloretin can be one of phytochemicals responsible for anti-inflammatory effect of apple.

**Key words** : Anti-inflammation, apple extract, phloretin, phloridzin, RAW264.7

### 서 론

염증이란 먼지, 병원균, 그리고 바이러스 감염과 같은 다양한 자극에 의해 작용하는 인체의 선천 방어 시스템의 일종이다[1]. 염증은 급성염증과 만성염증으로 나눌 수 있으며, 이러한 염증의 발생은 암을 비롯한 다양한 질병의 발병과 관련이 있다[11, 12, 14]. 또한, 염증은 ROS (reactive oxygen species) 생성과도 밀접한 관련이 있으므로, 염증 반응의 조절에 있어 ROS 생성을 조절하는 것도 중요하다[5, 7].

최근에는 파이토케미칼과 같은 식물유래의 천연물에 의해 염증 관련 질병을 예방하고 치료하기 위한 연구가 많이 진행되고 있다[4, 10, 20]. 과일이나 채소에 다량 함유되어 있는 식이용 파이토케미칼들은 쉽게 접할 수 있다는 장점이 있다. 가장 흔히 접하는 과일 중 하나인 사과에도 파이토케미칼을 비롯한 다양한 생리활성물질이 함유되어 있으며[8], 이러한 성분들은 사과 섭취 시 건강에 유익한 효과를 미치는 것과 밀접한

관련이 있는 것으로 판단된다[3]. 사과의 대표적인 생리활성물질로는 flavonoid인 phloretin과 이의 당화 유도체인 phloridzin을 들 수 있다. Phloretin과 phloridzin에 의한 항산화 활성[13, 18], 항염증 활성[2, 6, 21], 항암 활성[15, 16] 등에 대한 많은 연구들이 보고된 바 있다. 이에 반해, 사과추출물에 의한 생리활성 및 작용기전에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 세포주에서 풋사과와 애사과 추출물의 항염증 활성과 작용기전을 연구하였으며, 또한 동일한 *in vitro* 모델에서 사과 flavonoid인 phloretin과 phloridzin에 의한 항염증 활성을 연구하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

본 연구의 풋사과와 애사과는 2018년 경북 문경시 점촌동에 위치한 애플그린(Applegreen)에서 제공받았으며, 풋사과는 수정 후 70일 이내의 지름 4 cm 이하의 씨방이 만들어지기 이전의 사과이며, 애사과는 수정 후 90일이 지난 미성숙 사과로 정의하였다. 풋사과의 열수추출물(Hot water extract of green apple, GAHW)과 애사과 열수추출물(Hot water extract of unripe apple, UAHW)을 조제하기 위하여 각각의 사과를 세절 한 후 사과 시료에 대해 20배의 증류수를 가한 후 100°C에서 1시간 동안 추출하였으며, 추출액은 filter paper (Whatman No. 2)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1110S,

† Authors contributed equally.

\*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5798, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : jsk@anu.ac.kr

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.

Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan) 후 동결건조하였다. 한편 풋사과의 에탄올 추출물(Ethanol extract of green apple, GAE) 조제를 위해, 풋사과 시료에 20배의 70% ethanol (Daeyung Chemicals & Metals Co., Ltd. Korea)을 가한 후 상온에서 2일 동안 침지하여 추출하였으며, 추출액을 상기와 동일하게 농축, 동결 건조하였다. Apple flavonoid인 phloretin과 phloridzin은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 마우스 대식세포 RAW264.7 배양 및 LPS에 의한 염증반응 유도

마우스 대식세포 RAW264.7 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Fredrick, MD, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 염증을 유도하기 위해 그람음성세균의 세포벽 구조물인 lipopolysaccharide (LPS, Sigma)를 이용하여 세포를 자극하였다.

### Nitric oxide (NO) 생산 분석

LPS에 의해 염증 유도된 마우스 대식세포 RAW264.7 세포주에서 세 종류의 사과추출물과 phloretin, phloridzin에 의한 NO 생산변화를 측정하였다. 즉, 96-well plate의 각 well당 세포주를  $2 \times 10^5$  개 접종하여 19시간 동안 배양한 후, 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 LPS (Sigma)를 1시간 처리한 다음 각 시료를 농도 별로 처리한 후 16시간 동안 추가 배양하였다. 그 후, 상등액 100  $\mu\text{l}$ 와 Griess reagent (Sigma) 100  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 15분간 상온에서 반응시키고, Tecan Infinite M200 plate reader (Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생산 분석은 독립적인 4개의 well에서 수행되었으며, 통계 분석은 Sigma plot을 이용하여 mean  $\pm$  SD 값으로 나타내었다.

### Reactive oxygen species (ROS) 측정

사과 추출물이 ROS 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 DCF-DA assay를 수행하였다. RAW264.7 세포주의 배양, LPS의 처리, 그리고 각 시료의 처리 시간과 조건은 NO 생산 분석 실험과 동일하게 진행하였다. 이후 세포 배양액을 모두 제거한 후 25  $\mu\text{M}$  DCF-DA (Sigma)를 phenol-free DMEM (Gibco)에 희석하여 세포주에 처리하고 45분간 반응시켰다. 그 다음 세포주로부터 배양액을 모두 제거하고 새 phenol-free DMEM을 분주하고 10분 후, Tecan Infinite F200 pro plate reader (Austria)를 사용하여 excitation: 510 nm, emission: 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. ROS의 측정은 독립적인 3개의 well에서 수행되었으며, 통계 분석은 Sigma plot을 이용하여 mean  $\pm$  SD 값으로 나타내었다.

### 세포생존율 분석

세포생존율 분석은 CellTiter 96® AQueous One Solution

Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하였다. RAW264.7 세포주의 배양, LPS의 처리, 그리고 각 시료의 처리 시간과 조건은 NO 생산 분석 실험과 동일하게 진행하였다. RAW264.7 세포주에 20  $\mu\text{l}$ 의 MTS 용액을 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 4시간 동안 반응시키고, Tecan Infinite M200 plate reader (Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율 분석은 독립적인 4개의 well에서 수행되었으며, 통계 분석은 Sigma plot을 이용하여 mean  $\pm$  SD 값으로 나타내었다.

### Western blot analysis

단백질 발현 분석을 위하여 60 mm dish에 RAW264.7 세포주를 접종한 후 19시간 동안 배양한 후, 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 LPS (Sigma)를 처리하여 1시간 동안 염증을 유도하였다. 그 후 사과 추출물을 농도 별로 처리한 뒤 16시간 동안 추가 배양하였다. MAPKs와 phospho-MAPKs 단백질 측정 시 추출물을 serum free media에 혼합하여 처리하고 4시간 후에 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 LPS를 30분 처리한 후 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 10X RIPA buffer (Cell signaling, Beverly, MA, USA)를 2X로 희석하여 처리한 후 sonication 한 다음 원심분리하여 상층액을 얻었다. 단백질은 Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법을 이용하여 정량하고, -20°C에 보관하며 사용하였다. 본 실험에서 사용된 항체 중 iNOS, COX-2, p38, p-p38, ERK1/2, p-ERK1/2, JNK, p-JNK, 그리고 HO-1에 대한 항체는 모두 Cell signaling사(USA)에서 구입하였으며, Actin 항체 및 2차 항체는 모두 Santa Cruz 사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다.

### 통계 분석

모든 실험은 최소 3회 이상 실시하였으며, 실험결과는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었고, 각 실험결과의 유의성 검토는 대조구와 비교하여 Student's *t*-test에 의해 판정하였으며 *p* 값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

## 결과 및 고찰

### 사과 추출물에 의한 nitric oxide (NO) 생산 억제 및 세포 생존율 변화 분석

본 연구에서는 풋사과 열수추출물(GAHW), 풋사과 에탄올 추출물(GAE), 그리고 애사과 열수추출물(UAHW)이 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 세포에서 NO 생산과 세포성장에 미치는 영향을 연구하였다. LPS로 활성화된 RAW264.7 세포주에 1, 2, 5 mg/ml의 사과 추출물을 각각 처리한 결과, 추출물 GAHW, GAE, UAHW의 처리에 의해 농도 의존적으로 NO 생산이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 한편, 동일한 처리 조건에서 세포생존율 변화를 측정한 결과 세 추출물 모두 세

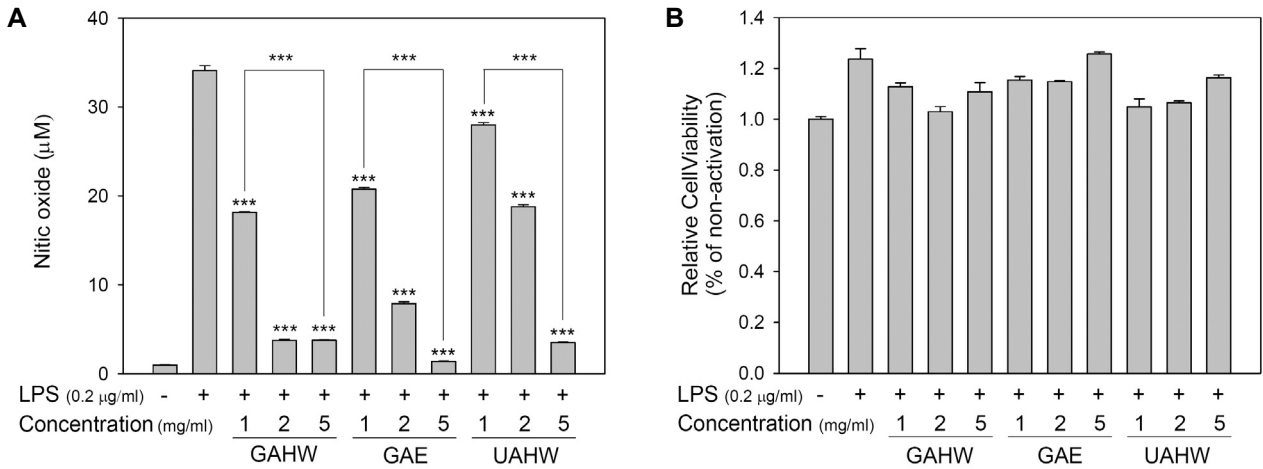


Fig. 1. Effects of hot water extracts of green apple (GAHW), unripe apple (UAHW), and ethanol extract of green apple (GAE) on nitric oxide (NO) production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were plated  $2 \times 10^5$  cells/well in 96-well plate and incubated with 1, 2, or 5 mg/ml of each extract for 16 hr in LPS-activated RAW264.7 cells. (A) NO production was measured by NO production assay. (B) Cell viability was measured using MTS proliferation assay kit. Values indicate means  $\pm$  SD (n=4). \*\*\* $p < 0.001$  vs LPS.

포 생존율에는 큰 영향을 주지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 1B). 따라서, 사과 추출물 GAHW, GAE, UAHE는 LPS로 염증 유도된 RAW264.7 세포의 세포 생존율에는 영향을 미치지 않으면서 NO 생산을 농도의존적으로 저해함을 확인하였다. 사과 추출물의 경우 유사한 RAW264.7 세포주를 이용한 연구는 전무하나, 최근 사과 껍질 성분이 동물모델에서 dextran sodium sulfate (DSS)로 유도한 궤양성 대장염을 감소시킨다는 보고가 있었다[17].

**사과추출물에 의한 iNOS와 COX-2 단백질 발현 감소**

사과 추출물 처리에 의한 염증 유도 유전자인 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 분석을 수행하였다. 즉, LPS로 활성화된 RAW264.7 세포주에 각각 5 mg/ml의 GAHW, GAE, 그리고 UAHW를 처리한 후 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 분석하였다(Fig. 2). 그 결과, LPS 처리에 의해 증가된 iNOS 단백질의 발현이 세 추출물에 의해 모두 감소되었으며, 특히 GAHW와 UAHW에 의해 현저히 iNOS의 발현이 감소됨을 확인하였다. 그러나, COX-2 단백질의 경우 풋사과 추출물인 GAHW와 GAE의 처리가 LPS 처리군에 비하여 명확한 차이를 나타내지 않았으나, UAHW 처리에 의해서는 COX-2의 발현이 약하게 감소됨을 확인하였다(Fig. 2). 사과 추출물에 의한 iNOS와 COX-2 유전자의 발현 감소는 보고된 바가 없으나, 사과 flavonoid인 phloretin에 의해 iNOS와 COX-2의 발현이 감소됨이 보고된 바 있다[19].

**사과추출물에 의한 MAPKs 신호 경로 저해**

사과 추출물에 의한 항염증 활성이 MAPKs 신호경로에 의해 조절되는지 확인하기 위하여 GAHW, GAE, UAHW 추출

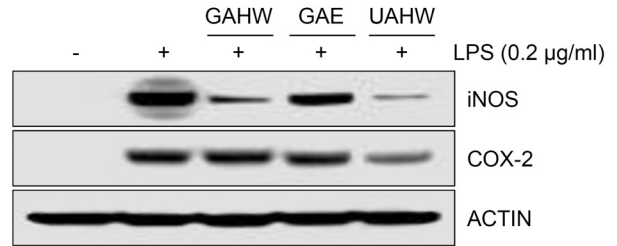


Fig. 2. Down-regulation of iNOS and COX-2 expression by GAHW, GAE, and UAHW. RAW264.7 cells were plated  $2 \times 10^5$  cells in 60 mm dish and incubated with 5 mg/ml of GAHW, GAE and UAHW for 16 hr in LPS-treated RAW264.7 cells. Subsequently, cell lysates were prepared and Western blot analysis was performed by using iNOS, COX-2 and ACTIN antibodies.

물 처리 후 MAPKs (p38, ERK1/2, JNK) 발현과 이들의 인산화 분석을 수행하였다. 즉, GAHW, GAE, UAHW를 5 mg/ml의 농도로 RAW264.7 세포에 4시간 동안 전처리한 후 LPS로 30분 동안 염증을 유도하였다. 그리고 p38, ERK1/2, 및 JNK 총 단백질과 각 MAPK 단백질의 인산화 변화를 분석하였다. Western blot 분석 결과 5 mg/ml 농도의 세 추출물을 처리한 경우 LPS만 처리한 경우에 비해 p38, ERK1/2 및 JNK의 총 단백질의 발현 변화는 관찰되지 않았다. 반면, 각 MAPK 단백질의 인산화가 저해되었으며, 특히 p-JNK는 현저하게 감소되었다(Fig. 3). 이러한 연구 결과는 GAHW, GAE, UAHW가 MAPK 신호전달경로를 조절함으로써 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 염증반응을 억제한다는 사실을 시사한다. Lee 등에 의하면 indomethacin에 의해 유도된 위 손상에서 사과 polyphenol compound에 의해 산화적 스트레스의 감소와 MAPK signal-

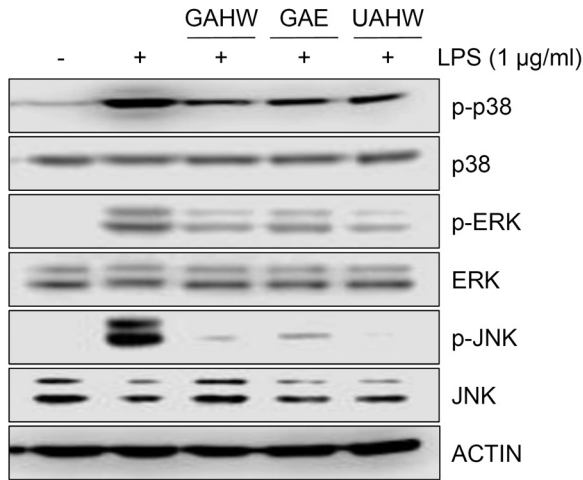


Fig. 3. Inhibition of MAPKs phosphorylation by GAHW, GAE and UAHW. RAW264.7 cells were plated  $2 \times 10^5$  cells in 60 mm dish and treated with 5 mg/ml of GAHW, GAE and UAHW for 4 hr, and then cells were stimulated with LPS (1 µg/ml) for 30 min. Cell lysates were prepared and Western blot was carried out by using antibodies against p38, p-p38, ERK1/2, p-ERK1/2, JNK, p-JNK and ACTIN.

ing의 조절에 의하여 염증이 완화된다고 보고하였다[9].

### 사과 추출물에 의한 ROS 생산 감소

ROS의 생성은 만성염증의 원인으로 작용할 수 있고 ROS 생성 억제제가 염증 발생 조절과 직접적인 관련성이 있으며, 또한 다양한 폴리페놀 성분에 의한 항산화 활성화와 항염증 활성화에 대한 총설이 보고 된바 있다[7]. 따라서, 본 연구에서 사과추출물 GAHW, GAE, UAHW가 ROS 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여 LPS로 자극된 RAW264.7 세포에 각 추출물을 2, 5 mg/ml의 두 농도로 처리한 후 ROS 생산을 측정하였다. 그 결과, Fig. 4A에서 보는 바와 같이 대조구에 비해 처리한 추출물의 농도의존적으로 ROS 생산이 감소됨을 확인하였다. 동일한 추출물 처리 조건에서 세포생존율에는 영향이 없었다 (Fig. 4B). GAHW, GAE, UAHW에 의한 ROS 생산 저해 현상이 항산화 활성화의 주요한 경로 단백질인 heme oxygenase-1 (HO-1)에 의한 것인지 확인하였다. 그 결과, GAHW와 GAE 처리에 의해서 HO-1의 발현이 현저하게 증가됨을 확인하였으나, UAHW에 의한 HO-1의 발현 증가는 확인하지 못하였다 (Fig. 4C).

### 사과유래 순수물질인 phloretin에 의한 NO 생산 감소 및 pro-inflammatory 단백질의 발현 감소

대표적인 사과 flavonoid인 phloretin과 phloridzin이 LPS로 활성화된 RAW264.7 세포주의 NO 생산에 미치는 영향을

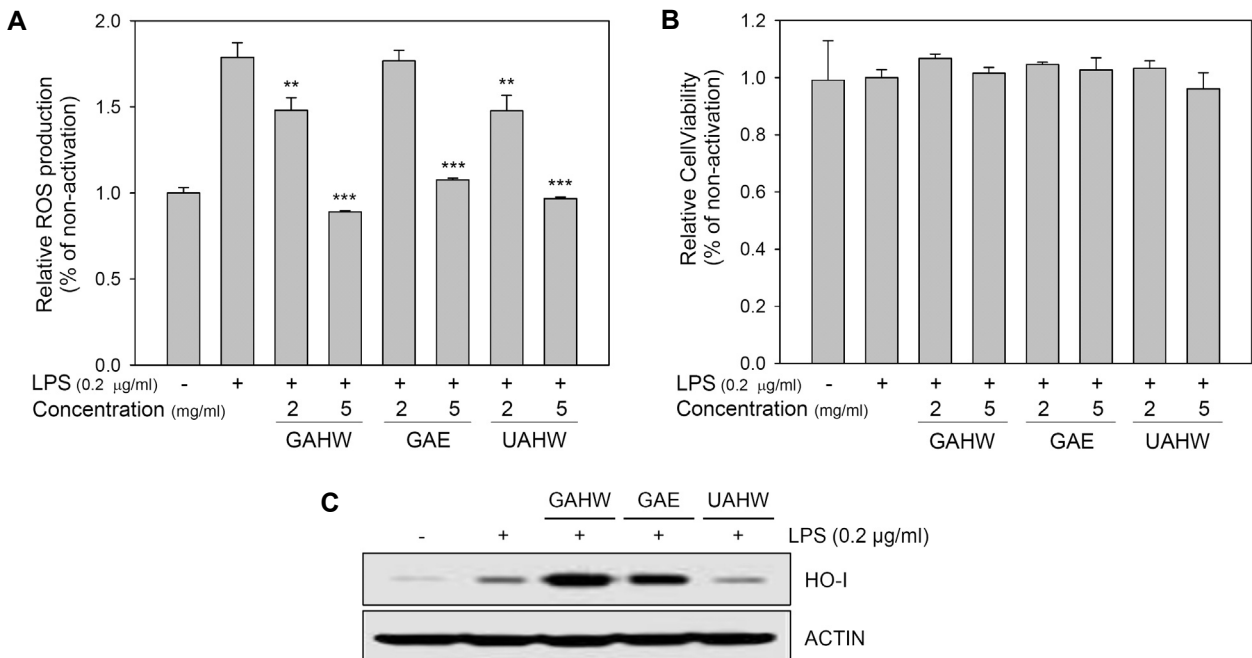


Fig. 4. Scavenging activities of reactive oxygen species (ROS) and up-regulation of heme oxygenase-1 (HO-1) by GAHW, GAE and UAHW. RAW264.7 cells were plated  $2 \times 10^5$  cells/well in a 96-well plate and incubated with 2 or 5 mg/ml of GAHW, GAE and UAHW for 16 hr. (A) ROS production was measured by DCF-DA assay. Values indicate means  $\pm$  SD (n=3). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs LPS. (B) Cell viability was measured using cell proliferation assay kit. (C) RAW264.7 cells were plated  $2 \times 10^5$  cells in 60 mm dish and treated 5 mg/ml of GAHW, GAE and UAHW for 16 hr. Subsequently, cell lysates were prepared from treated cells and Western blot analysis was performed by using HO-1 and Actin antibodies.

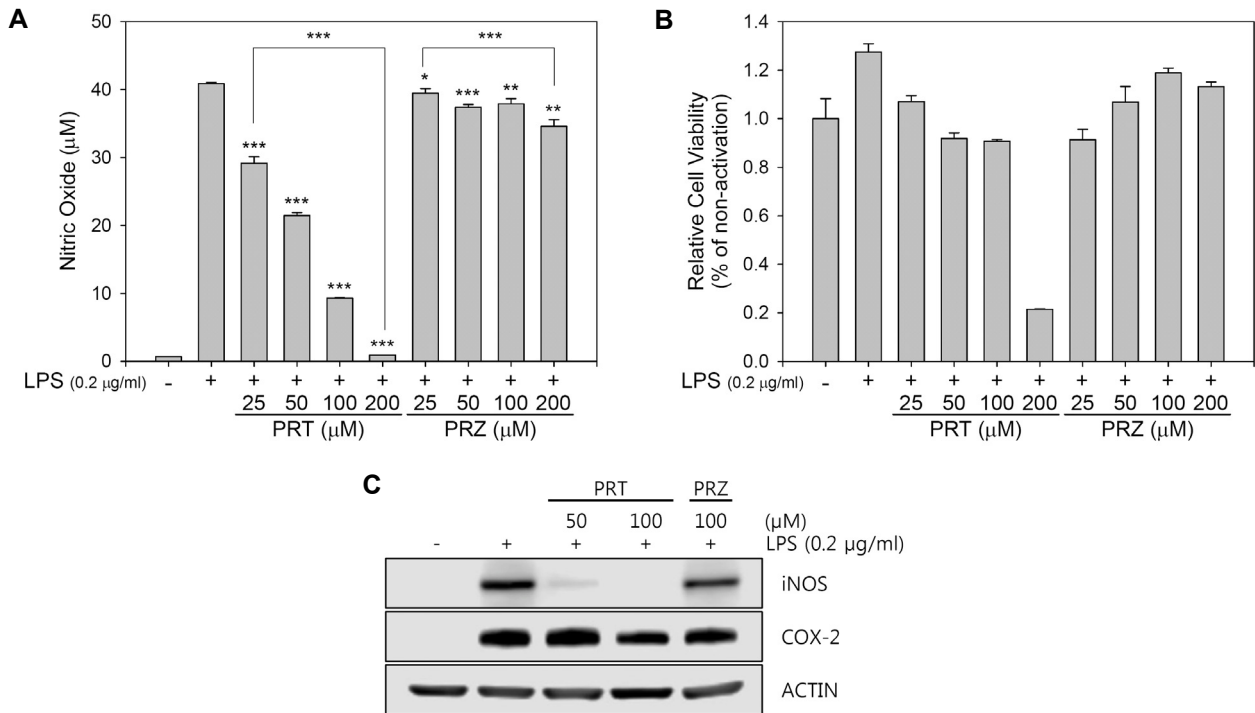


Fig. 5. Inhibition of NO production and down-regulation of iNOS and COX-2 by phloretin in LPS-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were plated  $2 \times 10^5$  cells/well in 96-well plate and incubated with 25, 50, or 100 µM of phloretin and phloridzin for 16 hr in LPS-activated RAW264.7 cells. (A) NO production was measured by NO production assay. (B) Cell viability was measured using MTS proliferation assay kit. Values indicate means  $\pm$  SD (n=4). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs LPS. (C) RAW264.7 cells were incubated with 50, 100 µM of phloretin and 100 µM of phloridzin for 16 hr in LPS-treated RAW264.7 cells. Subsequently, cell lysates were prepared and Western blot analysis was performed by using iNOS, COX-2 and ACTIN antibodies.

연구하였다. Fig. 5A, B에서 보는 바와 같이 phloretin을 25, 50, 100, 200 µM의 농도로 각각 처리한 결과 100 µM의 처리농도까지는 세포 생존율에 영향 없이 농도의존적으로 NO의 생산이 감소됨을 확인하였으나, 200 µM 처리군에서는 거의 90% 세포가 죽는 독성을 보여주었다. 반면, phloridzin을 동일한 조건에서 처리한 결과 세포독성과 NO 생산에 전혀 영향이 없는 것으로 확인되었다(Fig. 5A, B). 또한, 50, 100 µM의 phloretin을 처리한 경우 대표적인 pro-inflammatory 단백질인 iNOS의 발현이 현저하게 감소됨을 확인하였고, COX-2 단백질은 100 µM phloretin 처리군에서 감소하였다. 반면, phloridzin은 두 단백질 발현에 전혀 영향을 미치지 못하였다(Fig. 5C). 이러한 연구 결과를 통해 동일한 처리조건에서 phloretin은 NO 생산의 저해와 두 단백질의 발현을 감소시키는 것으로 확인된 반면, phloridzin은 전혀 효과가 없어 항염증 활성이 없는 것으로 판단된다. Chang 등의 보고[2]에 의해서도 동일한 *in vitro* 모델에서 본 연구결과와 유사하게 phloretin은 항염증 활성을 보여주었으나 phloridzin은 항염증 활성이 없었다.

종합적으로 풋사과와 애사과 추출물은 항염증 활성을 가지며, 사과 flavonoid의 한 종류인 phloretin이 사과의 항염증 활성을 담당하는 파이토케미칼 성분 중 하나라고 판단된다.

## 감사의 글

이 논문은 안동대학교 기본연구지원사업에 의하여 연구되었습니다. 이에 감사드립니다.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E. and Kumar, S. S. 2016. Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, 5276130.
- Chang, W. T., Huang, W. C. and Liou, C. J. 2012. Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Food Chem.* **134**, 972-979.
- Choi, B. Y. 2019. Biochemical basis of anti-cancer-effects of Phloretin-A natural dihydrochalcone. *Molecules* **24**, 278.

4. Desai, S. J., Prickril, B. and Rasooly A. 2018. Mechanisms of phytonutrient modulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inflammation related to cancer. *Nutr. Cancer* **70**, 350-375.
5. Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q. and Griendling, K. K. 2018. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circ. Res.* **122**, 877-902.
6. Huang, W. C., Chang, W. T., Wu, S. J., Xu, P. Y., Ting, N. C. and Liou, C. J. 2013. Phloretin and phlorizin promote lipolysis and inhibit inflammation in mouse 3T3-L1 cells and in macrophage-adipocyte co-cultures. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 1803-1813.
7. Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. and Rahu, N. 2016. Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us? *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, 7432797.
8. Kschonsek, J., Wolfram, T., Stöckl, A. and Böhm, V. 2018. Polyphenolic compounds analysis of old and new apple cultivars and contribution of polyphenolic profile to the in vitro antioxidant capacity. *Antioxidants (Basel)* **7**, 20.
9. Lee, Y. C., Cheng, C. W., Lee, H. J. and Chu, H. C. 2017. Apple polyphenol suppresses indomethacin-induced gastric damage in experimental animals by lowering oxidative stress status and modulating the MAPK signaling pathway. *J. Med. Food* **20**, 1113-1120.
10. Lichota, A., Gwozdziński, L. and Gwozdziński, K. 2019. Therapeutic potential of natural compounds in inflammation and chronic venous insufficiency. *Eur. J. Med. Chem.* **176**, 68-91.
11. Murata, M. 2018. Inflammation and cancer. *Environ. Health Prev. Med.* **23**, 50.
12. Newcombe, E. A., Camats-Perna, J., Silva, M. L., Valmas, N., Huat, T. J. and Medeiros, R. 2018. Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* **15**, 276.
13. Rezk, B. M., Haenen, G. R., van der Vijgh, W. J. and Bast, A. 2002. The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 9-13.
14. Sands, B. E. 2015. Biomarkers of inflammation in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **149**, 1275-1285.
15. Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., Will, F. and Pool-Zobel, B. L. 2006. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol. Carcinog.* **45**, 164-174.
16. Xu, M., Gu, W., Shen, Z. and Wang, F. 2018. Anticancer activity of phloretin against human gastric cancer cell lines involves apoptosis, cell cycle arrest, and inhibition of cell invasion and JNK signalling pathway. *Med. Sci. Monit.* **24**, 6551-6558.
17. Yeganeh, P. R., Leahy, J., Spahis, S., Patey, N., Desjardins, Y., Roy, D., Delvin, E., Garofalo, C., Leduc-Gaudet, J. P., St-Pierre, D., Beaulieu, J. F., Murette, A., Gouspillou, G. and Levy, E. 2018. Apple peel polyphenols reduce mitochondrial dysfunction in mice with DSS-induced ulcerative colitis. *J. Nutr. Biochem.* **57**, 56-66.
18. Zhang, T., Wei, X., Miao, Z., Hassan, H., Song, Y. and Fan, M. 2016. Screening for antioxidant and antibacterial activities of phenolics from Golden Delicious apple pomace. *Chem. Cent. J.* **10**, 47.
19. Zheng, W., Chen, C., Zhang, C., Cai, L. and Chen, H. 2018. The protective effect of phloretin in osteoarthritis: an *in vitro* and *in vivo* study. *Food Funct.* **9**, 263-278.
20. Zhu, F., Du, B. and Xu, B. 2018. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **58**, 1260-1270.
21. Zielinska, D., Laparra-Llopis, J. M., Zielinski, H., Szawara-Nowak, D. and Giménez-Bastida, J. A. 2019. Role of apple phytochemicals, phloretin and phloridzin, in modulating processes related to intestinal inflammation. *Nutrients* **11**, 1173.

## 초록 : 사과 추출물과 phloretin에 의한 항염증 활성

김근호<sup>1\*</sup> · 이은주<sup>1\*</sup> · 류승민<sup>1</sup> · 손호용<sup>2</sup> · 김종식<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>국립안동대학교 생명공학부, <sup>2</sup>국립안동대학교 식품영양학과)

본 연구에서는 풋사과의 열수추출물(GAHW)과 에탄올추출물(GAE), 그리고 애사과 열수추출물(UAHW)을 제조하고 LPS로 활성화된 RAW264.7세포주를 이용하여 이들의 항염증 활성을 연구하였다. 모든 추출물이 세포생존율에는 영향을 미치지 않고 nitric oxide (NO) 생산을 저해하였으며, iNOS의 발현도 감소시켰다. 반면, UAHW만이 COX-2의 발현을 저해하였다. 또한 모든 추출물이 모든 MAPKs의 인산화를 감소시켰다. 모든 추출물이 ROS의 생산을 농도의존적으로 감소시켰으며, GAHW와 GAE에 의해 HO-1의 발현이 증가됨을 확인하였다. 또한, 사과 flavonoid인 phloretin과 phloridzin의 항염증 활성을 연구하였다. Phloretin은 농도의존적으로 NO의 생산을 저해하였으나, phloridzin은 NO 생산에 아무 영향이 없었다. 또한, phloretin은 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 감소시킨 반면, phloridzin은 두 단백질 발현에 영향을 주지 못하였다. 따라서, 이러한 연구결과는 사과 추출물은 MAPK 경로와 HO-1 경로를 조절함으로써 항염증 활성을 가지며, phloretin이 사과의 항염증 활성을 담당하는 파이토케미칼의 하나가 될 수 있음을 제시한다.