

## 몽골 야생 링곤베리와 블루베리의 항산화, 항염증 효과 및 생리활성 물질 분석 연구

이혜주<sup>1</sup> · Batdorj Naranbulag<sup>2</sup> · 정승진<sup>1</sup> · 서 찬<sup>2</sup> · 이상길<sup>1,2,\*</sup>  
<sup>1</sup>부경대학교 스마트그린기술융합공학과, <sup>2</sup>부경대학교 식품영양학과

### Analysis of antioxidant and anti-inflammatory effects of Mongolian wild lingonberry and blueberry, and identification of their bioactive compounds

Hye Ju Lee<sup>1</sup>, Batdorj Naranbulag<sup>2</sup>, Seung Jin Jeong<sup>1</sup>, Chan Seo<sup>2</sup>, and Sang-Gil Lee<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Smart Green Technology Engineering, Pukyong National University

<sup>2</sup>Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University

**Abstract** The Mongolian lingonberry and blueberry are two essential food sources found in Mongolia. This study investigated the antioxidant and anti-inflammatory effects of methanol extracts from Mongolian lingonberry (LBE) and blueberry (BBE). Compared to the LBE, the BBE showed higher total phenolic, flavonoid, and anthocyanin contents, as well as antioxidant capacities. The LBE and BBE inhibited the mRNA expression of pro-inflammatory genes, including tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and cyclooxygenase (COX-2) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. In addition, the LBE and BBE inhibited NADPH oxidase-2 (Nox2) mRNA expression, indicating that they have cellular antioxidant capacities. Anthocyanin derivatives of the LBE and BBE were analyzed using LC-QTOF/MS. Six anthocyanins were identified in the BBE, while one was detected in the LBE. Our findings demonstrate that the anthocyanin-rich LBE and BBE could be used as functional food sources in Mongolia.

**Keywords:** Mongolian wild blueberry, Mongolian wild lingonberry, antioxidant, anti-inflammation, anthocyanins

## 서 론

염증(inflammation)은 세포 및 조직을 보호하기 위한 면역 반응으로 외부 자극에 대한 생체의 필수적인 방어 기작이지만, 과도한 염증반응은 세포 및 조직 손상을 유도할 수 있다. 특히, 만성염증에 의한 염증성 사이토카인의 분비는 당뇨병, 고혈압, 암 및 신경 퇴행성 장애 등과 같은 질병의 원인이 된다(Rankin, 2004). 또한, 많은 연구 결과들이 만성염증에 의한 염증성 사이토카인 분비는 세포 내 활성산소의 생성을 증가시켜 산화적스트레스(oxidative stress)를 유발하며 다양한 병리학적인 변화를 일으킨다고 발표하였다(Mittal 등, 2014). 이러한 만성 염증 및 산화적 스트레스를 완화시키기 위한 다양한 연구가 이루어지고 있으며, 비타민 및 폴리페놀과 같이 과일 및 채소에 풍부한 천연 항산화제의 섭취가 만성 염증 및 산화적 스트레스의 감소를 통해 만성질환을 예방하는데 효과적이라는 연구결과들이 발표되었다(Landete, 2013). 특히, 페놀성 화합물은 식물에서 시키메이트 및 아세테이트 경로(shikimate and acetate pathways)를 통해 생성되는 플라보

노이드 및 방향족산을 포함한 광범위한 2차 대사산물로 섭취 시 인체내 다양한 생리활성과 연관되어 있다고 알려져 있다.

몽골은 농업에 적합하지 않은 기후 환경으로, 육류 및 가축에서 얻은 젖 등을 통해 가공한 식품들이 주요 식단을 구성한다. 과일 및 채소의 경우 대부분 수입에 의존하며, 야생 베리류 등이 몽골의 유목민들에게 매우 중요한 과일 섭취원으로 여겨진다. 특히 몽골에서 자라는 블루베리(*Vaccinium Section cyanococcus*)와 링곤베리(*Vaccinium vitis-idaea* L.)는 몽골사람들이 제철에 수확하여 장기간 보관하며 먹는 과일로써, caffeic acid, gallic acid, flavonol, anthocyanin, proanthocyanidin 등과 같은 항산화력 및 항염능력이 뛰어난 페놀성 화합물이 풍부하다고 알려졌다(Hokkanen 등, 2009; Kalt 등, 2001). 그러나, 몽골의 야생 베리류에 관한 항산화 및 항염증 효과 그리고 주요 폴리페놀 및 안토시아닌류의 분석은 충분히 이루어지지 않은 상황이다. 그러므로 본 연구에서는 몽골에서 중요하게 섭취되는 야생 블루베리와 링곤베리의 폴리페놀, 플라보노이드 안토시아닌 류 등의 분석 및 총 항산화 효과를 측정하고 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포주를 이용하여 항염증 효과를 입증함으로써 몽골의 야생 베리류에 대한 정보 축적에 이바지하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 연구에 사용된 몽골 야생 베리인 링곤베리(*Vaccinium vitis-idaea* L.)와 블루베리(*Vaccinium Section cyanococcus*)는 2019년

\*Corresponding author: Sang Gil Lee, Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

Tel: +82-051-629-5851

Fax: +82-051629-5842

E-mail: sglee1125@pknu.ac.kr

Received February 11, 2022; revised February 23, 2022;

accepted February 23, 2022

몽골 쿠브굴성(Khuvsgul province)에서 8월 중순(블루베리)과 9월 중순(링곤베리)에 채집하여 동결 건조한 샘플을 사용하였다. Folin-ciocalteau's phenol reagent, 갈산(gallic acid), 케르세틴(quercetin), 탄산나트륨( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 염화알루미늄( $\text{AlCl}_3$ ), ascorbic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azobis-(2-Amidino Propane), HCl (AAPH), 인산나트륨(Sodium Phosphate)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt (ABTS), Iron (III) chloride ( $\text{FeCl}_3$ ), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), 황산제일철( $\text{FeSO}_4$ )은 Roche (Roche, Basel, Switzerland)에서 구입하였다. 세포실험을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)는 welgene Inc. (Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea)에서 구입하였다. Penicillin-Streptomycin Solution (PS)은 Cytiva-Hyclone Laboratories, Inc. (St. Logan, UT, USA)에서 구매하였다. Trypan Blue Stain (0.4%)은 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. RNA 추출을 위한 chloroform과 isopropanol은 Daejung, co. (Kyungki, Republic of Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실시간 유전자증폭(real-time PCR)을 위한 프라이머(primer)는 Macrogen Co. (Seoul, Republic of Korea)에서 제작하였으며, Western blot을 위한 iNOS, COX2 및 secondary antibody는 SantaCruz Biotechnology (PasoRobles, CA, USA)에서 구입하였다.

### 베리 추출물 제조

실험에 사용한 동결건조된 링곤베리와 블루베리 시료 10.00 g 을 80% 메탄올(250 mL)에 침지 후 균질기(Daihan Scientific, Daegu, Gyeongbuk)를 이용하여 12,000 rpm에서 1분 30초 동안 균질화하였다. 그 후 Whatman #1 여과지(Whatman, Maidstone, United Kingdom)를 이용하여 추출물을 여과한 후 여과지에 걸러진 샘플을 다시 수거하고 250 mL의 80% 메탄올을 가하여 상기 과정을 반복하여 추출하였다. 추출액은 Rotary Vacuum Evaporator (Eyela, Pte. Ltd., Singapore)로 감압 농축하여 완전히 건조시킨 후, 80% 메탄올을 이용하여 제조한 링곤베리 추출물(LBE)과 블루베리 추출물(BBE)을  $-50^\circ\text{C}$ 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 총 페놀성 화합물 함량 분석

총 페놀성 화합물 함량(total phenolic content, TPC)은 Folin-Ciocalteau's phenol 시약을 이용한 비색법으로 측정하였다(Kaur와 Kapoor, 2002). 시료 200  $\mu\text{L}$ 를 deionized water (DIW) 2.6 mL와 혼합 후 Folin-ciocalteau's phenol reagent 200  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 상온에서 6분간 반응시켰다. 그 후 7%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 2 mL를 첨가하여 교반 후 상온에서 90분 동안 반응시킨 뒤 분광광도계(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀성 화합물의 함량은 gallic acid 표준곡선을 이용하여 mg gallic acid equivalent (GAE)/g, dry weight (dw)으로 나타내었다.

### 총 플라보노이드 함량 분석

총 플라보노이드 함량(total flavonoid content, TFC)은 Zhishen 등의 방법을 변형하여 측정하였다(Zhishen 등, 1999). 시료 25  $\mu\text{L}$ 에 DIW 160  $\mu\text{L}$ 와 5%  $\text{NaNO}_2$  7.5  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 상온에서 5분간 반응시킨 후 10%  $\text{AlCl}_3$  (7.5  $\mu\text{L}$ )를 첨가하여 6분 반응시켰다.

이 반응액에 1 M NaOH 50  $\mu\text{L}$ 를 첨가한 후에 마이크로플레이트 리더(Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선용은 quercetin (10, 30, 60, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 표준물질로 사용하여 작성하였으며 플라보노이드 함량은 mg quercetin equivalent (QE)/g, dw으로 나타내었다.

### 총 안토시아닌 함량 분석

총 안토시아닌 함량(total anthocyanin content, TAC)은 pH differential method를 이용하여 측정하였다(Giusti와 Wrolstad, 2001). 시료 200  $\mu\text{L}$ 에 potassium chloride buffer (pH 1.0; 25 mM) 3,800  $\mu\text{L}$ 를 넣어 15초 간 반응시킨 후, sodium acetate buffer (pH 4.5; 400 mM) 3,800  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 15분 동안 반응시켰다. 분광광도계를 사용하여 510 nm와 700 nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같이 cyanidin-3-glucoside를 기준으로 산출하였다.

Monomeric anthocyanin pigment (mg CGE/L)

$$=(A \times MW \times DF \times 1000) / (e \times l)$$

\*Calculation: cyanidin-3-glucoside equivalents

$$[MW=449.2 \text{ g/mol}, e=26,900 \text{ L/cm} \cdot \text{mol}]$$

$$*A=(A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4.5}$$

\*MW=molecular weight of cyanidin-3-glucoside=449.2 g/mol

\*DF=dilution factor

\*e=the molar absorptivity=26,900 L/cm $\cdot$ mol

### 총 항산화 능력 측정

링곤베리와 블루베리의 총 항산화 능력(total antioxidant capacity, TAC)은 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거 능력 및 ferric reducing antioxidant power (FRAP) 분석법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다.

### ABTS 라디칼 소거 능력 측정(ABTS radical scavenging activity)

ABTS radical 소거능은 Re 등의 방법을 변형하여 측정하였다(Re et al., 1999). PBS를 이용하여 AAPH 1.0 mM과 ABTS 2.5 mM 용액 100 mL을 제조 한 후,  $80^\circ\text{C}$  항온수조에서 40분 동안 가열하여 ABTS 라디칼을 생성시켰다. ABTS radical solution 을 0.45  $\mu\text{M}$  PVDF 필터로 여과한 후, 734 nm에서 흡광도 값이  $0.70 \pm 0.02$ 이 되도록 PBS (pH 7.4)를 이용하여 희석하여 실험에 사용하였다. 시료 또는 PBS 5  $\mu\text{L}$ 에 ABTS radical solution 245  $\mu\text{L}$ 을 혼합하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader 를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 ABTS 라디칼 소거능은 Abs (PBS+ABTS 용액)-Abs (시료+ABTS 용액)으로 계산하였으며, 총 항산화 능력은 vitamin C를 표준물질로 이용하여 mg vitamin C equivalent (VCE)/g, dw로 나타내었다.

### DPPH 라디칼 소거 능력 측정(DPPH radical scavenging activity)

DPPH 라디칼 소거능을 통한 총 항산화 능력은 Blois의 방법을 활용하여 측정하였다(Blois, 1958). 100  $\mu\text{M}$ 의 DPPH를 80% 메탄올에 녹여 0.1 mM의 DPPH 라디칼 용액을 제조한 후, 517 nm에서 흡광도 값이  $0.70 \pm 0.020$ 이 되도록 80% 메탄올을 이용하여 희석하였다. 시료 50  $\mu\text{L}$ 에 DPPH radical solution 2.95 mL을 혼합한 후, 상온, 암실에서 30분간 반응시킨 뒤 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 DPPH 라디칼 소거

능은 Abs (PBS+DPPH 용액)-Abs (시료+DPPH 용액)으로 계산하였으며, 총 항산화 능력은 vitamin C를 표준물질로 이용하여 mg vitamin C equivalent (VCE)/g, dw로 나타내었다.

**Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay) 활성**

환원력(reducing power) 측정을 통한 총 항산화 능력은 Benzie 과 Strain의 방법을 일부 변형하여 측정하였다(Benzie & Strain, 1996). FRAP 시약은 acetate buffer (300 mM, pH 3.6)와 10 mM의 TPTZ, 20 mM FeCl<sub>3</sub> 용액과 증류수를 10:1:1:1.2의 비율로 혼합하여 제조하였다. 제조한 FRAP 시약은 37°C 항온수조에 보관하며 사용하였다. 환원력 측정을 위해 시료 6 µL를 200 µL의 FRAP 시약과 혼합하고 37°C에서 4분간 반응한 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 샘플의 환원력은 황산제일철(FeSO<sub>4</sub>)을 표준물질로 사용하여 mM FeSO<sub>4</sub> equivalent (FSE)/g, dw로 나타내었다.

**세포배양(Cell Culture)**

항염증 활성을 연구하기 위해 사용한 RAW 264.7 대식세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 실험에 사용하였으며, 세포는 5% CO<sub>2</sub> 환경의 incubator에서 10% FBS를 포함한 DMEM배지(1% PS 함유)를 사용하여 배양하였다. 배지는 2-3일마다 교체하였으며 세포가 80% 이상 증식하였을 때 계대배양 하였다.

**세포 생존율 측정(MTT assay)**

RAW 264.7 세포에 대한 샘플의 독성을 평가하기 위해 MTT assay를 진행하였다(Carmichael et al., 1987). RAW 264.7 세포를 1×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 96-well plate에 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경의 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포에 serum free DMEM로 제조한 샘플을 농도 별(0-200 µg/mL)로 처리하였다. 시료 처리 24시간 후, 각 well의 배지를 제거한 후 MTT

용액(5 mg/mL)을 100 µL씩 주입하여 1시간 30분간 재 배양하였다. 이후 MTT 용액을 제거하고 각 well에 DMSO 200 µL를 첨가하여 formazan 결정을 용해시킨 후, microplate reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군(0.1% DMSO 처리군)의 생존 정도 대비%로 나타내었다. 세포 생존율 실험 결과를 토대로 25, 50, 100 µg/mL 농도의 LBE 및 BBE를 항염증 및 항산화 관련 세포 실험에 사용하였다.

**총 RNA 추출 및 cDNA 합성**

RAW 264.7 세포를 12-well plate에 5×10<sup>5</sup> cells/well 농도로 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경의 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 배지를 제거하여 PBS로 2회 세척하고 시료를 농도 별(25, 50, 100 µg/mL)로 6시간 동안 선 처리한 후, LPS (100 ng/mL)와 시료를 농도별(25, 50, 100 µg/mL)로 2 mL씩 동시 처리하여 3시간 자극시켰다. 배지를 제거하고 각 well을 PBS로 2회 세척한 후 RiboEx total RNA solution (GeneAll Biotechnology, co., Seoul, Republic of Korea)을 사용하여 배양된 RAW 264.7 대식세포로부터 총 RNA를 추출하였으며, RNA 농도와 순도는 Multiskan microplate reader의 Microvolume Drops를 이용하여 260/280 nm의 흡광도로 측정하였다. cDNA는 smart gene compact cDNA synthesis kit (SJ Bioscience, Inc., Daejeon, Republic of Korea) 를 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성 후 대식세포 염증성 사이토카인의 발현 양상을 확인하기 위한 quantitative real-time-PCR을 진행하였다. 표적 유전자의 primer 염기서열은 Table 1과 같다. Real-Time PCR을 위하여 cDNA, Primer 및 SYBR Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA)를 혼합한 후 QuantStudio™ 1 Real-Time PCR Instrument (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA) 기기를 이용하여 실시간 정량 분석을 하였으며 Real-Time PCR 수행 조건은 다음과 같다: 95°C/2 min (1 cycle); 95°C/5 sec, 60°C/20 sec (40 cycles); 95°C/10 min, 60°C/1 min, 95°C/15 sec.

**Table 1. Primers for Real-Time PCR amplification of gene expression**

Primer <sup>a</sup>	F/R	sequences (5' to 3' direction)
<i>TNF-α</i>	F	5'-GGC TGC CCC GAC TAC GT-3'
	R	5'-ACT TTC TCC TGG TAT GAG ATA GCA AAT-3'
<i>IL-1β</i>	F	5'-GTC ACA AGA AAC CAT GGC ACA T-3'
	R	5'-GCC CAT CAG AGG CAA GGA-3'
<i>iNOS</i>	F	5'-AAT CTT GGA GCG AGT TGT GG-3'
	R	5'-CAG GAA GTA GGT GAG GGC TTG-3'
<i>COX-2</i>	F	5'-GCC TAC TAC AAG TGT TTC TTT TTG CA-3'
	R	5'-CAT TTT GTT TGA TTG TTC ACA CCA T-3'
<i>NOX2</i>	F	5'-CCC TTT GGT ACA GCC AGT GAA GAT-3'
	R	5'-CAA TCC CGG CTC CCA CTA ACA TCA-3'
<i>SOD1</i>	F	5'-GAG ACC TGG GCA ATG TGA T-3'
	R	5'-GTT TAC TGC GCA ATC CCA CT-3'
<i>Hmox1</i>	F	5'-CTC TCT TCT CTT GGG CCT CTA A-3'
	R	5'-TGT CAG GTA TCT CCC TCC ATT C-3'
<i>GAPDH</i>	F	5'-GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA-3'
	R	5'-GTT GCT GTA GCC AAA TTC GTT GT-3'

TNF-α, Tumor necrosis factor-α; IL-1β, Interleukin-1β; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, Cyclooxygenases-2; NOX2, NADPH oxidase 2; SOD1, Superoxide dismutase 1; Hmox1, Heme Oxygenase 1; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

하우스키핑 유전자는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였으며, 상대적인 유전자 발현(gene expressions)은 Delta Ct method를 이용하여 정량하였다(Rao et al., 2013).

### 세포 내 단백질 추출

RAW 264.7 세포를 6-well plate ( $2 \times 10^6$  cells/well)에 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경의 incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하여 PBS로 2회 세척하고 시료를 농도 별(25, 50, 100 µg/mL, Serum free DMEM, 2 mL)로 처리하여 6시간 배양하였다. 그 후 LPS (100 ng/mL, Serum free DMEM)와 시료를 농도 별(25, 50, 100 µg/mL)로 3 mL씩 동시에 처리하여 24시간 자극시켰다. 각 well을 PBS로 2회 세척한 다음 PRO-EX™ CETi Lysis Buffer (Trans Lab, Inc., Daejeon, Republic of Korea)을 사용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA)와 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하여 정량하였다. 단백질 20 µg을 8% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동한 후 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 transfer하였다. PVDF membrane은 1X General-Block solution, protein-free (Trans Lab, Inc., Daejeon, Republic of Korea)에 상온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 단백질을 blocking한 후 1차 항체(iNOS, COX2, β-actin)를 1X General-Block solution, Protein-Free 용액에 각각 희석하여(dilution 1:3000, 1:1000, 1:3000 respectively) 4°C에서 15 시간 반응시켰다. 그 후, Tween 20/TBS (TBS-T: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween-20)로 3회 세척한 후 2차 항체와 1시간 반응한 후 tween 20/TBS로 3회 세척 후 SmartGene middle femto ECL solution (SJ Bioscience, Inc., Daejeon, Republic of Korea)과 반응시켰다. 단백질 발현은 Image Quant LAS 500 (Luminescent Image Analyzer) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 기기를 이용하여 측정하였다.

### LC-MS/MS를 이용한 몽골리안 야생 베리의 베리의 플라보노이드 분석

액체 크로마토그래피-사중극자 비행시간 질량분석기(liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry, LC-QTOF/MS) 시스템을 이용하여 링곤베리와 블루베리의 플라보노이드를 분석하였다. 분석을 위하여 Acquity I Class (Waters)의 HPLC와 maxis HD (Bruker) system을 사용하였고, column은

Waters BEH (C18, 2.1 mm×100 mm, 1.7 µm)을 사용하였다. 이동상은 A: water (0.1% formic acid) 및 B: acetonitrile (0.1% formic acid)을 0.2 mL/min의 유속으로 0-2 min, 5% (B); 2-35 min, 20% (B); 35-36 min, 90% (B)의 조건으로 수행하였으며, 형광 검출기의 분석 조건은 520 nm로 설정하였다. LC/QTOF-MS 분석 조건은 electrospray ionization (ESI)에서 capillary, charging, plate offset 전압은 4,500, 2,000 및 -500 V로, nebulizer 가스는 0.8 bar 설정한 조건은 dry heater 온도는 200°C, dry gas flow는 8.0 L/min으로 설정하였다.

### 통계 처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였으며, 결과 값은 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 유의성 검증은 Graphpad 9.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)을 이용하였으며, 결과 간의 차이는 one-way analysis of variance (ANOVA) 및 Turkey's test 사후 검정( $p < 0.05$ )으로 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 몽골 야생 베리의 총 페놀성화합물, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량

몽골의 야생 링곤베리 및 블루베리의 총 페놀, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량은 Table 2과 같다. 링곤베리와 블루베리의 총 폴리페놀 함량은 각각 146.98±2.44 mg gallic acid equivalent (GAE)/g, 152.03±1.59 mg GAE/g으로 나타났으며, 블루베리가 링곤베리보다 유의적으로 높은 총 페놀 함량을 보여주었다. 총 플라보노이드 함량의 경우 링곤베리와 블루베리가 각각 79.50±4.33 mg quercetin equivalent (QE)/g과 81.17±2.89 mg QE/g으로 유사한 함량을 보였다. 그러나 총 안토시아닌 함량의 경우 블루베리가 172.28±1.28 mg cyanidin-3-glucoside equivalent (CGE)/g으로 33.95±1.93 mg CGE/g의 총 안토시아닌 함량을 보인 링곤베리보다 약 5배 높은 함량을 보여주었다. 이는 몽골의 야생 링곤베리가 안토시아닌 외에 다른 플라보노이드들의 비중이 블루베리보다 높기 때문으로 생각된다. 총 안토시아닌 함량의 차이는 스웨덴 야생 블루베리(*Vaccinium myrtillus*)와 링곤베리(*Vaccinium vitis-idaea* L.)의 연구 결과와 비슷한 경향을 보여주었다. 스웨덴의 야생 블루베리(*Vaccinium myrtillus*)의 총 안토시아닌의 함량이 링곤베리의 2배 이상 높은 것을 확인하였으며, 더 많은 종류의 안토시아닌을 함유하는 결과를 보여주었다(Liu et al., 2020). 이

**Table 2.** Comparison of total phenolic, flavonoid, and total anthocyanin amounts of Mongolian wild lingonberry extract (LBE) and blueberry extract (BBE)

	TPA (mg GAE/g)	TFA (mg QE/g)	TAA (mg CGE/g)
LBE	146.98±2.44	79.50±4.33	33.95±1.93
BBE	152.03±1.59	81.17±2.89	172.28±1.28

TPA, TFA, and TAA mean total phenolic amount, total flavonoid amount, and total anthocyanin amount, respectively. Values are mean±SD (n=3). Data are presented as mean±SD of three independent experiments.

**Table 3.** Comparison of total antioxidant capacities (TAC) of Mongolian wild lingonberry extract (LBE) and blueberry extract (BBE)

	ABTS (mg VCE/g)	DPPH (mg VCE/g)	FRAP (mM FSE/g)
LBE	93.01±1.68	48.39±2.67	0.49±0.01
BBE	103.38±1.09	65.35±4.41	0.67±0.03

ABTS, DPPH, and FRAP mean ABTS radical scavenging capacity, DPPH radical scavenging capacity, and ferric reducing antioxidant power, respectively. Values are mean±SD (n=3). Data are presented as mean±SD of three independent experiments.

와 대조적으로, 캐나다의 야생 lowbush 블루베리(*Vaccinium angustifolium* Aiton)와 링곤베리(*Vaccinium vitis-idaea* L.)의 경우 링곤베리의 폴리페놀의 함량 및 총 안토시아닌의 함량이 유의적으로 높음을 확인하였다(Dudonné et al., 2015). 이는 같은 베리에서도 품종에 따라 총 폴리페놀 및 안토시아닌의 함량에 차이가 있음을 보여주는 결과이다.

**총 항산화 능력 측정**

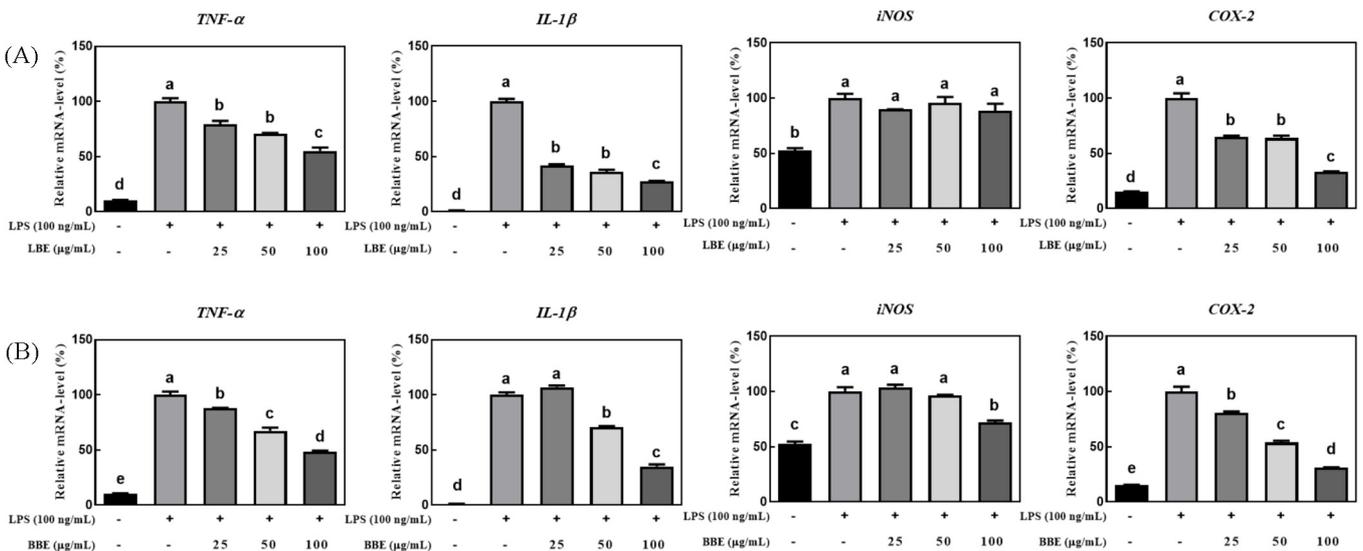
본 연구에서는 ABTS 및 DPPH radical 소거능 및 FRAP (ferric-reducing antioxidant power) value 실험을 통해 몽골 베리의 총 항산화 능력을 측정하였다(Table 2). ABTS radical 소거능의 경우, LBE와 BBE가 각각 93.01±1.68 mg vitamin C equivalent (VCE)/g, 103.38±1.09 mg VCE/g이었으며, DPPH radical 소거능의 경우, 48.39±2.67 그리고 65.35±4.41 mg VCE/g으로 나타났다. FRAP assay는 3가의 ferric tripyridyltriazine (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) 이 낮은 pH에서 항산화제에 의해 환원되어 2가의 청색 ferrous tripyridyltriazine (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ)가 생성될 때 593 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 능력을 측정하는 실험법으로, FRAP value 측정 실험에서도 라디칼 소거능 실험과 유사한 경향으로 BBE가 더 높은 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 총 페놀 함량이 높은 블루베리가 더 높은 총 항산화 능력을 보이는 것을 확인하였으며, 이는 총 페놀 함량이 높을수록 더 많은 하이드록시기(-OH)가 반응성 자유 라디칼의 전자 또는 수소 원자를 전달하여 환원제 또는 자유 라디칼 제거제로 작용함으로써 강력한 항산화 능력을 보이기 때문으로 생각된다(Paixao 등, 2007).

**몽골 야생 링곤베리와 블루베리의 세포내 항산화 및 항염증 효능**

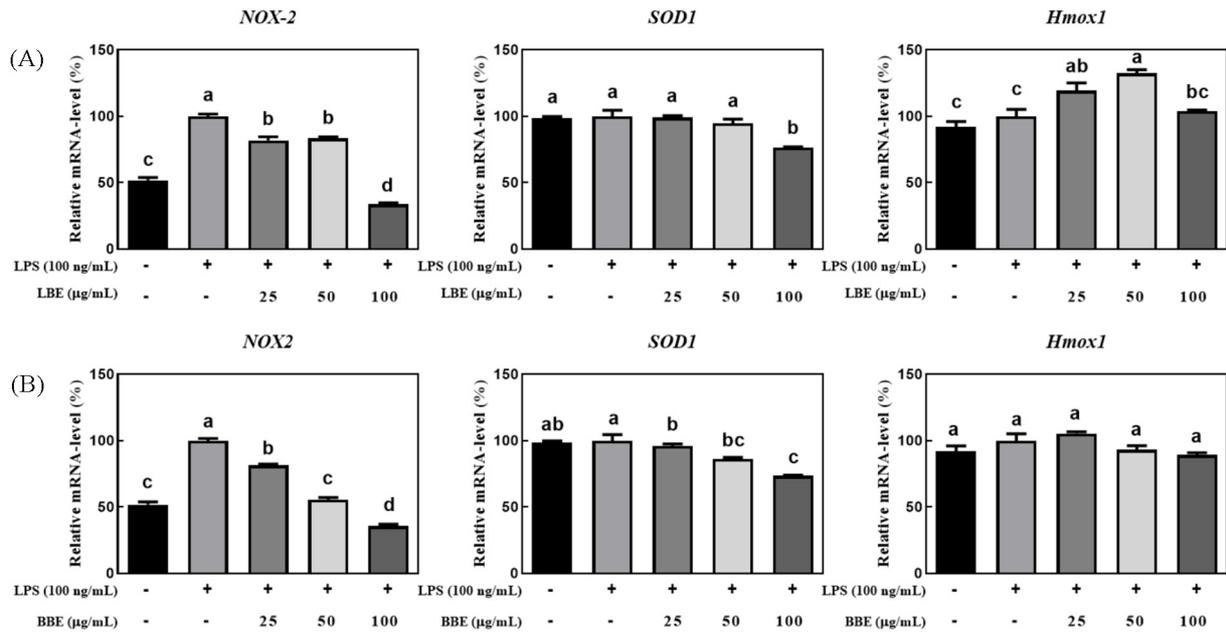
대식세포(macrophage)는 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6)와 같은 다양한 사이토카인 및 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase 2 (COX2)와 같은 염증성 매개인자를 방출함으로써 면역 반응에서 중요한 역할을 하는 세포이다. 대식세포의 활성화로 인해 분비되

는 사이토카인 및 염증성 매개인자들은 생체 내에서 다양한 염증 및 면역 반응에 관련된 세포 보호작용을 조절하지만 과도한 생성이 지속될 경우 류마티스성 관절염, 만성 염증, 자가면역 질환 등의 원인이 된다(Agarwal et al., 1995). 본 연구에서는 몽골 야생 링곤베리와 블루베리가 LPS (100 ng/mL)를 통해 자극된 RAW 264.7 대식세포주에서 증가된 염증성 사이토카인 및 매개인자들의 억제에 미치는 영향에 대해 관찰하였다. LBE와 BBE를 농도 별로(25, 50, 100  $\mu$ g/mL) 처리하여 염증성 사이토카인의 감소 여부를 확인하기 위해 mRNA 발현 양상을 확인하였다(Fig. 1). LPS 자극에 의해 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS, 및 COX-2의 mRNA 발현이 유의적으로 증가하였다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 및 COX-2는 LBE (Fig. 1(A))와 BBE (Fig. 1(B)) 처리군에서 농도 의존적으로 감소하였으나 iNOS의 발현은 블루베리 100  $\mu$ g/mL 처리군에서만 27% 유의적으로 감소하였다. 많은 논문들이 베리 폴리페놀 및 안토시아닌이 대표적인 염증성 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 핵으로의 이동을 억제하여 항염증 효능을 보임을 확인하였으며(Lee 등, 2014), 특히 LPS처리가 ERK, JNK 및 serine/threonine-protein kinase 등의 MAPK superfamily (MAPKs) 효소들에 의한 신호전달 체계를 통해 COX-2 발현을 증가시켜 아라키돈산의 prostaglandin2로의 전환을 유도하며, 베리 폴리페놀 및 안토시아닌이 이를 억제함은 여러 연구를 통해 규명되었다. 그러므로 LBE와 BBE 또한 NF- $\kappa$ B의 세포질에서 핵으로의 이동 및 MAPKs 신호전달 체계를 억제하는 것으로 생각되어진다.

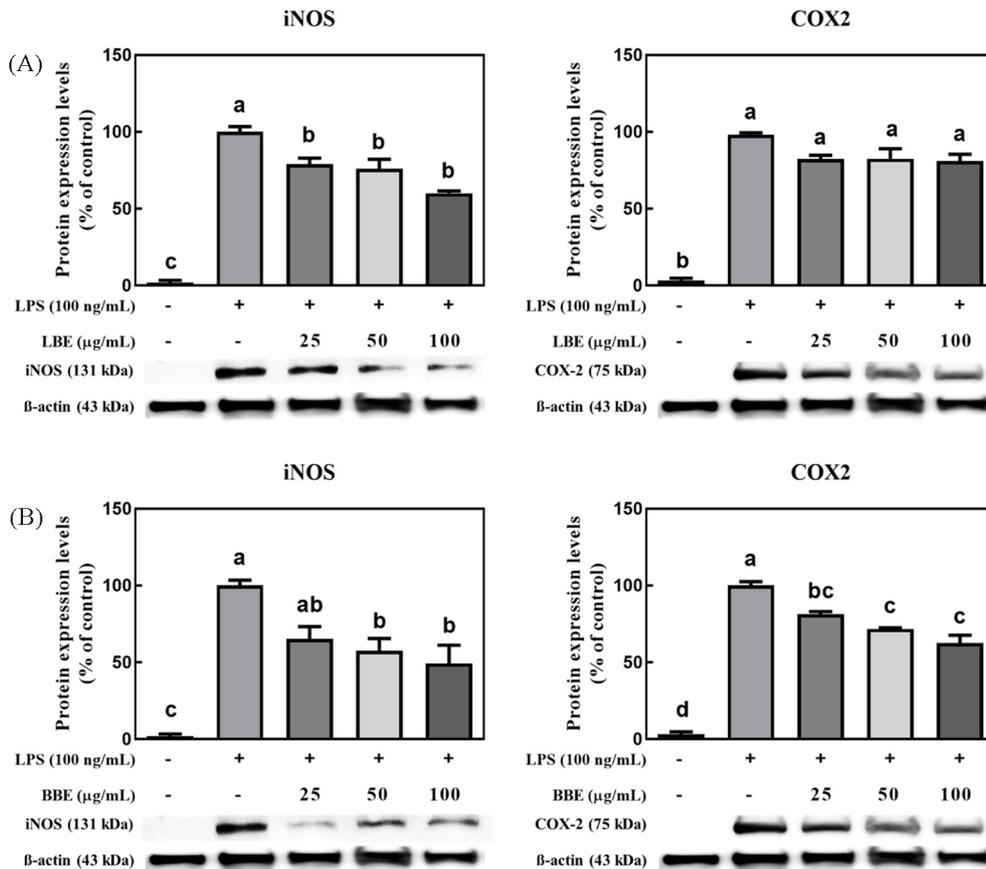
또한, LBE와 BBE는 대식세포 내 LPS 자극에 의해 발생하는 산화적 스트레스를 줄여주는 것으로 확인되었다(Fig. 2). ROS 과잉 생산으로 인한 산화 스트레스는 세포 지질, DNA 및 단백질을 손상시키고 다양한 급성 및 만성 염증성 질환, 심혈관 질환과 관련이 있다. 따라서 산화적 손상의 치료를 위해서는 활성산소 발현 수치의 하향 조절 또는 항산화 효소 활성의 상향 조절이 중요하다(Hwang 등, 2019). NADPH oxidase (NOX)는 염증성 사이토카인에 의한 활성산소 생성에 관여하는 효소로 알려져 있으며, 이는 nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2) 전사인자



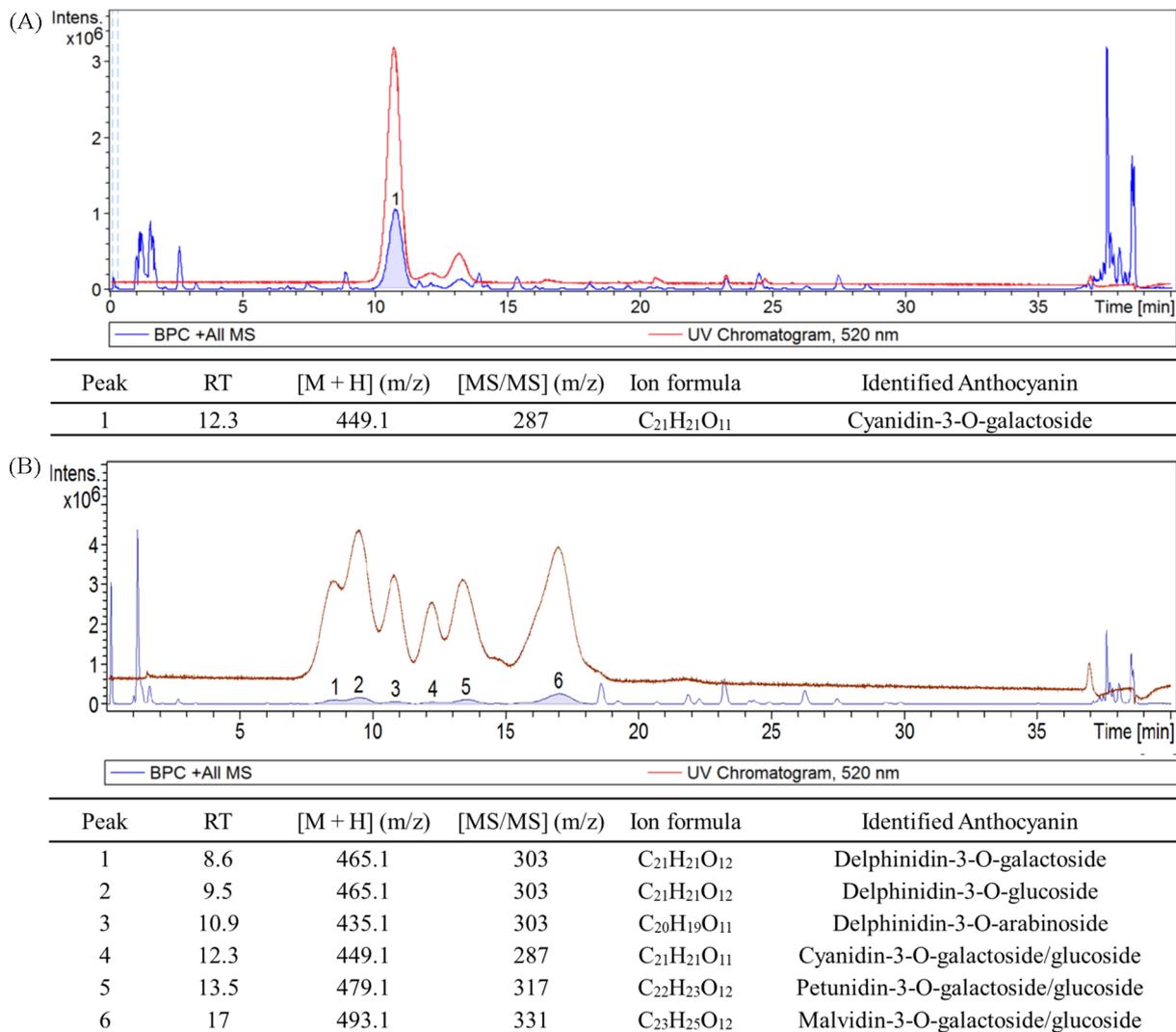
**Fig. 1. Anti-inflammatory effects of LBE (A) and BBE (B) in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells.** RAW 264.7 cells were plate at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well and incubated for 24 h. Cultured cells were pre-treated with various concentrations of LBE and BBE for 6 h and then stimulated with 100 ng/mL of LPS for 3 h. Different letters on the point indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on ANOVA with Tukey's post hoc analysis.



**Fig. 2. Anti-oxidant effects of LBE (A) and BBE (B) in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells.** RAW 264.7 cells were plate at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well and incubated for 24 h. Cultured cells were pre-treated with various concentrations of LBE and BBE for 6 h and then stimulated with 100 ng/mL of LPS for 3 h (Different letters on the point indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on ANOVA with Tukey's post hoc analysis).



**Fig. 3. Protein levels of iNOS and COX2 was downregulated by LBE (A) and BBE (B) in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells.** The RAW 264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cells/ well) were incubated 24 hr and were pre-treated with LBE and BBE for 6 hr and then stimulated with LPS (1 μg/mL) for 24 hr. The level of expression of iNOS and COX2 was measured by Western blot. β-actin was used as an internal control in a densitometric analysis. Data are presented as mean±SD of three independent experiments (Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on ANOVA with Tukey's post hoc analysis).



**Fig. 4.** Analysis of anthocyanin of Mongolian berry extracts using LC-QTOF/MS. UV (520 nm) and base peak chromatograms (BPC) of LBE (A) and BBE (B).

의 활성화에 의한 superoxide dismutase (SOD)와 heme oxygenase-1 (Hmox1) 등과 같은 다양한 항산화 효소의 생성을 통해 조절된다고 알려져 있다(Bedard와 Krause, 2007; Kovac 등, 2015; Rice-Evans 등, 1995). 본 연구에서는 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포에서 증가한 NOX2 mRNA 발현이 LBE와 BBE의 처리에 의해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 그러나 NRF2에 의해 조절되는 항산화효소인 SOD1 및 Hmox1의 발현은 LPS에 의해 유의적으로 증가되지 않았으며 링곤베리에 의한 Hmox1의 약 30% 증가를 제외하고는 LBE, BBE에 의해 유의적인 증가를 보이지 않았다. 이는 LBE와 BBE가 NOX 발현 억제에 의한 ROS 생성 감소를 통해 세포내 항산화 효능을 나타내는 것으로 생각된다 (Fig. 2). 본 연구는 블랙 커런트 및 블루베리의 안토시아닌이 NF-κB의 활성 저해를 통해 NOX2의 발현 억제를 통해 세포내 산화적 스트레스를 줄인다는 다른 연구와 유사한 경향을 보였다(Lee 등, 2014).

**Western blot을 통한 iNOS 및 COX2 단백질 발현 억제 활성 평가**

몽골 베리 추출물이 iNOS 및 COX2 단백질의 발현에 미치는

영향을 알아보기 위해 Western blot을 진행하였으며 iNOS 및 COX2의 단백질 발현을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 연구결과, iNOS 단백질의 경우 대조군에서는 거의 발현되지 않았으며 LPS (100 ng/mL) 처리군에서 단백질의 발현량이 증가한 것을 확인하였다. 몽골베리 추출물을 각각 농도 별로 처리 하였을 때 25 µg/mL 에서부터 유의적으로 iNOS 단백질의 발현이 억제 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). COX2 단백질 역시 LPS 처리로 인해 그 발현량이 증가하였으며, LBE (25, 50, 100 µg/mL)에서는 COX2의 발현의 통계적으로 유의미한 변화는 없었으나, 100 µg/mL에서는 약 30% (p=0.058)의 감소를 보였다(Fig. 3(A)). 대조적으로, BBE의 경우 농도 의존적으로 COX2의 발현이 유의미하게 억제되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3(B)). 이러한 결과는 몽골 베리 추출물이 전구염증매개 효소인 iNOS와 COX2 단백질의 발현을 조절함으로써 항염증 효과를 나타내는 것을 시사한다.

**LC-QTOF/MS를 이용한 몽골 야생 베리의 안토시아닌 분석**

Fig. 4에서 보이는 바와 같이 LC-QTOF/MS 분석 결과 링곤베리에서는 1종(Fig. 4(A)), 블루베리에서는 6 종(Fig. 4(B))의 주요

안토시아닌이 검출되었다(520 nm UV). ESI를 이용한 positive 모드에서 6종의 화합물의 질량 스펙트럼을 기준에 보고된 연구 결과와 비교분석 한 결과 블루베리의 peak 1과 2는 [M+H] (m/z) 465.1와 [MS/MS] (m/z) 303을 갖는 delphinidin-3-O-hexoside로 확인되었으며, 검출 시간을 토대로 peak 1이 galactoside, peak 2가 glucoside로 생각되어진다. Peak 3은 [M+H] (m/z) 435.1와 [MS/MS] (m/z) 303을 갖으며, 이는 delphinidin-3-O-araboside로 확인되었다. Peak 4, 5, 6 hexose (galactose 또는 glucose)를 배당체로 같은 안토시아닌으로 peak 4는 cyanidin-3-O-hexoside, peak 5는 petunidin-3-O-hexoside, peak 6은 malvidin-3-O-hexoside로 각각 확인되었다. 몽골 야생 블루베리의 경우 다른 연구에서 분석한 블루베리 품종(10종 이상의 안토시아닌이 검출)에 비해 다양한 안토시아닌 종류를 보여주지는 못하였다. 몽골 야생 링곤베리의 경우 [M+H] (m/z) 449.1와 [MS/MS] (m/z) 287을 갖는 cyanidin-3-O-hexoside로 확인되었으며, 다른 연구 논문과 비교하였을 때 cyanidin-3-O-galactoside로 생각되어진다(Hutabarat et al., 2019; Wu & Prior, 2005).

## 요 약

본 연구에서는 몽골 야생 베리 추출물의 총 페놀성 화합물, 플라보노이드, 그리고 안토시아닌 함량과 항산화 효과를 측정하였다. 전구 염증매개 사이토카인의 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과, LBE와 BBE의 전처리가 LPS 자극에 의해 증가된 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS, 및 COX-2의 mRNA 발현의 농도를 유의적으로 감소시키며 항염증 효능을 보여주었다. 또한 LBE와 BBE는 NOX2의 발현 억제를 통하여 활성산소의 생성을 저해시킴으로써 세포내 염증성 산화적 스트레스를 감소시킴을 확인하였다. 몽골 야생 블루베리에서는 6종의 안토시아닌이 검출되었으며, 야생 링곤베리에서는 1종의 안토시아닌이 검출되었다. 본 연구결과를 토대로 몽골의 야생 베리가 강력한 항산화 및 항염증을 통한 음식 위주의 식단을 소비하는 몽골인들의 산화적 스트레스 및 만성 염증성 질환을 줄여주는 식품으로의 가능성을 확인하였다.

## 감사의 글

본 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2021)에 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## References

Agarwal S, Piesco N, Johns L, Riccelli A. Differential expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J. Dent. Res.* 74: 1057-1065 (1995)

Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87: 245-313 (2007)

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70-76 (1996)

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 181: 1199-1200 (1958)

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric

assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942 (1987)

Dudonné S, Dubé P, Anhe FF, Pilon G, Marette A, Lemire M, Harris C, Dewailly E, Desjardins Y. Comprehensive analysis of phenolic compounds and abscisic acid profiles of twelve native Canadian berries. *J. Food Compos. Anal.* 44: 214-224 (2015)

Giusti MM, Wrolstad RE. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* F1. 2.1-F1. 2.13 (2001)

Hokkanen J, Mattila S, Jaakola L, Pirttilä AM, Tolonen A. Identification of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and hybrid bilberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* 57: 9437-9447 (2009)

Hutabarat R, Xiao Y, Wu H, Wang J, Li D, Huang W. Identification of anthocyanins and optimization of their extraction from rabbit-eye blueberry fruits in Nanjing. *J. Food Qual.* 2019: 1-11 (2019)

Hwang JH, Ma JN, Park JH, Jung HW, Park YK. Anti-inflammatory and antioxidant effects of MOK, a polyherbal extract, on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Int. J. Mol. Med.* 43: 26-36 (2019)

Kalt W, Ryan DA, Duy JC, Prior RL, Ehlenfeldt MK, Vander Kloet S. Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium section cyanococcus* spp.). *J. Agric. Food Chem.* 49: 4761-4767 (2001)

Kaur C, Kapoor HC. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37: 153-161 (2002)

Kovac S, Angelova PR, Holmström KM, Zhang Y, Dinkova-Kostova AT, Abramov, AY. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.-General Subjects.* 1850: 794-801 (2015)

Landete J. Dietary intake of natural antioxidants: Vitamins and polyphenols. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53: 706-721 (2013)

Lee SG, Kim B, Yang Y, Pham TX, Park Y-K, Manatou J, Koo SI, Chun OK, Lee J-Y. Berry anthocyanins suppress the expression and secretion of proinflammatory mediators in macrophages by inhibiting nuclear translocation of NF- $\kappa$ B independent of NRF2-mediated mechanism. *J. Nutr. Biochem.* 25: 404-411 (2014)

Liu J, Hefni ME, Witthöft CM. Characterization of flavonoid compounds in common Swedish berry species. *Foods.* 9: 1-13 (2020)

Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* 20: 1126-1167 (2014)

Paixao N, Perestrelo R, Marques JC, Câmara JS. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.* 105: 204-214 (2007)

Rankin JA. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Adv. Crit. Care.* 15: 3-17 (2004)

Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2<sup>-</sup> (-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat. Bioinforma. Biomath.* 3: 71-85 (2013)

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)

Rice-Evans C, Halliwell B, Lunt G, Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61: 1-31 (1995)

Wu X, Prior RL. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2589-2599 (2005)

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