알코올로 유도된 간손상에 대한 감꼭지 메탄올 추출물의 보호효과

홍성화¹ · 허희진¹ · 이하나¹ · 이민아¹ · 이준수¹ · 박정환^{1,2}

¹충북대학교 식품생명공학과

²한국한의학연구원 미래의학부

Protective Effects of the Methanol Extract from Calyx of *Diospyros kaki* on Alcohol-Induced Liver Injury

Seonghwa Hong¹, Huijin Heo¹, Hana Lee¹, Mina Lee¹, Junsoo Lee¹, and Jeong Hwan Park^{1,2}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University

²Future Medicine Division, Korea Institute of Oriental Medicine

ABSTRACT In this study, the calyx of *Diospyros kaki* was evaluated for antioxidative activity using HepG2 cells treated with alcohol-induced oxidative stress and quantitatively analyzed for phenolic acids and flavonoid concentration by LC-MS/MS. The extract of the calyx of *Diospyros kaki* showed no significant toxicity to HepG2 cells till a concentration of 10 µg/mL was reached and displayed increased cell viability compared to the 3% ethanol-treated group. The extract inhibited the production of reactive oxygen species at all concentrations. Besides, the extract inhibited malondialdehyde production at all concentrations and the inhibitory effect was higher than the positive control (esculetin 100 µM). Also, the extract increased the concentration of glutathione. The major phenolic acids and flavonoid in the extract were vanillic acid (729.01±42.48 µg/g) and catechin (1,894.89±105.10 µg/g), respectively. This study shows that the calyx of *Diospyros kaki* can be used as a functional material that exhibits antioxidative and hepatoprotective effects.

Key words: *Diospyros kaki*, antioxidant activity, oxidative stress, phenolic acids, flavonoid

서 론

알코올은 대부분 문화에서 관습적으로 소비되고 있으며 알코올 남용은 전 세계적으로 일반적이다(Massey와 Arteel, 2012). OECD 국가 중 리투아니아는 15세 이상 알코올 소비량이 2017년 기준 12.3 L로 세계에서 가장 많이 소비하는 국가이며, 우리나라는 8.7 L로 OECD 국가의 평균수준이다(KOSIS, 2019). 과도한 알코올 소비는 간염, 간경변, 간암 등 알코올 관련 간손상을 유발할 수 있다. 알코올은 주로 간세포에서 대사되는데, cytochrome P450-2E1(CYP2E1)에 의해 reactive oxygen species(ROS)로 대사될 수 있으며, 이는 세포 glutathione(GSH)을 고갈시키고 간에서 지질 과산화물을 일으킨다(Lee 등, 2018). 생체 내에서 ROS가 과잉 생성되면 단백질과 DNA 손상, 세포의 사멸과 이상 증식 그리고 조직이나 기관들을 손상시켜 노화와 각종 질병을 유

발하는 주요 원인으로 결국 질병을 일으키는 시발점이 된다(Halliwell과 Whiteman, 2004). ROS를 제거하기 위해 인류는 자연에서 약재를 찾는 노력을 계속하고 있으며 식물의 뿌리, 잎, 과일, 동물의 추출물, 광물 등 다양한 재료에서부터 화합물들을 찾아내고 그 효능을 밝혀왔다. 이러한 항산화 물질은 세포 내에서 산화-환원 반응을 조절하기도 하며 세포생장 및 외부 자극에 대한 반응에 필수적인 요소로 알려져 있다. 나아가 몇몇 항산화 물질은 기능성식품으로서의 역할 뿐만 아니라 암세포의 증식을 억제하거나 정상적인 세포의 간 기능을 보호하는 것으로 밝혀져 치료제로서의 역할도 중요시되고 있다(Devasagayam 등, 2004; Kamel 등, 2014; Park과 Kweon, 2013).

감(*Diospyros kaki* Thunb.)은 예전부터 우리나라에서는 제사에 사용할 뿐만 아니라 다양한 용도로 이용되는 과일로 알려져 있지만 한국과 중국 등의 동아시아에서는 한약재로 사용해왔다. 동의보감이나 향약집성방에 의하면 감은 종기나 염증질환, 부스럼, 화상을 치료하고 고혈압을 예방하며 동맥경화에 효능이 있다고 알려져 있다(Cha, 2014). 최근에는 기능성식품 소재 중 과일 부산물을 이용하는 경우, 원가 절감이 된다는 장점이 있어 감나무 자원의 고부가가치 창출을 위한 새로운 이용 부위 및 기능성 탐색에 관한 연구도

Received 26 Oct 2020; Revised 5 Mar 2021; Accepted 5 Mar 2021

Corresponding author: Jeong Hwan Park, Future Medicine Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseongdae-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34054, Korea, E-mail: siegfried@kiom.re.kr

Author information: Seonghwa Hong (Graduate student), Huijin Heo (Graduate student), Hana Lee (Graduate student), Mina Lee (Graduate student), Junsoo Lee (Professor), Jeong Hwan Park (Researcher)

활발히 수행되고 있다(Hong 등, 2008; Lee 등, 2001; Park, 2018). 감꼭지 생약명은 시체(柿蒂: Kaki Calyx)이며 이는 감나무의 열매에 붙어있는 꽃받침으로 가을에 성숙한 감의 꼭지를 채취하여 섌건(晒乾)한다. 감꼭지는 이기약(理氣藥)으로 분류되어 주로 막힌 기를 뚫는 약으로 사용되었는데, 특히 위(胃)의 기(氣)가 역행하여 생기는 딸꾹질을 멈추는데 사용되었다. 그 밖에 야뇨증, 만성기관지염 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Kim 등, 2018a).

알코올 해독을 도와주거나 숙취증상을 완화해 간 보호효과가 있는 식품 또는 천연물 소재로는 새싹채소(Yu 등, 2020), 유산균 발효 마늘 추출물(Choi 등, 2014), 밀크씨슬(Vargas-Mendoza 등, 2014), 헛개나무 추출물(Kim 등, 2006), 민들레 뿌리 추출물(You 등, 2010) 등이 보고되고 있다. 또한 감 발효주가 알코올 섭취로 증가한 혈중지질 수준을 개선하는 효과가 있다는 보고도 있다(Nam 등, 2011). 한편, 감꼭지는 항산화 활성, 항염증 활성, 항혈액응고 또는 항혈전 활성, 항암 활성, 피부미백 활성 등 다양하고 잠재적인 약리학적 활성을 가지고 있음을 보여주고 있다(Park, 2018). 감꼭지의 항산화 활성 연구에서 고종시 감나무의 감꼭지 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 36.5 µg/mL로 대조군인 butylated hydroxytoluene(BHT)의 활성 213.5 µg/mL보다 우수한 효과를 보였다고 보고되었다(Jeon 등, 2014). 부유 품종 감꼭지는 DPPH 라디칼 소거 활성과 ABTS 라디칼 소거 활성이 감의 씨, 껍질, 과육에 비해 높은 활성을 보였다는 보고가 있다(Jang 등, 2010). 또한 항염증 연구에서 lipopolysaccharide(LPS)로 활성화된 설치류 유래 RAW 264.7 세포에서 염증매개물질인 prostaglandin E₂(PGE₂)와 염증성 사이토카인 억제 효과에서 고종시 감나무의 감꼭지 추출물은 nitric oxide(NO) 생성억제는 우수하였고, PGE₂ 생성의 경우는 탁월한 억제 효과가 있었다. 더욱이 감꼭지 농도에 의존적으로 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin-1 β (IL-1 β)를 효과적으로 억제하였다는 보고가 있다(Jeon 등, 2014). 그러나 감꼭지의 알코올 자극에 의한 간손상 보호효과에 대한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구는 감꼭지 추출물이 알코올 자극을 받은 HepG2 세포의 보호효과와 ROS 생성량, malondialdehyde(MDA) 및 GSH 함량에 미치는 영향을 살펴보고 추출물의 페놀산과 플라보노이드 함량을 분석한 결과를 토대로 간 보호효과가 있는 기능성 소재로서 감꼭지의 활용 가능성을 살펴보았다.

재료 및 방법

추출물 제조

본 실험에 사용된 감꼭지는 읍니허브(Daegu, Korea)에서 구입한 것을 대한민국약전 규격에 적합한 것만을 선택하여 사용하였다. 추출물 제조를 위해 500 mL 플라스크에 분쇄한 감꼭지 5 g을 넣고 150 mL의 메탄올을 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 감압 농축하였다. 최종수율은 9.5%로 나타났고 농축액을 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 재용해한 뒤 0.22 µm 멸균필터로 여과하고 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

세포배양 및 독성 측정

HepG2 세포는 Korean Collection for Type Culture (Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS), 100 unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배지를 사용하여 배양기(SANYO Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan)에서 5% CO₂, 37°C, 습도 95% 조건에서 배양하였다. HepG2 세포를 96-well plate에 5×10⁴ cells/well 농도로 분주하였다. 24시간 배양 후 감꼭지 추출물을 FBS가 없는 배지에 1, 5, 10 µg/mL 농도로 희석하여 24시간 배양하였다. 이후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, 1.25 mg/mL) 용액 20 µL를 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.

세포 보호효과 측정

HepG2 세포를 96-well plate에 5×10⁴ cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양 후 감꼭지 추출물과 양성 대조군인 esculetin을 FBS가 없는 배지에 1시간 동안 배양하였다. 이후 3% 알코올과 시료를 24시간 동안 함께 처리하였다. 대조군은 알코올 처리 없이 동일한 조건으로 배양하였다. 세포생존율은 MTT assay를 이용한 세포독성 실험과 동일하게 진행하였다.

ROS 생성량 측정

ROS 생성량은 dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA)를 이용해 측정하였다(Wang과 Joseph, 1999). HepG2 세포를 96-well black plate에 5×10⁴ cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양 후 감꼭지 추출물과 양성 대조군인 esculetin을 FBS가 없는 배지에 일정 농도로 희석한 후 1시간 배양하였다. 이후 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후 알코올을 3% 농도로 첨가하여 1시간 배양하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 25 µM의 DCFH-DA로 처리하여 37°C에서 30분 배양시켰다. ROS는 fluorescent spectrophotometer(LS-55, Perkin-Elmer Crop., Norwalk, CT, USA)로 90분 동안 여기파장(excitation wavelength) 485 nm와 발광파장(emission wavelength) 530 nm에서 fluorescent intensity를 측정하였다.

과산화지질 함량 측정

HepG2 세포 내 MDA 생성량은 가장 널리 알려진 thio-barbituric acid(TBA) 방법으로 측정하였다(Buege와 Aust, 1978). HepG2 세포를 6-well plate에 1×10^6 cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양 후 감쪽지 추출물과 양성 대조군인 esculetin을 FBS가 없는 배지에 일정 농도로 희석한 후 1시간 동안 배양하였다. 이후 알코올을 3% 농도로 첨가하여 1시간 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, $10,000 \times g$ 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 수욕상에서 가열하였다. 가열한 세포용해물은 다시 $13,000 \times g$ 에서 5분간 원심분리한 후 535 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하였다. 시료의 MDA 농도는 $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 의 흡광계수를 사용하여 측정하였고 그 결과는 단백질 mg당 MDA의 nmol로 나타내었다.

GSH 함량 측정

GSH 함량은 Microtiter plate assay의 변형된 방법에 따라 측정하였다(Baker 등, 1990). HepG2 세포를 6-well plate에 1×10^6 cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양 후 감쪽지 추출물과 양성 대조군인 esculetin을 FBS가 없는 배지에 일정 농도로 희석한 후 1시간 배양하였다. 이후 알코올을 3% 농도로 첨가하여 1시간 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.)를 사용하여 세포를 10초간 방치하여 용해시켰다. 세포용해물은 4°C, $10,000 \times g$ 조건에서 5분간 원심분리하고 상등액은 즉시 GSH 함량 분석에 사용하였다. 단백질을 침전시키기 위해 5% sulfosalicylic acid 20 μ L와 세포용해물 180 μ L를 첨가한 후 4°C, $10,000 \times g$ 조건에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 20 μ L와 3 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB), 400 units/mL glutathione reductase가 포함된 반응 혼합물 150 μ L를 10분간 37°C에서 반응시킨 다음 2.5 mM NADPH 50 μ L를 첨가하여 microplate reader를 사용하여 412 nm에서 10분 동안 20초 간격으로 흡광도를 측정하였다. GSH의 농도는 표준곡선을 이용하여 계산하였고 단백질 mg당 GSH의 nmol로 나타내었다.

페놀산 및 플라보노이드 함량 분석

모든 페놀산 및 플라보노이드 표준원액은 메탄올을 용매로 사용하여 1,000 μ g/mL의 농도가 되게 준비하였다. Work-

ing standard 및 internal standard(salicylic acid- d_6 와 apigenin- d_5) 용액은 메탄올로 희석하여 각 표준원액에 넣어 준비하였다. 동결건조한 감쪽지 분말 메탄올 추출물(0.05 g)을 500 μ L의 internal standard 함유 메탄올과 혼합하였다. 현탁액을 실온에서 20분간 multitube vortex mixer(Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada)를 사용하여 교반한 후, 20분간 초음파(40 kHz) 추출을 하였다. 이후 초음파 추출물을 메탄올로 10배 또는 100배 희석한 다음 4°C, $30,000 \times g$ 에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 0.22 μ m nylon clarinet syringe filters(Bonna-Agela Technologies Inc., Wilmington, DE, USA)를 통해 여과한 후 LC-MS/MS 분석용 시료로 사용하였다.

LC-MS/MS 분석

시료의 페놀산과 플라보노이드 함량을 LS-MS/MS 기기(TSQ Quantiva, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)로 Sung 등(2019)의 방법으로 분석하였다. Acclaim C30 column(150 mm $\times$ 2.1 mm, 3.0 μ m particle size, Thermo Fisher Scientific)을 25°C로 유지하면서 이동상 (A) 0.1% formic acid in water와 (B) 0.1% formic acid in acetonitrile을 0.2 mL/min 속도로 설정하여 분리하였다. 이동상의 gradient elution은 A용매를 0~30분은 20~70%, 30~31분은 70~95%, 31~35분은 95%로 실행하였다. 질량 분석기는 selected reaction monitoring 모드에서, 시료의 이온화는 양이온 및 음이온 전기분무이온화(electrospray ionization; ESI⁺, ESI⁻)법을 사용하였다. ESI법의 매개 변수로 spray voltage는 3,500 V(ESI⁺) 및 2,500 V(ESI⁻), ion transfer tube temperature는 325°C, vaporizer temperature는 275°C, sheath gas는 35 Arb, aux gas는 10 Arb, sweep gas는 0 Arb, collision-induced dissociation gas는 2 mTorr, dwell time은 100 ms였다. MS/MS의 파라미터는 Table 1에 나타내었다. 시료의 정량분석을 계산하기 위해 페놀산 및 플라보노이드에 대한 외부 표준법(external standard method)이 사용되었다. 외부 표준품으로는 apigenin- d_5 와 salicylic acid- d_6 를 사용하였으며 데이터 분석은 Xcalibur 소프트웨어(Ver. 3.0, Thermo Fisher Scientific)로 처리하였다. 각 시료는 2회 반복 분석하였다.

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.

결과 및 고찰

세포독성 및 알코올 자극에 대한 보호효과

감쪽지 추출물이 HepG2 세포의 증식에 미치는 영향을

Table 1. MS/MS parameters for target phenolic acids and flavonoid

Compound	Retention time (min)	Polarity	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE (V)	RF lens (V)
Benzoic acid	17.5	—	121.1	77.1	10	40
Caffeic acid	14.3	—	179.1	135.1	16	59
Catechin	13.5	+	291.1	139.1	16	49
Kaempferol	25.0	+	287.0	152.9	33	88
Coumaric acid	16.3	—	163.2	119.2	16	53
Eriodictyol	21.6	+	289.1	153.1	24	75
Ferulic acid	17	+	195.1	177.1	11	64
Gallic acid	8.7	—	169.1	125.1	15	59
Luteolin	22.8	—	285.1	133.1	35	97
Naringenin chalcone	23.84	+	273.1	153.1	23	75
Phloridzin	19.2	—	435.2	273.1	16	81
Quercetin	22.6	—	301	151	21	77
Rutin	17	—	609.2	300	10	109
Sinapic acid	17	+	225.3	175.1	15	43
Taxifolin	17.8	—	303	285.1	10	61
Vanillic acid	13.8	—	167	152.1	14	48
Apigenin-d ₅ (IS)	24.6	+	276.1	155	30	118
Salicylic acid-d ₆ (IS)	18.3	—	141.3	97.1	17	45

알아보기 위해 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 감쪽지 추출물의 농도를 각각 1, 5, 10 µg/mL로 처리한 후 세포생존율을 측정한 결과 농도별로 처리한 구간 내 세포생존율은 84.27~90.53%로 측정됨에 따라 10 µg/mL 농도까지 우려할만한 세포독성은 없었다고 판단되었다 (Fig. 1A).

HepG2 세포에 에탄올로 산화 스트레스를 유도했을 때 감쪽지 추출물의 농도별 보호효과를 알아보았다. 세포에 감쪽지 추출물을 농도별(1~10 µg/mL)로 전처리한 후, 3% 에탄올에 노출시킨 결과 감쪽지 추출물이 처리되지 않은 세포에서는 세포생존율이 51.67%로 감소하였으나 감쪽지 추출물이 전처리된 세포에서는 세포생존율이 농도 의존적으로 증가했다(Fig. 1B). 특히 10 µg/mL에서는 90.96%의 세포생존율을 보여 감쪽지 추출물은 3% 에탄올로 유도된 산화 스트레스에 대해 세포 보호효과가 있는 것으로 판단되었다.

ROS 생성 억제 효과

산화 스트레스에 의해 발생하는 ROS 생성에 감쪽지 추출물의 효과를 알아보기 위해 HepG2 세포에 3% 에탄올로 산화 스트레스를 유도한 뒤 DCFH-DA를 이용하여 ROS의 생성량을 측정하였다. 실험결과 3% 에탄올을 처리하여 산화 스트레스가 유도된 세포는 정상세포에 비해 ROS의 생성이 빠르게 증가했으나, 감쪽지 추출물을 전처리한 세포는 ROS 생성이 억제되는 결과를 보여주었다(Fig. 2A). 이는 HepG2 세포에 참죽나무 잎 추출물을 10~100 µg/mL의 농도로 전처리한 후 에탄올(100 mM)로 산화 스트레스를 유도한 결과 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다는 보고(Kim 등, 2018b)와 HepG2/2E1 세포에 지구자 추출물을 100 µg/mL 농도로 전처리한 후 에탄올(200 mM)로 산화 스트레스를 유도한 결과 ROS 생성을 억제하였다는 보고와 유사한 경향이 있었다(You 등, 2009). 또한 HepG2 세포에 포도, 망콩 등에

Fig. 1. Cytotoxicity (A) and protective effect (B) of the CDK (calyx of *Diospyros kaki*) extract in untreated and 3% ethanol treated HepG2 cells. Esculetin (100 µM) was used as a positive control. Each value is expressed as the mean±SE (n=3). ###*P*<0.001 versus control. **P*<0.05, ***P*<0.01, and ****P*<0.001 versus 3% ethanol by ANOVA and the Tukey-Kramer method.

Fig. 2. Effects of the CDK (calyx of *Diospyros kaki*) extract on time course of ROS generation (A) and ROS production (B) at 60 min in 3% ethanol treated HepG2 cells. Esculetin (100 μ M) was used as a positive control. Each value is expressed as the mean $\pm$ SE (n=3). ^{##} P <0.01 versus control and ^{***} P <0.001 versus 3% ethanol by ANOVA and the Tukey-Kramer method.

존재하는 resveratrol을 50~400 mM의 농도로 전처리한 후 에탄올로 산화 스트레스를 유도한 결과, 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다고 보고한 연구와도 유사한 경향이 었다(Chen 등, 2016). 이러한 ROS 생성 억제 결과는 HepG2 세포에서 알코올이 대사되는 동안 생성된 자유라디칼이 감 꼭지 추출물에 의해 제거되는 것으로 보인다(Yu 등, 2020) 는 의견과 일치하는 것으로 판단되었다. 알코올로 산화 스트 레스를 유발한 후 60분이 경과한 시점의 ROS 생성량을 비 교한 결과, 감꼭지 추출물은 10 μ /mL 농도에서 양성 대조 군인 esculetin과 유사한 ROS 생성량을 나타내어 감꼭지 추출물이 ROS 생성 억제에 강한 활성이 있음을 보여주었다 (Fig. 2B).

과산화지질 함량 측정

MDA는 지질과산화물의 대표적인 성분의 하나로 지질산 화의 지표로 사용된다(Janero, 1990). 감꼭지 추출물의 지 질과산화 억제 활성을 알아보기 위해 HepG2 세포의 MDA

농도를 측정한 결과, 시료 무처리 세포는 0.07 nmol/mg protein이었다(Fig. 3A). 감꼭지 추출물을 1, 5, 10 μ /mL 의 농도로 처리한 결과 지질과산화 반응은 매우 잘 억제되어 세포의 MDA 농도가 감소하는 경향을 보였다. 특히 감꼭지 추출물은 모든 농도에서 positive control인 esculetin과 동 등한 정도의 MDA 생성 억제 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 3A). Sung 등(2016)은 HepG2/2E1 세포에 에탄올(200 mM)을 처리했을 때 증가한 MDA를 100~500 μ /mL의 농 도로 처리한 발효율균 추출물이 농도 의존적으로 감소시켰 다고 보고하였다. 또한, 에탄올과 굴 열수 추출물을 같이 투 여한 rat의 간조직 내 MDA 생성은 에탄올만 투여한 군에 비해 유의적으로 감소했다고 보고하였다(Osaki 등, 2016). 아울러 흰쥐의 간균질액에 LPS로 간독성을 유도한 후 MDA 의 함량을 측정한 결과, LPS를 투여한 대조군에 비해 어성 초, 오미자, 구기자 등을 함유한 혼합추출물이 MDA의 함량 을 약 65.81%로 감소시키는 효과를 보였다고 보고하였다 (Kwon 등, 2007). 이러한 결과들로부터 항산화 활성을 갖

Fig. 3. Effects of the CDK (calyx of *Diospyros kaki*) extract in 3% ethanol treated HepG2 cells. (A) Cellular lipid peroxidation was determined by the levels of MDA. (B) Cellular GSH levels were determined by DTNB-GSSG reductase recycling assay. Esculetin (100 μ M) was used as a positive control. Each value is expressed as the mean $\pm$ SE (n=3). ^{###} P <0.001 versus control, ^{**} P <0.01 and ^{***} P <0.001 versus 3% ethanol by ANOVA and the Tukey-Kramer method.

는 천연물 소재들이 알코올에 의해 유도된 HepG2 세포 내 지질산화 과정 중 대표적인 활성 알데히드인 MDA의 생성을 억제하는 것으로 생각할 수 있다(Sung 등, 2016).

GSH 함량 측정

GSH는 간에서 만들어지는 아미노산의 일종으로 산화적 손상을 보호하는 데 중추적인 역할을 하는 매우 강력한 항산화 물질이며 항산화 활성을 측정하기 위한 지표로 사용된다(Wu 등, 2004). 감꼭지 추출물의 세포 보호효과를 포함한 항산화 기전을 더 명확히 밝히기 위해 세포 내 GSH의 변화를 측정하였다(Fig. 3B). HepG2 세포에 3% 에탄올을 단독으로 처리하여 산화 스트레스를 유도한 세포에서 GSH의 농도는 대조군에 비해 현저하게 감소하였다. 그러나 감꼭지 추출물을 1, 5, 10 µg/mL의 농도로 전처리한 후 세포에 3% 에탄올을 처리한 결과 세포의 GSH의 함량은 감꼭지 추출물 농도에 비례하여 증가하는 경향을 보였다. You 등(2010)은 HepG2 세포에 에탄올(200 mM)로 산화 스트레스를 유도했을 때 GSH의 농도가 정상세포에 비해 감소하였으나 민들레 뿌리 추출물로 처리했을 때 GSH의 농도가 증가한다고 보고하였으며, Xie 등(2008)도 알팔파(alfalfa) 잎에서 분리한 펩타이드로 실험을 한 결과 대조군에 비해 GSH의 농도가 증가한다고 보고하였다. 또한 3% 에탄올로 산화 스트레스를 유도한 HepG2 세포에 처리된 10~100 µM esculetin이 농도 의존적으로 GSH 농도를 증가시켰다는 보고(Lee 등, 2018) 등 본 연구 결과와 비슷한 경향을 보인 사례가 많았다. 이러한 결과는 감꼭지 추출물이 외부로부터 산화 스트레스 해소나 생체 내 자유라디칼을 제거하는 능력을 보유하고 있으며, H₂O₂와 지질과산화를 대사시키는 GSH-Px, GST에 전자공여체로 작용하여 세포 방어체계에 중요한 역할을 하는 GSH 작용에 영향을 미쳐 HepG2 세포의 구조 및 기능

유지에 도움을 주는 것으로 이해할 수 있다(Yeon 등, 2013).

페놀산 및 플라보노이드 함량 분석

감의 주요 기능성 물질인 페놀산과 플라보노이드는 지질의 산화 억제, 활성산소 제거 및 산화적 스트레스를 해소함으로써 노화를 예방하거나 지연하는 효과, 심장병과 뇌졸중 예방효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Agati 등, 2012; Brunetti 등, 2013; Gao 등, 2014; Rice-Evans 등, 1996). LC-MS/MS를 사용하여 감꼭지에 존재하는 페놀산 및 플라보노이드를 정량 분석하였다(Table 2). 감꼭지의 16개 성분은 0.001~25 µg/mL의 농도 범위에서 검량선을 작성한 결과 상관계수(R²) 값이 0.9899 이상으로 양호한 직선성을 보였다. 감꼭지 추출물의 정량분석 결과에서 페놀산 가운데 vanillic acid의 함량이 729.01±42.48 µg/g으로 가장 높았고, gallic acid의 함량은 629.66±32.41 µg/g, coumaric acid의 함량은 217.30±21.82 µg/g, caffeic acid의 함량은 27.45±20.63 µg/g, sinapic acid의 함량은 24.15±0.89 µg/g이었다. 플라보노이드 중에서는 catechin의 함량이 1,894.89±105.10 µg/g으로 가장 높았고, kaempferol의 함량은 371.88±30.61 µg/g, quercetin의 함량은 230.03±19.21 µg/g, rutin의 함량은 167.98±42.15 µg/g, naringenin chalcone의 함량은 24.16±0.05 µg/g, phloridzin의 함량은 16.63±2.13 µg/g, eriodictyol의 함량은 12.43±0.17 µg/g, taxifolin의 함량은 5.46±0.02 µg/g, luteolin의 함량은 0.31±0.08 µg/g이었다. Cha(2014)의 감꼭지 항산화 효과에 대한 보고에 따르면 DPPH법에 의한 자유라디칼 소거 작용이 가장 강력한 부탄올 분획물에서 quercetin, catechin, gallic acid가 분리되었다. 이들 성분의 자유라디칼 소거 작용은 대조군인 α-tocopherol보다는 우수하고, BHA와는 유사 또는 우수한 항산화 효과를 나타낸다고 보고

Table 2. Concentration of phenolic acids and flavonoid in the calyx of *Diospyros kaki*

Compound	Concentration (µg/g of extraction residue)	Correlation coefficient (R ²)	Calibration range (µg/mL)
Vanillic acid	729.01±42.48	0.9909	0.010~25
Gallic acid	629.66±32.41	0.9977	0.005~25
Coumaric acid	217.30±21.82	0.9958	0.001~25
Caffeic acid	27.45±20.63	0.9958	0.001~25
Sinapic acid	24.15±0.89	0.9924	0.001~25
Catechin	1,894.89±105.10	0.9987	0.001~25
Kaempferol	371.88±30.61	0.9922	0.001~25
Quercetin	230.03±19.21	0.9990	0.001~25
Rutin	167.98±42.15	0.9984	0.050~25
Naringenin chalcone	24.16±0.05	0.9927	0.001~25
Phloridzin	16.63±2.13	0.9970	0.001~25
Eriodictyol	12.43±0.17	0.9988	0.001~25
Taxifolin	5.46±0.02	0.9975	0.001~25
Luteolin	0.31±0.08	0.9995	0.001~25
Benzoic acid	ND ¹⁾	0.9899	0.500~25
Ferulic acid	ND	0.9976	0.005~25

The values are expressed as a mean±SD (n=2).

¹⁾Not detected.

하였다(Cha, 2014). 한편 gallic acid, catechin, kaempferol, quercetin, rutin, caffeic acid가 Trolox equivalent antioxidant capacity가 우수하다고 보고(Rice-Evans 등, 1996; Sroka와 Cisowski, 2003)된 것을 고려하면, 본 연구에서 검출된 이들 성분이 감쪽지 추출물 유래 간세포 보호 활성에 기여하는 성분일 가능성이 있다.

요 약

본 연구에서는 감쪽지 추출물이 알코올 자극을 받은 HepG2 세포의 보호효과와 ROS 생성량, MDA 및 GSH 함량에 미치는 영향을 살펴보고, 감쪽지 추출물의 페놀산 및 플라보노이드 함량을 LC-MS/MS로 정량 분석하였다. 감쪽지 추출물은 HepG2 세포에서 10 µg/mL 농도까지 우려할만한 세포독성을 나타내지 않았고, 알코올 처리군에 비해 농도 비례하여 세포생존율을 증가시켰다. 감쪽지 추출물은 1, 5, 10 µg/mL 모든 농도에서 ROS의 생성을 억제하였다. 또한, 감쪽지 추출물은 모든 농도에서 세포의 MDA 생성을 억제하였는데 양성 대조군인 100 µM 농도의 esculetin보다 효과적으로 MDA 생성을 억제하였다. GSH 함량 분석 결과 감쪽지 추출물은 GSH를 증가시켰다. 감쪽지 추출물의 정량분석 결과에서 gallic acid 629.66±32.41 µg/g, catechin 1,894.89±105.10 µg/g, kaempferol 371.88±30.61 µg/g, quercetin 230.03±19.21 µg/g, rutin 167.98±42.15 µg/g 등 다양한 페놀산 및 플라보노이드가 검출되었으며, 이들이 감쪽지 추출물의 주요 간세포 보호 활성에 기여하는 성분일 가능성이 있다. 이러한 결과들은 감쪽지 추출물이 알코올로 유도된 산화적 스트레스부터 간세포를 보호할 수 있는 기능성 소재로 활용될 수 있음을 시사한다.

REFERENCES

Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. Flavonoid as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci.* 2012. 196:67-76.

Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem.* 1990. 190:360-365.

Brunetti C, Di Ferdinando M, Fini A, Pollastri S, Tattini M. Flavonoid as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans. *Int J Mol Sci.* 2013. 14:3540-3555.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978. 52:302-310.

Cha BC. Ingredients of antioxidant activity from calyx of *Diospyros kaki* Thunberg. *Kor J Pharmacogn.* 2014. 45:35-40.

Chen WM, Shaw LH, Chang PJ, Tung SY, Chang TS, Shen CH, et al. Hepatoprotective effect of resveratrol against ethanol-induced oxidative stress through induction of superoxide dismutase *in vivo* and *in vitro*. *Exp Ther Med.* 2016. 11:1231-1238.

Choi JH, Kim MS, Yu HJ, Kim KH, Lee HS, Cho HY, et al. Hepatoprotective effects of lactic acid-fermented garlic ex-

tracts on fatty liver-induced mouse by alcohol. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2014. 43:1642-1647.

Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor 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.

Gao H, Cheng N, Zhou J, Wang B, Deng J, Cao W. Antioxidant activities and phenolic compounds of date plum persimmon (*Diospyros lotus* L.) fruits. *J Food Sci Technol.* 2014. 51: 950-956.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Br J Pharmacol.* 2004. 142:231-255.

Hong JH, Kim HJ, Choi YH, Lee IS. Physiological activities of dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2008. 37:957-964.

Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990. 9:515-540.

Jang IC, Jo EK, Bae MS, Lee HJ, Jeon GI, Park E, et al. Antioxidant and antigenotoxic activities of different parts of persimmon (*Diospyros kaki* cv. Fuyu) fruit. *J Med Plants Res.* 2010. 4:155-160.

Jeon IH, Kang HJ, Lee HS, Shin JH, Park YG, Jeong SI, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of water-soluble extracts from different parts of Kojongsi persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Korean J Food Sci Technol.* 2014. 46:505-510.

Kamel KM, El-Raouf OMA, Metwally SA, El-Latif HAA, El-Sayed ME. Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoid, attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2014. 28:312-319.

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.* 2018a. 6:91-103.

Kim HJ, Cho SY, Kim JB, Kim HW, Choe JS, Jang HH. Effects of the *Cedrela sinensis* A. Juss. leaves on the alcohol-induced oxidative stress in the human hepatic HepG2 cells. *Korean J Food Nutr.* 2018b. 31:464-470.

Kim SM, Kang SH, Ma JY, Kim JH. A study on the extraction and efficacy of bioactive compound from *Hovenia dulcis*. *Korean J Biotechnol Bioeng.* 2006. 21:11-15.

Korean Statistical Information Service. Consumption of alcoholic beverages per person. 2019 [cited 2021 Apr 21]. Available from: http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_2KAAC06_OECD

Kwon RH, Na BJ, Park SJ, Woo WH, Mun YJ, Lee MS. Effect of *Houttuynia cordata* Thunb and herbs mixture extract on the antioxidation in the LPS-induced hepatotoxicity. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2007. 21:1520-1524.

Lee J, Yang J, Jeon J, Jeong HS, Lee J, Sung J. Hepatoprotective effect of esculetin on ethanol-induced liver injury in human HepG2 cells and C57BL/6J mice. *J Funct Foods.* 2018. 40: 536-543.

Lee YC, Sa YS, Jeong CS, Suh KG, Choi HS. Anticoagulating activity of persimmon and its processed foods. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2001. 30:949-953.

Massey VL, Arteel GE. Acute alcohol-induced liver injury. *Front Physiol.* 2012. 3:193. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00193>

Nam KS, Kim J, Noh SK, Park JH, Sung EG. Effect of sweet persimmon wine on alcoholic fatty livers in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2011. 40:1548-1555.

- Osaki K, Arakawa T, Kim B, Lee M, Jeong C, Kang N. Hepatoprotective effects of oyster (*Crassostrea gigas*) extract in a rat model of alcohol-induced oxidative stress. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2016. 45:805-811.
- Park JH, Kweon GR. Clinical applications of antioxidants. *Hanyang Med Rev.* 2013. 33:130-136.
- Park JH. Review on pharmacological efficacy and clinical study of the calyx of *Diospyros kaki*. *Korean Herb Med Inf.* 2018. 6:267-277.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoid and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996. 20:933-956.
- Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol.* 2003. 41:753-758.
- Sung H, Lee YH, Jun W. *In vitro* hepatoprotective effects of fermented *Curcuma longa* L. by *Aspergillus oryzae* against alcohol-induced oxidative stress. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2016. 45:812-818.
- Sung J, Suh JH, Wang Y. Effects of heat treatment of mandarin peel on flavonoid profiles and lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *J Food Drug Anal.* 2019. 27:729-735.
- Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González A, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, García-Luna Y, et al. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol.* 2014. 6:144-149.
- Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 1999. 27:612-616.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004. 134: 489-492.
- Xie Z, Huang J, Xu X, Jin Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chem.* 2008. 111:370-376.
- Yeon SH, Ham H, Sung J, Kim Y, Namkoong S, Jeong HS, et al. 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.* 2013. 42:1525-1532.
- You Y, Jung KY, Lee YH, Jun W, Lee BY. Hepatoprotective effects of *Hovenia dulcis* fruit on ethanol-induced liver damage *in vitro* and *in vivo*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2009. 38:154-159.
- You Y, Yoo S, Yoon HG, Park J, Lee YH, Kim S, et al. *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress. *Food Chem Toxicol.* 2010. 48: 1632-1637.
- Yu J, Jeong T, Choi Y, Lee SH, Lee H, Jeong HS, et al. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of methanol extracts from vegetable sprouts commonly consumed in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2020. 49:781-787.