고구마 유래 안토시아닌과 카로티노이드 추출물의 Caco-2 소장상피세포 단층막 투과성

박우성^{1*} · 구경아^{1,2*} · 김혜진¹ · 권지민¹ · 강동민¹ · 정혜진¹ · 이신우³ · 김호수⁴ · 곽상수⁴ · 안미정¹

¹경상국립대학교 약학대학, ²(주)에이조스바이오

³경상국립대학교 생명과학대학 항노화신소재학과, ⁴한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터

Intestinal Epithelial Monolayer Permeability of Sweet Potato-Derived Anthocyanin and Carotenoid Extracts in Caco-2 Cells

Woo Sung Park^{1*}, Kyung Ah Koo^{1,2*}, Hye-Jin Kim¹, Ji-Min Kwon¹, Dong-Min Kang¹,
Hye Jin Chung¹, Shin Woo Lee³, Ho-Su Kim⁴, Sang-Soo Kwak⁴, and Mi-Jeong Ahn¹

¹College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University

²Azothbio Inc.

³Department of Plant & Bio-Materials Science, College of Life Science, Gyeongsang National University

⁴Plant Systems Engineering Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

ABSTRACT Caco-2 human intestinal epithelial cells were used to determine the intestinal epithelial monolayer membrane permeability of the anthocyanin and carotenoid extracts from the purple- and yellow-flashed sweet potatoes, respectively. The permeability was analyzed at concentrations of 10 mg/mL of anthocyanin extract and 0.5 mg/mL of carotenoid extract without cellular toxicity. The Caco-2 cells were incubated for 25 days to form a monolayer on the Transwell filter. It was ensured that the membrane integrity of the monolayer was suitable for measuring the permeability *in vitro* by treatment with lucifer yellow and comparison with two markers, atenolol and propranolol. The permeability of lucifer yellow was 0.53% and the apparent permeability coefficients (*P*_{app}) of atenolol and propranolol were 6.01×10^{-7} and 2.26×10^{-5} cm/s, respectively, indicating that the monolayer was successfully formed. The *P*_{app} of the anthocyanin extract was 0.31×10^{-6} , 1.57×10^{-6} , 4.69×10^{-6} , and 5.16×10^{-6} cm/s for 1, 2, 4, and 6 hours, respectively. Analysis of the permeation rate on each of the twelve anthocyanins, 7 peonidins and 5 cyanidins in the extract showed that peonidins and cyanidins possessing caffeic acid present a higher permeability than those with ferulic acid or benzoic acid. However, cryptoxanthin, 13Z-β-carotene, all-trans-β-carotene, and 9Z-β-carotene in the carotenoid extract were not detectable within 6 hours of the incubation time.

Key words: sweet potato, anthocyanin, carotenoid, Caco-2, monolayer permeability

서 론

메꽃(Convulvulaceae)과에 속하는 고구마[*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]는 열대 및 아열대 지역에서 재배되는 작물로 세계적으로 중요한 식량자원이다(Katayama 등, 2017). 고구마는 다량의 탄수화물과 펙틴산, 무기질, 식이섬유, 비타민 등을 함유하고 있어서 세계적으로 중요한 식량자원일 뿐만 아니라 항암 활성과 항산화 활성 등의 다양한 기능성을

가지고 있다(Shin과 Lee, 2011).

안토시아닌은 자연계의 수용성 색소 중 가장 많은 부분을 차지하며, 주로 과일과 꽃에 존재하고 붉은색, 자주색, 푸른색, 보라색 등을 나타낸다. 빛과 산소, 열에 불안정하지만, 산성에는 안정하다(Strack과 Wray, 1994). 강한 항산화 활성을 가지고 있으며 이외에도 항염증·항미생물 활성 등이 잘 알려져 있다(Luo 등, 2014; Marques 등, 2018; Zheng과 Wang, 2003). 카로티노이드는 자연계의 지용성 색소로

Received 11 March 2021; Revised 1 August 2021; Accepted 2 August 2021

Corresponding author: Mi-Jeong Ahn, College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University, 501, Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongnam 52828, Korea, E-mail: amj5812@gnu.ac.kr

Author information: Woo Sung Park (Researcher), Kyung Ah Koo (Researcher), Hye-Jin Kim (Researcher), Ji-Min Kwon (Graduate student), Dong-Min Kang (Graduate student), Hye Jin Chung (Professor), Shin Woo Lee (Professor), Mi-Jeong Ahn (Professor)

*These authors contributed equally to this work.

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

식물이나 일부 미생물에 의해 생합성되며 노란색, 주황색, 빨간색을 나타낸다. 구조적으로 탄소 40개가 기본이 되며 공액이중결합을 많이 가지고 있어 빛이나 산소, 온도 등에 매우 불안정하며, 안토시아닌과는 반대로 산성 조건에서 쉽게 분해된다. 생체 내에서 항산화제 역할을 하여 심혈관질환 예방 혹은 항암 작용을 나타내고, 노화나 안과 질환 등을 예방한다고 알려져 있다(Fiedor와 Burda, 2014; Stahl과 Sies, 2005). 인체는 안토시아닌과 카로티노이드를 생합성하지 못하기 때문에 음식을 통해 섭취해야 한다(Rao와 Rao, 2007).

인체의 소장은 병원성 세균이나 독소 및 다른 외부 자극에 반응하는 화학적 장벽을 제공한다. 또한, 물리적 장벽으로 외부 자극에 방어하며 다양한 소화효소와 용도를 통해 음식을 소화하고 흡수한다. 가장 바깥쪽인 epithelium(상피)에서 음식물이 닿는 바깥쪽 부분을 apical이라 하고, 혈관과 만나는 안쪽 부분을 basolateral이라 한다. 소장에서의 흡수는 신장을 통한 배설과 함께 체내 영양소의 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 한다(Klunder 등, 2016).

Caco-2 세포는 사람의 대장암(colorectal carcinoma)에서 유래한 세포로 표피와 유사한 형태로 바닥에 부착하여 자란다. 이 세포는 분화되면서 분극 현상(polarization), 미소 융모막(microvilli)을 형성하는 등 형태적, 기능적으로 사람의 소장 상피세포의 특성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Pinto 등, 1983). Transwell의 insert에서 배양될 때 단층(monolayer)을 형성하면서 위아래가 구분되는데, polycarbonate membrane과 Caco-2 세포가 접하지 않은 부분은 정단부(apical), 접한 부분은 기저부(basolateral)의 특징을 나타낸다(Rousset, 1986). 따라서 Caco-2 세포단층 투과 실험은 영양분이나 약물이 소장관막으로부터 혈액으로 흡수되는 투과 기전 연구에 유용한 *in vitro* 실험모델로 널리 사용되고 있다(Giulian과 Wood, 1991; Hubatsch 등, 2007; Souba와 Copeland, 1992).

기존에 보고된 연구로는 고구마 유래 안토시아닌 추출물의 인지질 복합체가 추출물보다 Caco-2 상피세포 단층막 투과도가 높다는 보고가 있으나, 추출물의 처리 후 시간 경과에 따른 성분들의 투과도 변화에 대한 연구결과는 보고된 바 없다(Cheng 등, 2018). 또한, 현재까지 카로티노이드계 개별 화합물들의 단층막 투과성 연구는 보고되어 있으나, 실제로 우리가 일상생활에서 섭취하는 형태와 유사한 카로티노이드 추출물에 관한 연구는 보고된 바가 없다(During 등, 2002; O'Sullivan 등, 2004; O'Sullivan 등, 2007). 따라서 본 연구에서는 신자미 품종 자색 고구마로부터 얻은 안토시아닌 추출물과 신황미 품종 주황색 고구마로부터 얻은 카로티노이드 추출물의 Caco-2 상피세포 단층막 투과도를 분석하여 실제로 우리가 음식으로 섭취했을 경우 두 색소 성분의 인체흡수패턴에 관한 자료를 도출하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 신자미와 신황미 고구마는 국립식량과학원 바이오에너지작물연구소(Bioenergy Crop Research Center, National Institute of Crop Science, Muan, Korea)로부터 제공받아 사용하였다. 추출물을 제작하기 위해 고구마를 세척한 후 껍질을 벗겨내고 동결건조를 하였다. 시료는 -80°C 에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

안토시아닌과 카로티노이드 추출물 제조

실험에 사용하기 위한 안토시아닌과 카로티노이드 추출물 제조 방법은 이전에 보고한 방법을 이용하였다(Kim 등, 2015). 즉, 안토시아닌 추출물을 얻기 위해 동결건조된 신자미 고구마 시료 250 mg과 sea sand에 5% formic acid가 포함된 MeOH 15 mL를 넣고 30분간 초음파 추출한 후 Sep-Pak C18 cartridge(Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 정제하였다. 카로티노이드 추출물을 얻기 위해 동결건조된 신황미 고구마 시료 250 mg에 sea sand, Na_2SO_4 , NaHCO_3 를 넣고 아세톤 15 mL를 넣은 후 30분간 초음파 추출하였다.

세포배양

실험에 사용한 Caco-2 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Caco-2 세포의 배양액으로는 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% penicillin-streptomycin(100 U/mL penicillin과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Hyclone, Logan, UT, USA)을 사용하였다. 세포는 5% CO_2 , humidity 100%, 37°C 에서 배양하였으며, 계대배양은 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)로 세포를 세척하고 trypsin-EDTA를 사용하였다(Sontakke 등, 2016). DMEM 배지를 제외한 시약들은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

Caco-2 세포독성 시험

안토시아닌과 카로티노이드 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 MTT(Sigma-Aldrich) 방법을 이용하여 실험하였다. Caco-2 세포를 96 well plate에 $4 \times 10^5/\text{well}$ 로 seeding 한 후, 5% CO_2 , humidity 100%, 37°C 에서 5일 동안 배양하였다. 실험에 사용한 수용성 물질인 안토시아닌 추출물은 DMSO에 녹여 사용하였으며, 배지에 희석된 DMSO의 최종 농도는 1%로 DMSO에 의한 세포독성이 관찰되지 않는 범위에서 사용하였다. 지용성 물질인 카로티노이드 추출물은 계면활성제인 Tween 40을 이용하여 제조하였다(O'Sullivan 등, 2004). 과량의 카로티노이드 추출물과 아세톤, Tween 40을 잘 섞어서 N_2 가스로 용매를 제거하고 HBSS에 녹여 시린지 필터($0.45 \mu\text{m}$, Corning Life Scien-

ces, Tewksbury, MA, USA)로 여과한 후 HPLC-DAD로 카로티노이드의 농도를 결정하여 시료를 준비하였다. Tween 40의 최종 농도는 세포독성이 관찰되지 않는 0.25% 이내로 사용하였다. 세포에 독성을 나타내지 않는 최고 농도를 결정하기 위하여 안토시아닌 추출물의 경우 20, 10, 5, 2.5, 1.3 mg/mL로, 카로티노이드 추출물의 경우 0.5, 0.25, 0.13, 0.06, 0.03 mg/mL로 시료를 처리하고 24시간 후 MTT 시약을 처리하여 세포독성을 확인하였다. 모든 실험은 3배수, 최소 2회 반복하였다.

Caco-2 세포 단층막 형성 및 tight junction integrity 확인

투과도 분석을 위하여 12 Trans-well®(Corning Life Sciences, Santa Barbara, CA, USA)의 insert membrane filter(pore 크기 0.4 µm, 표면적 1.12 cm²)에 Caco-2 세포를 3.5×10^5 씩 seeding 하고 3일마다 배지를 교체하였고, 투과도 분석에 적절한 tight junction integrity를 가진 단층(monolayer) 형태로 잘 자라도록 25일 이상 배양하였다. 단층이 잘 형성되었는지는 25일 배양 후 Millicell-ERS (Millipore, Bedford, MA, USA) 기기를 사용하여 TEER (TransEpithelial Electrical Resistance) 값을 측정하여 결정하였으며(van Breemen과 Li, 2005), 문헌대로 300 Ω·cm² 이상이 되었을 때 본 실험에 사용하였다. 투과도를 분석을 위하여 투과도 측정용 완충용액 transport buffer(10 mM HEPES in HBSS)를 사용하였다.

표준물질 투과도 분석

Lucifer yellow(Sigma-Aldrich)의 투과도 측정은 최종 농도가 300 µM이 되도록 transport buffer 0.5 mL에 준비하여 정단부에 넣고, 기저부는 transport buffer 1.5 mL를 넣어주었다. 1시간 동안 배양 후 기저부의 buffer를 취하여 96 well plate에 넣고 microplate reader(Perkin Elmer, Victor X5, Waltham, MA, USA)를 이용하여 형광광도(excitation 488 nm, emission 535 nm)를 측정하였다(Sum-sakul과 Na-Bangchang, 2016). 투과된 양은 lucifer yellow 300 µM로부터 2배 연속 희석법으로 준비한 12개 농도로 얻은 표준검량선 방정식에 대입하여 결정하였다. 투과율은 초기 처리 농도 300 µM를 대조군으로 투과된 양을 백분율(%)로 환산하였다.

Atenolol과 propranolol(Sigma-Aldrich)의 투과도 분석은 최종 농도 100 µg/mL로 각각 처리하여 1시간 배양 후 기저부에서 10 µL씩을 취해 HPLC-DAD로 분석하였다. 이동상으로 water(0.1% formic acid)를 A 용액으로 하고, B 용액은 acetonitrile로 하였다. 농도 구배 조건은 처음 5분간 A를 90%로 흘려준 후 15분간 10%로 낮춰주고 5분간 유지한 뒤 초기 조건인 A 용액 90%를 5분간 유지하였다. 컬럼은 J'sphere ODS(250×4.6 mm, S-4 µm, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)를 사용하였으며 검출 파장은 275 nm로 하였다. 유속은 1.0 mL/min, 컬럼 온도는 30°C, 시료 주입량은

10 µL로 하였다. 본 분석 조건에서 atenolol은 15분, propranolol은 12분의 머무름 시간을 보였으며, Caco-2 세포 단층막 투과량은 2배 연속 희석법(100~0.8 µg/mL)으로 준비한 각각 8개 농도로 얻은 표준검량선 방정식에 대입하여 결정하였다. 각 표준물질의 투과도 계수(apparent permeability coefficient; P_{app} , cm/s)는 아래와 같이 계산하였다(Hubatsch 등, 2007).

$$P_{app} \text{ (cm/s)} = V \times \Delta C / \Delta t \times 1 / A C_0$$

V: 기저부 부피(1.5 mL)

ΔC: 기저부의 농도(mg/mL)

Δt: 시료 처리 시간(s)

A: insert 표면적(1.12 cm²)

C₀: 정단부의 초기 농도(mg/mL)

안토시아닌과 카로티노이드 추출물들의 투과도

Trans-well의 기저부에 transport buffer 1.5 mL를 넣고 정단부에 시료를 포함하는 배지 0.5 mL를 넣어주었다. DMSO에 준비한 안토시아닌 추출물과 Tween 40에 준비한 카로티노이드 추출물의 최종 농도가 각각 10 mg/mL와 0.5 mg/mL가 되도록 처리하였다. 안토시아닌 추출물 처리 후 1, 2, 4, 6시간 배양한 다음 기저부의 transport buffer 10 µL씩을 취해 이전에 보고한 방법대로 HPLC-DAD를 이용하여 투과도를 측정하였다(Kim 등, 2015). 안토시아닌과 카로티노이드 추출물 중 각 성분의 식별 및 정량은 이전에 보고한 방법을 그대로 사용하였다(Kim 등, 2020).

통계분석

반복 실험으로 얻어진 독립적인 실험결과들의 분석은 그룹 평균±표준편차(mean±SD)로 표기하였다. 프로그램은 Microsoft Excel 2019 software(Microsoft, Redmond, WA, USA)의 데이터분석-분산분석:일원배치법(One-way ANOVA, Dunnett's test)을 이용하였으며, $P < 0.05$ 수준에서 유의성을 확인하였다.

결과 및 고찰

안토시아닌과 카로티노이드 추출물의 세포독성 확인

Caco-2 세포를 배양한 96 well plate에 안토시아닌 추출물과 카로티노이드 추출물을 농도별로 처리하여 세포독성을 확인하였다. 그 결과, 안토시아닌 추출물은 10 mg/mL의 농도까지 세포독성이 없었고 20 mg/mL 농도에서는 세포생존율이 63.2%로 세포독성을 나타내었다(Fig. 1). 카로티노이드 추출물의 경우 0.5 mg/mL 농도에서는 세포독성이 없으면서 배지에 잘 용해되었으나, 그 이상의 농도에서는 추출물이 배지와 층 분리되는 현상이 발생하였다. 따라서 본 실험에 사용하는 안토시아닌과 카로티노이드 추출물의 농도를 각각 10 mg/mL와 0.5 mg/mL로 정하였다.

Fig. 1. Cell cytotoxicity of anthocyanin and carotenoid extracts that were prepared with DMSO and Tween 40, respectively. The cell viability was measured in 96 well plate. Relative cell viability (%) was calculated as OD of sample- or vehicle-treated cell $\times$ 100/OD of control cell. *** P <0.001 was considered significantly different, when compared with the control.

Caco-2 세포 단층막 형성 확인

Caco-2 세포를 trans-well insert에서 25일 이상 배양한 후 세포 단층막이 잘 형성되었는지 확인하기 위해 표준시약으로서 세포 간 integrity marker인 lucifer yellow와 친수성 물질인 atenolol, 친지질성 물질인 propranolol을 사용하였다(Artursson, 1990). Lucifer yellow를 정단부에 처리하고 1시간이 지난 후 기저부로 투과된 양을 형광광도계로 측정된 결과 0.53%가 투과되는 것을 확인하였다. 이 비율은 세포 사이의 membrane integrity, 즉 paracellular transport의 적정수준을 결정하는 것으로 투과도 1% 이하를 기준으로 하고 있다(Yamaura 등, 2016). Atenolol과 propranolol은 세포막의 β 1-blocker로서 고혈압 치료제로 현재 시판되고 있는 약물들이다. Atenolol은 세포 사이의 tight junction을 천천히 통과하는 paracellular transport 약물이고 propranolol은 빠르게 세포횡단수송(transcellular transport)을 하는 약물이며(Chen 등, 2017), 사람의 장관막 흡수율은 각각 50%와 90%로 알려져 있다(Yazdani 등, 1998; Zhao 등, 2001). 이들의 투과도를 비교군으로 하여 고구마 안토시아닌과 카로티노이드 추출물의 투과도를 측정하였다. 그 결과 atenolol의 투과계수는 $(6.01 \pm 0.09) \times 10^{-7}$ cm/s, propranolol의 투과계수는 $(2.26 \pm 0.01) \times 10^{-5}$ cm/s로 Kratz 등(2011)의 연구와 비교해 유사한 결과가 도출되어 Caco-2 세포 단층막 투과도 측정을 위한 *in vitro* 실험모델이 잘 확립되었음을 확인하였다.

안토시아닌 추출물의 단층막 투과성 측정

세포독성이 나타나지 않은 10 mg/mL 농도의 안토시아닌 추출물을 정단부에 넣고 0, 1, 2, 4, 6시간 반응 후 기저부에 서 각 10 μ L를 취하여 HPLC-DAD로 분석하였다(Fig. 2A,

2B). 즉, 정단부의 초기 농도(C_0)(Fig. 1A)에서 시간별 기저부의 농도(ΔC)를 Fig. 2B로부터 구해 Caco-2 세포 단층막 투과도를 계산하였다. 그 결과, 자색고구마의 안토시아닌 추출물 중 주요 안토시아닌 성분으로 알려진 12종을 포함하는 안토시아닌 총 함량에 대한 투과계수가 1시간 후에는 $(0.31 \pm 0.01) \times 10^{-6}$ cm/s였고 2시간 후에는 $(1.57 \pm 0.07) \times 10^{-6}$ cm/s, 4시간 후에는 $(4.69 \pm 0.13) \times 10^{-6}$ cm/s, 6시간 후에는 $(5.16 \pm 0.05) \times 10^{-6}$ cm/s였다. 시간당 변화량을 Fig. 3과 같이 그래프로 나타내면, 5시간 이후부터 plateau를 이루며 약 5×10^{-6} cm/s 투과도에서 최고점을 보였다. 이 값을 투과계수와 사람의 장관막 흡수율 비교 그래프에 대입해 보면(Grès 등, 1998; Cyprotex, 2021), 고구마 안토시아닌 추출물 중의 총 안토시아닌 성분의 인체 장관막 흡수율은 약 75%에 해당한다. 고구마 안토시아닌 추출물을 rat에 투여하였을 경우 투여 후 30분부터 peonidin 3-caffeoyl sophoroside-5-glucoside(**9**)가 plasma에서 검출되었다(Suda 등, 2002). 이 연구에서 사용한 추출물 제조방식(물, 고온 90°C)은 본 연구의 제조방식(메탄올, 상온 초음파)과 다르고 추출된 안토시아닌 4종 중에 3-caffeoyl sophoroside-5-glucoside(**9**)가 가장 많이 함유되어 있었던 점도 본 연구의 결과와는 다른 점이다. 한편, Caco-2 세포 단층막 투과도에 관한 고구마 유래 안토시아닌 추출물의 또 다른 연구(Cheng 등, 2018)에서도 추출물 제조방식(에탄올, 고온 80°C)이 다르고 주요 안토시아닌 성분으로 보고한 10종 중 8종이 본 연구의 결과와는 상이하여 직접적으로 비교할 수는 없지만, 이 경우 투여 후 2시간 뒤에 측정된 투과계수가 약 $(0.91 \pm 0.09) \times 10^{-6}$ cm/s로 같은 시간에 해당하는 본 연구결과보다는 다소 낮은 투과율을 보였다.

이외에 적포도, 블루베리류, 딸기, 체리에 함유된 cyani-

Fig. 2. HPLC-DAD chromatograms of anthocyanin and carotenoid extracts. (A) An LC chromatogram of twelve representative anthocyanins obtained from 10 μ L of the transport buffer prepared to be 10 mg/mL anthocyanin extract. Twelve peaks (1~12) were identified as follows: 1, peonidin 3-sophoroside-5-glucoside; 2, cyanidin 3-*p*-hydroxybenzoyl sophoroside-5-glucoside; 3, peonidin 3-*p*-hydroxybenzoyl sophoroside-5-glucoside; 4, cyanidin 3-(6"-feruloyl sophoroside)-5-glucoside; 5, peonidin 3-(6"-feruloyl sophoroside)-5-glucoside; 6, cyanidin 3-(6",6"-dicaffeoyl sophoroside)-5-glucoside; 7, cyanidin 3-caffeoyl-*p*-hydroxybenzoyl sophoroside-5-glucoside; 8, cyanidin 3-(6"-caffeoyl-6-feruloyl sophoroside)-5-glucoside; 9, peonidin 3-caffeoyl sophoroside-5-glucoside; 10, peonidin 3-(6",6"-dicaffeoyl sophoroside)-5-glucoside; 11, peonidin 3-caffeoyl-*p*-hydroxybenzoyl sophoroside-5-glucoside; 12, peonidin 3-(6"-caffeoyl-6-feruloyl sophoroside)-5-glucoside (Kim et al., 2020). (B) An LC chromatogram of anthocyanin extract obtained from 10 μ L of the transport buffer taken from the basolateral part at 2, 4, and 6 hours after treatment. (C) An LC chromatogram of carotenoid extract obtained from 10 μ L of the transport buffer prepared to be 0.5 mg/mL carotenoid extract. The peaks in the chromatogram were identified with external standards corresponding to each peak (Kim et al., 2020).

din, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin 계열 안토시아닌들의 Caco-2 세포 단층막 투과도 분석 연구에서는 30분~6시간 반응시간 동안 0.005~4.9%의 투과율을 보

Fig. 3. A schematic plot of Papp values of anthocyanin extract with Papp values of two standard markers atenolol and propranolol in the monolayer permeability.

였다(Kamiloglu 등, 2015; Yi 등, 2006). 본 연구에서 얻어진 분석결과를 상대적인 투과율로 계산해보면, 1시간은 0.07%, 2시간은 0.75%, 4시간은 4.50%, 6시간은 7.43%의 투과율을 보였다. 추출물에 포함된 안토시아닌의 종류에 따라 그 흡수율이 다르다는 관점에서 Fig. 2B의 크로마토그램에서 보이는 7종의 peonidin 계열의 안토시아닌과 5종의 cyanidin 계열의 안토시아닌 성분 총 12종을 성분별로 상대적 투과율을 계산하였다(Table 1). 그 결과 6시간 동안 누적된 투과량을 분석하면 peonidin이나 cyanidin 계열의 종류와는 상관없이 *p*-hydrobenzoic acid나 ferulic acid가 결합한 안토시아닌 성분보다는 caffeic acid가 결합한 안토시아닌 성분들(6~12)의 투과율이 유의적으로 높았다. Caffeic acid가 benzoic acid나 ferulic acid, coumaric acid보다 높은 투과율을 보인다는 기존의 연구결과들(Konishi와 Kobayashi, 2004; Redan 등, 2017)을 바탕으로 안토시아닌 화학 구조상 peonidin이나 cyanidin 모핵에 결합한 당에 치환된 caffeic acid가 Caco-2 세포 단층막 투과율을 높이는 데 기여한다고 추정할 수 있다.

Table 1. Relative permeabilities of twelve anthocyanins on the Caco-2 cell monolayer

Incubation time (h)	Anthocyanins in purple sweet potato												Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	0.20±0.03 ^a	0.11±0.02 ^b	0.08±0.00 ^b	0.11±0.01 ^b	0.07±0.01 ^b	0.11±0.00 ^b	0.04±0.01 ^c	0.08±0.00 ^b	0.10±0.00 ^b	0.06±0.00 ^{bc}	0.06±0.01 ^{bc}	0.07±0.01 ^{bc}	0.07±0.01 ^b
2	0.90±0.10 ^a	0.88±0.04 ^a	0.90±0.03 ^a	0.85±0.10 ^a	0.80±0.03 ^a	0.63±0.06 ^{bc}	0.66±0.03 ^b	0.84±0.05 ^a	0.60±0.60 ^{bc}	0.18±0.01 ^a	0.71±0.03 ^b	0.58±0.03 ^c	0.75±0.03 ^{ab}
4	4.77±0.19 ^b	4.27±0.08 ^c	5.20±0.18 ^a	4.34±0.39 ^{bc}	4.09±0.10 ^{cd}	3.41±0.07 ^e	3.97±0.13 ^d	4.64±0.07 ^b	3.56±0.16 ^e	4.08±0.26 ^{cd}	4.78±0.11 ^b	4.10±0.18 ^{cd}	4.50±0.12 ^b
6	5.67±0.10 ^f	6.08±0.02 ^e	6.94±0.10 ^{cd}	6.33±0.26 ^{de}	5.74±0.04 ^f	8.49±0.14 ^a	8.22±0.02 ^a	6.92±0.03 ^d	7.16±0.01 ^e	8.14±0.04 ^a	8.25±0.10 ^a	7.68±0.03 ^b	7.43±0.07 ^b

Values are expressed as mean±SD. The relative permeability (%) was calculated as (basal concentration/ initial apical concentration) × 100. Twelve peaks (1~12) of Fig. 2A were identified as follows: 1, peonidin 3-sophoroside-5-glucoside; 2, cyanidin 3-*p*-hydroxybenzoyl sophoroside-5-glucoside; 3, peonidin 3-*p*-hydroxybenzoyl sophoroside-5-glucoside; 4, cyanidin 3-(6"-feruloyl sophoroside)-5-glucoside; 5, peonidin 3-(6"-feruloyl sophoroside)-5-glucoside; 6, cyanidin 3-(6"-dicaffeoyl sophoroside)-5-glucoside; 7, cyanidin 3-caffeoyl-*p*-hydroxybenzoyl sophoroside-5-glucoside; 8, cyanidin 3-(6"-caffeoyl-6-feruloyl sophoroside)-5-glucoside; 9, peonidin 3-caffeoyl sophoroside-5-glucoside; 10, peonidin 3-(6"-dicaffeoyl sophoroside)-5-glucoside; 11, peonidin 3-caffeoyl-*p*-hydroxybenzoyl sophoroside-5-glucoside; 12, peonidin 3-(6"-caffeoyl-6"-feruloyl sophoroside)-5-glucoside (Kim et al., 2020). The values represented by small letters ($P < 0.05$) were considered significantly different between the groups.

일반적으로 안토시아닌 성분들은 대체로 Fig. 4처럼 paracellular transport로 수송되는 것으로 알려져 있다(Kalt 등, 2008; Talavéra 등, 2005). 최근에 지속적인 고지방식이 장관막 integrity 변화와 장내 세균 불균형을 일으키고 불안정한 redox 상태의 물질 투과도를 높이는 paracellular transport 증가를 유도하는데, 안토시아닌 성분이 이런 비정상적인 수송 증가를 차단하고 결과적으로 항비만 효능을 나타낸다는 연구결과가 발표되었다(Cremonini 등, 2019). 본 연구팀의 이전 연구에서도 고지방식으로 유도한 비만 생쥐에 투여한 자색고구마 안토시아닌 추출물이 체중증가를 줄였고, 4배 이상 증가한 중성지방을 약 50% 줄였다(Kim 등, 2020).

카로티노이드 추출물의 단층막 투과성 측정

카로티노이드 추출물을 0.5 mg/mL의 최종 농도로 정단부에 처리한 후 0시간(control)(Fig. 2C)과 2, 4, 6시간에 기저부에서 10 μ L를 취하여 세포 단층막 투과도를 측정하였다. 그 결과 6시간까지 HPLC-DAD의 측정범위 내 기저부에서 카로티노이드 성분이 검출되지 않았다. 한편, 추출물의 형태가 아닌 카로티노이드 단일성분을 투여한 연구에서는 투여 후 16시간까지 β -carotene과 cryptoxanthin의 세포 단층막 투과율을 분석하였고, 그 결과 각각 4.24%와 3.46%의 상대적인 투과율을 보였다고 한다(O'Sullivan 등, 2007). 카로티노이드 추출물을 사용한 본 연구에서는 추출물의 낮은 용해도로 인해 투여량을 0.5 mg/mL 이상 증가시키는데 한계가 있었고 투여 후 측정시간을 6시간으로 한정하였기에 이러한 차이가 발생하였다고 본다. 향후 카로티노이드 추출물에 대한 투과도 측정 시 생체 내에서의 유효작용과 같은 유사한 상황을 적용하는 방법 등으로 용해도를 더 증가시키고 투여 후 측정시간을 늘려서 관찰하는 것이 필요하다. 카로티노이드의 장관막 투과 생체이용률에 대해서는 주로 β -carotene 대사와 관련하여 rodents, ferret, Mongolian gerbil, 어린송아지 반추위 등의 많은 *in vivo* 동물 모델에서 연구되었으며, 이 경우 아주 낮은 투과율을 보였다(van Vliet, 1996). 카로티노이드 성분은 일반적으로 세포형단수송으로 세포막에 흡수 후 80%가 골지체(golgi apparatus)를 거치면서 킬로미크론(chylomicron)이라는 vesicle(enterocyte)의 형태로 만들어져 단층막 기저부로 전달되는 것으로 알려져 있다(During 등, 2002). 킬로미크론은 중성지방(85~92%)과 인지질(6~12%), 콜레스테롤(1~3%), 단백질(1~2%)로 구성되어 체내 각 기관에 지방질을 전달하는 것으로 알려져 있다(Rahmany와 Jialal, 2021). 따라서 일반적으로 카로티노이드 성분의 체내 흡수율을 높이기 위해 식물성 기름과 함께 섭취하는 것을 권장하고 있다.

실제로 본 연구팀의 이전 연구에서도 고지방식으로 유도한 비만생쥐에 고구마 카로티노이드 추출물을 올리브오일에 섞어 투여하였고, 그 결과 체중조절과 고지방식이에 의해 증가한 중성지방을 줄였다(Kim 등, 2020). 이상의 연구결과

Fig. 4. A schematic image of the transwell and its filter membrane with a well-grown Caco-2 intestinal epithelial monolayer, representing passive transports of anthocyanin and carotenoid extracts.

를 종합해보면 카로티노이드 추출물의 Caco-2 상피세포 단층막 *in vitro* 투과도는 투여 후 6시간 이내에서는 매우 낮지만, 실제로 실생활에서 식물성 기름과 잘 섞인 micelle 형태로 섭취하게 된다면 생체 내에서의 침액과 담즙산 등의 유화작용과 함께 킬로미크론 형태로 기저막에 잘 흡수가 될 것이라는 점을 시사한다(Fig. 4). 따라서 다른 고구마품종보다 카로티노이드 성분의 함량이 높은 신향미 고구마 조리방법에 대하여 다각도로 고려해볼 필요가 있다.

요 약

신자미 자색고구마의 안토시아닌 추출물과 신향미 황색고구마의 카로티노이드 추출물의 장관막 투과도를 알아보기 위하여 Caco-2 상피세포를 이용하였다. Caco-2 세포에 대해 안토시아닌과 카로티노이드 추출물들의 세포독성을 확인하여 세포독성이 관찰되지 않은 10 mg/mL와 0.5 mg/mL 농도에서 각각의 단층막 투과도 실험을 진행하였다. Caco-2 세포가 transwell에 단층막을 형성하도록 25일 동안 배양하였고, 투과도 측정에 적합한 *in vitro* 실험모델인지를 검증하기 위해 lucifer yellow와 atenolol, propranolol을 처리하여 단층막의 integrity를 분석하였다. 그 결과 lucifer yellow는 0.53%, atenolol의 투과계수는 $(6.01 \pm 0.09) \times 10^{-7}$ cm/s, propranolol의 투과계수는 $(2.26 \pm 0.00) \times 10^{-5}$ cm/s로 단층막의 integrity가 잘 형성되었음을 확인하였다. 고구마 색소 추출물의 단층막 투과도는 신자미 고구마로부터 얻은 안토시아닌 추출물의 경우, 처리 후 1, 2, 4, 6시간에서 각각 0.31×10^{-6} , 1.57×10^{-6} , 4.69×10^{-6} , 5.16×10^{-6} cm/s의 투과계수를 보였다. 추출물 중 12종의 주요 안토시아닌 성분들 각각의 투과율을 비교해보면, benzoic acid나 ferulic acid가 결합되어 있는 안토시아닌 성분보다 caffeic acid가 결합되어 있는 안토시아닌 성분들의 투과율이 높았다. 이

러한 결과는 안토시아닌의 화학 구조상 peonidin이나 cyanidin 모핵에 결합한 당에 치환된 caffeic acid가 Caco-2 세포 단층막 투과율을 높이는 데 기여하는 것으로 볼 수 있다. 신향미 고구마로부터 얻은 카로티노이드 추출물은 처리 후 6시간까지 측정범위 내에서 카로티노이드 성분이 검출되지 않았다. 향후 카로티노이드 추출물에 대한 투과도 분석에서는 생체 내에서의와 같은 유사한 상황을 적용하여 용해도를 최대한 증가시키거나 투과도 관찰 시간을 늘리는 등의 방법으로 반응시간에 따른 차이를 분석해볼 필요가 있다.

감사의 글

이 논문은 농촌진흥청의 차세대바이오그린21사업(PJ01318402)과 한국여성과학기술인지원센터(WISET, 2020-226) 및 2021년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. 2021R111A4A0105729511)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

REFERENCES

- Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I : A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci.* 1990. 79:476-482.
- Chen X, Slättengren T, de Lange ECM, Smith DE, Hammarlund-Udenaes M. Revisiting atenolol as a low passive permeability marker. *Fluids Barriers CNS.* 2017. 14:30. <https://doi.org/10.1186/s12987-017-0078-x>
- Cheng M, Zhang X, Cao J, Zheng X, Zhang Z. Caco-2 cell transport of purple sweet potato anthocyanins-phospholipids complex. *J Food Sci Technol.* 2018. 55:304-312.
- Cremonini E, Daveri E, Mastaloudis A, Adamo AM, Mills D, Kalanetra K, et al. Anthocyanins protect the gastrointestinal tract from high fat diet-induced alterations in redox signaling, barrier integrity and dysbiosis. *Redox Biol.* 2019. 26:101269.

- <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101269>
- Cypotex. Caco-2 Permeability Assay. 2021 [cited 2020 Dec 5]. Available from: <https://www.cypotex.com/admepk/in-vitro-permeability/caco-2-permeability>
- During A, Hussain MM, Morel DW, Harrison EH. Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells: β -carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. *J Lipid Res.* 2002. 43: 1086-1095.
- Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients.* 2014. 6:466-488.
- Giuliano AR, Wood RJ. Vitamin D-regulated calcium transport in Caco-2 cells: unique *in vitro* model. *Am J Physiol.* 1991. 260:G207-G212.
- Grès MC, Julian B, Bourrié M, Meunier V, Roques C, Berger M, et al. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharm Res.* 1998. 15:726-733.
- Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc.* 2007. 2:2111-2119.
- Kalt W, Blumberg JB, McDonald JE, Vinqvist-Tymchuk MR, Fillmore SAE, Graf BA, et al. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *J Agric Food Chem.* 2008. 56:705-712.
- Kamiloglu S, Capanoglu E, Grootaert C, Van Camp J. Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal caco-2 cells—A review. *Int J Mol Sci.* 2015. 16:21555-21574.
- Katayama K, Kobayashi A, Sakai T, Kuranouchi T, Kai Y. Recent progress in sweetpotato breeding and cultivars for diverse applications in Japan. *Breed Sci.* 2017. 67:3-14.
- Kim HJ, Koo KA, Park WS, Kang DM, Kim HS, Lee BY, et al. Anti-obesity activity of anthocyanin and carotenoid extracts from color-fleshed sweet potatoes. *J Food Biochem.* 2020. 18:e13438. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13438>
- Kim HJ, Park WS, Bae JY, Kang SY, Yang MH, Lee S, et al. Variations in the carotenoid and anthocyanin contents of Korean cultural varieties and home-processed sweet potatoes. *J Food Compos Anal.* 2015. 41:188-193.
- Klunder LJ, Faber KN, Dijkstra G, van IJzendoorn SCD. Mechanisms of cell polarity—Controlled epithelial homeostasis and immunity in the intestine. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016. 9:a027888. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027888>
- Konishi Y, Kobayashi S. Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem.* 2004. 52:2518-2526.
- Kratz JM, Teixeira MR, Koester LS, Simões CM. An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay. *Braz J Med Biol Res.* 2011. 44:531-537.
- Luo H, Lv XD, Wang GE, Li YF, Kurihara H, He RR. Anti-inflammatory effects of anthocyanins-rich extract from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) on croton oil-induced ear edema and *Propionibacterium acnes* plus LPS-induced liver damage in mice. *Int J Food Sci Nutr.* 2014. 65:594-601.
- Marques C, Fernandes I, Meireles M, Faria A, Spencer JPE, Mateus N, et al. Gut microbiota modulation accounts for the neuroprotective properties of anthocyanins. *Sci Rep.* 2018. 8:11341. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29744-5>
- O'Sullivan L, Ryan L, O'Brien N. Comparison of the uptake and secretion of carotene and xanthophyll carotenoids by Caco-2 intestinal cells. *Br J Nutr.* 2007. 98:38-44.
- O'Sullivan SM, Woods JA, O'Brien NM. Use of Tween 40 and Tween 80 to deliver a mixture of phytochemicals to human colonic adenocarcinoma cell (Caco-2) monolayers. *Br J Nutr.* 2004. 91:757-764.
- Pinto M, Robineleon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, et al. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell.* 1983. 47:323-330.
- Rahmany S, Jialal I. *Biochemistry, Chylomicron.* 2021 [cited 2020 Dec 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545157/>
- Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res.* 2007. 55:207-216.
- Redan BW, Albaugh GP, Charron CS, Novotny JA, Ferruzzi MG. Adaptation in Caco-2 human intestinal cell differentiation and phenolic transport with chronic exposure to blackberry (*Rubus* sp.) extract. *J Agric Food Chem.* 2017. 65:2694-2701.
- Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie.* 1986. 68:1035-1040.
- Shin MY, Lee WY. Optimization of the cold-air-drying condition for a steamed pumpkin-sweet potato slab. *Korean J Food Preserv.* 2011. 18:488-496.
- Sontakke SB, Jung JH, Piao Z, Chung HJ. Orally available collagen tripeptide: Enzymatic stability, intestinal permeability, and absorption of Gly-Pro-Hyp and Pro-Hyp. *J Agric Food Chem.* 2016. 64:7127-7133.
- Souba WW, Copeland EM. Cytokine modulation of Na⁺-dependent glutamine transport across the brush border membrane of monolayers of human intestinal Caco-2 cells. *Ann Surg.* 1992. 215:536-545.
- Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta.* 2005. 1740:101-107.
- Strack D, Wray V. The anthocyanins. In: Harborne JB, editor. *The Flavonoids: Advances in Research since 1986.* Chapman & Hall, London, UK. 1994. p 1-22.
- Suda I, Oki T, Masuda M, Nishiba Y, Furuta S, Matsugano K, et al. Direct absorption of acylated anthocyanin in purple-fleshed sweet potato into rats. *J Agric Food Chem.* 2002. 50: 1672-1676.
- Sumsakul W, Na-Bangchang K. Permeability of plumbagin across human intestinal cell *in vitro*. *Arch Pharm Res.* 2016. 39:380-389.
- Talavéra S, Felgines C, Texier O, Besson C, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL, et al. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J Agric Food Chem.* 2005. 53:3902-3908.
- van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2005. 1:175-185.
- van Vliet T. Absorption of β -carotene and other carotenoids in humans and animal models. *Eur J Clin Nutr.* 1996. 50:S32-S37.
- Yamaura Y, Chapron BD, Wang Z, Himmelfarb J, Thummel KE. Functional comparison of human colonic carcinoma cell lines and primary small intestinal epithelial cells for investigations of intestinal drug permeability and first-pass metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2016. 44:329-335.
- Yazdani M, Glynn SL, Wright JL, Hawi A. Correlating partitioning and caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. *Pharm Res.* 1998. 15: 1490-1494.
- Yi W, Akoh CC, Fischer J, Krewer G. Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by Caco-2 human intestinal cell

- monolayers. *J Agric Food Chem.* 2006. 54:5651-5658.
- Zhao YH, Le J, Abraham MH, Hersey A, Eddershaw PJ, Luscombe CN, et al. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. *J Pharm Sci.* 2001. 90:749-784.
- Zheng W, Wang SY. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J Agric Food Chem.* 2003. 51:502-509.