지방세포와 대식세포의 동시배양에서 구아바 가지 추출물의 항비만 활성

김윤정* · 최정민* · 김영화

경성대학교 식품생명공학과

Anti-Obesity Activity of Guava Branch Extract in the Co-Culture System of Adipocytes and Macrophages

Yoonjeong Kim*, Jung-Min Choi*, and Younghwa Kim

Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Sung University

ABSTRACT Obesity has become a prevalent health problem worldwide. In this study, the phytochemicals in guava branches were identified by using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-TOF-MS). Also, the anti-obesity and anti-inflammatory activities of guava branch extracts were investigated in 3T3-L1 adipocytes and RAW264.7 macrophages. The guava branches were extracted with 100% ethanol (E100), and water at 95°C or 80°C. A total of 15 compounds, including catechin, gallic acid, and quercetin, were tentatively identified in the guava branches. The cell viability was determined by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay and no cytotoxic effect was observed for all tested extracts in both cell lines. In addition, the E100 extract greatly suppressed lipid accumulation in the 3T3-L1 adipocytes. Treatment with E100 extract showed the most effective inhibition of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages. We also found that E100 extract markedly decreased NO production by about 78% compared to the LPS-only treated group in the co-culture system of adipocytes and macrophages. Therefore, these results suggest that guava branch extracts may be useful for preventing obesity.

Key words: guava branch extract, anti-obesity, anti-inflammatory, co-culture, nitric oxide

서 론

비만은 유전적 요인, 신체활동의 감소 및 식생활의 서구화로 인해 전 세계적으로 흔하게 발생하는 만성질환 중 하나로, 에너지의 섭취와 소비가 균형을 이루지 못하여 체내에 지방조직이 과잉 축적되어 건강에 악영향을 주는 질병을 의미한다(WHO, 2000; Kopelman, 2000). 체내에 과도하게 축적된 지방조직은 심혈관질환, 고지혈증, 제2형 당뇨병 및 고혈압 등 다양한 만성질환을 유발하는 원인으로 밝혀지고 있다(Visscher와 Seidell, 2001). 뿐만 아니라 비만은 염증 신호 전달 경로 활성화에 의한 만성염증 반응과도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Wellen과 Hotamisligil, 2003). 비만 상태에서는 지방조직에 다량 축적된 지방에 의해 지방세포의 크기가 커지고, 커진 지방세포 내로 대식세포

의 침윤이 증가한다(Nishimura 등, 2008). 또한 염증성 케모카인의 일종인 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)은 대식세포가 지방조직으로 침윤되는 것을 유도하고, 침윤된 대식세포는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), nitric oxide(NO) 등의 염증성 사이토카인 분비를 증가시켜 지방조직의 염증을 촉진하고 비만 상태를 악화시킨다(Kim 등, 2014; Wellen과 Hotamisligil, 2003).

구아바(*Psidium guajava* L.)는 guava, guayabo 또는 kuawa라고 불리는 도금양과(*Myrtaceae*)에 속하는 아열대성 식물로, 구아바의 여러 부분들은 예로부터 상처, 궤양 및 콜레라와 같은 질병을 치료하기 위한 민간요법으로 사용되어 왔다. 구아바 나무의 껍질은 어린이의 설사 치료에 효과적인 것으로 알려져 있으며, 구아바의 잎은 경련과 복부 팽

Received 1 October 2021; Revised 26 October 2021; Accepted 26 October 2021

Corresponding author: Younghwa Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Sung University, 309, Suyeong-ro, Nam-gu, Busan 48434, Korea, E-mail: younghwakim@ks.ac.kr

Author information: Yoonjeong Kim (Graduate student), Jung-Min Choi (Professor), Younghwa Kim (Professor)

*These authors contributed equally to this work.

© 2022 The Korean Society of Food Science and Nutrition.

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.

만의 완화에 이용되고, 구아바 잎의 70% 에탄올 추출물은 lipopolysaccharide(LPS)로 유도된 대식세포에서 NO 생성을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다(Begum 등, 2002; Lee와 Kim, 2018; Lozoya 등, 2002). 미국 FDA에서는 2003년에 구아바 잎 추출물을 “Everything Added to Food in the United States” 목록에 정식으로 등재하여 식품으로 안전하게 사용될 수 있다고 명시하였으며(Jo 등, 2009), 우리나라 식품의약품안전처는 구아바 잎 추출물을 혈당 억제 효과를 가진 기능성 원료로 인정하였다(MFDS, 2021). 또한 구아바의 과실에는 myricetin, apigenin, ellagic acid, anthocyanin 등의 페놀성 화합물과 비타민 C, carotenoid 등의 함량이 높은 것으로 알려져 있으며, 이로 인해 고혈당 억제, 지사, 해열, 항균, 항돌연변이 및 항산화 등의 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(Arima와 Danno, 2002; Mercadante 등, 1999; Mian과 Mohamed, 2001; Misra와 Seshadri, 1968). 이와 같이 구아바의 잎과 열매의 다양한 생리활성 성분과 항산화 및 항염증 효과에 대한 연구는 보고되어 있으나, 구아바 가지에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 구아바 가지의 항비만 활성을 탐색하기 위하여 3T3-L1 지방세포와 RAW264.7 대식세포의 동시배양을 통해 항비만 및 항염증 작용을 확인하여 천연 항비만 소재로서의 활용 가능성을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

본 실험에 사용한 구아바 가지는 충청북도 음성군 한국 구아바 경원농장에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 bovine serum(BS), penicillin, streptomycin, phosphate buffered saline(PBS), Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 및 fetal bovine serum(FBS)은 Welgene사(Daegu, Korea)에서 구입하였다. Insulin, isobutylmethylxanthine(IBMx), dexamethasone, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), oil red-O, Griess reagent, LPS, sodium nitrite 등 세포 실험에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry(LC-Q-TOF-MS) 분석을 위한 acetonitrile, water 등의 이동상 및 추출용매는 HPLC 등급(Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였다.

추출물 제조

본 실험에 사용한 추출물을 제조하기 위하여 구아바 가지를 증류수로 깨끗이 수세하여 물기를 제거한 후 동결건조하였다. 그 후 분쇄기로 구아바 가지를 분쇄하여 분말 2 g에 에탄올 30 mL를 가하여 45°C 이하에서 12시간 동안 교반하여 추출하였고, 여과지(Advantec No. 2, Tokyo, Japan)

를 사용하여 추출액을 여과한 후 동결건조하였다. 또한 열수 추출물을 제조하기 위하여 구아바 가지 분말 2 g에 증류수 30 mL를 넣어 2시간 동안 95°C 또는 80°C에서 중탕으로 추출하여 여과한 후 동결건조하였다. 동결건조한 추출액의 잔사는 100 mg/mL의 농도가 되도록 DMSO에 재용해하였고, 이를 -20°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

구아바 가지의 LC-Q-TOF-MS 분석

추출물에 존재하는 화합물의 정성 분석은 electro-spray ionization(ESI), Agilent 1260 Infinity II 시리즈(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)와 Agilent 6530 Q-TOF 질량 분석기(Agilent Technologies)를 통해 진행하였다. 컬럼은 Zorbax Eclipse XDB-C18(4.6 mm×50 mm, 1.8 µm, Agilent Technologies)을 사용하였고, 이동상은 용매 A(0.1% formic acid in water) 및 용매 B(0.1% formic acid in acetonitrile)로 구성되어 20분간(0~0.5분 2% B, 0.5~10분 100% B, 10~13분 100% B, 13~14분 2% B 및 14~20분 2% B) 0.5 mL/min 유속으로 1 µL를 주입하여 분석하였다. 추출물은 매개변수(mass range 20~1,500 m/z, collision energy 0 V, gas temperature 300°C, drying gas 10 L/min, nebulizer 45 psi, sheath gas temperature 300°C, sheath gas flow 12 L/min, capillary 4,000 V, fragmentor 150 V, oct 1 RF 750 V)를 사용하여 positive 및 negative ms scan mode로 분석하였으며, 표준물질은 gallic acid, catechin, quercetin, shikimic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid를 1 ppm으로 희석한 mixture를 사용하였다. 데이터 처리는 Agilent Mass Hunter 10.0 software를 통해 진행하였고 METLIN database(Version B 08.00, Agilent Technologies)를 바탕으로 물질을 식별하였다.

3T3-L1 세포배양 및 분화유도

3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기(BB15, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 배양하였다. 세포배양을 위한 배지는 10% BS, 100 units/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin이 첨가된 DMEM을 사용하였다. 3T3-L1 세포의 분화를 유도하기 위하여 6-well plate에 1×10⁵ cells/well로 seeding한 후 confluent 상태가 되면 10% FBS, 1 µg/mL 인슐린, 0.5 mM IBMx 및 1 µM dexamethasone이 포함된 DMEM 배지로 교체하였다. 배지는 2일 후 10% FBS와 1 µg/mL 인슐린이 함유된 DMEM으로 교환하였으며, 분화 유도 4일째 10% FBS DMEM으로 교환하여 성숙한 지방세포로 분화시켰다.

RAW264.7 대식세포의 세포배양

RAW264.7 대식세포는 한국세포주은행(Korea Cell Line

Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 배양기에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 세포는 10% FBS, 100 unit/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 10 mm tissue culture dish에서 배양하였다.

세포생존율 평가

3T3-L1 cell과 RAW264.7 cell의 세포 생존율은 Green 등(1984)의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 3T3-L1 세포와 RAW264.7 세포를 96-well plate에 분주하여 24시간 배양 후 배지에 구아바 추출물을 함께 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양한 plate의 각 well에 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 10 µL 가하여 4시간 동안 배양한 후 상층액을 제거하고 100 µL의 DMSO를 각 well에 첨가하여 formazan을 용해시켜 550 nm에서 ELISA reader(Thermo Scientific Ltd., Lafayette, CO, USA)로 흡광도를 측정하였다.

3T3-L1 세포에서의 지방구 축적 측정

3T3-L1 지방세포에서 추출물의 지방축적 억제 효과를 확인하기 위해 oil red-O 염색법으로 실험하였다. 6-well plate에서 배지를 제거하고 PBS로 세포를 세척한 후, 4% formaldehyde 용액을 각 well마다 1 mL씩 첨가하여 5분 동안 방치하였다. 그 후 PBS에 희석된 4% formaldehyde 용액 1 mL로 교체하여 1시간 이상 세포를 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 3회 세척한 후 0.3% oil red-O 염색액을 각 well에 500 µL를 분주하여 10분간 염색하였다. 염색액을 제거한 후 증류수를 이용하여 4번 세척한 후 1시간 동안 자연 건조하였다. 이후 세포의 지방구를 현미경으로 관찰하였고, isopropanol 500 µL를 첨가하여 지방구에 염색된 염료를 완전히 녹여내 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RAW264.7 대식세포에서의 NO 측정

RAW264.7 대식세포에서 생성된 NO의 양은 Green 등(1982)의 방법으로 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 RAW264.7 세포를 분주하여 37°C에서 5% CO₂ 조건의 배양기에서 6시간 동안 배양한 후, 추출물과 LPS 1 µg/mL를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. 그 후 상층액에 동량의 Griess reagent를 첨가하여 37°C, 10분간 반응시킨 후 ELISA reader를 통해 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성량은 sodium nitrite로 표준곡선을 작성하여 산출하였다.

3T3-L1 지방세포와 RAW264.7 대식세포의 동시배양 및 NO 측정

3T3-L1 지방세포와 RAW264.7 대식세포의 동시배양은 transwell(Costar Corning Inc., Corning, NY, USA)을 사용하였다. RAW264.7 대식세포는 0.4 µm의 다공성 막이

있는 transwell의 upper chamber에 처리하였고, 3T3-L1 지방세포는 lower chamber에서 분화시킨 후 혈청이 없는 DMEM을 첨가하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 동시배양한 세포를 수집하였고, 대조군으로 동시배양과 동일한 수의 3T3-L1 및 RAW264.7 세포를 배양하여 앞서 설명한 방법으로 NO 생성량을 측정하였다.

통계분석

실험 결과는 3회 반복 실험을 통해 얻어진 값으로 평균과 표준편차를 구하였다. 유의성 검정을 위해 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하였고, SAS version 9.4(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 실시하였다.

결과 및 고찰

구아바 가지 추출물의 성분 분석

본 연구에서는 구아바 가지의 생리활성 물질을 확인하기 위해 구아바 가지 생것에 에탄올을 첨가한 후 30분간 초음파 추출을 진행하여 Díaz-de-Cerio 등(2016)에서 동정된 페놀계 화합물을 참고하여 LC-Q-TOF-MS의 분석 결과를 METLIN database로 확인하였고, 분석 결과를 total ion chromatogram으로 나타내었다(Fig. 1). 그 결과 negative와 positive mode에서 각각 12가지, 6가지의 물질이 확인되었다(Table 1). Negative mode에서는 shikimic acid, gallic acid, (+)-gallo catechin, catechin, isoscutellarein, (-)-naringenin, positive mode에서는 hyperin, guaijaverin, quercetin 등의 플라보노이드 화합물이 검출되었다. 또한 uralenneoside, quercetin 3-(2"-galloyl- α -L-arabinopyranoside), patuletin 3-(6"-*p*-coumaroylglucoside)는 두 가지 mode에서 모두 확인되었다. 이전 연구에서 구아바 잎 추출물에는 quercetin, hyperin, catechin 등의 생리활성 기능을 가지는 화합물이 검출되었다고 보고하였으며(Díaz-de-Cerio 등, 2016), 구아바 열매 추출물에는 gallo catechin, catechin, procyanidin dimers 등 21가지의 페놀계 화합물이 ultra performance liquid chromatography(UPLC)-ESI-Q-TOF-MS를 통해 확인되었다(Liu 등, 2020). 또한 Jang 등(2014)의 연구에 따르면 구아바 잎 추출물에서 gallic acid, (+)-catechin 등 11가지의 플라보노이드 화합물이 UPLC-ESI-MS/MS를 통해 확인되었다. 천연 식물에 널리 존재하는 페놀계 화합물은 phenolic hydroxyl 그룹에 의해 단백질 등 거대 분자들이 결합하여 항산화, 항염, 항비만 등의 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Cha 등, 1999). 뿐만 아니라 폴리페놀 화합물의 일종인 플라보노이드는 일반적으로 당과 함께 결합된 배당체 형태로 식품 내에 존재하며, quercetin, kaempferol, myricetin 등의 플라보노이드는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 항돌연변이와 항암 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(Hertog 등,

Fig. 1. Total ion chromatogram (TIC) of the *Pisidium guajava* branch ethanol extract by LC-Q-TOF-MS in negative (A) and positive ion mode (B). Shikimic acid (1), gallic acid (2), 3,4-dihydroxybenzoic acid (3), (+)-gallocatechin (4), procyanidin B₃ (5), uralenneoside (6), catechin (7), myricetin 3'-O-(6"-p-coumaroyl) glucoside (8), quercetin 3-(2"-galloyl- α -L-arabinopyranoside) (9), patuletin 3-(6"-p-coumaroyl)glucoside (10), isocutellarein (11), (-)-naringenin (12), hyperin (13), guaijaverin (14), quercetin (15).

1992). 따라서 구아바 가지의 에탄올 추출물에서 확인된 다양한 페놀성 화합물은 항산화, 항염증, 항비만 등의 생리활성 기능에 대한 연구에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

구아바 가지 추출물의 항비만 및 항염증 활성

본 연구에서는 구아바 가지 추출물의 항비만 활성을 확인하기 위해 분화된 3T3-L1 세포에서 MTT assay를 통한 시료의 세포독성과 oil red-O 염색법을 이용한 지방구의 축적을 평가하였다. 3T3-L1 세포에 구아바 가지 추출물 100 μ g/mL를 24시간 동안 처리한 후 MTT 실험을 진행한 결과 모든 추출물에서 대조군보다 높거나 유사한 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 2A). Preadipocyte 형태인 3T3-L1 세포는 insulin, dexamethasone 및 IBMX와 같은 호르몬에 의해 adipocyte로 분화하는 특징을 가지고 있어 지방세포 분화 과정에 대한 연구에 많이 사용되어 왔다(Ailhaud 등, 1992; Boney 등, 1994; Elks와 Manganiello, 1985; MacDougald 등, 1995). 본 연구에서는 3T3-L1 세포가 adipocyte로 분화하는 과정에서 구아바 가지 추출물이 지방세포 내의

지방구 축적과 관련이 있는지 확인하기 위해 지방구의 중성 지방을 붉은색으로 염색하는 oil red-O 염색을 실시하였다(Fig. 2B). 붉은색으로 염색된 지방구를 현미경으로 관찰한 결과 100% 에탄올 추출물에서 지방구의 형성이 95°C 및 80°C 열수 추출물에 비해 감소하는 양상을 나타내었다. 지방구에 염색된 염색시약을 isopropanol에 용해하여 지방구의 형성 정도를 정량한 결과, 세 가지 추출물 모두 대조군과 비교하여 유의적으로 지방구의 축적을 억제하는 것을 확인하였다. 특히 100% 에탄올 추출물에서 50.266%로 나타나 추출물 중 지방구의 축적을 가장 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. Kim 등(2011)의 연구에 따르면 천년초의 지방 축적 억제능은 열수 추출물보다 80% 에탄올 추출물이 더 효과적인 것으로 나타났으며, Oh 등(2015)의 연구에서는 400 μ g/mL 농도에서 연꽃의 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 지방축적량이 더 낮은 것으로 나타나 본 연구와 유사한 경향을 보여주었다.

구아바 가지 추출물의 항염증 활성은 RAW264.7 대식세포에서 시료의 세포독성과 NO 생성 억제능을 통해 확인하였

Table 1. Identified in ethanol extracts of guava branch using LC-Q-TOF-MS in negative and positive mode

Mode	Putative identification	Rt (min) ¹⁾	Molecular Formula	m/z calculated ²⁾	m/z observed ³⁾	ppm (error)
Negative mode	Shikimic acid	1.303	C ₇ H ₁₀ O ₅	173.0455	173.0457	0.34
	Gallic acid	4.041	C ₇ H ₆ O ₅	169.0142	169.0139	-1.76
	3,4-Dihydroxybenzoic acid	4.726	C ₇ H ₆ O ₄	153.0193	153.0191	-0.97
	(+)-Gallocatechin	4.819	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305.0667	305.0662	-2.96
	Procyanidin B ₃	5.090	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1351	577.1333	-2.94
	Uralennoeside	5.107	C ₁₂ H ₁₄ O ₈	285.0616	285.0614	-0.79
	Catechin	5.395	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0718	289.0713	-1.99
	Myricetin 3'-O-(6"- <i>p</i> -coumaroyl) glucoside	6.434	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₅	625.1199	625.1186	-2.78
	Quercetin 3-(2"-galloyl- α -L-arabinopyranoside)	6.535	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₅	585.0886	585.0881	-0.68
	Patuletin 3-(6"- <i>p</i> -coumaroylglucoside)	6.759	C ₃₁ H ₂₈ O ₁₅	639.1355	639.1342	-2.14
	Isoscutellarein	7.926	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0405	285.0399	-1.04
	(-)-Naringenin	10.031	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0612	271.0605	-2.52
Positive mode	Uralennoeside	1.016	C ₁₂ H ₁₄ O ₈	287.0761	309.0580	-0.32
	Hyperin	6.004	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1028	476.0950	1.79
	Guaijaverin	6.219	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	435.0922	435.0905	-3.55
	Quercetin	6.294	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.0499	303.0501	0.73
	Quercetin 3-(2"-galloyl- α -L-arabinopyranoside)	6.542	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₅	587.1031	587.1043	2.93
	Patuletin 3-(6"- <i>p</i> -coumaroylglucoside)	6.771	C ₃₁ H ₂₈ O ₁₅	641.1501	641.1506	2.29

¹⁾Rt: Retention time in minutes.²⁾m/z calculated: m/z calculated by software.³⁾m/z observed: m/z observed in experiment.

다. RAW264.7 세포의 세포 생존율은 MTT assay를 통해 확인하였으며, 대조군과 비교하여 모든 추출물이 100 μ g/mL의 농도에서 독성을 나타내지 않았다(Fig. 3A). RAW 264.7 대식세포에서 구아바 가지의 세 가지 추출물의 LPS 자극에 의한 NO 생성을 확인한 결과, LPS를 처리한 군은 7.235 μ M로 대조군보다 약 9배 이상 증가하였지만, 세 가지 추출물 모두 LPS 자극에 의한 NO 생성을 유의적으로 억제하였다. 특히 100% 에탄올 추출물의 NO 생성은 2.541 μ M

로 세 가지 추출물 중 가장 효과적으로 NO의 생성을 억제하여 항염증 활성이 가장 우수한 것으로 판단되었다(Fig. 3B). NO는 염증 매개인자로 L-arginine에서 nitric oxide synthases에 의해 합성되며 혈관 확장, 신경 전달 및 면역 작용 등의 다양한 생리학적 특성을 가지고 있으나, 그람 음성균인 LPS의 자극에 의해 급격하게 증가하여 대식세포에서 nuclear factor- κ B(NF- κ B) 같은 염증 관련 신호 경로가 활성화된다. 활성화된 신호 경로에 의해 TNF- α , IL-6

Fig. 2. Cell viability (A) and lipid accumulation (B) of guava branch extracts (100 μ g/mL) in 3T3-L1 cells. Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Fig. 3. Cell viability (A) and NO production (B) of guava branch extracts (100 µg/mL) in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. NS, not significant.

등의 전염증성 사이토카인의 분비가 증가하여 염증 반응을 촉진시킨다(Katsuyama 등, 1998; Yun 등, 1996). 본 연구를 통해 구아바 가지 100% 에탄올 추출물은 열수 추출물보다 지방세포 내의 지방구 축적과 대식세포에서 LPS에 의한 NO 생성을 억제하는 작용이 뛰어남을 확인할 수 있었다.

구아바 가지 추출물의 동시배양에서의 항염증 활성

지방세포는 지질 대사, 혈관신생, 면역체계 등을 관여하는 adipokine을 생산하는 내분비기관으로 체내에 과도하게 축적될 경우 대식세포의 침윤을 증가시키고, 침윤된 대식세포는 지방조직에서 NO, IL-6 등 염증 매개인자의 발현을 증가시켜 염증을 유발하며, 이는 비만과 염증이 반복되는 악순환을 야기한다(Antuna-Puente 등, 2008; Guha와 Mackman, 2001; Trayhurn과 Wood, 2005). 비만과 염증의 관련성에 대한 연구는 오래전부터 이루어져 왔으며, 그중에서 NO는 당뇨병, 비만 및 심혈관질환 등의 질병에 관여한다는 연구결과가 보고되어 있다(Gruber 등, 2008; Sobrevia와 Mann, 1997; Williams 등, 2002). 따라서 본 연구에서는 지방세포인 3T3-L1과 대식세포인 RAW264.7의 동시배양을 통해 구아바 가지의 열수 및 에탄올 추출물에서의 NO 생

Fig. 4. Inhibition of NO production in co-culture of 3T3-L1 cells. Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

성억제 효과를 확인하였다(Fig. 4). LPS를 처리하여 동시배양한 adipocyte와 macrophage에서의 NO 생성량은 12.466 ± 1.532 µM로 LPS를 처리하지 않고 단일배양한 adipocyte 및 macrophage와 비교했을 때 15배~17배 증가하였으며, 이는 본 연구에서 앞서 언급한 단일배양한 대식세포 RAW 264.7에서의 LPS 처리군(7.235 ± 0.345 µM)보다 72% 많은 NO를 생성하는 것을 확인하였다. Ko 등(2014)의 연구에서는 3T3-L1과 RAW264.7 세포의 단일배양은 NO, IL-6, TNF-α 및 MCP-1과 같은 염증 매개인자를 낮은 수준으로 생성하였으나, 동시배양 시 뛰어나게 증가한 것으로 나타났다. 또한 Gregor와 Hotamisligil(2011) 연구에서 비만 상태의 지방세포는 염증 매개인자인 TNF-α를 방출하였고, 이는 지방세포에 의해 침윤된 대식세포의 염증이 활성화되는 것과 관련이 있다고 보고하였다. 한편 구아바 가지 추출물을 동시배양 세포에 처리한 경우 세 가지 추출물 모두 NO 생성량이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 특히 100% 에탄올 추출물의 NO 생성량이 2.739 ± 0.311 µM로 대조군 대비 78% 감소하여 가장 우수한 NO 생성 억제능을 나타내었다. 그리고 95°C 및 80°C 열수 추출물의 NO 생성능은 각각 5.511 ± 0.236 µM, 5.827 ± 0.109 µM로 대조군과 비교하여 2배 감소하였으나, 둘 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. Jeon 등(2021)의 연구에서는 구아바 가지에서 비타민 C, quercetin, catechin 등의 기능성 성분이 검출되었고, 구아바 가지의 열수 및 에탄올 추출물 중 100% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높게 나타난 것으로 보고하였다. 뿐만 아니라 Kassim 등(2010)의 연구에 따르면 hesperetin, naringin 등의 플라보노이드는 LPS로 유도된 NO의 생성을 억제하였고, quercetin, caffeic acid, chrysin 등의 폴리페놀 화합물은 NF-κB의 발현을 억제하여 inducible nitric oxide synthase의 발현 감소와 NO의 생성억제를 통해 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다(Hämäläinen 등, 2007). 본 연구에서는 구아바 가지 추출물

에서 gallic acid, quercetin 등의 페놀 및 플라보노이드 화합물을 확인하였으며, 이는 에탄올 추출물에서 NO의 생성을 뛰어나게 억제하는 것과 연관성이 있는 것으로 보인다.

요 약

본 연구는 구아바 가지의 생리활성물질을 확인하고, 3T3-L1 지방세포와 RAW264.7 대식세포의 동시배양을 진행하여 구아바 가지의 열수 및 에탄올 추출물에서 항비만 및 항염증 활성을 확인하였다. LC-Q-TOF-MS를 이용하여 negative 및 positive mode로 구아바 가지의 생리활성물질을 분석한 결과, catechin, gallic acid, quercetin 등 15가지의 페놀 및 플라보노이드 화합물이 확인되었다. 또한 전지방세포인 3T3-L1을 분화 유도하여 oil red-O 실험을 통한 지방구 축적을 확인한 결과 100 µg/mL 농도에서 세 가지 추출물 모두 독성을 나타내지 않았고, 95°C 및 80°C 열수 추출물에 비해 100% 에탄올 추출물에서 지방축적 억제 효과가 우수하였다. 또한 RAW264.7 대식세포에서 모든 추출물은 100 µg/mL 농도에서 시료에 의한 독성이 나타나지 않았고, 100% 에탄올 추출물에 의해 NO의 형성이 LPS만 처리된 실험군에 비해 약 65% 감소하였다. 그리고 대식세포만 단독으로 배양한 경우에 비하여 지방세포와 동시배양한 경우 NO 생성은 72% 증가하였으나, 구아바 가지 추출물에 의해 억제되었다. 특히 100% 에탄올 추출물의 NO가 LPS만 처리한 대조군에 비해 78% 감소하여 뛰어난 NO 억제 효과를 보여주었다. 이상의 결과를 종합하면, 지방세포 및 대식세포의 단일배양을 통해 구아바 가지 100% 에탄올 추출물의 지방축적 억제와 NO 생성억제 효과가 우수한 것을 확인하였고, 이는 구아바 가지에서 확인된 페놀 및 플라보노이드 화합물과 연관성이 있을 것으로 사료된다. 또한 대식세포와 지방세포의 동시배양을 통한 NO 생성억제 효과 또한 100% 에탄올 추출물에서 가장 뛰어나 구아바 가지는 항비만 활성을 갖는 천연 소재로써 활용 가능성이 높을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2021년도 교육부의 재원으로 한국기초과학지원연구원 국가연구시설장비진흥센터의 지원을 받아 수행된 연구(2019R1A6C1010044)이며, 2017년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(No. 2017R1C1B1008236)이고, 부산광역시 및 (재)부산인재평생교육진흥원의 BB21플러스 사업으로 지원된 연구입니다.

REFERENCES

Ailhaud G, Grimaldi P, Nègre R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr.* 1992. 12:207-233.

Antuna-Puente B, Fève B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 2008. 34:2-11.

Arima H, Danno G. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002. 66:1727-1730.

Begum S, Hassan SI, Siddiqui BS, Shaheen F, Ghayur MN, Gilani AH. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. *Phytochemistry.* 2002. 61:399-403.

Boney CM, Moats-Staats BM, Stiles AD, D'Ercole AJ. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins during adipogenesis. *Endocrinology.* 1994. 135:1863-1868.

Cha JY, Kim HJ, Chung CH, Cho YS. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 1999. 28:1310-1315.

Díaz-de-Cerio E, Gómez-Caravaca AM, Verardo V, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. *J Funct Foods.* 2016. 22:376-388.

Elks ML, Manganiello VC. A role for soluble cAMP phosphodiesterases in differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Physiol.* 1985. 124:191-198.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982. 126:131-138.

Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Methods.* 1984. 70:257-268.

Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011. 29:415-445.

Gruber HJ, Mayer C, Mangge H, Fauler G, Grandits N, Wilders-Truschnig M. Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. *Int J Obes.* 2008. 32:826-831.

Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 2001. 13:85-94.

Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-κB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-κB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflammation.* 2007. Article ID 045673.

Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem.* 1992. 40:2379-2383.

Jang M, Jeong SW, Cho SK, Ahn KS, Lee JH, Yang DC, et al. Anti-inflammatory effects of an ethanolic extract of guava (*Psidium guajava* L.) leaves *in vitro* and *in vivo*. *J Med Food.* 2014. 17:678-685.

Jeon A, Kim N, Cheon W, Kim Y. Biological activity and hepatoprotective effects of guava branch extract. *J Korean Soc Food Cult.* 2021. 36:210-217.

Jo YH, Ok DL, Lee SC. Antimicrobial characteristics of different parts of guava against food-borne bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2009. 38:1773-1778.

Kassim M, Achoui M, Mustafa MR, Mohd MA, Yusoff KM. Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate *in vitro* anti-inflammatory activity. *Nutr Res.* 2010. 30:650-659.

Katsuyama K, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. NO inhibits

- cytokine-induced iNOS expression and NF- κ B activation by interfering with phosphorylation and degradation of I κ B- α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998. 18:1796-1802.
- Kim DJ, Jung JH, Kim SG, Lee HK, Lee SK, Hong HD, et al. Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Preserv.* 2011. 18:366-373.
- Kim Y, Park Y, Namkoong S, Lee J. Esculetin inhibits the inflammatory response by inducing heme oxygenase-1 in cocultured macrophages and adipocytes. *Food Funct.* 2014. 5:2371-2377.
- Ko HJ, Lo CY, Wang BJ, Chiou RYY, Lin SM. Theaflavin-3, 3'-digallate, a black tea polyphenol, attenuates adipocyte-activated inflammatory response of macrophage associated with the switch of M1/M2-like phenotype. *J Funct Foods.* 2014. 11:36-48.
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature.* 2000. 404:635-643.
- Lee JS, Kim CD. Total phenolic compound, total flavonoid compound and anti-inflammatory inhibitory effects of *Psidium guajava* leaf extract. *J Korean Appl Sci Technol.* 2018. 35:254-262.
- Liu X, Yan X, Bi J, Wu X, Liu J, Zhou M. Identification of phenolic compounds and antioxidant activity of guava dehydrated by different drying methods. *Dry Technol.* 2020. 38:987-1000.
- Lozoya X, Reyes-Morales H, Chávez-Soto MA, Martínez-García MC, Soto-González YS, Doubova SV. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. *J Ethnopharmacol.* 2002. 83:19-24.
- MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995. 92:9034-9037.
- Mercadante AZ, Steck A, Pfander H. Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): isolation and structure elucidation. *J Agric Food Chem.* 1999. 47:145-151.
- Miean KH, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem.* 2001. 49:3106-3112.
- Ministry of Food and Drug Safety. Health Functional Food Code. Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Korea. 2021. p 82.
- Misra K, Seshadri TR. Chemical components of the fruits of *Psidium guava*. *Phytochemistry.* 1968. 7:641-645.
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Seo K, Yamashita H, Hosoya Y, et al. *In vivo* imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest.* 2008. 118:710-721.
- Oh JW, Lee JH, Lee OH, Kim KH, Kim HR, Lee HK. Effect of hot water and ethanol extracts from *Nelumbo nucifera* gaertner flower on lipid accumulation and reactive oxygen species (ROS) production in adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Korean J Food Preserv.* 2015. 22:744-750.
- Sobrevia L, Mann GE. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. *Exp Physiol.* 1997. 82:423-452.
- Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans.* 2005. 33:1078-1081.
- Visscher TL, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health.* 2001. 22:355-375.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003. 112:1785-1788.
- WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000. 894:1-253.
- Williams IL, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans. *Int J Obes.* 2002. 26:754-764.
- Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol.* 1996. 10:291-316.