KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 52, No. 1, pp. 60~66 (2020)
https://doi.org/10.9721/KJFST.2020.52.1.60

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

감 심지 에탄올 추출물의 항산화 활성 및 신경세포 보호 효과

변의백[1] · 김민진[2] · 김순정[2] · 오남순[2] · 박상현[2] · 김우식[1] · 송하연[1] · 한정무[1] · 김광욱[2] · 변의홍[2,3,*]
[1]한국원자력연구원, [2]공주대학교 식품공학과, [3]공주대학교 식품과학연구소

Antioxidant activity and neuroprotective effects of ethanol extracts from the core of *Diospyros kaki*

Eui-Baek Byun[1], Min-Jin Kim[2], Soon-Jung Kim[2], Nam-Soon Oh[2], Sang-Hyun Park[2], Woo Sik Kim[1], Ha-Yeon Song[1], JeongMoo Han[1], Kwangwook Kim[2], and Eui-Hong Byun[2,3,*]
[1]*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute*
[2]*Department of Food Science and Technology, Kongju National University*
[3]*Food Science Research Institute, Kongju National University*

Abstract This study examined the antioxidant activity and neuroprotective effects of ethanol extracts obtained from *Diospyros kaki* core (DCE). The total polyphenol and flavonoid contents in DCE was 786.47±15.27 and 31.14±0.82 mg/g, respectively. In addition, DCE exhibited a dose-dependent induction of radical scavenging activity, determined by 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) (ABTS), ferric reducing antioxidant power (FRAP), and reducing power assays. The viability of HT22 hippocampal cells was examined to investigate the neuroprotective effect of DCE. DCE treatment did not induce cytotoxicity at concentrations below 1,000 μg/mL. Additionally, DCE treatment in the background of H_2O_2 induce oxidative stress revealed a significant increase in the survival rat, indicated by increased SOD activity and decreased levels of MDA, a lipid peroxidation product. Therefore, the results suggest that DCE can be used as a source of natural antioxidants source and a therapeutic agent for the treatment of brain disorders induced by oxidative stress and neuronal damage.

Keywords: *Diospyros kaki* Core, antioxidant activity, neuroprotective effects, neuronal cell

서 론

최근 평균수명의 증가로 인한 고령화 현상이 증가됨에 따라 치매와 같은 퇴행성 질환이 문제되고 있다. 이러한 퇴행성 질환은 활성산소에 기인된 것으로 알려져 있어 산화적 스트레스에 관한 연구의 관심이 높아지고 있다. 이러한 산화적 스트레스의 직접적 원인이 되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 superoxide radical ($O^{\bullet -}_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH') 등이 있으며, 환경적 요인이나 생활습관 또는 스트레스로 인해 생성된다(Kim 등, 2017). ROS는 불안정하고 반응성이 높아 여러 생체물질과 쉽게 반응하며, 체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키거나 돌연변이, 세포독성 및 발암 등을 초래하게 된다(Koh 등, 2008). 체내에서는 이와 같은 산화적 손상으로부터 superoxide dismutase (SOD), glutathione, catalase (CAT) 등과 같은 항산화 시스템이 세포 보호 작용을 한다(Kim 등, 2016). 따라서 활성 산소종으로 부터 발생하는 손상을 억제하기 위해 활성산소를 조절하여 강력한 항산화 능력을 갖춘 butylated hydroxyanisole (BHA) 및 butylated hydroxytoluene (BHT) 같은 합성 항산화제가 개발 되었다. 하지만 변이원성 및 독성으로 인한 부작용을 초래 하여 문제가 되고 있어 독성이 없는 안전한 식품 유래 천연 항산화제 연구가 활발히 진행되고 있다(Kim 등, 2006; Sung 등, 2016). 특히 각종 과채류의 천연물질인 폴리페놀, 플라보노이드가 항알레르기, 항암, 항산화 활성 등 다양한 생리활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다(Lee 등, 2000).

감(*Diospyros kaki*)은 동양이 원산지로서 영양가치가 높은 과일 중의 하나로 당질과 vitamin A, B_1, C가 풍부하며 장의 수축과 장분비액의 분비를 촉진하고, 동의보감에 의하면 이뇨, 딸꾹질, 토혈, 패열, 숙혈, 주독 및 갈증해소 등에 탁월하다(Bian 등, 2015; Jo 등, 2010). 떫은 맛을 내는 dispyrin은 수용성 탄닌 성분으로 노화방지, 심혈관계 질환 예방 및 항암 효과가 보고되고 있다(Jeong 등, 2010). 감에는 gallic acid, catechin, epigallocatechin gallate 와 같은 페놀성 화합물 및 quercetin, rutin 등의 카로테노이드 화합물이 다량 함유되어 있으며, 이러한 성분들은 각종 질병의 원인이 되는 활성산소를 억제하는 능력이 뛰어나며 신경 세포에서 산화적 스트레스에 대한 보호효과 및 지질과산화 억제 효과가 알려져 있다(Chang 등, 2013; Joo 등, 2011; Kim 등, 2018; Wang 등, 2008; Yoo 등, 2011). 또한, 이전부터 감의 잎, 꼭지, 과육, 과피 등 감의 여러 부위에 대한 미백, 항산화, 항염증, 항알레르기, 항아토피, 항암 등의 생리활성에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다(Cho 등, 2015; Kim 등, 2011; Yoo과 Jeong, 2009).

*Corresponding author: Eui-Hong Byun, Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 32439, Republic of Korea
Tel: +82-41-330-1481
Fax: +82-41-330-1489
E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr
Received September 3, 2019; revised October 17, 2019; accepted October 21, 2019

하지만 감의 부산물 중 하나인 감 심지(*Diospyros kaki* Core, DCE)에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 이러한 부산물의 화학적 조성 및 생물학적 특성을 규명 할 수 있다면, 새로운 고부가 가치의 기능성 소재로 탈바꿈시켜 건강식품 및 화장품의 원재료로 사용할 수 있을 것이다. 이러한 내용을 바탕으로 본 연구는 DCE의 에탄올 추출물에 대한 항산화 활성 및 신경세포에 대한 보호효과를 확인하는 것을 목표로 하여 총 폴리페놀, 총 폴라보노이드 함량, 항산화 활성에 중요한 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) (ABTS) 라디칼 소거능 및 환원력을 평가 하였다. 또한 생쥐 해마 유래 HT22 세포에 DCE를 처리하여 세포생존율, 세포내 항산화 효소들(SOD, CAT) 및 지질과산화 생성물 malondialdehyde (MDA)의 분비능을 관찰해 보았다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험은 DCE의 항산화 활성 및 신경세포 보호 효과를 비교하기 위하여 충남 예산군 재배농가에서 시료를 구입하였다. 이후 감 심지를 분리하여 40°C에서 건조하였다.

DCE의 제조

건조한 시료 40 g에 1 L의 95%의 ethanol (Duksan, Ansan, Korea)을 가하여 24시간 동안 교반 추출하였다. 원심분리(2,000 rpm, 20 min)하여 상층액을 분리하였다. 상층액을 Filter paper (No. 42, Whatman, Kent, UK)로 여과 후, 추출하여 얻은 추출 상층액을 동결 건조하였고, −70°C에서 보관하여 본 실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법(Appel 등, 2001)을 일부 변형하여 분석하였다. 10 mg/mL 농도의 추출물 20 μL에 증류수 400 μL를 가한 다음, 2 N Folin-ciocalteuphenol reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 40 μL를 넣은 후 교반하였다. 이 용액에 30% Na_2CO_3 (Duksan) 400 μL 를 가하여 1시간 동안 반응시킨 후 microplate reader (Epoch, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드의 정량을 위하여 gallic acid (Sigma-Aldrich)를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드의 함량은 Davis(1947) 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 10 mg/mL 농도의 추출물 100 μL에 diethylene glycol (Sigma-Aldrich) 1 mL와 1 N NaOH (Duksan) 100 μL를 혼합하여 37°C 항온수조에서 1시간 동안 반응하였다. 흡광도의 변화는 microplate reader (Epoch)를 이용하여 420 nm에서 측정하였으며, 총 플라보노이드의 정량을 위하여 naringin (Sigma-Aldrich)을 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

DPPH 라디칼 소거능

DPPH (Sigma-Aldrich) 라디칼 소거능은 Blois(1958)의 방법을 일부 수정하여 분석하였다. 메탄올에 용해된 0.1 mM의 DPPH 용액 100 μL에 농도별 DCE (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL)를 첨가한 후 암실에서 30분간 반응시킨 다음 microplate reader (Epoch)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{sample} - A_{blank1}}{A_{blind} - A_{blank2}}\right) \times 100$$

여기서 A_{sample}은 sample과 DPPH 반응용액의 흡광도를 의미하며, A_{blank1}은 sample의 단독 흡광도를 나타내고, A_{blind}는 DPPH 용액의 단독 흡광도를 나타내며, A_{blank2}는 공시료를 나타낸다.

ABTS 라디칼 소거능

ABTS (Sigma-Aldrich) 라디칼 소거능은 Re 등(1999)의 방법을 이용해서 측정하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate (Sigma-Aldrich)을 24시간 동안 빛을 차단하여 ABTS 라디칼을 형성시킨 후, 이 용액을 760 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 20 μL에 농도별로 제조한 DCE (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL) 20 μL를 처리한 후 microplate reader (Epoch)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{sample}}{A_{blind}}\right) \times 100$$

여기서 A_{sample}은 sample과 ABTS 반응용액의 흡광도를 의미하며, A_{blind}는 ABTS 용액의 단독 흡광도를 나타낸다.

FRAP 측정

FRAP은 Benzie와 Strain(1996)의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.3 M sodium acetate buffer (pH 3.6, Sigma-Aldrich), 10 mM TPTZ (Sigma-Aldrich) 및 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Sigma-Aldrich)를 제조하여 실험 직전에 10:1:1의 비율로 혼합하여 FRAP 용액을 제조하였다. FRAP 용액 750 μL와 농도별(0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL) DCE를 30 μL씩 첨가한 후 37°C 항온수조에서 15분간 반응 후 microplate reader (Epoch)를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

환원력(reducing power) 측정

환원력은 Oyaizu(1986) 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 농도별 DCE (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL)의 100 μL에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 100 μL 및 1% potassium ferricyanide (Sigma-Aldrich) 100 μL를 각각 첨가하여 50°C 항온수조에서 20분 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich) 100 μL를 가하고 원심분리(12,000 rpm, 10분) 하였다. 그 후 0.1% ferric chloride (Sigma-Aldrich)를 20 μL 가하여 37°C 항온수조에서 20분 반응 후 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 환원력을 측정하였다.

HT22 mouse hippocampal 세포배양

생쥐 해마 유래 HT22 cell line은 ATCC에서 구매 후 사용하였으며, 5% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA)과 penicillin, streptomycin (100 IU/mL, 100 μg/mL, Gibco)을 함유한 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Welgene, Namcheon, Korea) 용액으로 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

HT22 세포생존율 평가

HT22 cell을 3×10^4 cells/well씩 96 well plate (SPL, Pocheon, Korea)에 분주하고, 37°C, 5% CO_2 incubator에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시킨 후 농도별 DCE (31.25, 62.5,

125, 250, 500 및 1,000 μg/mL)와 H_2O_2를 동시 처리하였다. 37°C, 5% CO_2 조건에서 5시간 동안 배양한 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) 분석을 통해 세포독성을 측정하였다. MTT assay는 배양 상등액을 제거하고 MTT 용액(5 mg/mL)을 30 μL씩 각각 well에 첨가하여 4시간 동안 배양한 후 생성된 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich)에 녹여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 내 SOD activity 측정

SOD 활성은 SOD assay kit (Dojindo, Kyushu, Japan)을 이용하여 측정하였다. 6 well plate에 HT22 cell을 3×10^4 cells/well로 분주하고, 37°C, 5% CO_2 incubator에서 6시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시킨 후 농도별 DCE (500 및 1,000 μg/mL)와 H_2O_2를 동시 처리하였다. 37°C, 5% CO_2 조건으로 5시간 동안 배양한 후 cell lysis buffer (Cell Signaling, Danvers, MN, USA)를 첨가하여 ice에서 5분 반응시키고, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 cell lysate를 분리하였다. 분리된 cell lysate는 BCA protein detection kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)을 사용하여 1 mg/mL의 농도로 단백질 정량하여 기질로 사용하였으며, 측정과정은 제조자가 제시한 지침에 따라 진행하였다.

세포 내 MDA level 측정

HT22 세포에 대한 DCE의 전처리 후 H_2O_2 처리에 따른 MDA level 변화를 확인하기 위해 MDA 586 kit (Oxis Research, Portland, OR, USA)을 이용하였다. 위의 1 mg/mL로 정량한 cell lysate를 이용하여 제조자가 제시한 지침에 따라 MDA level을 측정하였다.

세포 내 CAT 활성 측정

CAT 활성은 Catalase Assay Kit (Calbiochem, Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 위의 1 mg/mL로 정량한 cell lysate를 이용하여 제조자가 제시한 지침에 따라 CAT 활성을 측정하였다.

통계 분석

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) software를 이용하여 one way ANOVA test로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 $p<0.05$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

DCE의 수율, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

폴리페놀은 페놀성 화합물이라고 하며, 녹색식물이 광합성 작용을 할 때 생성된 탄수화물의 일부가 변화한 2차 대사산물로 식물계에 다량 존재한다. 분자 내 페놀성 수산기가 효소 단백질과 같은 거대 분자들과 결합하는 성질로 항산화, 항암 및 콜레스테롤 저하작용 등 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다(Jo 등, 2010). 플라보노이드는 C6-C3-C6 의 구조를 갖는 화합물로 식물의 꽃, 줄기 및 열매 등에 많이 함유되어 있으며, 항균, 항암 및 항염증 활성 등이 보고되어 있다(Byun 등, 2018). 중요한 것은 Chen 등(2008)의 논문에 따르면 *Diospyros Kaki*의 에탄올 추출물에는 총 32개의 폴리페놀 화합물들이 존재한다고 보고되고 있다. 이 중 gallic acid, epicathechin, epigallocatechin, chlorogenic acid, caffeic acid에 의한 강력한 항산화 효과를 나타낸다고 보고하고 있다(Muhammad 등, 2017). 뿐만 아니라 *Diospyros Kaki*에 포함된 폴리페놀 화합물들(ferulic acid, tannic acid, protocathechuic acid, vanillic acid, epicatechin gallate, catechin gallate)은 활성산소종(ROS)에 대한 산화스트레스에 대한 손상을 효과적으로 방어 할 수 있다고 보고하고 있다(Fu 등, 2015; Lee 등, 2012; Zhou 등, 2016). 또한 *Diospyros Kaki* 추출물에서는 다양한 flavonoid (quercetin, hyperin, isoquercitrin, kaempferol, glycoside, catechin)를 포함하고 있으며, 이러한 화합물들은 또한 항산화 효과를 가진다고 보고하고 있다(Ohguchi 등, 2010; Sun 등, 2011; Sun 등, 2014). 따라서 DCE의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량 변화를 측정함으로써 항산화 및 신경세포 보호효과에 대한 가능성을 확인하였다. 먼저 총 폴리페놀과 총 플라보노이드에 대한 표준물질로 garlic acid와 naringin을 각각 사용하였다. DCE의 수율은 10.36±1.34%이며, 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 786.47±15.27와 31.14±0.82 mg/g로 나타났다(Table 1). 따라서, 본 연구에서는 감 심지는 항산화 활성에 크게 기여하는 대표물질인 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함유하여 뛰어난 항산화 효과를 나타낼 것으로 생각한다.

Table 1. Yield and total polyphenols and total flavonoids contents ethanol extracts from *Diospyros kaki* Core (DCE)

Sample	Yield(%)	Total Polyphenol (Gallic acid, mg/g)	Total Flavonoid (Naringin, mg/g)
DCE	10.36±1.34	786.47±15.27	31.14±0.82

DCE의 DPPH 및 ABTS 자유라디칼 소거 활성

DPPH는 짙은 자색을 띄는 라디칼로서 항산화 물질의 전자 공여능으로 인해 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 자색의 DPPH가 탈색되어 나타내는 정도를 지표로 하여 항산화 활성을 측정하는 방법이다(Choi 등, 2003). DPPH 라디칼 소거능이 높으면 항산화 활성 증진으로 인체 내 노화를 억제하는 효과가 있다(Lee 등, 2013). DCE의 항산화 활성을 알아보기 위해 DPPH 및 ABTS 자유 라디칼 소거 활성에 대하여 조사하였다. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 확인해 본 결과, DCE (0.3125, 0.62, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL)를 처리하였을 때, 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하는 경향이 나타났다(Fig. 1A). DPPH 라디칼 소거활성은 자유 라디칼의 환원활성으로 활성 산소의 소거활성과도 비례적인 것으로 알려져 있으며, ABTS 라디칼 소거능 또한 항산화 활성 측정 시 사용하는 실험방법으로, ABTS와 과황산칼륨을 혼합하여 암소에 두면 ABTS 양이온이 생성되어 항산화 물질과 반응하여 특유의 청록색이 탈색되며 이의 흡광도 변화로 측정되는 방법이다(Yoo 등, 2007). DCE에 대한 ABTS 라디칼 소거능에 관하여 알아본 결과, DCE을 처리하였을 때, 농도 의존적으로 ABTS 라디칼소거 활성이 증가하는 경향을 확인 할 수 있었다(Fig. 1B). 따라서 본 연구에서 감 심지 에탄올 추출의 자유라디칼 소거능이 증가한 것은 감 심지 에탄올 추출의 다양한 유효성분인 폴리페놀 및 플라보노이드의 영향에 따른 것이라 생각한다.

DCE의 환원력

환원력은 항산화 작용의 여러 기작 중 활성산소종 및 유리기에 전자를 공여하는 능력을 말한다. Ferric ferricyanide (Fe^{3+}) 혼합물은 수소를 공여하고 free radical을 안정화시켜 ferrous ion

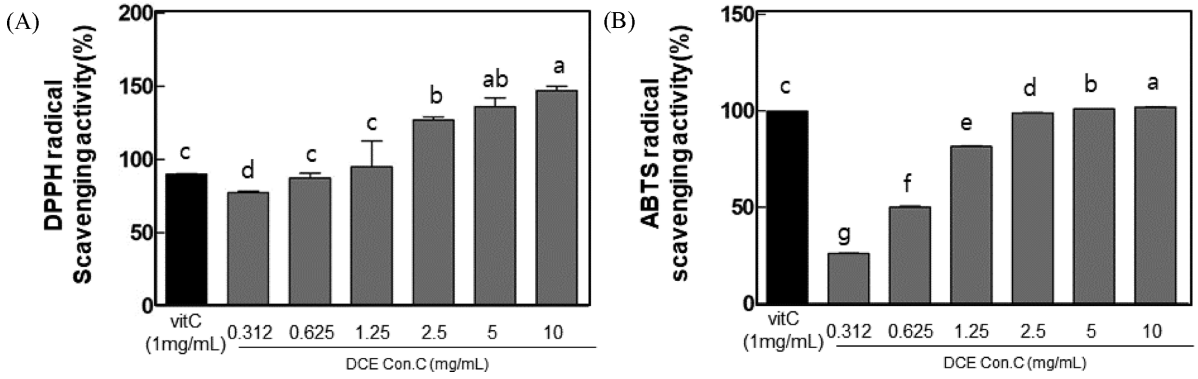

Fig. 1. DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activities of from ethanol extracts from *Diospyros kaki* Core (DCE). Results were expressed the radical scavenging activities as inhibition percent. Results was expressed as mean±SD. [a-g]Values with different letters are significantly different (p<0.05).

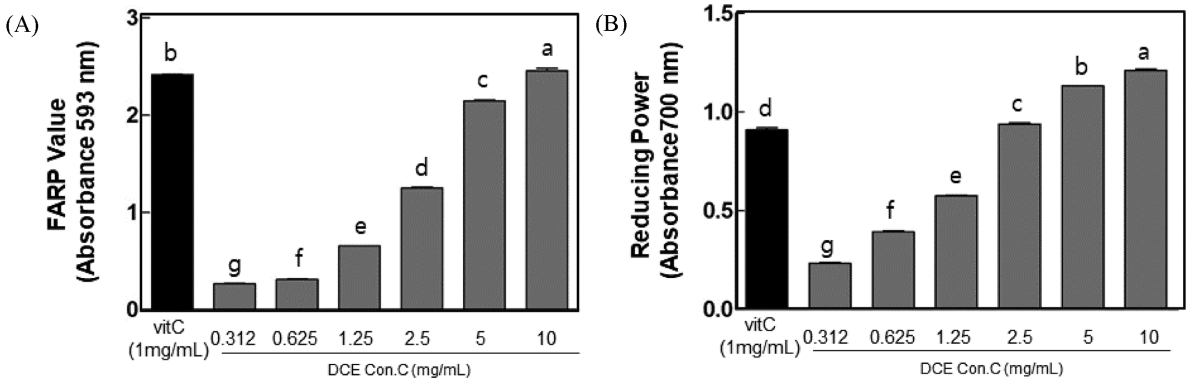

Fig. 2. FRAP (A) and reducing power (B) of ethanol extracts from *Diospyros kaki* Core (DCE). Results were expressed the radical scavenging activities as inhibition percent. Results was expressed as mean±SD. [a-g]Values with different letters are significantly different (p<0.05).

(Fe^{2+})로 전환하는 환원력을 흡광도 값으로 나타낸다(Lee 등, 2011). 환원력이 강할수록 진한 녹색에 가깝게 발색된다(Kang 등, 2016). FRAP 및 reducing power로 환원력을 측정한 결과, DCE (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL)를 처리하였을 때, 농도 의존적으로 환원력을 증가시키는 것으로 관찰되었다(Fig. 2). 감 심지에 존재하는 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물과 같은 생리활성물질들의 함량에 의해 환원력을 나타내는 것으로 보이며, DPPH 및 ABTS 라디칼 제거 활성과 함께 산화방지 능력을 가지고 있어, 향후 항산화 효능을 가진 천연물 소재로서의 활용 가치가 높아질 것으로 보인다.

DCE의 세포 독성 및 세포 보호 효과

MTT assay는 미토콘드리아의 탈수소효소(mitochondrial dehydrogenase) 작용에 의해 노란색의 수용성 기질을 청자색을 띠는 비수용성 MTT formazan으로 환원시키는 능력을 이용한 측정법이다(Kwak 등, 2013). DCE이 생쥐 유래 해마의 세포독성에 미치는 영향을 확인하였다. HT22 세포에 농도별(31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1000 μg/mL)로 처리하여 DCE의 H_2O_2 처리에 의한 세포독성에 따른 세포생존율을 MTT assay 방법으로 평가하였다. DCE을 HT22 세포에 처리 하였을 때 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않은 농도로 추후 실험을 진행하였다(Fig. 3A). 따라서 H_2O_2로 산화 유도된 HT22 세포에 감심지 에탄올 추출물을 처리하여 산화 독성으로부터 보호하는지 확인 하였다. 그 결과, Fig. 3B와 같이 H_2O_2와 DCE를 동시에 처리한 처리 군에서 유의적으로 H_2O_2가 유도하는 산화 독성으로부터 세포를 보호하는 효과가 관찰되었다. 뇌 조직은 대사를 위한 산소이용률이 높고 과산화지질의 함량도 높지만 활성산소에 대한 산화방지 효소계나 산화방지제가 타 조직에 비해 상대적으로 적어 자유 라디칼 공격에 대해서 취약한 것으로 알려져 있다(Chung 등, 2016). 자유 라디칼에 의한 뇌 세포사멸은 에너지 대사의 소실로 신경계의 기능장애로 나타나고 세포사멸에 의한 뇌 조직의 손상은 다시 회복되기 어렵기 때문에 퇴행성 신경질환에 있어서 신경세포 보호가 중요하다(Kim 등, 2018). 천연 항산화 소재로 대표적인 물질인 폴리페놀과 플라보노이드 등은 산화적 스트레스로부터 신경세포 보호 효과가 뛰어난 것으로 보고되고 있다(Byun 등, 2018). 중요한 것은 *Diospyros Kaki*에 포함된 폴리페놀 화합물들은 H_2O_2 의존적 ROS에 의한 세포손상에 대하여 Nuclear Factor-kappaB (NF-κB) 신호의 조절을 통하여 높은 방어효과를 나타낸다고 보고하고 있어, DCE에 대한 세포 보호효과는 DCE에 함유된 폴리페놀들에 의하여 ROS 의존적 NF-κB의 과도한 활성을 억제함으로서 이루어 질 것이라 판단된다(Lee 등, 2012; Sun 등, 2014).

세포 내 DCE의 SOD 활성

항산화 효소인 SOD는 superoxide anion radical을 제거하여 생체 내에서 활성산소의 독성으로부터 방어 작용을 하는 중요한 효소이다(Boo 등, 2011). SOD와 같은 항산화 효소와 활성산소의 불균형은 세포내 기관이 활성산소의 공격을 받기 쉬워 세포 독성으로 이루어진다(Zemlan 등, 1989). 본 실험에서 DCE가 H_2O_2 처

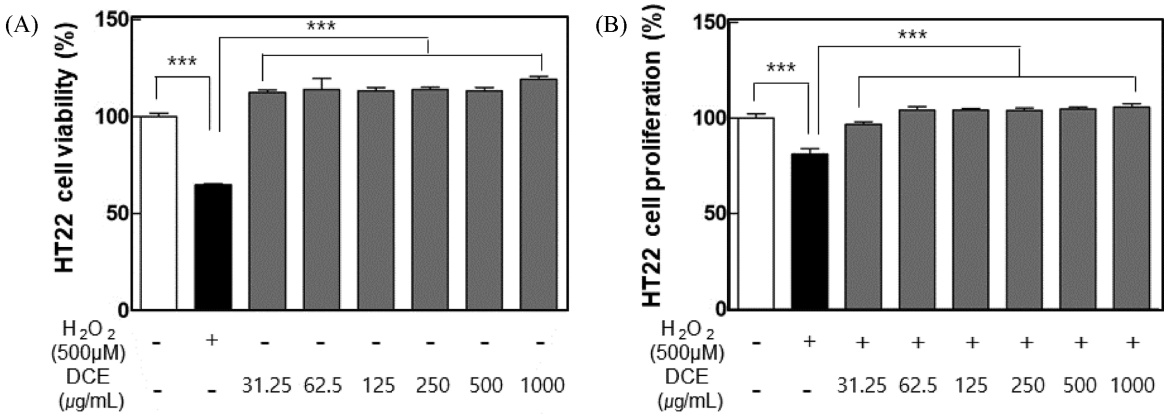

Fig. 3. Protective effect of ethanol extracts from *Diospyros kaki* Core (DCE) against H_2O_2-treated neuronal death. (A) After dose-dependent DCE pretreatment, cell viability was analyzed by a MTT assay. (B) The result was demonstrated that DCE treatment increased cell viability in HT22 cells. DCE pretreatment protected HT22 cells against H_2O_2-induced neuronal death. Results are expressed as the mean±SD. (n=3). Statistical analysis was performed using one way ANOVA test with a significant level of ***p<0.001 compared to H_2O_2 group.

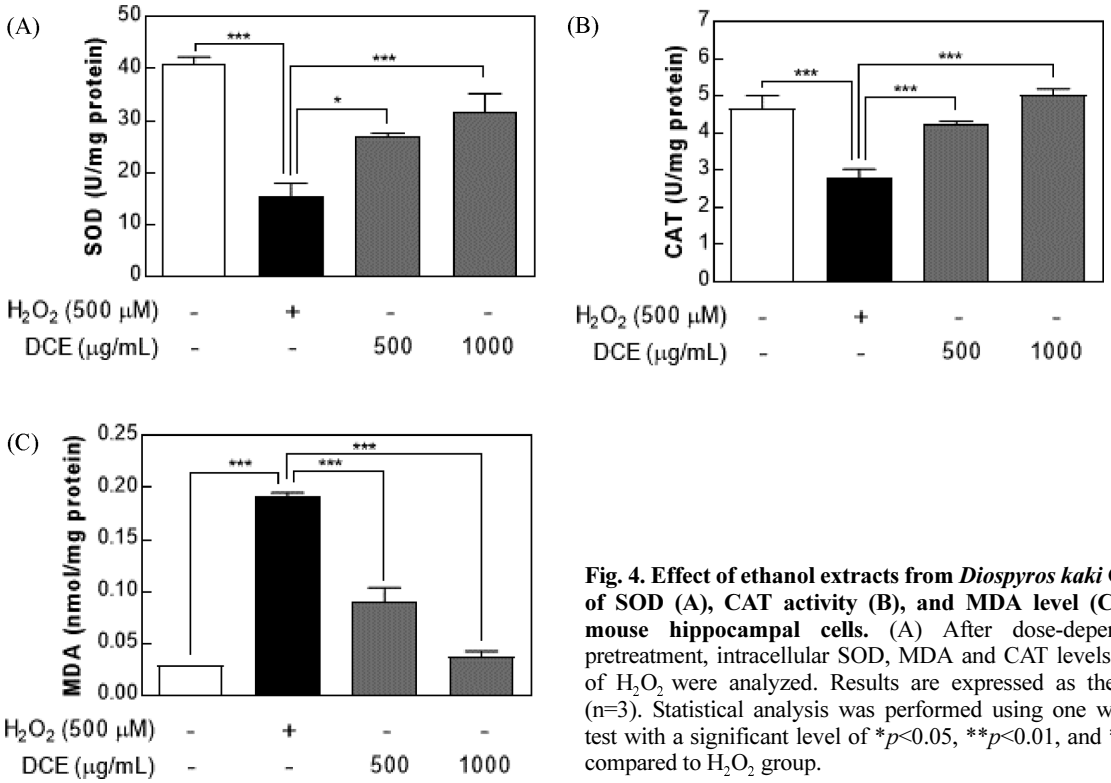

Fig. 4. Effect of ethanol extracts from *Diospyros kaki* Core (DCE) of SOD (A), CAT activity (B), and MDA level (C) on HT22 mouse hippocampal cells. (A) After dose-dependent DCE pretreatment, intracellular SOD, MDA and CAT levels in presence of H_2O_2 were analyzed. Results are expressed as the mean±SD. (n=3). Statistical analysis was performed using one way ANOVA test with a significant level of *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001, compared to H_2O_2 group.

리에 의해 유발된 독성의 세포보호 효과를 확인하기 위하여 SOD 활성을 측정하였다(Fig. 4A). DCE을 500 및 1000 μg/mL의 농도로 전 처리한 후, H_2O_2를 처리하여 산화독성을 유도한 다음 세포 내 SOD 활성을 측정하였다. 그 결과 감 심지 에탄올 추출물이 농도 의존적으로 세포 내 SOD 활성을 증가시켰다. 따라서 H_2O_2에 의하여 산화적 손상이 유도된 HT22 뇌 신경세포 보호 효과는 DCE에 의해 세포내 SOD 효소 활성의 증가로 의한 것으로 판단된다.

세포 내 DCE에 의한 CAT 활성 측정

CAT는 SOD와 함께 H_2O_2가 H_2O로 환원되도록 촉매 역할을 하여 인체의 free radical을 제거하는 대표적인 항산화 효소이다. 이를 통해 생체 내에서 H_2O_2에 의해 발생할 수 있는 ROS로 인한 단백질, 핵산 및 생체막 손상에 대하여 대응할 수 있는 작용을 한다(Ighodaro과 Akinloye, 2018). 따라서 SOD의 증가뿐만 아니라 CAT의 증가는 H_2O_2로 인한 세포 손상을 감소시키는데 중요하다. 따라서 본 연구에서는 DCE를 500 및 1,000 μg/mL의 농도로 전 처리한 후 H_2O_2를 동시 처리하여 산화독성을 유도한 다음 CAT 활성을 측정하였다. 그 결과, H_2O_2 단독 처리된 HT22 세포에서 보다 H_2O_2와 함께 DCE가 동시 처리된 세포들에서 세포 내 CAT 활성이 증가되었다(Fig. 4B). 이러한 결과를 바탕으로 DCE가 유도하는 SOD 뿐만 아니라 CAT의 활성에 의하여 세포 보호 효과를 유도하는 것으로 판단된다.

세포 내 DCE의 MDA level 측정

뇌 조직의 지질성분은 주로 신경세포 막에 존재하며, 외부 산화적 스트레스에 의한 세포막 손상과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Singh 등, 2010). 뇌 조직 지질성분인 불포화지방산은 과산화 과정을 통해 분해되어 MDA라고 하는 지질 과산화물을 생성하며, 이는 세포 내 산화스트레스에 대한 지표로 이용이 된다(Kim 등, 2017). 본 실험에서 DCE가 H_2O_2로 유도된 MDA를 억제하는지 평가하였다(Fig. 4C). DCE를 500 및 1,000 μg/mL의 농도로 전 처리한 후 H_2O_2를 동시 처리하여 산화독성을 유도한 다음 MDA level을 측정하였다. 그 결과, 농도 의존적으로 세포 내 MDA level을 감소시켰다. Zhao(2009)의 연구에 따르면 페놀성 화합물을 함유하는 추출물은 지방의 산화를 억제하는 활성이 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 DCE 처리 시 세포 내 MDA level 감소 효과는 DCE가 함유한 폐놀성 화합물에 의한 항산화 효소 활성의 증가로 세포 내 MDA level이 감소한 것으로 생각한다.

요 약

본 연구는 DCE의 항산화 활성 및 신경세포 보호 효과에 평가하였다. 감 심지로부터 유용성 성분을 얻기 위하여 에탄올 추출을 한 결과 약 10.36±1.34%의 추출물의 수율을 얻을 수 있었다. DCE의 총 폴리페놀, 총 폴라보노이드 함량과 항산화 활성으로 DPPH, ABTS 라디칼 소거능 및 환원력을 평가한 결과, DCE의 항산화 활성이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 또한, DCE의 HT22 세포 보호 효과에 관하여 알아보기 위하여 HT22 세포에 DCE을 처리한 후 H_2O_2를 통한 산화적인 스트레스의 유도를 통하여 세포독성에 미치는 영향을 확인한 결과, DCE의 처리는 HT22 세포에 독성이 나타나지 않았으며, 이에 따라 항산화 효소인 SOD 활성이 증가와 지질과산화 생성물인 MDA level의 감소를 확인 할 수 있었다. 이러한 결과들로 볼 때, DCE의 항산화 및 산화적 스트레스로부터 신경세포 보호효과를 확인함으로서 향후 퇴행성 신경질환 예방에 유용한 건강기능성 식품 소재로서의 개발 가능성이 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부에서 시행하는 방사선 기술개발사업(2018M2A2B3A02072069)와 기본연구사업(NRF-2019R1F1A1061378)의 지원으로 수행되었습니다.

References

Appel HM, Govenor HL, D'Ascenzo M, Siska E, Schultz JC. Limitations of folin assays of foliar phenolics in ecological studies. J Chem. Ecol. 27: 761-778 (2001)

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

Bian LL, You SY, Park JJ, Yang SJ, Chung HJ. Characteristics of nutritional components in astringent persimmons according to growing region and cultivar. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 44: 379-385 (2015)

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

Boo HO, Hwang SJ, Bae CS, Park SH, Song WS. Antioxidant activity according to each kind of natural plant pigments. Korean J. Plant Res. 24: 105-112 (2011)

Byun EH, Kim K, Kim YE, Cho EJ, Min HS, Lee JH, Cho G, Yoon WJ, Kim BC, Ahn DH, Park W. Comparison study of antioxidant activity and neuroprotective effects of barley sprout leaf, root, and stem ethanol extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 47: 973-980 (2018)

Chang CS, Chang CL, Lai GH. Reactive oxygen species scavenging activities in a chemiluminescence model and neuroprotection in rat pheochromocytoma cells by astaxanthin, beta-carotene, and canthaxanthin. Kaohsiung J. Med. Sci. 29: 412-421 (2013)

Chen XN, Fan JF, Yue X, Wu XR, Li LT. Radiacal scavenging activity and phnolic compounds in persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Mopam). J. Food Sci. 73; C24-C28 (2008)

Cho BO, Yin HH, Fang CZ, Shin JY, Ha HO, Kim SJ, Jeong SI, Jang SI. Anti-atopic effect of hot water and supercritical carbon dioxide fluid extract of persimmon (*Diospyros kaki*) peels. Korean J. Food Sci. Technol. 47: 394-400 (2015)

Choi CH, Song ES, Kim JS, Kang MH. Antioxidative activities of Castanea crenata Flos methanol extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 1216-1220 (2003)

Chung MJ, Lee S, Park YI, Lee J, Kwon KH. Neuroprotective effects of phytosterols and flavonoids from Cirsium setidens and Aster scaber in human brain neuroblastoma SK-N-SH cells. Life Sci. 148: 173-182 (2016)

Davis WB. Determination of flavanones in citrus fruits. Anal. Chem. 19:476-478(1947)

Fu R, Peng Y, Peng T, Guo Y, Chen F. Phenolic composition and effects on allergic contact dermatitis of phenolic extracts *Saptum sebiferum* (L.) Roxb. Leaves. J. Ethnopharmacol. 162: 176-180 (2015)

Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Med. J. 54: 287-293 (2018)

Jeong CH, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Jeong HR, Kim DO, Heo HJ. Changes in nutritional components of Daebong-gam (*Diospyros kaki*) during ripening. Korean J. Food Preserv. 17: 526-532 (2010)

Jo YH, Park JW, Lee JM, Ahn GH, Park HR, Lee SC. Antioxidant and anticancer activities of methanol extracts prepared from different parts of Jangseong Daebong persimmon (*Diospyros kaki* cv. Hachiya). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39: 500-505 (2010)

Joo OS, Kang ST, Jeong CH, Lim JW, Park YG, Cho KM. Manufacturing of the enhances antioxidative wine using a ripe daebong persimmon (*Dispyros kaki* L). J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 54: 126-134 (2011)

Kang DH, Park EM, Kim JH, Yang JW, Kim JH, Kim MY. Bioactive compounds and antioxidant activity of Jeju camellia mistletoe (*Korthalsella japonica* Engl.). J. Life Science. 26: 1074-1081 (2016)

Kim KB, Lee SA, Heo JH, Kim JH. Neuroprotective effects of Momordica charantia extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SK-N-MC cells. J. Nutr. Health. 50: 415-425 (2017)

Kim SJ, Lee SH, Park SE, Lee JS, Chung MJ. Neuroprotective effects of bread Containing Aster scaber Thunb. and Stachys sieboldii Miq. against ethanol- or H2O2-induced neuronal cell death. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 47: 24-31 (2018)

Kim MJ, Park SK, Guo TJ, Kang YJ, Ha JS, Lee DS. Neuronal cell protective effect of Dendropanax morbifer. J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr. 45: 938-947 (2016)

Kim HJ, Park TS, Jung MS, Son JH. Study on the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of sarcocarp and calyx of persimmon (*Cheongdo Bansi*). J. Appl. Biol. Chem. 54: 71-78 (2011)

Kim JM, Park SK, Kang JY, Park SH, Park SB, Yoo SK, Han HJ, Lee S, Lee U, Heo HJ. Nutritional composition, antioxidant capacity, and brain neuronal cell protective effect of cultivars of dried persimmon (*Diospyros kaki)*. Korean J Food Sci Technol. 50: 225-237 (2018)

Kim JH, Suh HJ, Choi HS. Protective effect of silk protein hydrolysates against tert-BHP induced liver damage. Korean J. Food Preserv. 24: 107-115 (2017)

Kim KB, Yoo KH, Park HY, Jeong JM. Anti-oxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 49: 328-333 (2006)

Koh YJ, Cha DS, Choi HD, Park YG, Choi IW. Hot water extraction optimization of dandelion leaves to increase antioxidant activity. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 283-289 (2008)

Kwak JH, Jo YN, Jeong JH, Kim HJ, Jin SI, Choi SG, Heo HJ. Protective effects of black soybean seed coat extracts against oxidative stress-induced neurotoxicity. Korean J. Food Sci. Technol. 45: 257-261 (2013)

Lee JH, Kim YC, Kim MY, Chung HS, Shin KC. Antioxidative activity and related compounds of apple pomace. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 908-913 (2000)

Lee JH, Lee, YB, Seo, WD, Kang, ST, Lim JW, Cho, KM. Comparative studies of antioxidant activities and nutritional constituents of persimmon juice (*Diospyros kaki* L. cv. Gapjubaekmok). Prev. Nutr. Food Sci. 17: 141-151 (2012)

Lee JB, Park HK, Lee, JS, Kim MH. Studies on antioxidant activity, total flavonoids and polyphenols, and reducing power in Yakju with different ratios of dandelionroot. J. East Asian Soc. Dietary Life. 21: 882-887 (2011)

Lee SJ, Shin JH, Lee HJ, Tak HM, Kang MJ, Sung NJ. Antioxidant and anti-inflammatory activities of functional plant materials. J. Life Science. 23: 869-878 (2013).

Muhammad K, Naveed A, Rehan M, An overview of dermatological and cosmeceutical denefits of *Diospyros kaki* and its phytoconstituents. Braz. J. Phamacog. 27: 650-662 (2017)

Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn. J. Nutr. 44: 307-315 (1986)

Ohguchi K, Nakajima C, Oyama M, Iinuma M, Itoh T, Akao Y, Nozawa Y, Ito M. Inhibitory effects of flavonoid glycosides isolated from the peel of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* 'Fuyu') on melanin biosynthesis. Biol. Pharm. Bull. 33: 122-124 (2010)

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)

Singh M, Dang TN, Arseneault M, Ramassamy C. Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. J. Alzheimers Dis. 21: 741-756 (2010)

Sun L, Zhang J, Lu X, Zhang L, Zhang Y. Evaluation to the antioxidantactivity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. Food Chem. Toxicol. 49: 2689–2696 (2011)

Sung NY, Song HY, Ahn DH, Yoo YC, Byun EB, Jang BS, Park C, Park W, Byun EH. Antioxidant and neuroprotective effects of green tea seed shell ethanol extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 45: 958-965 (2016)

Sun L, Zhang J, Fang K, Ding Y, Zhang L, Zhang Y. Flavonoids from persimmon (*Diospyros kaki*) leaves (FPL) attenuate H_2O_2-induced apoptosis in MC3T3-E1 cells via the NF-kappaB pathway. Food Funct. 5471–479 (2014)

Wang W, Shinto L, Connor WE, Quinn JF. Nutritional biomarkers in Alzheimer's disease: the association between carotenoids, n-3 fatty acids, and dementia severity. J. Alzheimer' Dis. 13: 31-38 (2008)

Yoo KH, Jeong JM. Antioxidative and antiallergic effect of persimmon leaf extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 1691-1698 (2009)

Yoo KH, Kim SJ, Jeong JM. Effects of persimmon (*Diospyros kaki Thunb*) syrup extracted from persimmon and persimmon by-products on blood glucose level. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 40: 682-688 (2011)

Yoo KM, Kim DO, Lee CY. Evaluation of different methods of antioxidant measurement. Food Sci. Biotechnol. 16: 177-182 (2007)

Zemlan FP, Thienhaus OJ, Bosmann HB. Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical filament formation. Brain Res. 476: 160-162 (1989)

Zhao B. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer' disease and Parkinson' disease. Neurochem. Res. 34: 630-638 (2009)

Zhou Z, Huang Y, Liang J, Ou M, Chen J, Li G. Extraction, purification and anti-radiation activity of persimmon tannin from *Diospyros kaki* L.f. J. Environ. Radioact. 162-163, 182-188 (2016)