

감국 발효 열수 추출물의 에탄올에 의해 손상된 HepG2 세포의 간보호 효과

서태수^{1,3} · 한준희² · 홍민² · 최다혜² · 이득찬³ · 유근형^{4,*}

¹성이바이오(주) 기업부설연구소, ²(재)춘천바이오산업진흥원 기술개발실,
³강원대학교 의생명과학대학 의생명공학과, ⁴(주)에드바이오텍 식의약사업본부

Hepatoprotective effect of fermented *Chrysanthemum indicum* L. water extract on ethanol-induced liver injury in HepG2 cells

Tae-Su Seo^{1,3}, Joon-Hee Han², Min Hong², Da-Hye Choi², Deug-Chan Lee³, and Keun-Hyung Yu^{4,*}

¹R&D Center, Sungvibio

²Department of Research and Development, Chuncheon Bioindustry Foundation

³Department of Medical Biotechnology School of Biomedical Science Kangwon National University

⁴Food&Drug Business Headquarters, Adbiotech

Abstract This study aimed to identify the hepatoprotective effects of a fermented *Chrysanthemum indicum* L. water extract. The extraction yield, antioxidant activities (ABTS and DPPH), and content of luteolin and luteolin-7-glucoside were significantly higher in the fermented *C. indicum* L. water extract (FCI) than in the *C. indicum* L. water extract. Treatment with FCI (200 µg/mL) significantly reduced the activities of gamma(γ)-glutamyl transferase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and lactate dehydrogenase in HepG2 cells treated with 3% ethanol. Furthermore, FCI did not affect the viability of the HepG2 cells. These results suggest that FCI can be useful for the development of an effective hepatoprotective agent.

Keywords: *Chrysanthemum indicum* L., fermentation, luteolin, antioxidant, hepatoprotective

서론

간질환은 만성간염에서 간경변증에 이르기까지 종류와 심한 정도가 다양하며, 간세포 파괴에 의한 해독능력 저하와 담즙분비 억제에 의한 독성물질 배설장애, 비타민 B₂, B₃ 및 C의 흡수 억제 및 축적저하에 의한 전신 권태감, 소양감, 식욕부진 및 피로 등의 증상 등을 동반한다(Kim, 2001; Van Thiel 등, 2002). 또한 간염, 알코올성 간질환, 지방간, 급성 간부전, 간경변 및 간암 등의 질환이 발생하여 사망에까지 이르게 되며(Lee 등, 2011), 이러한 간질환 등은 산화적 스트레스에 의해 유발되는 reactive oxygen species (ROS)가 세포의 산화적 손상을 일으켜 발생하는 것으로 보고된 바 있다(Jung 등, 2017; Zhang 등, 2013). 이에 대한 방안으로 인체 내 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GSH-px) 등과 같은 항산화효소의 활성을 증가시키고 식이를 통한 비타민이나 폴리페놀류와 같은 항산화제를 공급함으로써 산화적 스트레스로 유발된 ROS를 효율적으로 제거할 수 있다고 보고된 바 있다(Byers

와 Perry, 1992; Lawrence와 Burk, 1976; Yu 등, 2013).

감국은 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 아시아 지역에서 자생하는 국화과의 여러 해살이 풀로 꽃 부분에 감미(甘味)가 있어 감국(甘菊)이라 하며, 약용적인 부분 이외에도 좋은 향기로 인하여 국화주, 향로 등으로 이용하기도 하였다(Hwang 등, 2017; Park와 Lee 2000). 감국의 주요 성분인 폴리페놀류 화합물에는 luteolin, apigenin 등이 있으며, quercetin 등과 같은 플라보노이드 배당체, lactone 화합물 등(Choi 등, 2020; Kim 등, 2002; Kong 등, 2016; Lee 등, 2002; Ryu 등, 1994)이 보고되고 있고 이러한 성분은 다양한 암세포주의 세포주기를 조절하고 세포사멸 유도(Jung 등, 2019), 항산화(Jung 등, 2017), 항알러지, 항염증(Yoshikawa 등, 2000) 등의 다양한 생리학적 기능을 나타낸다.

감국을 포함한 여러 허브차의 경우 다양한 기능성 물질들이 천연화합물이기 때문에 인체 내 흡수가 어렵지만 장내 미생물에 의해 구조적 변화를 일으켜 천연화합물들의 흡수를 용이하게 할 수 있으며(Choi 등, 2020; De Pasquale 등, 2020; Gupta 등, 2018), Wang 등(2018)은 유산균과 함께 발효한 녹차 추출물을 고지방식이와 함께 마우스에 급여하였을 때 체지방감소와 비만억제 효과가 있었으며, 혈청 중성지방과 콜레스테롤 수치가 감소한다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성이 있는 감국의 활용가치를 높이고 유산균을 이용하여 발효한 감국 발효 추출물의 기능성을 알아보고자 감국 열수 추출물과 발효물의 항산화 활성 및 간세포 보호효과를 비교 분석함으로써 발효에 의한 활성 차이를 연구하였다.

*Corresponding author: Keun-Hyung Yu, Food&Drug Business Headquarters, Adbiotech, Chuncheon 24389, Korea
Tel: +82-33-261-4907
Fax: +82-33-261-4920
E-mail: khyu@adbiotech.co.kr
Received December 7, 2020; revised February 17, 2021;
accepted April 29, 2021

재료 및 방법

감국 발효

(주)광명생약으로부터 감국을 공급받아 수세 후 열풍 건조하고 20 g을 칭량한 후 증류수 180 mL을 첨가하였으며, 1 N NaOH를 이용하여 pH를 6.5로 조정하고 121°C에서 15분간 멸균하였다. 사용된 균주는 Korean Collection for Type Culture (KCTC, Daejeon, Korea)에서 분양받아 사용하였다. MRS broth (Difco)에 2회 이상 계대배양 한 *Lactobacillus plantarum* KCTC 10887BP을 최종 1.5×10^8 cfu/mL 농도로 접종하여 37°C에서 48시간 발효하면서 12 시간 마다 pH 및 생균수를 측정하였다.

감국 및 감국 발효물 열수 추출

37°C에서 가장 많은 생균수를 나타낸 12시간 발효한 시료에 800 mL의 증류수를 첨가한 후 Soxhlet's extractor (MS-EAM, MISUNG, Yangju, Korea)를 이용하여 90°C에서 6시간씩 환류냉각 추출하였으며, 4,500 rpm에서 15분간 원심분리 후 상등액을 Whatman No. 1 filter paper (Whatman, Maidstone, Kent, UK)를 이용하여 여과하고 동결건조(PVTF20R, Ilshinbase, Dongduchun, Korea)하여 감국 발효 열수 추출물(FCI)을 제조하였다(Fig. 1). 감국 열수 추출(CI)은 시료 20 g을 칭량한 후 증류수 1,000 mL을 첨가한 후 속슬렛 추출장치를 이용하여 90°C에서 6시간씩 환류냉각 추출하였으며, 4,500 rpm에서 15분간 원심분리 후 상등액을 Whatman No. 1 filter paper (Whatman)를 이용하여 여과하고 동결건조하여 실험재료로 사용하였다.

Luteolin 및 luteolin-7-glucoside 분석

각각의 시료를 methanol과 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)를 1:1로 혼합하여 10 mg/mL 농도로 용해한 후 10분간 초음파처리하고 5,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 0.45 µm syringe filter로 여과한 후 분석시료로 사용하였다. Luteolin 및 luteolin-7-glucoside 분석을 위해 표준품은 Sigma-

Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다. 정량을 위한 검량선을 작성하기 위해 각 표준물질이 100 µg/mL이 되도록 혼합 후 희석하여 100, 250 및 1,000 µg/mL 농도로 제작하여 이용하였다. HPLC 분석조건은 Table 1과 같이 시행하였으며, 분석에 사용한 HPLC는 UFLC LC-20AD (Shimadzu, Koyto, Japan)를 사용하였고 검출기는 UV/VIS SPD-20A (Shimadzu)를 이용하여 luteolin 및 luteolin-7-glucoside 함량을 분석하였다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법(Folin와 Denis, 1915)을 변형하여 측정하였다. 각각의 추출물을 10% DMSO에 10 mg/mL 농도로 용해하고 0.2 µm syringe filter를 이용하여 filtering한 후 96 well plate에 20 µL 분주하고 Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich)를 20 µL 첨가한 후 10% Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich)를 20 µL 첨가하였다. 96 well plate에 140 µL의 3차 증류수를 가하고 상온에서 1시간 반응시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀의 함량은 tannic acid (Sigma-Aldrich)를 이용하여 검량선을 작성하고 700 nm에서 측정된 흡광도 값을 대입하여 총 폴리페놀의 함량을 산출하였다.

ABTS radical 소거능

7 mM 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS, 5 mL)와 140 mM potassium peroxodisulfate (88 µL)를 혼합하고 빛이 차단된 실온에서 하루 이상 방치하여 양이온 라디칼을 안정화 시킨 후 stock solution으로 사용하였다. Stock solution을 에탄올로 희석(1:88) 후, 734 nm에서 흡광도가 0.70±0.02가 되도록 조절하여 ABTS solution을 제조하였다. ABTS radical 소거능 측정을 위해 ABTS solution 100 µL와 0.2 µm syringe filter로 filtering하여 각각의 농도로 희석한 시료를 50 µL씩 혼합하여 10 분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였으며, ABTS radical 소거능 측정을 위해 시약은 Sigma-Aldrich에서 구매하여 사용하였다.

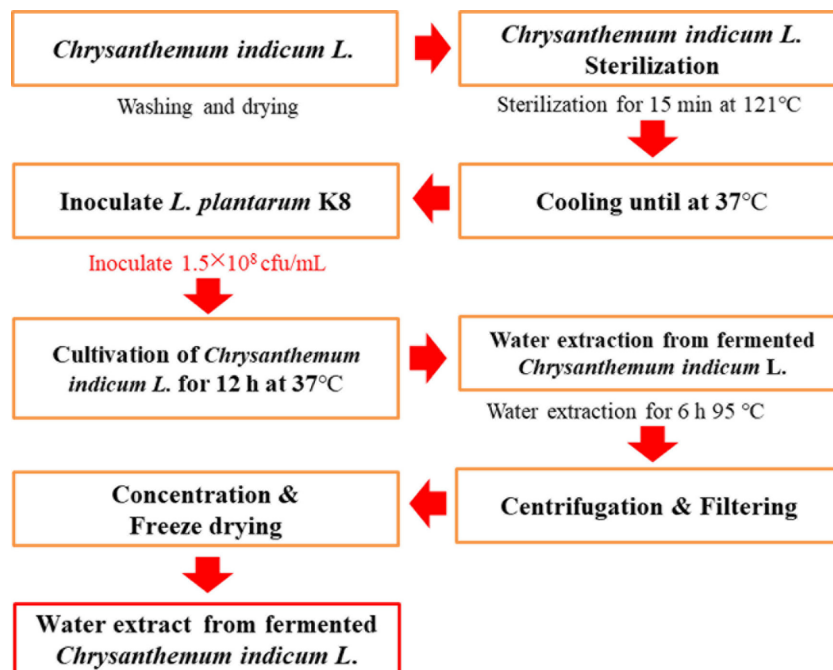


Fig. 1. Process of fermented *Chrysanthemum indicum L.* water extract.

Table 1. The operating condition of HPLC system

Items	Conditions
Column	Prontosil C18 250 × 4.6 mm, 5 μm (Bischoff, Germany)
Column temperature	30°C
Mobile phase	A: 1% Acetic acid in 3 water B: 1% Acetic acid in acetonitrile
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volumn	10 μL
Detection wavelength	350 nm
Gradient condition	0 min: 20% (B), 5 min: 20% (B), 45 min: 60% (B), 48 min: 100% (B), 51 min: 100% (B), 52 min: 20% (B)

DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거활성은 Blois 방법(Blois, 1958)에 따라 측정하였다. 방법을 응용하였다. 150 μM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 100 μL와 각각의 농도로 희석한 FCI 및 CI를 100 μL씩 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, DPPH radical 소거능 측정을 위해 시약은 Sigma-Aldrich에서 구매하여 사용하였다.

세포독성평가

세포독성 평가를 위해 HepG2 세포는(ATCC BB-8065)은 American Type Culture Collection으로부터 구입하여 사용하였다. HepG2 세포를 24 well plate에 2.0×10^5 cells/well 농도로 seeding 하고 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후 phosphate buffer (PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cell을 2회 washing하였으며, 0.2 μm syringe filter로 filtering하여 각각의 농도로 희석한 각각의 추출물을 500 μL씩 24 well plate에 분주하고 48시간 동안 CO₂ incubator에서 추가 배양하였다. 배양 48시간에 CCK-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan)를 50 μL씩 24 well plate에 분주한 후 CO₂ incubator에서 4시간 배양하고 450 nm에서 ELISA reader (Molecular devises, San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

간세포 보호효과

HepG2 세포를 24 well plate에 2.0×10^5 cells/well 농도로 seeding 하고 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후 PBS를 이용하여 cell을 2회 washing하였으며, 0.2 μm syringe filter로 filtering한 후 fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)이 첨가되지 않은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 각각의 농도로 희석한 시료를 500 μL씩 24 well plate에 분주하고 48시간 동안 CO₂ incubator에서 추가 배양하였다. 배양 48시간에 PBS를 이용하여 cell을 2회 washing하고 FBS가 첨가되지 않은 DMEM을 이용하여 3% 농도로 희석한 ethanol을 500 μL씩 24 well plate에 분주한 후 CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 well plate를 5,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 회수하고 생화학분석기(Konelab 20B, Thermo, Vantaa, Finland)를 이용하여 gamma(γ)-glutamyl transferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) 및 lactate dehydrogenase (LDH)를 측정하였다.

통계처리

실험결과는 실험군당 평균(mean)과 표준편차(SD)로 나타내었고, GraphPad prism 4 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA)

를 이용하여 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 실시한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Turkey's multiple comparison test에 의해 각 실험군 평균치 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

감국 발효에 의한 생균수 측정

감국의 원활한 발효를 위해 최종 1.5×10^8 cfu/mL 농도로 *L. plantarum*을 접종 후 37°C에서 배양하면서 12시간 마다 pH 변화를 측정한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 배양 12시간에 pH가 3.5이하로 크게 감소하였으며, 24시간 이후부터 pH 3.3을 유지하였다. 감국 발효에 따른 생균수 변화는 배양 12시간에 생균수가 증가하여 배양 24시간에서 서서히 사멸기로 접어들어 감소하며 배양 48시간에 생균수가 통계 유의적으로 급격하게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3). Yu(2014)는 곰취 열수 추출물에 *L. plantarum*을 접종하여 37°C에서 72시간 배양한 결과 배양 24시간 배양 전에 생균수가 급증하였다가 이 후 pH가 4.9로 감소되며 생균수가 급격히 감소하는 것으로 보고한 바 있다. 또한 Ivan 등(2019)에 의하면 *L. plantarum* 초기접종 농도 1.73×10^8 cfu/mL에서 13시간 쯤 2.66×10^9 cfu/mL으로 본 연구와 유사한 생장 주기를 나타내었다. Choi 등(2020)은 감국 추출물에 유산균 접종 시 모두 사멸되어 항균작용에 저항성을 갖는 유산균을 선발

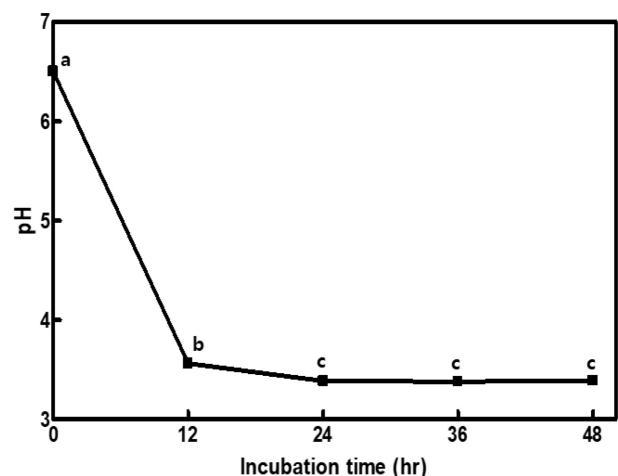


Fig. 2. Changes of pH during the fermentation of *Chrysanthemum indicum* L. by *L. plantarum* at 37°C for 48 h. Values represent the mean±SD (n=3). Different letters means significantly different at $p < 0.05$.

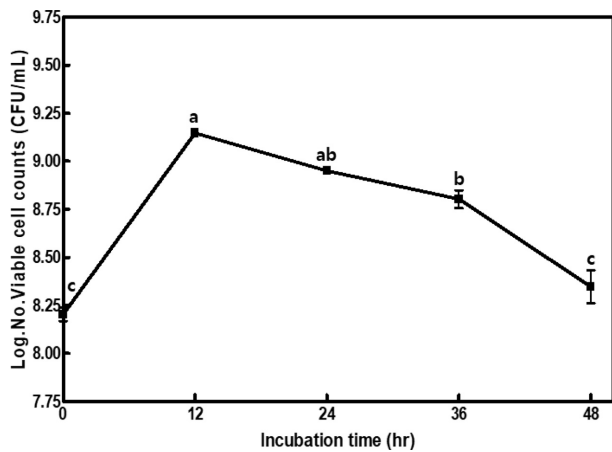


Fig. 3. Changes of viable cell counts during the fermentation of *Chrysanthemum indicum* L. by *L. plantarum* at 37°C for 48 h. Values represent the mean±SD (n=3). Different letters means significantly different at $p<0.05$.

하는 과정을 진행하였지만, 본 연구에 사용된 균주는 감국추출물의 유산균 성장에 영향을 주지 않았다. 이는 같은 종의 유산균이라도 각각의 특성이 다를 수 있으며, 천연물 내에 존재하는 성분 조성 및 추출 조건 등에 따른 유산균의 성장에 영향을 미친 것으로 판단되어진다.

Luteolin 및 luteolin-7-glucoside 분석

Luteolin과 luteolin-7-glucoside는 과일, 올리브, 허브 등 자연에 존재하는 천연 플라보노이드의 일종으로 항염증, 항산화, 항알러지(Hu와 Kitts, 2004; Shukla 등, 2019), 간보호(Lee 등, 2011; Qiusheng 등, 2004) 및 비알코올성 지방간 개선효과가 있는 것으로 보고되었다(Azevedo 등, 2010; Yin 등, 2017). Luteolin 및 luteolin-7-glucoside의 HPLC 분석결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 45분 이내에 luteolin 및 luteolin-7-glucoside가 완전히 분리되었으며, luteolin-7-glucoside, luteolin 순으로 용리되었다. CI와 FCI의 성분 검출 패턴은 거의 유사한 것으로 나타났으나 FCI에서 다소 증가하는 것으로 나타났다. Table 2에서 보는 바와 같이 발효에 의해 luteolin 및 luteolin-7-glucoside가 유의적으로 증가하는 것으로 나타났으며, luteolin-7-glucoside의 경우 CI와 비교하여 약 2.0배 증가하는 것으로 나타났다($p<0.05$).

총 폴리페놀 함량

FCI가 함유하고 있는 총 폴리페놀 함량은 60.71 mg gallic acid

Table 2. Content of luteolin and luteolin-7-glucoside of CI and FCI

Samples	Content (mg/g)	
	Luteolin	Luteolin-7-glucoside
CI ¹⁾	1.96±0.04 ³⁾⁴⁾	3.85±0.12 ^a
FCI ²⁾	2.27±0.02 ^b	8.02±0.20 ^b

¹⁾*Chrysanthemum indicum* L. water extract.
²⁾Fermented *Chrysanthemum indicum* L. water extract.
³⁾Mean±SD
⁴⁾Values with the different superscripts within the same column are significantly different $p<0.05$.

Table 3. Total phenolic contents of CI and FCI

Samples	Phenolic contents (mg GAE ³⁾ /g)
CI ¹⁾	51.54±1.11 ⁴⁾
FCI ²⁾	60.71±0.35

¹⁾*Chrysanthemum indicum* L. water extract.
²⁾Fermented *Chrysanthemum indicum* L. water extract.
³⁾Gallic acid equivalents
⁴⁾Mean±SD

equivalents (GAE)/g이었으며, CI의 폴리페놀 함량은 51.54 mg GAE/g인 것으로 확인되었다(Table 3). 폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포하는 대사산물로 다양한 구조와 분자량을 가지고 있으며, 환분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl기를 갖으며, 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하여 항암 및 항산화 효과와 같은 다양한 생리활성기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Lee 등, 2008). 효모를 이용하여 천마를 발효할 경우 총 폴리페놀 함량이 3배 이상 증가하였으며, 더덕을 발효할 경우 총 폴리페놀 함량이 2배 이상 증가한다고 보고하였고(Park 등, 2012; Park 등, 2010), Lee 등(2014)은 유산균 발효에 의해 마늘 추출물의 페놀 화합물의 함량이 1.9배 증가한다고 보고하였다. 본 연구결과에서도 발효에 의한 폴리페놀 함량의 증가를 확인하였으나 폴리페놀의 함량 증가에 있어 각 연구결과마다 차이를 보이는 것은 발효기질, 발효균주, 균주접종 농도 및 발효시간 등과 같은 발효조건에 의한 것으로 사료된다.

ABTS radical 소거능

감국 발효 전과 후의 ABTS radical 소거능을 비교한 결과는 Table 4와 같다. CI의 ABTS radical 소거능은 추출물의 농도가 50, 100, 200 및 400 µg/mL의 범위에서 각각 5.69, 8.52, 18.88, 34.27%의 소거율을 보였으나 같은 농도의 범위에서 FCI의 경우

Table 4. ABTS radical scavenging activity of CI and FCI

Samples	ABTS radical scavenging activity (%)			
	Concentration (µg/mL)			
	50	100	200	400
CI ¹⁾	5.69±0.59 ⁴⁾	8.52±1.60	18.88±1.12	34.27±0.71
FCI ²⁾	7.30±0.53	15.55±1.00	28.30±1.81	44.48±1.98
AA ³⁾	≥99.99	≥99.99	≥99.99	≥99.99

¹⁾*Chrysanthemum indicum* L. water extract.
²⁾Fermented *Chrysanthemum indicum* L. water extract.
³⁾Ascorbic acid (positive control).
⁴⁾Mean±SD

Table 5. DPPH radical scavenging activity of CI and FCI

Samples	DPPH radical scavenging activity (%)			
	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	50	100	200	400
CI ¹⁾	4.66 \pm 4.69 ⁴⁾	7.19 \pm 3.69	14.66 \pm 5.47	27.87 \pm 4.69
FCI ²⁾	6.03 \pm 1.82	12.25 \pm 1.96	26.18 \pm 1.97	41.05 \pm 3.09
AA ³⁾	74.35 \pm 4.84	93.35 \pm 0.71	93.80 \pm 0.36	94.29 \pm 0.08

¹⁾*Chrysanthemum indicum* L. water extract.

²⁾Fermented *Chrysanthemum indicum* L. water extract.

³⁾Ascorbic acid (positive control).

⁴⁾Mean \pm SD

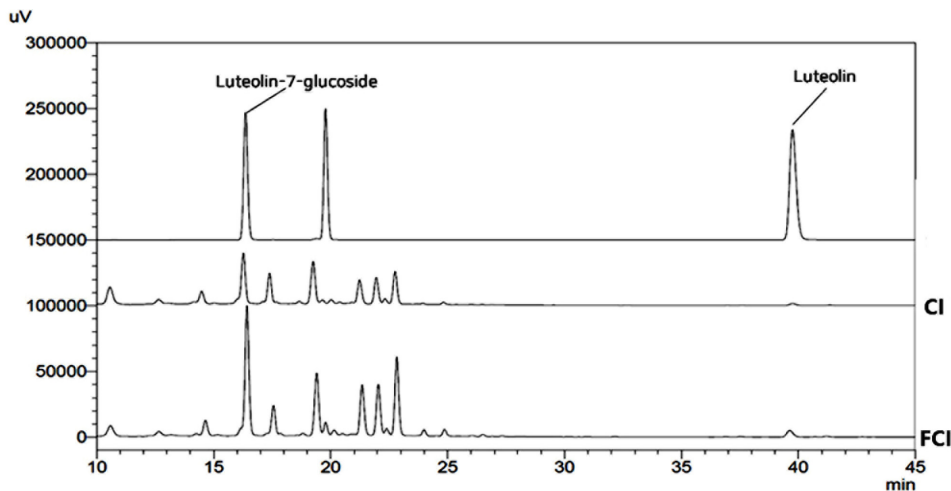


Fig. 4. HPLC chromatogram of luteolin and luteolin-7-glucoside of CI and FCI. CI: *Chrysanthemum indicum* L. water extract, FCI: Fermented *Chrysanthemum indicum* L. water extract.

각각 7.30, 15.55, 28.30, 44.48%로 CI와 비교하여 증가하는 것으로 나타났다. Kang 등(2011)은 추출물의 농도 500 mg/mL에서 꾸지뽕 추출물의 경우 77.80%의 소거능을 보였으며, 발효 꾸지뽕 추출물의 경우 90.01%의 소거능을 보였다고 보고한 바 있다. Park 등(2012)은 천마 추출물과 발효 천마 추출물을 16 mg/mL 처리하였을 때 ABTS radical 소거능은 30.32% 및 46.21%로 발효 천마에서 높은 radical 소거능이 증가한다고 보고하였다. 감국 열수 추출물 및 발효물의 경우 매우 낮은 농도에서도 매우 높은 ABTS radical 소거능을 확인할 수 있었으며, 이는 높은 폴리페놀 함량에서 기인된 것으로 사료된다.

DPPH radical 소거능

CI와 FCI의 DPPH radical 소거능을 비교한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. DPPH radical 소거능 역시 ABTS radical 소거능을 비교한 결과와 유사하게 CI의 농도가 50, 100, 200 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 각각 4.66, 7.19, 14.66, 27.87%의 DPPH radical 소거능 보였으나 같은 농도의 범위에서 FCI의 경우 각각 6.03, 12.25, 26.18, 41.05%로 CI와 비교하여 증가하는 것으로 나타났다. Jeon 등(2011)은 인삼 열매 추출물과 발효 인삼 열매 추출물을 0.1, 1.0% 처리시 각각 24.85, 49.78%에서 54.30, 86.36%로 활성능이 증가한다고 보고한 바 있다. 본 연구에서도 발효에 의해 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였음을 확인할 수 있었으며, 천연물 내에 존재하는 것으로 알려진 페놀성분이 free radical을

효과적으로 제거하지만 radical의 기질에 따라 선택적으로 작용하는 페놀성분이 존재하기 때문에 ABTS와 DPPH radical 소거 활성이 차이를 보이는 것으로 사료된다.

세포독성측정

세포독성은 세포독성을 갖는 물질을 세포에 처리시 세포의 사멸을 유도하기 때문에 각종 기능성 소재의 사용 가능여부를 판단하는 기초자료로 활용된다. CI와 FCI의 농도별 첨가에 따른 HepG2 세포의 생존율은 각각의 추출물을 48시간 처리하였을 때 모든 농도에서 세포독성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 5). Choi 등(2020)은 3T3-L1 세포주 감국 추출물 및 발효물을 처리하여 세포독성을 확인한 결과 감국 추출물 및 발효물의 세포독성은 모두 확인되지 않았으며, 1,000 ppm 처리 시 오히려 세포주의 증식을 유도하였고, 세포독성은 없다고 보고하였다.

간세포 보호효과

HepG2 세포에 에탄올을 처리하여 간독성을 유발하여 FCI의 간세포 보호효과를 알아보았다(Table 6). 간질환이나 알코올성 간질환에서 증가하는 GGT의 활성을 측정한 결과 에탄올을 처리한 모든 처리구에서 유의하게 GGT 활성이 증가하였으나 FCI는 100 $\mu\text{g/mL}$ (6.49 U/L) 이상, CI의 경우 200 $\mu\text{g/mL}$ (6.12 U/L) 처리구에서 대조구(7.62 U/L)와 비교하여 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 간염, 간 경변 등의 지표로 널리 사용되는 AST의 활성

Table 6. Effects of CI and FCI on the GGT, AST, and LDH activities in Hep G2 cell treated with 3% ethanol

Samples	GGT ¹²⁾	AST ¹³⁾	ALT ¹⁴⁾	LDH ¹⁵⁾
Normal ¹⁾	4.66±0.18 ^{10)d11)}	47.96±0.37 ^d	0.35±0.02 ^c	335.33±1.93 ^c
Control ²⁾	7.62±0.27 ^{ab}	160.43±3.45 ^a	4.62±0.35 ^a	1267.79±10.87 ^a
SM-50 ³⁾	5.91±0.09 ^c	125.99±1.24 ^c	2.88±0.17 ^d	943.56±27.12 ^b
CI-50 ⁴⁾	7.14±0.32 ^{ab}	147.43±11.84 ^{ab}	4.30±0.42 ^{ab}	1194.83±107.43 ^a
CI-100 ⁵⁾	8.02±0.21 ^{ab}	146.12±1.68 ^{ab}	3.72±0.19 ^{bc}	1266.72±35.57 ^a
CI-200 ⁶⁾	6.12±0.24 ^c	132.12±3.89 ^{bc}	2.94±0.12 ^{cd}	1154.10±38.14 ^{ab}
FCI-50 ⁷⁾	8.12±0.19 ^b	148.62±5.06 ^{ab}	3.78±0.08 ^{bc}	1280.98±52.97 ^a
FCI-100 ⁸⁾	6.49±0.45 ^c	135.93±5.04 ^{bc}	3.22±0.21 ^{cd}	1242.91±109.94 ^a
FCI-200 ⁹⁾	6.44±0.15 ^c	118.78±2.50 ^c	2.93±0.10 ^d	1019.01±18.29 ^b

¹⁾Not treated.
²⁾3% ethanol.
³⁾Silymarin (positive control) 50 µg/mL and 3% ethanol.
⁴⁾*Chrysanthemum indicum* L. water extract 50 µg/mL and 3% ethanol.
⁵⁾*Chrysanthemum indicum* L. water extract 100 µg/mL and 3% ethanol.
⁶⁾*Chrysanthemum indicum* L. water extract 200 µg/mL and 3% ethanol.
⁷⁾Fermented *Chrysanthemum indicum* L. water extract 50 µg/mL and 3% ethanol.
⁸⁾Fermented *Chrysanthemum indicum* L. water extract 100 µg/mL and 3% ethanol.
⁹⁾Fermented *Chrysanthemum indicum* L. water extract 200 µg/mL and 3% ethanol.
¹⁰⁾Mean±SD
¹¹⁾Different letters means significantly different at $p<0.05$.
¹²⁾GGT, gamma(γ)-glutamyl transferase
¹³⁾AST, aspartate aminotransferase
¹⁴⁾ALT, alanine aminotransferase
¹⁵⁾LDH, lactate dehydrogenase

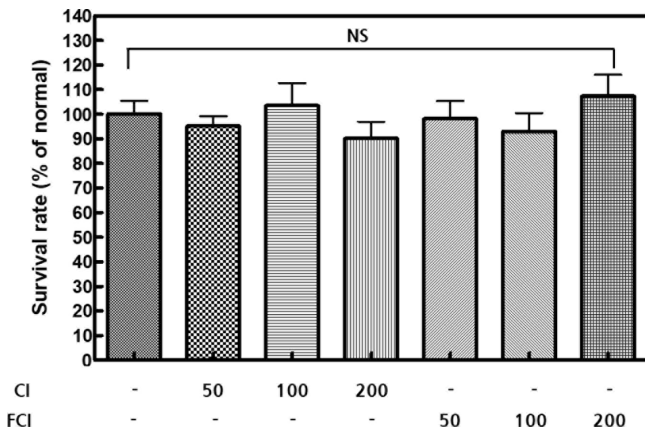


Fig. 5. Percentage of HepG2 cells viability at various concentration of *Chrysanthemum indicum* L. water extract (CI) and fermented *Chrysanthemum indicum* L. water extract (FCI) during 48 h. Values represent the mean±SD (n=3). NS means not significantly different at $p<0.05$.

을 측정된 결과 FCI를 100 µg/mL (135.93 U/L) 이상 처리한 처리구에서는 AST 대조구(160.43 U/L)와 비교하여 유의하게 감소하였으며, CI의 경우 200 µg/mL 처리구(132.12 U/L)에서 대조구와 비교하여 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 특히 FCI 200 µg/mL (118.78 U/L)의 경우 Silymarin (SM)을 50 µg/mL (125.99 U/L) 처리했을 때 보다 더 좋은 활성을 나타내었다. 간염과 간괴사, 간 경변 등으로 인해 활성이 증가하는 것으로 알려진 ALT의 활성을 측정된 결과 CI를 200 µg/mL (2.94 U/L) 처리하였을 때 대조구(4.62 U/L)와 비교하여 유의하게 감소하는 것으로 나타났으나, FCI를 처리한 모든 처리구에서 대조구와 비교하여 유의하게 ALT 활성이 유의하게 감소하였다. 간세포로부터 유리되어 증

가하고 독성간염에서 약 10배 정도 증가하는 것으로 알려진 LDH 활성을 측정된 결과 FCI를 200 µg/mL 처리한 처리구(1019.01 U/L)에서만 대조구(1267.79 U/L)와 비교하여 유의하게 효소활성이 감소하는 것을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 발효한 감국 발효 열수 추출물의 luteolin 및 luteolin-7-glucoside 함량, 항산화 활성 및 간세포 보호효과를 비교 분석함으로써 발효에 의한 활성차이를 분석하였다. 감국 내 luteolin 및 luteolin-7-glucoside 함량은 발효 전과 비교하여 유의하게 증가하였고 총 폴리페놀 함량 역시 발효 전보다 증가하는 것으로 나타났다. 유산균 발효에 의해 ABTS radical 소거능은 추출물의 농도가 50, 100, 200 및 400 µg/mL의 범위에서 7.30, 15.55, 28.30, 44.48%로 감국 열수 추출물과 비교하여 증가하는 것으로 나타났다. DPPH radical 소거능 역시 ABTS radical 소거능을 비교한 결과와 유사하게 같은 농도의 범위에서 감국 발효 열수 추출물의 경우 각각 6.03, 12.25, 26.18, 41.05%로 감국 열수 추출물과 비교하여 증가하는 것으로 나타났다. HepG2 세포에 감국 열수 추출물과 감국 발효 열수 추출물을 처리한 후 48시간 배양한 결과 모든 처리구에서 세포독성이 없는 것으로 나타났다. HepG2 세포에 에탄올을 처리하여 간독성을 유발한 결과 에탄올 처리한 모든 처리구에서 GGT, AST, ALT 및 LDH 활성이 증가하였고, 감국 발효 열수 추출물을 100 µg/mL을 처리하였을 때 대조구와 비교하여 GGT, AST 및 ALT 활성이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며, LDH 활성은 감국 발효 열수 추출물을 200 µg/mL을 처리하였을 때 대조구와 비교하여 감소하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 감국 발효 열수 추출물은 luteolin 및 luteolin-7-glucoside 함량 증가, 항산화 활성 증가 및 GGT, AST, ALT, LDH의 활성을 감소시킴으로써 에탄올에 의한 간 손

상을 예방하는 것으로 사료되며, 동물실험을 통한 추가적인 간 기능개선 검증이 필요하다고 판단된다.

References

- Azevedo MF, Camsari C, Sá CM, Lima CF, Ferreira FM, Wilson PC. Ursolic acid and luteolin-7-Glucoside improve lipid profiles and increase liver glycogen content through glycogen synthase kinase-3. *Phytother. Res.* 24: S220-S224 (2010)
- Blois MS. Antioxidant activity determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 181: 1199-1200 (1958)
- Byers T and Perry G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu. Rev. Nutr.* 12: 135-159 (1992)
- Choi JY, Lim JS, Sim BR, Yang YH. Inhibitory Effect of Lactic Acid Bacteria-fermented *Chrysanthemum indicum* L. on Adipocyte Differentiation through Hedgehog Signaling. *J. Life Sci.* 30: 532-541 (2020)
- De Pasquale I, Pontonio E, Gobetti M, Rizzello CG. Nutritional and functional effects of the lactic acid bacteria fermentation on gelatinized legume flours. *Int. J. Food Microbiol.* 316: 108426 (2020)
- Folin AD and Denis W. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.* 22: 305-308 (1915)
- Gupta R, Jeevaratnam K, Fatima A. Lactic acid bacteria: probiotic characteristic, selection criteria, and its role in human health. *J. Emerg. Technol. Innov. Res.* 5: 411-423 (2018)
- Hu C and Kitts DD. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 265: 107-113 (2004)
- Hwang SW, Cha JY, Lee HY, Kim BR, Park M, Lee BR, Moon KH, Lee JH, Kim DG, Kim W, Jeong, KO, Lee YM. Antioxidant activity and inhibition activity against α -Glucosidase and PTP1B of *Chrysanthemum indicum* L. extract and fractions. *J. East Asian Soc. Diet Life.* 27: 235-242 (2017)
- Ivan K, Vera K, Dani D, Leona B, Monika V, Amedeo A. Hydrogen sulfide effects on the survival of *Lactobacilli* with emphasis on the development of inflammatory bowel diseases. *Biomolecules.* 9: 752 (2019)
- Jeon JM, Choi SK, Kim YJ, Jang SJ, Cheon JW, Lee HS. Antioxidant and antiaging effect of ginseng berry extract fermented by lactic acid bacteria. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.* 37: 75-81 (2011)
- Jung HA, Abdul QA, Byun JS, Joung EJ, Gwon WG, Lee MS, Kim HR, Choi JS. Protective effects of flavonoids isolated from Korean milk thistle *Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum on tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *J. Ethnopharmacol.* 209: 62-72 (2017)
- Jung CH, Han AR, Chung HJ, Ha IH, Um HD. Linarin inhibits radiation-induced cancer invasion by downregulating MMP-9 expression via the suppression of NF- κ B activation in human non-small-cell lung cancer A549. *Nat. Prod. Res.* 33: 3582-3586 (2019)
- Kang DH, Kim JW, Youn KS. Antioxidant activities of extracts from fermented mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit, and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. *Korean J. Food Preserv.* 18: 238-243 (2011)
- Kim OK. Protective effects of extracts of *Diospyrus kaki* *Folium* against hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 97-101 (2001)
- Kim SR, Park MJ, Lee MK, Sung SH, Park EJ, Kim J, Kim SY, Oh TH, Markelonis GJ, Kim YC. Flavonoids of *Inula britannica* protect cultured cortical cells from necrotic cell death induced by glutamate. *Free Radic. Bio. Med.* 32: 596-604 (2002)
- Kong MR, Seo SJ, Han MR, Lee YS. Anti-oxidation and anti-aging activity of three compositae species at different extraction temperatures. *J. Invest. Cosmetol.* 12: 29-37 (2016)
- Lawrence RA and Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 952-958 (1976)
- Lee JY, Chang EJ, Kim HJ, Park JH, Choi SW. Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius*. *Arch. Pharm. Res.* 25: 313-319 (2002)
- Lee KH, Choi, EM. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Ligularia fischeri* leaves in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* 120: 103-107 (2008)
- Lee WC, Jung HA, Choi JS, Kim YS, Lee SM. Protective effects of luteolin against apoptotic liver damage induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide in mice. *J. Nat. Prod.* 74: 1916-1921 (2011)
- Lee HS, Lim WC, Choi JH, Yu HJ, Kim KH, Lee SH, Cho HY. Ameliorating effects of lactic acid-fermented garlic extracts on oleic acid-induced hepatic steatosis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 762-768 (2014)
- Park JH, Lee JK. The Encyclopedia of Medicinal Plants. Shinilbooks Pub, Seoul, Korea, pp. 8 (2000)
- Park SJ, Park DS, Lee SB, He X, Ahn JH, Yoon WB, Lee HY. Enhancement of antioxidant activities of *Codonopsis lanceolata* and fermented *Codonopsis lanceolata* by ultra high pressure extraction. *Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 1898-1902 (2010)
- Park MR, Yoo C, Chang YN, Ahn BY. Change of total polyphenol content of fermented *Gastrodia elata* Blume and radical scavenging. *Korean J. Plant Res.* 25: 379-386 (2012)
- Qiusheng Z, Xiling S, Xubo, Gang L, Meng S, Changhai W. Protective effects of luteolin-7-glucoside against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. *Int. J. Pharm.* 59: 286-288 (2004)
- Ryu SY, Choi SU, Lee SH, Ahn JW, Zee OP. Antitumor activity of some phenolic components in plants. *Arch. Pharm. Res.* 17: 42-44 (1994)
- Shukla R, Pandey V, Vadrere GP, Lodhi S. Role of Flavonoids in Management of Inflammatory Disorders. Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy (Editor), pp. 293-322 (2019)
- Van Thiel DH, Brems J, Nadir A, Idilman R, Colantoni A, Holt D, Edelstein S. Liver transplantation for fulminant hepatic failure. *J. Gastroenterol.* 13: 78-81 (2002)
- Wang LC, Pan TM, Tsai TY. Lactic acid bacteria-fermented product of green tea and *Houttuynia cordata* leaves exerts anti-adipogenic and anti-obesity effects. *J. Food Drug Anal.* 26: 973-984 (2018)
- Yoshikawa M, Morikawa T, Toguchida I, Harima S, Matsuda H. Medicinal flowers. II. Inhibitors of nitric oxide production and absolute stereostructures of five new germacrane-type sesquiterpenes, kikkanol D, D monoacetate, E, F and F monoacetate from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. *Chem. Pharm. Bull.* 48: 651-656 (2000)
- Yu KH. Effect of Fermented aqueous extracts from *Ligularia fischeri* leaves by using lactic acid bacteria on improving liver function. Ph.D Thesis, Kangwon University, Korea, pp. 39-45 (2014)
- Yu KH, Lee SY, Yang HM, Ham HA, Lee SU, Chae SW, Lee YJ. Effects of the *Artemisia capillaris* extract on the hepatotoxicity in ethanol-induced rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1560-1566 (2013)
- Yin Y, Gao L, Lin H, Wu Y, Han X, Zhu Y, Li J. Luteolin improves nonalcoholic fatty liver disease in db/db mice by inhibition of liver X receptor activation to down-regulate expression of sterol regulatory element binding protein 1c. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482: 720-726 (2017)
- Zhang A, Sun H, Wang X. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *Eur. J. Med. Chem.* 63: 570-577 (2013)