

## Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Solvent Fractions from the Peel of the Native Jeju Citrus 'Hongkyool' and 'Pyunkyool'

Ju Mi Hyun<sup>1†</sup>, Kyung Jin Park<sup>1</sup>, Sang Suk Kim<sup>1</sup>, Suk Man Park<sup>1</sup>, Young Jae Lee<sup>2</sup> and Hyun Joo An<sup>1†\*</sup>

<sup>1</sup>Citrus Research Institute, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Jeju 63607, Korea

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 102, Korea

Received August 20, 2015 / Revised September 24, 2015 / Accepted September 30, 2015

This study investigated the anti-oxidative and anti-inflammatory activity of unripe fruit peel solvent fractions of the native jeju citrus 'Hongkyool' (*Citrus tachibana* Tanaka) and 'Pyunkyool' (*C. tangerina* Hort. ex Tanaka). The total polyphenol content and total flavonoid content were highest in the butanol fraction of both 'Hongkyool' (534.4 mg/g, 431.8 mg/g) and 'Pyunkyool' (342.9 mg/g, 415.7 mg/g). In both cultivars, the butanol fraction showed the strong antioxidant activity by DPPH radical scavenging and ABTS radical scavenging. The DPPH radical scavenging of the butanol fraction from 'Hongkyool' and 'Pyunkyool' was 89% and 64% at a concentration of 1 mg/ml, respectively. The ABTS radical scavenging of the butanol fraction from 'Hongkyool' and 'Pyunkyool' was 94% and 85% at a concentration of 1 mg/ml, respectively. We investigated the effect of the anti-inflammatory activity of the ethyl acetate fraction from 'Hongkyool' and 'Pyunkyool' on LPS-induced NO production, IL-6, iNOS, and COX-2 protein expression in Raw 264.7 cells. At concentrations of 50 and 100 µg/ml of the 'Hongkyool' ethyl acetate fraction, the anti-inflammatory effect was excellent. These results suggest that ethyl acetate and butanol fractions from 'Hongkyool' and 'Pyunkyool' could be useful functional materials, with anti-oxidative and anti-inflammatory properties.

**Key words** : Anti-oxidative, anti-inflammatory, citrus, Hongkyool, Pyunkyool

### 서론

감귤은 운향과 감귤아과에 속하는 식물로써 예로부터 궁중에 진상되었으며 생식뿐만 아니라 한약재로도 활용도가 높은 과일이다. 비타민 C, 유기산, 당류 등의 일반 성분 외에 essential oil, flavonoids, carotenoids, coumarins, limonoids 등 약 60여종의 생리활성물질을 함유하고 있으며, 이 중에는 hesperidin, naringin 및 감귤 특유의 tangeretin, nobiletin과 같은 polymethoxylated flavones (PMFs)를 가지는 것으로 보고되어 있다. 특히 이러한 생리활성 물질은 과육보다果皮에 많이 함유되어 있으며 기능성에 대한 평가로서 항산화 작용, 순환계 질병의 예방, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 혈중지질 저하작용, 면역증강작용, 모세혈관 강화작용 등이 보고된 바 있다[9, 18, 20].

인체는 산화촉진물질(pro-oxidant)과 산화억제물질(anti-oxidant)이 균형을 이루고 있으나 여러 가지 요인들에 의하여

이런 균형상태가 불균형을 이루게 되고 산화촉진 쪽으로 기울게 되면, 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되어 잠재적인 세포손상 및 병리적 질환을 일으키게 된다. 이러한 산화적 스트레스의 직접적 원인이 되는 활성 산소 종(reactive oxygen species, ROS)은 불안정하고 반응성이 높아 여러 생체물질과 쉽게 반응하고, 체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키거나 돌연변이, 세포독성 및 발암 등을 초래하게 된다[19]. 염증반응 또한 체내에서 발생한 산화스트레스에 의해 촉진되는데, 내독소의 하나인 lipopolysaccharide (LPS)는 Raw 264.7 macrophage에서 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β)와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키며, nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 등의 염증매개물질을 분비한다. 염증상태에서는 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 NO synthase (NOS)가 유도되어 과량의 PGE<sub>2</sub>, NO 등이 생성되며 여러 가지 질병 및 암 발병이 촉진된다. 특히 NO를 생성하는 효소인 NOS와 다양한 prostaglandins (PGs)의 생합성을 매개하는 효소인 cyclooxygenase (COX)가 염증반응을 조절하는 중요한 매개체로 알려져 있다[13].

생체는 활성산소로부터 세포손상을 방지하고 항상성을 유지하기 위하여 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase 등과 같은 항산화 효소를 분비한다. 비효소적 항산화 물질에는 L-ascorbic acid, tocopherol과 같은 천연 항산화제와 BHT, BHA와 같은 합성 항산화제가 있는데, 합성

<sup>†</sup>Authors contributed equally.

\*Corresponding author

Tel : +82-64-730-4107, Fax : +82-64-730-4111

E-mail : hjan67@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

항산화제는 높은 활성과 경제성이 있으나 독성으로 인한 안전성의 문제가 있어서 독성과 부작용이 적은 각종 생약제나 과일, 채소 등을 이용하여 천연물 유래 항산화제, 염증질환 치료제 개발과 관련된 연구가 진행되고 있다[5]. 따라서, 본 실험에서는 제주 재래종 감귤 2종 용매 분획물의 항산화 및 항염증 효과를 검증하여 천연물 유래 소재로서의 가능성을 확인하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용된 감귤 품종은 제주 재래 감귤 '홍귤'(Hongkyool, *C. tachibana* Tanaka) 및 '편귤'(Pyunkyool, *C. tangerina* Hort ex Tanaka)로 제주특별자치도 서귀포시 감귤연구소 포장에서 재배된 과실을 2014년 9월 16일에 수확하여 사용하였다. 수확한 과실은 선별 및 세척 후 과피와 과육을 분리하고, 과피를 60°C 건조기에서 12~48시간 건조시킨 후 분쇄하여 사용하였다.

### 시료 추출

각 품종별 과피 추출물은 과피 건조 분말 20 g에 70% 메탄올 1 l를 가하여 3시간씩 3회 추출 한 다음 추출액을 여과한 후 감압농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하였고 동결 건조하여 추출 수율을 측정하였다. 동결건조물 일정량을 취하여 증류수 1 l로 재 용해하여 hexane (1 l×3회), ethyl acetate (1 l×3회)와 butanol (1 l×3회)을 순차적으로 가하여 분획물을 얻었고 최종 남은 용액을 물 분획물이라 칭하였으며, 이 분획물들은 감압농축 한 후 동결 건조하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 추출 수율은 n-hexane 분획물(홍귤 2.6%, 편귤 2.2%), ethyl acetate 분획물(10.7%, 8.8%), n-butanol 분획물(21.3%, 26.1%), 물 분획물(63.8%, 65.8%)이었다.

### 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis [4]을 이용하여 비색 정량하였다. 추출물 100 µl에 증류수 900 µl를 넣어 total volume이 1 ml가 되도록 희석하였다. 여기에 Folin-ciocalteus' phenol reagent 100 µl를 첨가하여 실온에서 약 3분간 반응시키고, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액(7%, w/v) 200 µl를 가하여 혼합한 후 증류수 700 µl를 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. UV-Spectrophotometer (Molecular devices, SpectraMax M2, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 720 nm에서 흡광도 측정을 통해 분석되었으며, 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 작성한 표준검정곡선을 통해 추출물의 총 폴리페놀 함량을 나타내었다.

### 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법[15]을 이용하여

비색 정량하였다. 추출물 15 µl에 diethylene glycol 150 µl, 1 N NaOH 15 µl를 첨가하여 혼합한 후 상온에서 1시간 반응시키고 UV-Spectrophotometer를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 표준물질로 하여 작성한 표준검정곡선을 통해 추출물의 총 플라보노이드 함량을 나타내었다.

### DPPH 라디칼 소거능 측정

항산화 활성은 변형된 Blois 등의 방법[1]을 이용하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical에 대한 전자공여능(Electron donating ability, EDA)을 측정하였다. 추출물의 전자공여능 측정을 위해, 시료 20 µl에 0.2 mM DPPH 용액 180 µl를 넣고 10분간 반응시킨 후 UV-Spectrophotometer를 사용하여 잔존하는 DPPH free radical을 517 nm에서 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

### ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS radical 소거활성은 Pellegrini 등의 방법[17]에 따라 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합 후 실온 암소에서 15시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 되도록 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 180 µl에 추출물 20 µl를 가하여 실온에서 15분 동안 방치한 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

### 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7은 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양 받아 1% Penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양 하였다. Lipopoly-saccharide (LPS, *E. coli* serotype 0111:B4)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 세포독성 측정

Raw 264.7 cell (1.5×10<sup>5</sup> cells/ml)을 18시간 전 배양하고 홍귤, 편귤의 에틸아세테이트 분획물과 LPS (1 µg/ml)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후, 3-(4,5dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 100 µg을 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 200 µl를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 for-

mazan 침전물을 용해시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 성장억제 정도를 조사하였다.

### Nitric oxide (NO) 측정

Raw 264.7 cell ( $1.5 \times 10^6$  cells/ml)을 18시간 전 배양 후, 홍굴, 편굴의 에틸아세테이트 분획물과 LPS (1 µg/ml)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub> 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 µl와 Griess 시약 [1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) nathylethylenediamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid] 100 µl를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 염증성 cytokine 측정

Raw 264.7 cell ( $1.5 \times 10^6$  cells/ml)을 24시간 배양 후, LPS를 1 µg/ml로 처리하여 cytokine 생성을 자극하고 동시에 홍굴, 편굴의 에틸아세테이트 분획물을 농도 별로 처리하였다. 24시간 배양 후 상등액을 취하여, 각각 BD Bioscience사(CA, USA)의 mouse IL-6 ELISA kit를 사용하여 정량하였다.

### iNOS, COX-2 단백질 발현량 측정

세포의 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현을 Western blot analysis로 확인하였다. Raw 264.7 cell ( $1.0 \times 10^6$  cells/ml)을 18시간 전 배양 후, LPS (1 µg/ml)와 홍굴, 편굴의 에틸아세테이트 분획물을 농도 별로 동시 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하고 400 µl의 lysis buffer (Pro-prep, Intron biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)를 가하여 균질화 한 후, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준용액으로 하여 Bradford reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)로 정량 하였다. 동일한 양의 단백질(20 µg/sample)을 SDS-PAGE (polyacry-

lamide gel electrophoresis)로 전기영동 한 후, gel transfer device (iBlot®, Life technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 PVDF membrane으로 단백질을 transfer하였다. 1차 항체인 NOS2, COX-2 및 β-actin과 2차 항체인 HRP가 결합된 anti-rabbit IgG는 모두 Santa Cruz Biotechnology사의 제품을 사용하였다. ECL 기질(West-zol, Intron biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)과 반응 시킨 후, Chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT, Deutschland, Germany)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

### 통계분석

모든 실험은 3회 반복으로 이루어졌으며 실험결과는 SAS package (version 9.2, Cary, NC, USA)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타냈다. 각 실험군의 유의적 차이가 있는 항목은 Duncan's Multiple Range Test에 의하여  $p < 0.05$  수준에서 통계적 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정

Citrus류의 과피나 종자에는 페놀산과 flavonoids와 같은 페놀화합물들이 많이 함유되어 있으며, 종자나 과육보다 과피에 더 많이 함유되어 있음이 보고되었다[11]. 페놀계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl (OH)기를 가진 방향족 화합물들을 가리키며, 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 충치예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다 [10]. 각 분획물에 함유된 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 홍굴, 편굴 모두 부탄올 분획물에서 총 페놀성 화합물의 함량이 각각 534.4 mg/g, 342.9 mg/g으로 가장 높았으며, 그 다음으로 에틸아세테이트, 헥산, 그리고 물 분획물 순이었다. 총 플라보노이드 함량에 있어서도 부탄올 분획물에서 홍굴 431.8 mg/g, 편굴 415.7

Table 1. Total phenolic content and total flavonoid content of solvent fractions from Citrus peels

Cultivar	Solvent fraction	Total phenolic content (mg/g, GAE)	Total flavonoids content (mg/g, QE) <sup>1)</sup>
Hongkyool	Hexane	186.79±0.7c	51.47±1.5c <sup>2)</sup>
	Ethyl acetate	470.61±1.0b	217.56±0.9b
	Butanol	534.41±4.2a	431.85±9.6a
	Water	123.63±1.5d	48.87±2.8c
Pyunkyool	Hexane	225.09±3.5c	115.65±13.3b
	Ethyl acetate	334.33±4.1b	393.57±34.4a
	Butanol	342.91±2.7a	415.74±0.5a
	Water	60.42±0.2d	20.13±0.3c

<sup>1)</sup>GAE; gallic acid equivalent, QE; quercetin equivalent.

<sup>2)</sup>Results are mean±SD (n=3). Values followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

mg/g으로 가장 높게 나타났으며 에틸아세테이트, 헥산, 물 분획물 순으로 조사되었다.

**항산화 효능 측정**

**DPPH 라디칼 소거능 측정**

항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 DPPH 라디칼 소거활성은 비교적 간단하면서 대량으로 측정이 가능한 항산화 측정법이다. DPPH는 라디칼 중 비교적 안정한 화합물로 황 함유 아미노산, ascorbic acid, 페놀성 화합물 등의 항산화 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 DPPH-H로 환원되면서 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있는 동시에 식물체의 항산화 활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되고 있는 방법이다[8]. 홍굴, 편굴 과피 추출물의 유기 용매 분획에 따른 DPPH 라디칼 소거 활성은 Fig. 1과 같다. 홍굴의 경우 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/ml 의 시료 처리에 의해 DPPH 라디칼 소거능이 헥산 분획물은 1.65, 3.01, 4.99, 5.93, 16.14%, 에틸아세테이트 분획물은 16.49, 23.31, 42.44, 61.73, 84.70%, 부탄올 분획물은 26.38, 40.61, 71.65, 88.15, 89.19%, 물 분획물은 5.24, 5.63, 17.05, 24.90, 53.26%을 보여 부탄올 분획물이 가장 활성이 높음을 알 수 있었다. 반면 헥산 분획물과 물 분획물은 50% 이하의

낮은 활성을 보였다. Hyon 등[6]은 재래 감귤 중 진굴과 온주밀감, 하귤 과피 추출물의 DPPH 소거능을 측정한 결과 시료 1 mg/ml농도에서 진굴의 경우 67.8%, 온주밀감 82.8%, 하귤 86.3%의 소거활성을 나타낸다고 하였다. 본 연구결과 홍굴 부탄올 분획물 1 mg/ml 시료 처리 시 DPPH 라디칼 소거능이 89.19%로써 진굴 과피 추출물 보다 높은 항산화 효과가 있음을 알 수 있었다. 편굴의 경우 홍굴과 마찬가지로 부탄올 분획물이 DPPH 라디칼 소거능이 가장 높았으나, 편굴은 전체적으로 DPPH 라디칼 소거 활성이 낮은 것을 알 수 있었다. Cho 등[2]은 식물추출물의 DPPH 라디칼에 대한 소거활성은 phenolic content와 밀접한 관계가 있으며 특히 플라보노이드 보다는 폴리페놀 성분에 의해서 항산화 활성이 나타난다고 보고 했는데, 본 실험의 결과에서도 편굴 부탄올 분획물, 에틸아세테이트 분획물 모두 DPPH 라디칼 소거능이 낮은 것은 두 분획물이 폴리페놀 함량 보다는 플라보노이드 함량이 높은 것과 관련이 있을 것으로 판단된다.

**ABTS 라디칼 소거능 측정**

ABTS는 비교적 안정한 free radical로서 DPPH 방법과 함께 항산화 활성을 스크리닝 하는데 많이 이용되고 있다. 또한 lipophilic 또는 hydrophilic 항산화 물질의 측정에 적용 가능한 방법으로 이 방법에 의한 항산화 활성은 ABTS radical을 억제하거나 소거하는 것에 의해 이루어진다[12]. 홍굴과 편굴 과피 용매 분획물에 따른 ABTS 양이온 소거능 측정 결과는 Fig. 2와 같다. 홍굴, 편굴 모두 부탄올 분획물에서 ABTS 양이온 소거능이 가장 우수하였으며, 다음으로 에틸아세테이트 분획물의 활성이 좋았다. 품종 간에는 홍굴의 분획물이 편굴 분획물에 비해 ABTS 양이온 소거능이 우수함을 알 수 있었다.

**항염증 효능 측정**

**세포독성 및 NO 측정**

홍굴, 편굴 과피 분획물의 세포독성을 측정하기 위해 Raw 264.7 macrophage의 세포 생존율을 MTT assay로 분석하였다. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)분석은 탈수소 효소작용에 의해 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색의 formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 세포의 증식과 성장을 알아보는 대표적인 실험방법 중 하나로 살아있는 세포수에 비례해서 흡광도를 나타낸다[3]. 부탄올 분획물은 배당체 등 극성이 큰 물질들이 많이 함유되어 있어 추후 유효성분들을 분리 및 정제하여 신소재로 사용하고자 할 때 어려움이 따르므로 부탄올 분획물 다음으로 활성이 좋았던 에틸아세테이트 분획물을 시료로 사용하여 항염증 효능을 측정하였다. 홍굴, 편굴 에틸아세테이트 분획물의 세포독성을 측정한 결과 (Fig. 3A), 모든 농도에서 90% 이상의 생존율을 보여 세포독성은 나타나지 않는 것으로 확인하였다.

Nitric oxide (NO)는 free radical인 활성 질소 중(reactive

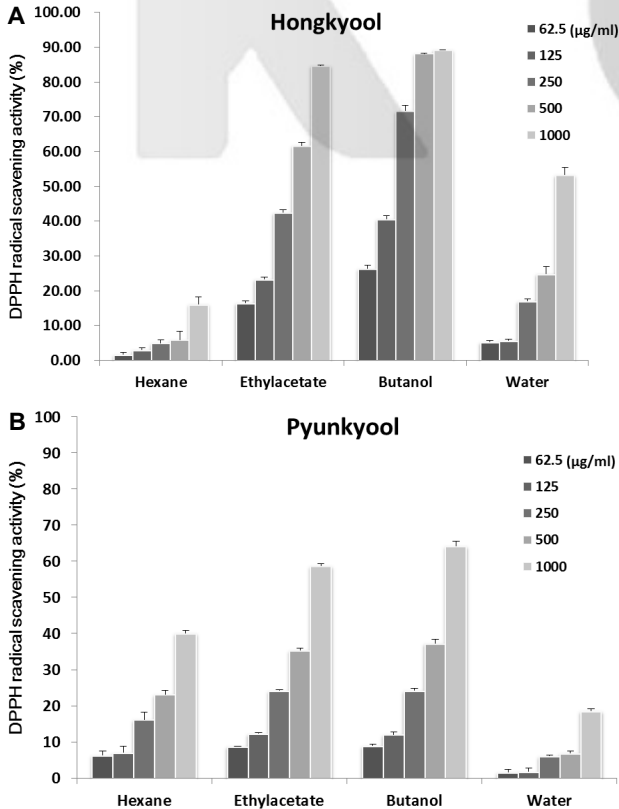


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of four fractions from 'Hongkyool' (A) and 'Pyunkyool' (B) peel. Results are mean±S.D. of triplicate data.

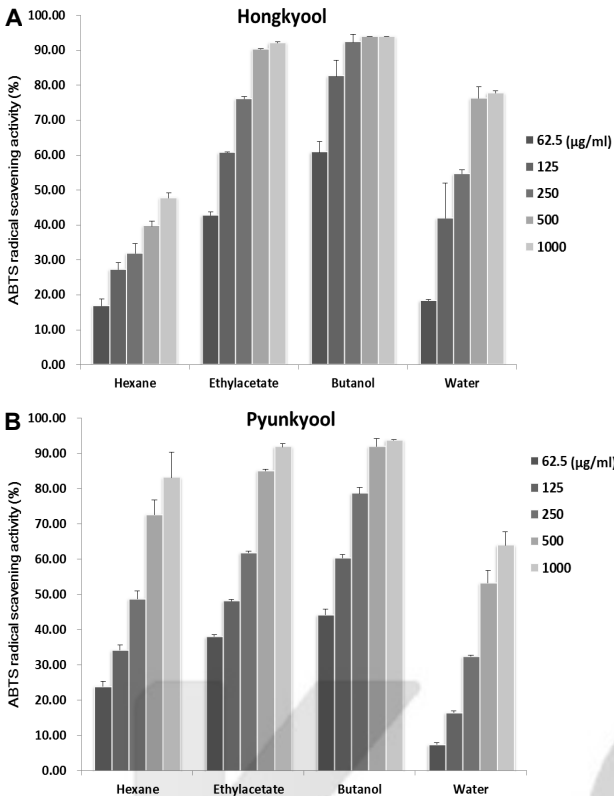


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of four fractions from 'Hongkyool' (A) and 'Pyunkyool' (B) peel. Results are mean±S.D. of triplicate data.

nitrogen species: RNS)의 일종으로 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine이 citrulline으로 산화될 때 발생되는 반응성이 매우 높은 것으로 알려져 있다. 정상적인 농도로 존재하는 NO는 심혈관계와 신경계 및 면역계의 전달 물질로서 신경전달물질을 운반하거나 종양을 억제하는 작용, 감염성 병원체에 대한 억제 등 매우 다양한 기능을 가지는 물질로 알려져 있다. 그러나 과도하게 발현된 NO는 독성 radical로 작용하여 인체에 유해한 영향을 주는 세포손상뿐만 아니라 염증 반응을 비롯한 뇌막염, 알츠하이머병과 파킨슨병 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용하는 것으로 보고되어 있다[7]. 대장균 lipopolysaccharide (LPS)를 대식세포에 처리하여 nitric oxide (NO)를 유도 시킨 후 홍굴, 편굴의 에틸아세테이트 분획물을 대식세포에 처리하여 NO 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 (Fig. 3B), 홍굴 에틸아세테이트 분획물의 경우 25 µg/ml에서 NO 생성량이 59.6%, 편굴 에틸아세테이트 분획물의 경우 50 µg/ml에서 67.3%로 현저히 감소하였으며 추출물의 농도가 증가할수록 NO 생성량이 감소하였다.

**염증성 cytokine 측정**

염증성 cytokine으로 대표되는 IL-1β, IL-6 및 TNF-α는 염증반응을 매개하는 물질로 특히 초기 염증반응에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 그 중 IL-6는 B cell이 plasma

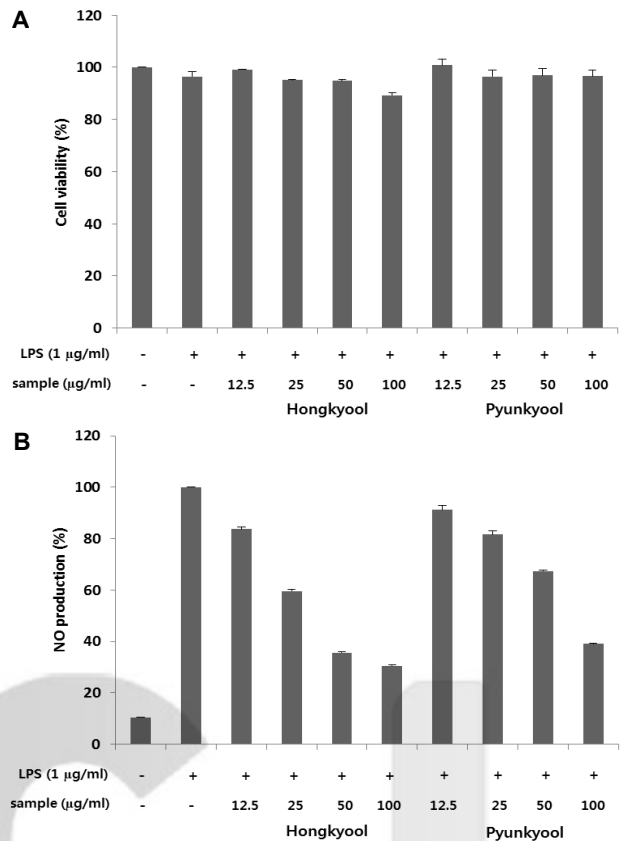


Fig. 3. Cell viability (A) and nitric oxide production (B) of 'Hongkyool' and 'Pyunkyool' ethyl acetate fraction on Raw 264.7 macrophage. Results are mean±S.D. of triplicate data.

cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고 염증병변에서 증가하는 것으로 알려져 있다[13]. 홍굴, 편굴 에틸아세테이트 분획물의 IL-6 생성 억제 효과를 측정할 결과, 처리 농도 의존

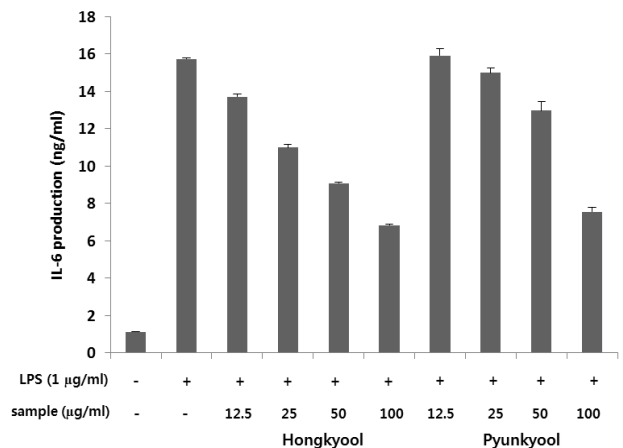


Fig. 4. The effect of 'Hongkyool' and 'Pyunkyool' ethyl acetate fraction on pro-inflammatory cytokine IL-6 level of LPS-induced Raw 264.7 macrophage. Results are mean±S.D. of triplicate data.

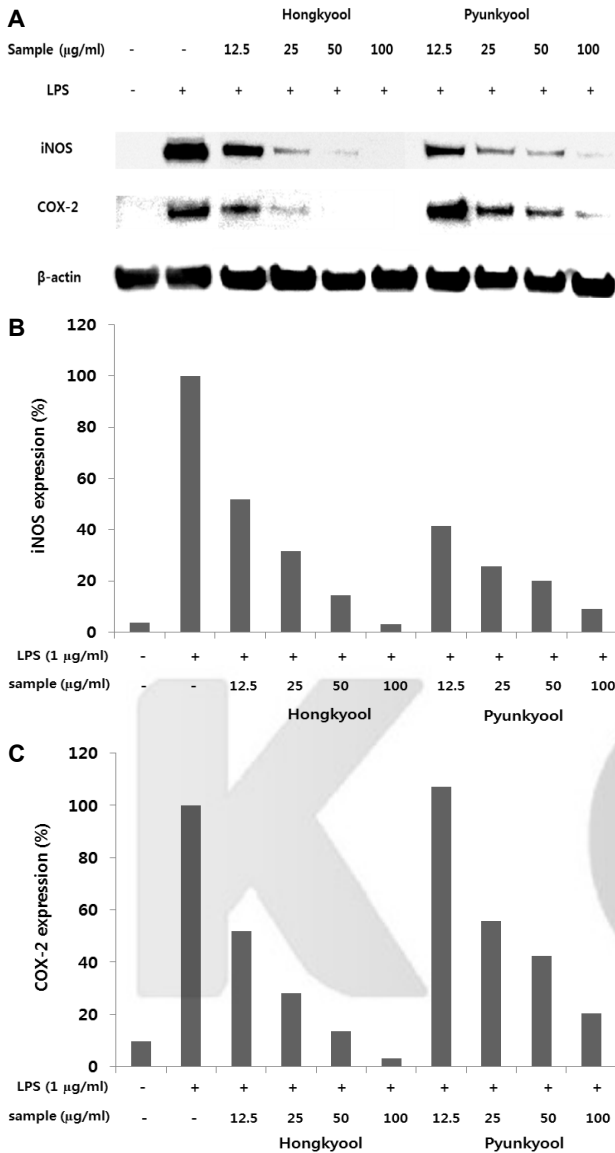


Fig. 5. Pro-inflammatory effect of 'Hongkyool' and 'Pyunkyool' ethyl acetate fraction on iNOS and COX-2 protein expression in Raw 264.7 macrophage. (A) Western blots of iNOS and COX-2 protein from macrophage cells, (B) relative density value of iNOS protein expression in Raw 264.7 cells, (C) relative density value of COX-2 protein expression in Raw 264.7 cells. Results are mean±S.D. of triplicate data.

적으로 IL-6의 생성을 효과적으로 감소시키는 것을 알 수 있었으며, 특히 홍굴 에틸아세테이트 분획물 100 µg/ml 농도에서 41%(6.8 ng/ml)로 가장 높은 IL-6 생성 억제 효과를 나타냈다 (Fig. 4). Lee 등[14]은 당유자 미숙과 추출물을 처리하여 IL-6 생성에 대한 억제 효과를 조사하였는데 본 실험의 결과와는 달리 핵산 분획물 100 µg/ml 농도에서 40% 정도의 IL-6 생성 억제 효과가 있었음을 보고하였다. 따라서 재래굴 품종에 따라 분획물의 효과가 다를 수 있었다.

### iNOS, COX-2 단백질 발현량 측정

체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 등의 염증인자가 유도형 NO synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase (COX-2)에 의해 생성된다고 알려져 있다[16]. 따라서 LPS로 유도 되어진 Raw 264.7 cell에서 iNOS, COX-2 protein 발현량의 감소에 의해 항염증 효과를 기대할 수 있기 때문에 홍굴, 편굴 에틸아세테이트 분획물이 iNOS, COX-2 protein 발현 저해효과가 있는지를 알아보기 위해 western blotting으로 두 단백질의 발현 변화를 확인하였다(Fig. 5). LPS 비처리군은 두 단백질 모두 거의 발현되지 않은 반면 LPS 처리군에서는 발현이 현저히 증가됨을 확인하였고, 홍굴, 편굴 에틸아세테이트 분획물 처리로 농도 의존적으로 iNOS, COX-2 단백질 발현이 효과적으로 억제되는 것을 확인 할 수 있었다. 특히, 홍굴 에틸아세테이트 분획물 100 µg/ml 농도 처리 시 염증억제 작용이 탁월할 것으로 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 지원사업(과제번호: PJ906971042015)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### References

1. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
2. Cho, E. K. and Choi, Y. J. 2013. Antioxidant, antidiabetic, and anti-inflammatory effects of extracts and fractions from *Parthenocissus tricuspidata* stems. *J. Life Sci.* **23**, 399-405.
3. Choi, E. O., Kim, H. S., Han, M. H., Choi, Y. H., Park, C., Kim, B. W. and Hwang, H. J. 2013. Effects of *Hizikia fusiforme* fractions on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. *J. Life Sci.* **23**, 1495-1500.
4. Gutfinger, T. 1981. Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 966-968.
5. Hwang, J. H., Park, K. Y., Oh, Y. S. and Lim, S. B. 2013. Phenolic compound content and antioxidant activity of citrus peels. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 153-160.
6. Hyon, J. S., Kang, S. M., Senevirathne, M., Koh, W. J., Yang, T. S., Oh, M. C., Oh, C. K., Jeon, Y. J. and Kim, S. H. 2010. Antioxidative activities of dried and fresh citrus peels in Jeju. *Kor. J. Food Cook. Sci.* **26**, 88-94.
7. Im, D. Y. and Lee, K. I. 2012. Nitric oxide production inhibitory effect and antibacterial activity of the extract and fractions from *Paoniae Radix*. *Kor. J. Pharmacogn.* **43**, 173-178.
8. Katsube, T., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K. and Yamane, Y. 2004. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and FolinCiocalteu assay. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2391-2396.

9. Kawaguchi, K., Mizuno, T., Aida, K. and Uchino, K. 1997. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 102-104.
10. Kim, H. H., Park, G. H., Park, K. S., Lee, J. Y. and An, B. J. 2010. Anti-oxidant and anti-inflammation activity of fractions from *Aster glehnii* Fr. Schm. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 434-441.
11. Kim, J. H., Kwon, S. H., Kim, J. K. and Kim, M. K. 2006. Effects of different mandarin formulation on antioxidative capacity and oxidative DNA damage in fifteen-month aged rats. *Kor. J. Nutr.* **39**, 610-616.
12. Kim, W. B., Park, S. H., Hwang, H. S., Woo, J. Y., Lee, H. R., Hwang, D. Y., Choi, J. H. and Lee, H. 2012. Antioxidative activities and whitening effects of solvent fraction from *Prunus davidiana* (Carriere) Franch. *Fruit. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1363-1370.
13. Kim, Y. J. and Son, D. Y. 2014. Inflammatory mediator regulation of the *Zizyphus jujube* leaf fractions in the LPS-stimulated Raw264.7 mouse macrophage. *Kor. J. Food Preserv.* **21**, 114-210.
14. Lee, H. J., Kang, G. J., Yoon, W. J., Kang, H. K., Kim, Y. S., Kim, S. M. and Yoo, E. S. 2006. Anti-inflammatory effect of unripe fruit of *Citrus grandis* Osbeck in raw 264.7 and HaCat cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **37**, 74-80.
15. Moreno, M. I., Isla, M. I., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacology* **71**, 109-114.
16. Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
17. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
18. Sohn J. S. and Kim, M. K. 1998. Effect of hesperidin and naringin on antioxidative capacity in the rat. *Kor. J. Nutr.* **31**, 687-696.
19. Yoon, J. H., Park, S. G., Lee, M. J., Park, J. Y., Seo, K. S., Woo, K. C. and Lee, C. E. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Bletilla striata Reichenbach* fil. fractions as cosmetic. *J. Life Sci.* **23**, 1073-1078.
20. Yoshigai, E., Machida, T., Okuyama, T., Mori, M., Murase, H., Yamanishi, R., Okumura, T., Ikeya, Y., Nishino, H. and Nishizawa, M. 2013. Citrus nobiletin suppresses inducible nitric oxide synthase gene expression in interleukin-1 $\beta$ -treated hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **439**, 54-59.

**초록 : 제주 재래종 감귤 ‘홍귤’, ‘편귤’ 과피 분획물의 항산화, 항염증 효과**

현주미<sup>1†</sup> · 박경진<sup>1</sup> · 김상숙<sup>1</sup> · 박석만<sup>1</sup> · 이영재<sup>2</sup> · 안현주<sup>1†\*</sup>

(<sup>1</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤연구소, <sup>2</sup>제주대학교 수의학과)

한약재로 사용되고 있는 제주 재래 감귤 중 홍귤, 편귤 품종 과피 추출물의 기능성 소재로서의 활용 가능성을 알아보기 위해 용매별 분획물이 보유한 항산화 및 항염증 활성을 조사하였다. 홍귤, 편귤 모두 부탄올 분획물에서 총 페놀성 화합물의 함량이 각각 534.4 mg/g, 342.9 mg/g으로 가장 높았으며, 그 다음으로 에틸아세테이트, 헥산, 그리고 물 분획물 순이었다. 총 플라보노이드 함량에 있어서도 부탄올 분획물에서 홍귤 431.8 mg/g, 편귤 415.7 mg/g으로 가장 높게 나타났다. DPPH 라디칼 소거활성은 부탄올 분획물 1 mg/ml 에서 홍귤(89.2%), 편귤(64.2%) 모두 가장 높았으며, ABTS 라디칼 소거활성에 있어서도 두 품종 모두 부탄올 분획물에서 낮은 농도에서도 매우 우수한 활성을 보였으며 그 뒤로 에틸아세테이트, 헥산, 물 분획물 순이었다. 항염증 효과 측정에서 홍귤, 편귤 에틸아세테이트 분획물 모두 NO, IL-6, iNOS 및 COX-2 단백질 생성 억제 효과를 확인할 수 있었다. 특히 홍귤 에틸아세테이트 분획물 100  $\mu$ g/ml 농도에서 항염증 효과가 우수하였다.