

미세캡슐화한 녹차 및 자몽종자 추출물이 Murine RAW 264.7 대식세포주의 항염증에 미치는 영향 비교*

전윤경¹ · 김명환² · 성필남³ · 장문정^{1§}

국민대학교 식품영양학과,¹ 단국대학교 식품공학과,² 국립축산과학원³

A comparison of anti-inflammatory activities of green tea and grapefruit seed extract with those of microencapsulated extracts*

Jun, Yoon Kyung¹ · Kim, Myung Hwan² · Seong, Pil Nam³ · Chang, Moon-Jeong^{1§}

¹Department of Food & Nutrition, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

²Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

³National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 446-706, Korea

ABSTRACT

We compared the effects of grapefruit seed extract (GFSE), green tea extract (GT) and their microencapsulated extract on anti-inflammatory activities in murine RAW 264.7 macrophages cell line. In order to protect the bioactive compounds in the extracts, they were microencapsulated with maltodextrin and H₂O. Nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor necrosis factor- α (TNF- α), inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein expression and thiobarbiturate reactive substances (TBARS) were analyzed in LPS activated RAW 264.7 macrophages. The green tea extract at the range of 100–600 μ g/mL inhibited NO, PGE₂ production and iNOS protein expression without cytotoxicity in a dose-dependent manner. Grapefruit seed extract had strong inhibitory effects on NO and PGE₂ production and iNOS protein expression at the range of 5–20 μ g/mL without cytotoxicity. Microencapsulation of green tea extract had further inhibitory effects on NO and PGE₂ production and on iNOS protein expression, whereas microencapsulated GFSE did not show any further inhibitory effects on these parameters. Taken together, our results suggest that GSFE might be a promising candidate for preventing inflammation related diseases, such as cardiovascular disease, cancer or diabetes, and the microencapsulation of green tea extract could improve its bioactivity. (*Korean J Nutr* 2012; 45(5): 443 ~ 451)

KEY WORDS: grapefruit seed extract, green tea extract, microencapsulation, RAW 264.7 macrophages, anti-inflammation.

서 론

자유기와 같은 유해 활성산소종은 체내 대사 반응과정에서 지속적으로 생성되고 있으며 유해활성 산소에 의한 산화적 손상은 수퍼옥사이드 디스무타아제, 글루타치온 퍼옥시다아제, 비타민 C, 비타민 E, 카로티노이드와 같은 항산화성분에 의해 보호되고 있다.¹⁾ 체내 항산화능에 비해 자유기 생성이 많을 때 지방, 단백질, DNA를 손상시켜 세포구조의 안정성, 세포막, 효소, 유전자 발현기능의 손상을 유발한다.²⁾ 많은 연구에서 심혈관계 질환, 염증성 질환, 암, 알츠하이머, 당뇨병등이 부분적으로는

유해활성산소종으로 인한 산화적 손상과 관련이 있음이 보고되고 있다.²⁾

산화질소 (nitric oxide, NO)는 L-arginine의 guanido nitrogen으로부터 생성되는 반응성이 강한 자유기로 NO synthase (NOS)에 의해 산화된다. NO는 박테리아, 바이러스, 진균류와 같은 병원체에 반응하는 면역반응에 필수적일 뿐아니라, 신경 전달물질과 혈관이완기능등의 생리적 기능조절기능한다.³⁾ 그러나 NO가 과다하게 생성되면 관절염, 자가면역질환 등과 같은 염증반응을 유발하며, 당뇨병, 심혈관계 질환도 만성 염증반응과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다.⁴⁻⁶⁾ 사이토카인은 대식세포, 단핵세포 등의 다양한 세포에서 분비되며 염증반응, 조절, 면역

접수일: 2012년 10월 2일 / 수정일: 2012년 10월 17일 / 채택일: 2012년 10월 19일

*This research was supported by joint research project from Rural Development Administration (project No. PJ907122).

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail: cmoon@kookmin.ac.kr

© 2012 The Korean Nutrition Society

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.

기능조절에 관련된 성분이다. 염증성 반응이 증가할 때 대식세포에서 NO와 사이토카인의 분비가 증가되며,⁷⁾ 따라서 NO와 사이토카인의 생성을 억제하는 것이 염증성 질환을 비롯한 만성퇴행성 질환의 발병을 억제하는 주요 목표가 되고 있다.

식품속에 존재하는 비영양소 성분인 플라보노이드와 같은 페놀화합물은 만성질환의 발병과 병의 진전을 억제하는 데 이 물질들은 자유기와 반응하여 새로운 자유기의 생성을 억제하거나, 지질산화를 촉진하는 Fe^{2+} 과 같은 금속이온과의 결합을 통해 산화스트레스를 억제하는 것으로 보고 되고 있다.^{8,9)} 또한 항산화제의 섭취는 면역 반응을 개선시킬 수 있다는 연구도 보고된 바 있으며,¹⁰⁾ 과일과 채소의 섭취가 암과 심혈관계 질환의 위험도를 감소시키는 것도 베타카로틴, 비타민 C, 폴리페놀류와 같은 항산화성분의 섭취증가와 관련이 있는 것으로 보고되었다.^{11,12)}

최근 천연 식물성 식품은 다양한 항산화성분을 함유하고 있어 많은 연구의 대상이 되었는데,¹³⁾ 과일, 채소, 허브류 등은 비타민, 무기질, 식이섬유소뿐 아니라 페놀산, 플라보노이드와 같은 매우 효과적인 항산화성분을 다량 함유하고 있음이 보고되었다.^{14,15)} 과일, 채소, 향신료, 곡물, 허브류에 함유된 천연 항산화물질은 건강기능성 식품의 형태로 섭취되고 있을 뿐 아니라 최근에는 천연항산화물에 대한 건강기능성, 환경친화적 요구증가로 인해 이들 성분은 다양한 용매로 추출되어 식품가공시 항산화능 개선을 위한 천연 식품첨가물로도 활용되고 있다.

녹차 (*Camellia Sinensis* L.)는 가장 널리 소비되는 음료로 다른 차류에 비해 상당량의 카테킨, 에피카테킨과 같은 플라보노이드가 들어 있다.¹⁶⁾ 녹차는 항산화, 항진균성, 항암효과가 있음이 in vitro, 동물실험을 통해 보고되었으며,^{17,18)} 인체 임상실험에서도 심혈관계 질환을 예방할 수 있음이 관찰되었다.¹⁹⁾ 자몽종자에는 플라보노이드, 프로안토시아닌인 올리고머와 같은 폴리페놀류가 다량 들어 있으며, 강력한 항바이러스능, 항박테리아능과 항산화능을 갖는 성분으로 혈소판 응집을 억제하는 효과가 있음이 최근 보고되었으나²⁰⁾ 적합한 세포모델이나 동물 모델을 이용한 생리적인 효과연구는 거의 수행된 바 없다.

식품소재에 들어있는 생리활성 성분은 추출 또는 가공, 저장 과정에서 분해가 일어나며 특히 가열과정이나 저장과정 중에 항산화능의 감소가 감소가 일어난다.²¹⁾ 추출성분의 구조, 농도, pH, 다른 성분들과의 상호작용, 자가 반응, 금속이온, 효소, 산소, 당 분해산물등이 유효성분의 안정성의 변화를 유도하여 생리효과를 감소시킨다.^{22,23)} 코팅물질로 천연 생리활성물질의 피복시켜 미세캡슐화하는 가공방법은 생리활성 성분의 효능을 보존하기 위해 사용되어 온 방법이다.²⁴⁾ Ersus와 Yurdagel²⁵⁾은 안토시아닌이 다량함유된 당근의 에탄올 추출물을 말토덱스트린으로 미세캡슐화하여 안토시아닌의 안정성과 반감기를 3

배 이상 증가시켰음을 보고하였다. Takahashi 등²⁶⁾은 항산화 생리활성성분을 코팅물질을 이용하여 미세캡슐화시키면 섭취 후 위에서 소화되는 과정에서 분해되는 것을 방지하여 생리활성을 유지하고 생체유용성이 증가함을 관찰하였다.

본 연구는 말토덱스트린으로 미세캡슐화 시킨 녹차와 자몽종자의 열수 추출물을 10일간 냉장보관 (0-8°C)후 RAW 264.7 세포를 이용하여 in vitro 항염증효과의 생리활성 및 관련 기작을 일반조건에서 추출한 추출물과 비교하고자 하였다.

연구 방법

재료 및 시약

항염증 효능 검정에 사용된 시약중 lipopolysaccharides (LPS, phenolic extraction from *E. Coli*), phosphatidic acid, 3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium nitrite, N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, sulfanilamide, malondialdehyde bis (dimethyl acetal)(1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane, TEP), trichloroacetic acid, 2-thiobarbituric acid는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified eagles medium (DMEM), penicillin, streptomycin, glutamine, sodium pyruvate, fetal bovine serum (FBS)은 Welgene사 (대구, 대한민국)에서 구입하였으며, western blot분석을 위한 1차 항체인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), β -actin과 2차 항체는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다.

녹차 추출물은 바이오랜드 (Ansan, Korea)에서, 자몽종자 추출물은 에프에이뱅크 (안성, 대한민국)구입하여 사용하였다. 말토덱스트린은 (주)한국마프다니 (성남, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다.

녹차 및 자몽종자 추출물의 미세캡슐화공정

녹차 및 자몽종자 추출물을 핵물질로 사용하여 피복물질로 말토덱스테린을 이용하였다. 미세캡슐공정은 말토덱스트린과 증류수를 첨가하여 수화시킨 후 hydroshear homogenizer (Janke & Kunkel, IKA®Labortechnik, Staufen, Germany)를 이용하여 8,000 rpm에서 30분간 균질화시켜 제조하였다. 피복물질의 비는 1 : 4 (w/w)로 하였고 동결건조기 (SFD6M-24L, Samwon Freezing Engineerign Co, 성남, 대한민국)로 분말제조하였다. 추출물과 미세캡슐화한 시료는 단국대학교 식품공학에서 제공받은 것을 사용하였으며,²⁷⁾ 각 시료를 10일간 동일하게 냉장보관한 후 실험을 수행하였다.

세포배양

마우스 대식세포주 RAW 264.7를 (한국세포주은행)에서 구

입하여 5% FBS (v/v), 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 4.5 g/L glucose, 100 µg/mL streptomycin, 100 units/mL penicillin이 첨가된 phenol red free DMEM로 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 72시간 배양하였다. 세포배양접시에 세포의 밀도가 2 - 3 × 10⁶/mL 정도가 되게 계대배양하여 세포상태를 유지하였다. 녹차와 자몽종자 추출물 처리 실험을 할 때는 80%의 confluency와 20회 이하의 passages 조건을 준수하였으며, 실험시 실험전 12시간은 FBS를 제거한 배지로 세포를 배양하였다. 세포를 24 well plate에 6 × 10⁵/mL/well 농도로 넣고 well에 부착되도록 1시간 정도 방치하였다. 추출물은 10 mg/mL DMSO에 용해시킨다음 DMEM용액으로 2배 희석농도의 단계희석을 하였다. 녹차 추출물의 처리농도는 100-600 µg/mL 자몽종자 추출물은 5-20 µg/mL이었으며, 미세캡슐화된 시료의 농도도 동일하게 유지하였다. 세포는 1 µg/mL의 LPS로 활성화시키기 1시간 전에 실험시료를 첨가하였다. 활성화시킨 세포는 16시간 배양을 하였고, 상등액을 수집하여 nitrite 농도를 분석하였으며 일부는 분석을 위해 -80°C에 냉동보관하였다. 대조군 세포는 동일한 조건에서 LPS를 첨가하지 않고 배양하였다.

세포 생존률

세포생존률은 MTT assay로 분석하였다.²⁸⁾ MTT (10 mg/mL)을 phosphate buffered saline (PBS)에 용해시켜 0.2 µm filter로 여과한 다음 2-8°C에 보관하여 분석에 사용하였다. 세포의 배양액을 제거한 뒤 1 mL의 PBS로 1회 세척한 후 MTT stock 용액을 10배 희석 (1 mg/mL)하여 각 well에 첨가하고 5% CO₂, 37°C로 유지된 항온기에서 3시간 배양하였다. MTT 용액을 제거하고 형성된 formazan을 0.5 mL isopropanol로 용해시킨 후 이 중 150 µL를 96 well plate에 옮겨 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

산화질소(Nitric oxide, NO) 분석

Nitrite 농도를 Griess 반응법을 기반으로 하여 분석하여 NO 생성 지표로 사용하였다.²⁹⁾ 세포를 배양하였던 상등액 100 µL나 sodium nitrite 표준액 (0-10 µM)을 동일한 용량의 Griess 용액 0.1% (w/v) N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride와 5% HCl용액으로 1% (w/v) sulfanilamide을 제조한 용액과 1 : 1로 혼합한 후 20분간 실온에 방치후 microtitration plate reader (Asys HiTech UVM 340, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Thiobarbiturate reactive substances (TBARS)

TBARS 용액은 15 mL의 trichloroacetic acid 용액에 0.375 g의 thiobarbitruic acid, 4.16 mL의 6M HCl를 첨가한 뒤 증

류수로 총 부피가 100 mL로 맞추어 제조하였다. 배양한 세포를 lysis buffer (1M Tris-HCl, 5M, NaCl, 0.5M EDTA, 10% NP-40, 100 mM PMSF, 10 µL protease inhibitor)로 lysis 한 후 10분간 4,000 rpm에서 원심분리하였다. 상등액 (400 µL) 또는 표준용액에 800 µL TBARS 용액을 혼합한 후 95°C에서 1시간 가열한 뒤, 냉각시키고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액은 165 µL TEP에 500 mL 증류수, 835 µL 1N HCl을 혼합하여 실온에서 10분간 방치후 증류수로 0-40 µM 농도로 희석하여 사용하였다.³⁰⁾

Tumor necrosis factor-α(TNF-α)와 Prostaglandin E2(PGE2)

배양한 세포를 lysis buffer로 lysis한 후 5분간 1,000 xg에서 원심분리 후 상등액을 사용하여 TNF-α는 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Raybiotech, Norcross, USA)로 분석하였으며, PGE2는 ELISA kit (RnD system, Minneapolis, MN, USA)로 분석하였다.

Western blot

세포를 5 × 10⁶/mL의 농도로 100 mm plate에 넣고 plate에 부착되도록 1시간 정도 방치하였다. 세포를 1 µg/mL LPS로 활성화시키기 1시간 전에 자몽종자 추출물과 녹차 추출물 또는 이들 추출물의 미세캡슐화시킨 시료를 첨가하였다. 활성화시킨 세포는 16시간 배양을 한 뒤 PBS로 세척을 하고 lysis buffer를 첨가한 후, 3,000 rpm, 4°C에서 원심분리를 하여 단백질을 추출하였다. 상등액을 Bradford 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하여 25 µg의 단백질을 취해 6x sample buffer (33% glycerol, 0.33 mM Tris-HCl, 0.03% bromophenol blue, 10% SDS)와 함께 혼합한 후 12.5 mM EDTA, 1% 2-mercaptoethanol)를 넣고 5분간 97°C에서 가열하였다. 가열된 단백질시료를 10% SDS-PAGE gel에서 전기영동시킨 후 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore사, USA)으로 gel 단백질을 transfer시켰다. Membrane을 10% skim milk로 blocking한 후 iNOS 및 β actin 1차 항체를 12시간 반응시킨 후 TBST로 세척하였다. Antimouse horseradish conjugated 2차 항체를 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후 TBST로 세척한 다음 supersignal wet pico chemiluminescent kit (Thermo scientific, USA)로 발색하였고 X-ray film으로 현상하였다. 결과는 Image J ver 1.42q (National Institutes of Health)를 이용하여 값을 계산하였다.

통계처리

실험은 3회 이상 반복하여 평균값과 표준오차를 구하였고, 일원배치분석법으로 분석후 Duncan의 다중검정으로 분석하였

고, 각 추출물의 미세캡슐화효과는 Student t-test로 분석하였다. $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의성 있는 것으로 판정하였다.

결 과

세포증식에 미치는 영향

자몽종자 추출물과 녹차 추출물과 이들 추출물을 미세캡슐화시킨 시료를 다양한 농도로 각각 첨가하여 MTT assay로 RAW 264.7 생존세포수를 측정하여 Fig. 1에 제시하였다. 추출물의 세포독성 효과를 억제하기 위해 본 실험에서는 세포의 사멸에 영향을 미치지 않는 농도를 선택하여 자몽종자 추출물은 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 에서, 녹차 추출물은 100~600 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 처리하여 실험하였다.

NO 생성에 미치는 영향

LPS를 RAW 264.7 대식세포에 첨가하여 16시간 배양하였을 때 nitrite로 측정한 NO 생성량은 2에서 100 μM 로 유의하게 증가하였다. 미세캡슐화 한 자몽종자 추출물과 녹차 추출물이 NO 생성에 미치는 효과는 자몽종자 추출물의 경우 LPS

로 활성화시킨 RAW 264.7 대식세포에 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때 유의하게 NO 생성을 억제하였고, 녹차 추출물은 100~600 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때 NO 생성을 억제하였다. 녹차 추출물의 경우 처리농도에 의존적으로 NO 생성을 억제하였으며 400 $\mu\text{g/mL}$ 와 600 $\mu\text{g/mL}$ 처리농도에서 통계적으로 유의하였다. 미세캡슐화한 녹차 추출물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리농도에서 녹차 추출물에 비해 통계적으로 유의하게 NO 생성을 억제하였다 (Fig. 2). 자몽종자 추출물은 5 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때 NO 생성을 26% 억제하였다. 그러나 자몽종자 추출물의 경우 미세캡슐화시켰을 때의 NO 생성의 추가적인 억제효과는 없었다.

PGE2와 TNF- α 생성에 미치는 영향

녹차 추출물의 첨가는 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 LPS로 활성화한 RAW 264.7 대식세포와 비교하였을 때 유의적인 차이가 없었으나 >200 $\mu\text{g/mL}$ 처리농도에서 PGE2 생성을 유의하게 억제하였다. 미세캡슐화 녹차 추출물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리농도에서 PGE2 생성을 유의하게 억제하였으며 처리농도 의존적으로 PGE2 생성을 억제하였다. 그러나 200~400 $\mu\text{g/mL}$

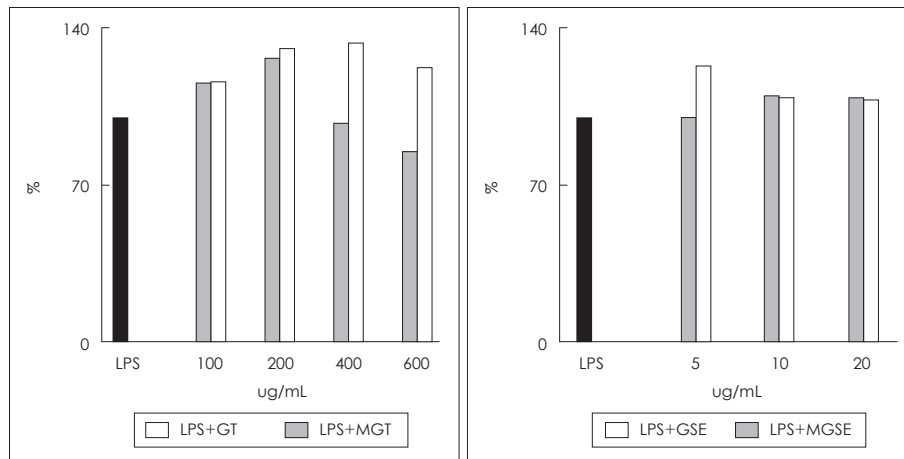


Fig. 1. Effect of green tea extract (GT), grapefruit seed extract (GSE) and microencapsulated extracts (MGT, MGSE) on cell viability in RAW 264.7 macrophages cell line. Cells were seeded at initial density of $5 \times 10^5/\text{mL}$. Cells were treated with various concentrations of GT, GSE, MGT and MGSE and incubated for 48 h. GT: green tea extract, MGT: microencapsulated green tea extract, GSE: grapefruit seed extract, MGSE: microencapsulated grapefruit seed extract.

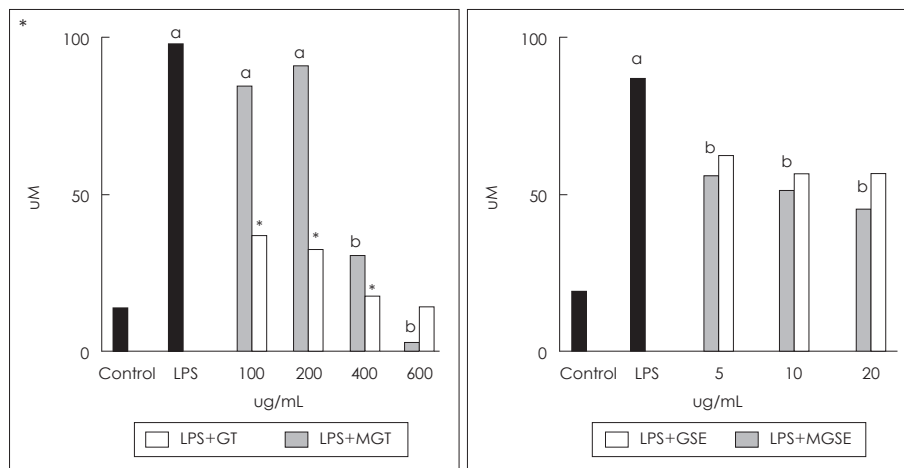


Fig. 2. Effect of green tea extract (GT), grapefruit seed extract (GSE) and microencapsulated extracts (MGT, MGSE) on nitric oxide Production in RAW 264.7 macrophages cell line. Cells were seeded at initial density of $6 \times 10^5/\text{mL}$. Cells were treated with various concentrations of GT, GSE, MGT and MGSE and incubated for 16 h. Each column represents the mean of triplicates. Different letters denote significant difference in nitrite level ($p < 0.05$). *: indicates significant difference from microencapsulated extract ($p < 0.05$). GT: green tea extract, MGT: microencapsulated green tea extract, GSE: grapefruit seed extract, MGSE: microencapsulated grapefruit seed extract.

처리농도에서 녹차 추출물과 미세캡슐화 녹차 추출물간의 차이는 없었다 (Fig. 3). 자몽종자 추출물의 경우 5 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 유의하게 감소하였으나 처리농도를 증가시켰을 때는 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때와 비교하였을 때 차이가 없었다. 미세캡슐화한 자몽종자 추출물의 경우 오히려 PGE2 생성을 유의하게 증가시켜 LPS로 활성화시킨 대식세포의 PGE2 생성량 이상 증가하였다.

녹차나 자몽종자 추출물은 가장 처리농도가 높았을 때 TNF- α 생성을 감소시켰으나 미세캡슐화의 효과는 나타나지 않았다 (Fig. 4).

TBARS 생성에 미치는 영향

RAW264.7 대식세포를 LPS와 함께 다양한 농도의 녹차 또는 자몽종자 추출물로 처리하였을 때 녹차 추출물은 100~600 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 TBARS 생성에 영향을 주지 않았다 (Fig. 5). 반면 미세캡슐화한 녹차추출물은 통계적으로 유의하지 않았으나 TBARS 생성을 감소시키는 경향이 있었다. 자몽종자 추출물은 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때 TBARS 생성을 유의

하게 억제하였으나 처리 농도증가에 의한 영향은 없었으며, 미세캡슐화의 영향도 나타나지 않았다.

iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

녹차 또는 자몽종자 추출물로 처리한 RAW 264.7 대식세포의 NO 생성 억제가 iNOS 단백질 발현의 감소로 인한 것인지를 알아보기 위해 iNOS 항체를 이용하여 western blotting을 한 결과는 Fig. 6에 제시하였다. 세포를 LPS로 활성화시켰을 때 iNOS 단백질 발현이 증가하였다. LPS와 함께 녹차 추출물 또는 미세캡슐화 녹차 추출물로 배양하였을 때 녹차 추출물의 경우 100~200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 iNOS 단백질 발현에 영향을 주지 않았으며 400 $\mu\text{g/mL}$ 이상 처리 농도에서 유의하게 감소하였다. 그러나 미세캡슐화 녹차 추출물의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리 농도에서부터 iNOS 단백질 발현이 감소하였으며 농도에 의존적으로 감소하여 600 $\mu\text{g/mL}$ 처리 농도에서 가장 낮았다. 자몽종자 추출물 처리군도 5 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도로 처리하였을 때 농도에 의존적으로 감소하여 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 유의하게 감소하였다. 미세캡슐화한 자몽종자 추출물 처리군도

Fig. 3. Effect of green tea extract, grapefruit seed extract and microencapsulated extracts on prostaglandin E2 in RAW 264.7 macrophages cell line. Cells were seed at initial density of $6 \times 10^5/\text{mL}$. Cells were treated with various concentrations of GT, GSE, MGT and MGSE and incubated for 16 h. Each column represents the mean of triplicates. Different letters denote significant difference ($p < 0.05$). *: indicates significant difference from microencapsulated extract ($p < 0.05$). GT: green tea extract, MGT: microencapsulated green tea extract, GSE: grapefruit seed extract, MGSE: microencapsulated grapefruit seed extract.

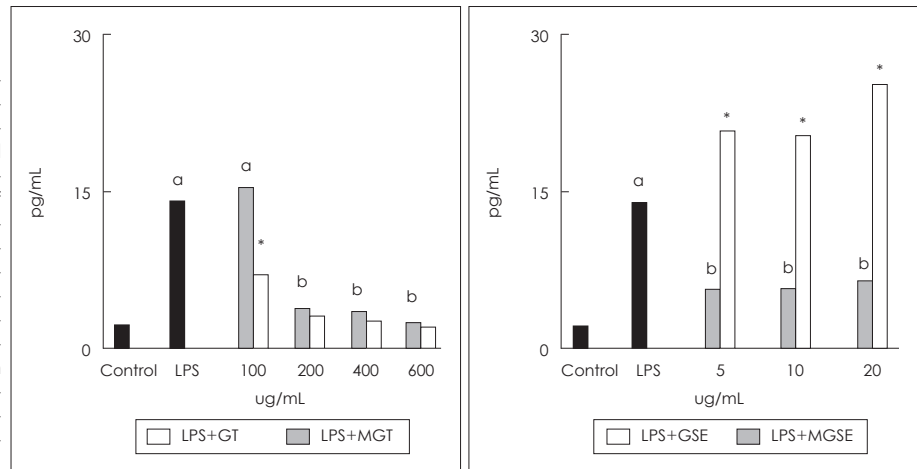
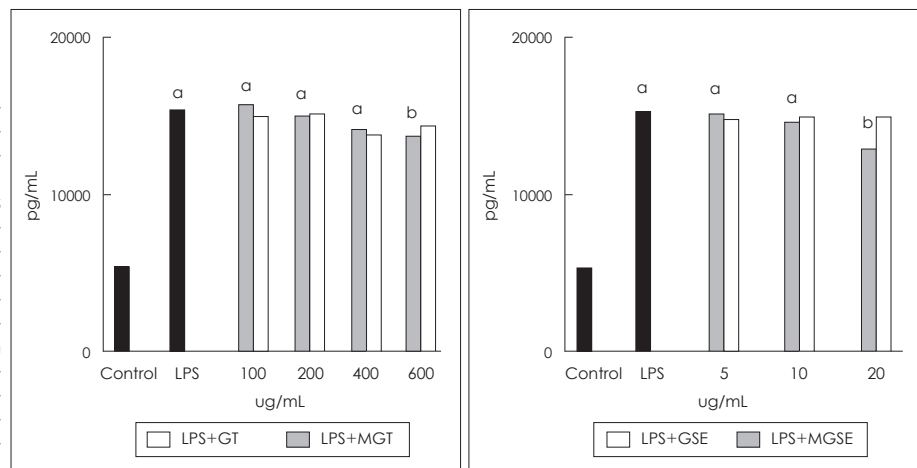


Fig. 4. Effect of green tea extract, grapefruit seed extract and microencapsulated extracts on tumor necrosis factor- α in RAW 264.7 macrophages cell line. Cells were seed at initial density of $6 \times 10^5/\text{mL}$. Cells were treated with various concentrations of GT, GSE, MGT and MGSE and incubated for 16 h. Each column represents the mean of triplicates. Different letters denote significant difference ($p < 0.05$). GT: green tea extract, MGT: microencapsulated green tea extract, GSE: grapefruit seed extract, MGSE: microencapsulated grapefruit seed extract.



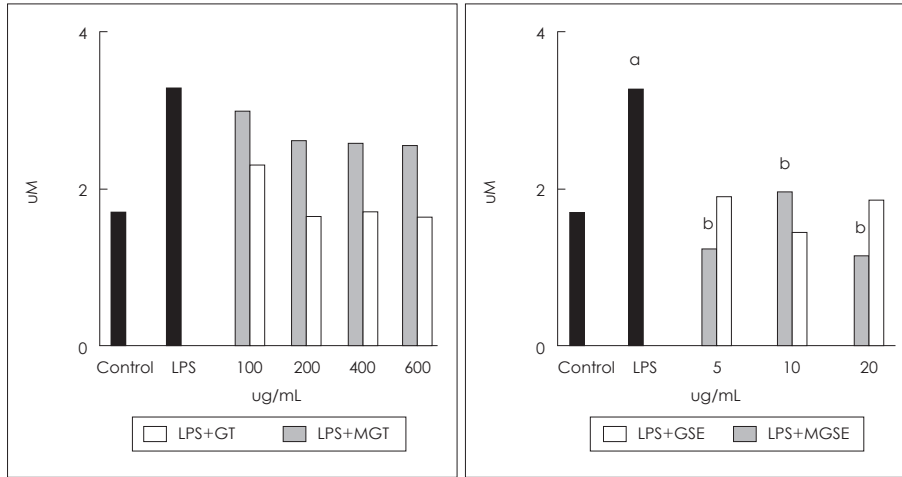


Fig. 5. Effect of green tea extract (GT), grapefruit seed extract (GSE) and microencapsulated extracts (MGT, MGSE) on thiobarbiturate reactive substances in RAW 264.7 macrophages cell line. Cells were seed at initial density of 5×10^5 /mL. Cells were treated with various concentrations of GT, GSE, MGT and MGSE and incubated for 16 h. Each column represents the mean of triplicates. Different letters denote significant difference ($p < 0.05$). GT: green tea extract, MGT: microencapsulated green tea extract, GSE: grapefruit seed extract, MGSE: microencapsulated grapefruit seed extract.

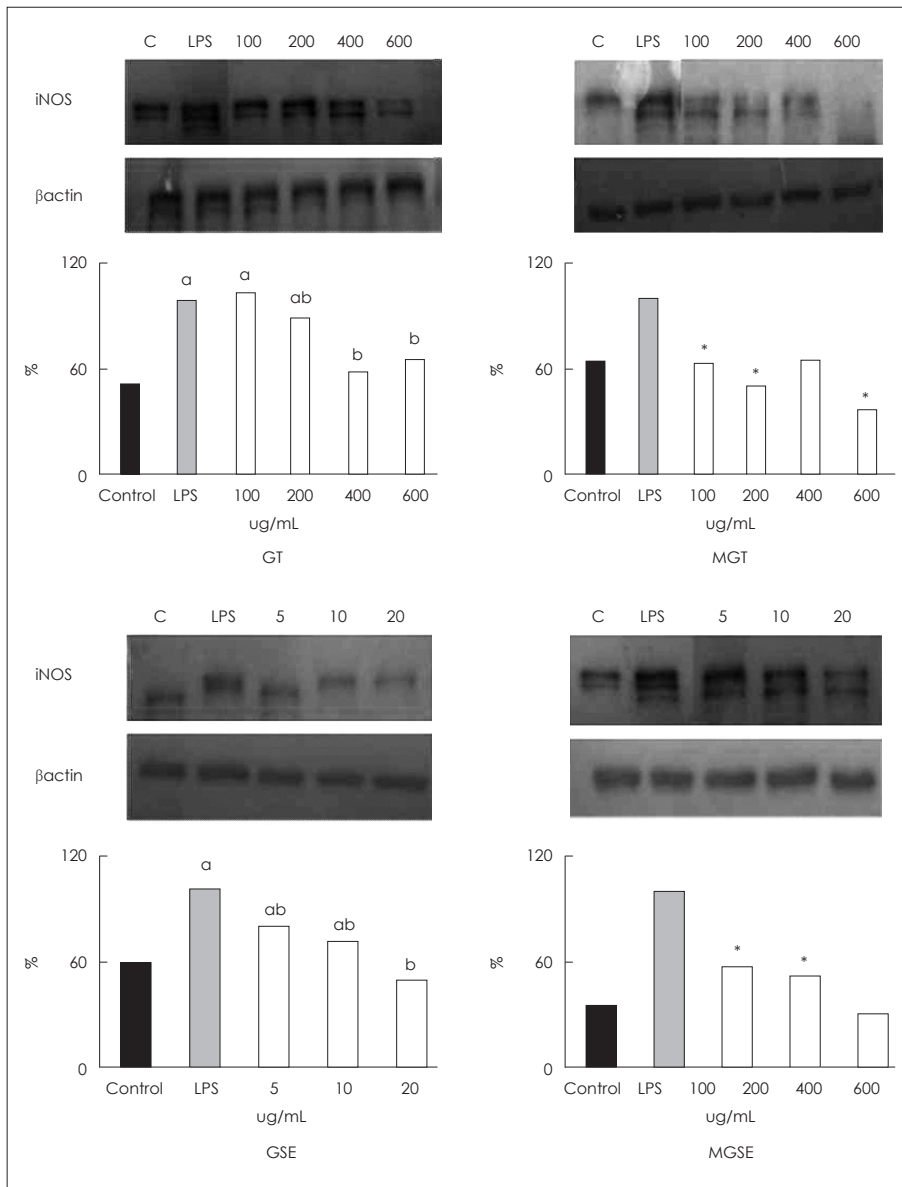


Fig. 6. Effect of green tea extract (GT), grapefruit seed extract (GSE) and microencapsulated extracts (MGT, MGSE) on expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in RAW 264.7 macrophages cell line. Cells were seed in 100 mm dish at initial density of 5×10^6 /mL. Cells were treated with various concentrations of GT, MGT, GSE, MGSE and incubated for 16 h. Each column represents the mean of triplicates. Different letters denote significant difference ($p < 0.05$). *: indicates significant difference from microencapsulated extract ($p < 0.05$). GT: green tea extract, MGT: microencapsulated green tea extract, GSE: grapefruit seed extract, MGSE: microencapsulated grapefruit seed extract.

농도에 의존적으로 iNOS 단백질 발현을 감소하는 경향이었으며, 동일한 농도 처리시 효과적으로 iNOS 단백질 발현을 유의하게 감소시켰다.

고 찰

산화스트레스에 노출된 세포나 동물모델의 활성화된 염증 세포에서 분비하는 TNF- α , PGE2, NO과 같은 염증유발성 물질의 증가는 염증성 질환을 비롯하여 심혈관계 질환, 암, 당뇨병을 유발과 관련이 있는 것으로 알려져 왔으며, Nathan 등⁷⁾은 특히, NO와 PGE2가 염증성 반응의 중요한 매개역할을 한다고 보고하였다. TNF- α 는 NO 생성과 관련된 iNOS 발현을 조절하고 PGE2 생성을 조절한다.³¹⁾ 또한 iNOS에 의한 NO의 생성량 증가는 다양한 질병의 원인이 된다고 보고되어, iNOS의 활성을 선택적으로 억제하고, 염증유발성 사이토카인 생성을 감소시킬 수 있는 방법들이 연구되고 있다.³²⁾

Tsai 등은 녹차와 다양한 허브차류와 비교하였을 때 녹차 추출물이 NO를 제거하고 NO 생성을 억제하는 효과가 가장 높았다고 보고하였으며,³³⁾ Nakagawa와 Yokozawa,³⁴⁾ Paquay 등³⁵⁾은 녹차의 epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG)와 같은 카테킨 성분이 NO를 제거하고 NO 생성을 억제하는 것으로 보고하였다. 또한 Singh 등은 녹차에 함유된 EGCG가 TNF- α , PGE2 생성을 억제하였다고 보고하였다.¹⁶⁾ 본 연구에서도 LPS와 함께 배양하여 산화스트레스를 유발한 RAW 264.7 대식세포를 녹차 추출물과 함께 배양하였을 때 처리농도 400 μ g/mL 이상으로 처리농도가 증가하였을 때 NO 생성을 60% 이상 억제하여 선행연구결과와 유사하였다. 또한 녹차 추출물 처리는 100 μ g/mL 이상의 농도에서 처리시 농도에 의존적으로 iNOS 단백질 발현을 억제하였으며 600 μ g/mL 처리시 가장 단백질 발현이 적었다. 200 μ g/mL 농도에서 녹차 추출물은 PGE2 생성을 억제하였으며, 가장 처리 농도가 높았던 600 μ g/mL에서 TNF- α 생성이 억제되었다.

자몽종자는 플라보노이드와 리모노이드 (limonoids)와 같은 물질이 다량 들어있는 데 리모노이드는 자몽과 같은 감귤류에 존재하며 대장, 폐, 구강, 위에 발생하는 암세포의 성장을 억제하는 것으로 보고되었다.³⁶⁾ 또한 자몽종자 추출물은 항균효과가 매우 우수할 뿐 아니라 인체 안전성이 입증되어 캡슐형태로 제조되어 건강보조식품이나 식이보충제 형태로 소비되고 있다.³⁷⁾ 본 연구에서 자몽종자 추출물은 녹차 추출물에 비해 매우 낮은 농도 (5~20 μ g/mL) 농도에서 LPS로 활성화한 세포에 비해 유의적으로 NO, PGE2 생성을 억제하였다. 자몽종자 추출물의 주요 생리활성 물질은 리모노이드 (triterpenoid dilactone, limonin)이며, 그외 proanthocyanidins, naring-

ine, quercetin, kaempferol, hesperdin과 apigenin이 함유되어 있어, 자몽종자 추출물의 생리활성 효과는 항산화기능 때문인 것으로 보고되고 있다.³⁷⁾ Bagchi 등은³⁸⁾ 자몽종자 추출물의 항산화능은 비타민 C와 비타민 E에 비해 크다고 보고하였다. 녹차 추출물이 다른 허브차 추출물에 비해 항산화, 항염증효과가 컸음에도 불구하고 본 연구에서는 자몽종자 추출물이 녹차 추출물 처리농도의 1/10 수준에서 효과적으로 NO 생성, PGE2 생성을 억제하였으며, iNOS 단백질 발현을 억제하였다. 그러나 자몽종자 추출물도 녹차 추출물 처리와 유사하게 TNF- α 생성은 가장 처리 농도가 높았던 20 μ g/mL 농도에서 유의하게 감소되었다. 녹차 추출물의 항염증효과에 비해 자몽종자 추출물이 매우 효과적으로 염증매개물질의 생성 및 관련 효소 단백질 발현을 억제한 것은 자몽종자의 항산화효과가 녹차 추출물에 비해 클 뿐 아니라 함유된 생리활성 성분의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 리모노이드, 카로티노이드와 같은 항산화제로부터 생성된 자유기는 비교적 안정적으로 유지되어 연쇄적인 산화반응을 억제한다고 보고되었다.³⁹⁾ 반면, 녹차의 EGCG나 다른 카테킨의 생체유용성은 비교적 낮으며, 이는 50-1,600 mg (약 0.7-23 mg/kg 체중)섭취하였을 때 반감기가 1.87-4.58시간으로 짧기 때문이라고 하였다.³⁶⁾ Yu는 자유기 소거능으로 평가한 항산화능은 리모노이드에 비해 플라보노이드가 높았으나, 자몽에서 추출한 리모노이드를 섭취한 햄스터에서 플라보노이드 섭취군에 비해 LDL/HDL 콜레스테롤 상승을 억제하였으며, LDL의 산화를 억제하는 효과가 있어 동맥경화증을 예방할 가능성이 있다고 제시하였다.⁴⁰⁾ 이는 in vitro에서는 단기적으로 플라보노이드의 항산화능이 자유기 소거능이 우수하지만 세포나 in vivo에서는 세포내로 흡수된 이후 생리적 효과가 나타나므로 항산화능과 같은 생리적 효과를 나타내는 데 있어서 항산화물질의 장기적인 안정성을 유지하는 것이 더 중요한 요인으로 작용할 가능성이 있다.

최근 건강기능성에 대한 소비자의 기대로 인해 가공식품의 질을 향상시키기 위해 식물로 부터추출한 항산화물질을 첨가하고 있다. 그러나 저장 기간동안 생리활성 물질의 산화적 분해 (oxidative degradation)가 일어나 그 효능감소를 유발할 뿐 아니라 산화는 페놀류와 생리활성물질을 중합시켜 활성과 용해도를 감소시킨다.⁴¹⁾ 미세캡슐화가공은 생리활성물질을 피복하여 식품에서 추출한 생리활성 물질을 빛, 습도, 산소와 같은 유해환경으로부터 보호하고, 생리활성물질이 식품내 다른 성분들과의 상호작용을 억제한다.⁴²⁾ 또한 항산화성물질을 미세캡슐화시키면 위에서 소화되는 동안 분해되는 것을 방지할 수 있다.²⁶⁾ Fang 등⁴³⁾은 미세캡슐화시켰을 때 미세캡슐내에 들어있는 물질의 저장기간을 연장시키는 효과가 있다고 보고한 바 있으며, Lee 등²⁷⁾은 녹차 추출물을 미세캡슐공정으로 처리하

였을 때 색도 및 DPPH 라디칼 소거활성을 유의하게 향상시켰다고 보고하였다. Zhang 등⁴⁴⁾은 포도씨 추출 프로안토시아닌을 본 연구에서 사용한 말토덱스트린과 겔 혼합물로 미세캡슐화시켰을 때 프로안토시아닌의 안정성을 높일 수 있음을 관찰하였다. 본 연구에서는 녹차 추출물을 미세캡슐화하여 RAW 264.7 대식세포에 처리하였을 때 유의하게 NO 생성, PGE2 생성과 iNOS 단백질발현을 억제하였다. 그러나 자몽종자 추출물의 경우 미세캡슐화시켰을 때 iNOS 단백질 발현은 유의하게 억제하였으나 NO 생성과 TNF- α , TBARS생성에는 영향을 주지 않았고, PGE2생성은 오히려 증가시켰다. 이는 자몽종자 추출물이 녹차 추출물에 비해 낮은 농도에서도 염증반응을 억제하는 효과가 크며, 피복물질로 미세캡슐화하지 않아도 생리활성 효과의 안전성이 유지되었을 가능성이 있다. 또한 녹차와 자몽종자 추출물을 구성하는 항산화물질의 물리적, 화학적 성분의 차이 때문일 수도 있다. Halliwell 등⁴⁵⁾은 자몽종자 추출물에는 비타민 C, 비타민 E, hesperidine, neohesperidin, naringin, naringin, flavonone 배당체가 다량 들어 있다고 하였다. Aoshima 등⁴⁶⁾은 녹차와 같은 음료에 들어있는 폴리페놀류는 쉽게 산화하기 때문에 세포배양시 배양액에서도 쉽게 산화할 수 있다고 한 반면, 리모노이드와 카로티노이드는 안정적으로 항산화능을 유지하기 때문에 자몽종자 추출물의 경우 미세캡슐화에 의한 NO와 PGE2 생성을 추가적으로 억제하는 효과가 없었을 가능성이 있다.

본 연구결과 자몽종자 추출물의 항염증 효과는 녹차 추출물에 비해 낮은 농도에서 효과적이었으며, 녹차 추출물의 경우 미세캡슐화시키면 항염증 효과가 개선됨을 알 수 있었다. 자몽종자는 자몽을 주스로 가공하는 과정에서 다량 생산되는 부산물이며 그 생리활성에 대한 연구는 아직 미미하며 그 활용도가 매우 낮은 실정이다. 본 연구결과 자몽종자 추출물의 in vitro RAW 264.7 대식세포에서 항염증 효과가 매우 우수하여 건강기능성 식품소재로서의 활용가능성을 제시하며, 또한 항산화성분의 반감기가 짧은 추출물의 경우 미세캡슐화공정을 통해 생리활성효과를 증진시킬 수 있음을 제안한다.

요약 및 결론

본 연구는 녹차 추출물과 자몽종자 추출물에 함유되어 있는 생리활성 물질과 이 추출물의 생리활성 보호를 위해 말토덱스트린을 피복물질로 미세캡슐화 한 추출물이 murine RAW 264.7 대식세포의 항염증 효과 및 관련 기전에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. 녹차 추출물의 세포사멸에 영향을 주지 않는 농도는 0-600 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며 자몽종자 추출물은 0-20 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 녹차 추출물과 자몽종자 추출물은 NO 생성, PGE2 생

성을 유의하게 억제하였으며 녹차 추출물의 경우 농도에 의존적이었다. 녹차 추출물과 자몽종자 추출물은 iNOS 단백질 발현은 농도에 의존적으로 억제하였다. 반면 TNF- α 생성은 녹차 추출물은 600 $\mu\text{g/mL}$ 에서 자몽종자 추출물은 20 $\mu\text{g/mL}$ 처리농도에서 유의하게 억제되었다. 녹차 추출물은 TBARS 생성에 영향을 주지 않았으며, 자몽종자 추출물은 TBARS 생성을 억제하는 경향이었다. 미세캡슐화 녹차 추출물은 미세캡슐화하지 않은 추출물에 비해 NO와 PGE2 생성, iNOS 단백질 발현을 유의하게 억제하였으나 자몽종자 추출물의 미세캡슐화는 NO와 TNF- α 생성에 미치는 효과는 없었으나 iNOS 단백질 발현을 유의하게 감소시켰다.

따라서 본 연구결과 자몽종자 추출물이 녹차 추출물에 비해 낮은 농도에서 효과적으로 염증반응을 억제하였으며, 미세캡슐화는 녹차 추출물의 항염증효과를 개선시키는 것으로 나타나 자몽종자 추출물의 건강기능성 식품소재로서의 가능성을 제시하며, 미세캡슐화는 생리활성을 유지 및 개선시킬 있음을 제안한다.

Literature cited

- 1) Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82(2): 291-295
- 2) Byers T, Perry G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 139-159
- 3) Bogdan C, Rölinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 2000; 173(1): 17-26
- 4) Evans CH. Nitric oxide: what role does it play in inflammation and tissue destruction? *Agents Actions Suppl* 1995; 47: 107-116
- 5) Grosjean SA, Arstall MA, Mitchell RN, Klappacher GW, Kelly RA, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor in animal models of myocardial necrosis induced by coronary artery ligation or isoproterenol injection. *J Card Fail* 1999; 5(3): 236-245
- 6) Crook MA, Tutt P, Pickup JC. Elevated serum sialic acid concentration in NIDDM and its relationship to blood pressure and retinopathy. *Diabetes Care* 1993; 16(1): 57-60
- 7) Nathan CF, Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991; 3(1): 65-70
- 8) Tang SY, Whiteman M, Jenner A, Peng ZF, Halliwell B. Mechanism of cell death induced by an antioxidant extract of *Cratogeomys cochinchinense* (YCT) in Jurkat T cells: the role of reactive oxygen species and calcium. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(12): 1588-1611
- 9) Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *Afr J Biotechnol* 2008; 7(18): 3188-3192
- 10) Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342(8878): 1007-1011
- 11) Mirmiran P, Noori N, Zavareh MB, Azizi F. Fruit and vegetable consumption and risk factors for cardiovascular disease. *Metab-*

- olism 2009; 58(4): 460-468
- 12) Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S, Van De Put F, Dacombe C, Rice-Evans CA. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radic Res* 2002; 36(2): 217-233
- 13) Dillard CJ, German JB. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J Sci Food Agric* 2000; 80(12): 1744-1756
- 14) Al-Saikhan MS, Howard LR, Miller JC. Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum*, L.). *J Food Sci* 1995; 60(2): 341-343
- 15) Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem* 2001; 49(11): 5315-5321
- 16) Singh R, Akhtar N, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate: inflammation and arthritis. [corrected]. *Life Sci* 2010; 86(25-26): 907-918
- 17) Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50(1): 28-32
- 18) Conney AH, Wang ZY, Huang MT, Ho CT, Yang CS. Inhibitory effect of green tea on tumorigenesis by chemicals and ultraviolet light. *Prev Med* 1992; 21(3): 361-369
- 19) Ishikawa T, Suzukawa M, Ito T, Yoshida H, Ayaori M, Nishiwaiki M, Yonemura A, Hara Y, Nakamura H. Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Am J Clin Nutr* 1997; 66(2): 261-266
- 20) Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr* 2000; 130(1): 53-56
- 21) Yue X, Xu Z. Changes of anthocyanins, anthocyanidins, and antioxidant activity in bilberry extract during dry heating. *J Food Sci* 2008; 73(6): C494-C499
- 22) Francis FJ. Food colorants: anthocyanins. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1989; 28(4): 273-314
- 23) Davies AJ, Mazza G. Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic-compounds. *J Agric Food Chem* 1993; 41(5): 716-720
- 24) Main JH, Clydesdale FM, Francis FJ. Spray drying anthocyanin concentrates for use as food colorants. *J Food Sci* 1978; 43(6): 1693-1694
- 25) Ersus S, Yurdagel U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *J Food Eng* 2007; 80(3): 805-812
- 26) Takahashi M, Uechi S, Takara K, Asikin Y, Wada K. Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. *J Agric Food Chem* 2009; 57(19): 9141-9146
- 27) Lee HD, Kim HS, Seong PN, Kim MH. Effect of microencapsulation processing on functional property of natural pigment and antioxidant. *Food Eng Prog* 2012; 16(3): 283-286
- 28) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63
- 29) 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(1): 131-138
- 30) Radkar V, Hardej D, Lau-Cam C, Billack B. Evaluation of resveratrol and piceatannol cytotoxicity in macrophages, T cells, and skin cells. *Arh Hig Rada Toksikol* 2007; 58(3): 293-304
- 31) Smith JR, Hart PH, Williams KA. Basic pathogenic mechanisms operating in experimental models of acute anterior uveitis. *Immunol Cell Biol* 1998; 76(6): 497-512
- 32) Chiou WF, Chen CF, Lin JJ. Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. *Br J Pharmacol* 2000; 129(8): 1553-1560
- 33) Tsai PJ, Tsai TH, Yu CH, Ho SC. Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea. *Food Chem* 2007; 103(1): 181-187
- 34) Nakagawa T, Yokozawa T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol* 2002; 40(12): 1745-1750
- 35) Paquay JB, Haenen GR, Stender G, Wiseman SA, Tijburg LB, Bast A. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *J Agric Food Chem* 2000; 48(11): 5768-5772
- 36) Mandadi KK, Jayaprakasha GK, Bhat NG, Patil BS. Red Mexican grapefruit: a novel source for bioactive limonoids and their antioxidant activity. *Z Naturforsch C* 2007; 62(3-4): 179-188
- 37) Kaur M, Agarwal CH, Agarwal R. Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based product. *J Nutr* 2009; 139:1806S-1812S
- 38) Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamin C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 95: 179-189
- 39) Pedrielli P, Pedulli GF, Skibsted LH. Antioxidant mechanism of flavonoids. Solvent effect on rate constant for chain-breaking reaction of quercetin and epicatechin in autoxidation of methyl linoleate. *J Agric Food Chem* 2001; 49(6): 3034-3040
- 40) Yu J. Citrus limonoids and flavonoids: extraction, antioxidant activity and effects on hamster plasma cholesterol distribution [dissertation]. College Station (TX): Texas A & M University; 2004
- 41) Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arc Biochem Biophys* 2008; 476: 107-112
- 42) McClements DJ. Design of nano-laminated coatings to control bioavailability of lipophilic food components. *J Food Sci* 2010; 75(1): R30-R42
- 43) Fang Z, Bhandari B. Encapsulation of polyphenols-a review. *Trends Food Sci Technol* 2010; 21(10): 510-523
- 44) Zhang L, Mou D, Du Y. Procyanidins: extraction and micro-encapsulation. *J Sci Food Agric* 2007; 87(12): 2192-2197
- 45) Aoshima H, Ayabe S. Prevention of the deterioration of polyphenol-rich beverages. *Food Chem* 2007; 100:350-355