

H₂O₂에 의해 유도된 HDF 세포 손상에 대한 그라비올라 추출물의 항산화 및 세포 보호 효과

신윤미^a · 김유정^b · 유선희^{c†}

건국대학교 생물공학과^a, 여주대학교 뷰티미용과^b, 연성대학교 뷰티스타일리스트과^{c†}
(2017년 8월 3일 접수: 2017년 8월 24일 수정: 2017년 9월 5일 채택)

Antioxidative and Cytoprotective Effects of *Annona muricata* (Graviola) Extract for HDF Cell Damage Induced by Hydrogen Peroxide

Yun-Mi Shin^a · You-Jeong Kim^b · Seon-Hee You^{c†}

^aDepartment of Bioengineering, Konkuk University, 120, Neungdong-ro,
Gwangjin-gu, Seoul, 05029, Korea

^bDepartment of Beauty care, yeosu University, 388, Sejong-ro, Yeosu-si,
Gyeonggi-do, 12652, Korea

^{c†}Department of Beauty Stylist-Major in Skin Care, Yeonsung University,
37, Yanghwa-ro, Manan-go, Anyang-si, Gyeonggi-do, 14011, Korea

(Received August 3, 2017; Revised August 24, 2017; Accepted September 5, 2017)

요약 : 최근 기능성과 친환경 화장품에 대한 관심이 증가하고 있으며, 이에 따라 안전하면서 효능이 우수한 식물 추출물을 활용한 소재 개발이 이루어지고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서도 주로 건강 기능성 소재로써 다양한 효능이 있는 것으로 알려진 그라비올라 추출물이 기능성 화장품 소재로써의 가능성을 확인하고자 하였다. 그라비올라 추출물의 항산화 활성을 확인하고자 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량, DPPH radical 소거 활성을 측정하였고, HDF 세포에서의 세포 독성을 확인한 후 적정 농도에서 HDF 세포에 과산화수소(H₂O₂)를 처리하여 산화적 스트레스에 대한 ROS 활성 억제 효과와 세포 보호 효과를 측정하였다. 본 실험 결과, 그라비올라 추출물은 항산화 지표가 되는 총 폴리페놀과 플라보노이드의 100g당 26.6 mg(CA)/100g, 14.3 mg(CA)/100g의 높은 함량을 확인하였으며, 높은 radical 소거 활성을 확인하였다. HDF 세포에 대한 세포 생존율을 측정한 결과, 모든 농도에서 유의한 세포 독성이 나타나지 않았으며, 추후 100 µg/mL 농도에서 실험하였다. H₂O₂로 유도된 HDF 세포에 ROS 활성 억제를 측정한 결과, 농도 의존적인 ROS 활성 억제 효과를 확인하였고, H₂O₂를 4 시간, 24 시간, 48 시간 동안 처리 후 그라비올라 추출물의 세포 보호 효과를 측정한 결과, 25 µg/mL 농도에서 24시간까지 89.92%의 높은 세포 보호 효과를 확인하였다. 이와 같은 결과를 통하여 그라비올라 추출물은 항산화 활성이 우수하고, HDF 세포에 대한 독성이 거의 없으며, H₂O₂에 의해 발생하는 활성산소에 대한 효과적인 활성 억제 효과와 세포 보호 효과가 우수한 것으로 확인됨에 따라 항산화 및 세포 보호 효과를 가진 다양한 기능성 소재로서의 가능성을 확인하였다.

[†]Corresponding author
(E-mail: yoush4843@naver.com)

주제어 : 향산화, 세포독성, 그라비올라, 과산화수소, 활성산소

Abstract : As interest in functionality and environmentally friendly cosmetics is growing in recent years, materials that use safe and effective plant extracts have been developed. Therefore, this study also attempted to check the possibility of the graviola extract, which is known to have various efficacy mainly as a health functional material as a functional cosmetic material. In order to find out the antioxidant activity of graviola, we measured total polyphenol, total flavonoid content and DPPH radical scavenging activity and measured the ROS activity inhibition effect and cytoprotective effect on oxidative stress by treating HDF with hydrogen peroxide cells at an appropriate concentration after checking cytotoxicity in HDF cells. Based on the results of this experiment, the graviola extract was found to contain as high as 26.6 mg(CA)/100g, 14.3 mg(Q)/100g of total polyphenol and flavonoid, which are the antioxidant indexes and to have the high radical scavenging activity. The cell survival rate of the HDF cells was measured, and as a result, no significant cytotoxicity was observed at all concentrations and the experiment was carried out at a concentration of 100 μ g / mL afterwards. Inhibition of ROS activity in HDF cells induced by hydrogen peroxide was measured and the concentration-dependent inhibition of ROS activity was found and the cell protection effect of graviola was measured after hydrogen peroxide was treated for 4, 24 and 48 hours. As a result, the cell protection effect as high as 89.92% was confirmed at a 25 μ g/mL concentration up to 24 hours. As these results show that the graviola extract has excellent antioxidant activity, almost no toxicity to HDF cells, an effective activity inhibitory effect on active oxygen generated by hydrogen peroxide and excellent cytoprotective effect, the possibility as various functional materials with antioxidant and cytoprotective effects was confirmed.

Keywords : Anti-oxidant, Cytotoxicity, Graviola, H₂O₂, ROS

1. 서론

인체는 생명 유지에 필요한 에너지를 유지하기 위한 호흡과정을 통해 끊임없이 산소를 필요로 하며, 흡입한 산소의 일부(약 2~3%)는 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS)라는 유독한 물질로 전환되어 세포에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다[1]. 이러한 활성산소종은 일중항산소(¹O₂)나 superoxide (O₂^{·-}), Hydroxyl radical (OH[·])과 같이 짝이 없는 상태의 free radical과 과산화수소(H₂O₂)등으로, 이들은 분자 구조적으로 매우 불안정하기 때문에 정상 세포들을 공격하여 산화적 손상을 유발하고[2], 더욱 강하게 활성화하려는 특성을 가지고 있다[3]. 산화적 스트레스에 의한 ROS 생성은 당뇨병[4], 간섬유화[5] 등의 여러 가지 질환의 원인이 될 수 있으며, 더 나아가 유전자와 단백질 구조를 변화시켜 피부 노화를 가속화 시키고, 염증, 발암, 동맥경화를 일으키는 것으로 알려져 있다[6-9]. 최근 성인병

과 노화의 원인이 활성산소에 기인한 것이라는 학설이 보고됨에 따라, 이러한 활성산소를 조절하거나 제거할 수 있는 물질인 항산화제에 대한 관심이 높아지고 있으며, 대표적으로 비타민 C, 비타민 E, 폴리페놀과 같은 천연 항산화제와 butylated hydroxyanisole (BHA)와 butylated hydroxytoluene (BHT)등의 합성 항산화제가 널리 사용되어 지고 있다. 하지만 합성 항산화제의 경우 인체에 대한 변이성 및 독성의 유해성이 알려짐에 따라, 인체에 보다 안전하고, 부작용이 적으며, 효과가 우수한 천연물을 활용한 소재 개발 연구가 진행되고 있다[10-12]. 그라비올라(Graviola)의 학명은 *Annona muricata*로 포포나무과(Annonaceae)에 속하며, 포르투갈어로는 Graviola, 스페인어로는 Guanábana라고 불리고 있다. 그라비올라는 오래전부터 원주민들의 민간요법으로 이용되어 왔으며 뿌리, 줄기, 잎, 열매, 씨앗을 이용하여 상처를 치료하였고 해열, 설사, 이질, 기침, 천식, 구충제, 신경통, 관절염, 간장질

환 및 당뇨병에 치료로 사용되었다[13]. 특히 그라비올라 잎 추출물에는 아노나세오스(annonaceous) 및 아세토제닌(acetogenins) 등의 성분이 췌장암, 전립선암, 난소암, 폐암, 간암 등을 포함한 12가지 유형의 암세포를 죽인다고 알려져 있고, 화학 항암 치료제인 adriamycin보다 약 1,000배 정도 효과가 높다고 보고되고 있으며[14], 그라비올라 잎을 수집하여 아세토제닌 성분을 연구한 결과, 아세토제닌 성분이 암세포에 영양을 공급하는 혈관의 성장을 감소시켜 세포를 사멸시키는 작용을 한다고 보고되고 있다[15]. 또한 인체에서 항산화물질이나 세포 손상을 억제하는 작용을 해 건강을 유지시켜 주고, 면역체계를 회복시켜 치명적인 감염으로부터 보호해주고[16], 항고혈압과 이완, 항 경련, 심억제성[17], 항 바이러스성[18], 항 세균성[19], 항 당뇨, 항 산화 특성[20-22] 등의 다양한 연구가 보고되고 있다. 최근 건강식품으로써 그라비올라에 대한 관심이 높아지고 있으나, 현재까지 화장품 소재로서의 생리활성 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 그라비올라 잎을 70% 에탄올로 추출하여, 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량, DPPH radical 소거 활성을 통한 항산화 활성을 확인하고, HDF 세포에서의 H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과를 통하여 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 준비 및 방법

2.1. 시료 준비

건조시킨 그라비올라 잎(wellfood korea, philippines)을 구입하여, 70% 에탄올에 20배의 양을 가하여 37°C 인큐베이터안에서 72 h 추출하였다. 72 h 후 원심분리를 이용하여 침전물 여과를 진행하였다. 이 후 에탄올을 제거 하기 위하여 Rotary evaporator (EYELA, Japan)를 사용하여 감압 농축한 후 동결 건조하여 최종 시료 13.5 g을 얻었으며, 냉장고에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1 Total phenolic compound 함량 측정

그라비올라 추출물의 총 폴리페놀 함량을 확인하기 위하여 Folin-Denis 방법으로 정량하였다

[23]. 그라비올라 추출물을 0.5, 1, 2.5, 5 mg/mL가 되도록 농도별로 처리하여, 시료 400 μ L와 Folin-Denis reagent (Sigma-Aldrich, USA) 400 μ L를 혼합하여, 실온에서 3 min 동안 반응시켰다. 3 min 후 10% Na₂CO₃ 400 μ L를 혼합한 후, 암실에서 60 min 반응시켰다. 60 min 후 96 well plate에 상등액 200 μ L씩 넣은 다음 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질은 caffeic acid (0~100 μ g/mL, Sigma-Aldrich)의 만들어진 곡선에 시료값을 대입하여 총 폴리페놀 값을 구하였으며, 각 폴리페놀 성분에 대해서는 작성된 검량선식이 나타내는 상관관계수(R²)값이 0.9989의 직선성을 나타내어 표준 곡선으로써 사용하였다.

2.2.2. Total flavonoid 함량 측정

그라비올라 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Moreno방법을 이용하여 측정하였다[24]. 시료를 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL가 되도록 농도별로 처리하여, 시료 100 μ L 에 10% aluminum nitrate (Sigma-Aldrich) 20 μ L, 1M potassium acetate (Sigma-Aldrich) 20 μ L, ethanol (Duksan, Korea) 860 μ L를 차례대로 혼합하여 40 min 동안 반응 시켰다. 40 min 후 원심분리기로 부유물을 가라앉힌 다음 96 well plate에 200 μ L씩 넣은 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질은 quercetin (0~100 μ g/mL, Sigma-Aldrich)의 만들어진 곡선에 시료값을 대입하여 총 플라보노이드 값을 구하였으며, 각 플라보노이드 성분에 대해서는 작성된 검량선식이 나타내는 상관관계수(R²)값이 0.9981의 직선성을 나타내어 표준 곡선으로써 사용하였다.

2.2.3. DPPH radical 소거 활성 측정

그라비올라 추출물의 항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH; Sigma-Aldrich)용액을 사용하여 radical 소거 활성을 측정하는 blois의 방법으로 측정하였다[25]. 시료를 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도별로 희석하여, 96 well plate에 10 mM DPPH 용액 180 μ L와 시료액 20 μ L를 혼합하여 차광된 상태에서 37°C, 30 min 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 양성 대조군으로는 Ascorbic acid (Sigma-Aldrich)을 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL의 농도로 사용하였다.

DPPH radical 소거 활성(%) = 100 -
 ((첨가군 흡광도 / 무첨가군 흡광도) × 100)

2.3. HDF 세포주 배양

본 연구에 사용한 HDF 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA)과 1% penicillin (100 IU/mL, GE Healthcare Life Sciences, USA), 1% streptomycin (50 µg/mL, GE Healthcare Life Sciences)를 High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, USA) 배지에 첨가하여 37°C, 5%의 CO₂ 인큐베이터 안에서 배양하였다.

2.4. 세포 생존율 및 H₂O₂에 대한 세포 보호 효과

Neutral red (NR) assay를 이용하여 그라비올라 추출물이 HDF 세포에 H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과를 측정하고자 하였다[26]. HDF 세포를 96 well plate에 well 당 3 × 10⁴ cells/well로 처리한 후 24 h 동안 배양하였고, 24 h 후 그라비올라 추출물을 각 농도별로 처리한 다음 H₂O₂ 100 µM을 각 4 h, 24 h, 48 h 동안 처리하여, 37°C에서 CO₂ 배양기에서 48 h 동안 배양하였다. 배양 후 무혈청 배지에 NR solution (Sigma-Aldrich)이 1%를 첨가하여, 교환한 다음 3 h 동안 배양하였다. 3 h 후 10% formaldehyde 용액이 첨가된 phosphate buffered saline (PBS)을 100 mL씩 처리하여 20 min 고정하였고, NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water)을 well당 100 mL을 가하여 세포 내의 NR을 추출하였다. 추출 후 microplate reader (Synergy HT; BioTek Instruments, USA)를 이용하여, 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 그라비올라의 세포 생존율을 H₂O₂를 처리하지 않고, 농도별로 처리하여 동일한 방법으로 진행하였다.

2.5. 세포 내 Reactive oxygen species (ROS) 측정

그라비올라 추출물의 세포 내 활성산소의 생성 억제력을 측정하기 위하여 Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 방법을 이용하여 세포 내 ROS 활성 억제력을 측정하였다. HDF 세포를 이용

하여 2 × 10⁵ cells/well의 농도로 분주 한 후 24 h 배양하였다. 세포에 시료를 12.5, 25, 50 µg/mL의 농도로 분주하여 24 h 추가 배양을 진행하였다. 24 h 후 DCF-DA 10 µM 첨가하여 30 min 어두운 곳에서 배양 한 후 Flow Cytometer (BD Biosciences, USA)을 이용하여 485 nm excitation 530 nm emission wavelength에서 ROS의 변화량을 측정하였다.

2.6. 통계 처리

본 연구는 독립적으로 3회 이상 측정하여 본 실험 결과를 얻어 분석하였으며, 모든 실험은 동일한 조건하에 진행하였다. 각 실험에 대하여 통계 처리는 SPSS Window Version 17.0 (SPSS Inc., USA)을 이용하여 분석하였고, 유의성 검증은 Student's t-test로 실시하였다. 또한 p-value 값을 구하고, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 총 폴리페놀 함량

생체막에 존재하는 지질 성분들은 불안정한 free radical과 반응하여 산화되며, 생체의 노화를 일으키는 주범으로 알려져 있다. 이러한 산화 반응을 방지하기 위하여 free radical scavenging을 이용하여 radical을 비교적 안정한 상태로 유지하게 되는데, 이러한 free radical scavenging을 항산화제라고 부르며, 대표적인 물질이 페놀 화합물이다[27]. 따라서 총 페놀 함량은 항산화 활성에 중요한 인자로 작용하며, 일반적으로 폴리페놀 함량이 증가할수록 항산화 활성이 증가한다고 보고됨과 같이 본 연구에서 항산화 활성에 지표가 되는 총 폴리페놀 함량을 확인하기 위하여, 그라비올라 추출물 0.5, 1, 2.5, 5 mg/mL의 농도로 처리하였으며, 폴리페놀 함량을 Fig. 1에 나타내었다. 본 실험 결과, 농도 의존적인 폴리페놀 함량이 확인되었으며, 표준 물질로 사용한 caffeic acid에 대입하여 총 플라보노이드 함량을 측정할 결과, 26.6 mg(CA)/100g의 폴리페놀 함량을 확인하였다. Lee & Jo의 선행연구에서 그라비올라 잎의 용매별 분획 추출물 중 에탄올 추출물에서 가장 높은 폴리페놀 함량이 나타내었다고 보고되고 있으며[28], 그라비올라 잎 추출물에서 높은 페놀류의 함량으로 인한 항산화 효과가 있을 것

으로 사료된다.

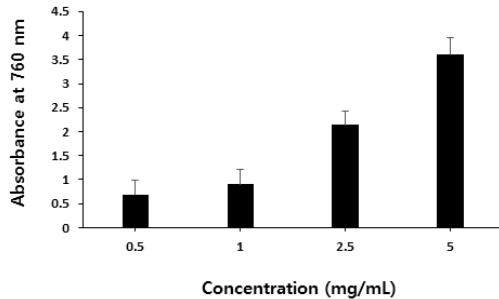


Fig. 1. Change of total polyphenol concentration of *Annona muricata* (graviola) extract. The results are presented as the mean±S.D. of three independent experiments.

3.2. 총 플라보노이드 함량

그라비올라 추출물의 총 플라보노이드의 함량을 확인하기 위하여 그라비올라 추출물 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도로 처리한 후 총 플라보노이드 함량을 측정하였다(Fig. 2). 본 실험 결과, 그라비올라 추출물의 총 플라보노이드 함량은 14.3 mg(Q)/100g의 높은 플라보노이드 함량을 확인하였으며, 그라비올라 추출물의 총 페놀 함량이 높게 확인됨에 따라 플라보노이드 함량도 비교적 높게 함유된 것으로 사료된다.

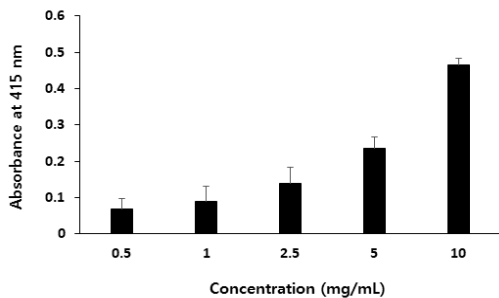


Fig. 2. Change of total flavonoid concentration of *Annona muricata* (graviola) extract. The results are presented as the mean±S.D. of three independent experiments.

3.3. DPPH radical 소거 활성 측정

본 연구에서는 그라비올라 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위하여 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL

의 농도를 사용하여 DPPH radical 소거 활성을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 본 실험 결과, 대표적인 항산화제로 알려진 ascorbic acid의 0.5 mg/mL 에서는 63 %의 radical 소거 활성을 확인하였고, 그라비올라 추출물의 1 mg/mL의 농도에서도 63.7%의 양성 대조군과 비슷한 소거 활성이 확인되었다. 특히 그라비올라 추출물 10 mg/mL 농도에서는 81.4%의 높은 radical 소거 활성이 확인 되었다. Choi & Ohk의 선행 연구 중 그라비올라 잎 열수 추출물 10 mg/mL의 농도에서 82.4%의 radical 소거 활성을 나타내었다고 되고 있으며, 본 연구와 유사한 결과를 확인 하였다[29]. 이와 같은 결과는 그라비올라 추출물의 총 페놀성 화합물들의 함량이 농도에 의해 증가됨에 따라 Phenolic hydroxy를 alkyl radical과 수소를 공유하여 산화를 억제하는 과정으로 인하여[30], radical 소거 활성에 영향을 미치는 것으로 사료되어 진다.

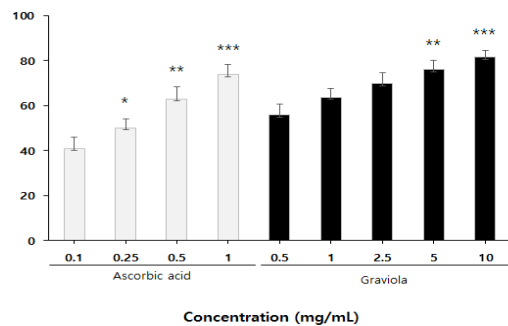


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of *Annona muricata* (graviola) extract. The results are presented as the mean±S.D. of three independent experiments (*p<.05, **p<.01, ***p<.001).

3.4. HDF 세포 생존율

본 실험을 통해 그라비올라 추출물의 세포 독성을 평가하고, 추후 실험의 적정 농도를 결정하기 위하여 그라비올라 추출물을 0~100 μg/mL 농도로 처리하여 세포 독성을 통한 세포 생존율을 측정하였다(Fig. 4). 본 실험 결과, 그라비올라의 추출물을 최고 농도인 100 μg/mL에서도 유의한 세포 독성이 확인 되지 않았으며, 모든 농도에서 90% 이상의 세포 생존율이 확인 되었다. 또한 Choi & Ohk의 선행연구에서 MTT assay

를 통한 HDF 세포 생존을 측정하였을 때 150 mg/mL에서 100%의 세포 생존율이 확인되었다고 보고되고 있으며[29], 본 연구와 비슷한 연구 결과를 확인하였다. 이와 같은 결과를 토대로 본 연구에서 향후 HDF 세포주 모델 실험에서는 최고 농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 추후 실험을 진행하였다.

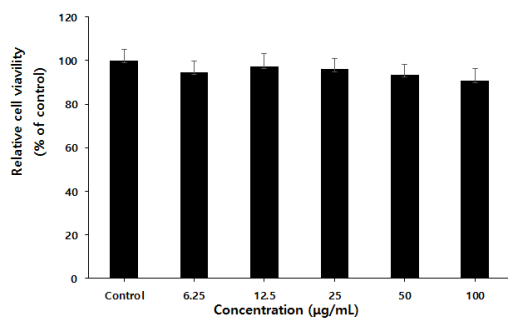


Fig. 4. Cytotoxicity in HDF cells. The results are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments.

3.5. H_2O_2 에 의한 HDF 세포 손상 억제 효과

대표적인 활성산소인 H_2O_2 가 유발하는 산화적 스트레스로부터 그라비올라 추출물의 세포 보호 효과를 확인하기 위하여, HDF 세포에 그라비올라 추출물을 각 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 H_2O_2 를 각 4 h, 24 h, 48 h 처리하여, 세포 생존율을 측정하는 NR assay 방법으로 각 세포 생존율을 비교하였다(Fig. 5). 본 실험 결과, HDF에 H_2O_2 만을 처리하였을 때 20% 미만의 세포 생존율을 확인하였으며, HDF 세포에 그라비올라 추출물을 처리 하였을 때 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 농도 의존적인 세포 생존율의 변화를 확인하였으나, 50 $\mu\text{g/mL}$ 부터는 세포 생존율이 점차 감소되는 것을 확인 할 수 있었다. 특히, 25 $\mu\text{g/mL}$ 농도를 처리 하였을 때 24 h까지 89.92%의 높은 세포 손상 억제 효과를 확인하였으며, 48 h 처리하였을 때 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 76.09%의 세포 손상 억제 효과를 확인하였다.

3.6. 세포 내 ROS 측정

그라비올라 추출물의 세포 내 ROS 활성 억제 측정을 확인하기 위하여, HDF 세포에 산화적 스트레스를 유발한 후 그라비올라 추출물 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리 한 후 DCF-DF를 이용

하여 ROS 활성 억제 효과를 측정 하였다(Fig. 6). 본 실험 결과, HDF 세포에 H_2O_2 가 유의하게 ROS를 증가시켰으며, 그라비올라 추출물은 HDF 세포에서 농도가 증가할수록 유의한 ROS 활성 억제 효과를 확인하였다. 특히 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 전 처리에 비해 28.01%의 활성 억제 효과를 나타내었고, 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid 와 비슷한 활성 억제 효과를 확인 하였다. 이와 같은 결과를 통하여 그라비올라 추출물이 HDF 세포에서 H_2O_2 에 유도된 ROS 생성을 효과적으로 억제함으로써 그라비올라 추출물이 항산화, 항노화와 관련한 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다.

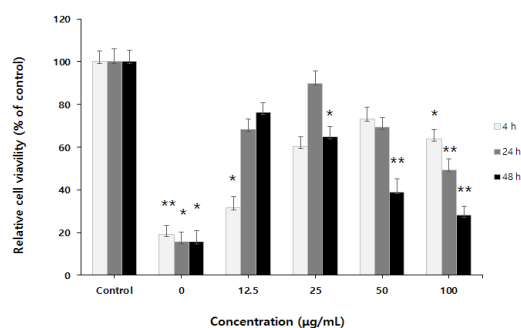


Fig. 5. Cytoprotective effect of *Annona muricata* (graviola) extract on H_2O_2 . The results are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments (* $p < .05$, ** $p < .01$).

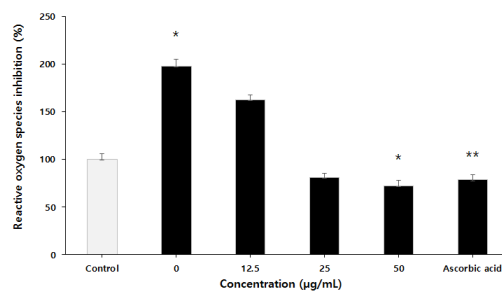


Fig. 6. Reactive oxygen species (ROS) inhibition of graviola extract. The results are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments (* $p < .05$, ** $p < .01$).

4. 결론

본 연구에서는 그라비올라 추출물의 항산화 활성 및 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 먼저, 그라비올라 추출물의 항산화 활성을 측정한 결과, 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 26.6 mg(CA)/100g, 14.3 mg(CA)/100g의 높은 함량을 확인하였으며, 농도가 증가할수록 페놀성 화합물의 증가로 인한 높은 DPPH radical 소거 활성이 확인되었다. 다음으로 HDF 세포에서의 세포 생존율을 측정한 결과, 모든 농도에서 10% 미만의 세포 독성으로 추후 100 µg/mL을 최고 농도로 하여 추후 실험을 진행 하였다. H₂O₂가 유발하는 산화적 스트레스로부터 그라비올라 추출물의 세포 보호 효과를 확인하기 위하여 H₂O₂를 각 4 h, 24 h, 48 h 동안 처리하여 NR assay 방법을 이용하여 측정하였다. 실험 결과, 그라비올라 추출물은 농도 의존적인 세포 생존율을 나타내었으며, 25 µg/mL의 농도까지 농도 의존적인 세포 생존율을 통한 세포 보호 효과를 확인하였으나, 50 µg/mL 부터는 세포 생존율이 점차 감소되는 것을 확인 할 수 있었다. 특히, 25 µg/mL 농도를 처리 하였을 때 24 h까지 89.92%의 높은 세포 손상 억제 효과를 확인하였으며, 48 h 처리하였을 때 12.5 µg/mL의 농도에서 76.09%의 세포 손상 억제 효과를 확인하였다. 마지막으로 DCF-DA를 이용하여 그라비올라 추출물의 ROS 활성 억제 효과를 확인한 결과, 농도가 증가할수록 유의한 ROS 활성 억제 효과를 확인하였고, 특히 양성대조군인 ascorbic acid 과 비슷한 활성 억제 효과를 확인하였다. 이와 같은 결과를 종합해 볼 때 항산화 활성이 우수하고, HDF 에 대한 세포 독성이 적으며, 그라비올라 추출물이 H₂O₂로 인해 유도되는 HDF 세포의 손상에 대한 세포 사멸을 억제하고, 세포 내 ROS 활성 억제를 통한 항산화 효과를 확인됨에 따라 그라비올라 추출물의 항산화 활성 및 세포 보호 효과를 가진 기능성 화장품 소재로서의 활성 가능성을 확인하였다.

References

1. S. O. Lee, M. J. Kim, D. K. Kim, H. J. Choi, "Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*", *Korean J. Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.34, No.2 pp. 139-147, (2005).
2. S. Papa, V. P. Skulachevi, "Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging", *Mol. Cell. Biochem.*, Vol.174, No.21 pp. 305-319, (1997).
3. C. Frippiat, Q. M. Chen, S. Zdanov, J. P. Magalhaes, J. Remacle, O. Toussaint, "Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor- β I, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts", *J. Biol. Chem.*, Vol.276, No.4 pp. 2531-2537, (2001).
4. P. Stanely Mainzen Prince, Venugopal P. Menon, "Antioxidant action of *Tinospora cordifolia* root extract in alloxan diabetic rats", *Phytother. Res.*, Vol.15, No.3 pp. 213-217, (2007).
5. A. Szuster-Ciesielska, J. Daniluk, M. Kandefer-Szerszen, "Alcohol-related cirrhosis with pancreatitis. The role of oxidative stress in the progression of the disease", *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, Vol.49, No.2 pp. 139-146, (2001).
6. I. S. Young, J. McEneny, "Lipoprotein oxidation and atherosclerosis", *Biochem. Soc. Trans.*, Vol.29, No.2 pp. 358-362, (2001).
7. S. Y. Kim, S. Y. Baek, S. M. Kang, "The Nail Design Technique Applying with UV Gel", *Kor. Soc. Aesthet. Cosmetol.*, Vol.10, No.1 pp. 179-184, (2012).
8. M. S. Son, J. H. Song, J. S. Kim, H. D. Jang, G. N. Kim, "Anti-oxidant activity of Oil Extracted from Korean Red Ginseng and Its Moisturizing Function", *Kor. Sor. Aesther. Cosmetol.*, Vol.11, No.3 pp. 489-494, (2013).
9. E. J. Jung, J. S. Moon, T. B. Choi, "Effect of Curcumin on the MMP-1 Expression and Collagen Production in Human Dermal Fibroblast", *Kor. Sor. Aesther. Cosmetol.*, Vol.11, No.4 pp. 743-752,

- (2013).
10. S. H. You, Y. H. Pyo, "Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Ethanol Extracts from Wheat Sprout", *J Invest Cosmetol*, Vol.11, No.3 pp. 231-238, (2015).
 11. S. H. You, J. S. Moon. "A Study on Anti-oxidative, Anti-inflammatory, and Melanin Inhibitory Effects of Chrysanthemum Sibiricum Extract", *Journal of the Korean oil chemists' society*, Vol.33, No.4 pp. 762-770, (2016).
 12. S. H. You. "Antioxidant Activity and Whitening activity of Psidium guajava leaf extract", *J. of Korean Oil Chemists. Soc*, Vol.34, No.2 pp. 296-304, (2017).
 13. Sim EA. *Annona muricata* soap study on sensitive skin improving action, *Chung-ang University Master's thesis*, 2016.
 14. C, Yang, S. R. Gundala, R. Mukkavilli, S. Vangala, M. D. Reid, R. Aneja. "Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in *Graviola (Annona muricata)* leaves confer protection against prostate cancer", *Carcinogenesis*, Vol.3, No.6 pp. 656-665, (2015).
 15. L. Dvorkin-Camiel, J. S. Whelan. "Tropical american plants in the treatment of infectious diseases", *Journal of dietary supplements*, Vol.5, No.4 pp. 349-372, (2008).
 16. Y. D. Yeni, S. N. Djannah, L. H. Nurani. "UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI INFUSA DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) SECARA in Vitro TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 35218 SERTA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPISNYA", *KES MAS*, Vol.4 No.3 pp. 114-239, (2010).
 17. P. N'Gouemo. "Effects of ethanol extract of *Annona muricata* on pentylenetetrazol-induced convulsive seizures in mice", *Phytotherapy Research*, Vol.11 No.3 pp. 243-245, (1997).
 18. M. T. Pepato, E. H. Keller, A. M. Baviera, I. C. Kettelhut, R. C. Vendramini, I. L. Brunetti. "Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats", *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.81, No.2 pp. 191-197, 2002.
 19. S. O. Adewole, E. A. Caxton-Martins, "Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic-cells of streptozotocin-treated diabetic rats", *African Journal of Biomedical Research*, Vol.9, No.3 pp. 173-187, (2006).
 20. S. Adewole, J. Ojewole, "Protective effects of *Annona muricata* (Linn) (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats", *Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*, Vol.6, No.1 pp. 30-41, (2009).
 21. D. O. Adeyemi, O. A. Komolafe, O. S. Adewole, E. M. Obuotor, T. K. Adenowo, "Anti-hyperglycemic activities of *Annona muricata* (Linn)", *Afr J Tradit Complement Altem Med*, Vol.6, No.1 pp. 62-69, (2009).
 22. G. Yahaya, "Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola)", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Vol.7, No.1 pp. 355-363, (2014).
 23. T. Gutfinger, "Polyphenols in olive oils", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Vol.58, No.11 pp. 966-968, (1981).
 24. M. I. Moreno, M. I. Isla, A. R. Sampietro, M. A. Vattuone, "Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina", *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.71, No.1-2 pp. 109-114, (2000).

25. M. S. Blois, "Antioxidant determination by the use of a stable free radical", *Nature*, Vol.181 pp. 1199-1200, (1958).
26. M. J. Ha, S. H. You, "Bioactive Characteristics of Extracts of *Opuntia humifusa* Fruit as Functional Cosmetic Ingredients", *Asian J Beauty Cosmetol*, Vol.14, No.4 pp. 463-472, (2016).
27. C. kaur, H. C. Kapoor, "Anti-oxidant activity and total phenolic content of some asian vegetables", *inter. j. food. sci. technology*, Vol.37, No.2 pp. 153-161, (2002).
28. G. W. Lee, Y. H. Cho. "Antioxidant Activity of Leaf Extract from *Annona muricata*", *Korea Contents Association*, Vol.14, No.3 pp. 43-46, (2016).
29. J. H. Choi, S. H. Ohk, "Evaluations on Antioxidant Effect of Water Extract from *Graviola* Leaves", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol.18, No.6 pp. 129-135, (2017).
30. G. Nonaka, "Isolation and structure elucidation of tannins", *Pure & Appl. Chem*, Vol.61, No.3 pp. 357-360, (1989).