생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
50(2) : 86 ~ 95 (2019)

대추 추출물의 항산화 및 아토피 피부염 관련 항염증 효과

홍창의[1] · 전영희[2] · 유수연[3*]
[1]전북대학교 생물학과, [2]서울여자대학교 화학과, [3]순천대학교 약학과

Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of *Zizyphus jujuba* Miller var. *inermis* extracts

Chang-Eui Hong[1], Young-Hee Chun[2] and Su-Yun Lyu[3*]
[1]*Department of Biology, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea*
[2]*Department of Chemistry, Seoul Women's University, Seoul 01797, Korea*
[3]*Department of Pharmacy, Sunchon National University, Suncheon 57922, Korea*

Abstract – In the present study, the effect of *Z. jujuba* Miller var. *inermis* Rehder extracts on the secretion of atopic dermatitis (AD)-related cytokines and hyaluronidase activity was investigated. We prepared four fractions, butylene glycol (JB), ethanol (JE), and water (JW), with *Z. jujuba* Miller var. *inermis* extracts. JW significantly reduced the secretion of interleukin-8 and JE reduced the secretion of tumor necrosis factor-alpha in human keratinocyte HaCaT cells. Also, hyaluronidase activity was measured by enzyme assay and the fractions inhibited the activity in a dose-dependent manner. In addition, the human dermal fibroblast, HDF-n cells were treated with the extracts and antioxidant activities were measured. The results showed that the extracts increased the free radical scavenging activity and the superoxide dismutase activity. Taken together, *Z. jujuba* Miller var. *inermis* extracts reduced the secretion of AD-related cytokines and inhibited the hyaluronidase. In addition, the extracts showed antioxidant activity.

Keywords – *Zizyphus jujuba* Miller var. *inermis* Rehder, Anti-inflammatory, Antioxidant, Atopic dermatitis

대추(*Zizyphus jujuba* Miller var. *inermis* Rehder)는 갈매나무과(Rhamanceae), Zizyphus속으로, 원산지는 북아프리카와 서유럽으로 40여종의 품종과 400여종의 변종이 있는 것으로 알려져 있다.[1)] 대추의 용도는 다양하여 차, 잼, 떡, 음료 등의 식품 제조로 널리 이용되고 있고 그 외에 떡, 음료 등의 부재료로도 사용된다. 또한 대추는 진통, 항암, 해열, 진정, 지혈, 강장, 면역증강 등의 약리적 효능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.[2,3)] 대추에는 alkaloid, saponin, triterpenoid, polyphenol 등이 함유되어 있으며,[4)] 이 중 triterpenoid는 중요한 활성 물질의 하나로서 세포독성,[5)] 항균,[6)] 항말리리아,[7)] 항-HIV,[8)] 항염[9,10)] 등의 생물학적 활성을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다.

피부는 표피(epidermis), 진피(dermis), 피하조직(subcutaneous tissue)으로 이루어져 있고, 피부의 가장 외층인 표피는 외부 환경으로부터 인체를 보호하며, 수분증발을 억제하여 피부의 건조화를 방지해주는 역할을 한다.[11)] 건강한 표피는 15 – 20%의 수분을 함유하고 있으며 수분이 10% 이하로 떨어지면 피부가 건조해지고 윤기가 없어져 피부 손상이 일어날 수 있다.[12,13)]

아토피 피부염(Atopic dermatitis, AD)은 주로 영유아기에 발생하는 피부질환으로, 만성적인 재발의 양상을 보인다. AD는 피부 건조화, 표피 과증식(hyperkeratosis), 홍반, 부종, 소양증, 부스럼 딱지 등의 양상을 보이며, 천식, 알레르기, 두드러기, 습진 등을 동반하여 나타난다.[14)] AD는 최근, 급격하게 증가하고 있으며, 영유아 뿐만 아니라 성인에게도 증가하고 있는 추세다.[15,16)] 현재, 어린이는 10 – 20%의 유병률을 보이며, 성인은 1 – 3%의 유병률을 보인다고 알려져 있다. 그 중 80 – 90% 는 5세 이전에 발병하며, 85% 정도는 1세 이전에 발병한다.[17)]

AD의 발생에는 환경, 유전적, 면역학적 이상 등 다양한 요인이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다.[18)] 특히, 집먼지 진드기(*Dermatophagoides pteronyssimus*, *D. farinae*)는 AD의 가장 중요한 원인으로 알려져 있으며,[19)] 유전적으로 부모 중 한쪽이 AD일 경우, 자녀의 약 56%가, 부모 모

*교신저자(E-mail) : suyun@scnu.ac.kr
(Tel) : +82-61-750-3759

두가 AD일 경우, 자녀의 약 81%에서 AD가 나타나는 것으로 알려져 있다.[20)]

AD의 발생에는 T-세포, B-세포, Langerhans 세포, 호산구, 각질형성세포 등이 분비하는 cytokine, immunoglobulin(Ig) E와 같은 인자들이 관여한다.[21)] 각질형성세포는 자극에 의해 염증반응을 촉진시키는 pro-inflammatory cytokine인 interleukin(IL)-1, IL-4, tumor necrosis factor alpha(TNF-α) 등을 분비하여 림프구, 대식세포, 호산구에 부착할 수 있는 분자들을 끌어들여 염증을 악화시킨다.[22)] 또한, IL-4는 T helper(Th) 2 세포에서 분비되어 B-세포의 성장 및 분화를 촉진시키고, IgE의 분비를 증가시키며, 비만 세포의 활성화에 중요한 역할을 한다.[23,24)] IL-8은 각질형성세포에서 분비되어 세포 사이의 결합, 호산구의 활성화, histamine 분비 등을 조절한다.[25,26)] 그리고 TNF-α는 각질형성세포, 대식세포, 비만세포 등에서 생산되어 여러 cytokine의 생성, 세포의 성장과 분화, 괴사 등에 관여하여 AD에 영향을 준다.[27)]

건조한 피부는 AD에서 흔하게 동반되는 증상이며, 피부장벽기능의 이상에 의해서 피부 건조가 발생되고 그 결과, 소양증과 피부 태선화가 나타난다.[28)] 이로 인해 allergen과 미생물의 투과성이 증가되어 진피 안으로 침투를 증가하게 한다.[29)] 피부 보습의 중요 인자인 hyaluronic acid(HA)는 세포 외 기질(extracellular matrix)의 구성성분으로 수분 보유, 세포 간 간격 유지, 세포 성장인자, 영양성분의 저장 및 확산에 관여할 뿐만 아니라 세포 분열과 분화, 이동 등에도 관여하는 것으로 보고된 바 있다.[30)] 특히 HA는 자기보다 200배에 해당하는 수분을 함유할 수 있으며, 피부에서 HA의 감소는 피부 건조의 원인이 된다.[31)] Hyaluronidase(HAase)는 고분자 HA를 분해하여 저분자 HA로 변형하는 효소인데, 고분자 HA는 대식세포의 식작용을 억제하여 염증반응을 조절하는 반면,[32)] 저분자 HA는 류마티스 관절염 등 염증성 질환 환자에게서 높은 농도로 관찰되고 있다.[33)] 이러한 기작을 통해 최근 AD 치료제 연구 등에서 hyaluronidase 저해제가 많은 관심을 끌고 있다.[34)]

한편 산소와 항상 접촉하고 있는 피부는 특히, 태양광선에 노출 시 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 인한 광산화적 손상을 받는다. ROS에는 반응성이 매우 큰 hydroxyl radical(OH·), superoxide anion radical($O^{\cdot-}_2$), peroxide radical(RO_2·)과 같은 자유기들과 과산화수소(H_2O_2), singlet oxygen($^1O_2$), 오존 등이 있다.[35)] 이들은 고에너지 복사선, 광증감반응 및 효소반응 등의 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 내에서 생성될 수 있다.[36)] ROS는 식균작용이나 면역체계에서도 생성되어 이물질 침입에 대한 방어기작으로 이용되나, 체내에 고농도로 존재하는 경우 산화적 스트레스를 유발하여 DNA 변이, 노화를 촉진하고,[37)] 여러 가지 pro-inflammatory cytokine, chemokine 및 eicosanoid metabolites의 분비를 촉진시켜 염증 반응의 지속 및 악화를 가져온다.[38)] 그리고 정상인에 비해 급성으로 악화된 AD 환자에서 산화적 스트레스 표지자들이 증가되어 있음이 밝혀졌고, 이는 치료에 반응하여 감소하는 양상을 보였다. 또한 중증의 AD에서 각질층의 산화적 단백 손상(oxidative protein damage)에 의한 카르보닐 성분(carbonyl moiety)의 증가 및 불포화 지방산 산화에 의한 알데하이드의 생성은 산화작용이 표피 장벽의 손상과 수분 손실을 유발하여 AD를 악화시킬 수 있다는 것을 보여준다.[39-41)] 그러나 ROS에 대한 방어기작으로 생물들은 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화효소가 존재하여 ROS로부터 보호 작용을 가지게 된다.[42)] SOD는 $O^{\cdot-}_2$을 H_2O_2로 변환시키고 생성된 H_2O_2는 catalase에 의해 물과 산소 분자로 전환시켜 산소기를 제거시킨다.[43)] 따라서 항산화효소의 활성화를 통한 ROS의 제거는 AD의 증상 완화 또는 치료와 밀접한 관련이 있다.[44)]

AD는 대부분 염증성 피부를 동반하기 때문에 치료 시 염증치료를 위한 항히스타민제와 스테로이드제를 처방하는 것이 일반적이다. 그러나 이러한 처방의 가장 큰 문제점은 장기간 사용 시 부작용이다.[45)] 항히스타민제는 저혈압, 피부염, 소화기장애 등을 일으킬 수 있고,[46)] 스테로이드제의 경우 고혈압, 심부전, 피부 위축, 피부염, 혈관확장 등 심각한 부작용을 초래할 수 있다.[47)] 그러므로 이러한 부작용을 나타내지 않으면서, 항염증 효능을 보유하는 아토피 치료용 원료나 제약을 개발하기 위한 다양한 연구가 활발히 진행되고 있다.[48)]

따라서 본 연구에서는 대추 추출물을 활용하여 AD관련 cytokine분비 변화와 hyaluronidase활성, 그리고 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 자유 라디칼에 대한 소거 활성 및 pyrogallol을 이용한 SOD 유사 활성 측정을 통해 항산화활성을 평가함으로써 부작용이 없으면서 염증반응을 억제할 수 있는 차세대 AD 치료제로서의 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 – 본 실험에서 사용한 시료인 대추는 경동한약재시장에서 구입하여 유수연 교수가 검증하였다. 대추 추출물의 제조 방법은 다음과 같다. 대추 100 g을 용매 별 40% butylene glycol (JB), 70% ethanol (JE) 및 증류수 (JW) 1 kg에 넣어 24시간 상온 침지 시킨 후 한지 이중 필터로 걸러내고, pore size가 다른 membrane filter(0.8, 0.45, 0.22 μm)에 의해 순차적으로 여과하여 -20°C에 보관하여 사용하였다.

세포 배양 – 사람 각질형성세포인 human HaCaT 세포는 American type culture collection(ATCC, Rockvill, USA)에서, 사람 피부 아세포(Human dermal fibroblast)인 HDF-n

세포는 Modern Tissue Technology(MTT, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. HaCaT 세포와 HDF-n 세포는 각각 10% fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL, Grand Island, USA), 1% penicillin/streptomycin(GibcoBRL)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, GibcoBRL) 배지로 배양하고 CO_2 incubator(Sanyo, Japan, 5% CO_2, 95% air, 37°C)에서 배양하였다. IL-8 분비 측정을 위해서 recombinant human TNF-α(BD Biosciences, California, SJ, USA) 100 ng/mL을 HaCaT 세포에 처리한 후 대추 추출물을 농도 별로 투여하여 세포의 변화를 관찰하였다.

집먼지 진드기 – 집먼지 진드기인 *D. farinae*는 연세대 의대 알레르기 연구소에서 구입하여 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.0)에 녹이고, pore size가 다른 membrane filter (0.8, 0.45, 0.2 μm)에 의해 순차적으로 여과하여 -20°C에서 보관하여 사용하였다.

세포독성 측정 – 시료에 대한 각 세포의 독성은 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 사용하여 실험하였다. 96 well flat-bottomed culture plate(Nunc, Life Technologies, Paisley, UK)에 세포를 1×10^4 cells/well씩 접종하고 시료를 200 μL씩 가한 후, 48시간 배양하였다. 이 후, PBS에 녹인 MTT solution(3 mg/mL)을 50 μL씩 첨가하고 CO_2 incubator에 넣어 4시간 동안 반응시켰다. 4시간 후, 상등액을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO) 150 μL씩 첨가하고 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cytokine 분비 변화 측정 – 96-well plate에 affinity purified anti-human TNF-α(eBioscience, San Diego, CA, USA)를 3 μg/mL로 binding buffer(0.1 M sodium phosphate buffer, pH 9.0)에 희석하여 well 당 50 μL씩 넣은 후, 4°C에서 24시간 방치하였다. PBS/tween으로 3회 세척 후, blocking buffer(5% skimmed milk/PBS)를 200 μL 가한 후, 37°C에서 2시간 방치하였다. PBS/tween으로 4회 세척 후, 시료와 반응시킨 세포의 상등액을 100 μL씩 넣고, 4°C에서 24시간 반응시켰다. PBS/tween으로 5회 세척 후, biotinylated anti-human IL-8 antibody(BD Biosciences)를 PBS에 희석하여 100 μL/well로 넣고 37°C에서 2시간 반응시켰다. PBS/tween으로 6회 세척 후, streptavidin-HRP(BD Biosciences)를 PBS에 1:1000으로 희석하여 100 μL/well로 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS/tween으로 7회 세척 후, 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine(TMB, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) solution을 100 μL/well씩 첨가하고 15분 동안 반응시킨 후, 1 M HCl solution을 100 μL/well씩 가하여 반응을 종료시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

HAase 저해 활성 – 각 시료를 일정 농도가 되도록 조제하여 20 mM sodium phospate buffer(pH 7.0) bovine serum albumin(BSA)와 125 μL로 맞추고, 5 units/mL HAase solution(Sigma)을 125 μL 넣어, 37°C에서 1시간 방치하였다. 여기에 0.03% (*w/v*) HA solution(Sigma)을 250 μL씩 가한 후, 다시 37°C에서 45분간 방치하였다. 반응이 끝난 혼합물 125 μL를 취해 acid albumin solution(24 mM sodium acetate, 79 mM acetic acid, 0.1%(*w/v*) BSA, pH 3.75) 625 μL에 더하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 600 nm에서 흡광도를 측정하고, 저해활성능은 대조군과 비교하여 감소율로 나타내었다.

DPPH 자유 라디칼 소거 활성 – 자유 라디칼 소거 활성은 Inkeda 등[49]의 방법에 준하여 측정하였다. 각 시료를 일정 농도가 되도록 메탄올에 넣어 200 μL로 맞추고, 메탄올에 녹인 0.1 mM DPPH solution(Sigma)을 200 μL씩 가한 후, 교반하고 실온에서 30분 동안 방치한 다음 519 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거활성능은 대조군과 비교하여 감소율로 나타내었다.

자외선(UVA) 조사 – HDF-n 세포를 산화적으로 손상시키기 위해 100 mm culture dish에 1×10^6 cells/mL로 분주한 다음 24시간 동안 배양하였다. 자외선 조사 직전에 PBS로 1회 세척하고, PBS를 세포가 살짝 잠길 정도로 넣어 준 상태에서 plate 뚜껑을 열고 자외선을 조사하였다. 자외선 조사 즉시 다시 PBS로 1회 세척한 후, 5% FBS를 첨가한 DMEM과 농도 별 대추 추출물을 넣고 CO_2 incubator에 넣어 배양하였다. 자외선 조사 이후, 세포를 수거하여 파쇄 완충용액(20 mM HEPES, pH 7.0/1 mM EDTA, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) 300 μL를 넣고, 초음파기로 파쇄 후 4°C, 12,000 × *g*에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 수거하고 단백질을 정량한 후, 항산화 활성 실험에 사용하였다.

SOD 유사 활성도 측정 – SOD 유사 활성은 pyrogallol의 자기산화(auto-oxidation)를 저해하는 정도로 확인 하였다.[50] 1 mM EDTA를 함유한 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.2) 970 μL에 0.2 mM pyrogallol solution을 10 μL와 세포 추출물(단백질 농도 5 mg/mL) 20 μL를 가하여 15°C에서 10분간 반응시키고, 1 M HCl 용액을 가하여 반응을 종료 시킨 후, 440 nm에서 흡광도를 측정하여 활성도를 산정하였다.

통계분석 – 각 군간의 통계처리는 GraphPad PRISM Ver. 7.04(GraphPad Software, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

HaCaT 세포에 대한 대추 추출물의 세포 독성 – Keratinocyte인 HaCaT 세포를 이용하여 대추 추출물의 AD 관련 cytokine 분비에 대한 영향을 확인하기 전에, 추출물의 세포에 대한 영향을 MTT assay에 의하여 확인하였다. HaCaT 세포에 추출물을 농도 별로 처리하고 48시간 배양

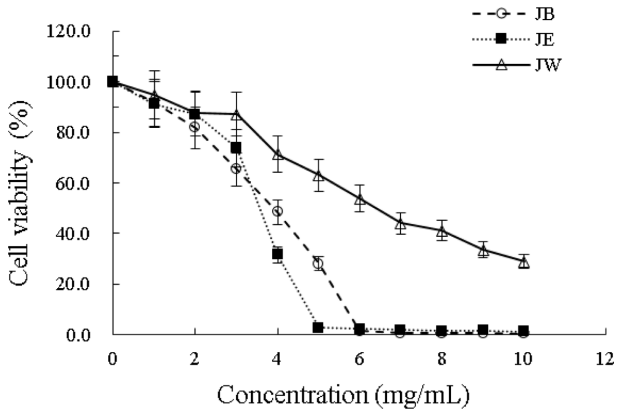

Fig. 1. Viability of HaCaT cells treated with *Z. jujuba* Miller var. *inermis* extracts. Cells were treated with extracts for 48 h and the viability was measured by a MTT assay.

하여 세포의 생존율을 확인하였으며, 시료를 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하였다. 그 결과 JB와 JE의 IC_{50}(inhibitory concentration of 50%)는 3 mg/mL이었으며, JW의 IC_{50}는 7 mg/mL이었다. 그리고 1 mg/mL 농도의 추출물을 처리한 결과, JB의 경우 99%의 생존율을, JE는 96%의 생존율을, JW는 96%의 생존율을 보이는 것으로 보아 대추 추출물이 세포에 거의 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이 결과를 바탕으로 추출물의 농도를 세포의 생존율에 크게 영향을 미치지 않는 1 mg/mL 이하로 설정하여 실험을 수행하였다.

대추 추출물이 TNF-α 분비에 미치는 영향 – 먼저 집먼지 진드기의 HaCaT 세포에 대한 영향을 MTT assay에 의하여 확인하기 위하여 HaCaT 세포에 집먼지 진드기를 농도 별로 처리하고, 48시간 배양하여 세포의 생존율을 확인하였다. 그 결과 집먼지 진드기 2 μg/mL의 농도에서 78%의 생존율을, 10 μg/mL의 농도에서 67%의 생존율을 보이는 것으로 나타났으며, 이후 모든 실험에 사용할 집먼지 진드기의 농도는 10 μg/mL 이하의 농도로 설정하였다(Fig. 2A). 다음으로 HaCaT 세포에 집먼지 진드기를 처리하여 TNF-α 분비를 유도하고, 이를 ELISA에 의하여 확인하였다. HaCaT 세포에 집먼지 진드기를 농도 별로 처리하고 48시간 동안 배양하여 TNF-α의 분비를 확인한 결과, 전체적으로 분비가 1.5배 이상 증가하였다. 특히 진드기 2 μg/mL의 가장 낮은 농도로 처리한 HaCaT 세포에서 TNF-α가 가장 높은 수준인 2.3배 증가함을 알 수 있었으며 (Fig. 2B), 이 결과를 바탕으로 집먼지 진드기 2 μg/mL을 사용하여 세포의 TNF-α 분비를 유도하였다. 이 결과는 Maeda 등의[51] 경우 HaCaT 세포에 *D. farinae* 10 μg/mL를 처리하여 48시간 배양했을 때 TNF-α의 mRNA 전사량이 상당히 증가된 결과와 유사하며, 집먼지 진드기가 염증성 cytokine의 분비를 증가시킴으로써 천식과 AD 등을 유발하는 것으로 생각

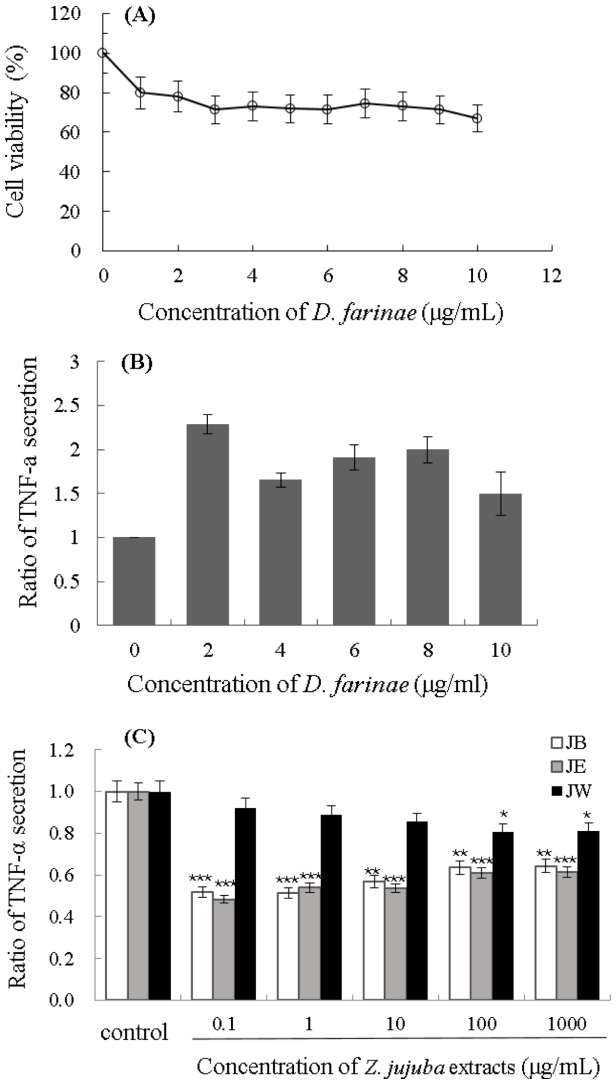

Fig. 2. Effect of *Z. jujuba* Miller var. *inermis* extracts on the secretion of TNF-α in HaCaT cells. (A) Viability of HaCaT cells treated with house dust mite. Cells were treated with house dust mite (*D. farinae*) for 48 h and the viability was measured by a MTT assay. (B) Effect of house dust mite on the secretion of TNF-α in HaCaT cells. Cells were treated with house dust mite (*D. farinae*) for 48 h and TNF-α secretion was measured. (C) Effect of *Z. jujuba* Miller var. *inermis* extracts on the secretion of TNF-α in HaCaT cells. The secretion of TNF-α from HaCaT cells was induced by treatment of house dust mite (2 μg/mL). Cells were treated with extracts of *Z. jujuba* Miller var. *inermis* for 48 h and TNF-α secretion was measured. JB: butylene glycol extract, JE: ethanol extract, JW: water extract. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared with control. Statistics by ANOVA and Dunnett's Multiple Comparison Test.

된다. 마지막으로, HaCaT 세포를 이용하여 대추 추출물의 AD관련 cytokine인 TNF-α 분비에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포에 2 μg/mL의 집먼지 진드기를 처리하여 TNF-

α의 분비를 유도 시킨 후, 대추의 용매 별 추출물을 처리하여 48시간 배양한 후, 분비된 TNF-α의 양을 ELISA에 의하여 확인하였다. 그 결과 JB를 처리한 경우, 처리 농도에 따라 TNF-α의 분비가 0.51 – 0.64배 감소하였으며, JE 를 처리한 경우 TNF-α의 분비가 0.48 – 0.61배 감소하였고, JW 를 처리한 경우 TNF-α의 분비가 0.81 – 0.92배 감소하였다(Fig. 2C). 특히 JB와 JE는 농도가 낮을수록 분비가 상당히 감소된 반면, JW는 농도가 높을수록 TNF-α의 분비가 감소되었고, 그 정도는 다소 낮은 것으로 나타났다. JB와 JE가 TNF-α의 분비를 상당히 감소시키는 것은 butylene glycol과 ethanol 추출물에서 항염증 효과가 있는 성분이 많이 용출된 것으로 생각되며, 물 추출물의 경우 TNF-α의 분비를 낮게 감소시키는 것으로 보아 용매의 종류에 따라 cytokine의 분비가 크게 달라지는 것을 알 수 있었다.

대추 추출물이 IL-8 분비에 미치는 영향 – 대식세포는 침입한 세균 등을 잡아 소화하고, 그에 대한 정보를 T-세포에 전달하는 항원제시세포이며, 자극을 받으면 신호전달 과정을 활성화시켜 종양괴사인자인 TNF-α 등 여러 염증성 물질들의 생산을 증가시킨다.[52] IL-8은 CXC chemokine으로서 백혈구의 탈과립을 유도하여 염증 세포들이 자극 부위로 모여들게 하여 염증반응을 촉진시키는 기능을 한다.[53] 본 연구에서는 TNF-α(100 ng/mL)을 HaCaT 세포에 8시간 처리한 후 ELISA를 통해 IL-8의 발현양을 관찰하였다. 그 결과 JB를 처리한 경우, 처리 농도에 따라 0.82 – 0.95배 분비가 감소되었으며, JE를 처리한 경우, 0.81 – 0.86배 분비가 감소되었다. 그리고 JW는 1 μg/mL의 농도에서 0.88배, 10 μg/mL의 농도에서 0.86배 분비가 감소되었고, 특히 1,000 μg/mL의 농도에서 IL-8의 분비가 최대 0.74배까지 감소시키는 것을 확인하였다(Fig. 3). Yagi 등의[54] 경우 대추의 에탄올 추출물에서 분리해낸 ethyl-α-D-fructofuranoside가 항알러지 작용을 하는 것을 보고하였고, Cyong 등의[55] 경우 약리적 효과가 있다고 알려진 180개의 야채와 과일의 물 추출물을 대상으로 cyclic adenosine monophosphate(c-AMP)의 활성을 검증한 결과, 오직 대추에서만 c-AMP의 활성이 나타났다는 결과를 보고하였다. 또한 Strieter 등은[56] c-AMP가 염증성 cytokine의 생성을 감소시키는 결과를 보고하여, 대추 추출물에 용출된 항염증 효과가 있는 물질들이 여러 기작을 통해 IL-8의 분비를 감소시킨 것으로 보인다.

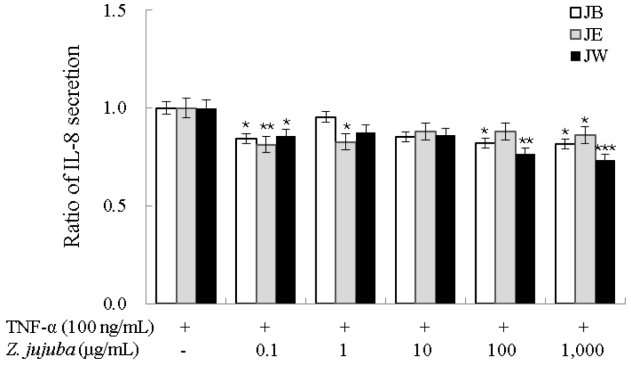

Fig. 3. Effect of *Z. jujuba* Miller var. *inermis* extracts on the secretion IL-8 in HaCaT cells. Cells were cultured in the presence or absence TNF-α for 8 h, followed by of *Z. jujuba* Miller var. *inermis* treatment. The secretion of IL-8 was measured by ELISA. JB: butylene glycol extract, JE: ethanol extract, JW: water extract. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ compared with control. Statistics by ANOVA and Dunnett's Multiple Comparison Test.

HAase 저해 활성 측정 – HAase는 보습의 주요 인자인 HA를 분해하는 효소이다. 또한 HAase는 항알레르기 약물인 disodium cromoglycate, tranilast, traxanox 등의 약물들에 의해 그 활성이 억제되고, 알레르기 반응 모델 중의 하나인 passive cutaneous anaphylaxis(PCA) 반응 시에는 그 활성이 증가된다고 보고되어,[57] HAase의 활성을 저해하는 물질은 피부보습과 항알레르기 작용을 할 수 있다고 생각된다. 대추의 용매 별 추출물을 농도 별로 처리하고 HA와 반응시켜 가수분해 되고 남은 HA를 측정하여 대추 추출물의 HAase 저해활성을 확인하였다. 그 결과, 추출물 50 mg/mL의 농도에서 JB는 65.7%로 활성을 저해하였고, JE는 49.3%로, 그리고 JW는 57.9%로 저해하였다. 즉, JB는 우수한 HAase 저해활성을 보인 반면, JE는 다른 추출물보다 저해활성이 다소 낮은 것으로 나타났다(Fig. 4). 이상의 결과는 대추 추출물이 HAase를 높게 저해함으로써 피부보습 및 항알레르기 기능을 갖는 기능성 화장품 원료로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

DPPH 자유 라디칼 소거 활성 – DPPH는 화합물 내 질

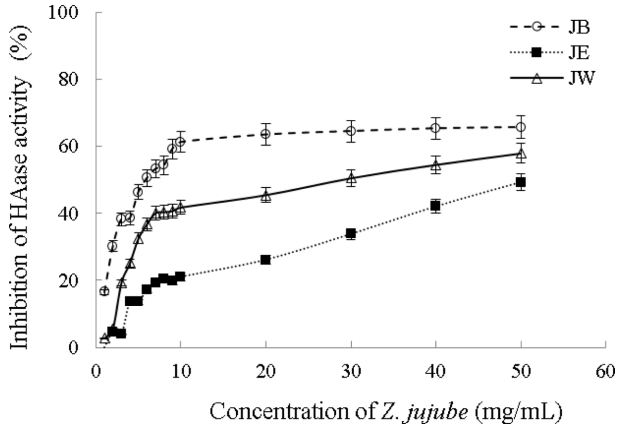

Fig. 4. Inhibition of hyaluronidase activity by *Z. jujuba* Miller var. *inermis* extracts. Hyaluronidase solution (5 unit/mL) was preincubated with extracts of *Z. jujuba* Miller var. *inermis* for 60 min at 37°C, and the mixture was added to hyaluronic acid (0.03%) for 45 min at 37°C. JB: butylene glycol extract, JE: ethanol extract, JW: water extract.

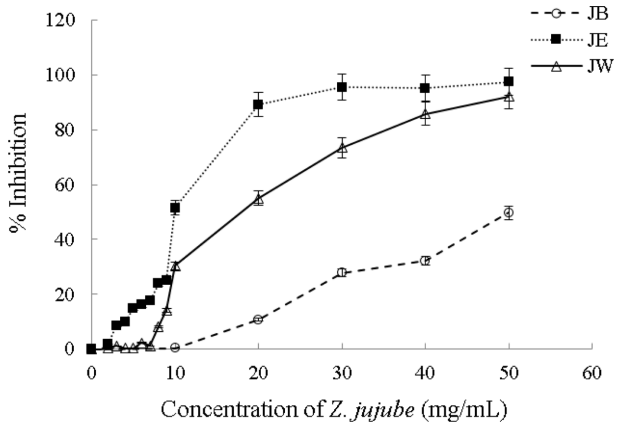

Fig. 5. Free radical scavenging activity of *Z. jujuba* Miller var. *inermis* extracts measured by DPPH assay. Extracts of *Z. jujuba* Miller var. *inermis* were incubated with DPPH at 25°C for 30 min and the absorbance at 519 nm was measured. JB: butylene glycol extract, JE: ethanol extract, JW: water extract.

소 중심의 라디칼로 라디칼 전자의 비편재화에 의해 안정한 구조의 라디칼로 존재하며, 항산화제와 반응시켜 항산화제의 자유 라디칼 소거활성능을 측정할 수 있다.[49] 자유 라디칼 소거능은 중요한 항산화 활성의 지표로 사용되고 있으며, DPPH assay는 polyhydroxy 방향족, 방향족아민류 등 시료에 의한 환원반응을 측정함으로써 자유 라디칼 소거능의 차이를 측정할 수 있다.[58] 본 실험에서는 대추 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위하여 DPPH 자유 라디칼 소거능를 측정하였다. 그 결과, 추출물 50 mg/mL의 농도에서 JB는 49.6%의 활성을, JE는 97.4%의 활성을, JW는 92.1%의 활성을 보였다. 즉, JE는 우수한 항산화활성을 보였으나, JB는 활성이 비교적 낮은 것으로 나타났다(Fig. 5). JE가 높은 활성을 보이는 것은 에탄올 추출물에서 항산화 능력이 있는 성분이 많이 용출된 것으로 생각된다. Yu 등의[59] 경우 대추의 메탄올 추출물에서 DPPH 소거 활성을 비교한 결과 상당한 활성을 보여주었고, Li 등의[60] 경우 대추에서 강한 환원제로 잘 알려진 ascorbic acid를 확인하였고, Kim 등의[61] 경우 대추의 메탄올 추출물에서 phenol류인 caffeic acid가 있음을 확인하였다. 또한 대추는 saponin, triterpenoid, polyphenol을 많이 함유하고 있어, 이러한 성분들이 항산화 활성에 영향을 준 것으로 생각된다.

UVA를 조사한 HDF-N 세포 내에서의 SOD 유사 활성에 미치는 영향 – SOD 유사활성을 알아보기 위하여 우선 사람 피부 아세포인 HDF-n에 UVA를 조사하여 산화적으로 손상시킨 후, 추출물에 대한 항산화효소의 활성에 미치는 영향을 확인하였다. 이를 위하여 먼저 HDF-n 세포의 생존에 대한 UVA의 영향을 MTT assay에 의하여 확인하였다. UVA 2 – 8 J/cm^{2}을 조사하고 48시간 배양하여 세포의 생존율을 확인하였으며, UVA를 조사하지 않은 세포를 대조군

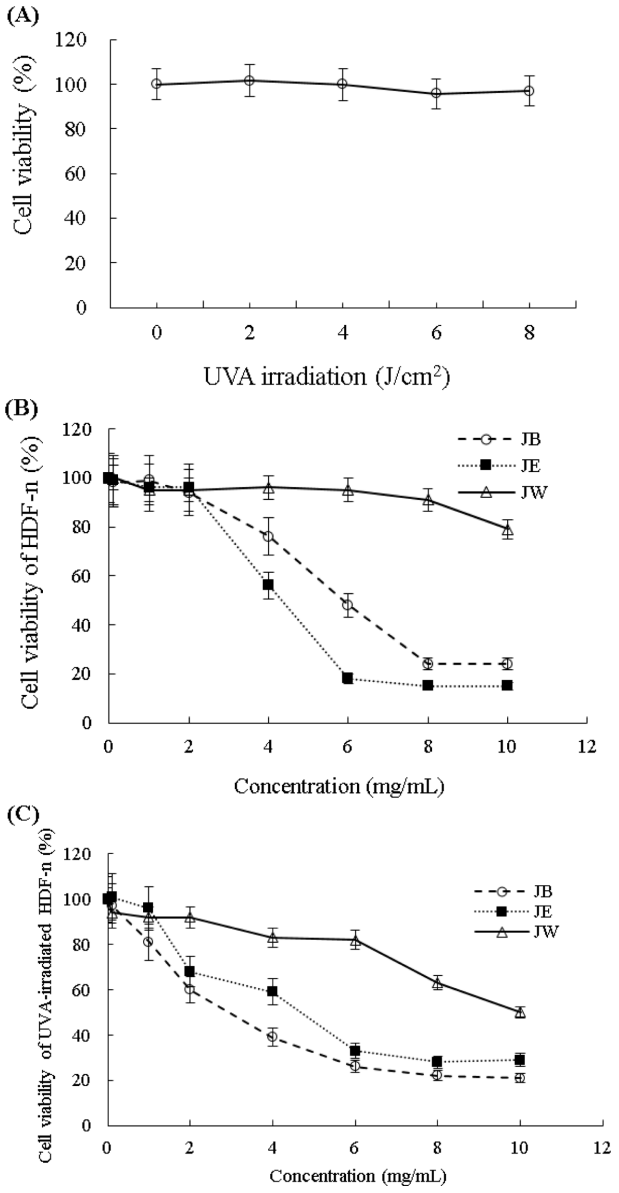

Fig. 6. (A) Viability of HDF-N cells irradiated by UVA (0 – 8 J/cm^2), and the viability of (B) HDF-n cells and (C) UV (8 J/cm^2)-irradiated HDF-n cells incubated with *Z. jujuba* Miller var. *inermis* extracts. HDF-n cells and UV (8 J/cm2)-irradiated HDF-n cells were treated with extracts of *Z. jujuba* Miller var. *inermis* for 48 h in the incubator at 37°C (5% CO_2, 95% air), and viability was measured by a MTT assay.

으로 하였다. 그 결과 조사된 UVA는 세포의 생존에 크게 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다(Fig. 6A). 본 실험에서는 이 결과를 바탕으로 HDF-n세포에 크게 영향을 미치지 않는 8 J/cm^{2}의 UVA 세기로 설정하여 실험하였다. 또한 HDF-n에 UVA를 조사한 후, 대추 추출물의 영향을 MTT assay에 의하여 확인하였다. HDF-n 세포 및 UVA가 조사된 HDF-n 세포에 추출물을 처리하고 48시간 배양하여 세포의

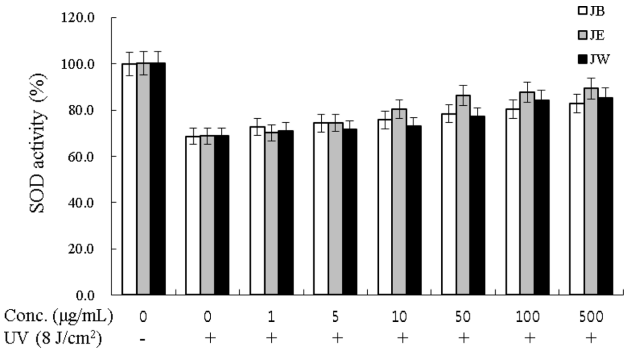

Fig. 7. Effect of *Z. jujuba* Miller var. *inermis* extracts on the SOD activity in UV-irradiated HDF-n cells. UV-irradiated HDF-n cells were treated with extracts of *Z. jujuba* Miller var. *inermis* for 48 h. The cells in lysis buffer were broken by sonication and centrifuged.

생존율을 확인한 결과, 1 mg/mL 이하의 농도에서는 두 가지 세포의 생존에 큰 영향을 끼치지 않는 것을 알 수 있었다(Fig. 6B and C).

산화적 대사과정 중에 생체 내에서는 항상 활성산소가 생성되고 있으며, 이들 대부분은 생체 내의 방어기작인 SOD, catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화효소나 생체 항산화물질 등에 의해 제거된다. Loesberg 등은[62] 아토피 피부염 환자의 경우 활성산소의 제거에 요구되는 SOD의 활성도가 떨어져서 체내 활성 산소를 제거하지 못하게 되고, 이로 인해 아토피 피부염이 발생된다고 하였다. 따라서 활성도가 저하된 SOD를 정상으로 돌려놓을 수 있는 물질을 활용하면 아토피 피부염의 증상이 완화 또는 치료 될 수 있다고 생각된다. 본 실험에서는 *Z. jujuba* Miller var. *inermis*의 용매 별 추출물이 세포 내의 예방적 항산화제인 SOD의 활성에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, UVA에 의하여 세포 내 SOD의 활성이 감소하였으며, *Z. jujuba* Miller var. *inermis* 추출물에 의하여 효소 활성이 농도의존적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 추출물 500 μg/mL의 농도에서 JB는 1.22배, JE는 1.31배, 그리고 JW는 1.29배 효소 활성이 증가하였다. 즉, JE는 JB와 JW의 경우보다 활성의 증가 정도가 높은 것을 알 수 있었던 반면, JW는 효소 활성이 다소 낮은 것으로 나타났다(Fig. 7). 특히 JE는 DPPH 소거활성뿐만 아니라 SOD의 효소활성도 높게 증가하여 에탄올 추출물에서 항산화 능력이 있는 성분들이 많이 용출된 것이라 생각된다. Na 등의[63] 경우 사염화탄소(CCl_4)에 의해 유발된 간 손상에 대추의 메탄올 추출물을 처리한 결과 간 조직의 항산화효과가 확인되었고, 이는 본 결과와 유사하다. 이상의 결과로부터 항산화활성의 차이는 추출물의 용매 차이인 것으로 보이며, 각 추출물에 용출된 항산화물질의 함량 차이인 것으로 추정되는 바 이에 대한 자세한 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

AD는 세계적으로 증가하는 염증성 피부질환으로 유전적, 면역학적, 환경적 요인 등이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다. AD를 치료하기 위해서는 항히스타민제와 국소 부신피질 호르몬제를 동시에 사용하는 것이 일반적이지만, 장기간 사용하면 내성이 생기고 저혈압, 소화기능 장애, 피부 위축, 혈관 확장과 같은 심각한 부작용을 초래하게 된다. 본 연구에서는 부작용이 없는 AD의 치료물질을 개발하기 위하여 천연물질인 대추의 용매 별 추출물 JB, JE, JW를 이용하여 AD 관련 cytokine의 분비, HAase 활성 및 항산화활성을 측정하였고, 그 결과는 다음과 같았다.

1. 대추 추출물의 사람 각질형성세포인 HaCaT 세포에 대한 세포독성을 확인한 결과, 각 추출물 1 mg/mL 이하의 농도에서 세포의 생존에 큰 영향이 없었다. 또한 HaCaT 세포에 집먼지 진드기를 처리한 결과 큰 영향은 없었다.

2. 추출물에 의한 HaCaT 세포의 AD 관련 cytokine인 TNF-α의 분비 영향을 확인한 결과, JB 및 JE의 경우, 농도가 낮을수록 분비를 억제하였고 JW의 경우 농도가 높을수록 TNF-α의 분비를 억제하였다. 또한 추출물에 의한 IL-8분비 영향을 확인한 결과 세 종류의 추출물 모두 분비를 감소시켰고 특히 JW는 1 mg/mL의 농도에서 가장 큰 영향을 보였다.

3. 추출물의 HAase저해활성에 대한 영향을 확인한 결과, 농도 의존적으로 HAase의 활성을 저해하였다. 50 mg/mL의 농도에서 JB와 JW는 각각 65.7%, 57.9%로 저해하였으며, JE는 HAase 저해활성이 비교적 낮았다.

4. 대추 추출물의 자유라디칼 소거활성능을 측정한 결과, 50 mg/mL의 농도에서 JE와 JW는 각각 97.4%, 92.1%로 우수한 항산화활성을 보인 반면, JB의 경우에는 자유 라디칼 소거 활성이 비교적 낮았다.

5. SOD의 활성을 확인하기 위하여 자외선 조사에 의하여 HDF-n 세포의 산화적 손상을 유발하였다. 그 결과, 2 – 8 J/cm^{2}의 자외선 및 추출물 1 mg/mL 이하의 농도에서는 세포의 생존에 크게 영향을 끼치지 않았다. 자외선 조사 후, 피부세포 내 SOD의 활성이 감소하였으며, 대추 추출물에 의하여 효소 활성이 농도 의존적으로 증가하였고, 특히 JE에 의하여 효소 활성이 높게 나타났다.

이상으로 대추 추출물이 AD 관련 cytokine의 분비를 억제하고 HAase 활성을 농도 의존적으로 저하시키는 것을 알 수 있었다. 또한 자유 라디칼에 대한 소거 활성 및 SOD의 효소 활성을 통해 항산화활성을 발휘함으로써 대추 추출물의 AD 치료물질로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

사 사

이 논문은 2016년 순천대학교 학술연구비로 연구되었음.

인용문헌

1. Douglas, M. and Considine, P. E. (1992) Foods and food production encyclopedia. Van Nostrand Reinhold company, New York.
2. Bown, D. (1995) Encyclopedia of Herbs and Their Uses. Dorling Kindersley, London.
3. Duke, J. A. and Ayensu, E. S. (1985) Medicinal plants of China. Reference Publications, Inc., Algonac.
4. Lee, S. M., Park, J. G., Lee, Y. H., Lee, C. G., Min, B. S., Kim, J. H. and Lee, H. K. (2004) Anti-complementary activity of triterpenoides from fruits of *Zizyphus jujuba*. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 1883-1886.
5. Lee, S. M., Min, B. S., Lee, C. G., Kim, K. S. and Kho, Y. H. (2003) Cytotoxic triterpenoids from the fruits of *Zizyphus jujuba*. *Planta Med.* **69**: 1051-1054.
6. Li, X. C., Cai, L. and Wu, C. D. (1997) Antimicrobial compounds from *Ceanothus americanus* against oral pathogens. *Phytochemistry* **46**: 97-102.
7. Suksamrarn, S., Panseeta, P., Kunchanawatta, S., Distaporn, T., Ruktasing, S. and Suksamrarn, A. (2006) Ceanothane- and lupane-type triterpenes with antiplasmodial and antimycobacterial activities from *Ziziphus cambodiana*. *Chem. Pharm. Bull.* **54**: 535-537.
8. Fujioka, T., Kashiwada, Y., Kilkuskie, R. E., Cosentino, L. M., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janzen, W. P., Chen, I.-S. and Lee, K.-H. (1994) Anti-AIDS Agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity ofstructurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod.* **57**: 243-247.
9. Manez, S., Recio, M. C., Giner, R. M. and Rios, J. L. (1997) Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* **334**: 103-105.
10. Su, B. N., Cuendet, M., Farnsworth, N. R., Fong, H. H., Pezzuto, J. M. and Kinghorn, A. D. (2002) Activity-guided fractionation of the seeds of *Ziziphus jujuba* using a cyclooxygenase-2 inhibitory assay. *Planta Med.* **68**: 1125-1128.
11. Holbrook, K. (1991) Structure and function of the developing human skin. *In* Goldsmith, L. (ed.), Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin, 63-110, Oxford University Press, Oxford.
12. Choi, Y. S., You, C. E., Park, M. Y., Son, S. J. and Whang, K. U. (2006) A study on clinical features and laboratory findings according to the severity of atopic dermatitis. **44**: 824-829.
13. Kim, H., Park, K. H., Yeo, J. H., Lee, K. G., Jeong, D. H., Kim, S. H. and Cho, Y. (2006) Dietary effect of silk protein sericin or fibroin on plasma and epidermal amino acid concentration of NC/Nga mice. *Kor. J. Nutr.* **39**: 520-528.
14. Avgerinou, G., Goules, A. V., Stavropoulos, P. G. and Katsambas, A. D. (2008) Atopic dermatitis: new immunologic aspects. *Int. J. Dermatol.* **47**: 219-224.
15. Asher, M. I., Montefort, S., Bjorksten, B., Lai, C. K., Strachan, D. P., Weiland, S. K. and Williams, H. (2006) Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* **368**: 733-743.
16. Hassan, A. S., Kaelin, U., Braathen, L. R. and Yawalkar, N. (2007) Clinical and immunopathologic findings during treatment of recalcitrant atopic eczema with efalizumab. *J. Am. Acad. Dermatol.* **56**: 217-221.
17. Buggiani, G., Ricceri, F. and Lotti, T. (2008) Atopic dermatitis. *Dermatol. Ther.* **21**: 96-100.
18. McGrath, J. A. (2008) Filaggrin and the great epidermal barrier grief. *Australas. J. Dermatol.* **49**: 67-73; quiz 73-64.
19. Matsuoka, H., Maki, N., Yoshida, S., Arai, M., Wang, J., Oikawa, Y., Ikeda, T., Hirota, N., Nakagawa, H. and Ishii, A. (2003) A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite Dermatophagoides farinae. *Allergy* **58**: 139-145.
20. Avgerinou, G., Goules, A. V., Stavropoulos, P. G. and Katsambas, A. D. (2008) Atopic dermatitis: new immunologic aspects. *Int. J. Dermatol.* **47**: 219-224.
21. Abramovits, W. (2005) Atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **53**: S86-93.
22. Leung, D. Y. (2013) New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol. Int.* **62**: 151-161.
23. Vercelli, D. (1995) Regulation of IgE synthesis in humans. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **9**: 1-6.
24. Murphy, K. M. and Reiner, S. L. (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 933-944.
25. Luger, T. A. and Schwarz, T. (1990) Evidence for an epidermal cytokine network. *J. Invest. Dermatol.* **95**: 100s-104s.
26. Roebuck, K. A. (1999) Regulation of interleukin-8 gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* **19**: 429-438.
27. Baugh, J. A. and Bucala, R. (2001) Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease. *Current opinion in drug discovery & development* **4**: 635-650.
28. Park, B. D. and Lee, S. H. (2000) Atopic dermatitis and ceramide. *Kor. Soc. Skin Barrier Res.* **2**: 27-35.
29. Leung, D. Y. (2000) Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**: 860-876.
30. Kim, S. H., Nam, G. W., Kang, B. Y., Lee, H. K., Moon, S. J. and CHang, I. S. (2005) The effect of kaempferol, quercetin on hyaluronan-synthesis stimulation in human keratinocytes (HaCaT). *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **31**: 97-102.
31. Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T. and Robbins, S. L. (1999) Robbins pathologic basis of disease. Saunders, Philadelphia.

32. Menzel, E. J. and Farr, C. (1998) Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett.* **131**: 3-11.
33. Kakegawa, H., Matsumoto, H. and Satoh, T. (1992) Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their antiallergic actions. *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 1439-1442.
34. Bu, H. J., Ham, Y. M., Kim, J. M., Lee, S. J., Hyun, J. W. and Lee, N. H. (2006) Elastase and hyaluronidase inhibition activities of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava*. *Kor. J. Pharmacogn.* **37**: 92-96.
35. Park, S. N. (2003) Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes. *Korean Journal of Food Science and Technology* **35**: 510-518.
36. Park, S. N. (2003) Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics. *Kor. Ind. Eng. Chem.* **14**: 657-665.
37. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. and Cross, C. E. (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **119**: 598-620.
38. Perisic, T., Sreckovic, M. and Matic, G. (2007) An imbalance in antioxidant enzymes and stress proteins in childhood asthma. *Clin. Biochem.* **40**: 1168-1171.
39. Omata, N., Tsukahara, H., Ito, S., Ohshima, Y., Yasutomi, M., Yamada, A., Jiang, M., Hiraoka, M., Nambu, M., Deguchi, Y. and Mayumi, M. (2001) Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci.* **69**: 223-228.
40. Tsukahara, H., Shibata, R., Ohshima, Y., Todoroki, Y., Sato, S., Ohta, N., Hiraoka, M., Yoshida, A., Nishima, S. and Mayumi, M. (2003) Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci.* **72**: 2509-2516.
41. Niwa, Y., Sumi, H., Kawahira, K., Terashima, T., Nakamura, T. and Akamatsu, H. (2003) Protein oxidative damage in the stratum corneum: Evidence for a link between environmental oxidants and the changing prevalence and nature of atopic dermatitis in Japan. *Br. J. Dermatol.* **149**: 248-254.
42. Smith, J. G., Jr., Davidson, E. A., Sams, W. M., Jr. and Clark, R. D. (1962) Alterations in human dermal connective tissue with age and chronic sun damage. *J. Invest. Dermatol.* **39**: 347-350.
43. Tolmasoff, J. M., Ono, T. and Cutler, R. G. (1980) Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**: 2777-2781.
44. Kiyohara, C., Tanaka, K. and Miyake, Y. (2008) Genetic susceptibility to atopic dermatitis. *Allergol. Int.* **57**: 39-56.
45. Lee, J. H., Kim, K. H., Kim, M. N., Kim, J. W., Ro, Y., Park, Y. L., Park, C. W., Lee, K. H., Lee, A. Y., Cho, S.-B. and Choi, J. H. (2006) Report from ADRG: The treatment guideline of Korean atopic dermatitis. *Kor. J. Dermatol.* **44**: 907-913.
46. Scadding, G. K. (1999) Clinical assessment of antihistamines in rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* **29 Suppl 3**: 77-81.
47. Kim, H. M. (2000) Development of allergic disease by oriental medicinal resource. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nut.* **5**: 10-13.
48. Czech, W., Schopf, E. and Kapp, A. (1996) Soluble E-selectin in sera of patients with atopic dermatitis and psoriasis--correlation with disease activity. *Br. J. Dermatol.* **134**: 17-21.
49. Ikeda, N. and Fukuzumi, K. (1977) Synergistic antioxidant effect of nucleic acids and tocopherols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **54**: 360-366.
50. Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**: 276-287.
51. Maeda, S., Maeda, S., Shibata, S., Chimura, N. and Fukata, T. (2009) House dust mite major allergen Der f 1 enhances proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in a cell line of canine epidermal keratinocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **131**: 298-302.
52. Clemons-Miller, A. R., Cox, G. W., Suttles, J. and Stout, R. D. (2000) LPS stimulation of TNF-receptor deficient macrophages: a differential role for TNF-alpha autocrine signaling in the induction of cytokine and nitric oxide production. *Immunobiology* **202**: 477-492.
53. Bordon, Y. (2010) Cytokines: Cytokines reach out. *Nat. Rev. Immunol.* **10**: 382.
54. Yagi, A., Koda, A., Inagaki, N., Haraguchi, Y., Noda, K., Okamura, N. and Nishioka, I. (1981) Studies on the constituents of Zizyphi Fructus. IV. Isolation of an anti-allergic component, ethyl alpha-D-fructofuranoside from EtOH extract of Zizyphi Fructus. *Yakugaku Zasshi* **101**: 700-707.
55. Cyong, J.-C. and Hanabusa, K. (1980) Cyclic adenosine monophosphate in fruits of *Zizyphus jujuba*. *Phytochemistry* **19**: 2747-2748.
56. Strieter, R. M., Remick, D. G., Ward, P. A., Spengler, R. N., Lynch, J. P., 3rd, Larrick, J. and Kunkel, S. L. (1988) Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**: 1230-1236.
57. Kim, Y., Noh, Y. K., Lee, G. I., Kim, Y. K., Lee, K. and Min, R. (1995) Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**: 265-272.
58. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **28**: 25-30.
59. Yu, M.-H., Im, H.-G., Lee, H.-J., Ji, J. and Lee, I.-S. (2006) Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *Korean Journal of Food Science and Technology* **38**: 128-134.
60. Li, J.-w., Ding, S.-d. and Ding, X.-l. (2005) Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. *Process Biochem.* **40**: 3607-3613.

61. Kim, H. K. and Joo, K. J. (2005) Antioxidative capacity and total phenolic compounds of methanol extract from *Zizyphus jujuba*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nut.* **34**: 750-754.
62. Loesberg, C., Henricks, P. A. and Nijkamp, F. P. (1988) Superoxide anion production by alveolar macrophages of guinea pigs fed different diets in a model of atopy. *Agents Actions* **23**: 99-100.
63. Na, H. S., Kim, K. S. and Lee, M. Y. (1996) Effect of jujube methanol extract on the hepatotoxicity in CCl4-treated rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nut.* **25**: 839-845.

(2019. 3. 26 접수; 2019. 4. 10 심사; 2019. 5. 9 게재확정)