

수용성 헤스페리딘(Hesperidin)에 의한 세포 손상회복, 항염증 및 melanin 생성억제 활성화

이경애[†]

안양대학교 식품영양학과, 교수
(2023년 12월 7일 접수: 2023년 12월 21일 수정: 2023년 12월 22일 채택)

Cell recovery, anti-inflammatory, and melanogenesis inhibitory activity of water soluble hesperidin *in vitro*

Kyung-Ae Lee[†]

Department of Food and Nutrition, Anyang University,
Anyang, Gyeonggi 14028, Republic of Korea

(Received December 7, 2023; Revised December 21, 2023; Accepted December 22, 2023)

요약 : 헤스페리딘(Hesperidin, HD)은 다양한 식물체에 존재하는, 강한 항산화 기능을 가진 대표적인 flavonoid의 일종이다. 본 연구에서는 수용성 HD인 Hesperidin glucoside(HDG)가 가지는 세포손상 회복, 항염증 인자억제 및 melanin 생성억제 활성을 세포수준에서 비교하였다. HDG는 HD에 당전이 효소반응으로 제조되었으며, HD에 비해 20,000배 이상 수용해도가 증가되었다. HaCaT 세포주에 대한 세포독성은 HDG가 HD에 비해 월등히 낮았다. HD와 HDG는 모두 자외선 조사된 HaCaT 세포에서 세포생존을 회복효과를 나타내었다. 또한 HD와 HDG는 세포내 산화질소(NO), 종양괴사인자- α (TNF- α) 및 인터루킨-6(IL-6)과 같은 염증 매개체 및 cytokine을 감소시켰으며, HD 보다는 HDG의 효과가 다소 우수하였다. Melanoma B16F10 세포주를 이용한 melanin 형성능과 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과, HD와 HDG 모두 효과를 나타내었으며 HDG가 약간 우수한 결과를 보였다. 결론적으로, HD의 당전이체인 HDG는 HD에 비해 동등이상의 세포손상 회복, 염증성 매개체 및 cytokine 억제능과 melanin 형성억제능을 나타내었으며, HDG의 높은 수용성과 낮은 세포독성 등의 특성은 다양한 분야에서의 용도를 확대시킬 수 있을 것으로 보인다.

주제어 : 헤스페리딘 글루코사이드, 수용성, 세포손상회복, 항염증, melanin생성억제

Abstract : Hesperidin(HD) is a potent antioxidant flavonoid found in various plants. In this study, the recovery of cell death, anti-inflammatory, and melanogenesis inhibitory activities of Hesperidin glucoside (HDG), a water-soluble HD, were compared with HD *in vitro*. HDG was prepared by an enzymatic glycosylation reaction from HD, and the water solubility of HDG was increased by more

[†]Corresponding author
(E-mail: drlka21@anyang.ac.kr)

than 20,000 times compared to HD. Cell toxicity was significantly lower for HDG than HD. Both HD and HDG increase cell viability in UV damaged HaCaT cells. HD and HDG also reduced an inflammatory mediator such as nitric oxide (NO), and pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in the cells irradiated with UV, and the reducing effect of HDG was slightly higher than that of HD. In the melanogenesis inhibition assay using the Melanoma B16F10 cells, HDG showed a superior inhibitory activity compared to HD. In conclusion, HDG, a glucosylated product of HD with high water solubility showed more than equal ability of cell recovery and anti-inflammatory potential, and higher melanogenesis inhibition activity compared to HD *in vitro*.

Keywords : Hesperidin glucoside, Water soluble, Cell viability, Ant-inflammatory, Melanogenesis inhibition

1. 서론

Flavonoid는 다양한 식물에 널리 분포된 폴리페놀류 2차 대사산물의 일종이다[1]. 헤스페리딘(Hesperidin, HD)은 비당체인 Hesperetin과 α -L-rhamnosyl-D-glucose (rutinoside)로 구성된 flavanone glycoside로서, 레몬, 라임, 오렌지와 같은 감귤류 과일에서 풍부하게 발견된다. HD와 그 대사산물인 Hesperetin의 흡수, 생체이용률 및 약동학적 특성에 대해서는 많은 연구가 수행되어 왔으며, 이러한 연구는 인체에서 경구 섭취된 HD가 장내 미생물 효소에 의해 rutinoside가 제거된 후 비당체 Hesperetin의 형태로 흡수되고, Hesperetin는 다시 glucuronidated 또는 sulfated metabolites로 전환된다는 것을 보여주었다[2,3]. HD와 그 대사체, 유도체들은 항염증, 항균, 항혈전 및 항암 활성을 포함한 광범위한 약리학적 특성을 갖는 것으로 보고되었으며, 최근에는 코로나 바이러스에 대한 억제활성도 연구되었다[4-10]. 그러나 HD는 낮은 용해도 때문에 제약, 식품 및 화장품 분야의 산업적 응용을 확장하는데 한계가 있으며, 이러한 낮은 용해도를 개선하고 생물학적 효과를 향상시키기 위해서 다양한 연구가 수행되어 왔다. 예로서, 올리고당류와 혼합된 HD에서 수용성 및 항산화 활성의 개선이 보고되었으며[11], HD를 함유한 다양한 나노 입자가 HD의 용해도 및 생체이용률을 향상시키기 위해 제조되었다[12]. 또 HD의 구조에서 구성당 부분의 변화에 따른 효과가 광범위하게 연구되었으며, 특히 당전이(glycosylation) 방법은 수용성 및 생체이용률을 증가시키는 효율적인 방법 중 하나로 연구

되었다[13,14].

피부는 인체 항상성에 필수적인 보호 외피를 제공하여 중요한 환경적 방어 역할을 하는 가장 큰 신체 기관이다. 따라서, 인간의 피부는 많은 산화 스트레스와 염증에 일상적이고 병리학적으로 노출될 수 있으며, 특히 자외선은 다양한 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 강력한 유발인자로서 피부에 손상을 입혀 일광화상, 피부 노화 및 암을 유발할 수 있다[15,16]. 이러한 자외선 손상의 예방, 치료를 위해 다양한 항산화 및 산화적 손상의 회복에 대한 연구가 진행되어 왔다. 대표적인 식물 flavonoid인 HD는 섭취에 의해 항산화, 항염증 기능 등을 나타낸다는 것이 연구되었으며, 피부세포에 의해서도 이러한 기능이 나타날 수 있는 것으로 연구되었다[17,18]. 본 연구에서는 난용성인 헤스페리딘을 대상으로 수용성이 증가된 당전이체인 HDG를 제조하고, HDG가 가지는 세포손상 회복능, 항염증 및 melanin 형성억제능 등을 HD와 비교하여 *in vitro*에서 조사하였다. 본 연구의 대상 시료인 HD와 HDG의 구조는 Fig. 1에 나타내었다.

2. 실험

2.1. 실험재료

HDG 제조를 위한 HD(>95%)는 주식회사 IBT(한국, 군포)에서 입수하였으며, 표준 HD는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HDG 제조를 위한 당전이효소인 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase, Toruzyme)

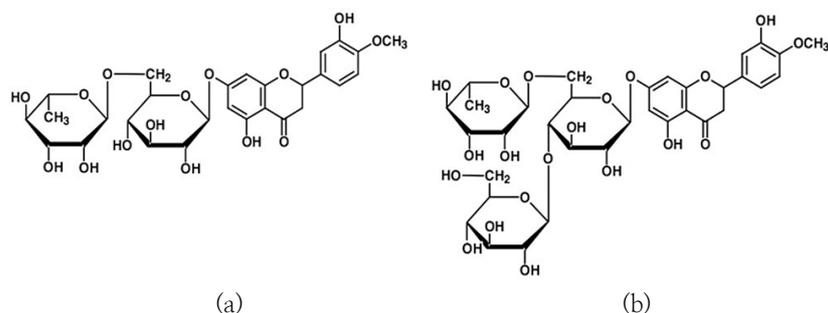


Fig. 1. Structure of hesperidin and hesperidin glucoside.
(a) Hesperidin (b) Hesperidin glucoside

과 가수분해효소인 glucoamylase(AMG)는 Novozymes사(Glaxo, Denmark)에서 구입하였다. Dextrin은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서, 다공성 resin(Amberlite XAD-7)은 Dow Chem.(Midland, MI, USA) 제품을 사용하였다. 세포시험용 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 및 fetal bovine serum(FBS)은 Cytiva사(Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltriazolium bromide(MTT), penicillin/streptomycin 용액, dimethyl sulfoxide(DMSO), melanocyte stimulating hormone(α -MSH), L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA) 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 산화질소(NO) 검출 키트는 iNtRON Biotechnology(한국, 성남)의 제품이었고 tumor necrosis factor alpha(TNF- α) and interleukin-6(IL-6)에 대한 ELISA 키트는 Thermo Fisher Scientific에서 구입하였다. 기타 모든 시약은 1등급 이상의 시약을 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. HDG의 제조

HD로부터 당전이된 HDG는 Choi 등[19]의 연구에 기술된 방법에 따라 제조되었다. 즉, HD 분말을 0.1 N NaOH 용액에 1%(w/v) 농도로 용해시킨 직후 pH를 7.0으로 맞춘 후 dextrin을 HD의 4배 비율로 첨가하고 CGTase 5%(w/v)와 glucoamylase 1%(w/v)를 단계별로 반응하여 HDG를 제조하였다. 반응물은 흡착수지로 채워진 컬럼에 로딩하고 60% 에탄올로 용리한 후 감압

농축시키고 냉각시켜 형성된 침전물을 수확하고 건조시켰다.

2.2.2. HPLC 분석

HD과 HDG 분석은 HPLC에 의해 분석하였다. 분석컬럼으로는 Amide 컬럼(TSKgel Amide-80, Tosoh Corp., Tokyo, Japan)을 사용하였으며, 이동상은 acetonitrile:water의 gradient로서, 0분(80%:20%), 15분(65%:35%), 30분(60%:40%), 37분(80%:20%), 50분(80%:20%)이었고, 유속은 0.8 mL/min, 컬럼 온도는 25°C로 유지되었고 검출 파장은 280 nm에서 분석하였다.

2.2.3. LC-MS에 의한 분석

효소 반응을 통해 얻은 HDG는 LC-MS spectra에서의 fragmentation을 분석하여 확인하였다. 기술된 HPLC 분석 방법에 기반하여 HPLC 시스템(LC-20AD, Shimadzu, Japan)에서 수행되었으며, LC/MS 검출은 positive mode에서 Q-TOF Premierometer(Waters, Milford, MA, USA) 시스템에서 수행되었다.

2.2.4. 용해도 측정

용해도 테스트는 25°C(298 K)에서 수행되었다 [20]. 과량의 HD 또는 HDG를 증류수 용해시킨 후 0.2 μ m 필터를 통해 여과하고 여액을 HPLC로 분석하였다. 가용화 계수(SCS)는 물에 첨가된 총 HD의 양에 대한 HDG의 양으로 계산하였다.

2.2.5. 세포 배양조건 및 세포 손상회복 측정

세포독성 및 염증성 cytokine에 대한 실험은 keratinocyte인 HaCaT 세포를 (췌마크로케어에서

분양받아 수행되었다. 세포는 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin 용액을 포함하는 DMEM에서 배양되었으며, 세포독성은 MTT assay[21]에 의해 측정되었다. HD 및 HDG에 의한 영향을 확인하기 위해, 세포는 96-well에서 약 4×10^4 cell/well의 농도로 분주한 다음 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 동안 배양한 후, 각기 다른 농도의 HD 및 HDG를 well에 첨가하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후, MTT 용액 100 μ L를 각 well에 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 유지하였다. 이어서 DMSO를 첨가하고 microplate reader(Epoch2, Bio Tek, Winousski, VT, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군과 샘플 그룹 간의 흡광도 차이를 백분율로 계산하였다. 별도로 자외선 손상에 대한 세포생존율 회복은 상기와 동일한 조건에서 HD 및 HDG를 첨가한 후, 자외선 조사기(UV Crosslinker CL-1000M, UVP, Upland, CA, USA)를 이용하여 302nm의 자외선을 70 mJ/cm² 세기로 조사하고 37°C에서 24시간 동안 배양하여 측정하였다.

2.2.6. NO에 대한 영향 측정

HD 및 HDG로 처리/처리되지 않은 세포에서 생성된 NO level을 측정하였다. 세포를 96-well에서 2×10^4 cell/well의 농도로 사전 배양하고 다양한 농도의 HD 및 HDG로 처리하였다. 자외선에 의한 영향은 자외선 조사기를 이용하여 자외선을 10 mJ/cm² 세기로 조사하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 생성된 NO level은 NO 검출 kit를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다. 흡광도는 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

2.2.7 TNF- α 및 IL-6에 대한 영향 측정

TNF- α 및 IL-6 분석에 대한 세포 배양 및 실험 조건은 NO 분석에 사용된 조건과 동일하였다. 즉 세포를 96-well에서 2×10^4 cell/well의 농도로 사전 배양하고 다양한 농도의 HD 및 HDG로 처리하였다. 자외선에 의한 영향은 자외선 조사기를 이용하여 302nm의 자외선을 10 mJ/cm² 세기로 조사하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 생성된 TNF- α 및 IL-6의 양은 TNF- α 및 IL-6 검출 ELISA kit를 사용하여 각

각의 프로토콜에 따라 측정하였다. 흡광도는 microplate reader를 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

2.2.8. Melanin 형성억제능 측정

Melanin 형성에 미치는 HD 및 HDG의 영향은 Melanoma B16F10세포주를 한국세포주은행(한국, 서울)에서 구입하여 측정하였다. 세포는 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 DMEM에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. Melanin 생성량 측정은 Hosoi 등[22]의 방법을 일부분 변경하여 사용하였다. B16F10 세포를 5×10^4 cell/well의 농도가 되도록 분주하고 24시간 동안 세포를 배양한 후에 10 μ M 농도의 α -MSH와 HD 또는 HDG를 농도 별로 처리하였다. 72 시간 동안 처리 후 배지를 제거하고 PBS로 수세한 후, 1 N 농도의 NaOH 용액 100 μ L를 처리하여 60°C, 2 시간 동안 melanin을 용해시키고 microplate reader를 사용하여 흡광도(405 nm)를 측정하였다. 양성대조군으로 100 μ g/mL의 arbutin을 사용하였다. Melanin 색소의 생성 억제는 α -MSH 처리조건에서 시료별 처리군의 melanin 생성량을 퍼센트로 표시하였다.

2.2.9. Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해 활성을 위한 세포배양은 상기 melanin 형성억제능과 유사한 조건으로 수행하였다. 즉, 세포를 배양한 후 PBS로 세척하고 1% Triton X-100이 함유된 PBS를 첨가하여 세포를 용해시켰다. 상등액을 회수하고 10 mM의 L-DOPA가 첨가된 PBS를 첨가하여 37°C에서 1 시간 동안 반응시킨 뒤 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해능은 시료용액의 첨가 구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.2.10. 통계분석

대부분의 실험 절차는 3반복으로 수행되었으며, 측정값은 평균 \pm 표준 편차로 표현되었다. 일원분산분석(ANOVA)은 SPSS 소프트웨어(version 22, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행되었다. 처리군 간의 유의한 차이는 Duncan's multiple range test를 사용하여 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$ 에서 검정되었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. HDG의 제조 및 분석

3.1.1. HDG의 효소 당전이 및 분석

HDG의 효소적 합성은 dextrin을 포도당 공여체로, 헤스페리딘을 수용체로 사용하여 수행하였다[19]. CGTase에 의한 글리코실화 반응 및 정제를 통해 얻어진 95% 이상의 고순도 HDG를 수득하여 사용하였다. 효소적 당전이에 의해 얻어진 HDG는 LC/MS 분석을 통해 확인하였다. 스펙트럼에서 m/z 773에서 HDG의 양성자화된 분자 이온은 glucose를 잃어 m/z 611에서 단편이온을 생성하였고 다시 m/z 303에서 단편 이온을 생성하였다(Fig. 2).

3.1.2. HDG의 용해도

많은 연구에서 flavonoid의 용해도를 증가시킬 경우 *in vitro* 및 *in vivo* 효능이 증가할 수 있음

이 보고되었다[23,24]. 본 실험에서 HD의 용해도는 약 14.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으나, 당전이체로서 glucose가 부착된 HDG의 용해도는 급격히 증가하여 300 mg/mL 이상으로 21,352배 이상의 용해도를 나타내었다. HDG의 상대적 가용화 계수(SC) 값은 Table 1에 표기하였다.

3.2. HD 및 HDG의 세포효능

3.2.1. HD 및 HDG의 세포독성

HaCaT 세포에 대한 HD 및 HDG의 세포독성을 평가한 결과, HDG는 HD에 비해 매우 적은 세포 독성을 나타내었다(Fig. 3). HDG는 500 μM 농도에서도 유의미한 세포 사멸을 유도하지 않은 반면, HD은 200 μM 농도에서 현저한 세포독성을 나타내었다. 따라서 이후의 항염증 인자 분석은 HD과 HDG 모두 100 μM 의 농도까지 수행하였다.

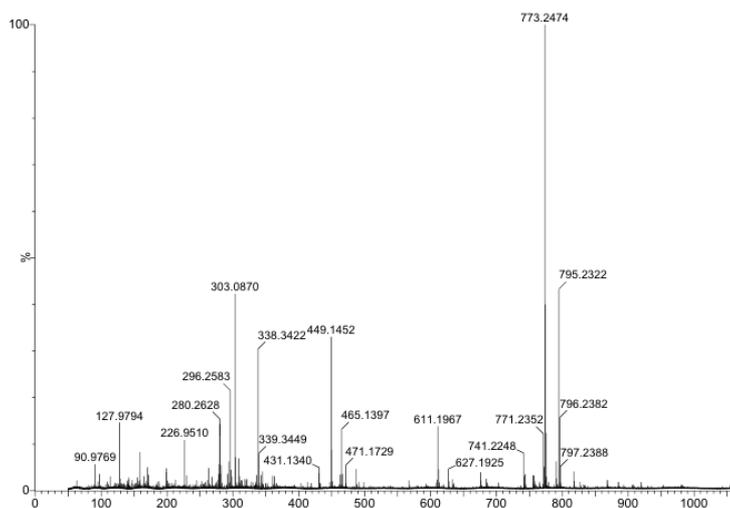


Fig. 2. Mass spectrum of prepared HDG by LC-MS analysis.

Table 1. Solubility of HD and HDG in water

Sample	Solubilization coefficient(SC)
Hesperidin	1.0 \pm 0.04
Hesperidin glucoside	21,352 \pm 0.35

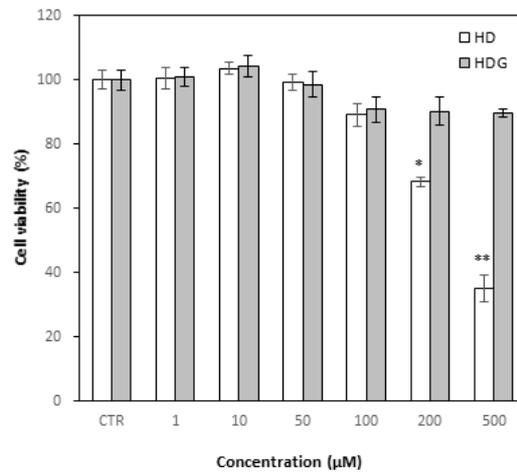


Fig. 3. Cytotoxicity of HD and HDG on HaCaT cells.

Cells were treated with or without HD and HDG, respectively. Results were represented as mean \pm SD (n=3). Significant differences from the control(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). CTR; Control.

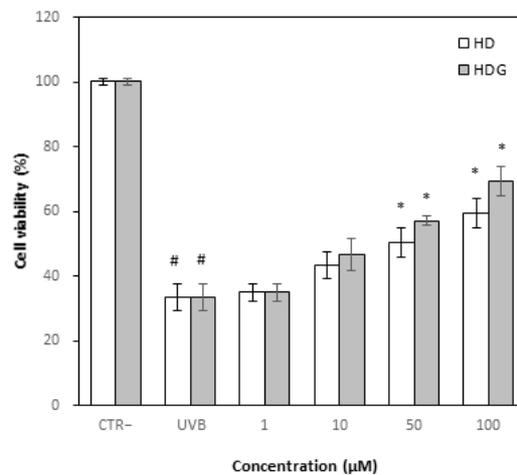


Fig. 4. Effect of HD and HDG on HaCaT cell viability damaged by UV irradiation.

Cells were treated with HD and HDG, respectively, and treated with UV(70 mJ/cm² UVB). Results were represented as mean \pm SD (n=3). Significant differences from the negative control (# $p < 0.01$), Significant differences from the UV irradiated control(* $p < 0.05$). CTR-; Negative control, UVB; UV irradiated control.

3.2.2. HD 및 HDG의 자외선 손상에 대한 회복
한편 자외선(UVB 302 nm)에 조사된 세포에 대한 HD 및 HDG의 회복 효과를 HaCaT 세포에서 평가하였다. 70 mJ/cm²의 세기로 자외선 조사된 세포의 경우 40% 이하의 생존율을 나타

내었으나 HD 및 HDG를 처리한 경우는 50 μ M 이상에서 유의미한 생존율 증가를 보였으며, 이때 HDG를 처리한 군이 HD를 처리한 군보다 약간 우수하였으나 차이가 크지는 않았다(Fig. 4).

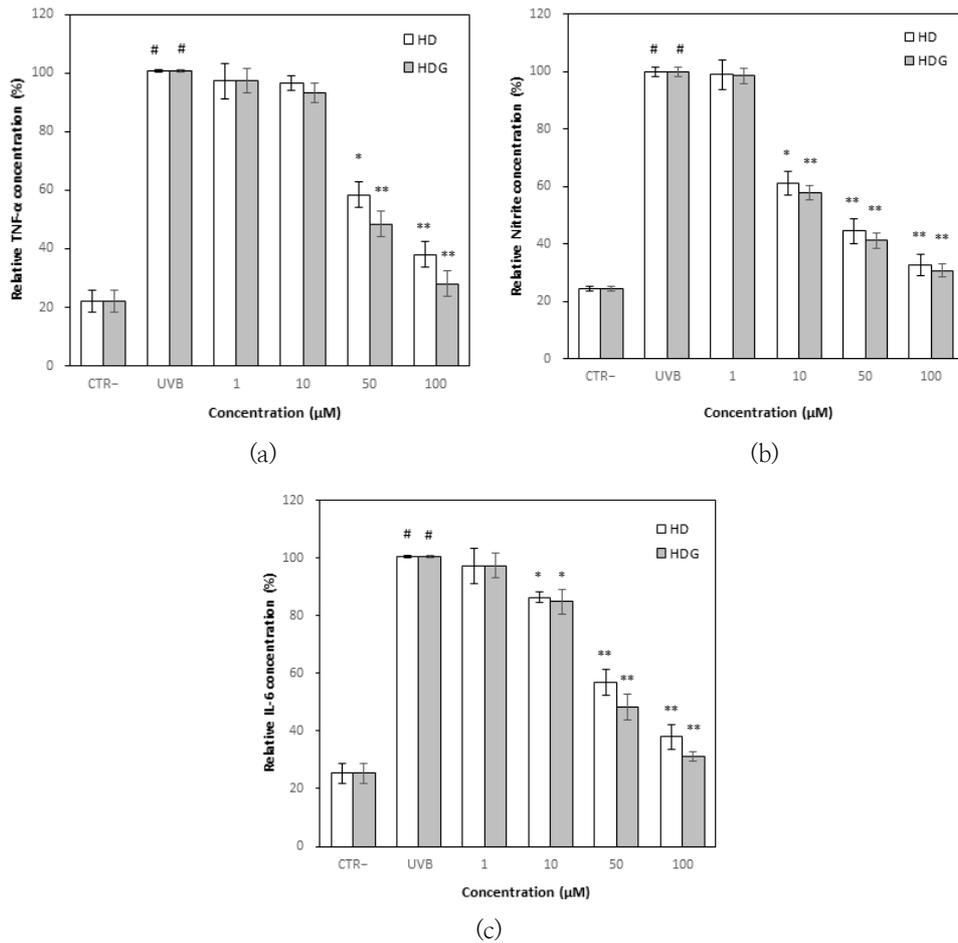


Fig. 5. Effect of HD and HDG on the production of nitric oxide(NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 6(IL-6) in HaCaT cells.

Cells were treated with HD and HDG, respectively, and treated with UV(10 mJ/cm² UVB). Results were represented as mean \pm SD (n=3). Significant differences from the negative control (# p < 0.01), Significant differences from the UV irradiated control(* p < 0.05; ** p < 0.01). CTR-: Negative control, UVB: UV irradiated control. (a) Effect on NO levels, (b) Effect on TNF- α levels, (c) Effect on IL-6 levels.

3.2.3. NO 생성량에 미치는 영향

NO는 잘 알려진 염증 매개체이며, 이의 과잉 생산은 염증 과정에서 중요한 역할을 할 수 있다 [25]. 본 실험에서는 자외선에 의한 손상회복 실험과는 달리 세포 사멸이 적고 NO 생성이 유도 되는 조건인 10 mJ/cm²의 세기로 자외선을 조사 하였다. 자외선을 조사한 세포는 처리되지 않은 대조군과 비교하여 상당한 양의 NO 생성을 유도

하였다. HD 및 HDG를 처리한 경우 다소 차이는 있으나 10 μ M부터 NO 생성을 억제하기 시작하여, 50 μ M 이상의 농도에서 NO 생성을 현저하게 감소시켰다(Fig 5. a).

3.2.4. TNF- α 및 IL-6 생성량에 미치는 영향

TNF- α 및 IL-6과 같은 염증성 cytokine을 세포에서 정량화하였다. 자외선을 조사한 세포는

처리되지 않은 대조군과 비교하여 상당한 양의 TNF- α 및 IL-6 생성을 유도하였다(Fig. 5. b, c). HD 및 HDG를 처리한 경우 50 μ M 이상의 농도에서 TNF- α 및 IL-6 생성을 각각 현저하게 감소시켰으며, 두 cytokine 모두에서 HDG의 감소효과가 HD에 비해 다소 큰 경향을 보였다.

염증 및 산화 스트레스는 암, 신경퇴행성 질환 및 심혈관 질환을 포함한 다양한 생명을 위협하는 질병과 밀접한 관련이 있으며[26,27], 산화 스트레스는 전염증성 cytokine[28]를 포함한 많은 유전자의 발현을 유도하는 특정 전사 인자를 활성화할 수 있다. Choi 등[19]의 연구에서 HD 및 HDG는 항산화 기능과 함께 RAW264.7 세포에서 염증성 cytokine을 농도 의존적 감소시키는 것으로 보고되었으며, keratinocyte를 이용한 본 연구에서도 HD와 HDG는 세포손상을 회복시키고 염증성 cytokine을 감소시키는 효과를 나타내었다. 또 HDG는 HD 보다 세포 독성이 훨씬 적었을 뿐 아니라, 염증성 cytokine 들에 대한 억제 효과도 HD에 비해 다소 높음을 확인하였다. Flavonoid와 같은 물질의 경우, 많은 연구에서 상대적으로 hydrophilic 특성을 갖는 glycoside 구조에 비해 hydrophobic 특성을 갖는 aglycone 구조가 세포막과의 상호작용이나 투과성 등에 의해 세포독성이 높고 기능성도 높을 수 있는 것으로 보고되었으며[29,30], 본 연구에서도 HD가

수용성이 높은 HDG에 비해 세포독성이 높은 것으로 나타났다. 반면 염증성 cytokine 들에 대한 억제 효과도 HDG는 HD에 비해 다소 높은 것으로 나타났으며, 이는 세포배양액에서 HDG의 극히 높은 수용성이 영향을 줄 수 있는 것으로 추정되나, hydrophobicity와 같은 구조적 요소 이외에도 용액내 안정성과 같은 여러 요소가 효능에 영향을 줄 수 있을 것으로 연구된 바[31,32], 보다 다양한 조건 및 *in vivo*에서의 효능 연구가 필요할 것으로 사료된다.

3.2.5. Melanin 생성억제능 및 Tyrosinase 저해 활성

B16F10 세포에서 HD 및 HDG에 의해 melanin 색소 생성이 감소되는지를 알아보기 위해 melanin 색소 생성률을 확인하였다. α -MSH가 처리된 세포에서 melanin색소 생성량을 정량화한 결과, HD 및 HDG를 처리할 때 melanin색소의 생성이 대조군에 비해 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6, a). HDG가 HD에 비해 다소 높은 melanin 저해능을 보였으며 10 μ M에서부터 억제 효과가 나타나 이후 급격히 억제효과가 증가하였다. 별도로 세포 추출액을 이용하여 melanin 생성의 주요 단계인 tyrosinase 활성이 저해되는지를 측정하였다(Fig. 6, b). melanin 생성억제와 유사하게 HDG가 다소 높은

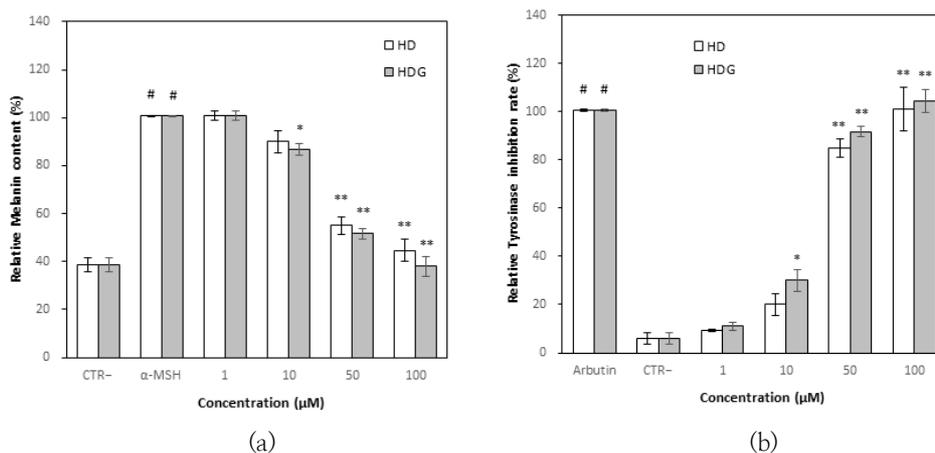


Fig. 6. Effect of HD and HDG on melanogenesis and tyrosinase inhibition.

B16F10 Cells were treated with α -MSH and HD or HDG. Results were represented as mean \pm SD (n=3). Significant differences from the negative control (# $p < 0.01$). Significant differences from the α -MSH(a) or Negative control(b) treated control(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). CTR-; Negative control. (a) Effect on melanogenesis (b) Effect on tyrosinase inhibition

저해활성을 보였으며 10 μ M에서부터 생성억제가 시작되어 50 μ M 이상의 농도에서 양성 대조군인 arbutin에 근접하는 우수한 저해효과를 나타내었다.

4. 결론

기능성을 가진 flavonoid이나 난용성인 HD의 적용성 확대를 위하여, 약 20,000배 이상의 수용성을 가지는 당전이체인 HDG를 제조하여 세포에서의 다양한 효능을 측정하였다. HD와 HDG는 모두 자외선 처리된 HaCaT 세포에서의 세포 생존율 회복 및 염증성 cytokine의 생성억제 효과를 나타내었으며, B16F10 세포에서 melanin 형성억제 및 tyrosinase 활성저해 효과를 나타내었다. 수용성이 높고 세포독성이 낮은 HDG의 활성이 HD에 비해 동등 이상으로 우수하여, HDG가 보다 다양하게 활용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 중소기업기술정보진흥원의 “지역특화산업육성+(R&D, S3370592)” 사업의 지원을 받아 수행된 연구결과임.

References

1. G. R. Beecher, “Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake”, *Journal of Nutrition*, Vol.133, No.10, pp. 3248S–3254S, (2003).
2. K. Németh, G. W. Plumb, J.-G. Berrin, N. Juge, R. Jacob, H. Y. Naim, G. Williamson, D. M. Swallow, P. A. Kroon, “Deglycosylation by Small Intestinal Epithelial Cell B-Glycosidases Is a Critical Step in the Absorption and Metabolism of Dietary Flavonoid Glycosides in Humans”, *European Journal of Nutrition*, Vol.42, No.1, pp. 29–42, (2003).
3. H. Matsumoto, Y. Ikoma, M. Sugiura, M. Yano, Y. Hasegawa, “Identification and Quantification of the Conjugated Metabolites Derived from Orally Administered Hesperidin in Rat Plasma”, *Journal Of Agriculture and Food Chemistry*, Vol.52, No.2, pp. 6653–6659, (2004).
4. F. Haidari, S. A. Keshavarz, M. R. Rashidi, M. M. Shahi, “Orange Juice and Hesperetin Supplementation to Hyperuricemic Rats Alter Oxidative Stress Markers and Xanthine Oxidoreductase Activity”, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, Vol.45, No.3, pp. 285–291, (2009).
5. A. Hirata, Y. Murakami, M. Shoji, Y. Kadoma, S. Fujisawa, “Kinetics of Radical-Scavenging Activity of Hesperetin and Hesperidin and their Inhibitory Activity on Cox-2 Expression”, *Anticancer Research*, Vol.25, No.5, pp. 3367–3374, (2005).
6. Y. Hao, Z. Wei, Z. Wang, G. Li, Y. Yao, B. Dun, “Biotransformation of Flavonoids Improves Antimicrobial and Anti-Breast Cancer Activities *In Vitro*”, *Foods*, Vol.10, No.10, 2367, (2021).
7. B. Olas, “A Review Of *In Vitro* Studies of the Anti-Platelet Potential of Citrus Fruit Flavonoids”, *Food Chemistry And Toxicology*, Vol.150, 112090, (2021).
8. A. Paredes, M. Aluzuru, J. Mendez, M. Rodriguez-Ortega, “Anti-Sindbis Activity of Flavanones Hesperetin and Naringenin”, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol.26, No.1, pp. 108–109, (2003).
9. K. Pyrzynska, “Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities”, *Nutrients*, Vol.14, No.12, 2387, (2022).
10. F. J. Cheng, T. K. Huynh, C. S. Yang, D. W. Hu, Y. C. Shen, C. Y. Tu, Y. C. Wu, C. H. Tang, W. C. Huang, Y. Chen, “Hesperidin Is a Potential Inhibitor Against Sars-Cov-2 Infection”, *Nutrients*, Vol.13, No.8, 2800, (2021).
11. R. Cao, Y. Zhao, Z. Zhou, X. Zhao,

- “Enhancement of the Water Solubility and Antioxidant Activity of Hesperidin by Chitoooligosaccharide”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol.98, No.6, pp. 2422–2427, (2018).
12. G. M. Sulaiman, H. M. Waheeb, M. S. Jabir, S. H. Khazaal, Y. H. Dewir, Y. Naidoo, “Hesperidin Loaded on Gold Nanoparticles as a Drug Delivery System for a Successful Biocompatible, Anti-Cancer, Anti-Inflammatory and Phagocytosis Inducer Model”, *Scientific Reports*, Vol.10, 9362, (2020).
 13. K. Slámová, J. Kapešová, K. Valentová, “Sweet flavonoids: Glycosidase-catalyzed Modifications”, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.19, No.7, 2126, (2018).
 14. M. Yamamoto, A. Suzuki, T. Hase, “Short-term Effects of Glucosyl Hesperidin and Hesperetin on Blood Pressure and Vascular Endothelial Function in Spontaneously Hypertensive Rats”, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, Vol.54, No.1, pp. 95–98, (2008).
 15. R. M. Martinez, F. A. Pinho-Ribeiro, V. S. Steffen, C. V. Caviglione, J. A. Vignoli, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, W. A. Jr. Verri, R. Casagrande, “Hesperidin methyl chalcone inhibits oxidative stress and inflammation in a mouse model of ultraviolet B irradiation-induced skin damage”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 148, pp. 145–153, (2015).
 16. G. Bens, “Sunscreens”, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 810, pp. 429–463, (2014).
 17. G. Man, T. M. Mauro, Y. Zhai, P. L. Kim, C. Cheung, M. Hupe, D. Crumrine, P. M. Elias, M. Q. Man, “Topical Hesperidin Enhances Epidermal Function in an Aged Murine Model”. *Journal of Investigative Dermatology*, Vo.135, No.4, pp. 1184–1187, (2015).
 18. M. Q. Man, B. Yang, P. M. Elias, “Benefits of Hesperidin for Cutaneous Functions”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 266307, (2019).
 19. S. S. Choi, S. H. Lee, K. A. Lee, “A Comparative Study of Hesperetin, Hesperidin and Hesperidin Glucoside: Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antibacterial Activities In Vitro”. *Antioxidants*, Vol11, 1618, (2022).
 20. S. S. Choi, K. A. Lee, “Antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activity of hesperetin and its cyclodextrin inclusion complexes”, *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.40, No.5. 988 ~1000, (2023).
 21. T. Mosmann, “Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays”, *Journal of Immunological Methods*, Vol.65, No.1–2, pp. 55–63, (1983).
 22. J. Hosoi, E. Abe, T. Suda, T. Kuroki, “Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid”, *Cancer Research*, Vol.45, pp. 1474–1478, (1985).
 23. P. K. Sudheeran, R. Ovadia, O. Galsarker, I. Maoz, N. Sela, D. Maurer, O. Feygenberg, M. Oren Shamir, N. Alkan. “Glycosylated Flavonoids: Fruit’s Concealed Antifungal Arsenal”, *New Phytologist*, Vol.225, No.4, pp. 1788–1798, (2020).
 24. S. Kobayashi, S. Tanabe, M. Sugiyama, Y. Konishi, “Transepithelial Transport of Hesperetin and Hesperidin in Intestinal Caco-2 cell Monolayers”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, Vol.1778, No.1, pp. 33–41, (2008).
 25. T. J. Guzik, R. Korbut, T. Adamek-Guzik, “Nitric Oxide and Superoxide in Inflammation and Immune Regulation”, *Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol.54, No.4, pp. 469–487, (2003).
 26. M. Matsumoto, N. Matsukawa, H. Mineo, H. Chiji, H. Hara, “A Soluble Flavonoid-glycoside, AlphaG-rutin, Is Absorbed as Glycosides in the Isolated

- Gastric and Intestinal Mucosa”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol.68, No.9, pp. 1929–1934, (2004)
27. D. Procházková, I. Boušová, N. Wilhelmová, “Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids”, *Fitoterapia*, Vol.82, No.4, pp. 513–523, (2011).
28. J. H. Kim, S. H. Park, E. J. Baek, C. H. Han, N. J. Kang, “Anti-oxidant and Anti-inflammatory Effects of Rutin and its Metabolites”, *Current Research in Agriculture and Life Sciences*, Vol.31, No.3, pp. 165–169, (2013).
29. K. Sak, “Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types”, *Pharmacognosy Reviews*, Vol.8, Issue 16, pp. 122–146, (2014).
30. J. Londoño-Londoño, V. R. Lima, C. Jaramillo, T. Creczynski-Pasa, “Hesperidin and hesperetin membrane interaction: understanding the role of 7-O-glycoside moiety in flavonoids”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol.499, No.1–2, pp. 6–16, (2010).
31. J. Xiao, “Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance?” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol.57, No.9, pp. 1874–1905, (2017).
32. V. Habauzit, I. Nielsen, A. Gil-Izquierdo, A. Trzeciakiewicz, C. Morand, W. Chee, D. Barron, P. Lebecque, M. J. Davicco, G. Williamson, E. Offord, V. Coxam, M. N. Horcajada, “Increased bioavailability of hesperetin-7-glucoside compared with hesperidin results in more efficient prevention of bone loss in adult ovariectomised rats”, *British Journal of Nutrition*, Vol.102, No.7, pp. 976–984, (2009).