

혈관내피세포에서 산화 스트레스에 대한 시체(柿蒂)의 보호효과

임진영 대학원생¹, 이민아 대학원생¹, 성은정 대학원생¹, 이준수 교수¹, 박정환 선임연구원^{1,2*}

1. 충북대학교 식품생명공학과
2. 한국한의학연구원 한의약데이터부

Protective Effects of the Calyx of *Diospyros kaki* on Oxidative Stress in Vascular Endothelial Cell

Jinyeong Lim¹, Mina Lee¹, Eunjeong Seong¹, Junsoo Lee¹, Jeong Hwan Park^{1,2*}

1. Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University
2. KM Data Division, Korea Institute of Oriental Medicine

Abstract

The oxidative stress causes damage to vascular endothelial cells, which is an important mediator in the pathogenesis of hypertension. The antioxidant and antihypertensive activity of the methanol extracts of *Diospyros kaki* calyx was measured in this study. At concentrations of 2.5, 5, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the calyx of *Diospyros kaki* methanol extract, cytotoxicity was not observed, and cell viability was increased compared to EA.hy926 cells treated with H_2O_2 . The methanol extracts of *Diospyros kaki* calyx significantly inhibit the production of reactive oxygen species. In addition, the extract increased nitric oxide production and showed angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. Our results provided experimental evidence that the methanol extracts of *Diospyros kaki* calyx exhibit antioxidant activity and antihypertensive activity in vascular endothelial cells.

Keywords: calyx of *Diospyros kaki*, antioxidant activity, oxidative stress, nitric oxide, ACE inhibitory activity

Correspondence: 박정환(Jeong Hwan Park)

1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon, 34054, Republic of Korea
Tel: +82-42-868-9358, E-mail: siegfried@kiom.re.kr
Received 2021-11-05, revised 2021-12-03, accepted 2021-12-04, available online 2021-12-07
doi:10.22674/KHMI-9-2-11



서론

고혈압은 세계 질병 발생의 가장 큰 원인이 되는 위험인자이다¹⁾. 국내에서는 고혈압 진단을 받은 인구가 2002년 300만 명에서 2020년에는 1,200만 명으로 급속히 증가하면서 고혈압은 성인 인구 3명 중 1명이 보유한 국민적인 만성질환이 되었다²⁾. 고혈압의 병인으로 유전적 요인과 연령, 비만, 음주, 흡연, 스트레스 등의 환경적 요인이 복합적으로 관련되어 있으며, 혈관의 산화 스트레스로 인한 reactive oxygen species (ROS)의 과도한 증가와 연관되어 있다고 보고되고 있다^{3,4)}. 고혈압의 병리적 측면에서 산화 스트레스의 증가는 혈관 내피세포의 손상에 중요한 매개체로 작용한다. 즉, 과산화수소(H_2O_2) 생성을 증가시키고 항산화제의 생체 유용도를 감소시키며 아울러 혈관 확장 작용을 하는 산화질소(NO)의 합성도 감소시킨다. 나아가 산화 스트레스는 혈관 내피세포의 기능 장애, 비대, 세포자멸사 등과도 관련성이 있음이 밝혀지고 있다⁵⁻⁸⁾. 이에 최근에는 산화 스트레스로부터 혈관 내피세포를 보호할 수 있는 식물성 항산화제를 찾는 연구가 진행되고 있다⁹⁻¹¹⁾.

Renin angiotensin system (RAS)은 혈압, 체액 및 전해질 균형과 같은 정상적인 심혈관계 기능 유지를 하며 고혈압 발생에 밀접한 역할을 하고 있다. Angiotensin converting enzyme (ACE)은 간에서 분비된 angiotensin I을 강력한 혈관 수축 작용이 있는 angiotensin II로 전환시키고 혈관 확장 작용을 하는 bradykinin을 불활성화시켜 혈압을 상승을 유도한다. ACE 억제제는 심박수를 증가시키지 않으면서 혈관을 이완시키고 나트륨 배설을 촉진시켜 결국 혈압을 낮추게 한다¹²⁾. 고혈압 치료제로 1970년대 말에 처음 개발된 것은 ACE 억제제인 captopril이다. 이후 ACE 억제제는 고혈압의 일차 치료제로 항고혈압약의 주축이 되었으나 혈관 부종, 마른 기침 등의 부작용이 나타났¹³⁾. 이에 안전성이 높으면서 강력한 ACE 억제능을 갖는 천연 물질의 탐색이 지속적으로 이루어지고 있다.

시체(柿蒂, Kaki Calyx)는 감나무 *Diospyros kaki* Thunberg의 열매에 붙어있는 묵은꽃받침(숙약(宿萼))이다. 가을에 열매가 성숙했을 때 혹은 식용 시, 감의 꼭지를 채취하여 햇볕에 말린다. 회갈색 또는 적갈색을 띠며 지름은 1.5~3cm, 두께는 0.1~0.4cm이다. 보통 냄새가 없고 맛은 좀 떫다. 시체(柿蒂)의 성은 평(平)하고 미는 고삼(苦澁)하다. 귀경은 폐(肺)-위(胃)이며 강역하기(降逆下氣)의 효능으로 주로 애역(呃逆)을 다스리는 데 사용된다¹⁴⁾. 시체(柿蒂)의 약리학적 활성으로는 항산화 활성, 항염증 활성, 항혈액응고 활성, 피부 미백 활성 등이 연구되었지만 더 많은 연구가 필요하다¹⁵⁾. 본 연구에서는 시체(柿蒂)의 혈관내피세포에 대한 보호 효과를 조사하고자 했다. 즉, 시체(柿蒂)를 대상으로 혈관 내피세포에 과산화수소로 산화 스트레스를 가했을 때 세포 생존율, 세포독성, ROS 생성량, NO 생성량 및 ACE 억제 활성에 미치는 영향을 보고자 하였다.

본론

1. 재료 및 방법

1) 시체(柿蒂) 메탄올 추출물 제조

본 실험에 사용된 시체(柿蒂)는 옴니허브(Daegu, Korea)에서 구입한 것을 「대한민국약전외한약(생약)규격집」에 맞추어 관능검사 후, 공정서 규격에 적합한 것만을 정선하여 사용하였다. 시체(柿



蒂) 메탄올 추출물 제조를 위해 500 mL 플라스크에 분쇄된 시체 5 g과 메탄올 150 mL을 넣고 실온에서 24시간 교반 추출기(VS-8480, Vision Scientific, Daejeon, Korea)를 이용하여 추출하였다. 추출물은 Whatman No. 5 (Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과한 후 37°C에서 감압농축 하였다. 최종 추출 수율은 9.5%로 나타났고 농축잔사를 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하여 100 mg/mL로 재용해한 뒤 0.22 μm 멸균 필터로 여과하고 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

2) 세포 배양 및 독성 측정

EA.hy926 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 10% heat-inactivated fetal bovin serum (FBS), 100 unit/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여, 배양기(Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan)에서 37°C, 5% CO₂ humid air로 배양하였다. EA.hy926 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well 농도로 분주하였다. 24시간 배양 후 시체(柿蒂) 메탄올 추출물을 FBS가 없는 배지에 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 희석하여 24시간 배양하였다. 이후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL) 용액 20 μL 를 각 well에 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 생존 세포에서 생성된 청색 결정을 DMSO로 모두 녹인 후 microplate reader (BioTek Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료처리 시에는 DMSO의 최종 농도가 0.1%(v/v) 미만이 되도록 시료를 배지로 희석하여 사용하였다.

3) 세포 보호 효과 측정

EA.hy926 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양 후 시체(柿蒂) 메탄올 추출물(2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 양성 대조군인 quercetin (25 μM)을 FBS가 없는 배지에 희석하여 2시간 동안 전처리하였다. 이후 시체(柿蒂) 메탄올 추출물, quercetin을 600 μM H₂O₂와 함께 FBS가 없는 배지에 희석하여 24시간 배양하였다. 세포 생존율은 MTT assay를 이용한 세포 독성 실험과 동일하게 진행하였다.

4) ROS 생성량 측정

EA.hy926 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양 후 일정 농도의 시체(柿蒂) 메탄올 추출물을 24시간 동안 전처리하였다. 이후 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 25 μM 의 dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA)를 2시간 동안 처리하였다. 이후 DCFH-DA를 PBS로 세척한 후 산화 스트레스 자극처리군에는 600 μM 의 H₂O₂가 함유된 FBS가 없는 배지를, 대조군에는 FBS가 없는 배지를 넣어 세포 내 ROS 생성에 해당하는 형광 강도를 485 nm의 여기 파장 및 530 nm의 방출 파장에서 fluorescent spectrophotometer (LS-55, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)로 측정하였다.

5) NO 생성량 측정

EA.hy926 세포에서 생성된 NO의 양을 측정하기 위해 nitrite 농도를 Griess reagent를 이용한 방법을 응용하여 실시하였다¹⁶⁾. 96-well plate에 1×10^4 cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양 후 시체(柿蒂) 메탄올 추출물(2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포 배양액

170 μL 에 Griess reagent 30 μL 를 가하여 10분간 상온에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite (NaNO_2)를 이용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

6) ACE 억제 활성 측정

Angiotensin converting enzyme (ACE) 억제 활성은 Cushman과 Cheung (1971)의 방법을 변형하여 실시하였다¹⁷⁾. 100 mM sodium borate buffer (pH 8.3)에 녹인 Hippuryl-His-Leu acetate salt (HHL) 5 mM와 ACE (0.1 U/mL)을 사용하여 측정하였다. 먼저 반응 혼합물에는 각 희석된 시료 용액 80 μL 와 HHL 용액 200 μL 를 넣은 후 37°C에서 10분 동안 반응하였다. 그 후 ACE 40 μL 를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응한 다음 1N HCl 250 μL 를 첨가하여 반응을 종료하였다. 모든 처리군에 ethyl acetate 1.5 mL를 첨가한 후 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm, 10분 동안 원심분리하였다. 상층액 1 mL를 취해 90°C에서 30분 동안 방치한 후 증류수 1 mL를 첨가하여 재용해하여 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 추출물 대신 buffer를 첨가하여 억제율을 계산하였으며 ACE 활성의 억제 작용이 있는 대표적 약물인 captopril을 양성 대조군으로 사용하였다.

7) 통계처리

시료로부터 얻어진 실험 결과들의 통계분석은 GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 소프트웨어를 이용하여 실시하였다. 데이터 간의 유의차는 one-way ANOVA의 Tukey-Kramer method 분석과 Duncan's multiple range test를 통해 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

2. 결과 및 고찰

1) 시체(柿蒂) 메탄올 추출물의 세포 독성 및 보호효과

세포의 미토콘드리아는 MTT를 절단하여 formazan을 생성할 수 있으며, 그 양은 생존 세포 수와 직접적인 관련이 있다. 시체(柿蒂) 메탄올 추출물의 EA.hy926 세포의 증식에 미치는 독성을 확인하고자 MTT assay를 이용한 세포 생존율을 측정하였다. EA.hy926 세포에 시체(柿蒂) 메탄올 추출물의 농도를 각각 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 후 세포 생존율을 측정한 결과 모든 농도에서 세포독성은 보이지 않았다(Fig. 1A). 또한, EA.hy926 세포에 H_2O_2 로 산화 스트레스를 유도하여 시체(柿蒂) 메탄올 추출물의 보호효과를 확인하였다. EA.hy926 세포에 600 μM 의 H_2O_2 를 처리한 경우 정상 세포에 비해 세포 생존율이 68.14% 수준까지 감소하였으나, 시체(柿蒂) 메탄올 추출물이 처리된 세포에서는 세포 생존율이 모든 농도에서 증가하는 결과를 나타내었다(Fig. 1B). H_2O_2 를 처리하여 산화 스트레스를 유발한 PC12 신경세포에서 생감의 껍질과 껍질 벗긴 과육의 메탄올 추출물은 세포 생존율에 영향을 미치지 못한 반면 감의 꼭지인 시체(柿蒂) 메탄올 추출물은 세포 생존율을 크게 증가시켰는데, 이는 시체(柿蒂) 메탄올 추출물이 H_2O_2 로 유도된 세포자멸사에 대한 보호효과에 기인한다고 하였다¹⁸⁾. 이것으로 볼 때 시체(柿蒂) 메탄올 추출물은 H_2O_2 로 유도된 산화 스트레스에 대해 세포 보호효과가 있는 것으로 판단된다.



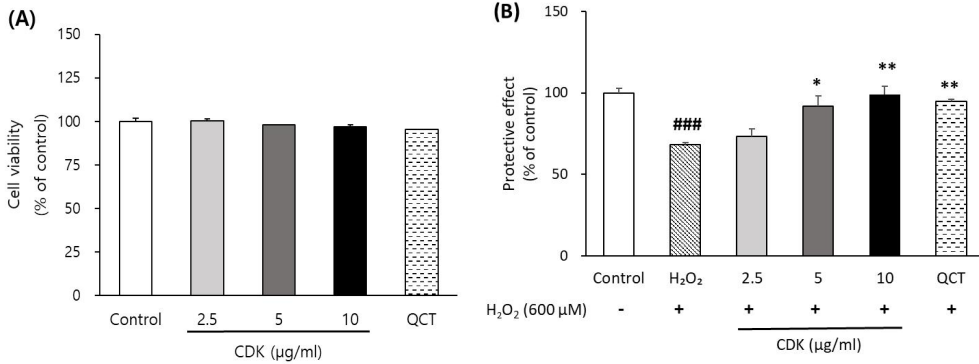


Fig. 1. Effect of the methanol extract from the calyx of *Diospyros kaki* (CDK) on cell viability (A) and protective effect (B) on H₂O₂ (600 μM) treated EA.hy926 cells. Quercetin (QCT, 25 μM) was used as a positive control. Data were presented as the mean ± standard error (n=3). ###P < 0.001 versus control, *P < 0.05 and **P < 0.01 versus H₂O₂ (600 μM) treated control by ANOVA and the Tukey-Kramer method.

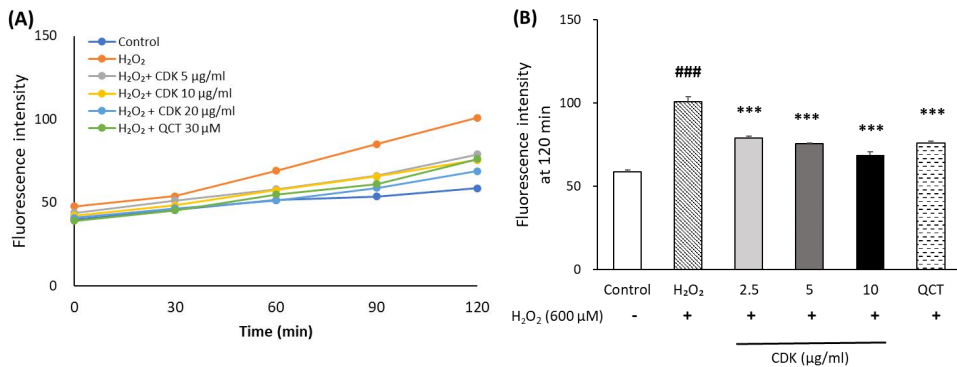


Fig. 2. Effects of the methanol extract from the calyx of *Diospyros kaki* (CDK) on time course of ROS generation (A) and ROS production at 120 min (B) in H₂O₂ (600 μM) treated EA.hy926 cells. Quercetin (QCT, 25 μM) was used as a positive control. Data were presented as the mean ± standard error (n=3). ###P < 0.001 versus control and **P < 0.001 versus H₂O₂ (600 μM) treated control by ANOVA and the Tukey-Kramer method.

2) ROS 생성량 측정

산소를 이용하는 대사 과정 중에 생성되는 부산물인 ROS는 산화 스트레스에 의한 세포 손상을 유발한다. 과도하게 생성된 ROS는 세포막 지질, 단백질 및 다른 생체 분자에 대한 광범위한 손상의 원인이 되므로 ROS를 제거하거나 항산화제에 의한 ROS 생성을 억제하는 것이 산화적 세포 사멸을 예방하는 데 효과적이다¹⁹⁾. 본 실험에서 H₂O₂로 산화 스트레스를 유발한 EA.hy926 세포는 ROS 생성이 급격하게 증가되었으나 시체(柿蒂) 메탄올 추출물을 전처리한 세포에서는 모든 농도에서 ROS 생성을 유의적으로 저해시켰다(Fig. 2A). 120분이 경과한 시점의 ROS 생성량을 비교한 결과,

시체(柿蒂) 메탄을 추출물은 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 양성 대조군인 25 μM 농도의 quercetin과 유사하게 ROS 생성을 저해하는 활성을 나타냈다(Fig. 2B). ROS의 과도한 생성은 생체내 항산화 방어계의 자정작용을 초과하거나 여러 생체 분자 구조에 산화적 손상을 일으키게 되어 산화 스트레스에 대한 방어 능력이 떨어지게 된다. 항산화제는 혈관내피세포의 기능을 개선시키고 혈압을 낮추는 작용을 한다²⁰⁻²¹). 따라서 시체(柿蒂) 메탄을 추출물은 항산화 활성으로 혈압을 낮추는데 도움을 줄 수 있을 것으로 보인다.

3) NO 생성량 및 ACE 억제 활성 측정

혈관 내피세포에서 endothelial NO synthetase(eNOS)를 통해 생성되는 NO는 혈관의 항상성을 유지하는 데 중요한 물질이다. NO는 혈관을 확장하는 기능이 있을뿐만 아니라 혈소판 응집 억제, 평활근 세포 증식 및 동맥 경화에 관여하는 유전자 발현 억제와 같은 특성이 있다²²). 산화 스트레스로 인해 과도하게 생성된 ROS는 NO와 결합하여 peroxynitrite(ONOO⁻)와 같은 강력한 산화촉진제를 유발시켜 세포 내 거대분자를 손상시키는 매개체가 되며 결국 NO의 감소로 혈관 확장 기능을 억제하게 한다²³). 따라서 과도한 ROS의 생성을 억제하거나 NO 생성을 촉진하는 것은 혈관 내피세포의 기능 유지에 도움을 줄 수 있다. 본 실험에서 NO 생성량을 측정한 결과 시체(柿蒂) 메탄을 추출물 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 대조군 대비 각각 103.4%, 116.9%, 147.3%로 NO 생성이 증가하였다(Fig. 3A). 이로 볼 때 시체(柿蒂) 메탄을 추출물이 NO 생성을 촉진하는 역할을 하는 것으로 보인다.

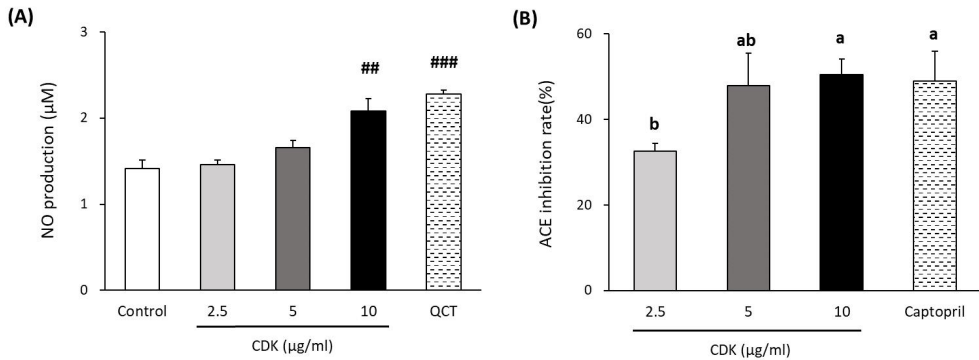


Fig. 3. Effects of the methanol extract from the calyx of *Diospyros kaki* (CDK) on NO production (A) in EA.hy926 cells and ACE inhibitory activity (B). Quercetin (QCT, 25 μM) and captopril (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used as a positive control. Data were presented as the mean \pm standard error ($n=3$). ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ versus control by ANOVA and the Tukey-Kramer method. Different letters (a-b) above the bars indicate significant differences based on the Duncan's test ($P < 0.05$).

RAS는 심장, 신장, 뇌 및 혈관 등에 분포하고 전신에 작용하여 전해질 및 체액량을 조절하여 항상성을 유지하고 혈압을 조절한다. ACE는 비활성 형태의 angiotensin I을 강력한 혈관 수축제인 angiotensin II로 전환시켜 혈압을 조절하는 주요 역할을 한다¹³). 본 실험에서 시체(柿蒂) 메탄을 추출물의 ACE 억제 활성을 측정한 결과 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에 따라 각각 32.5%, 47.9%, 50.4%의 억제 활성을 나타냈다(Fig. 3B). 폴리페놀, 펩타이드, 고도 불포화지방산 등 다양한 성분을



함유한 천연물은 ACE 억제 활성을 통해 혈압을 낮출 수 있다고 보고되고 있다²⁴⁻²⁸. 덜 익은 감과 감잎에 존재하는 플라보노이드, 탄닌과 같은 폴리페놀 화합물은 고혈압을 예방하거나 치료할 수 있는 잠재적인 천연 물질이라 할 수 있다^{29,30}. 이러한 항고혈압 활성은 자유라디칼 소거 활성, ACE 억제 활성 및 NO를 포함한 질소 대사에 대한 조절 효과에 기인하는 것으로 나타났다³¹. 시체(柿蒂)에서 분리된 폴리페놀 성분으로는 quercetin, catechin, luteolin, kaempferol, rutin, tannin 등이 있다고 알려졌다^{15,32}. quercetin은 강력한 항산화제로 혈관 내피세포에서 생성된 ROS의 활동을 억제할 뿐만 아니라 직접적으로 eNOS가 NO를 생성할 수 있도록 촉진한다³³. luteolinin은 NO 생성에 직접적으로 관여하여 혈관 확장을 유도한다³⁴. 또한, catechin은 ACE 억제제로 작용하여 angiotensin I을 angiotensin II로 전환되는 것을 억제한다³⁵.

이상의 결과들에서 시체(柿蒂) 메탄을 추출물이 ACE 억제 활성을 가지고 있으며 혈관 내피세포에서 H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스에 대해 ROS 생성을 억제시키고 NO 생성을 촉진시켜 항고혈압 활성이 있음을 보여주었다.

결론

산화 스트레스는 혈관 내피세포의 손상을 유발하여 고혈압의 발병 기전에 중요한 매개체가 된다. 본 연구에서는 시체(柿蒂) 메탄을 추출물의 항산화 및 항고혈압 활성을 측정하여 혈관 내피세포 보호 효과가 있는지를 확인하였다. 시체(柿蒂) 메탄을 추출물 2.5, 5, 10 µg/mL 농도에서 세포독성은 나타나지 않았으며, H₂O₂로 처리된 EA.hy926 세포에 비해 세포생존율을 증가시켰다. 시체(柿蒂) 메탄을 추출물은 산화 스트레스에 의한 ROS 생성을 유의적으로 저해하는 활성이 있는 것으로 나타났다. 또한, 시체(柿蒂) 메탄을 추출물은 혈압을 낮추는 기능과 관련 있는 NO 생성의 증가 및 ACE 억제 활성도 보였다. 시체(柿蒂) 메탄을 추출물은 혈관 내피세포에서 항산화 활성과 항고혈압 활성이 있음을 확인하였다.

참고문헌

1. GBD 2017 Risk Factor Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392:1923-4.
2. Kim HC, Cho SMJ, Lee H, Lee HH, Baek J, Heo JE; Korean Society of Hypertension (KSH) - Hypertension Epidemiology Research Working Group. Korea hypertension fact sheet 2020: analysis of nationwide population-based data. *Clinical Hypertension*. 2021;15:27(1):8.
3. Sun D, Liu J, Xiao L, Liu Y, Wang Z, Li C, et al. Recent development of risk-prediction models for incident hypertension: An updated systematic review. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0187240.
4. Ceriello A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care*. 2008;31 Suppl 2:S181-4.

5. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004;44(3):248-52.
6. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circulation Research*. 2000;86(9):E85-90.
7. Sinha N, Dabla PK. Oxidative stress and antioxidants in hypertension—a current review. *Current hypertension reviews*. 2015;11(2):132-42.
8. Warren MC, Bump EA, Medeiros D, Braunhut SJ. Oxidative stress-induced apoptosis of endothelial cells. *Free radical Biology & Medicine*. 2000;29(6):537-47.
9. Martins TF, Palomino OM, Álvarez-Cilleros D, Martín MA, Ramos S, Goya L. Cocoa flavanols protect human endothelial cells from oxidative stress. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2020;75(2):161-8.
10. 김종구, 박선동, 박원환. 고콜레스테롤 식이로 유발된 동맥경화 병태 흰쥐의 혈관조직내 지질과 산화 및 산화스트레스에 대한 삼칠근의 영향. *동의생리병리학회지*. 2006;20(5):1187-95.
11. 황지영, 한지숙. 혈관내피세포에서 고농도 포도당으로 유도된 산화스트레스에 대한 조릿대잎 추출물의 보호효과. *한국식품영양과학회지*. 2010;39(12):1753-60.
12. Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*. 1998;97(14):1411-20.
13. 안계택, 진선아, 정진욱. 고혈압의 진단 및 치료: 대한고혈압학회 진료지침을 기반으로. *대한신경과학회지*. 2019;37.2:123-34.
14. 한국한의학연구원. 본초감별도감 제 2 권. *한국한의학연구원*. 2016:210.
15. 박정환. 시체(柿蒂)의 약리학적 효능 및 임상연구에 대한 고찰. *한약정보연구회지*. 2018;6(2):267-77.
16. Wang S, Chen Y, He D, He L, Yang Y, Chen J, Wang X. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with *Gastrodia* and *Uncaria* decoction, a traditional Chinese formulation. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;114(3):458-62.
17. Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*. 1971;20(7):1637-48.
18. Yoon MY, Lee EA, Choi AR, Moon SH, Kim Y, Park HR. Protective effect of extracts of calyx from *Diospyros kaki* on H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2013;7(10):612-8.
19. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of pharmacology*. 2004;142(2):231-55.
20. Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):606-11.
21. Sorriento D, De Luca N, Trimarco B, Iaccarino G. The antioxidant therapy: New



- insights in the treatment of hypertension. *Frontiers in Physiology*. 2018;9:258.
22. Leikert JF, Räthel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation*. 2002;106(13):1614-7.
 23. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *The Journal of Pathology*. 2000;190(3):244-54.
 24. Iwaniak A, Minkiewicz P, Darewicz M. Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014;13(2):114-34.
 25. Dong J, Xu X, Liang Y, Head R, Bennett L. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by polyphenols from tea (*Camellia sinensis*) and links to processing method. *Food & Function*. 2011;2(6):310-9.
 26. 조영제, 천성숙, 차원섭, 박준희, 이경환, 김정환, 권효정, 윤소정. 구기자 (*Lycii fructus*) 추출물의 항산화와 항고혈압 효과. *한국식품영양과학회지*. 2005;34(9):1308-13.
 27. 윤광섭, 김재원. 건조방법에 따른 꾸지뽕열매 추출물의 항산화활성과 Angiotensin Converting Enzyme I 저해활성. *한국식품영양과학회지*. 2012;41(10):1388-94.
 28. Zieliński H, Honke J, Topolska J, Bączek N, Piskula MK, Wiczowski W, Wronkowska M. ACE inhibitory properties and phenolics profile of fermented flours and of baked and digested biscuits from buckwheat. *Foods*. 2020;9(7):847.
 29. Uchida S, Ohta H, Niwa M, Mori A, Nonaka G, Nishioka I, Ozaki M. Prolongation of life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) ingesting persimmon tannin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1990;38(4):1049-52.
 30. Xie C, Xie Z, Xu X, Yang D. Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves: a review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;163:229-40.
 31. Liu C, Kurakane S, Takita J, Itano R, Soga T, Oikawa A, Igarashi K. Antihypertensive effects of unripe persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Hiratanenashi) fruit and its component in spontaneously hypertensive rats. *Food Science and Technology Research*. 2012;18(3):391-8.
 32. 홍성화, 허희진, 이하나, 이민아, 이준수, 박정환. 알코올로 유도된 간손상에 대한 감꼭지 메탄올 추출물의 보호효과. *한국식품영양과학회지*. 2021;50(4):339-46.
 33. Clark JL, Zahradka P, Taylor CG. Efficacy of flavonoids in the management of high blood pressure. *Nutrition Reviews*. 2015;73(12):799-822.
 34. El-Bassossy HM, Abo-Warda SM, Fahmy A. Chrysin and luteolin attenuate diabetes-induced impairment in endothelial-dependent relaxation: effect on lipid profile, AGEs and NO generation. *Phytotherapy Research*. 2013;27(11):1678-84.
 35. Balasuriya BWN, Rupasinghe HPV. Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension. *Functional Foods in Health and Disease*. 2011;5:172-88.

