

머위 분획물의 *In Vitro* 라디칼 소거능 및 신경세포의 산화적 스트레스 보호 효과

왕 천¹ · 이아영¹ · 최지명¹ · 이동구² · 김현영³ · 이상현^{2*} · 조은주^{1*}

¹부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소, ²중앙대학교 식물시스템학과, ³경남과학기술대학교 식품과학부

In Vitro Radical Scavenging Effect and Neuroprotective Activity from Oxidative Stress of *Petasites japonicus*

Qian Wang¹, Ah Young Lee¹, Ji Myung Choi¹, Dong Gu Lee², Hyun Young Kim³, Sanghyun Lee^{2*} and Eun Ju Cho^{1*}

¹Department of Food Science and Nutrition and Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

³Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

Abstract – This study was focused on the evaluation of radical scavenging effect and the protective activity against oxidative stress of the extract and fractions from *Petasites japonicus*. *P. japonicus* was extracted with methanol and then fractionated into 4 fractions [*n*-butanol, ethyl acetate (EtOAc), methylene chloride, and *n*-hexane]. The extract and fractions showed strong 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. Among all the fractions, particularly, the EtOAc fraction showed the strongest effect with the IC₅₀ value of 0.02 µg/ml. In addition, the fractions also showed strong hydroxyl radical scavenging activity and nitric oxide scavenging activity as well. Furthermore, cell viability generated by the *P. japonicus* extract and 4 fractions were examined under C6 glial cellular model. The C6 glial cells showed high generation of reactive oxygen species (ROS) and decrease in cell viability by the treatment generator of hydrogen peroxide. However, the production of ROS formation was decreased by the treatment of the fractions of *P. japonicus* and also founded that the EtOAc fraction led to significant increase in the cell viability at concentration 100 µg/ml. Results from this work indicated that *P. japonicus* showed protective effects against oxidative stress and its EtOAc fraction may be served as a useful natural antioxidant.

Key words – *Petasites japonicus*, C6 glial cells, Reactive oxygen species, Hydrogen peroxide, Oxidative stress

인간을 비롯한 모든 생물체들은 생체 내 생화학 반응 및 환경적 인자에 의해 superoxide radical(O₂⁻), hydroxyl radical (-OH), peroxy radical, hydrogen peroxide(H₂O₂) 등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되며, 이들은 산화력이 매우 강하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하게 된다.^{1,2)} 생체 내 이들의 생성이 증가된 상태인 산화적 스트레스에 의해 세포 내 구성성분인 단백질 및 지질성분 등이 손상되고 과량의 활성산소나 지속적인 활성산소 생성으로 항산화 방어계의 균형이 깨지게 되면 조직을 손상시켜 암, 당뇨병, 동맥경화, 심장질환 및 알츠하이머와 같은 다양한 만성 질환

을 유발한다.³⁻⁵⁾ 특히 뇌 신경세포에 있어 활성 산소에 의한 산화적 손상은 신경퇴행성 질환의 유발기전과 밀접한 관련이 있는 것으로 제시되었다.⁶⁾ 이로 인하여 생체 내 유리 라디칼의 생성을 억제하는 것이 질병예방을 위한 중요한 과제로 대두되고 있으며 이에 관련된 연구도 다양하게 수행되고 있다.⁷⁾

머위(*Petasites japonicus* S. et. Z. Max.)는 한국, 일본, 중국 등 야산의 습지에서 자생하는 국화과(Compositae) 머위속(Senecio)에 속하는 다년생 근경식물로, 머위의 짧은 맛과 정유성분의 향기 및 독특한 질감은 사람들의 기호에 적합하여 찜과 생채 및 나물로 이용하거나 말려서 탕의 재료로 사용한다.⁸⁾ 또한 머위는 민간에서 진해, 거담, 건위의 효과가 있다고 알려져 있고 진정, 소종, 이뇨, 풍한 등의 치료에 오랫동안 사용되어 왔다.⁹⁾ 그러나 머위의 생리활성에 관한

*교신저자(E-mail): slee@cau.ac.kr, ejcho@pusan.ac.kr
(Tel): +82-31-670-4688, +82-51-510-2837

과학적 연구는 아직 미흡한 실정이다.

머위의 주요 성분으로는 머위 잎으로부터 분리된 fukinolic acid¹⁰⁾ 및 petasignolide A¹¹⁾ 등이 있으며, 뿌리와 줄기에서 분리된 sesquiterpenoid인 eremopetasidioner과 phenolic compound인 petasiphenone 및 eremophilinolide 등이 분리되었다는 보고가 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 이전 연구에서 머위 에탄올 추출물이 알코올 투여로 손상된 간 조직을 보호하는 항산화 효과를 나타낼 뿐만 아니라 머위를 첨가한 식이를 먹인 mice에서 체내 산화적 방어 능력을 높이는 것을 확인할 수 있었다.¹⁵⁻¹⁶⁾ 또한, 머위 추출물이 위암 및 간암 세포의 생육을 억제시켰으며 각질 형성세포에서 염증성 사이토카인 interleukin-1 α 와 prostaglandin E₂의 생성 억제 효과 등이 보고되어 있다.¹⁷⁻¹⁸⁾ 그러나 free radical에 의해 유도되는 산화적 스트레스 상태에서 머위의 신경 세포 보호 효과에 대한 연구는 행해져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 머위의 추출물과 분획물을 이용하여 free radical에 의한 산화적 스트레스 개선효과를 *in vitro* 라디칼 소거능과 C6 glial cell을 이용한 신경 세포 보호 효과를 검토해 보았다.

재료 및 방법

머위의 추출 및 분획물 조제 - 실험재료인 머위(*P. japonicus* S. et. Z. Max.)는 국립수목원(2009년 울릉도 채집)으로 제공 받았으며, 중앙대학교 안영희교수님으로부터 감정을 받은 후 사용하였다. 머위를 음건한 후 methanol (MeOH)로 추출하여 추출물을 조제하였다. MeOH 추출물은 원형 플라스크에 넣고 MeOH을 채워서 환류 냉각장치가 부착된 추출장치를 이용하여 3회에 걸쳐 추출하였다. 추출 후 얻은 머위 MeOH 추출물은 극성별 유기용매인 *n*-butanol(BuOH), ethyl acetate(EtOAc), methylene chloride (MC), *n*-hexane(Hx)로 다시 표준 분획물을 조제하였다.

1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl(DPPH) 소거능 측정 - Ethanol에 녹인 각 농도 별 시료(5, 10, 50, 100 μ g/ml) 100 μ l와 60 μ M DPPH 용액 100 μ l를 96-well plate에 혼합하여 실온에서 30분간 방치시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 free radical 소거효과를 IC₅₀(DPPH radical 생성을 50%까지 억제하는데 필요로 하는 시료 농도)로 나타내었다.¹⁹⁾

Hydroxyl Radical(\cdot OH) 소거능 측정 - Fenton 반응에 따라 10 mM FeSO₄·7H₂O-EDTA에 10 mM의 2-deoxyribose solution과 농도 별 시료 용액을 혼합한 다음 10 mM의 H₂O₂를 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 이 혼합액에 2.8% trichloroacetic acid(TCA)와 1.0% thiobarbituric acid (TBA) solution을 각각 첨가하여 20분간 끓여 식힌 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.²⁰⁾

Nitric Oxide(NO) 소거 효과 측정 - NO 소거능은 Marccoci

등의 방법으로 측정하였다. 5 mM sodium nitroprusside(SNP) solution에 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)에 녹인 각 농도 별 시료를 넣고 25°C에서 150분간 반응시켰다. 이 반응 혼합액은 96 well plate에 주입하여 0.1%의 naphthyl ethylenediamine dihydrochlorid와 1%의 sulfanilamide를 함유한 5%의 phosphoric acid를 동량 섞은 griess reagent를 넣어 실온에서 30분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 저해활성을 확인하였다. 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.²¹⁾

세포 종류 및 시약 - C6 glial cell은 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하고 배양을 위한 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)배지, fetal bovine serum(FBS)과 100 units/ml penicillin streptomycin, trypsin EDTA 용액은 Welgene(Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 산화적 스트레스를 유도시키기 위해 사용한 H₂O₂는 Junsei(Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)회사에서 구입하여 사용하였다. 세포 생존율을 측정하기 위해 사용한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 BIO BASIC(BIO BASIC CANADA INC.)에서, dimethyl sulfoxide(DMSO)는 BIO PURE(Ontario, Canada)에서 구입하여 사용하였다.

세포 배양 - C6 glial cell은 100 units/ml의 penicillin streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 1~2일에 한 번 배양액을 바꾸어 주면서 세포분화가 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline(PBS)로 세포를 세척한 후 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액으로 부착된 세포를 분리하여 원심 분리해서 집적된 세포를 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

Reactive Oxygen Species(ROS) 측정 - 세포가 confluence 상태가 되면 black 96 well plate에 5 \times 10⁴ cells/ml로 seeding하여 2시간 동안 37°C에서 배양한 후 세포가 잘 부착되면 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 H₂O₂(250 μ M)와 시료를 농도 별로(10, 50, 100 μ g/ml) 처리하여 24시간 배양한 뒤 80 μ M의 DCF-DA용액을 각 well에 주입하여 37°C에서 30분 동안 재배양한 후 FLUOstar OPTIMA(BMG lavtech, Ortenberg, Germany)에서 excitation-480 nm, emission-535 nm로 측정하였다.²²⁾

Cell Viability 측정 - 세포가 confluence 상태가 되면 24 well plate에 well당 1 \times 10⁵ cells/ml로 seeding하여 2시간 37°C에서 배양한 후 세포가 잘 부착되면 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 H₂O₂(500 μ M)를 첨가하여 6시간 배양하였다. 산화적 스트레스 유발한 후, 머위 시료를 농도 별로(5, 10, 50, 100 μ g/ml) 처리하여 18시간 배양한 뒤 5 mg/ml의 MTT solution을 각 well에 주입하였다. 37°C에서 4시

간 동안 재배양한 후 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.²³⁾

통계분석 - 대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 평균 ± 표준편차로 나타내었고, SAS 4.2를 이용하여 각 실험 결과로부터 ANOVA(analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple test($P < 0.05$)를 이용하여 각 군의 평균 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

DPPH 소거 효과 - DPPH radical 소거활성 측정은 분자 내 radical을 가지고 있는 보라색의 화합물로 ascorbic acid, polyhydroxy 방향족 화합물 등에 의해 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여 환원되어짐에 따라 보라색에서 탈색되어 가는 원리를 이용한 것이다.²⁴⁾ 비교적 간단하면서도 대량으로 측정 가능하고 반복할 수 있기 때문에 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 널리 이용되고 있다. 머위 추출물과 분획물의 DPPH 소거효

과를 IC₅₀로 나타낸 결과, Table I에서 보는 바와 같이 EtOAc 분획물, BuOH 분획물, MeOH 추출물, MC 분획물, Hx 분획물 순으로 각 0.02, 1.47, 6.09, 16.51, 22.78 µg/ml의 IC₅₀ 값을 보여 EtOAc 분획물이 가장 우수한 DPPH 소거능을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

·OH 소거효과 - Free radical중에서도 가장 강한 독성을 나타내는 것으로 알려진 ·OH radical은 반응성이 매우 크고 반응속도가 빠르며 지질의 산화 및 DNA에 손상을 주고 돌연변이를 유발함으로써 다양한 질환에 관여하는 것으로 알려져 있다.²⁵⁾ Table II에 나타난 ·OH radical 소거능을 살펴본 결과, 처리 농도에 따라 소거 효과가 유의적으로 높아지는 것을 볼 수 있었고 MeOH 추출물과 4중 분획물 모두 10 µg/ml에서 70% 이상의 ·OH radical 소거능을 확인할 수 있었다. 특히 EtOAc 분획물의 100 µg/ml 농도에서 93.87%의 가장 높은 소거능을 나타내었고 MeOH, BuOH 분획물 또한 각 93.70%, 90.23%의 높은 소거능을 보였다. 따라서 머위 추출물과 분획물은 ·OH radical에 대한 독성 제거 효과가 높은 것으로 확인되었다.

NO 소거효과 - NO는 혈액응고 및 혈압조절 기능, 암세포에 대한 면역기능을 가지고 있지만,²⁶⁾ O₂와 반응하여 더 반응성이 크고 독성이 강한 산화제 peroxynitrite(ONOO⁻)를 생성한다. ONOO⁻는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 가장 강력한 산화제로 단백질, 아미노산, DNA 등과 반응하여 세포 및 조직 손상을 야기할 뿐만 아니라 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증, 뇌막염, 알츠하이머병, 파킨슨병과 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다.²⁷⁻²⁹⁾ NO는 생리적 pH상태(pH 7.4)의 SNP용액에서 자연스럽게 생성되며, 산소와 반응한 아질산염의 생성량을 griess reagent로 확인할 수 있다.³⁰⁾ 따라서 본 실험에서 SNP를 사용하여 아질산염의 양으로 NO 소거활성을 산출하였다. 측정된 결과(Table III), 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, 특히 EtOAc 분획물은 100 µg/ml에서 50.77%의 가장 높은 NO 소거 효과를 나타내었다.

Table I. IC₅₀ values of the MeOH extract and each fraction from *P. japonicas* against DPPH radical

Sample	IC ₅₀ (µg/ml) ¹⁾
MeOH ext.	6.09±0.04 ^c
BuOH fr.	1.47±0.09 ^d
EtOAc fr.	0.02±0.02 ^e
MC fr.	16.51±0.23 ^b
Hx fr.	22.78±0.54 ^a
Ascorbic acid ²⁾	2.43±0.01

Values are mean±SD.
^{a-c}Means with the different letters among same concentrations are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.
¹⁾IC₅₀ is concentration in µg/ml required to inhibit DPPH radical formation by 50%.
²⁾Ascorbic acid was used as positive control.

Table II. Hydroxyl radical scavenging activity of the MeOH extract and each fraction from *P. japonicus*

Sample	Concentration (µg/ml)			
	5	10	50	100
MeOH ext.	64.25±0.17 ^c	81.18±0.14 ^b	87.48±0.24 ^b	93.70±0.19 ^a
BuOH fr.	66.63±0.15 ^b	80.88±0.09 ^c	87.77±0.09 ^b	90.23±0.07 ^b
EtOAc fr.	74.23±0.16 ^a	83.29±0.09 ^a	88.94±0.07 ^a	93.87±0.08 ^a
MC fr.	52.02±0.21 ^e	74.00±0.13 ^d	84.00±0.00 ^d	88.51±0.14 ^d
Hx fr.	56.52±0.20 ^d	74.09±0.08 ^d	84.51±0.22 ^c	89.11±0.10 ^c
Ascorbic acid ¹⁾ (IC ₅₀ , µg/ml)	1.06±0.01			

Values are mean±SD.
^{a-c}Means with the different letters among same concentrations are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.
¹⁾Ascorbic acid was used as positive control.

Table III. NO scavenging activity of the MeOH extract and each fraction from *P. japonicus*

Sample	Concentration (µg/ml)			
	5	10	50	100
MeOH ext.	1.65±1.28 ^c	13.43±0.51 ^c	22.31±1.01 ^c	43.80±0.64 ^b
BuOH fr.	9.30±0.51 ^a	36.57±1.45 ^a	38.02±0.00 ^a	42.56±0.64 ^b
EtOAc fr.	4.05±0.47 ^b	16.02±0.63 ^b	32.63±0.47 ^b	50.77±0.63 ^a
MC fr.	- ¹⁾	-	8.03±0.67 ^d	24.08±2.13 ^c
Hx fr.	-	-	-	5.98±1.14 ^d
Ascorbic acid ²⁾ (IC ₅₀ , µg/ml)	0.18±0.03			

Values are mean±SD.

^{a-d}Means with the different letters among same concentrations are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾No effect.

²⁾Ascorbic acid was used as positive control.

ROS 생성 억제 효과 - DCF-DA는 세포 내 과산화수소를 측정하는 대표적 물질이고 세포막을 자유롭게 통과하여 세포 내 esterase에 의해 비형광성 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소종인 과산화수소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 DCF가 되는 원리³¹⁾를 이용하여 머위 MeOH 추출물과 BuOH, EtOAc, MC, Hx 분획물의 세포 내 활성산소종 억제 효과를 알아보았다. C6 glial cell을 이용한

H₂O₂의 산화적 스트레스 실험 모델은 많은 연구자들에 의해 확립되었다.³²⁻³³⁾ 시료의 효과를 검증하기 위하여 H₂O₂를 시료와 동시에 처리하여 ROS의 생성능을 측정한 결과 ROS의 생성량이 증가할 뿐만 아니라, 산화적 스트레스와 관련된 인자들의 발현이 증가 되었다고 보고되었다.³⁴⁾ 따라서 본 연구에서는 이러한 연구들을 바탕으로 시료와 H₂O₂를 동시에 처리하여 머위 추출물 및 분획물의 효능을 검토하였다.

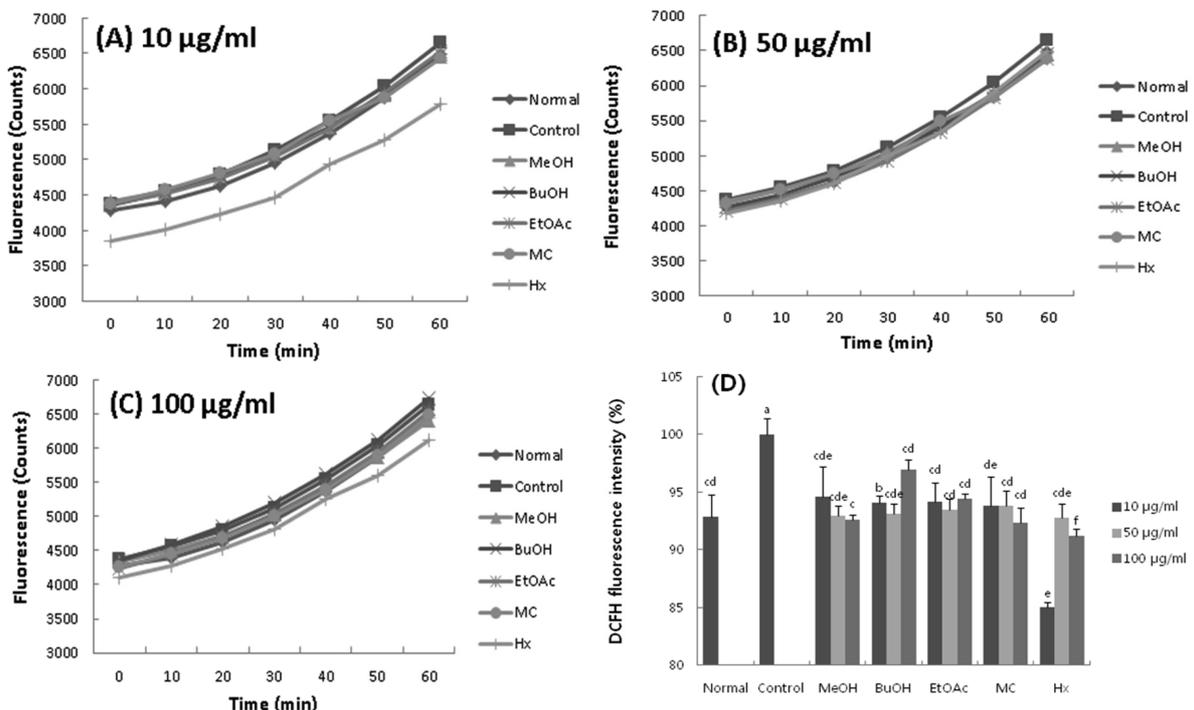


Fig. 1. Effect of fractions from *P. japonicus* on level of ROS in C6 glial cells treated with H₂O₂. (A: Time course of change in intensity of ROS fluorescence with fractions from *P. japonicus* at the concentration of 10 µg/ml; B: Time course of change in intensity of ROS fluorescence with fractions from *P. japonicus* at the concentration of 50 µg/ml; C: Time course of change in intensity of ROS fluorescence with fractions from *P. japonicus* at the concentration of 100 µg/ml; D: The production of ROS treated with fractions from *P. japonicus*).

Values are mean ± SD.

^{a-f}Means with the different letters are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

결과를 살펴 보면(Fig. 1), 시간이 지남에 따라 모든 군에서 ROS 생성량이 증가하는 것을 보였으며, 이를 통해 산화적 스트레스가 유발되었음을 알 수 있었다. 60분 기준으로 control군을 100%로 하였을 때 머위 MeOH 추출물과 BuOH, EtOAc, MC, Hx 분획물을 농도 별로(10, 50, 100 µg/ml) 처리한 결과, control군에 비해 ROS 생성량이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 특히, EtOAc 분획물은 normal군(92.88%)과 비슷한 ROS 생성량을 보여 H₂O₂에 의해 유도되는 세포 사멸을 억제하는 요인으로 사료되며 Hx 분획물 또한 ROS 생성량을 억제함으로써 세포 독성을 보호한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 머위 추출물 및 분획물은 H₂O₂에 의해 유도되는 ROS의 생성을 효과적으로 감소시킴으로써 ROS에 대한 신경세포 보호 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

H₂O₂ 처리로 유도된 산화적 스트레스 개선 효과 - H₂O₂는 세포 내에서 유전자 발현 변화를 조절하기도 하고, 세포의 행동, 운동, 모양 등을 조절하는 신호전달 물질로 작용하며, 생체의 정상적인 영위에서 10⁻⁹~10⁻⁷ M로 항상 생성되고 있다. 하지만 구리(Cu²⁺)나 철(Fe²⁺)이온 존재 하에 ·OH로 전환되어 산화적 스트레스를 유발함에 따라 세포 손상

을 일으켜 퇴행성 신경질환, 암 등의 각종 질병을 일으키게 된다.³⁵⁻³⁷⁾ 본 연구에서는 H₂O₂가 유발하는 산화적 스트레스로부터 C6 glial cell을 보호하는 머위 추출물과 분획물의 효과를 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 아무것도 처리하지 않은 normal군과 H₂O₂ 처리한 control군 그리고 H₂O₂와 머위 추출물/분획물을 농도별로 처리한 실험 군을 비교하였다. 그 결과, normal군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때, H₂O₂를 처리한 control군에서는 72.24%로 나타내어 신경세포가 H₂O₂에 의해 손상을 받은 것을 확인할 수 있었다. 반면 머위 추출물과 분획물을 처리하였을 때 세포생존율이 증가하는 것을 볼 수 있었으며 BuOH 분획물과 EtOAc 분획물이 10 µg/ml의 낮은 농도에서도 80% 이상의 높은 세포 생존율이 나타난 것을 볼 수 있었다. EtOAc 분획물을 처리한 군은 농도(5, 10, 50, 100 µg/ml)에 따라서 세포 생존율이 유의적으로 증가됨을 알 수 있었고 특히 50 µg/ml, 100 µg/ml에서는 각 86.32%, 91.23%의 높은 세포 생존율을 나타내어 인체 내에서 발생하는 활성산소의 생성을 억제하거나, 활성산소를 제거함으로써 신경세포를 보호하는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 머위는 free radical 소거

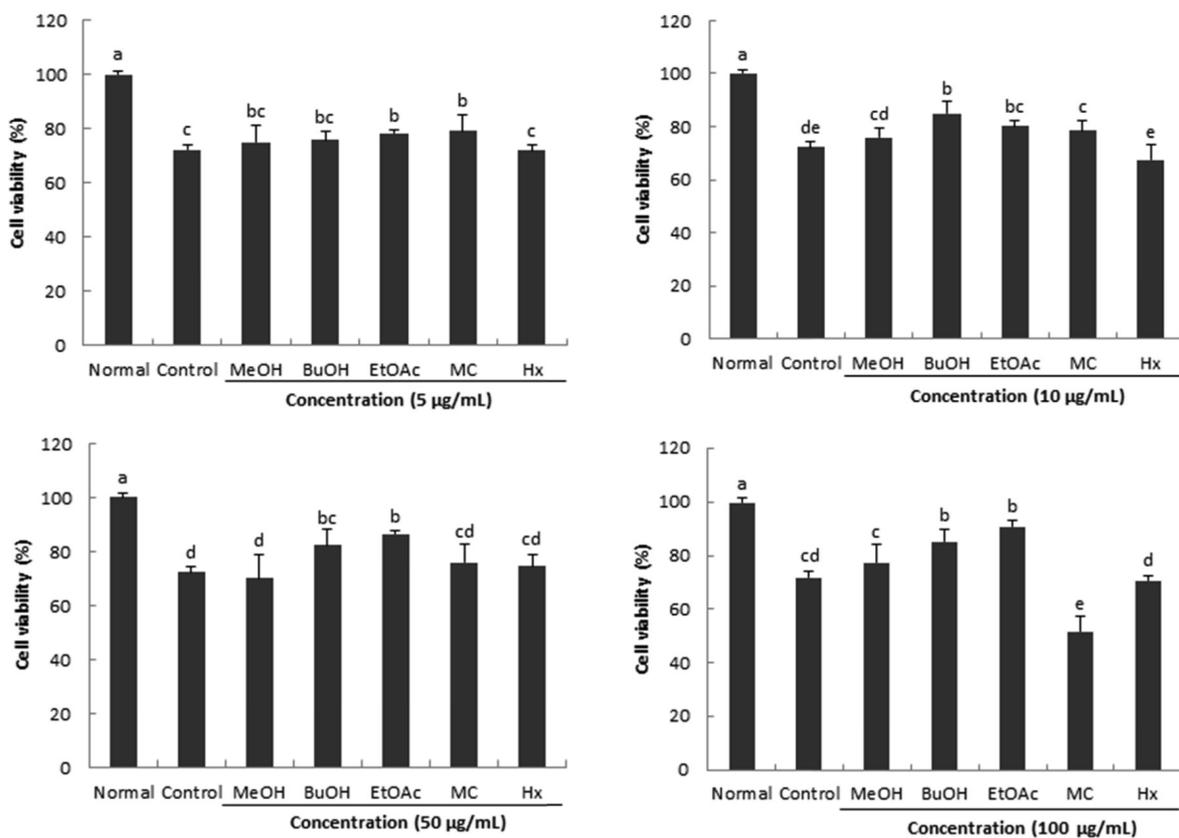


Fig. 2. Effect of fractions from *P. japonicus* on viability of C6 glial cells treated with H₂O₂.

Values are mean±SD.

^{a-c}Means with the different letters are significantly different (*P*<0.05) by Duncan's multiple range test.

능과 산화적 스트레스 개선 효과가 있음을 알 수 있었고 그 중 EtOAc 분획물이 radical 소거능과 H₂O₂로 유발된 산화적 스트레스 상태에서 세포생존율이 가장 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 머위의 EtOAc 분획물은 우수한 항산화제로서의 가능성을 나타낼 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 머위 MeOH 추출물과 BuOH, EtOAc, MC, Hx 4종 분획물의 free radical 소거능과 C6 glial cell에서 H₂O₂에 의한 산화적 스트레스 개선 효과를 알아보았다. 그 결과 머위 추출물과 분획물은 우수한 free radical 소거능을 나타내었고, 특히 EtOAc 분획물은 DPPH 소거능에서 0.02 µg/ml의 IC₅₀ 값을 보여 가장 우수한 radical 소거능이 있음을 확인할 수 있었다. ·OH radical 소거 효과를 알아본 결과, 처리농도에 따라 농도 의존적으로 ·OH radical 소거능이 증가됨을 볼 수 있었으며 5 µg/ml의 낮은 농도에서도 70% 이상의 소거능을 나타내었고 100 µg/ml 농도에서는 93.87%의 가장 높은 소거능을 나타내었다. NO 소거능에서는 EtOAc 분획물이 100 µg/ml에서 50.77%의 가장 높은 NO 소거 효과를 나타내었다. 또한 머위 추출물과 분획물이 H₂O₂로부터 유도된 산화적 스트레스 상태에서 세포 생존율을 증가시켰으며, ROS 생성을 억제 시키는 것을 살펴볼 수 있었다. 이상의 결과에서 머위의 EtOAc 분획물은 우수한 항산화능과 산화적 스트레스 개선을 통한 신경세포 보호 효과가 있음을 알 수 있었다.

사 사

이 논문은 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임 (2013R1A1A2011228).

인용문헌

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell B.* **39**: 44-84.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., Oxford University Press, *New York*.
- Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* **221**: 1256-1264.
- Cha, B. C., Lee, H. W. and Choi, M. Y. (1998) Antioxidative and antimicrobial effects of nut species. *Korean J. Pharmacogn.* **29**: 28-34.
- Shin, C. H. (2001) Studies on the antioxidative character in the ethyl acetate extractions of *Rumex crispus*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**: 592-602.
- Barnham, K. J., Masters, C. L. and Bush, A. I. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**: 205-214.
- Kim, S. D., Do, J. H. and Oh, H. I. (1981) Antioxidant activity of *Panax ginseng* browning products. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **24**: 161-166.
- Choi, O. B. (2002) Anti-allergic effects of *Petasites japonicum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **15**: 382-385.
- Cho, B. S., Lee, J. J., Ha, J. O. and Lee, M. Y. (2006) Physicochemical composition of *Petasites japonicus* S. et Z. Max. *Korean J. Food Preserv.* **13**: 661-667.
- Hasa, Y. and Tazaki, H. (2004) Biosynthesis of fukinolic acid isolated from *Petasites japonicus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 2212-2214.
- Min, B. S., Cui, H. S., Lee, H. K., Sok, D. E. and Kim, M. R. (2005) A new furofuran lignan with antioxidant and anti-seizure activities from the leaves of *Petasites japonicus*. *Arch. Pharm. Res.* **28**: 1023-1026.
- Yaoita, Y. and Kikuchi, M. (1994) Eremopetasidione a norsesquiterpenoid from the rhizomes of *Petasites japonicus*. *Phytochemistry* **37**: 1765-1766.
- Yaoita, Y. and Kikuchi, M. (1994) Petasiphenone, a phenolic compound from rhizomes of *Petasites japonicus*. *Phytochemistry* **37**: 1773-1774.
- Yaoita, Y. and Kikuchi, M. (1994) Structures of six new eremophilanolides from the rhizomes of *Petasites japonicus* Maxim. *Chem. Pharm. Bull.* **42**: 1944-1947.
- Cho, B. S., Lee, J. J. and Lee, M. Y. (2007) Effects of ethanol extracts from *Petasites japonicus* S. et Z. Max. on hepatic antioxidative systems in alcohol treated rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**: 298-304.
- Oh, S. H., Yang, Y. H., Kwon, O. Y. and Kim, M. R. (2006) Effects of diet with added butterbur (*Petasites japonicus* Maxim) of the plasma lipid profiles and antioxidant index of mice. *J. East Asian. Soc. Dietary Life* **16**: 399-407.
- Kim, J. H., Na, Y., Sim, G. S., Lee, B. C. and Pyo, H. B. (2006) Antioxidative and anti-inflammatory effects of *Petasites japonicus*. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **32**: 263-267.
- Seo, H. S., Chung, B. H. and Cho, Y. G. (2008) The antioxidant and anticancer effects of butterbur (*Petasites japonicus*) extract. *Korean J. Plant Res.* **21**: 265-269.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. and Okuda, T. (1989) Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI: Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 2016-2021.

20. Chung, S. K., Osawa, T. and Kawakishi, S. (1997) Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 118-123.
21. Marcocci, L., Maguire, J. J., Droxylefaix, M. T. and Packer, L. (1994) The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb761. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**: 748-755.
22. Byun, Y. J., Kim, S. K., Kim, Y. M., Chae, G. T., Jeong, S. W. and Lee, S. B. (2009) Hydrogen peroxide induces autophagic cell death in C6 glioma cells via BNIP3-mediated suppression of the mTOR pathway. *Neurosci. Lett.* **461**: 131-135.
23. Mosmann, T. (1983) Rapid colormetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**: 55-63.
24. Wang, K. J., Zhang, Y. J. and Yang, C. R. (2005) Antioxidant phenolic compounds from rhizomes of *Polygonum paleaceum*. *J. Ethnopharmacol.* **96**: 483-487.
25. Halliwell, B. and Aruoma, O. I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* **281**: 9-19.
26. Nakagawa, T. and Yokozawa, T. (2002) Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem. Toxicol.* **40**: 1745-1750.
27. Lee, S. G., Kim, H. J., Lee, S. P. and Lee, I. S. (2009) Antioxidant and anticancer activities of defatted soybean grits fermented by *Bacillus subtilis* NUC1. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **38**: 657-662.
28. Althaus, J. S., Oien, T. T., Fici, G. J., Scherch, H. M., Sethy, V. H. and VonVoigtlander, P. F. (1994) Structure activity relationships of peroxynitrite scavengers an approach to nitric oxide neurotoxicity. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **83**: 243-254.
29. Lee, K. I. and Kim, S. M. (2009) Antioxidative and antimicrobial activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaf extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**: 267-273.
30. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131-138.
31. Cathcart, R., Schwiers, E. and Ames, B. N. (1983) Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal. Biochem.* **134**: 111-116.
32. Quincozes-Santos, A., Bobermin, L. D., Latini, A., Wajner, M., Souza, D. O., Goncalves, C. A. and Gottfried, C. (2013) Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1. *PLoS One* **8**: e64372
33. Mahesh, R. and Kim, S. J. (2009) The protective effects of insulin on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in C6 glial cells. *Biomol. Ther.* **17**: 395-402.
34. Chen, T. J., Jeng, J. Y., Lin, C. W., Wu, C. Y. and Chen, Y. C. (2006) Quercetin inhibition of ROS-dependent and independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicol.* **223**: 113-126.
35. Oda, A., Tamaoka, A. and Araki, W. (2010) Oxidative stress up-regulates presenilin 1 in lipid rafts in neuronal cells. *J. Neurosci. Res.* **88**: 1137-1145.
36. Pavlica, S. and Gebhardt, R. (2010) Protective effects of flavonoids and two metabolites against oxidative stress in neuronal PC12 cells. *Life Sci.* **86**: 79-86.
37. Zaidi, A., Fernanders, D., Bean, J. L. and Michaelis, M. L. (2009) Effects of paraquat-induced oxidative stress on the neuronal plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Free Radic. Biol. Med.* **47**: 1507-1514.

(2014. 3. 27 접수; 2014. 5. 2 심사; 2014. 6. 12 게재확정)