

## 머위 에틸아세테이트 분획물의 LLC-PK<sub>1</sub> 세포에서의 Nrf-2 매개 항산화 효과

김지현<sup>1</sup> · 이재민<sup>2</sup> · 이상현<sup>2\*</sup> · 조은주<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소, <sup>2</sup>중앙대학교 식물시스템학과

## Ethyl Acetate Fraction from *Petasites japonicus* Attenuates Oxidative Stress through Regulation of Nuclear Factor E2-Related Factor-2 Signal Pathway in LLC-PK<sub>1</sub> Cells

Ji Hyun Kim<sup>1</sup>, Jaemin Lee<sup>2</sup>, Sanghyun Lee<sup>2\*</sup>, and Eun Ju Cho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition & Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 46241, Korea

<sup>2</sup>Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

**Abstract** – Antioxidant effects and nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf-2) signal pathway of methanol extract and 4 fractions [n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate (EtOAc), and n-butanol fractions] from *Petasites japonicus* were investigated. The EtOAc fraction showed highest polyphenol and flavonoid contents among other fractions. In addition, EtOAc fraction showed stronger scavenging activity against superoxide anion radical than other fractions. Furthermore, we investigated antioxidant effects of the EtOAc fraction under cellular system using LLC-PK<sub>1</sub> cells. The EtOAc fraction dose-dependently increased the antioxidant protein expressions of heme oxygenase 1 (HO-1) and thioredoxin reductase 1 (TrxR1) known to be involved in oxidative stress, through activation of Nrf-2. The treatment of EtOAc fraction (100 µg/mL) led to the elevation of the high expression of Nrf-2-dependent factor such as HO-1 and TrxR1. These results indicated that the EtOAc fraction of *P. japonicus* showed high antioxidant activity by regulation of Nrf-2 signaling pathway.

**Key words** – *Petasites japonicus*, Antioxidant, Heme oxygenase-1, Nrf-2

활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 정상적인 호흡 과정에서 자연스럽게 생성되며 여러 가지 세포 반응을 조절함으로써 정상적인 세포 기능에 필수적이지만, 과다할 시 산화적 스트레스(oxidative stress)를 일으켜 체내에서 여러 질환의 원인이 된다.<sup>1)</sup> Superoxide anion radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl radical(·OH), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등을 포함하는 ROS는 강력한 산화력을 갖는 산소종으로써, 스트레스, 흡연 등과 같은 여러 환경적 요인에 의해 과다하게 증가하게 된다.<sup>2)</sup> 과다한 ROS의 축적으로 인해 체내 산화/항산화 체계의 균형이 깨어지게 되고, 이는 세포 손상 및 DNA 산화로 인해 체내 구성 성분의 손상을 일으켜 암, 노화, 신경퇴행성 질환 등을 일으킨다.<sup>3,4)</sup>

체내에 과다한 ROS의 생성으로부터 방어하기 위하여 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx),

catalase 등의 항산화 효소의 발현을 통해 ROS를 제거하는 항산화 시스템을 지니고 있다.<sup>5)</sup> 또한, 항산화에 관여하는 핵심적인 메커니즘의 하나로, nuclear factor E2-related factor 2(Nrf-2)의 핵 내 전사를 통해 antioxidant response element(ARE)에 결합 시, heme oxygenase-1(HO-1), thioredoxin reductase 1(TrxR1), NADPH quinone oxidoreductase-1(NQO1) 등의 항산화 유전자들이 활성화 되어 세포를 보호하며, 이들은 체내 항산화 방어 시스템의 핵심적인 역할을 담당하고 있다.<sup>6,7)</sup>

머위(*Petasites japonicus*)는 국화과(Compositae)에 속하는 다년초로 한국, 중국, 일본 등에서 자생 또는 재배되고 있다. 머위는 잎과 줄기가 연하고 향이 풍부한 육질을 지니 산채나물로 섭취되고 있으며 예로부터 민간요법 또는 한방에서 거담, 진해, 해열, 천식, 해독 등의 치료에 이용되어 왔다.<sup>8)</sup> 머위에 관한 국내의 연구들에 의하면, 항산화,<sup>9,10)</sup> 항염증,<sup>11)</sup> 항암,<sup>12)</sup> 항알러지<sup>13)</sup> 등과 관련한 연구들이 보고되어져

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

있다. 이전의 연구에서 머위 분획물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), ·OH 라디칼 및 nitric oxide(NO) 소거를 통한 *in vitro* 항산화 효과와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스에 대한 신경세포에서의 항산화 효과를 확인하였으며,<sup>24)</sup> 머위 첨가 식이를 마우스에게 8주간 섭취하였을 때, 간 및 혈장에 포함된 SOD, GPx, glutathione peroxidase, glutathione reductase 등과 같은 항산화 효소 활성이 높게 나타남이 보고된 바 있다.<sup>9)</sup> 또한, 머위의 주요 성분에는 꽃눈(flower bud)에서 quercetin 배당체, rutin, caffeic acid,<sup>31)</sup> 머위의 잎에서 quercetin 및 kaempferol 배당체,<sup>32)</sup> 근경 및 줄기에서 phenolic compound인 petasiphenone<sup>33)</sup>과 eremophilanolide<sup>34)</sup>를 분리하여 보고된 것으로 미루어보아 머위는 항산화 활성이 우수한 성분을 함유하는 것을 확인하였다. 그러나 머위의 산화적 스트레스에 대한 방어 작용기전에 대한 연구가 부족한 실정이며, Nrf-2 pathway에서의 유전자 전사 활성에 미치는 효과에 대한 연구는 보고된 바 없었다.

본 연구에서는 머위의 *in vitro* 항산화 효과와 LLC-PK<sub>1</sub> 세포를 이용하여 머위 분획물의 Nrf-2 유전자 매개 항산화 작용기전에 대해 확인하였다.

## 재료 및 방법

**머위의 추출 및 분획물 조제** - 실험에 사용한 머위(*P. japonicus*)는 국립수목원 최경박사(2009년 울릉도 채집)로부터 제공받아 실험에 사용하였으며, voucher specimen은 중앙대학교 식물시스템과학과에 보관되어 있다(No. Lee 2009-07). 음건한 머위(2,950 g)를 원형 플라스크에 넣고 methanol (MeOH) 8 L를 채워서 환류 냉각장치가 부착된 추출장치를 이용하여 5회에 걸쳐 추출물(541.9 g)을 조제하였다. 추출 후 얻은 머위 MeOH 추출물은 극성별 유기용매인 *n*-hexane(Hx), methylene chloride(MC), ethyl acetate(EtOAc), *n*-butanol(BuOH)으로 각각 분획하였다. 다시 각 표준 분획물 Hx(82 g), MC(21 g), EtOAc(42 g), BuOH(64 g)을 얻었으며 실험에 사용하였다.

**총 페놀 함량 측정** - 총 페놀 함량은 Gutfinger(1981)의 방법에 따라 측정하였다. 증류수에 녹인 시료 200 µl와 증류수 1800 µl를 혼합 후, phenol reagent 200 µl를 혼합하여 실온에서 5분간 방치한 뒤, 2 ml의 7% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 혼합하여 실온에서 90분간 방치시킨 후, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 결과는 0~100 µg/mL의 농도로 제조한 Tannic acid를 사용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 작성한 표준곡선으로부터 시료의 총 페놀 함량을 산출하였다.<sup>14)</sup>

**총 플라보노이드 함량 측정** - 총 플라보노이드 함량은 Moreno 등(2000)의 방법에 따라 증류수에 녹인 시료 200 µl와 증류수 400 µl를 혼합 후, 5% NaNO<sub>2</sub> 용액 30 µl를 가하

여 6분간 방치하였다. 10% AlCl<sub>3</sub> 30 µl와 4% NaOH 400 µl를 더하여 15분간 방치 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 결과는 0~100 µg/mL의 농도로 제조한 Quercetin을 사용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 작성한 표준곡선으로부터 시료의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.<sup>15)</sup>

**Superoxide Anion Radical 소거능 측정** - Superoxide anion radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 소거능은 Nishikimi 등(1972)의 방법에 따라 측정하였다. 증류수에 녹인 시료 500 µl, 0.1M Tris-HCl(pH 7.4) 100 µl, 100 µM PMS 200 µl, 500 µM NBT 200 µl, 500 µM NADH 400 µl를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 함유하지 않은 용매에 대한 소거능(%)로 결과를 산출하였다.<sup>16)</sup> Positive control로 L-ascorbic acid를 이용하여 소거 효과를 IC<sub>50</sub>(O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성을 50%까지 억제하는데 필요로 하는 시료 농도)로 나타내었다.

**세포 종류 및 시약** - 본 실험에 사용한 LLC-PK<sub>1</sub> cell은 American Type Culture Collection(ATCC, Ohio, USA)에서 분양 받았으며 배양을 위해 100 units/ml의 penicillin streptomycin, 5% fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's modified eagle medium(DMEM) 배지, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)용액은 Welgene(Daegu, South Korea)에서 구입하여 사용하였다. Cell viability를 측정하기 위해 사용한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Bio Basic(Toronto, Canada)에서 구입하여 사용하였다.

**세포 배양** - 실험에 사용한 LLC-PK<sub>1</sub> cell은 5%의 FBS와 100 units/ml의 penicillin streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 2~3일에 한 번 배양액을 바꾸어 주면서 세포 분화가 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세포를 세척한 후 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액으로 부착된 세포를 분리하여 원심 분리를 통해 집적시킨 후, 피펫을 이용하여 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

**Cell Viability 측정** - LLC-PK<sub>1</sub> cell이 confluence 상태가 되면 96 well plate에 well당 5×10<sup>4</sup> cells/ml로 seeding하여 37°C에서 24시간 배양 후, 세포가 잘 부착되면 머위 EtOAc 분획물을 25, 50, 100 µg/ml의 농도별로 처리하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 그 뒤, 5 mg/ml의 MTT solution을 각 well에 주입하여 4시간 배양 하였다. 배양 후, 각 well의 MTT solution을 제거하고 보라색의 formazan 결정을 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>17)</sup>

**Western Blot Analysis** - 항산화 관련 단백질 발현을 확인하기 위하여 머위 EtOAc 분획물을 0, 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리한 LLC-PK<sub>1</sub> 세포를 배양한 후 RIPA buffer

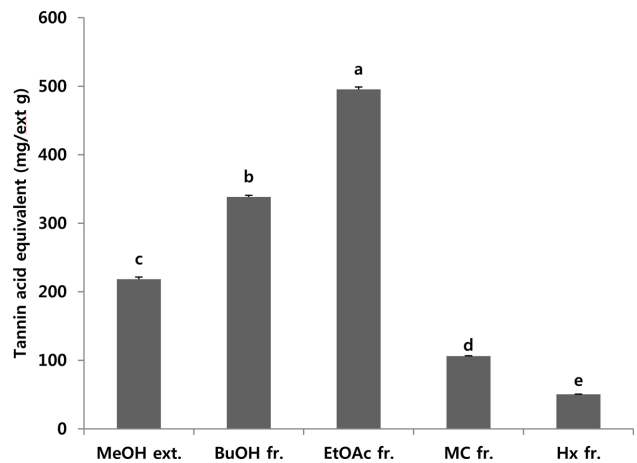
를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 4°C, 12,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액의 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질은 단백질 정량 시약인 Bio-Rad protein assay kit(CA, USA)을 이용하여 정량 한 다음, Laemmli sample buffer(Bio-Rad, CA, USA)와 혼합하여 sample을 제조하여 실험에 사용하였다. 동량의 sample을 10% sodium dodecyl sulphate(SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane에 transfer 하여 5% skim milk에서 1시간 blocking 하였다. 1차 항체인 Nrf-2(Santa cruz, CA, USA), pNrf-2(Santa cruz, CA, USA), TrxR1(Santa cruz, CA, USA), HO-1(Abcam, Cambridge, UK)을 PBS-T와 1:1000의 비율로 각각 희석하여 4°C에서 overnight 반응시킨 후, 2차 항체인 anti-rabbit IgG HRP-linked antibody(Cell signaling, CA, USA)를 1:500의 비율로 PBS-T와 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 PBS-T로 세척 후 enhanced chemiluminescence (ECL) solution과 반응시킨 후 Chemilium inescence image system(Davinch-ChemiTM)을 이용하여 특정 단백질 발현을 확인하였다.

**통계분석** - 모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 통계 프로그램인 Statistical Package for the Social Sciences(SPSS)을 이용하여 각 실험결과들로부터 ANOVA (analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple test( $P < 0.05$ )를 이용하여 각 군의 평균간의 유의성을 검정하였다.

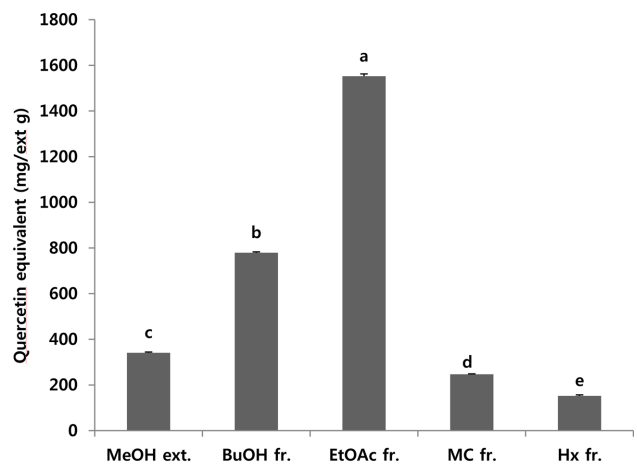
### 결과 및 고찰

산화적 스트레스의 직접적인 원인이 되는 ROS는 불안정하고 반응성이 높아 체내에서 쉽게 반응하여 단백질, 지질, 유전자, 세포 등의 산화적 손상을 통해 체내 여러 조직에 비가역적 손상을 일으키며 이는 만성질환의 원인이 된다.<sup>24)</sup> 따라서, 산화적 스트레스에 방어하기 위해 독성과 부작용이 없는 천연물 유래의 항산화제에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

인체에 무해하고 항산화력이 우수한 천연 식물 유래의 항산화제는 주로 폴리페놀 물질이며, 그 함량이 높을수록 항산화 활성이 높다고 알려져 있다.<sup>18)</sup> 폴리페놀류는 metal chelating activity 및 분자 내 phenolic hydroxy기의 전자 수용을 통해 free radical을 소거하는 능력이 보고되어 있으며, 이를 통해 항산화 효과를 나타낸다.<sup>19)</sup> 본 연구에서 머위 추출 및 분획물의 페놀 함량을 확인하였으며, 페놀 함량은 tannic acid를 기준물질로 하여 측정하였다. 머위 추출 및 분획물의 총 페놀함량을 측정한 결과, EtOAc>BuOH>MeOH>MC>Hx 분획물 순으로 각각 495.35>338.37>218.32>106.06>50.33 mg/g extract의 함량을 나타내어 머위의 EtOAc 분획물에서 가장 높은 함량을 나타냄을 확인하였다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Total phenolic contents of methanol extract and each fraction from *P. japonicas*. Values are mean±SD. <sup>a-c</sup>Means with the different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. MeOH: methanol extract, BuOH: *n*-butanol fraction, EtOAc: ethyl acetate fraction, MC: methylene chloride fraction, Hx: *n*-hexane fraction.



**Fig. 2.** Total flavonoid content of methanol extract and each fraction from *P. japonicas*. Values are mean±SD. <sup>a-c</sup>Means with the different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. MeOH: methanol extract, BuOH: *n*-butanol fraction, EtOAc: ethyl acetate fraction, MC: methylene chloride fraction, Hx: *n*-hexane fraction.

플라보노이드는 폴리페놀에 합성되는 물질로써, 화학적 구조의 차이에 의해 anthocyanidin, catechin, flavonol, flavanone, flavone, isoflavone 등과 같이 분류된다.<sup>20)</sup> 플라보노이드는 free radical을 소거하는 능력을 가지며, 구조에 따라 과산화 지질 생성 억제 등의 효과를 나타내어 항산화 지표로서 이용되고 있다.<sup>21)</sup> 본 실험에서의 플라보노이드 함량은 quercetin을 기준물질로 하여 측정하였다. 머위 추출 및 분획물의 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과, EtOAc>BuOH>MeOH>MC>Hx 분획물 순으로 각각 1552.33>

**Table I.** Superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) scavenging activity of methanol extract and each fraction from *Petasites japonicus*

Sample ( $\mu\text{g/mL}$ )	Scavenging activity (%)			
	5.	10	50	100
MeOH ext.	2.96 $\pm$ 0.38 <sup>c</sup>	6.01 $\pm$ 0.63 <sup>c</sup>	24.90 $\pm$ 0.66 <sup>c</sup>	19.09 $\pm$ 0.79 <sup>c</sup>
BuOH fr.	8.26 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	14.68 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>	39.14 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup>	48.52 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>
EtOAc fr.	8.02 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	15.47 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	47.02 $\pm$ 1.51 <sup>a</sup>	83.44 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
MC fr.	4.55 $\pm$ 1.39 <sup>b</sup>	3.41 $\pm$ 0.40 <sup>d</sup>	2.75 $\pm$ 2.39 <sup>e</sup>	3.80 $\pm$ 0.42 <sup>e</sup>
Hx fr.	2.00 $\pm$ 0.74 <sup>d</sup>	1.35 $\pm$ 0.06 <sup>e</sup>	14.03 $\pm$ 0.66 <sup>d</sup>	12.45 $\pm$ 0.63 <sup>d</sup>
L-ascorbic acid <sup>1)</sup> (IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> , $\mu\text{g/mL}$ )	69.22 $\pm$ 3.34			

Values are mean $\pm$ SD. <sup>a-c</sup>Means with the different letters are significantly different ( $P<0.05$ ) by Duncan's multiple range test. MeOH ext. : methanol extract, BuOH fr. : *n*-butanol fraction, EtOAc fr. : ethyl acetate fraction, MC fr. : methylene chloride fraction, Hx fr. : *n*-hexane fraction. <sup>1)</sup>L-ascorbic acid was used as a positive control. <sup>2)</sup>IC<sub>50</sub> is the concentration of sample required for scavenging radical by 50%.

778.92>341.00>246.38>151.83 mg/g extract의 함량을 나타내어 머위의 EtOAc 분획물이 유의적으로 가장 높은 함량을 나타냄을 확인하였다(Fig. 2).

Superoxide radical( $O_2^-$ )는 ROS의 일종으로 생체 내의 정상적인 대사과정에서 생성될 뿐만 아니라, 생체 구성성분의 자동산화, 효소반응 등에 의하여 생성되며, 체내에서 가장 많이 생성되는 ROS의 일종이다.<sup>22)</sup> 또한,  $O_2^-$ 는 세포 독성에 반응성이 강한  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxynitrite 등의 다른 ROS로 전환되어 직접적 또는 간접적으로 세포손상을 유발시켜 조직을 손상시킨다.<sup>22,23)</sup> 본 연구에서 머위 추출 및 분획물의  $O_2^-$  소거능을 측정한 결과(Table I), BuOH, EtOAc 분획물에서 농도 유의적으로 소거능이 증가하는 경향을 보였으며, 모든 농도에서 EtOAc 분획물이 유의적으로 가장 높은 소거 효과를 나타내었다. 특히 EtOAc 분획물을 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 80% 이상의 높은 소거 효과를 확인하였다. *In vitro*에서 총 페놀 및 플라보노이드 함량,  $O_2^-$  소거능을 확인한 결과 머위 추출 및 분획물 중 EtOAc 분획물이 가장 높은 활성을 나타냄을 확인하였다. 이는 *in vitro*에서 DPPH,  $\cdot\text{OH}$ , NO 소거능을 확인하였을 때 머위의 여러 분획물 중 EtOAc 분획물이 가장 높은 항산화 효과를 내었으며, 특히 EtOAc 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 가장 우수한 소거능을 나타낸 이전의 연구와 일치하는 바이다.<sup>24)</sup>

*In vitro* 상에서 가장 우수한 항산화 활성을 나타내었던 머위의 EtOAc 분획물을 이용하여 LLC-PK<sub>1</sub> cell에서의 Nrf-2 pathway 매개 항산화 유전자 발현을 확인해보았다. 먼저 LLC-PK<sub>1</sub> cell에서 EtOAc 분획물의 세포 독성을 조사하기 위해 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 확인해 보았다(Table II). LLC-PK<sub>1</sub> cell에서 EtOAc 분획물을 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 시료를 처리하지 않은 normal군과 비교하였을 때 세포 생존율에 차이를 나타내지 않았음을 확인하였다. 따라서, EtOAc 분획물이 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않아 세포에 독성을 미치지 않은 것

**Table II.** Effect of the EtOAc fraction from *P. japonicus* on viability of LLC-PK<sub>1</sub> cells

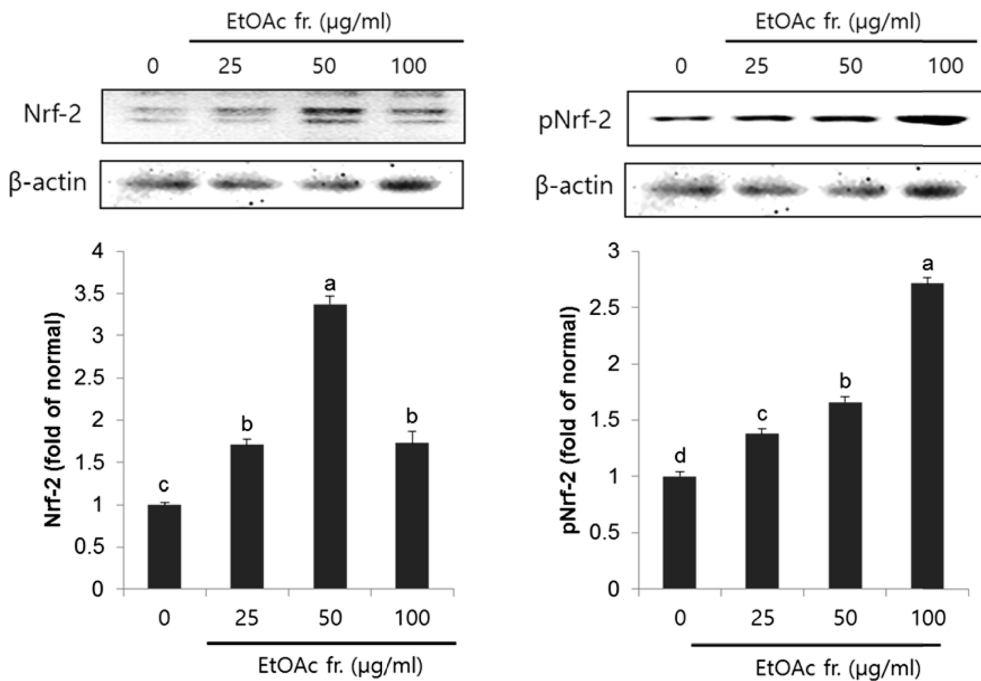
Treatment ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cell viability (%)
25	99.08 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>
50	102.21 $\pm$ 2.99 <sup>a</sup>
100	108.59 $\pm$ 2.24 <sup>b</sup>
Normal	100.00 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>

Values are mean $\pm$ SD. <sup>a-b</sup>Means with the different letters are significantly different ( $P<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

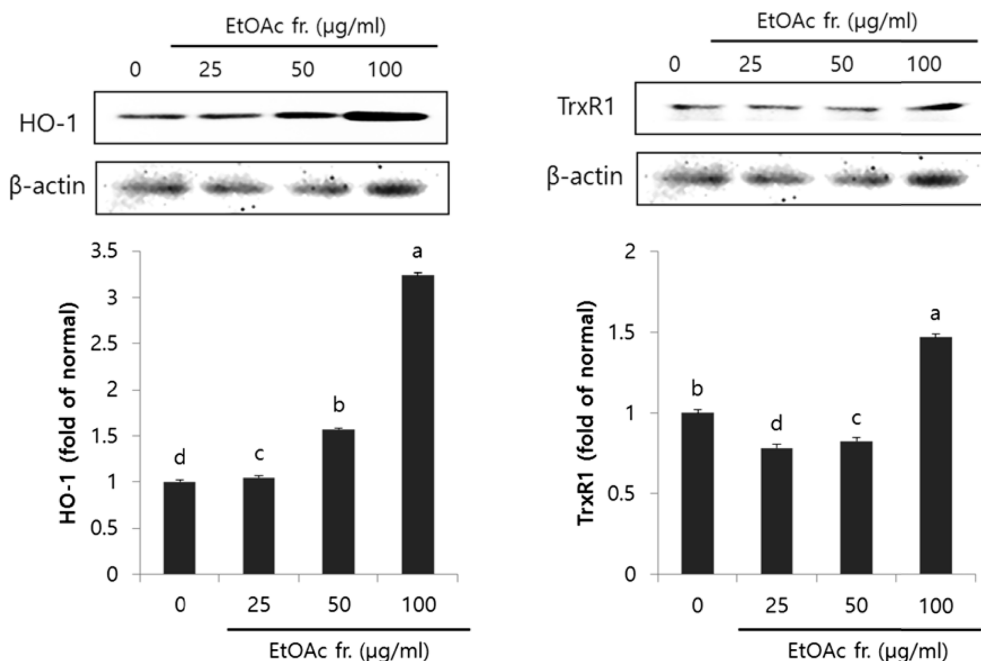
으로 사료되며, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 Nrf-2 pathway 매개 항산화 유전자 발현을 확인해보았다.

Nrf-2는 체내의 산화적 손상이 있을 경우 다양한 항산화 유전자 및 항산화 효소의 발현을 조절하는 전사인자로 산화적 스트레스 방어기전의 핵심적인 역할을 담당한다.<sup>6,25)</sup> 정상적인 체내에서 Nrf-2는 세포질 내에서 kelch-like ECH-associated protein(Keap 1)과 inactive complex의 형태로 존재하지만, 세포가 산화적 손상을 받았을 경우 Keap 1으로부터 분리되어 나와 핵 안으로 이동하게 된다.<sup>25)</sup> 핵 안으로 이동한 Nrf-2는 ARE에 결합함으로써 표적 유전자인 HO-1, TrxR1 등의 항산화 유전자의 전사를 활성화시켜 단백질 발현이 증가시키며, 이들은 산화환원반응 조절을 통해 효과적으로 세포를 보호하며 체내 항산화 시스템의 중심적인 역할을 담당하고 있다.<sup>26,27)</sup> 머위의 EtOAc 분획물을 LLC-PK<sub>1</sub> cell에 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 24시간 배양 후 Nrf-2 발현을 확인해본 결과(Fig. 3), 시료를 처리하지 않은 normal군에 비해 유의적으로 Nrf-2의 발현이 증가하였으며, Nrf-2의 활성형인 pNrf-2의 발현 또한 normal군에 비해 농도 유의적으로 증가한 것을 확인하였다.

인체가 산화적 스트레스로 손상 시 Nrf-2의 핵 내 전사과정으로 인해 발현되는 항산화 인자인 HO-1은 발현 시 세포



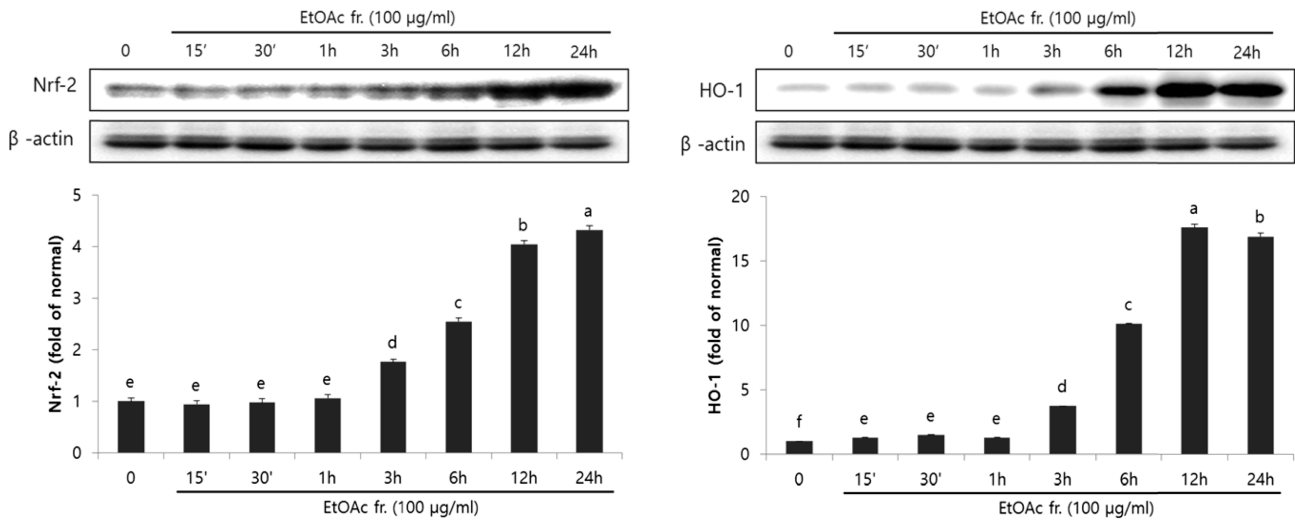
**Fig. 3.** Expression of Nrf-2 and pNrf-2 in LLC-PK<sub>1</sub> cells treated with the EtOAc fraction from *P. japonicus* for 24 h. Values are mean±SD. <sup>a-d</sup>Means with the different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.  $\beta$ -actin was used as a loading control. EtOAc fr.: ethyl acetate fraction.



**Fig. 4.** Expression of HO-1 and TrxR1 in LLC-PK<sub>1</sub> cells treated with the EtOAc fraction from *P. japonicus* for 24 h. Values are mean±SD. <sup>a-d</sup>Means with the different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.  $\beta$ -actin was used as a loading control. EtOAc fr.: ethyl acetate fraction.

내의 heme을 분해하여 biliverdin, 일산화탄소(carbon monoxide; CO), 철(free ion; Fe<sup>2+</sup>)을 생성하고 이는 항산화 및 항염증 등의 작용을 통해 세포의 손상으로부터 보호하

는 강력한 항산화 인자로 알려져 있다.<sup>7,28)</sup> Thioredoxin reductase(TrxRs)는 셀레노단백질로써 산화 환원 반응을 통해 산화된 부위를 환원함으로써 산화적 손상에 대해 세포



**Fig. 5.** Expression of Nrf-2 and HO-1 in LLC-PK<sub>1</sub> cells treated with the EtOAc fraction from *P. japonicus* during 24 h. Values are mean±SD. <sup>a-f</sup>Means with the different letters are significantly different ( $P<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.  $\beta$ -actin was used as a loading control. EtOAc fr.: ethyl acetate fraction.

를 보호하는 역할을 하며, TrxRs의 일종인 TrxR1은 Nrf-2의 전사에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다.<sup>29,30</sup> 머위 EtOAc 분획물을 농도 별로 처리하여 24시간 후 HO-1 및 TrxR1의 발현을 확인해 본 결과(Fig. 4), 시료를 처리하지 않은 normal군에 비해 농도 유의적으로 각 단백질의 발현이 증가하였으며, 특히 EtOAc 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 가장 우수한 발현을 확인하였다.

머위의 EtOAc 분획물을 100  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하여 시간 별로 Nrf-2와 HO-1의 발현을 확인한 결과, 시간이 경과할수록 Nrf-2와 HO-1의 발현이 현저히 증가하는 양상을 나타내어 Nrf-2의 전사에 의해 HO-1의 발현이 증가하는 것으로 사료되며, 특히 12시간 및 24시간 처리 시 가장 뚜렷한 발현을 확인하였다(Fig. 5).

따라서, 본 연구를 통해 머위의 EtOAc 분획물이 LLC-PK<sub>1</sub> cell에서 Nrf-2 전사 활성화를 통해 HO-1, TrxR1과 같은 항산화 단백질 발현을 증가시켜 항산화 활성을 증진시키는 것으로 사료된다. 또한 머위 활성 분획물인 EtOAc 분획물이 가장 높은 페놀 및 플라보노이드 함량을 나타냄을 확인하여 항산화 활성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구에서는 머위의 항산화 효과와 그 작용기전에 관하여 연구하였으며, *in vitro*에서 머위 추출 및 분획물 중 EtOAc 분획물이 가장 높은 항산화 효과를 나타내었다. 항산화 작용기전을 확인하기 위해 LLC-Pk<sub>1</sub> cell에서 Nrf-2 매개 단백질 발현을 확인한 결과, EtOAc 분획물은 Nrf-2의 전사를 통해 HO-1, TrxR1과 같은 항산화 단백질 발현을 확

인하였다. 이상의 결과에서 머위의 EtOAc 분획물은 Nrf-2 pathway를 통해 우수한 항산화 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

## 사사

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2013R1A1A2011228).

## 인용문헌

- Balaban, R. S., Nemoto, S. and Finkel T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**: 483-495.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**: 7915-7922.
- Satoh, T., Enokido, Y., Kubo, T., Yamada, M. and Hatanaka, H. (1998) Oxygen toxicity induces apoptosis in neuronal cells. *Cell Mol. Neurobiol.* **18**: 649-666.
- Maynard, S., Schurman, S. H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N. C. and Bohr, V. A. (2009) Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* **30**: 2-10.
- Ray, P. D., Huang, B. W. and Tsuji, Y. (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* **24**: 981-990.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. (1997) An Nrf2/small Maf

- heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 313-322.
7. Koriyama, Y., Nakayama, Y., Matsugo, S. and Kato, S. (2013) Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2-dependent heme oxygenase-1 induction in the RGC-5 cellline. *Brain Res.* **1499**: 145-157.
  8. 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.
  9. Oh, S. H., Yang, Y. H., Kwon, O. Y. and Kim, M. R. (2006) Effects of diet with added butterbur (*Petasites japonicus* Maxim) on the plasma lipid profiles and antioxidant index of mice. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **16**: 399-407.
  10. 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.
  11. Lee, J. S., Yang, E. J., Yun, C. Y., Kim, D. H. and Kim, I. S. (2011) Suppressive effect of *Petasites japonicus* extract on ovalbumin-induced airway inflammation in an asthmatic mouse model. *J. Ethnopharmacol.* **133**: 551-557.
  12. 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.
  13. Choi, O. B. (2002) Anti-allergic effects of *Petasites japonicum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **15**: 382-385.
  14. Gutfinger T. (1981) Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**: 966-967.
  15. Moreno, M. I., Isla, M. I., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. (2000) Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* **71**: 109-114.
  16. Nishikimi, N., Rao, N. A. and Yagi, K. (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygenin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**: 849-854.
  17. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
  18. Duval, B. and Shetty, K. (2001) The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed anise root extract. *J. Food Biochem.* **25**: 361-377.
  19. Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**: 317-333.
  20. Beecher, G. R. (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutr.* **133**: 3248S-3254S.
  21. Middleton, E. J. and Kandaswami, C. (1994) Potential health promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol.* **48**: 115-119.
  22. Lee, C. H., Yi, H. S., Kim, J. E., Heo, S. K., Cha, C. M., Won, C. W. and Park, S. D. (2009) Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of fractionated extracts of *Smilacis glabrae* rhizome in human umbilical vein endothelial cell. *Kor. J. Herbology* **24**: 39-50.
  23. Kamat, J. P. (2006) Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent. *Indian J. Exp. Biol.* **44**: 436-447.
  24. Wang, Q., Lee, A. Y., Choi, J. M., Lee, D. G., Kim, H. Y., Lee, S. H. and Cho, E. J. (2014) *In vitro* radical scavenging effect and neuroprotective activity from oxidative stress of *Petasites japonicus*. *Kor. J. Pharmacogn.* **45**: 147-153.
  25. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D. and Yamamoto, M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**: 76-86.
  26. Tanito, M., Agbaga, M. P. and Anderson, R. E. (2007) Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and *in vitro*. *Free Radic. Biol. Med.* **42**: 1838-1850.
  27. McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J. D. (2003) Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**: 21592-21600.
  28. Maines, M. D. (1988) Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanism, and clinical applications. *FASEB J.* **2**: 2557-2568.
  29. Sakurai, A., Nishimoto, M., Himeno, S., Imura, N., Tsujimoto, M., Kunimoto, M. and Hara, S. (2005) Transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 expression by cadmium in vascular endothelial cells: role of NF-E2-related factor-2. *J. Cell. Physiol.* **203**: 529-537.
  30. Mustacich, D. and Powis, G. (2000) Thioredoxin reductase. *Biochem. J.* **346**: 1-8.
  31. Matsuura, H., Amano, M., Kawabata, J. and Mizutani, J. (2002) Isolation and measurement of quercetin glucosides in flower buds of Japanese butterbur (*Petasites japonicus* subsp. *gigantea* Kitam.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 1571-1575.
  32. Lee, D. G., Lee, K. H., Park, K. W., Han, C. K., Ryu, B. Y. and Cho, E. J. (2015) Isolation and identification of flavonoids with aldose reductase inhibitory activity from *Petasites japonicus*. *Asian J. Chem.* **27**: 991-994.
  33. Yaoita, Y. and Kikuchi, M. (1994) Petasiphenone, a phenolic compound from rhizomes of *Petasites japonicus*. *Phytochemistry* **37**: 1773-1774.
  34. Tori, M., Kawahara, M. and Sono, M. (1997) Novel epoxyteremophilanoids, eremopetasitenins A1, A2, B1, and B2, from *Petasites japonicus*. *Tetrahedron Lett.* **38**: 1965-1968.
- (2015. 12. 11 접수; 2016. 2. 2 심사; 2016. 2. 22 게재확정)