

## 금불초 추출물의 항산화 효과 및 산화 스트레스에 대한 신경세포 보호작용

이나현 · 홍정일 · 김진영<sup>1</sup> · 장매희<sup>1\*</sup>

서울여자대학교 식품과학부, <sup>1</sup>서울여자대학교 환경생명과학부

### Antioxidant Properties and Protective Effects of *Inula britannica* var. *chinensis* Regel on Oxidative Stress-induced Neuronal Cell Damage

Na Hyun Lee, Jungil Hong, Jin Yung Kim<sup>1</sup>, and Mae-Hee Chiang<sup>1\*</sup>

Division of Food Science, College of Natural Science, Seoul Women's University

<sup>1</sup>Division of Environment and Life Science, College of Natural Science, Seoul Women's University

**Abstract** The antioxidant properties and protective effects of *Inula britannica* on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced SH-SY5Y neuroblastoma cell damage were investigated. A series of solvent fractions, including hexane(Fr.H), petroleum ether, chloroform, ethyl acetate(Fr.EA), and water fraction(Fr.W), were prepared from the 70% methanol extracts of *Inula britannica*. Fr.W had the highest total contents of phenolics and flavonoids, followed by Fr.EA. The antioxidant properties of the fractions were also evaluated by analyzing their scavenging activities on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radicals, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radicals, and nitric oxide. Fr.W showed the strongest activities in all assays. The concentrations of Fr.W that resulted in 50% reductions of the DPPH and ABTS radicals were 20.7 µg/mL and 39.4 µg/mL, respectively. Fr.W showed the weakest cytotoxic activities on the SH-SY5Y cells, whereas it effectively protected H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death, increasing cell survival by 35.0-77.0% at a concentration range of 62.5-250 µg/mL. In this range, Fr.W also significantly decreased intracellular ROS levels by 34-39%. Overall, the antioxidant properties of *Inula britannica* can contribute to rescuing neuronal cells from oxidative stress-induced cell injury.

**Key words:** *Inula britannica*, polyphenol, reactive oxygen species, neuroprotective effect, SH-SY5Y

## 서 론

금불초(*Inula britannica* var. *chinensis* Regel)는 국화과(Compositae)에 속하는 여러해살이풀로 우리나라 전역과 일본, 중국, 내몽고, 소련에 분포한다. 습기를 잘 견디고 건조한 곳에서 잘 자라 재배하기 쉽다. 땅속줄기가 발달하여 퍼지고 줄기는 곧게 자라며 잎은 끝이 뾰족한 타원형이다. 7-9월에 지름 3-4 cm의 노란색 꽃이 피는데 한방에서는 금불초의 꽃을 말린 것을 선복화라고 하여 약으로 쓰이며 이는 거담, 진해, 건위, 진토, 진정 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 어린순은 나물 또는 국거리 등의 식용으로 이용된다(1-3).

금불초에 관한 연구로는 추출 essential oil에 대한 성분 분석(4), chloroform 추출물에서 분리된 taraxasteryl acetate의 간보호 효과(5), 선복화로부터 분리된 sesquiterpene lactone류의 암세포 사멸유도 효과(6,7), nitric oxide synthase와 cyclooxygenase-2의 억제능(8,9), glutamate에 의해 유도된 뇌세포 괴사에 대한 보호능(10), 자가면역성 당뇨에 대한 보호능(11) 등이 있다. 금불초 활성성분으로 *O,O*-diacetylbritannilactone, *O*-acetylbritannilactone 등의 ses-

quiterpene류가 밝혀졌으며(7) 그 외에 *n*-BuOH 추출물에서 분리된 patuletin, nepetin, axillarin 등의 flavonoids에 대한 활성도 보고 되어 있다(10).

활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 세포가 에너지를 얻기 위해 유산소 호흡을 할 때 필연적으로 생겨난다. ROS의 예로는 superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등이 있으며, 이들은 매우 반응성이 크기 때문에 세포막 분해, 단백질 분해, 지방 산화, DNA 손상 및 합성 억제 등을 유발시켜 세포 손상을 준다(12,13). ROS의 형성으로 인한 산화적 스트레스는 생체 내의 방어기작인 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화효소에 의하여 억제되지만, 식이 항산화 성분의 섭취에 의해서도 효과적으로 방어될 수 있다. 따라서 폴리페놀류와 같은 항산화능이 높은 천연 기능성 식이성분에 대한 탐색과 효능 검증에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 특히 ROS의 증가로 인한 산화적 손상이 퇴행성 뇌질환을 일으키는 주요한 원인으로 밝혀짐에 따라 항산화력 또는 유리라디칼 소거능을 가진 물질을 이용하여 알츠하이머병과 같은 질병을 예방하기 위한 연구가 활발히 진행 중에 있다(14). 이와 관련하여 glutamate로 유도된 산화적 스트레스에 대한 제비꽃 추출물에 대한 보호 효과(15), 석곡 추출물의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 보호 효과(16), 녹차 추출물의 산화적 스트레스에 대한 억제 효과(17) 등이 신경세포를 모델로 하여 연구된 바 있다.

기존의 연구를 통하여 glutamate에 의해 유도된 rat의 대뇌피질 세포 손상에 대한 금불초 성분의 보호 효과가 발표된 바 있으나(10), 본 연구에서는 금불초의 항산화 효과와 신경세포의 산화적

\*Corresponding author: Mae-Hee Chiang, Division of Environment and Life Science, College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 139-774  
Tel: 82-2-970-5617  
Fax: 82-2-970-5973  
E-mail: mhchiang@swu.ac.kr  
Received September 12, 2008; revised November 6, 2008; accepted November 9, 2008

손상에 대한 보호능 사이의 연관성을 평가하기 위하여  $H_2O_2$ 에 의한 직접적인 산화적 스트레스를 유발하고, 특히 산화적 손상에 민감한 인간 뉴런기원의 신경모세포 모델을 사용하였다. 이를 위하여 금불초 지상부위를 70% MeOH로 침출시킨 후 hexane, petroleum ether, chloroform, ethyl acetate를 이용하여 분획하고 hexane, ethyl acetate, water 분획물의 항산화 특성과  $H_2O_2$ 에 의해 유도된 SH-SY5Y 세포의 사멸에 대한 보호 효과를 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 실험재료

금불초는 강원도 동해의 한약상에서 구입하였다. 시료의 수확 시기는 9-10월경이며 뿌리와 꽃이 제거된 건조상태의 지상부위를 2007년 2월에 구입하였다. 총 폴리페놀/플라보노이드 함량 측정과 항산화 실험에 사용된 Folin-Ciocalteu's phenol 시약은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였고,  $AlCl_3$ 은 Junsei(Tokyo, Japan)에서, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltertrazolium bromide (MTT)는 Amresco Inc.(Solon, OH, USA)에서 구입하였다. 신경모세포주 SH-SY5Y는 한국세포주은행(Korea cell line bank, Seoul, Korea)으로부터 분양받았고 세포 배양에 사용된 배지 및 항생물질은 Hyclone(Logan, UT, USA)에서, fetal bovine serum은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 이외에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich 제품 및 일반 특급시약을 사용하였다.

### 추출물의 제조 및 분획

금불초 지상부위를 증류수로 세척 후 70% 메탄올을 이용하여 상온에서 24시간씩 2회 침출시켰다. 이 침출액을 회전식 감압 농축기(Rotary Evaporator N-1000, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 잔여 분산층에 동량의 hexane을 가하여 3회 추출하고 이행층을 농축 건조하여 핵산 분획(Fr.H)을 얻었다. 이어서 같은 방법으로 petroleum ether, chloroform, ethyl acetate의 차례로 분획을 실시하여 petroleum ether, chloroform, ethyl acetate(Fr.EA) 분획을 얻은 후 감압농축하여 건조시켰고 마지막에 남은 물분획층(Fr.W)은 동결건조기(Labconco Co., Kansas city, MO, USA)를 이용하여 건조시켰다. 미량의 시료가 얻어진 petroleum ether 및 chloroform 분획을 제외한 각 3 분획은 100 mg/mL 농도로 dimethyl sulfoxide에 녹여 등분한 후,  $-80^\circ C$  초저온냉동고(DF8520, Ilshin lab., Yangju, Korea)에 저장하여 사용하였다.

### 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(18)에 의하여 측정하였다. 각 추출물 시료 80  $\mu L$ 에 2%  $Na_2CO_3$  100  $\mu L$ 를 가한 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 이 반응에 50% Folin-Ciocalteu's phenol 시약 20  $\mu L$ 를 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 microplate reader (Spectra Max 250, Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 농도를 달리한 (+)-catechin으로 표준검량곡선을 작성하여 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

### 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Jia 등(19)의 방법을 변형하여 실행하였다. 각 추출물의 시료 50  $\mu L$ 에 30  $\mu L$ 의 5%  $NaNO_2$ 를 가하여 5분간 상온에서 방치한 후 60  $\mu L$ 의 2%  $AlCl_3$ 를 더하여 6분간 두었다. 이후 4%  $NaOH$  100  $\mu L$ 를 첨가하여 11분간 반응시킨 다음 microplate reader를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

농도를 달리한 (+)-catechin으로 표준검량곡선을 작성하여 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

### 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거 활성

DPPH radical 소거활성은 DPPH radical에 대한 시료의 환원력으로 측정하였다(20). 각 추출물 시료 100  $\mu L$ 와 600  $\mu M$  DPPH methanol 용액 100  $\mu L$ 를 혼합하여 상온의 암소에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical 소거 활성

ABTS radical 소거활성은 Dewanto 등(21)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 ABTS와 potassium persulfate를 각각 7.4 mM과 2.6 mM의 최종농도가 되도록 혼합한 후,  $37^\circ C$ 의 암소에서 24시간 방치하여 ABTS radical을 형성시켰다. 이를 증류수 처리한 대조구의 흡광도가 517 nm에서  $0.9 \pm 0.1$ 이 되도록 10 mM phosphate buffer saline(PBS)로 희석한 후, 추출물 시료 50  $\mu L$ 에 희석한 ABTS radical solution을 150  $\mu L$  가하여 상온의 암소에서 30분간 반응시켰다. 흡광도는 517 nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다.

### Nitric oxide 소거 활성

추출물 시료 50  $\mu L$ 에 100  $\mu M$   $NaNO_2$  100  $\mu L$ 를 가한 후  $37^\circ C$ 의 암소에서 1시간 반응시켰다. 여기에 5%  $H_3PO_4$ 로 희석한 1% sulfanilamide를 50  $\mu L$  가하고 빛을 피해 암소에서 5분간 다시 반응시켰다. 이후 0.1% *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride를 50  $\mu L$  가하고 10분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(22). Nitric oxide 소거능은 비침가구의 흡광도에 대한 시료 침가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 환산하여 나타내었다.

### SH-SY5Y 세포주 배양 및 hydrogen peroxide에 의한 세포사멸 보호능

SH-SY5Y 신경모세포종은 DMEM medium에 10% FBS와 50 U/mL의 penicillin/streptomycin이 첨가된 배지를 사용하여  $37^\circ C$ , 5%  $CO_2$ 가 유지되는 incubator에서 배양하였다. 세포에 대한 각 추출 분획 및  $H_2O_2$ 의 독성, 각 분획의  $H_2O_2$ 로부터의 세포 손상 보호능은 MTT를 이용하여 측정하였다. 세포를 96 well plate에 접종한 후 70-80% confluency가 되었을 때, 각 농도별로 금불초 추출 분획을 2시간 처리한 후 이를 걷어내고 500  $\mu M$   $H_2O_2$ 가 함유된 배양액으로 교체하여 2시간 더 처리하였다. 이어서 성장배지로 교체하여 18시간 배양한 후 0.5 mg/mL의 MTT를 약 2시간 처리하여 생성된 MTT formazan을 dimethyl sulfoxide에 용해시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출 분획 및  $H_2O_2$ 의 단독 처리에 의한 독성은 위의 순서에 따르되 추출 분획 또는  $H_2O_2$ 만을 농도별로 2시간 처리하여 분석하였다.

### 세포 내 ROS 측정

세포 내 ROS 측정은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)가 세포 내로 투과된 후 아세틸기가 유리된 2',7'-dichlorofluorescein(DCFH)의 형태에서 ROS와 반응하여 형광물질을 생성하는 성질을 이용하였다. SH-SY5Y 세포를 96 well plate에 well당 약 8,000 cell이 되도록 접종하여 배양한 후 70-80% confluency가 되었을 때 각 금불초 추출 분획을 PBS에 녹여 30분간 처리하였다. 이를 걷어낸 후 10  $\mu M$  DCFH-DA로 다시 40분간 처리한 후 fluorescence microplate reader(Triad LT, Dynex Technologies,

**Table 1. Total polyphenol and flavonoid contents of solvent fractions from *Inula britannica***

Fractions of <i>Inula britannica</i> var. <i>chiensis</i> Regel	Total polyphenols <sup>1,2)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ solid)	Abs at 285 nm (at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Total flavonoids <sup>1,2)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ solid)
Fr.H <sup>3)</sup>	13.76 $\pm$ 1.47	0.105	26.73 $\pm$ 1.17
Fr.EA <sup>3)</sup>	125.95 $\pm$ 4.64	0.208	62.07 $\pm$ 0.70
Fr.W <sup>3)</sup>	318.10 $\pm$ 20.62	0.477	335.87 $\pm$ 6.02

<sup>1)</sup>Microgram of contents/mg of extracts based on (+)-catechin as a standard.

<sup>2)</sup>Data indicate means  $\pm$  S.D.

<sup>3)</sup>Fr.H, Fr.EA, and Fr.W represent hexane, ethylacetate, and water fraction, respectively.

Chantilly, VA, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 형광을 측정하였다(23).

## 결과 및 고찰

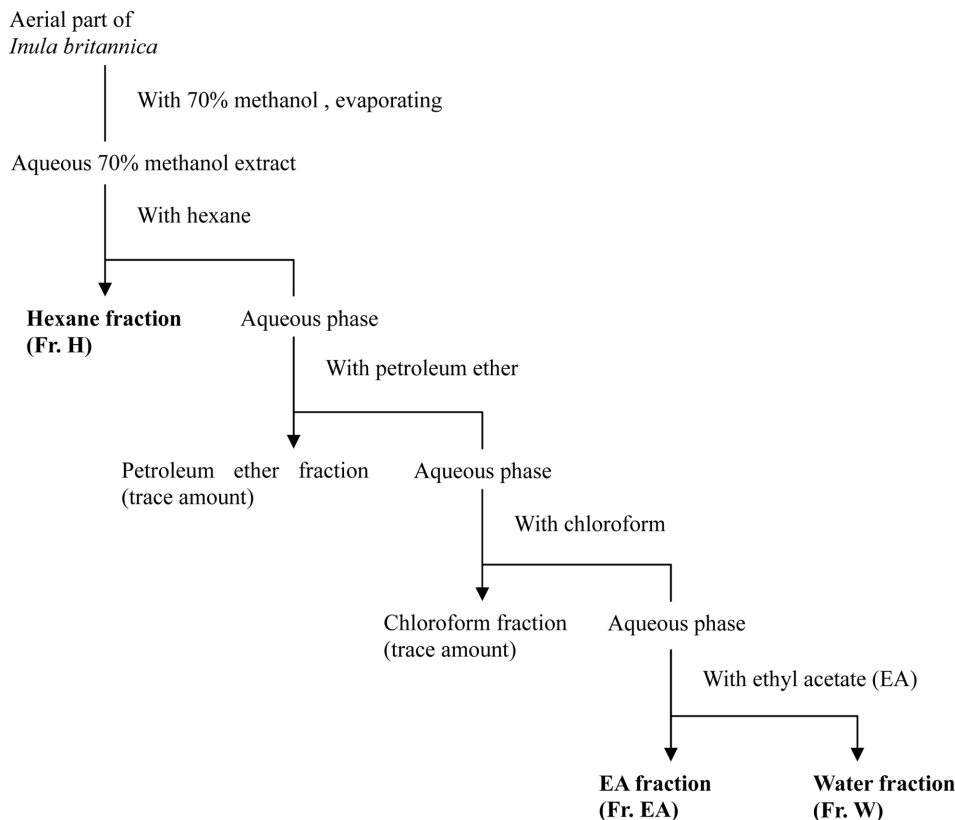
### 총 폴리페놀/플라보노이드 함량

폴리페놀성 물질은 수산기를 통한 수소공여와 페놀 고리구조의 공명구조 안정화로 인하여 항산화 활성을 나타낸다(24). 금불초 추출물의 각 분획 별 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 (+)-catechin을 표준물질로 계산하여 Table 1에 나타내었다. 총 폴리페놀 함량은 Fr.W에서 mg solid당 318.10 $\pm$ 20.62  $\mu\text{g}$ 으로 가장 높았으며 다음으로 Fr.EA이 125.95 $\pm$ 4.64  $\mu\text{g}$ , Fr.H이 13.76 $\pm$ 1.47  $\mu\text{g}$  순이었다. 항산화성 물질인 phenol, aromatic amine, 단백질 등에 의한 흡수가 주로 일어나는 285 nm 파장의 흡광도를 측정하였을 때(25) 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 Fr.W의 흡광도는 0.477이었고 같은 농도의 Fr.H와 Fr.EA에 비해 각각 4.5배, 2.3배 높았다. 일반적으로 추출물의 용매 분획시 폴리페놀류는 중간극성의 용매층에서 높은 함량을 나타내는 것으로 알려져 있으나 본 금불초 시료의

경우 물 분획층에서 폴리페놀 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. Park 등(26)의 보고에 의하면 금불초의 *n*-BuOH 추출물에서 항산화능을 보이는 12가지 플라보노이드 배당체가 분리되었는데, Fr.W에 이러한 극성 플라보노이드 배당체나 수용성 폴리페놀류가 다량으로 존재하는 것으로 사료된다.

### 항산화 효과

금불초 추출물의 항산화 효과는 DPPH radical, ABTS radical에 대한 소거능과 nitric oxide 소거능을 근거로 평가하였다. Fr.W와 Fr.EA는 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 69.1%와 18.9%의 DPPH radical 소거능을 보였고 Fr.H의 경우 활성을 나타내지 않았다(Fig. 2A). 상대적으로 높은 활성을 나타내는 Fr.W를 ascorbic acid와 농도별로 비교하여 IC<sub>50</sub>(radical을 50% 저해하는 농도)를 계산하였을 때 Fr.W는 20.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ascorbic acid는 8.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났고 동량의 ascorbic acid에 비해 약 40%의 radical 소거활성을 보유하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 2B). 금불초 추출물의 ABTS radical의 소거능은 농도 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 Fr.W이 45.3%로, 19.4%의 활성을 보인 Fr.EA에 비하여 2.3배의 활성도가 높았다. 한편 Fr.H



**Fig. 1. A scheme for solvent fractionation of extracts from *Inula britannica*.**

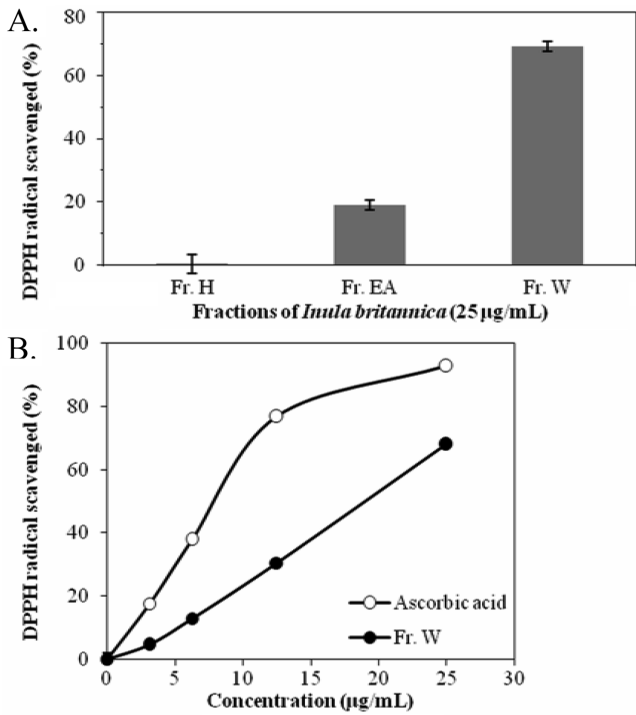


Fig. 2. DPPH radical scavenging activities of solvent fractions from *Inula britannica* at 25 µg/mL (A) and concentration-dependent activities of Fr.W (●) or ascorbic acid (○) (B). Fr.H, Fr.EA, and Fr.W represent hexane, ethylacetate, and water fraction, respectively. Each value represents the mean ± S.D. (n = 3).

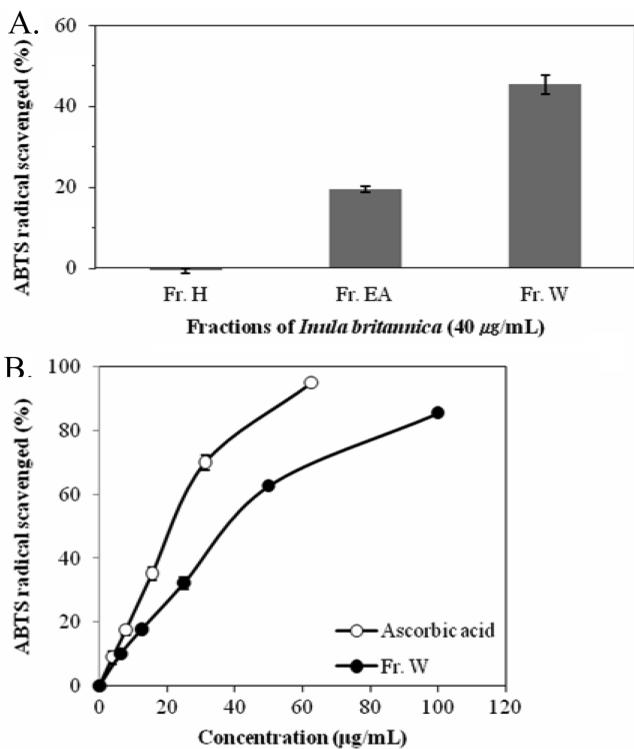


Fig. 3. ABTS radical scavenging activities of solvent fractions from *Inula britannica* at 40 µg/mL (A) and concentration-dependent activities of Fr. W (●) or ascorbic acid (○) (B). Fr.H, Fr.EA, and Fr.W represent hexane, ethylacetate, and water fraction, respectively. Each value represents the mean ± S.D. (n = 3).

의 경우 40 µg/mL에서 ABTS radical의 소거 활성을 나타내지 않았다(Fig. 3A). ABTS radical에 대한 IC<sub>50</sub>값은 Fr.W가 39.4 µg/mL로, ascorbic acid(22.3 µg/mL)와 비교하였을 때 약 56%의 활성을 보였다(Fig. 3B). Nitric oxide에 대한 소거능은 농도 40 µg/mL에서 Fr.W, Fr.EA이 각각 81.1%, 25.8%을 나타내었고, Fr.H도 10.1%

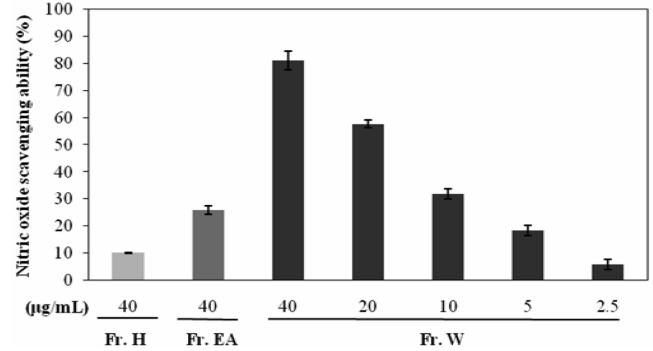


Fig. 4. Nitric oxide scavenging activities of solvent fractions from *Inula britannica* at 40 µg/mL. Fr.H, Fr.EA, and Fr.W represent hexane, ethylacetate, and water fraction, respectively. Each value represents the mean ± S.D. (n = 3).

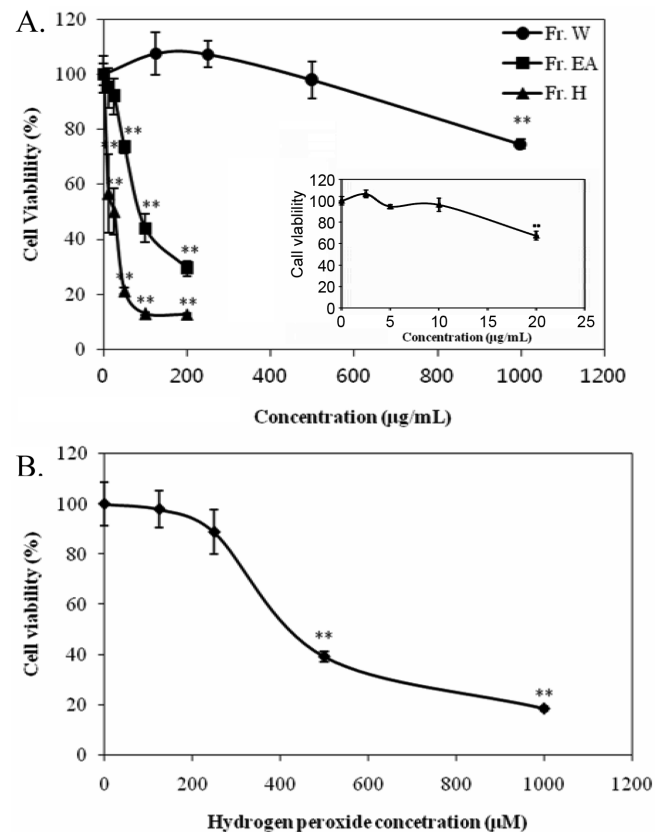


Fig. 5. Concentration-dependent effects of *Inula britannica* fractions (A) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) on SH-SY5Y cell growth. Effects of Fr.H below 20 µg/mL were also shown in box (A). Cells were treated with each fraction or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as indicated in material and methods. Viable cells were analyzed using the MTT assay. Fr.H, Fr.EA, and Fr.W represent hexane, ethylacetate, and water fraction, respectively. The result represents the mean±S.D. (n = 4). \*\*Significantly different from control (\*p<0.05; \*\*p<0.01).

의 약한 활성을 보였다(Fig. 4). 이상의 결과는 각 분획물의 총 폴리페놀, 플라보노이드 물질의 함량과 일관된 경향을 나타내는 것으로서 금불초의 폴리페놀류 및 플라보노이드류 등이 이러한 radical 소거능의 주요 역할을 하는 것으로 보인다.

#### 금불초 추출물 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 SH-SY5Y 세포에 대한 독성 평가

SH-SY5Y 신경모세포종에 대한 금불초 추출물 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 독성은 이들을 각각 2시간 처리한 후 다시 성장배지로 환원하여 18시간 후에 측정하였다. 금불초 분획 중 Fr.H의 세포 독성이 가장 높았고 약 25 µg/mL의 농도에서 50% 정도의 세포사멸을 유도하였다. Fr.EA는 약 100 µg/mL에서 50% 세포사멸을 유도하였고 Fr.W

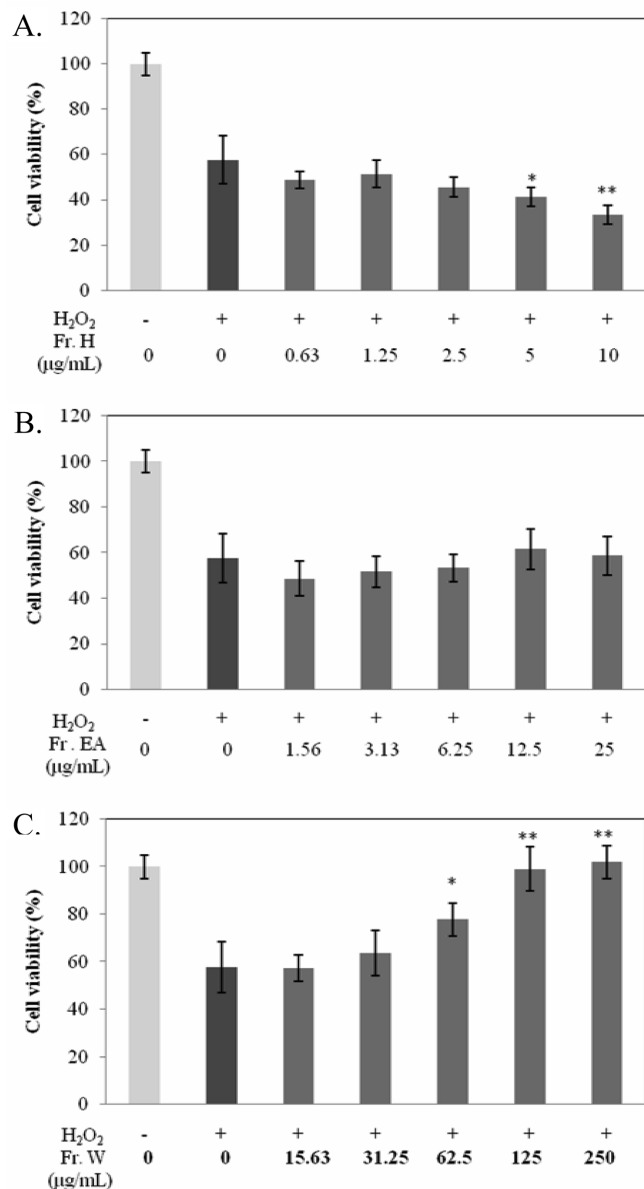
의 경우 500 µg/mL 농도까지 세포에 대한 뚜렷한 독성을 나타내지 않았다(Fig. 5A). 따라서 세포독성을 야기하는 금불초의 주요 성분들은 극성 폴리페놀류 성분보다는 유기용매 층의 비극성 물질들로 사료된다. 한편 SH-SY5Y 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하였을 때 농도의존적인 세포독성을 나타내었으며 500 µM에서 약 40-50%의 세포생존율을 보였다(Fig. 5B).

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 SH-SY5Y 세포독성에 대한 보호효과

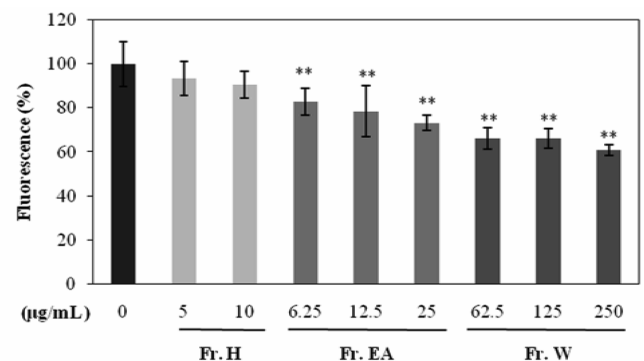
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 SH-SY5Y 세포독성에 대한 금불초 추출물의 보호 효과는 선행실험(Fig. 5A) 상에서 독성을 나타내지 않은 농도범위의 시료를 처리하여 측정하였다. 각 분획물을 2시간 선 처리한 세포에 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 2시간 노출시켜 세포 독성을 유도하고 정상성장배지로 교체하여 18시간 배양한 후 세포생존율의 차이를 평가하였다. 다른 분획들에 비하여 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량, 항산화능이 가장 높고 독성이 낮았던 Fr.W이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 SH-SY5Y 신경모세포종의 독성에 대한 현저한 보호 효과를 나타내었다. Fr.W는 동일 조건하의 대조구에 비교하였을 때 62.5 µg/mL 농도에서 35.0%의 세포 사멸을 억제하여 유의적인 보호 효과를 나타내었으며, 125 µg/mL 및 250 µg/mL 농도에서는 각각 71.7%, 77.0%의 세포 사멸을 억제하였다(Fig. 6C). 한편 독성을 나타내지 않는 범위 내에서 Fr.H과 Fr.EA는 SH-SY5Y 세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과를 나타내지 않았다. 오히려 Fr.H의 경우 단독처리에 독성을 나타내지 않았던 5 µg/mL, 10 µg/mL 농도에서도 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리시 대조구에 비하여 각각 28.6% 및 42.2% 세포 사멸을 증가시켰다(Fig. 6A). Kim 등(10)은 *n*-BuOH 추출물에서 분리한 극성 flavonoids가 glutamate로 유도된 대뇌피질 세포괴사에 대한 보호 효과를 보고하였는데, 이와 유사하게 본 연구에서도 Fr.W에 다량 함유된 수용성 폴리페놀류, 플라보노이드 성분들이 신경모세포종의 산화적 손상에 대한 세포 보호 효과를 나타내는 것으로 보인다.

#### 금불초 추출물에 의한 세포내 ROS 감소

DCFH-DA는 세포 내로 비교적 자유롭게 투과되어 세포내 esterase에 의해 DCFH로 전환된다. DCFH는 세포 투과성이 낮아 세포 내에 축적되며 세포내 ROS가 존재할 경우 이와 반응하여 형광물질로 전환된다. Fig. 7은 각 금불초 추출물을 30분간 선



**Fig. 6.** Concentration-dependent effects of Fr.H (A), Fr.EA (B), or Fr.W (C) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced SH-SY5Y cell death. Cells were treated with different concentrations of each fraction and 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as described in materials and methods. Viable cells were analyzed using the MTT assay. Fr.H, Fr.EA, and Fr.W represent hexane, ethylacetate, and water fraction, respectively. Each value represents the mean±S.D. (n=4). \*\*Significantly different from control (\*p<0.05; \*\*p<0.01).



**Fig. 7.** Effects of *Inula britannica* fractions on SH-SY5Y intracellular ROS level. Cells were treated with different concentrations of each fraction for 30 min and the medium was replaced with one containing 10 µM DCFH-DA. Data represents the mean±S.D. (n=6). Fr.H, Fr.EA, and Fr.W represent hexane, ethylacetate, and water fraction, respectively. The results indicate the percent units of the fluorescence intensity in cells treated with each fraction as compared with control. \*\*Significantly different from control (\*p<0.05; \*\*p<0.01).

리 한 후 SH-SY5Y 세포 내의 ROS량에 미치는 영향을 DCFH-DA를 이용하여 측정한 결과를 나타낸 것이다. Fr.W와 Fr.EA는 각각 62.5 및 6.25 µg/mL의 농도로부터 유의적으로 세포내 ROS를 감소시켰으며 5와 10 µg/mL Fr.H를 처리한 구에서는 유의적인 ROS의 감소가 나타나지 않았다. Fr.W를 62.5, 125, 250 µg/mL로 처리한 세포에서는 대조구(100%)에 비하여 세포내에 각각 66.2%, 66.2%, 60.8%의 ROS 수준을 나타내었으며, Fr.EA의 경우 25 µg/mL 농도에서 최대 26.8%의 세포 내 ROS를 감소시켰다. 이상의 결과는 금불초 분획물의 폴리페놀 함량 및 항산화 활성이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 신경모세포종의 세포사멸 보호능 및 세포 내 ROS 소거능과 상관관계를 갖고 있으며, 이러한 활성이 ROS에 의해 야기되는 뇌세포 사멸에 대한 보호 작용에 공헌할 수 있음을 시사한다. 한편 보다 구체적인 활성성분의 화학적 특성 및 극성 물질로서의 생체이용률에 대한 한계점들을 극복하기 위한 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

### 요 약

본 연구에서는 금불초(*Inula britannica*) 추출물의 항산화 효과와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로부터 유도된 SH-SY5Y 신경모세포종의 세포독성에 대한 보호능을 측정하였다. 금불초 지상부위의 70% 메탄올 추출물에 대하여 용매별로 분획을 실시하였고 핵산(Fr.H), 에틸아세테이트(Fr.EA) 및 물(Fr.W) 분획에 대하여 활성을 조사하였다. 분획 중 Fr.W의 폴리페놀/플라보노이드 함량이 가장 높았으며 Fr.W의 총 폴리페놀 함량은 318.1±20.6 µg/mg solid로, Fr.EA 및 Fr.H와 비교하여 각각 약 2.5배, 23.1배 수준이었다. DPPH radical, ABTS radical 및 nitric oxide 소거능 등의 항산화 활성에서도 Fr.W가 가장 높은 활성을 나타내었고 Fr.H는 거의 활성을 나타내지 않았다. Fr.W는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 세포사멸에 대하여 62.5 µg/mL 농도에서 현저하게 세포독성을 감소시켰으며 250 µg/mL에서는 77.0%의 세포사멸 억제능을 보였다. Fr.EA는 보호 효과를 나타내지 않았으며 Fr.H는 오히려 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 인한 세포 독성을 증가시키는 것으로 나타났다. 세포 내 ROS에 대한 영향으로 Fr.W 250 µg/mL 처리시 39.2% 세포내 ROS를 감소시켰으며 Fr.EA는 25 µg/mL에서 26.8%의 세포내 ROS를 소거하였다. 이러한 금불초 Fr.W의 항산화 활성은 ROS에 의해 야기되는 뇌세포 독성에 대한 보호 작용에 공헌할 수 있을 것으로 예상된다.

### 감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 연구비 지원(KRF 2006-311-F00054)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문 헌

1. Lee YM. Hankuk eui yasenghwa (Korean wild plants). Dareunsesang, Seoul, Korea. pp. 245-248 (2003)
2. Song KY. Yasenghwa shypge chatgi (Convenient searching for wild plants). Jinsun corp., Seoul, Korea. pp. 355 (2003)
3. Encyber. *Inula britannica* var. *chinensis*. Available from: <http://www.encyber.com>. Accessed Aug. 11, 2008.
4. Zha J, Fu Y, Wu Y, Guo C, Zhang D, Wang Y. Study of chemical constituents of the essential oil from *Inula britannica* L. by GC-MS. *Zhong Yao Cai*. 28: 466-468 (2005)
5. Iijima K, Kiyohara H, Tanaka M, Matsumoto T, Cyong JC, Yamada H. Preventive effect of taraxasteryl acetate from *Inula britannica*

- subsp. *japonica* on experimental hepatitis *in vivo*. *Planta Med*. 61: 50-53 (1995)
6. Park EJ, Kim J. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Inula britannica*. *Planta Med*. 64: 752-754 (1998)
7. Rafi MM, Bai NS, Ho CT, Rosen RT, White E, Perez D, Dipaola RS. A sesquiterpenelactone from *Inula britannica* induces anti-tumor effects dependent on Bcl-2 phosphorylation. *Anticancer Res*. 25: 313-318 (2005)
8. Han WJ, Lee BG, Kim YK, Yoon JW, Jin HK, Hong S, Lee HY, Lee KR, Lee HW. Ergolide, sesquiterpene lactone from *Inula britannica*, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages through the inactivation of NF-kappa B. *Brit. J. Pharmacol*. 133: 503-512 (2001)
9. Han M, Wen JK, Zheng B, Zhang DQ. Acetylbritannilactone suppresses NO and PGE<sub>2</sub> synthesis in RAW 264.7 macrophages through the inhibition of iNOS and COX-2 gene expression. *Life Sci*. 75: 675-684 (2004)
10. Kim SR, Park MJ, Lee MK, Sung SH, Park EJ, Kim J, Kim SY, Oh TH, Markelonis GJ, Kim YC. Flavonoids of *Inula britannica* protect cultured cortical cells from necrotic cell death induced by glutamate. *Free Radical Bio. Med*. 32: 596-604 (2002)
11. Kobayashi T, Song QH, Hong T, Kitamura H, Cyong JC. Preventive effects of the flowers of *Inula britannica* on autoimmune diabetes in C57B/KsJ mice induced by multiple low doses of streptozotocin. *Phytother. Res*. 16: 377-382 (2002)
12. McKee T, McKee JR. *Biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. McGraw-Hill, New York, NY, USA. pp. 319-325 (2002)
13. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J. Food Sci. Technol*. 37: 233-240 (2005)
14. Huang SH, Lin CM, Chiang BH. Protective effects of *Angelica sinensis* extract on amyloid beta-peptide-induced neurotoxicity. *Phytomedicine* 15: 710-721 (2008)
15. Choi WH, Oh YS, Ahn JY, Kim SR, Ha TY. Antioxidative and protective effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* extracts on glutamate-induced cytotoxicity in PC 12 cells. *Korean J. Food Sci. Technol*. 37: 479-483 (2005)
16. Yoon MY, Kim JY, Hwang JH, Cha MR, Lee MR, Jo KJ, Park HR. Protective effect of methanolic extracts from *Dendrobium nobile* Lindl. on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*. 50: 63-67 (2007)
17. Kim NY, Lee JH, Heo MY. Protective effect of green tea extracts on oxidative stress. *Korean J. Med. Crop Sci*. 14: 322-328 (2006)
18. Hong JI, Kweon MH, Ra KS, Sung HC, Yang HC. Free radical scavenging activities and inhibitory effects on xanthine oxidase by ethanol extract from *Capsella bursa-pastoris*. *Agr. Chem. Biotechnol*. 38: 590-595 (1995)
19. Jia Z, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 64: 555-559 (1999)
20. Blios MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1203 (1958)
21. Dewanto V, Wu X, Liu RH. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. Agr. Food Chem*. 50: 4959-4964 (2002)
22. Gray JI, Dugan LR. Inhibition of *N*-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci*. 40: 981-984 (1975)
23. Xie JT, Shao ZH, Vanden Hoek TL, Chang WT, Li J, Mehendale S, Wang CZ, Hsu CW, Becker LB, Yin JJ, Yuan CS. Antioxidant effects of ginsenoside Re in cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol*. 532: 201-207 (2006)
24. Kim NM, Sung HS, Kim WJ. Effect of solvents and some extraction conditions on antioxidant activity in cinnamon extracts. *Korean J. Food Sci. Technol*. 25: 204-209 (1993)
25. Kim HY, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Jeong HS. Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. *Korean J. Food Sci. Technol*. 40: 166-170 (2008)
26. Park EJ, Kim Y, Kim J. Acylated flavonol glycosides from the flower of *Inula britannica*. *J. Nat. Prod*. 63: 34-36 (2000)