

자색고구마 신자미로부터 분리한 안토시아닌 분획물의 항산화 활성과 산화스트레스에 대한 간세포 보호 효과

§장환희 · §남송이 · 김미주 · 김정봉 · 김행란 · †이영민*
농촌진흥청 국립농업과학원 기능성식품과

Antioxidant Activity and Protective Effects of Anthocyanins-Rich Fraction from Korean Purple Sweet Potato Variety, “Shinjami” against Oxidative Stress in HepG2 Cell

§Hwan Hee Jang, §Song Yee Nam, Mi Ju Kim, Jung Bong Kim,
Haeng Ran Kim and †Young Min Lee*

Functional Food & Nutrition Division, Department of Agro-Food Resources, National Academy of Agricultural Science,
Rural Development Administration, Wanju 565-851, Korea

Abstract

Anthocyanins, a class of flavonoids, are natural water-soluble pigments, which are mainly found in vegetables and fruits. Anthocyanins have attractive pharmacological activities, such as anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, and anti-diabetic. The purpose of this study was to investigate the protective effects of anthocyanins-rich fraction (ANF) from Korean purple sweet potato variety, “Shinjami”, against hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress. In our results, pre-treatment of HepG2 cells with ANF (10 µg/mL) significantly prevented cell death and maintained cell integrity, following exposure to 0.9 mM hydrogen peroxide. The H₂O₂-dependent production of intracellular ROS was also significantly decreased by pre-treatment with ANF (6 h, 10 µg/mL). In addition, ANF increased the mRNA levels of antioxidant enzymes, catalase and glutathione level in H₂O₂-treated HepG2 cells. These results indicated that ANF protected HepG2 cells against H₂O₂-induced oxidative stress by inducing protective system.

Key words: anthocyanin, flavonoid, purple sweet potato, anti-oxidant, hydrogen peroxide

서 론

통계청 발표에 따르면, 우리나라 2013년 3대 사망원인은 악성신생물(암), 뇌혈관 질환, 심장 질환으로 총 사망자의 거의 반을 차지하며(Statics Korea 2014), 이러한 만성질환의 위험을 증가시키는데 활성산소종의 생성이 관련되는 것으로 보고되고 있다(Reuter 등 2010; Hoeschen RJ 1997). 생체는 활성산소종의 생성을 차단시키거나 감소시키기 위한 항산화 시스템을 가지고 있어, 정상적 상태에서는 해로운 영향을 주

지 않는다. 그러나, 환경이나 질병 등에 의해 산화와 항산화 작용의 평형이 깨지고, 산화적 스트레스가 발생하게 되면 세포내 지질, 단백질, 또는 DNA를 손상시킴으로 정상적인 기능을 방해하게 된다(Esposito 등 1999). 체내 항산화 시스템은 체내에서 생성되는 catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase 등의 항산화 효소와 자유 라디칼을 환원시키는 비타민 C, 비타민 E, 카로티노이드, 폴리페놀, 플라보노이드 등의 식이 미량영양소를 포함한다(Limón-Pacheco & Holbrook 2009; Lachance 등 2001).

* 현재 소속은 서울여자대학교 식품영양학과임.

† Corresponding author: Young Min Lee, Division of Food & Nutrition, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea. Tel: +82-2-970-5642, E-mail: ymlee@swu.ac.kr

§ Equally contributed

안토시아닌은 채소 및 과일류에 주로 존재하는 수용성 천연 색소성분으로 많은 식물체에서 붉은색, 보라색, 푸른색 등의 색을 띠는 플라보노이드 화합물이다. 안토시아닌의 phenolic 구조는 ROS(reactive oxygen species)를 소거하는 능력을 갖고 있어 기본적으로 항산화뿐만 아니라, 항염(anti-inflammatory), 항돌연변이(antimutagenic), 항당뇨(antidiabetes), 항알레르기(antiallergic)의 활성을 나타낸다.

고구마는 식이섬유와 무기질, 비타민을 다량 함유하고 있어 영양학적으로 우수할 뿐만 아니라, 카로티노이드와 플라보노이드 등의 기능성분을 함유하고 있어 최근에 건강기능식품으로 새롭게 관심을 받고 있다(Lee 등 2012). 특히 자색고구마는 안토시아닌을 다량 함유하고 있어 자색고구마 안토시아닌 성분의 분리 동정이 보고되었다(Kim 등 2012). 자색고구마의 기능성과 관련해서는 자색고구마 5종 메탄올 추출물의 돌연변이 억제 효과(Park 등 2011) 및 자색고구마 물 및 아세톤 추출물의 항산화 효과(Kim & Kim 2010), 자색고구마 물 추출물의 산화스트레스에 대한 신경세포 보호 효과(Kwak 등 2010), 자색고구마 분말의 사염화탄소에 의한 간 손상 보호 효과(Kim 등 2003) 등이 보고되어 있다. 주로 고구마의 분말이나 조추출물의 기능성을 평가한 것으로 자색고구마의 안토시아닌 자체의 기능성을 평가한 연구는 미비한 편이다. 따라서 본 연구에서는 자색고구마로부터 안토시아닌 분획을 분리하여 항산화능과 세포 내 산화스트레스에 대한 보호 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용한 자색고구마(신자미)는 농촌진흥청 바이오에너지작물센터에서 2011년에 재배하여 수확한 것이다. 자색고구마를 동결건조(PVTFD 10R, Ilsin Lab, Yangju, Korea)하고, 40 mesh 분쇄기(FM909T, Hani, Wonju, Korea)로 분쇄한 후 분말상태로 밀봉하여 냉동(-20°C) 보관하였다. 자색고구마 분말 50 g을 0.5% trifluoroacetic acid(Merck Co.)가 포함된 증류수 1.5 L에서 3시간 동안 상온에서 3회 반복하여 교반 추출하였다. 이를 감압 여과한 후 hexane, ethylacetate, butanol로 각각 3회 반복하여 순차적으로 용매 분획을 실시하였다. 감압여과 후 용매를 제거하여 최종적으로 안토시아닌 분획물(ANF) 3 g을 얻었다. 시료는 냉동(-20°C) 보관하여 실험에 사용하였다. 자색고구마 신자미의 안토시아닌 구성은 peonidine 계열의 안토시아닌이 77.4%를 차지하며 cyanidine 계열의 안토시아닌이 22.6% 정도 포함되어 있다(Kim 등 2012).

2. ABTS 라디칼 소거능 측정

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)

(Sigma Co.)와 과황산칼륨(potassium persulfate)을 혼합하여 암소에 두면 ABTS 양이온이 생성되는데, 항산화물질과 반응하여 양이온이 소거됨으로써 특유의 청록색이 탈색되며, 이의 흡광도를 측정하여 항산화 능력을 측정할 수 있다(Re 등 1999). 7.4 mM ABTS 용액과 2.6 mM 과황산칼륨을 혼합하여 암소에서 약 15시간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 희석하였다. 희석한 용액 300 µL에 농도별 시료 20 µL를 첨가하여 잘 혼합하고 실온에 30분간 방치한 다음, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 라디칼의 제거활성으로 나타냈으며, 양성대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다. 실험은 3회 반복 수행하여 평균값을 제시하였다.

3. 세포배양

본 실험에는 사람 간암세포인 HepG2(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea) 세포를 사용하였다. 실험에 사용한 배지는 10% fetal bovine serum(Invitrogen, Carlsbad, USA)과 penicillin-streptomycin solution(100 units/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin)(Hyclone)이 포함된 RPMI 1640이었고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양되었다.

4. MTT assay

HepG2 세포를 1×10⁵ cell/mL 농도로 96 well plate에 200 µL씩 분주하여 24시간 경과 후 ANF를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. Plate에서 배지를 제거하고 최종 처리농도 0.9 mM의 hydrogen peroxide(H₂O₂)를 새 배지에 혼합하여 분주한다. 암소상태로 20시간 동안 배양한 후 5 mg/mL thiazolyl blue tetrazolium bromide(Sigma Co.)를 각 well에 20 µL씩 넣어 4시간 반응(37°C, 5% CO₂)시켰다. Plate 바닥에 생성된 formazan이 같이 나오지 않도록 조심스럽게 배지를 제거하고, DMSO 200 µL를 넣어 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 3회 반복하여 수행하였으며, 대조군(PBS) 대비 세포 생존율로 나타내었다.

5. LDH(Lactose dehydrogenase) assay

세포 손상도는 LDH assay를 통해 측정하였다. 세포막이 손상되면 세포질에 존재하는 효소인 젖산 탈수소효소(Lactose dehydrogenase: LDH)는 배지 중으로 방출되어 젖산의 탈수소화를 촉매 작용해 pyruvate와 NADH를 생성한다(Dekcer & Lohmann-Matthes 1988). NADH는 diaphorase와 함께 tetrazolium salt를 환원시켜 적색의 formazan 색소를 형성한다. 이때의 흡광도를 측정해 LDH 활성을 통한 세포 손상도를 파악할 수 있다. HepG2 세포를 1×10⁵ cell/mL 농도로 96 well plate에 200 µL씩 분주하여 24시간 경과 후 ANF를 농도별로 처리하여 24

시간 동안 배양하였다. Plate에서 배지를 제거하고, 최종 처리 농도 0.9 mM의 H₂O₂를 새 배지에 혼합한 후, 분주하여 암소 상태로 20시간 동안 배양한다. Plate를 상온에서 10분간 250×g으로 원심 분리한 후 상층액 100 μL를 새 96 well plate에 넣어준 후 LDH 활성을 측정하였다. LDH 활성은 상업용 측정 키트(Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 제공된 실험법에 따라 혼합시약을 제조하여 30분간 암소상태로 상온에 방치 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 손상도는 다음의 방법으로 계산하였다.

$$\text{세포 손상도(\%)} = \left(\frac{\text{시료처리구의 흡광도}}{\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 처리대조구의 흡광도}} \right) \times 100$$

6. ROS 측정

과산화수소에 의한 세포 내 ROS 생성능을 측정하기 위해 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate(DCF-DA)를 사용하였다. DCF-DA 시약은 세포 내로 들어가며, oxygen radical에 의해 산화되어 DCF로 deacetylation 되면서 형광을 내는 물질로 전환된다. 이때 형광을 측정 해, 산화 정도를 파악할 수 있다(Subramaniam & Ellis 2011). HepG2 세포는 1×10⁵ cell/mL 농도로 96 well black plate에 200 μL씩 분주하여 24시간 경과 후 ANF를 농도 별로 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 최종 처리농도가 10 μM이 되도록 DCF-DA 형광물질을 첨가하여 다시 30분간 배양한다. Plate에서 배지를 제거하고, 최종 처리농도 0.9 mM의 H₂O₂를 새 배지에 혼합하여 분주하여 암소상태로 30분 동안 배양한다. 형광분석기(Fluorescence reader, Molecular devices)를 사용하여 excitation 495 nm, emission 520 nm에서 30분간 형광의 세기를 측정하여 다음의 방법으로 ROS 생성능을 측정하였다.

$$\text{ROS 생성능(\%)} = \left(\frac{\text{시료의 형광도}_{30\text{분}} - \text{시료의 형광도}_{0\text{분}}}{\text{대조구의 형광도}_{30\text{분}} - \text{대조구의 형광도}_{0\text{분}}} \right) \times 100$$

7. Catalase mRNA 발현 수준

HepG2 세포를 2×10⁵ cell/mL 농도로 24 well plate에 1 mL씩 분주하여 24시간 경과 후 ANF 10 μg/mL를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. Plate에서 배지를 제거하고 최종 처리 농도 0.9 mM의 H₂O₂를 새 배지에 혼합하여 분주한 후, 암소 상태로 6시간 동안 배양하였다. RNeasy plus mini kit(Qiagen, 74134)로 RNA를 추출하고, cDNA는 Quantitect Reverse Transcription kit(Qiagen, 205311)를 이용하여 매뉴얼에 따라 합성하였다. 생성된 cDNA를 이용하여 CFX96™ Real-Time PCR Detection System(BIO-RAD, USA)에서 SYBR green PCR reagents

Table 1. Sequences of PCR primers used for RT-PCR of the antioxidant enzyme

Target gene	Primer sequence
Catalase	F: 5'-ACT TTG AGG TCA CAC ATG ACA TT-3' R: 5'-CTG AAC CCG ATT CTC CAG CA-3'
GAPDH	F: 5'-AAG AAG GTG GTG AAG CAG GC-3' R: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

(BIO-RAD, USA)을 이용한 real time quantitative PCR 반응을 수행하였다. GAPDH를 endogenous control로 사용하였고, 반응조건은 다음과 같다. Pre-denaturation 95°C 3 min; 95°C 10 s, 55°C 30 s, 65°C 30 s; 40 cycles. Catalase와 GAPDH의 프라이머는 Table 1에 제시하였다. PCR 반응의 특이성은 melting curve 분석으로 확인하였다.

8. Glutathione(GSH) 함량 측정

HepG2 cell을 1×10⁵/mL로 6 well에 3 mL씩 18시간 배양하였다. 여기에 농도별 ANF를 처리하고 24시간 배양 후, 0.9 mM H₂O₂를 처리하여 6시간 배양하였다. 상층액의 GSH 함량은 glutathione assay kit(Cayman Co, USA)를 이용해 측정하였다. 상층액 50 μL씩에 kit 내에 있는 assay cocktail을 150 μL씩 넣어 암소 상태로 microplate shaker로 교반 후, microplate reader를 이용해 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. 통계처리

실험결과는 3회 반복 측정 후 평균±표준편차로 나타내었고, 처리간의 차이는 SPSS 프로그램에서 ANOVA를 실시한 후 사후검정으로 Duncan's multiple range tests에 의하여 *p*<0.05 수준에서 검증하였다. 두 군간의 차이는 Student's *t*-test로 *p*<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. ABTS^{·+} 라디칼 소거능

자색고구마 안토시아닌 분획물(ANF)의 ABTS^{·+} 라디칼 소거능 측정결과는 Table 2와 같이 나타났다. 대조구로 사용한 ascorbic acid는 12.5 μg/mL 농도에서 ABTS^{·+} 라디칼 소거능이 최대 활성을 나타내었으며, ANF 50 μg/mL 농도 이상에서 최대 활성을 보였다. 또한 50%의 소거활성을 나타내는 농도는 ascorbic acid와 ANF 각각 5.9 μg/mL, 20.8 μg/mL로 측정되었다.

본 연구에서 사용한 자색고구마인 신자미는 총 안토시아닌 함량이 1,342 mg/100 g DW 정도로, 자색고구마 건조 중량의 약 1.3% 정도에 해당하는 양이 함유된 것으로 보고되어 있

Table 2. ABTS^{·+} radical scavenging activity of ascorbic acid and ANF isolated Korean purple potato, “Shinjami”

(μg/mL)	Scavenging activity of ABTS ^{·+} radical(%)					IC ₅₀ (μg/mL)
	3.2	6.3	12.5	25	50	
Ascorbic acid	29.0±0.2 ¹⁾	53.5±0.5	100.0±0.1	100.0±0.1	100.1±0.1	5.9
ANF	12.2±0.2	20.9±0.6	37.7±0.2	66.3±0.7	99.8±0.3	20.8

¹⁾ Data was expressed as mean±SD.

다(Kim 등 2012).

ANF의 ABTS^{·+} 라디칼 소거능은 ascorbic acid에 비해서는 낮은 활성이지만, 식품 유래 추출물의 효과와 비교하면 높은 수준의 활성을 나타낸다고 할 수 있다. Lee 등(2013)의 연구에서는 흑도라지 열수 추출물의 ABTS^{·+} 라디칼 소거능이 IC₅₀ 70.4 μg/mL로 보고되었다.

2. 과산화수소(H₂O₂)로 유도된 세포 손상 보호 효과

세포 손상 보호효과는 MTT assay를 통한 세포 생존율과 LDH assay를 통한 세포 손상도를 측정하였다. HepG2 세포를 다양한 농도의 ANF로 전처리 후 H₂O₂(0.9 mM)에 노출하여 산화 손상에 대한 보호효과를 평가한 결과, ANF는 H₂O₂ 처리구 대비 농도 의존적으로 세포 생존율을 증가시켰으며, ANF 10 μg/mL 농도에서 유의적인 증가 효과를 보였다(Fig. 1). 세포 손상도는 ANF 처리 농도 의존적으로 감소하였으며, 10 μg/mL 농도에서 H₂O₂ 처리구 대비 유의적으로 감소하여 산화 스트레스에 의한 세포 손상 보호 효과를 나타내었다(Fig. 2).

3. ROS 생성 억제 효과

HepG2 세포에 다양한 농도의 ANF를 전처리한 후 H₂O₂ (0.9 mM)에 의해 생성되는 ROS 억제 효과를 Fig. 3에 나타내었다. ANF는 ROS 생성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 10

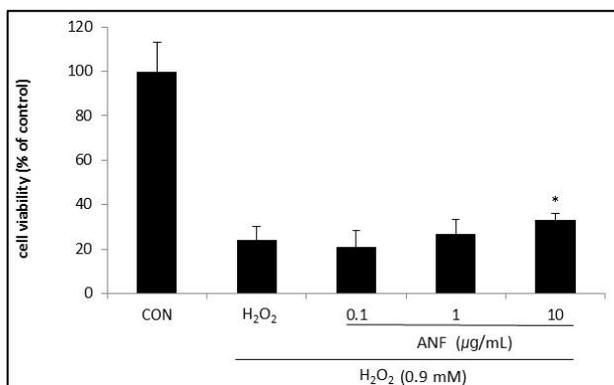


Fig. 1. Effect of ANF on H₂O₂-induced cell damage cell viability was measured by MTT assay. Data was expressed as mean±SD. **p*<0.05(vs. H₂O₂ treated control) determined by Duncan's multiple range tests.

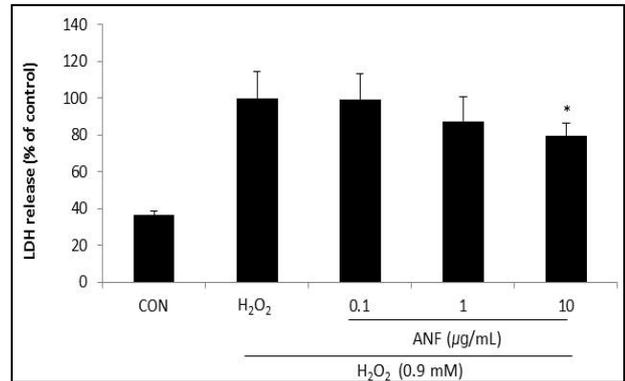


Fig. 2. Effect of ANF on H₂O₂-induced LDH leakage. Data was expressed as mean±SD. **p*<0.05(vs. H₂O₂ treated control) determined by Duncan's multiple range tests.

μg/mL 농도에서 유의적인 효과를 보였다.

활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 대사과정 중에 필연적으로 생성되는 물질이지만, 세포에서는 내재적인 방어 시스템을 갖추고 있어 활성산소로부터 세포를 보호할 수 있다(Veskoukis 등 2012). 그러나 과도한 활성산소는 세포에 산화적 손상을 유도하고, 퇴행성 질환과 노화를 촉진하는데 영향을 미친다(Salganik RI 2001). 따라서 자색고구마 유래 안토시아닌은 산화적 스트레스로 유도되는 여러 질환의 예방 또는 치료에 활용 가능성이 높을 것으로 생각된다.

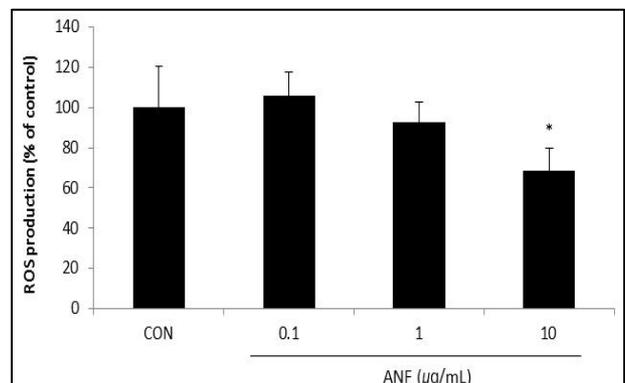


Fig. 3. Effect of ANF on H₂O₂ dependent intracellular ROS production. Data was expressed as Mean±SD. **p*<0.05 (vs. control) determined by Duncan's multiple range tests.

4. 세포 내 Glutathione 수준에 미치는 영향

세포 내 활성산소에 대한 방어시스템으로는 비효소적 분자와 항산화 효소가 있다(Martindale & Holbrook 2002). 이 중 비효소적 분자인 세포 내 glutathione은 환원형(GSH)과 산화형(GSSG) 두 가지 형태로 존재하지만, 건강한 세포상태에서는 대부분이 GSH로 존재하며, 10% 정도만 GSSG로 존재한다. 세포내 GSSG:GSH의 비가 증가하는 것은 산화스트레스의 민감한 지표로 활용되는데, 산화스트레스가 증가하면 GSH는 glutathione peroxidase의 촉매작용으로 GSSG로 산화되며, 동시에 라디칼이나 지질과산화물을 물로 전환한다(Nocito & Foyer 1998). HepG2 세포에 0.9 mM의 H₂O₂를 처리하면 대조구에 비해 세포 내 GSH 농도가 62% 감소하였다(Fig. 4). 그러나 세포에 ANF(10 µg/mL)를 전 처리한 후 H₂O₂를 처리한 군에서는 GSH 농도가 H₂O₂ 대조구 대비 31% 증가하여 유의하게 회복되는 것을 확인하였다.

5. Catalase 유전자 발현에 미치는 영향

ANF가 HepG2 간세포에서 과산화수소로 유도된 산화스트레스를 억제하기 위한 기전으로 ANF(10 µg/mL)의 전 처리가 항산화 효소 유전자, catalase(CAT) 발현에 미치는 영향을 Fig. 5에 나타내었다. CAT는 H₂O₂를 물과 산소로 분해시키는 효소로 작용하며, 이러한 항산화 효소는 생체 내에서 활성 산소로부터 생체를 보호하는 작용을 함으로써 각종 성인병 예방 및 항암, 항노화 기능을 수행한다. CAT의 mRNA 수준은 H₂O₂를 처리했을 때 대조구 대비 약 50%의 발현 감소를 보였으며, ANF 10 µg/mL 농도 처리에 의해 H₂O₂ 대조구 대비 CAT 발현이 유의적으로 증가됨을 보였다(Fig. 5). 항산화 효소의 유전자 발현 증가는 산화적 스트레스에 대해 세포를 보호하는데 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Hayes 등 1999). 따라서 자색고구마 유래 안토시아닌은 비효소적 항산

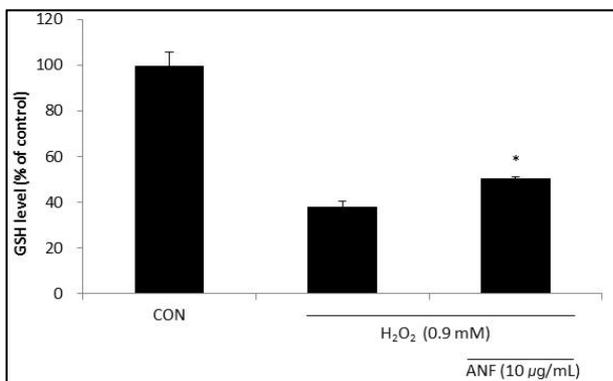


Fig. 4. Effect of ANF on glutathione level. Data was expressed as mean±SD. *Significantly different ($p < 0.05$) compared to H₂O₂ treated control by Student's *t*-test.

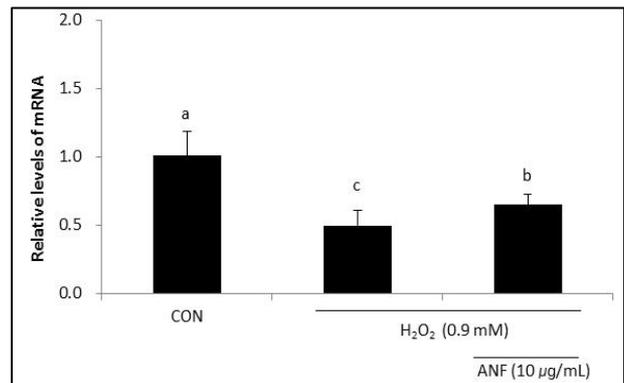


Fig. 5. Effect of ANF on antioxidant gene expression in cells, as determined by quantitative real time PCR. Data are expressed as Mean±SD. * $p < 0.05$ determined by Duncan's multiple range tests.

화 분자뿐만 아니라, 항산화 효소를 증가시킴으로써 H₂O₂로 유도되는 산화적 스트레스에 대해 세포를 보호하는 것으로 나타났다. 최근에 자색고구마는 된장(Bae 등 2012), 요구르트(Cheon 등 2013) 등 다양한 제품에 적용이 시도되고 있어, 이러한 자색고구마의 기능성에 대한 정보는 신수요를 창출하는데 유용할 것으로 생각된다.

결론

최근 자색고구마가 건강기능식품으로 새롭게 관심 받고 있으며, 자색고구마에 함유된 색소성분이 기능성분으로 주목 받고 있다. 본 연구에서는 자색고구마인 신자미의 안토시아닌 분획물(ANF)이 라디칼 소거능과 간세포에서 산화스트레스로부터 보호 효과에 어떠한 영향을 미치는지 평가하였다. 그 결과, 자색고구마는 농도 20.8 µg/mL에서 50%의 라디칼 소거활성을 나타냈다. 또한, 자색고구마 유래의 ANF는 HepG2 cell에 hydrogen peroxide를 처리해 산화스트레스가 유도된 상태에서 10 µg/mL의 농도에서 세포 생존율과 손상도를 개선시켰고($p < 0.05$), ROS의 생성을 저해시켰으며($p < 0.05$), glutathione의 함량과 catalase 항산화 효소의 mRNA의 발현을 증가시켰다($p < 0.05$). 따라서 자색고구마 유래 안토시아닌은 산화적 스트레스로 유도되는 암, 순환기계 질환, 당뇨 등 여러 질환의 예방 또는 치료에 활용 가능성이 높을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술연구개발사업(과제번호: PJ010052)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 그 지원에 감사드립니다.

References

- Bae JO, Lee KJ, Park JS, Choi DS. 2012. Preparation of sweet potato *Doenjang* using colored sweet potato. *Korean J Food & Nutr* 25:529-537
- Cheon JE, Baik MY, Choi SW, Kim CN, Kim BY. 2013. Optimization of *Makgeolli* manufacture using several sweet potatoes. *Korean J Food & Nutr* 26:29-34
- Cho YJ, Kim HA, Bang MA, Oh YB, Jeong BC, Moon YH, Jeong WJ. 2003. Protective effect of purple sweet potato (*Ipomoea batatas*) hepatotoxicity rats induced by carbon tetrachloride. *Korean J Food Culture* 18:202-210
- Decker T, Lohmann-Matthes M. 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 115:61-69
- Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC. 1999. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 96:4820-4825
- Hayes JD, Ellis EM, Neal GE, Harrison DJ, Manson MM. 1999. Cellular response to cancer chemopreventive agents: Contribution of the antioxidant responsive element to the adaptive response to oxidative and chemical stress. *Biochem Soc Symp* 64:141-168
- Hoeschen RJ. 1997. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 13:1021-1025
- Kim HW, Kim JB, Cho SM, Chung MN, Lee YM, Chu SM, Che JH, Kim SN, Kim SY, Cho YS. 2012. Anthocyanin changes in the Korean purple-fleshed sweet potato, Shinzami, as affected by steaming and baking. *Food Chem* 130:966-972
- Kim SJ, Kim JS. 2010. Antioxidative effects of purple sweet potato extracts. *Agricultural Research Bull Kyungpook National University* 28:25-29
- Korean National Statistical Office. 2014. The Cause of Death Statistics. Available from <http://www.kostat.go.kr> [cited 2014 September 8]
- Kwak JH, Chol GN, Park JH, Kim JH, Jeong HR, Heong CH, Heo HJ. 2010. Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. *J Agriculture & Life Sciences* 44:57-66
- Lachance PA, Nakat Z, Jeong W. 2001. Antioxidants: An integrative approach. *Nutrition* 17:835-838
- Lee SJ, Bang WS, Hong JY, Kwon OJ, Shin SR, Yoon KY. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of black *Doraji* (*Platycodon grandiflorum*). *Korean J Food Preserv* 20:510-517
- Lee YM, Bae JH, Kim JB, Kim SY, Chung MN, Park MY, Ko JS, Song J, Kim JH. 2012. Changes in the physiological activities of four sweet potato varieties by cooking condition. *Korean J Nutr* 45:12-19
- Limón-Pacheco J, Gonsbatt ME. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research* 674:137-147
- Martindale JL, Holbrook NJ. 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192:1-15
- Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Biol* 49:249-279
- Park JS, Bae JO, Choi GH, Chung BW, Choi DS. 2011. Antimutagenicity of Korean sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:37-46
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231-1237
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* 49:1603-1616
- Salganik RI. 2001. The benefits and hazards of antioxidants: Controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J Am Coll Nutr* 20:464S-472S
- Subramaniam SR, Ellis EM. 2011. Esculetin-induced protection of human hepatoma HepG2 cells against hydrogen peroxide is associated with the Nrf2-dependent induction of the NAD (P) H: Quinone oxidoreductase 1 gene. *Toxicol Appl Pharmacol* 250:130-136
- Veskoukis AS, Tsatsakis AM, Kouretas D. 2012. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones* 17:11-21

Received 5 November, 2014
 Revised 12 November, 2014
 Accepted 14 November, 2014