

## 노루궁뎅이 버섯균사체를 이용한 비타민나무 발효물이 생체고분자의 산화적 변형과 세포사멸에 미치는 보호 영향

김승섭<sup>1</sup> · 경인구<sup>2</sup> · 이미라<sup>2</sup> · 김동구<sup>2</sup> · 신지영<sup>2</sup> · 양진이<sup>1</sup> · 이광호<sup>1</sup> · 음원식<sup>3</sup> · 강정훈<sup>1</sup>

<sup>1</sup>청주대학교 바이오메디컬학과  
<sup>2</sup>(주)코시스바이오 기업부설연구소  
<sup>3</sup>한림대학교 생명공학연구소

### Protective Effects of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Leaves Fermented with *Hericium erinaceum* Mycelium against Oxidative Modification of Biological Macromolecules and Cell Death

Seung-Sub Kim<sup>1</sup>, Inn-Goo Kyeong<sup>2</sup>, Mi-La Lee<sup>2</sup>, Dong-Goo Kim<sup>2</sup>, Ji-Young Shin<sup>2</sup>, Jin-Yi Yang<sup>1</sup>, Gwang-Ho Lee<sup>1</sup>, Won-Sik Eum<sup>3</sup>, and Jung-Hoon Kang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Science, Cheongju University  
<sup>2</sup>R&D Center, Cosis Bio Corporation Limited  
<sup>3</sup>Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Hallym University

**ABSTRACT** In this study, hot water extract from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves fermented with *Hericium erinaceum* mycelium (SBT-HE) was assessed for protection against oxidative modification of biological macromolecules and cell death. Antioxidant activity of SBT-HE was evaluated based on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical, and peroxy radical scavenging assays. SBT-HE showed 65.06% DPPH radical scavenging activity at 500 µg/mL, 98.83% ABTS radical scavenging activity at 50 µg/mL, and 44.03% peroxy radical scavenging activity at 100 µg/mL. SBT-HE significantly inhibited DNA strand breakage induced by peroxy radical. SBT-HE also prevented peroxy radical-mediated human serum albumin modification. SBT-HE effectively inhibited H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death and significantly increased cell survival by 21.59% at 100 µg/mL. SBT-HE also reduced intracellular reactive oxygen species levels in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells. The results suggest that SBT-HE can contribute to antioxidant activity and protect cells from oxidative stress-induced cell injury.

**Key words:** oxidative modification, biological macromolecules, antioxidant activity, reactive oxygen species

## 서 론

비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.)는 보리수나무과(Elaeagnaceae)에 속하는 낙엽성 관목으로서 중앙아시아에서 유럽에 이르는 넓은 지역에 자생하며, 내한성이 강하고 다양한 기후 조건과 토양 조건에서 생육이 가능하다(1,2). 비타민나무의 열매와 종자의 생리활성 기능 연구는 현재까지 활발히 진행되고 있으며, 위궤양 및 간 섬유화 보호 기능, 혈당 및 콜레스테롤 저하 작용, 면역강화, 항염작용 및 항암, 항돌연변이 등 다양한 효과가 있는 것으로 보고되었다. 비타민나무 열매에는 폴리페놀, 토코페롤, 카로티노이드, 플라보노이드 등이 함유되어 있고, 잎에는 퀘세틴, 갈산, 타닌 등의

생리활성 물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(3-7). 비타민나무 잎 추출물을 림프구 세포에 처리한 후 세포 독성을 유발하여 림프구 세포에 대한 보호 효과를 확인한 결과 세포 내의 글루타치온의 수준을 상승시켰고 reactive oxygen species(ROS)의 생성을 저하함으로써 항산화적 방어 시스템을 향상시킨다고 보고되었다(8).

대표적인 약용버섯 중 하나인 노루궁뎅이 버섯(*Hericium erinaceum*)은 일본, 동남아시아, 유럽 등에 분포되어 가을철 활엽수의 고목이나 생목에서 주로 발생한다. 노루궁뎅이 버섯의 자실체 생산은 광선, 온도 습도의 제어를 필요로 하며 유효성분의 추출수율이 낮아 식용 이외의 산업화는 미비한 실정이다. 반면 자실체 발생 이전 단계인 균사체의 액체 배양에 의한 항산화 활성, 항암 활성과 면역증강 활성 등의 생리활성에 대한 연구는 꾸준히 진행되고 있다(9-12).

현재 다양한 식용식물과 버섯류로부터 각각의 생리활성 물질에 대한 연구는 활발히 진행되고 있으나 비타민나무와

노루궁뎅이 버섯균사체를 함께 이용한 연구는 찾아보기 어려운 실정이다. 따라서 본 연구에서는 비타민나무 잎을 천연 물배지로 하여 노루궁뎅이 버섯균사체를 배양시켜 제조한 발효물이 생체고분자의 산화적 변형과 세포사멸을 억제할 수 있는지를 확인하고자 하였다. 이와 같은 연구는 노루궁뎅이 버섯균사체 발효물을 이용한 기능성 식품 개발 및 상업화에 기초적 자료를 제공할 것이다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 시약

실험용 비타민나무(sea buckthorn, SBT) 잎은 2013년 5월에 강원도 춘천시 동면 지내리에서 채취한 것을 사용하였으며, 균주로 사용한 노루궁뎅이 버섯(*H. erinaceum*) 균사체는 충북농업 기술원(Chungbuk, Korea)으로부터 분양받아 potato dextrose agar(PDA, Difco, Detroit, MI, USA) 사면배지에서 25°C에서 10일간 배양한 후 4°C에 보존한 노루궁뎅이 버섯균사체를 사용하였다.

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), phosphate buffer saline(PBS), trichloroacetic acid(TCA), thio-barbituric acid(TBA), Cu,Zn-superoxide dismutase(Cu,Zn-SOD), human serum albumin(HSA), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dimethyl sulfoxide(DMSO), Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA) 등은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, sodium dodecyl sulfate(SDS)는 Bio-Rad(Hercules, CA, USA)로부터 구입하였다. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)는 Boehringer Mannheim GmbH(Mannheim, Germany)에서 구입하여 사용하였고, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)는 Wako(Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

### 비타민나무의 발효

비타민나무의 발효는 비타민나무의 잎을 수세한 후 실온에서 3~4일간 건조시켜 수분 함량을 조절한 다음 건조물 100 g에 1.5배수의 물을 첨가하여 3시간 침지시켜준 후 121°C에서 2시간 동안 고압에서 멸균하였다. 멸균시킨 비타민나무 잎을 냉각시킨 후 10% 노루궁뎅이 버섯균사체를 접종하여 25°C에서 60일간 배양(multi room incubator, Vision Scientific, Gyeonggi-do, Korea)하고 60°C에서 2일간 건조시켜 비타민나무 발효물을 제조하였다. 이와 같은 발효물의 열수 추출물 제조를 위해 비타민나무 발효물에 20배의 증류수를 첨가하고 homogenizer(Ultra-turrax T-50, KG-IKA-Labortechnik, Staufen, Germany)로 5,000 rpm에서 10분간 분쇄한 후 열수 추출하였으며, 여과지(No.

2, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 잔사와 추출액을 분리하고 잔사는 다시 반복 추출하였다. 2회 반복 추출 후 열수 추출액을 4°C에서 30분 동안 7,600×g로 원심분리하여 불용성 침전물을 제거하고 상층액을 농축 및 동결건조하여 실험에 사용하였다.

### DPPH radical 소거활성

DPPH radical 소거활성을 Brand-Williams 등(13)의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.1 mM DPPH 900 µL를 DMSO 50 µL와 비타민나무 발효물 50 µL를 혼합하여 실온에서 20분간 반응시킨 후 원심분리(10,000×g, 5분)를 통해 불순물을 제거하고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 다음 식(1)에 의해 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Experiment}}}{A_{\text{Control}}}\right) \times 100 \quad (1)$$

### ABTS radical 소거활성

ABTS radical 소거활성을 Brand-Williams 등(13)의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.5 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 37°C 암실에서 12시간 동안 반응시킨 후 희석하여 사용하였다. ABTS 900 µL에 DMSO 50 µL와 비타민나무 발효물 50 µL를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 다음 식(2)에 의해 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Experiment}}}{A_{\text{Control}}}\right) \times 100 \quad (2)$$

### Peroxyl radical 소거활성

Peroxyl radical 소거활성을 Ohkawa 등(14)의 방법을 변형하여 측정하였다. 50 mM AAPH와 10 mM 2-deoxy-D-ribose를 함께 첨가하여 thiobarbituric acid와 반응할 수 있는 물질인 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)를 유도하기 위해 37°C에서 2시간 반응시키고, 1X PBS 용액, 2.8% TCA 용액, 1% TBA 용액을 각각 200 µL씩 첨가하고 100°C에서 10분간 가열한다. 반응액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다. Peroxyl radical 소거활성은 다음 식(3)에 의해 백분율로 나타내었다.

$$\text{Peroxyl radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Experiment}}}{A_{\text{Control}}}\right) \times 100 \quad (3)$$

### DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

Peroxyl radical에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용을 Kang과 Kim(15)의 방법을 이용하였다. DNA는 pUC19(100 µg/mL)를 사용하고 DNA의 산화적 손상을 유발시키기 위해 10 mM AAPH를 사용하여 peroxyl radical

을 생성시켰다. 반응액에 비타민나무 발효물을 첨가하여 37°C에서 6시간 동안 반응시킨 후 gel electrophoresis를 통해 산화적 손상에 대한 보호 작용을 확인하였다.

### HSA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

HSA의 산화적 손상에 대한 보호 작용을 확인하기 위해 Laemmli(16)의 방법을 이용하였다. HSA의 산화적 손상을 유발시키기 위해 50 mM AAPH를 사용하였고, 비타민나무 발효물을 첨가하여 37°C에서 6시간 동안 반응시킨 후 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 통해 단백질 띠의 형태를 확인하였다.

### SOD의 산화적 손상에 대한 보호 작용

Cu,Zn-SOD의 산화적 손상에 대한 보호 작용을 확인하기 위해 Laemmli(16)의 방법으로 확인하였다. Cu,Zn-SOD의 산화적 손상을 유발시키기 위해 50 mM AAPH를 사용하였고 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 용액과 비타민나무 발효물을 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 SDS-PAGE를 통해 확인하였다.

### 세포배양 및 세포생존율 측정

세포배양을 위해 NIH3T3 fibroblast 세포를 직경 100 mm culture dish에서 10% bovine calf serum(BCS), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 함유한 DMEM 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기(MCO 17AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 37°C로 배양하여 사용하였다. 세포를 96 well plate에 분주하고 12시간 배양한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(2 mM/mL)를 처리하여 산화적 스트레스에 의한 세포사멸을 유도하였다. 세포의 생존율은 MTT assay를 통해 ELISA reader(Labsystems Multiskan MCC/340, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(17,18).

### ROS 생성 관찰

세포 내 ROS 생성 관찰은 DCF-DA 염색법을 이용하여 측정하였다(17,18). 세포를 3×10<sup>4</sup> 크기로 cover glass 위에 깔아준 후 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 배양기를 통해 12시간 배양한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(2 mM/mL)를 처리하여 ROS 생성을 유도하였으며, 2~3회 세척 후 20 µM DCF-DA를 1시간 동안 반응시킨 후 형광현미경(Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan)을 통해 확인하였다.

### 통계처리

실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험값은 3회 이상 반복 실시한 결과를 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 각 군 간의 측정

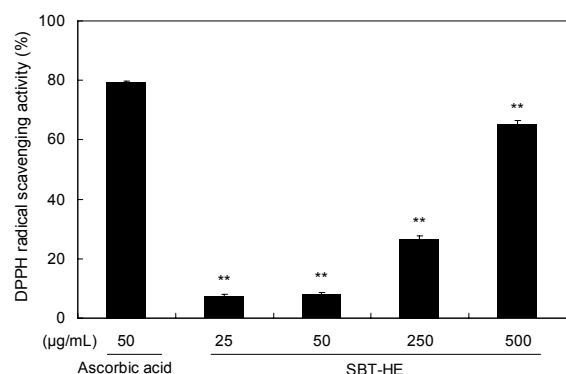
치 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA) test를 실시한 후 95%(*P*<0.05)의 유의수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 군 간의 유의적 차이를 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### DPPH radical 소거활성

호기성 생물의 호흡과정으로 생성되는 활성산소는 체내 조직 및 기관에 산화적 스트레스를 일으켜 노화와 질병의 원인이 되고 있다(19). 이와 같은 산화적 스트레스를 방어하는 항산화 분자들은 정상적인 세포활성을 유지하는 데 매우 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 비타민나무 발효물도 세포활성을 유지하는 항산화 활성이 있는지를 확인하기 위하여 발효물의 농도에 따른 radical 소거활성을 측정하였다. DPPH를 이용한 전자 공여능 측정법은 식물 추출물의 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있어 많이 사용되고 있다. DPPH radical 소거활성의 경우 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid 50 µg/mL 농도에서 79.52%의 DPPH radical 소거활성을 보였으며 비타민나무 발효물 250 µg/mL 농도와 500 µg/mL 농도에서 각각 26.53%, 65.06% 활성을 나타냈다(Fig. 1). 비타민나무 발효물의 DPPH radical 소거활성은 같은 농도에서 양성대조군보다는 낮게 나타났지만 이는 대조군에 비하여 모두 유의적으로 증가하였고(*P*<0.01), 발효물 농도에 비례해서 활성이 증가됨을 알 수 있었다.

식물계에 널리 분포되어 있는 페놀성 물질은 다양한 구조와 분자량을 가지며, 항산화, 항균, 항암 등의 생리활성을 나타낸다(20). 또한 세포벽, 다당류, 리그닌 등과 에스테르 결합이 되어 중합체로 존재하며, 수산기를 통한 수소 공여와 페놀 고리구조의 공명 안정화에 의해 항산화 능력을 나타낸다고 보고되었다(21,22). 비타민나무 잎의 총 폴리페놀 함



**Fig. 1.** DPPH radical scavenging activity of fermented sea buckthorn leaves with *H. erinaceum* mycelium (SBT-HE). The reaction mixture contained 0.1 mM DPPH in the presence or absence of various concentrations of SBT-HE at 37°C for 20 min. The values represent the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the ascorbic acid treated group. \*\**P*<0.01.

량은 약 59 mg/g으로 50~100°C에서 평형수분 함량이 1~3%로 건조된 경우 34~45 mg/g dm(dry matter)으로 감소하였다고 보고한 바 있다(7). 약용식물의 경우 총 폴리페놀 함량이 30 mg/g 이상이면 뛰어난 항산화 활성을 나타낸다고 알려져 있으므로(23), 평균으로 인한 폴리페놀 함량의 감소가 예상됨에도 불구하고 비타민나무 잎 발효물의 DPPH free radical 소거활성은 뛰어난 것으로 판단된다.

### ABTS radical 소거활성

ABTS radical 소거활성 측정방법은 DPPH radical 소거활성과 마찬가지로 인위적으로 radical을 제거하는 작용으로 DPPH radical 소거활성과 유의적인 상관성을 보이는 것으로 알려져 있다(24). ABTS radical 소거활성은 항산화물질에 의해 radical 특유의 짙은 청록색이 하늘색 및 투명색으로 탈색되는 것을 이용한 측정법으로 이는 hydrogen-donating antioxidant와 chain breaking antioxidant를 측정할 수 있고 aqueous phase 및 organic phase 모두에 적용이 가능하다는 점이 특징이다(25). 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid의 ABTS radical 소거활성은 10 µg/mL 농도에서 87.69%로 나타났으며 비타민나무 발효물의 경우 5 µg/mL의 저 농도에서 23.18%의 활성을 나타내었고, 50 µg/mL 농도에서 99.51%의 활성을 나타냈다(Fig. 2). 비타민나무 발효물의 ABTS radical 소거활성도 같은 농도에서 양성대조군보다는 낮은 것으로 나타났지만 발효물의 농도가 증가함에 따라 활성이 유의하게( $P<0.01$ ) 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

기존의 연구 결과에 의하면 비타민나무 잎은 플라보노이드가 풍부한 식물로 페놀성분 중 카테킨과 퀘세틴이 풍부하고 루틴이 함유되어 있다고 보고된 바 있다. 또한 폴리페놀 함량과 항산화 활성은 밀접한 연관성을 가진다고 보고되었다(26,27). 따라서 비타민나무 잎 발효물의 ABTS radical

소거활성도 비타민나무 잎에 포함되어 있는 높은 농도의 폴리페놀 성분에 기인하는 것으로 사료되었다.

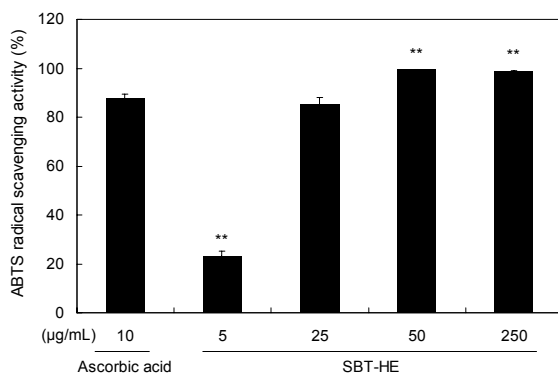
### Peroxyl radical 소거활성

AAPH는 지질과산화의 initiator로 용액 상에서 산소 radical 중에 하나인 peroxy radical을 생성하는 화학물질로 잘 알려져 있다(28). Peroxyl radical은 2-deoxy-D-ribose와 반응하여 TBA와 반응할 수 있는 물질(TBARS)로 전환시키며 이는 분홍색을 띠게 된다. 따라서 TBARS 생성 억제 정도를 측정하여 peroxy radical 소거활성을 관찰하였다. 비타민나무 발효물은 농도가 증가함에 따라 TBARS 생성을 억제하였다. Peroxyl radical 소거활성은 1 µg/mL에서 18.14%였고 100 µg/mL에서는 44.03%로 이는 control군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다( $P<0.01$ )(Fig. 3).

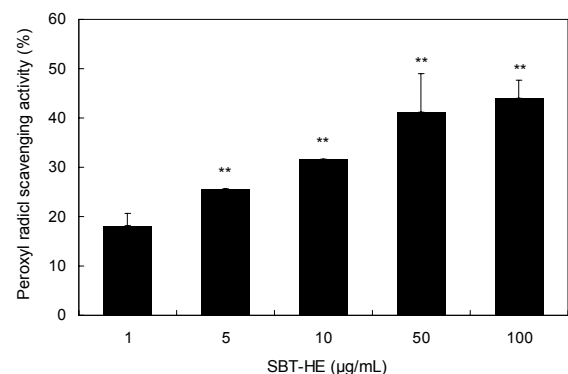
Peroxyl radical은 다양한 생리적 및 병리적 과정에서 나타나며(29,30), 지질과산화 과정 중에 나타나는 탄소 radical과 산소가 반응하여 생성되므로 지질과산화물의 생성과 밀접한 관련이 있다. 따라서 비타민나무 발효물에 의한 peroxy radical 소거활성은 세포 내의 지질과산화 생성을 억제하여 이와 관련된 여러 질병을 예방하는 데 도움을 줄 것으로 사료된다.

### DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

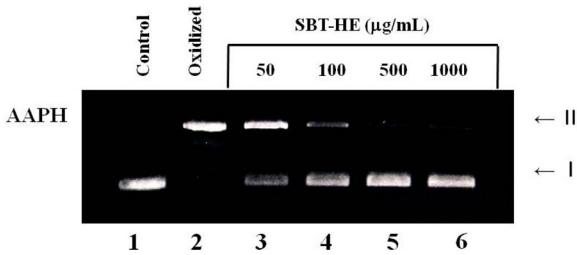
비타민나무 발효물이 DNA의 산화적 손상을 억제하는지를 알아보았다. 앞서서도 언급했듯이 AAPH는 용액 상에서 peroxy radical을 효과적으로 생성하며 이들은 지질이나 DNA와 반응하여 산화적 손상을 유도한다(31-33). pUC19 DNA 50 µg/mL에 산화적 손상을 일으키기 위해 발효물을 처리하지 않은 상태와 처리한 상태에서 10 mM AAPH 처리하여 37°C에서 6시간 반응시켰다. 반응액을 전기영동한 후 agarose gel 상의 DNA 형태를 관찰한 결과 pUC19 DNA는



**Fig. 2.** ABTS radical scavenging activity of fermented sea buckthorn leaves with *H. erinaceum* mycelium (SBT-HE). The reaction mixture contained 7 mM ABTS and 2.5 mM potassium persulfate in the presence or absence of various concentrations of SBT-HE at 37°C for 10 min. The values represent the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the ascorbic acid treated group. \*\* $P<0.01$ .



**Fig. 3.** Peroxyl radical scavenging activity of fermented sea buckthorn leaves with *H. erinaceum* mycelium (SBT-HE). The reaction mixture contained 10 mM deoxyribose and 50 mM AAPH in the presence or absence of various concentrations of SBT-HE at 37°C for 2 h. The values represent the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. \*\* $P<0.01$ .



**Fig. 4.** Protective effects of fermented sea buckthorn leaves with *H. erinaceum* mycelium (SBT-HE) on DNA strand breakage induced by peroxy radical. pUC 19 DNA was incubated with 10 mM AAPH in the presence of various concentrations of SBT-HE at 37°C for 6 h. Lane 1, control DNA; lane 2, lane 1+AAPH; lane 3, lane 2+50 µg/mL SBT-HE; lane 4, lane 2+100 µg/mL SBT-HE; lane 5, lane 2+500 µg/mL SBT-HE; lane 6, lane 2+1,000 µg/mL SBT-HE.

supercoil form(I)으로 나타났으며(Fig. 4, lane 1), DNA의 산화적 손상이 일어난 경우는 strand breakage(II)가 관찰되었다(Fig. 4, lane 2). 반면 50, 100, 500, 1,000 µg/mL의 농도로 비타민나무 발효물을 처리했을 때는 농도가 증가함에 따라 strand breakage가 억제되었으며 500 µg/mL에서부터는 완전히 억제되었다.

생체 내에서 활성산소에 의한 DNA의 변형에 관한 연구는 많이 알려져 있다. 일반적으로 활성산소에 의한 DNA의 손상이 일어날 경우 DNA cleavage 또는 fragmentation 현상이 일어나며 deoxyguanosine 분자가 8-hydroxy deoxyguanosine으로 변형되는 현상이 일어난다(34-36). 이와 같은 현상은 돌연변이나 노화, 암 등과 같은 질병의 원인이 되고 있다(37,38). 따라서 비타민나무 발효물은 DNA의 산화적 손상을 보호함으로써 노화 및 질병 예방에 도움이 될 것으로 생각된다.

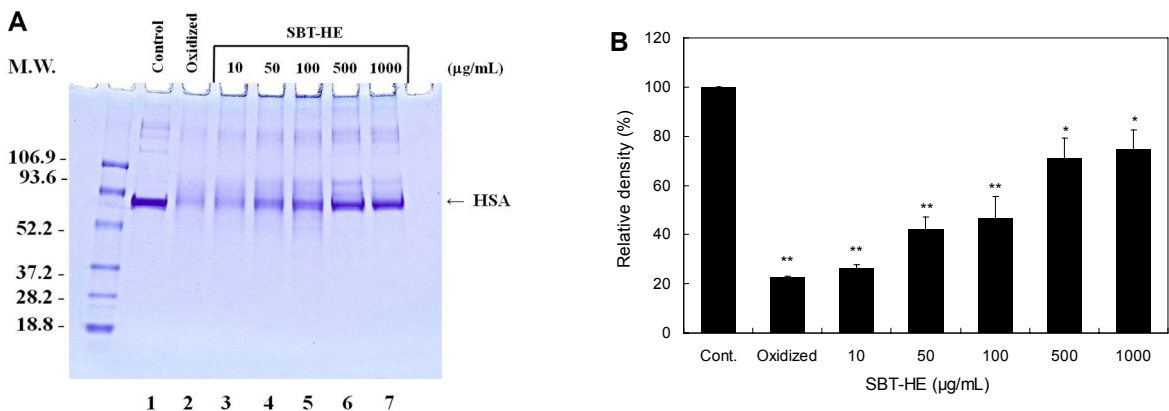
**HSA의 산화적 손상에 대한 보호 작용**

HSA 단백질에 50 mM AAPH를 처리하여 산화적 손상을

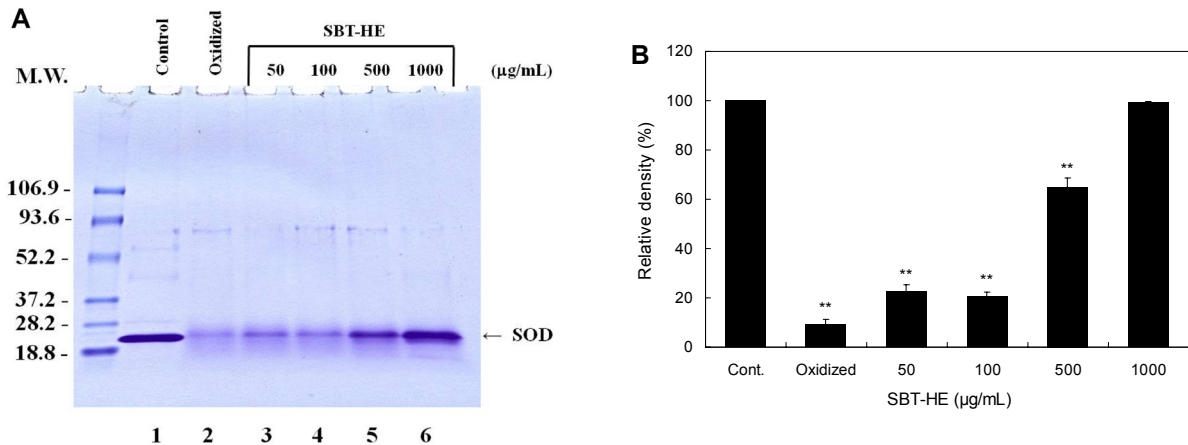
유발한 후 비타민나무 발효물의 단백질 보호 영향을 알아보았다. AAPH는 용액 상에서 peroxy radical을 생성하고 이로 인해 HSA의 산화적 손상이 일어난다. HSA 단백질에 산화적 손상이 일어나면 펩티드 결합이 파괴되면서 단백질 띠가 거의 사라졌다(Fig. 5A, lane 2). 반면 발효물을 농도별로 처리한 결과 처리 농도에 비례하여 HSA 단백질 띠의 밀도가 유의하게 증가하였다( $P < 0.01$ ). HSA 단백질 띠를 밀도 측정기로 측정된 결과 500 µg/mL 농도에서 비타민나무 발효물을 처리한 단백질 띠의 밀도가 AAPH만을 처리한 군에 비해 48.65% 이상 보호되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5B). 활성산소 중에 의한 단백질의 손상은 아미노산의 변형(39), 단백질의 cross-linking(40), 단백질의 절단 형태로 나타난다. 특히 단백질에 대한 산화적 손상은 단백질의 구조와 기능을 변화시키므로 노화 및 많은 질병의 원인이 되고 있다(41,42). 미토콘드리아의 전자전달 단백질인 cytochrome c의 산화적 손상이 파킨슨병을 유도하는 α-synuclein 단백질의 응집과 밀접한 관련이 있다고 보고되었다(43). 또한 알츠하이머병, 파킨슨씨병과 같은 퇴행성 뇌질환에서 나타나는 공통적인 현상 중에 하나가 neurofilament의 변형 및 축적인데 이와 같은 현상은 여러 요인에 의해 일어날 수 있으나 활성산소에 의한 단백질의 산화적 변형이 중요한 이유 중 하나일 것으로 추측되고 있다(44-46). 따라서 비타민나무 발효물은 세포 내 단백질의 변형을 억제함으로써 노화 및 퇴행성 질병 예방에 도움이 될 것으로 생각된다.

**Cu,Zn-SOD의 산화적 손상에 대한 보호 작용**

세포질에 존재하는 중요한 항산화 효소인 Cu,Zn-SOD의 산화적 손상에 발효물이 미치는 영향을 관찰하였다. AAPH를 처리하여 단백질의 손상을 유도하고 비타민나무 발효물을 처리한 결과 발효물을 처리하지 않았을 때에는 단백질의 절단으로 인해 단백질 띠가 거의 보이지 않았으나(Fig. 6A, lane 2), 발효물을 처리하였을 때에는 농도가 증가함에 따라



**Fig. 5.** Protective effects of fermented sea buckthorn leaves with *H. erinaceum* mycelium (SBT-HE) on oxidative modification of HSA induced by peroxy radical. HSA was incubated with 50 mM AAPH in the presence of various concentrations of SBT-HE at 37°C for 6 h. Lane 1, control HSA; lane 2, lane 1+AAPH; lane 3, lane 2+10 µg/mL SBT-HE; lane 4, lane 2+50 µg/mL SBT-HE; lane 5, lane 2+100 µg/mL SBT-HE; lane 6, lane 2+500 µg/mL SBT-HE; lane 7, lane 2+1,000 µg/mL SBT-HE. The values represent the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .



**Fig. 6.** Protective effects of fermented sea buckthorn leaves with *H. erinaceum* mycelium (SBT-HE) on oxidative modification of Cu,Zn-SOD induced by peroxy radical. Cu,Zn-SOD was incubated with 50 mM AAPH in the presence of various concentrations of SBT-HE at 37°C for 24 h. Lane 1, control Cu,Zn-SOD; lane 2, lane 1+AAPH; lane 3, lane 2+50 µg/mL SBT-HE; lane 4, lane 2+100 µg/mL SBT-HE; lane 5, lane 2+500 µg/mL SBT-HE; lane 6, lane 2+1,000 µg/mL SBT-HE. The values represent the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. \*\* $P<0.01$ .

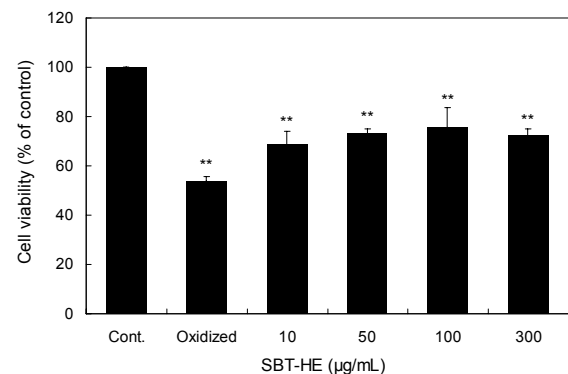
단백질 띠의 밀도가 증가함을 나타냈다(Fig. 6A). SOD 단백질 띠를 밀도 측정기로 측정하였을 때 비타민나무 발효물 처리군이 대조군에 비하여 단백질 띠의 밀도가 유의하게 증가한 것으로 나타났으며( $P<0.01$ ), 1,000 µg/mL 농도에서 Cu,Zn-SOD 단백질 띠가 정상 단백질로 100% 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6B).

Cu,Zn-SOD는 정상적으로 발현이 될 때에는 효과적인 항산화 효소로 작용하지만 산화적 손상이 일어날 경우 세포의 파괴(47-49), 지질과산화의 증가(50,51), biogenic amine의 이동 감소(50), 신경세포의 파괴(52) 등과 같은 해로운 현상을 야기한다. 질병에 관한 연구에서 Cu,Zn-SOD는 퇴행성 뇌질환을 앓고 있는 환자에서 그 활성이 높아진다는 사실이 보고됨으로써 이 효소와 퇴행성 뇌질환과의 상호 관련이 있음을 시사하고 있다. 알츠하이머병의 환자 혈액에서 Cu,Zn-SOD의 농도와 활성은 정상인보다 높은 것으로 나타나 있으며(53), 파킨슨씨병 환자에서 뇌 조직을 포함한 여러 조직에서 Cu,Zn-SOD의 농도와 활성이 정상인보다 높은 것으로 나타났다(54). 또한 알츠하이머병 환자의 cerebrospinal fluid에서는 구리이온의 농도가 정상인에 비해 2.2배 높다는 사실이 보고되었다(55). 따라서 이 질환의 발병인자 중에 하나가 구리이온일 가능성이 있으며 구리이온의 농도 증가는 Cu,Zn-SOD의 농도 증가 및 산화적 손상과 상호 연관성이 있을 것으로 예상된다. 따라서 비타민나무 발효물에 의한 Cu,Zn-SOD의 손상 억제제는 세포 내의 해로운 현상을 막아 주어 궁극적으로 여러 퇴행성 뇌질환 예방에 도움이 될 것으로 생각된다.

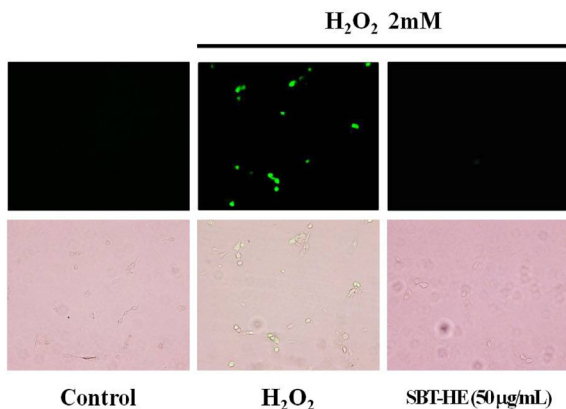
#### 세포생존율 측정

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포사멸에 비타민나무 발효물이 어떤 영향을 미치는지를 관찰하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하기 2시간 전에 비타민나무 발효물을 농도별로 처리하고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 2 mM/mL

로 처리하여 배양한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 세포의 생존율은 54.16%로 정상세포보다 45.83% 감소하였으나 발효물을 10 µg/mL 농도로 처리한 세포의 생존율은 68.80%였고 100 µg/mL를 처리한 농도에서는 생존율이 75.75%로 나타남으로써 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만을 처리에 비하여 유의한 증가를 나타냈으며( $P<0.01$ ), 정상세포 수준으로 회복되는 것이 확인되었다(Fig. 7). 인체의 대사과정에서 소량 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 항산화 효소에 의해 아무런 영향이 없지만(56), 뇌허혈이나 근위축성측삭경화증(ALS)과 같은 병리적 상태에서는 뇌 조직에 과량 축적됨으로써 세포독성을 나타내게 된다(57,58). 특히 뇌 조직에서 다량의 iron과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 상호작용에 의해 산화적 스트레스로부터 신경세포의 사멸이 촉진된다고 보고된 바 있다(59,60). 따라서 비타민나무 발효물에 의한 세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과는 뇌 조직에서의 신경세포 사멸



**Fig. 7.** Protective effects of fermented sea buckthorn leaves with *H. erinaceum* mycelium (SBT-HE) on cell death induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. NIH3T3 fibroblast cells were treated with 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence or absence of varying concentrations of SBT-HE for 24 h, and cell viabilities were estimated by with a colorimetric assay using MTT. The values represent the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. \*\* $P<0.01$ .



**Fig. 8.** Protective effects of fermented sea buckthorn leaves with *H. erinaceum* mycelium (SBT-HE) on the generation of ROS induced by  $H_2O_2$ . 2 mM  $H_2O_2$  was added to the cells for 40 min, and then examined by fluorescence microscopy after staining with DCF-DA.

억제에 영향을 줄 것으로 생각된다.

#### ROS 생성에 대한 영향

세포 내 ROS 생성에 발효물이 미치는 영향을 관찰하였다. 다음 그림의 control 표시 부분의 상단에 나타나는 형광 정도에 비해  $H_2O_2$  표시 상단에 나타나는 형광 정도가 더 높게 나타났다. 이는  $H_2O_2$  처리 세포에서 ROS가 생성되었음을 나타낸 것이며 여기에 비타민나무 발효물 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 결과 형광 정도가 현저히 감소됨을 알 수 있었다 (Fig. 8). ROS에 의한 산화적 스트레스는 apoptosis를 촉진시키는 가장 큰 요인으로 알려져 있으며(61), ROS의 생성 증가는 뇌 해마에서의 항산화 수준 감소, malondialdehyde와 caspase-3 과발현 촉진으로 인한 신경 손상과 사멸을 가속화시킨다고 알려져 있다(62-64). 이상과 같은 결과들을 통해 비타민나무 발효물의 항산화 활성과  $H_2O_2$ 에 의해 유도된 세포사멸 억제능 및 세포 내 ROS 소거능과 상관관계가 있으며, 이러한 활성이 ROS에 의해 야기되는 노화 및 퇴행성 질환을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 요 약

본 연구에서는 노루궁뎅이 버섯균사체를 비타민나무 잎에 배양하여 조제한 노루궁뎅이 버섯균사체-비타민나무 발효물 열수 추출물이 생체고분자의 산화적 손상과 세포사멸을 보호할 수 있는지를 관찰하였다. 노루궁뎅이 버섯균사체-비타민나무 발효물의 항산화 활성을 DPPH radical, ABTS radical, peroxy radical 소거활성 측정을 통해 알아보았다. 그 결과 노루궁뎅이 버섯균사체-비타민나무 발효물을 처리한 DPPH radical 소거활성은 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 65.06%, ABTS radical 소거활성은 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 98.83%, peroxy radical 소거활성은 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 44.03%로 높은 항산화 활성을 나타내었다. 노루궁뎅이 버

섯균사체-비타민나무 발효물은 DNA의 산화적 손상을 효과적으로 억제하였다. 노루궁뎅이 버섯균사체-비타민나무 발효물 역시 사람의 혈청단백질과 Cu,Zn-SOD의 산화적 손상을 억제하였다. 세포에  $H_2O_2$ 를 처리하였을 때 세포생존율에 비하여 발효물을 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 전 처리한 세포생존율은 21.59% 높게 증가되었다. 또한 발효물을 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리했을 경우 세포 내 ROS의 축적이 유의적으로 감소되었다. 따라서 노루궁뎅이 버섯균사체-비타민나무 발효물은 항산화 활성뿐만 아니라 산화적 스트레스에 의해 야기되는 세포 독성에 대한 보호 작용이 뛰어난 것으로 사료된다.

#### 감사의 글

본 연구는 2013년도 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업육성(R&D) 기술개발사업(과제번호: R0002323)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

#### REFERENCES

1. Heinäaho M, Puseenius J, Julkunen-Tiitto R. 2006. Effects of different organic farming methods on the concentration of phenolic compounds in sea buckthorn leaves. *J Agric Food Chem* 56: 7678-7685.
2. Beveridge T, Li TS, Oomah BD, Smith A. 1999. Sea buckthorn products: manufacture and composition. *J Agric Food Chem* 47: 3480-3488.
3. Eccleston C, Baoru Y, Tahvonen R, Kallio H, Rimbach GH, Minihane AM. 2002. Effects of an antioxidant-rich juice (sea buckthorn) on risk factors for coronary heart disease in humans. *J Nutr Biochem* 13: 346-354.
4. Zeb A. 2004. Important therapeutic uses of sea buckthorn (*Hippophae*): a review. *J Biological Sciences* 4: 687-693.
5. Chauhan AS, Negi PS, Rameke RS. 2007. Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) seeds. *Fitoterapia* 78: 590-592.
6. Padwad Y, Ganju L, Jain M, Chanda S, Karan D, Kumar Banerjee P, Chand Sawhney R. 2006. Effect of leaf extract of Seabuckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 6: 46-52.
7. Tiffany TYG, Stefan C, Arnie H. 2005. Effect of drying on the nutraceutical quality of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. sinensis) leaves. *J Food Sci* 70: 514-518.
8. Geetha S, Sai Ram M, Mongia SS, Singh V, Ilavazhagan G, Sawhney RC. 2003. Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) on chromium (VI) induced oxidative stress in albino rats. *J Ethnopharmacol* 87: 247-251.
9. Mizuno T, Wasa T, Ito H, Suzuki C, Ukai N. 1992. Antitumor-active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, an edible and medicinal mushroom called yamabushitake or houtou. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 347-348.
10. Yang BK, Park JB, Song CH. 2003. Hypolipidemic effect of an exo-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Hericium erinaceum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1292-1298.
11. Kim H, Park CK, Jeong JH, Jeong HS, Lee HY, Yu KW.

2009. Immune stimulation and anti-metastasis of crude polysaccharide from submerged culture of *Hericium erinaceum* in the medium supplemented with Korean ginseng extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1535-1542.
12. Kim H, Jeong JH, Hwang JH, Jeong HS, Lee HY, Yu KW. 2010. Enhancement of immunostimulation and anti-metastasis in submerged culture of bearded tooth mushroom (*Hericium erinaceum*) mycelia by addition of ginseng extract. *Food Sci Biotechnol* 19: 1259-1266.
  13. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* 28: 25-30.
  14. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
  15. Kang JH, Kim SM. 1997. DNA cleavage by hydroxyl radicals generated in the Cu,Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system. *Mol Cells* 7: 777-782.
  16. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
  17. Ahn EH, Kim DW, Shin MJ, Kim YN, Kim HR, Woo SJ, Kim SM, Kim DS, Kim J, Park J, Eum WS, Hwang HS, Choi SY. 2013. PEP-1-ribosomal protein S3 protects dopaminergic neurons in an MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *Free Radic Biol Med* 55: 36-45.
  18. Kim MJ, Kim DW, Park JH, Kim SJ, Lee CH, Yong JI, Ryu EJ, Cho SB, Yeo HJ, Hyeon J, Cho SW, Kim DS, Son O, Park J, Han KH, Cho YS, Eum WS, Choi SY. 2013. PEP-1-SIRT2 inhibits inflammatory response and oxidative stress-induced cell death via expression of antioxidant enzymes in murine macrophages. *Free Radic Biol Med* 63: 432-445.
  19. McKee T, McKee JR. 2002. *Biochemistry: the molecular basis of life*. McGraw-Hill, New York, NY, USA. p 319-324.
  20. Oh YJ, Seo HR, Choi YM, Jung DS. 2010. Evaluation of antioxidant activity of the extracts from the aerial parts of *Cnidium officinale* Makino. *Korean J Medicinal Crop Sci* 18: 373-378.
  21. Hermann K. 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 28: 315-347.
  22. Yusof S, Ghazali HM, King GS. 1990. Naringin content in local citrus fruits. *Food Chem* 37: 113-121.
  23. Heo SI, Jung HJ, Kim MK, Wang MH. 2007. Antioxidative activities and tyrosinase inhibitory effects of Korean medicinal plants. *J Appl Biol Chem* 50: 115-119.
  24. Lee YM, Bae JH, Jung HY, Kim JH, Park DS. 2011. Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean edible wild plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 29-36.
  25. Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized method for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplement. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.
  26. Pang X, Zhao J, Zhang W, Zhuang X, Wang J, Xu Z, Qu W. 2008. Antihypertensive effect of total flavones extracted from seed residues of *Hippophae rhamnoides* L. in sucrose-fed rats. *J Ethnopharmacol* 117: 325-331.
  27. Kim KM, Park MH, Kim KH, Im SH, Park YH, Kim YN. 2009. Analysis of chemical composition and *in vitro* anti-oxidant properties of extracts from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). *J Appl Biol Chem* 52: 58-64.
  28. Niki E, Kawakami A, Saito M, Yamamoto Y, Tsuchiya J, Kamiya Y. 1985. Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J Biol Chem* 260: 2191-2196.
  29. Sawa T, Akaike T, Kida K, Fukushima Y, Takagi K, Maeda H. 1998. Lipid peroxyl radicals from oxidized oils and heme-iron: implication of a high-fat diet in colon carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 1007-1012.
  30. Dix TA, Aikens J. 1993. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol* 6: 2-18.
  31. Niki E. 1987. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44: 227-253.
  32. Hiramoto K, Johkoh H, Sako K, Kikugawa K. 1993. DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). *Free Radic Res Commun* 19: 323-332.
  33. Landi L, Fiorentini D, Galli MC, Sequera-Aquilar J, Beyer RE. 1997. DT-Diaphorase maintains the reduced state of ubiquinones in lipid vesicles thereby promoting their antioxidant function. *Free Radic Biol Med* 22: 329-335.
  34. Ames BN. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221: 1256-1264.
  35. Cerutti PA. 1985. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375-381.
  36. Sagripanti JL, Kraemer KH. 1989. Site-specific oxidative DNA damage at polyguanosines produced by copper plus hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 264: 1729-1734.
  37. Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
  38. Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. 2001. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res* 488: 65-76.
  39. Stadtman ER, Berlett BS. 1991. Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J Biol Chem* 266: 17201-17211.
  40. Davies KJ, Delsignore ME. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem* 262: 9908-9913.
  41. Levine RL, Oliver CN, Fulsks RM, Stadtman ER. 1981. Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2120-2124.
  42. Rivett AJ, Levine RL. 1990. Metal-catalyzed oxidation of *Escherichia coli* glutamine synthetase: correlation of structural and functional changes. *Arch Biochem Biophys* 278: 26-34.
  43. Hashimoto M, Takeda A, Hsu LJ, Takenouchi T, Maslah E. 1999. Role of cytochrome c as a stimulator of alpha-synuclein aggregation in Lewy body disease. *J Biol Chem* 274: 28849-28852.
  44. Carden MJ, Trojanowski JQ, Schlaepfer WW, Lee VM. 1987. Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J Neurosci* 7: 3489-3504.
  45. Perrot R, Eyer J. 2009. Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders. *Brain Res Bull* 80: 282-295.
  46. Kyeong IG, Eum WS, Choi SY, Kang JH. 2013. Oxidative modification of neurofilament-L and neuronal cell death induced by the catechol neurotoxin, tetrahydropapaveroline. *Toxicol Lett* 217: 59-66.
  47. Scott MD, Meshnick SR, Eaton JW. 1987. Superoxide dismutase-rich bacteria. Paradoxical increase in oxidant toxicity. *J Biol Chem* 262: 3640-3645.
  48. Scott MD, Meshnick SR, Easton JW. 1989. Superoxide dis-



- mutase amplifies organismal sensitivity to ionizing radiation. *J Biol Chem* 264: 2498-2501.
49. Amstad P, Moret R, Cerutti P. 1994. Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu,Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress. *J Biol Chem* 269: 1606-1609.
  50. Elroy-Stein O, Groner Y. 1988. Impaired neurotransmitter uptake in PC12 cells overexpressing human Cu/Zn-superoxide dismutase--implication for gene dosage effects in Down syndrome. *Cell* 52: 259-267.
  51. Elroy-Stein O, Bemstein Y, Groner Y. 1986. Overproduction of human Cu/Zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. *EMBO J* 5: 615-622.
  52. Ceballos-Picot I, Nichole A, Briand P, Grimber G, Delacourte A, Defossez A, Javoy-Aqid F, Lafon M, Blouin JL, Sinet PM. 1991. Neuronal-specific expression of human copper-zinc superoxide dismutase gene in transgenic mice: animal model of gene dosage effects in Down's syndrome. *Brain Res* 552: 198-214.
  53. Serra JA, Famulari AL, Kohan S, Marschoff ER, Dominguez RO, de Lustig ES. 1994. Copper-zinc superoxide dismutase activity in red blood cells in probable Alzheimer's patients and their first-degree relatives. *J Neurol Sci* 122: 179-188.
  54. Kushleika J, Checkoway H, Woods JS, Moon JD, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD. 1996. Selegiline and lymphocyte superoxide dismutase activities in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 39: 378-381.
  55. Fitzgerald DJ. 1995. Zinc and Alzheimer's disease. *Science* 268: 1920-1923.
  56. Heilmann L, Calis I, Kirmizibekmez H, Schuhly W, Harput S, Sticher O. 2000. Radical scavenger activity of phenylethanoid glycosides in FMLP stimulated human polymorphonuclear leukocytes: structure-activity relationships. *Planta Med* 66: 746-748.
  57. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung WY, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Lain NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown Jr RH. 1993. Mutation in Cu,Zn-superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature (London)* 362: 59-62.
  58. Lee HJ, Lee BJ, Lee DS, Seo Y. 2003. DPPH radical scavenging effect and *in vitro* lipid peroxidation inhibition by *Portulaca oleracea*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 165-169.
  59. Halliwell B, Gutteridge JM. 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Mol Aspects Med* 8: 89-193.
  60. Radak Z, Kumagai S, Taylor AW, Naito H, Goto S. 2007. Effects of exercise on brain function: role of free radical. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 942-946.
  61. Groszami R, Dawson G. 2000. Does ceramide play a role in neural cell apoptosis? *J Neurosci Res* 60: 141-149.
  62. Chen CF, Lang SY, Zuo PP, Yang N, Wang XQ, Xia C. 2006. Effects of D-galactose on the expression of hippocampal peripheral-type benzodiazepine receptor and spatial memory performances in rats. *Psychoneuroendocrinology* 31: 805-811.
  63. Cui X, Zuo P, Zhang Q, Li X, Hu Y, Long J, Packer L, Liu J. 2006. Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid. *J Neurosci Res* 83: 1584-1590.
  64. Sun WS, Yu HQ, Zhang H, Zheng YL, Wang JJ, Luo L. 2007. Quercetin attenuates spontaneous behavior and spatial memory impairment in D-galactose-treated mice by increasing brain antioxidant capacity. *Nutr Res* 27: 169-175.