

삼채 뿌리의 항산화 및 수명연장 효과

이은별¹ · 김준형¹ · 양재현² · 김영수³ · 전현일³ · 기별희³ · 이성현⁴ · 김유석⁵ · 한순천¹ · 김대근^{1*}
¹우석대학교 약학대학, ²전북대학교 헬스케어기술개발사업단, ³전북대학교 식품공학과,
⁴농촌진흥청 국립농업과학원 기능성식품과, ⁵순창군농업기술센터

Antioxidant and Longevity Properties of the Root of *Allium hookeri* in *Caenorhabditis elegans*

Eun Byeol Lee¹, Jun Hyeong Kim¹, Jae Heon Yang², Young-Soo Kim³, Hyun-Il Jun³, Byeolhui Ki³,
Sung-Hyen Lee⁴, You-Suk Kim⁵, Sooncheon Han¹ and Dae Keun Kim^{1*}

¹College of Pharmacy, Woosuk University, Jeonju 565-701, Korea

²Center for Healthcare Technology Development, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

³Development of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 570-752, Korea

⁴Functional Food & Nutrition Division, Department of Agro-food Resources, RDA, Iseo 565-851, Korea

⁵Sunchang County Agricultural Research Center, Sunchang 595-831, Korea

Abstract – *Allium hookeri* (Liliaceae), native to India is widely cultivated in Korea lately as a medicinal plant. This study was performed to evaluate the antioxidant and lifespan extending effects of the root of *A. hookeri*. Methanol extract from the root of *A. hookeri* was successively partitioned as methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol and H₂O soluble fractions. Antioxidant effects of the fractions were measured by measuring the radical scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), and superoxide quenching activities. Lifespan extending effects of the fractions were investigated using *Caenorhabditis elegans* model system. In addition, stress resistant, superoxide dismutase (SOD) and catalase activities, and intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were also studied. Furthermore, we had investigated aging-related factors such as reproduction, food intake, growth and movement of *C. elegans* to find any sample-induced significant change. Our results revealed that ethyl acetate soluble fraction from the root of *A. hookeri* showed the most potent antioxidant and lifespan extending effects, and this fraction elevated the most potent SOD and catalase activities of worms, and reduce intracellular ROS accumulation.

Key words – *Allium hookeri*, *Caenorhabditis elegans*, Antioxidant, Lifespan

노화는 모든 동물에 피할 수 없는 자연현상으로 다양한 요인 즉 유전적, 환경적, 생활방식 등의 복합적인 요인에 의해 발생하여 결과적으로 질병을 발생시키고 사망의 위험을 증가시킨다. 지금까지의 노화와 관련된 확실한 기전은 아직도 많은 논란이 있으나 free radical 등의 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress)가 주요 요인으로 설명되고 있다.^{1,2)} 활성 산소종에는 hydroxyl radical(•OH), superoxide radical(•O₂), singlet oxygen(¹O₂)과 hydrogen peroxide(H₂O₂) 등이 알려져 있으며, 이들 중 hydroxyl radical이 가장 강하고 위험한

활성을 가지며 주변의 세포를 바로 공격한다.³⁾ 미토콘드리아의 ATP 생산을 위한 부산물로 발생하기도 하는 이러한 활성 산소종은 어느 정도의 양은 생체 내에서 필요하기도 하지만 일정량 이상에서는 세포 내의 단백질, 지질, DNA 등에 강력한 산화적 스트레스를 일으키는 물질로 노화의 원인으로 알려져 있다.^{4,5)} 따라서 인체 내의 노화를 촉진하며 질병을 야기할 수 있는 활성 산소종의 생성을 억제하거나 제거할 수 있는 자원의 발굴이 필요하며, 실제로 천연물 유래 화합물들이 활성 산소종의 생성을 방지하거나 제거하여 산화적 스트레스를 방지해 노화를 지연시키고 수명을 연장할 수 있을 가능성에 대한 보고가 지속되고 있다.^{6,7)}

삼채(*Allium hookeri*)는 1,400 m 이상의 초고랭지에서 자

*교신저자(E-mail): dkkim@woosuk.ac.kr
(Tel): +82-63-290-1574

생하는 식물로 미얀마, 인도 등지에서 채소로 애용하고 있는 마늘, 파, 양파, 부추 등과 같은 백합과(Liliaceae)에 속한다. 현지에서는 염증질환과 암 등에 민간요법으로 사용되고 있는 것으로 알려져 있으며, 중국에서도 식용과 약용으로 사용되어 왔다.^{8,9)} 삼채의 성분과 관련된 연구로는 유향 함유 성분들과 총페놀성 성분, 총플라보노이드 외에는 보고된 것이 없으며,^{10,11)} 약리활성 연구로는 항염증 효과,^{12,13)} 당질 및 지질대사에 미치는 효과,^{14,15)} DPPH radical 소거능 및 NO 생성 억제능¹⁶⁾ 등이 보고되어 있다.

이 연구에서는 삼채 뿌리 추출물 용매 분획물의 DPPH radical 및 superoxide 소거능을 측정하고, 초파리, 마우스 등과 함께 수명연장 실험모델로 이용되는 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 사용하여 분획물의 수명연장 효능을 확인하였다. 또한, 수명연장의 기전적인 연구로 열과 산화적 스트레스에 대한 저항성을 확인하고, 선충 내의 항산화 효소인 SOD와 catalase의 활성을 확인하며, 세포 내의 ROS의 축적 억제 효능을 확인하여 삼채 뿌리 추출물이 수명연장에 미치는 효능을 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 삼채 뿌리는 2014년에 전북 순창군 농업기술센터에서 김유석 박사가 검증한 후 제공하여 실험에 사용하였으며, 표준품은 우석대학교 약학대학 생약표본실에 보관하고 있다(WSU-14-012).

추출 및 분획 - 삼채 뿌리 1 kg을 조말로 분쇄하여 methanol로 진탕하면서 50°C에서 5시간씩 3회 온침 추출하였다. 그 추출액을 수욕상에서 감압농축하여 methanol엑스 약 84 g을 얻었으며, 이 methanol 엑스를 증류수로 현탁시키고 상법에 따라 동량의 methylene chloride(6.30 g), ethyl acetate(1.24 g) 및 *n*-butanol(5.86 g)의 순으로 용매 분획하여 각각의 분획을 얻었다.

DPPH Free Radical 소거법에 의한 항산화활성 측정¹⁷⁾ - 96well plate에 시료를 ethanol로 각 농도 별로 조제한 용액에 13 µM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 일정량씩 가하였다. 10초간 진탕한 후 25°C에서 30분간 방치한 후 microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조약물은 L-ascorbic acid를 사용하였다. 항산화 효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도와 비교하여 그래프로 나타내었다. 각 시료에 대한 DPPH radical 소거작용을 3회 반복하여 측정하였다.

Riboflavin 유래 Superoxide 억제 활성^{18,19)} - 시료의 superoxide 억제능력은 methionine, riboflavin, NBT로 구성된 평가 시스템을 이용하여 광화학 작용을 측정하는 것이다. 반응 혼합액은 2.6 µM riboflavin, 3 mM methionine, 75 µM NBT, 0.1 mM EDTA, PBS(pH 7.4) 및 여러 농도의

시료로 이루어졌다. 혼합물은 light box에 넣은 후 5분마다 자리를 임의로 바꾸어 주면서 15분 동안 방치하였다. Light box 안의 온도는 20±1°C, 빛의 밝기는 5,500 lux를 유지하였다. NBT는 빛 아래에서 blue formazan으로 환원되며, blue formazan형성 억제능이 superoxide 억제능력인 된다. 이 생성물을 560 nm에서 측정하였다.

Xanthin유래 Superoxide 소거 활성 측정²⁰⁾ - Xanthine/xanthine oxidase에 의해 생성된 superoxide radical은 Thuong 등의 방법에 따라 측정하였다. Nitro blue tetrazolium(NBT, 100 µM), xanthine(250 µM)을 포함하는 phosphate buffer(pH 7.8, 20 mM)와 시료를 함께 혼합한다. 5분 후 xanthine oxidase(0.05 U/mL) 100 µL를 넣고, 37°C에서 30분간 배양시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide radical 소거 활성은 시료와 대조군의 NBT의 환원 정도를 비교하여 나타내었다.

Caenorhabditis elegans의 배양²¹⁾ - *C. elegans* (N2 : wild type)는 Caenorhabditis Genetic Center(CGC; University of Minnesota, Minneapolis, MN)로부터 제공받은 것을 사용하였으며, *Escherichia coli* OP50를 도말한 Nematode Growth Medium(NGM) agar plate에 20°C에서 배양하였다. 삼채 분획은 DMSO를 용매로 한 stock solution 상태로 멸균된 NGM plates(50°C)에 첨가되었으며, 최종 DMSO농도는 모든 상태에서 0.1%(v/v)를 유지하였다.

수명연장효능평가²²⁾ - 수명분석은 20°C에서 독립적으로 3회 실행하였다. 선충의 성장단계를 일치시키기 위해 NGM plate로부터 알만을 분리하여 삼채 분획 수용액(500 µg/mL)을 첨가한 각각의 plate에 옮겨 배양하였고 매일 생존을 확인하였다. 생존여부의 확인은 *C. elegans*를 platinum wire의 끝으로 자극했을 때의 반응을 통해 확인하였다.

스트레스 저항성 평가²³⁾ - 성장 단계가 동일한 선충을 각각의 분획별 plate에서 배양하였다(500 µg/mL). 온도에 의한 내성을 분석하기 위해 선충을 신선한 배지로 옮기고 성체가 된 후 4일째에 36°C에서 배양하여 시간 별로 생존율을 19시간 동안 측정하였다. 산화적 스트레스에 의한 내성은 기존의 방법을 약간 변형하여 평가하였으며, 성체가 된 후 7일째에 일시적으로 선충을 1 mM juglone이 함유된 M9 buffer가 담긴 96 well plate의 well에 옮기고 시간 별로 생존율을 확인하였다(500 µg/mL).

선충 체내의 항산화 효소(SOD, Catalase) 활성 측정^{24,25)} - 성장 단계가 동일한 N2 선충을 각각의 분획별 plate에서 배양하였다(500 µg/mL). 성체가 된 후 4일째에 선충을 모아 M9 buffer로 3회 세척 후 분쇄하여 효소활성 측정에 사용하였다(homogenization buffer: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5). SOD 활성은 Ibrahim 등의 방법을 응용하여 측정하였다. 먼저 10 mM phosphate buffer(pH 8.0)를 용매로 반응혼합물(1.6 mM xanthine과

0.48 mM NBT) 0.49 mL를 만든 뒤 sample 10 μ L와 37°C에서 5분간 pre-incubation시켰다. 그 후 xanthine oxidase 1 mL(0.05 U/mL)을 첨가하고 37°C에서 다시 20분 동안 incubation시킨 다음 69 mM SDS로 반응을 멈추고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catalase activity는 Aebi의 방법을 응용하여 25 mM H₂O₂에 시료 50 μ L(500 μ g/mL)를 3분 동안 반응시키고 240 nm에서 흡광도를 측정하였다.

선충 세포 내 활성 산소종(ROS) 분석²⁶⁾ - 세포 내 활성 산소종은 2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate(H₂DCF-DA)를 사용하여 측정하였다. 성장 단계가 동일한 N2 선충을 각 분획별 plate에서 배양하였다(500 μ g/mL). 성체가 된 후 4일째 50 μ M juglone을 함유한 M9 buffer에 넣고 2시간 노출시킨 뒤 96 well plate에 담긴 50 μ L M9 buffer에 5마리씩 옮겼다. 마지막으로 25 μ M H₂DCF-DA 50 μ L를 첨가한 뒤 여기 485 nm, 방출 535 nm에서 흡광도를 각각 측정하였다.

노화 관련인자 분석 - 삼채 분획 수용액을 처리한 plate에서 성장 단계가 동일한 N2 선충을 배양하였다. 생식능 측정은 모체와 자손을 구별하기 위해 L4 유충을 개별적으로 매일 깨끗한 plate에 옮겼으며, 자손은 L2 또는 L3 단계에서 계산되었다. 그리고 선충의 식이량을 알아보기 위해 4, 8일이 된 성충을 깨끗한 NGM plate로 옮겨 1분 동안 인두의 움직임을 측정하였다. 또한 선충의 몸길이는 4일째, 운동량은 성체 4일, 8일째에 측정하였다. 몸길이와 운동량은 Olympus software(Olympus, Japan)를 이용해 분석하였고 모든 실험은 동일하게 수회 반복하였다. 모두 각 분획물 500 μ g/mL 농도에서 실험을 진행하였다.

통계 분석 - 통계 자료의 값은 평균값±표준오차(mean±S.E.M.)로 표시 하였다. 그룹 간의 통계적 유의성 검정은 Student's t-test를 통해서 분석하였고 선충의 연속적인 생존도는 Log-rank test분석 방법을 이용하였다. p값은 * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

DPPH Radical 소거능 - 삼채 뿌리 분획 중에서, DPPH radical 소거 효과는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 분획들 중 ethyl acetate분획(IC₅₀; 41.2 μ g/mL)이 비타민 C(IC₅₀; 10.3 μ g/mL)보다는 낮았지만 가장 높은 DPPH free radical 소거 효과를 나타내었다.

Riboflavin 유래 Superoxide 소거 활성 - Riboflavin 유래 superoxide quenching 활성에서는 대조군 비타민 C가 IC₅₀ 값이 31.6 μ g/mL로 superoxide quenching 활성을 보였으며, 삼채 뿌리 분획 중 ethyl acetate분획은 IC₅₀값이 199.2 μ g/mL로 농도의존적으로 superoxide quenching 활성을 나타냈

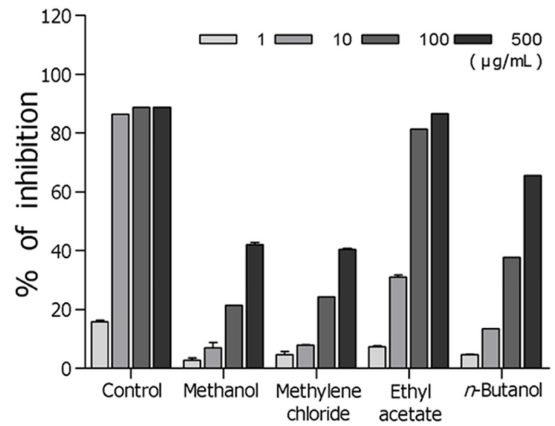


Fig. 1. DPPH radical scavenging effects of the methanol extract, and its fractions from *Allium hookeri*.

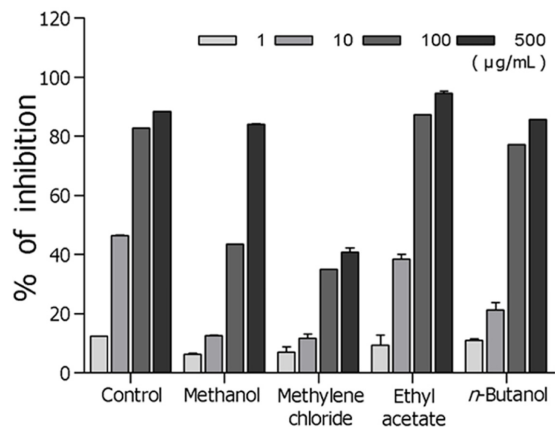


Fig. 2. Riboflavin-originated superoxide quenching activities of fractions from *A. hookeri*.

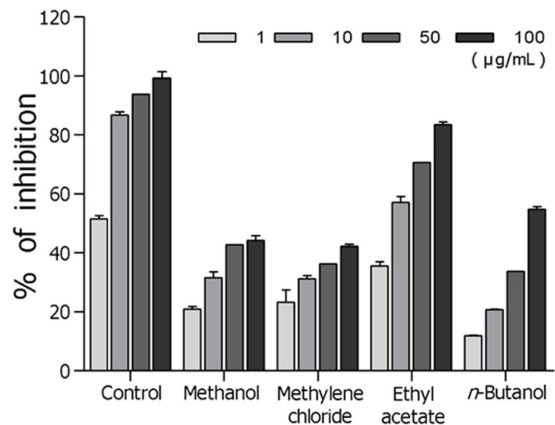


Fig. 3. Xanthine-originated superoxide quenching activities of methanol extract, and its fractions from *A. hookeri*.

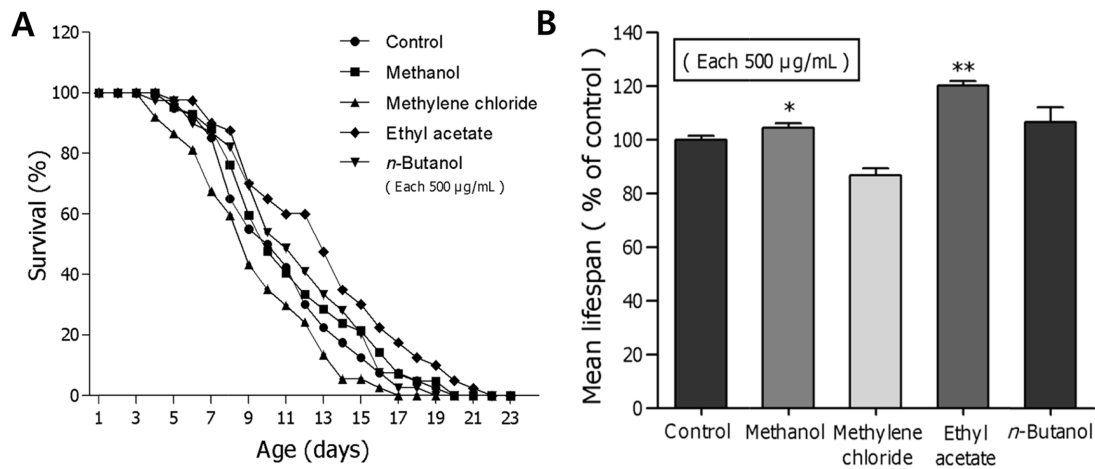


Fig. 4. Effects of fractions from *A. hookeri* on the lifespan of wild-type N2 nematodes. Worms were grown in the NGM agar plate at 20°C in the absence or presence of fractions from *A. hookeri*. The number of worms used per each lifespan assay experiment was 37-42 and three independent experiments were repeated (N=3). (A) The mortality of each group was determined by daily counting of surviving and dead animals. (B) The mean lifespan of the N2 worms was calculated from the survival curves. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test. Error bars represent the standard error of mean (S.E.M.). Differences compared to the control were considered significant at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by one-way ANOVA.

Table I. Effects of fractions from *Allium hookeri* on the lifespan of *C. elegans*

Fraction	Mean Lifespan (day)	Maximum lifespan (day)	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
Control	10.9±0.5	19	-	-
Methanol	11.3±0.4	19	4.4	* $p < 0.05$
Methylene chloride	9.4±0.5	16	-13.2	-
Ethyl acetate	13.1±0.4	21	20.1	** $p < 0.01$
n-Butanol	11.6±0.4	18	6.5	-

Mean lifespan presented as mean±S.E.M data. Change in mean lifespan compared with control group (%). Statistical significance of the difference between survival curves was determined by log-rank test using the Kaplan-Meier survival analysis. Differences compared to the control were considered significant at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

다(Fig. 2).

Xanthin 유래 Superoxide 소거 활성 – 시료와 대조군의 NBT의 환원정도를 비교하는 xanthine 유래 superoxide quenching 활성에서는 삼채 뿌리의 ethyl acetate분획이 IC₅₀ 값이 1.8 µg/mL로 비타민 C(IC₅₀; 0.5 µg/mL)와 비교해 볼 때 비교적 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3).

삼채 뿌리 분획의 선충(C. elegans) 수명 연장효능 – 야생형 N2 선충을 이용하여 삼채 뿌리 분획은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 분획 중 ethyl acetate분획이 선충의 수명을 가장 크게 증가시켰다. 대조군의 평균 수명 시간은 10.9±0.5 일인 반면, ethyl acetate분획은 선충의 평균 수명을 13.1±0.4 일로 20.1%의 수명연장 효능을 나타냈다(** $p < 0.01$)(Fig. 4, Table I).

스트레스 저항성 증가 효능 – 삼채 뿌리 분획이 선충의

스트레스 저항성에 미치는 영향은 고온 및 산화적 스트레스 조건에서 선충을 배양하여 생존율을 확인하였다. 선충에게 고온 조건인 36°C에서 생존율을 관찰한 결과 대조군은 2시간 만에 죽기 시작하여 15시간에 모두 사멸한 반면 삼채 뿌리 분획 처리군은 ethyl acetate분획과 n-butanol분획에서 각각 19시간, 17시간으로 생존율이 향상되었다. 대조군의 평균 생존시간이 9.8±0.4시간이었으나 ethyl acetate분획 처리군은 11.7±0.8시간(* $p < 0.05$)으로, n-butanol분획 처리군은 11.9±0.6시간(** $p < 0.01$)으로 각각 13.5%와 15.5% 평균 생존 시간을 향상시켰다(Fig. 5A, Table II). 선충에 산화적 스트레스를 유도하기 위해서 1 mM juglone이 함유된 M9 buffer가 담긴 96 well plate에서 배양한 대조군 선충의 최고 생존시간은 12시간이었으나, ethyl acetate분획은 생존시간을 17시간으로 가장 크게 증가시켰다. 평균 생존시간은 대

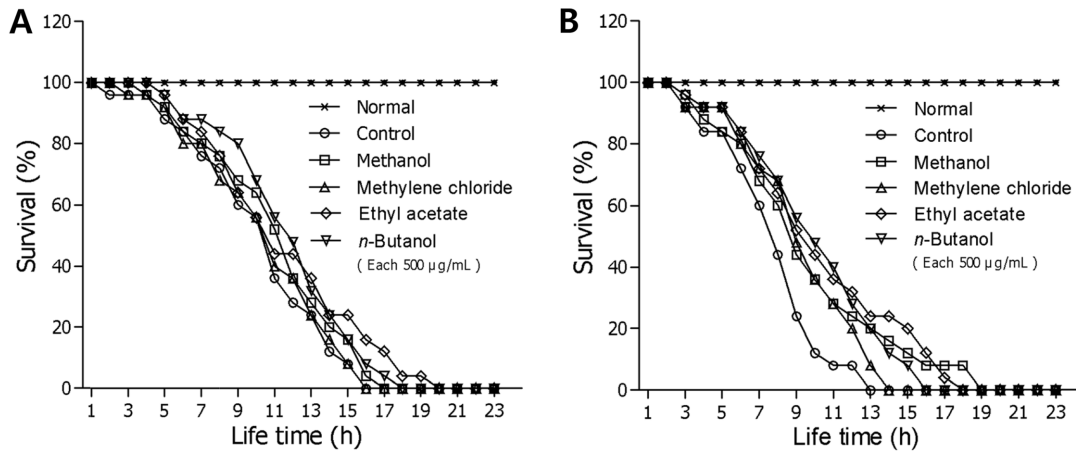


Fig. 5. Effects of fractions from *A. hookeri* on the stress tolerance of wild-type N2 nematodes. (A) To assess thermal tolerance, worms were incubated at 36°C and then their viability was scored. (B) For the oxidative stress assays, worms were transferred to 96-well plate containing 1 mM of juglone liquid culture, and then their viability was scored. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test. All experiments were done in triplicates.

Table II. Effects of fractions from *Allium hookeri* on the stress tolerance of *C. elegans*

Stress condition	Fraction	Mean lifespan (h)	Maximum lifespan (h)	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
36°C thermal tolerance	Control	10.3±0.7	15	-	-
	Methanol	11.1±0.7	16	8.1	-
	Methylene chloride	10.5±0.7	15	2.3	-
	Ethyl acetate	11.7±0.8	19	13.5	* <i>p</i> <0.05
	n-Butanol	11.9±0.6	17	15.5	** <i>p</i> <0.01
1 mM Juglone	Control	7.8±0.5	12	-	-
	Methanol	9.8±0.8	18	24.3	* <i>p</i> <0.05
	Methylene chloride	9.3±0.6	13	18.7	-
	Ethyl acetate	10.4±0.8	17	32.9	** <i>p</i> <0.01
	n-Butanol	10.1±0.7	15	28.9	-

Mean lifespan presented as mean±S.E.M data. Change in mean lifespan compared with control group (%). Statistical significance of the difference between survival curves was determined by log-rank test using the Kaplan-Meier survival analysis. Differences compared to the control were considered significant at **p*<0.05 and ** *p*<0.01.

조균의 평균 생존시간이 7.8±0.5시간이었으나 ethyl acetate분획 처리군은 평균 생존 시간이 10.45±0.8시간으로 32.9%의 생존 시간을 향상시켰다(***p*<0.01)(Fig. 5B, Table II).

선충 체내의 항산화 효소(SOD, Catalase) 활성 증가 효능 - xanthine을 기질로 xanthine oxidase의 효소반응 과정에서 생성되는 superoxide anion을 활용하여 SOD의 활성을 측정하였다. Fig. 6A에서 보는 바와 같이 선충의 ethyl acetate 투여군이 SOD의 활성을 가장 높게 증가시켰으며, 분획들 중 ethyl acetate분획 투여군은 대조군과 비교하여 SOD 활성을 약 15.7% 정도 증가시켰다(***p*<0.01). SOD에 의해 생성된 hydrogen peroxide 역시 강력한 반응성을 가진

활성 산소종으로 체내에서는 catalase에 의해 대사되는데, Fig. 6B에서 나타난 바와 같이 분획들 중 ethyl acetate분획 투여군은 대조군에 비해 catalase 활성을 약 5% 정도 증가시켰으나 유의성은 나타나지 않았다.

선충 세포내 활성 산소종(ROS) 감소 효능 - 삼채 뿌리 분획의 세포 내 활성 산소종의 감소 효능을 알아보기 위해 H₂DCF-DA와 선충 내부의 활성 산소종을 반응시켜 형광을 관찰하였다. 활성 산소종 형광의 감소 폭은 대조군과 비교하여 ethyl acetate층 투여군에서 약 12.1%(***p*<0.01)로 관찰되고, 활성 산소종을 감소시키는 것으로 확인되었다(Fig. 7).

노화 관련인자의 변화 - 삼채 뿌리 분획 처리가 선충의

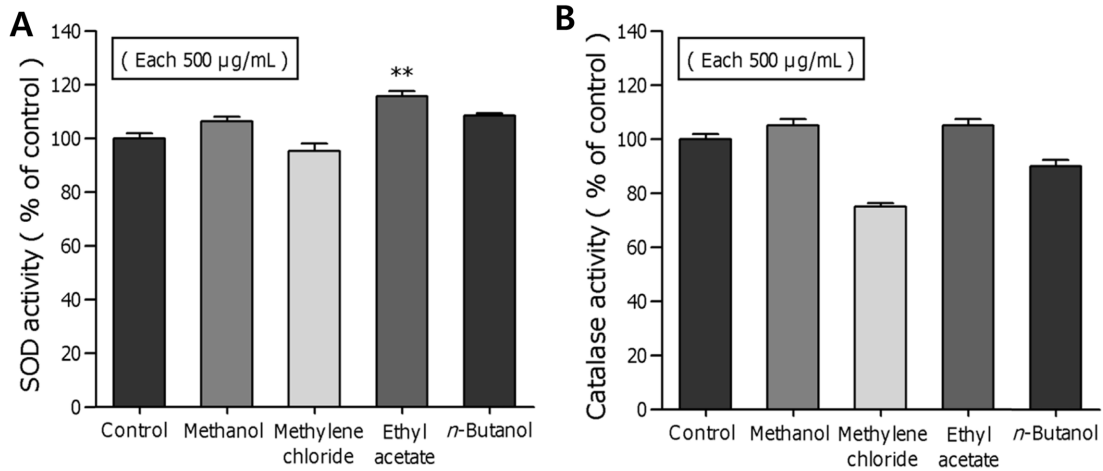


Fig. 6. Effects of fractions from *A. hookeri* on the stress resistance proteins of wild type N2 nematodes. (A) The enzymatic reaction of xanthine with xanthine oxidase was used to generate $\bullet\text{O}_2^-$ and the SOD activity was estimated spectrophotometrically through formazan formation by NBT reduction. SOD activity was expressed as a percentage of the scavenged amount per control. (B) Catalase activity was calculated from the concentration of residual H_2O_2 , as determined by a spectrophotometric method. Catalase activity was expressed in U/mg protein. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (N=3). Differences compared to the control were considered significant at $**p<0.01$ by one-way ANOVA.

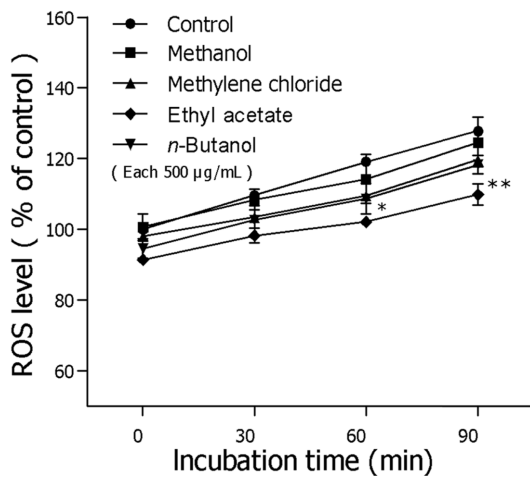


Fig. 7. Effects of fractions from *A. hookeri* on the intracellular ROS accumulation of wild-type N2 nematodes. The worms were incubated with 50 μM juglone for 2 h, and subsequently treated with the fluorescent probe $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$. Intracellular ROS accumulation was quantified spectrometrically at excitation 485 nm and emission 535 nm. Plates were read 30 min for 90 min. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (N=3). Differences compared to the control were considered significant at $*p<0.05$ and $**p<0.01$ by one-way ANOVA.

수명 메커니즘에 미치는 영향을 확인하기 위해, 생식, 섭식, 몸길이, 운동량을 측정하였다. 대조군에 비하여 선충의 생식과 4일과 8일째 식이량, 몸길이에 분획 중 ethyl acetate

층에 미세한 증가는 있었으나 영향을 미치지 않았다(Fig. 8A-8C). 그러나 4일과 8일째 선충의 움직임을 측정된 결과 4일째는 큰 차이를 보이지 않았으나 8일째에 분획 중 ethyl acetate층의 이동량이 증가하는 것이 확인되었다(Fig. 8D).

고찰

삼채 뿌리 분획 중 ethyl acetate분획은 DPPH radical과 superoxide 소거시험에서 가장 강한 소거활성을 보여 주었다. 이는 삼채는 항염증 효과가 보고되어 있으며,^{12,13)} DPPH radical 소거능과 NO 생성억제효과 있음이 보고된¹⁶⁾ 것과 같은 항산화 효능 보고와 부합되는 결과이다. 약 3주 정도의 짧은 수명을 가지고 있어 수명관련 실험에 널리 사용되는 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)을 모델로 사용하여 삼채 뿌리 분획에 대해 각각의 수명연장에 대한 실험을 하였다.²⁷⁾ 삼채 뿌리 분획에 따른 수명비교실험을 위해 일반적인 배양환경에서 야생형 N2 선충을 이용하였으며, 시간에 따른 선충의 생존율을 측정된 결과 ethyl acetate분획이 가장 높은 유의성 있는 생존율을 나타냈다. 선충의 수명 연장 효능은 선충의 생존과 수명에 영향을 주는 스트레스와 관련이 되어 있으므로 생존율과 수명연장에 영향을 미치는 열과 산화적 스트레스 조건에서 선충의 저항성을 측정하였다.²⁸⁾ 열 스트레스 조건에서 삼채 뿌리 분획 중 n-butanol분획과 ethyl acetate분획을 처리한 선충군들이 유사한 효능을 나타냈으며 대조군에 비해 높은 생존율을 보여 주었다. Juglone으로 유발시킨 산화적 스트레스 조건에서는 ethyl acetate분획을 처리한 선충

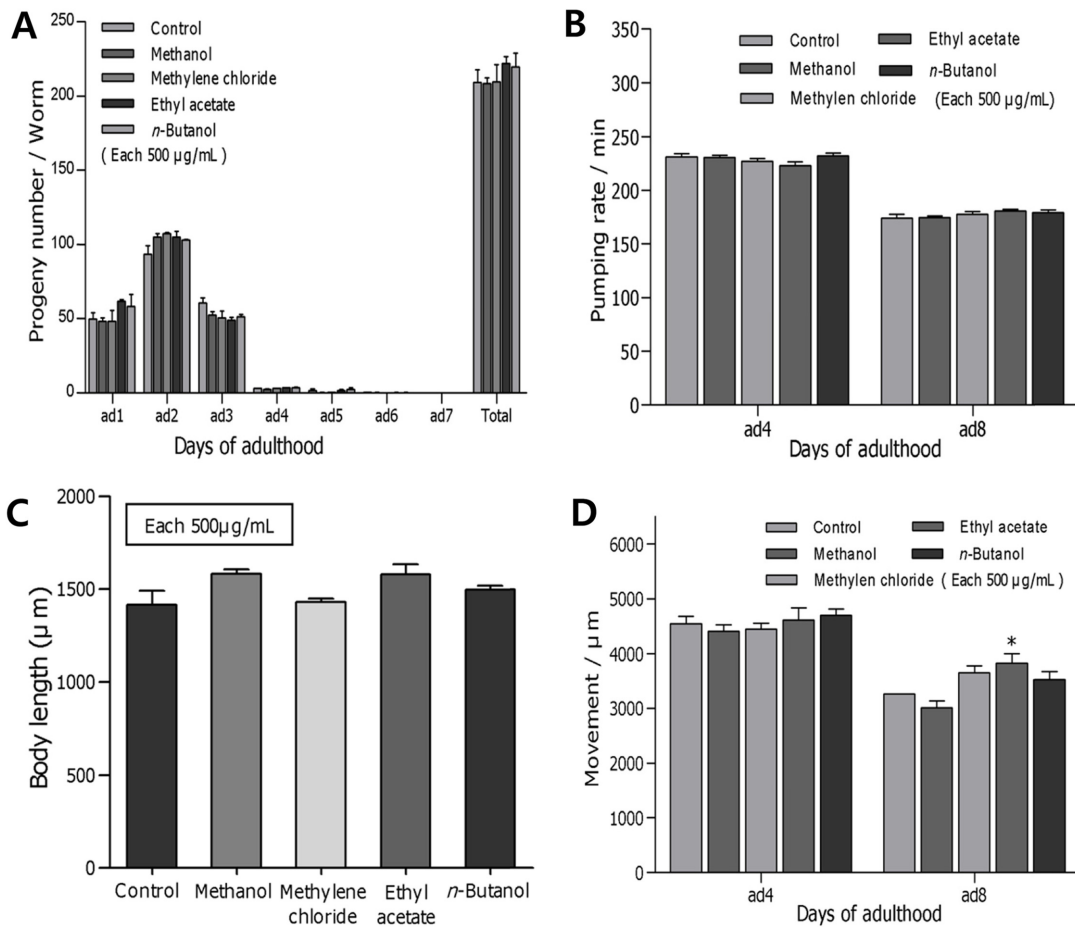


Fig. 8. Effects of fractions from *A. hookeri* on the various aging-related factors of wild-type N2 nematodes. (A) Daily and total reproductive outputs were counted. The progeny was counted at the L2 or L3 stage. (B) On the 4th days of adulthood, the pharyngeal pumping rates were measured. (C) For the growth alteration assay, photographs were taken of worms and the body length of each animal was analyzed. (D) The body movements were counted under a dissecting microscope for 10 seconds. Data are expressed as the mean±S.E.M. of three independent experiments (N=3). Differences compared to the control were considered significant at * $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

균이 대조군에 비해 가장 높은 생존율을 나타냈다. 항스트레스 능력은 노화방지 및 수명연장과 관련이 있다는 다수의 보고가 있으며,^{29,31)} 삼채 뿌리 추출물이 선충의 스트레스에 대한 저항력을 높여 선충의 수명연장에 영향을 미칠 수 있을 것으로 추측할 수 있다. 보고에 따르면 활성 산소종은 미토콘드리아의 에너지 대사과정, 세포의 손상, phagocytosis 및 주변의 산화물 등에 의해 부산물로 생성하며, 강한 산화적 스트레스를 야기시켜 암을 비롯한 노화 관련된 각종 질환의 원인으로 작용할 수 있고, 항산화제는 이러한 변화를 방어할 수 있을 것으로 보고되어 있다.^{32,33)} 선충 내에서 삼채 뿌리 분획이 항산화 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 선충의 ROS 축적억제 능력을 측정된 결과 시료를 투여한 군에서 대조군과 비교했을 때 ethyl acetate분획이 가장 높은 ROS 축적을 억제하는 효능을 보여 주었으며, ethyl

acetate분획은 선충의 SOD와 catalase의 활성을 가장 크게 증가시켰다. SOD와 catalase의 활성이 노화에 따라 감소하는 것으로 보고되어 있어 선충의 수명연장 효과와도 관련이 있을 것으로 사료된다.³⁴⁾ 삼채 뿌리 분획들은 선충의 구조적, 기능적인 면에 미치는 영향을 실험하기 위해 생식, 인두의 움직임 횟수, 몸길기와 운동량을 측정 하였다. 이와 같은 변화를 대조군과 비교한 결과 운동량을 제외하고는 모두 유의성 있는 변화를 보이지 않았으나 선충의 운동량이 ethyl acetate분획 투여군에서 유의성 있는 증가를 보여 주었다. 이러한 결과는 삼채 뿌리 분획이 생식능력과 몸길기의 변화 및 음식 섭취에는 영향을 미치지 않으나 운동량을 증가시켜 수명연장에 어느 정도 영향이 있을 것으로 판단된다. 마늘, 양파, 부추와 같은 Allium속 식물들은 주성분으로 황화합물을 가지고 있으며, 노화와 관련된 항산화 활성, 항암,

항염증 등의 활성이 보고되어 있으며, 이러한 효능을 나타내는 물질들은 항산화 및 스트레스 저항능력을 향상시켜 선충의 수명연장에 영향을 주는 성분의 구성물질로 작용할 수 있을 것으로 생각되며, 앞으로 삼채 추출물 중에 이와 같은 활성을 나타내는 물질에 대한 더 많은 연구들이 이루어져야 할 것으로 사료된다.^{10,14)}

결 론

삼채 뿌리 분획 중 ethyl acetate분획은 DPPH free radical 과 superoxide 소거시험에서 강한 항산화력을 보여 주었으며, 예쁜꼬마선충을 실험 모델로 사용한 수명연장실험에서 삼채 뿌리 분획물 투여군에서도 ethyl acetate분획이 대조군보다 유의성 있게 가장 강한 수명연장 효과를 나타내었다. 스트레스 저항성을 알아보기 위한 열과 산화적 스트레스 저항성 평가와 선충 내에 존재하는 항산화 효소인 SOD와 catalase 활성 평가에서도 삼채 뿌리 분획 중 ethyl acetate분획 처리군에 의해 스트레스 저항성, SOD와 catalase 효소의 활성이 가장 크게 증가되는 것이 관찰되었다. 또한 선충 세포 내의 ROS의 발생량은 삼채 분획 투여군이 대조군에 비해 감소하는 효과를 보여 주었으며, 수명에 미치는 노화 관련 인자의 측정 결과 삼채 뿌리 분획의 처리가 생식능력과 몸길이의 변화 및 음식 섭취에는 영향을 미치지 않으나 운동량을 증가시켜 수명연장에 어느 정도 영향이 있음을 확인하였다.

사 사

이 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 ‘삼채를 이용한 식이 소재 개발 및 기능성 유효성분 탐색’(Project No. PJ01049 002)의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Hsu, A.-L., Feng, Z., Hsieh, M.-Y. and Xu, X. Z. S. (2009) Identification by machine vision of the rate of motor activity decline as a lifespan predictor in *C. elegans*. *Neurobiol. Aging* **30**: 1498-1503.
- Zhong, W., Liu, N., Xie, Y., Zhao, Y., Song, X. and Zhong, W. (2013) Antioxidant and anti-aging activities of mycelial polysaccharides from *Lepista sordida*. *Int. J. Biol. Macromol.* **60**: 355-359.
- den Endea, W. V., Pesheva, D. and Garab, L. D. (2011) Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends Food Sci. Technol.* **22**: 689-697.
- Su, S. and Wink, M. (2015) Natural lignans from *Arctium lappa* as antiaging agents in *Caenorhabditis elegans*. *Phytochemistry* **117**: 340-350.
- Feng, S., Cheng, H., Xu, Z., Shen, S., Yuan, M., Liu, J. and Ding, C. (2015) Thermal stress resistance and aging effects of *Panax notoginseng* polysaccharides on *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Biol. Macromol.* **81**: 188-194.
- Obrenovich, M. E., Nair, N. G., Beyaz, A., Aliev, G. and Reddy, V. P. (2010) The role of polyphenolic antioxidants in health, disease, and aging. *Rejuvenation Res.* **13**: 631-643.
- Pandey, R., Gupta, S., Shukla, V., Tandon, S. and Shukla, V. (2013) Antiaging, antistress and ROS scavenging activity of crude extract of *Ocimum sanctum* (L.) in *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900). *Indian J. Exp. Biol.* **51**: 515-521.
- Kim, C.-H., Lee, M.-A., Kim, T.-W., Jang, J. Y. and Kim, H. J. (2012) Anti-inflammatory effect of *Allium hookeri* root methanol extract in LPS-induced RAW264.7 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 1645-1648.
- Jeong, S.-J., Kim, K.-H. and Yook, H.-S. (2015) Whitening and antioxidant activities of solvent extracts from hot-air dried *Allium hookeri*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **44**: 832-839.
- Hwang, J.-S., Lee, B. H., An, X., Jeong, H. R., Kim, Y.-E., Lee, I., Lee, H. and Kim, D.-O. (2015) Total phenolics, total flavonoids, and antioxidant capacity in the leaves, bulbs, and roots of *Allium hookeri*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **47**: 261-266.
- Rhyu, D. Y. and Park, S. H. (2013) Characterization of alkyl thiosulfinate in *Allium hookeri* root using HPLC-ESI-MS. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **56**: 457-459.
- Bae, D.-Y. and Bae, G.-C. (2012) The anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Allium hookeri* cultivated in South Korea. *Kor. J. Herbology* **27**: 55-61.
- Kim, C.-H., Lee, M.-A., Kim T.-W., Jang, J. Y. and Kim, H. J. (2012) Anti-inflammatory effect of *Allium hookeri* root methanol extract in LPS-induced RAW264.7 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 1645-1648.
- Kim, N.-S., Choi, B.-K., Lee, S.-H., Jang, H.-H., Kim, J.-B., Kim, H.-R., Kim, D. K., Kim, Y.-S., Yang, J.-H., Kim, H.-J. and Lee, S.-H. (2015) Effect of *Allium hookeri* on glucose metabolism in type II diabetic mice. *Kor. J. Pharmacogn.* **46**: 78-83.
- Lee, S.-H., Kim, N.-S., Choi, B.-K., Jang, H.-H., Kim, J.-B., Lee, Y.-M., Kim, D. D., Lee, C.-H., Kim, W.-S., Yang, J.-H., Kim, Y.-S., Kim, H.-J. and Lee, S.-H. (2015) Effects of *Allium hookeri* on lipid metabolism in type II diabetic mice. *Kor. J. Pharmacogn.* **46**: 148-153.
- Won, J.-Y., Yoo, Y.-C., Kang, E.-J., Yang, H., Kim, G.-H., Seong, B.-J., Kim, S.-I., Han, S.-I., Han, S.-H., Lee, S.-S. and Lee, K.-S. (2013) Chemical components, DPPH radical scavenging activity and inhibitory effects on nitric oxide production in *Allium hookeri* cultivated under open field and greenhouse conditions. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**.

- 1351-1356.
17. Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. (1989) Studies on inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. V: Radical scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 1919-1921.
 18. Ginnopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* **59**: 309-314.
 19. Choi, D. S., Kim, S. J. and Jung, M. Y. (2001) Inhibitory activity of berberine on DNA strand cleavage induced by hydrogen peroxide and cytochrome c. *BioSci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 452-455.
 20. Thuong, P. T., Kang, H. J., Na, M., Jin, W., Youn, U. J., Seong, Y. H., Song, K. S., Min, B. S. and Bae, K. (2007) Anti-oxidant constituents from *Sedum takesimensense*. *Phytochemistry* **68**: 2432-2438.
 21. Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
 22. Lithgow, G. J., White, T. M., Melov, S. and Johnson, T. E. (1995) Thermo tolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 7540-7544.
 23. Lee, E. Y., Shim, Y. H., Chitwood, D. J., Hwang, S. B., Lee, J. and Paik, Y. K. (2005) Cholesterol-producing transgenic *Caenorhabditis elegans* lives longer due to newly acquired enhanced stress resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**: 929-936.
 24. Mekheimer, R. A., Sayed, A. A. and Ahmed, E. A. (2012) Novel 1,2,4-triazolo[1,5-a]pyridines and their fused ring systems attenuate oxidative stress and prolong lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *J. Med. Chem.* **55**: 4169-4177.
 25. Ibrahim, H. R., Hoq, M. I. and Aoki, T. (2007) Ovotransferrin possesses SOD-like superoxide anion scavenging activity that is promoted by copper and manganese binding. *Int. J. Biol. Macromol.* **41**: 631-640.
 26. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Method. Enzymol.* **105**: 121-126.
 27. Guha, S., Natarajan, O., Murbach, C. G., Dinh, J., Wilson, E. C., Cao, M., Zou, S. and Dong, Y. (2014) Supplement timing of cranberry extract plays a key role in promoting *Caenorhabditis elegans* healthspan. *Nutrients* **21**: 911-921.
 28. Zhang, L., Jie, G., Zhang, J. and Zhao, B. (2009) Significant longevity-extending effects of EGCG on *C. elegans* under stress. *Free Radic. Biol. Med.* **46**: 414-421.
 29. Harman, D. (1956) Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**: 298-300.
 30. Bokov, A., Chaudhuri, A. and Richardson, A. (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.* **125**: 811-826.
 31. Berger, M. M. (2005) Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin. Nutr.* **24**: 172-183.
 32. Saran, M. and Bors, W. (1990) Radical reaction in vivo – an overview *Radiat. Environ. Biophys.* **29**: 249-262.
 33. Sun, Y. (1990) Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **8**: 583-599.
 34. Choe, M., Shin, G., Choi, G. P., Do, J. H. and Kim, J. D. (2003) Synergistic effects of extracts from Korean red ginseng, *Saururus chinensis* (Lour.) Baill. and *Rubus coreanus* Miq. on antioxidative activities in rats. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **11**: 148-154.
- (2015. 9. 4 접수; 2015. 9. 21 심사; 2015. 9. 22 게재확정)