

건강 에틸아세테이트 분획의 예쁜꼬마선충 내의 항산화 효과

이은별¹ · 김준형¹ · 임재윤¹ · 김혜수² · 김대성² · 은재순¹ · 한순천¹ · 김대근^{1*}

¹우석대학교 약학대학, ²한풍제약

Anti-oxidative Activity of Ethyl acetate Fraction of the Dried Ginger in *Caenorhabditis elegans*

Eun Byeol Lee¹, Jun Hyeong Kim¹, Jae-Yoon Leem¹, Hye-Soo Kim², Dae-Sung Kim², Jae Soon Eun¹,
Sooncheon Han¹ and Dae Keun Kim^{1*}

¹College of Pharmacy, Woosuk University, Jeonju 55338, Korea

²Hanpoong Pharm. Co., LTD, Wanju 55316, Korea

Abstract – Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae), which is a well-known food seasoning, has been used as a traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorder, vomiting and cough in Korea, China and Japan. Ethanol extract from the dried ginger (DG) was successively partitioned as methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol and H₂O soluble fractions. Among those fractions the ethyl acetate soluble fraction (EDG) showed the most potent DPPH radical scavenging and superoxide quenching activities. To know the effect of antioxidant activities of EDG, we tested the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase together with oxidative stress tolerance and intracellular ROS level in *Caenorhabditis elegans*. To investigate whether EDG-mediated increased stress tolerance was due to regulation of stress-response gene, we quantified SOD-3 expression using transgenic strain including CF1553. Consequently, EDG elevated SOD and catalase activities of *C. elegans*, reduced intracellular ROS accumulation in a dose-dependent manner. Moreover, EDG-treated CF1553 worms exhibited significantly higher SOD-3::GFP intensity.

Key words – *Zingiber officinale*, *Caenorhabditis elegans*, SOD, Catalase, ROS

신체 내에서 발생하는 노화현상은 유전적, 환경적 요인뿐만 아니라 생활방식 등과의 복합적인 요인에 의해 발생하여 각종 염증이나 암과 같은 질병을 발생시켜 사망의 위험을 증가시킨다. 이러한 질병과 관련된 기전은 현재 많은 논란이 있으나 적은 농도에서는 다양한 신호전달에서 second messenger로서의 역할을 하는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 과도한 양에서는 핵산, 단백질, 지질 등에 치명적인 oxidative stress를 야기하는 주요인으로 다뤄지고 있다.¹⁻³⁾ 미토콘드리아 내에서 부산물로 생성되기도 하는 hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$), superoxide radical($\cdot\text{O}_2^-$), singlet oxygen($^1\text{O}_2$)과 hydrogen peroxide(H_2O_2) 등의 활성 산소종이 알려져 있으며, 인체 세포 내에는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase 및 catalase 등과 같은 항산화

효소들이 존재하여 활성 산소종을 제거하는 기전이 알려져 있다.^{4,5)} 이러한 과도한 활성 산소종에 의해 발생하는 만성 염증성 질환, 뇌졸중, 심장질환 등과 같은 질병을 예방하기 위해 항산화제에 대한 관심이 높아져 몇 종의 합성 항산화제들이 사용되어 오고 있으나 부작용의 사례들이 보고되면서 천연물 유래 항산화제에 대한 관심이 높아지고 있다.^{6,7)}

건강은 생강(*Zingiber officinale*, Zingiberaceae)을 말린 것으로 한국, 중국, 일본 등에서 위장장애, 소화불량, 구역, 구토, 감기 등을 치료하는 전통약물로 오랫동안 사용되어 왔다.⁸⁾ 이 식물에 대한 식물화학적 성분연구로는 휘발성 물질과 gingerol 유도체와 같은 diarylheptanoid계 유사 화합물들이 보고되어 있으며,^{9,10)} 추출물의 간보호 효과, 강심, 세포독성 등의 효능이 보고되어 있다.¹¹⁻¹⁴⁾

본 연구에서는 건강 알코올 추출물의 용매 분획을 DPPH free radical 및 superoxide 소거능을 측정하여 가장 강한 항산화능을 나타낸 ethyl acetate분획을 예쁜꼬마선충(*Caenor-*

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

habditis elegans)을 이용하여 선충 내의 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD)와 catalase의 활성과 세포 내의 활성 산소종(ROS)의 축적 억제 능력을 측정하였다. 또한, juglone으로 유도된 oxidative stress에 대한 저항능력을 확인하고 이와 관련된 선충 내의 oxidative stress에 저항하기 위한 단백질의 증가여부를 확인하기 위하여 SOD-3을 포함한 형질 전환 선충 CF1553을 이용하여 SOD 발현 유전자의 증가 여부를 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 건강은 2015년에 한풍제약에서 제공받아 김대근교수가 검증한 후에 실험에 사용하였으며, 표준품은 우석대학교 약학대학 생약표본실에 보관하고 있다(WSU-15-012).

추출 및 분획 - 건강 152 g을 분쇄하여 50% 주정으로 가끔 진탕하면서 50°C에서 5시간씩 2회 추출하였다. 그 추출액을 수욕상에서 감압농축하여 ethanol엑스 약 20 g을 얻었으며, 이 ethanol엑스를 증류수로 현탁시키고 상법에 따라 동량의 methylene chloride(5.1 g), ethyl acetate(2.3 g) 및 *n*-butanol(8.9 g)의 순으로 용매 분획하여 각각의 분획물을 얻었다.

DPPH Free Radical 소거활성 측정¹⁵⁾ - 96well plate에 시료를 ethanol로 각 분획 별로 조제한 용액에 13 µM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 일정량씩 가하였다. 10 초간 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 비교하였다. 각 시료에 대한 DPPH radical 소거작용을 3회 반복하여 측정하였다.

Xanthin 유래 Superoxide 소거활성 측정¹⁶⁾ - 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 혼합하였다. 5분 후 xanthine oxidase(0.05 U/mL) 100 µL를 넣고, 37°C에서 30 분간 배양시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide radical 소거 활성은 시료와 대조군의 NBT의 환원 정도를 비교하였다.

예쁜꼬마선충의 배양¹⁷⁾ - 예쁜꼬마선충(*C. elegans*, wild type)은 Caenorhabditis Genetic Center(CGC; University of Minnesota, Minneapolis, MN)로부터 제공받은 것을 사용하였으며, *Escherichia coli* OP50을 도말한 Nematode Growth Medium(NGM) agar plate에 20°C에서 배양하였다. EDZ은 DMSO를 용매로 한 stock solution 상태로 멸균된 NGM plates(50°C)에 첨가되었으며, 최종 DMSO농도는 모든 상태

에서 0.1%(v/v)를 유지하였다.

선충 체내의 항산화 효소(SOD, Catalase) 활성 측정^{18,19)} - 성장 단계가 동일한 N2 선충을 각각의 농도별 plate에서 배양하였다(EDZ 250, 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 µL와 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 µL (EDZ 250, 500 µg/mL)를 3분 동안 반응시키고 240 nm에서 흡광도를 측정하였다.

선충 세포 내 활성 산소종(ROS) 분석²⁰⁾ - 세포 내 활성 산소종은 2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate(H₂DCF-DA)를 사용하여 측정하였다. 성장 단계가 동일한 N2 선충을 각각 농도별로 plate에서 배양하였다. 성체가 된 후 4일째 50 µM juglone을 함유한 M9 buffer에 넣고 2시간 노출시킨 뒤 96 well plate에 담긴 50 µL M9 buffer에 5마리씩 옮겼다. 마지막으로 25 µM H₂DCF-DA 50 µL를 첨가한 뒤 여기 485 nm, 방출 535 nm에서 흡광도를 각각 측정하였다.

Oxidative Stress 저항성 평가²¹⁾ - 성장 단계가 동일한 선충을 각각의 농도별 plate에서 배양하였다(EDZ 250, 500 µg/mL). 산화적 스트레스에 의한 내성은 기존 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.

형질전환 선충 내 SOD-3::GFP 형광 측정 - 형질 전환된 선충으로 SOD-3::GFP를 포함한 CF1553을 농도별로 투여된 배지에 배양하였다. 성체가 된 후 4일째에 사용하였으며, 선충은 sodium azide(2%)로 마취시켰고 GFP 발현은 형광 실체 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 발현강도를 정량, 분석 하기 위해 현미경을 이용한 사진 촬영과 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 모든 실험은 3회 반복하였다.

통계 분석 - 통계 자료의 값은 평균값±표준오차(mean±S.E.M.)로 표시하였다. 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 - 건강 분획 중에서 DPPH radical 소거 효과는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 분획들 중 ethyl acetate분획(IC₅₀; 55.6 µg/mL)이 대조군인 비타민 C (IC₅₀; 5.6 µg/mL)보다는 낮았으나 분획물 중 가장 높은 DPPH free radical 소거 효과를 나타냈다(Fig. 1).

Xanthin 유래 Superoxide 소거능 - 시료와 대조군의 NBT의 환원정도를 비교하는 xanthine 유래 superoxide quenching 활성에서는 건강의 ethyl acetate분획이 IC₅₀값이 25.4 µg/mL로 비타민 C(IC₅₀; 5.4 µg/mL)와 비교해 볼 때 상당히 높은 활성을 나타냈다(Fig. 2).

선충 체내의 항산화 효소 SOD 및 catalase 활성증가 효능 - Xanthine을 기질로 xanthine oxidase의 효소반응 과정 중에 생성되는 superoxide anion을 활용하여 SOD의 활성을 측정하였다. Fig. 3A에서 나타난 바와 같이 선충의 ethyl acetate 500 µg/mL 투여군은 SOD의 활성을 농도의존적으로 증가시켰으며, ethyl acetate분획 500 µg/mL 투여군은 대조군과 비교하여 SOD 활성을 약 29.3% 정도 증가시켰다(***p*<0.001). 강력한 반응성을 가진 활성 산소종인 hydrogen peroxide를 체내에서 대사시키는 catalase의 활성은 Fig. 3B에서 나타난 바와 같이 ethyl acetate분획 500 µg/mL 투여군이 대조군에 비해 catalase활성을 약 67.8% 정도 증가시켰다(***p*<0.001)(Fig. 3).

선충 세포 내 활성 산소종(ROS) 감소 효능 - 건강 ethyl acetate 분획의 농도별 세포 내 활성 산소종의 감소 효능을 알아보기 위해 H₂DCF-DA와 선충 내부의 활성 산소종을 반응시켜 형광을 관찰하였다. 활성 산소종 형광의 감소 폭

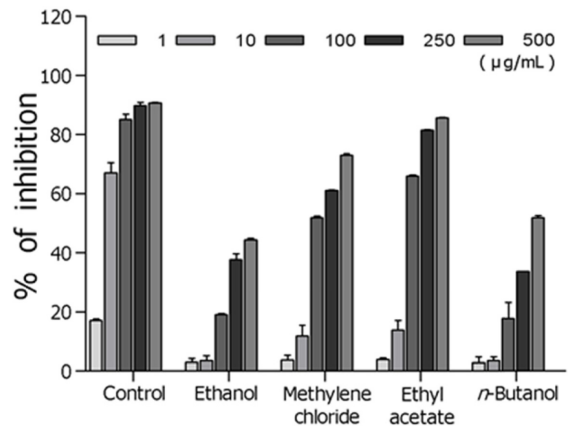


Fig. 1. DPPH radical scavenging effects of the methanol extract, and its fractions from the dried ginger.

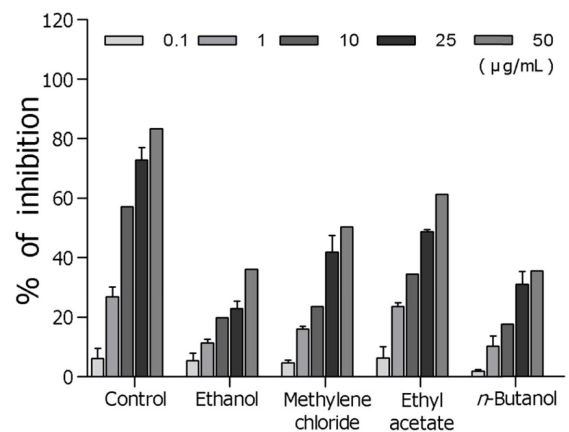


Fig. 2. Xanthine-originated superoxide quenching activities of methanol extract, and its fractions from the dried ginger.

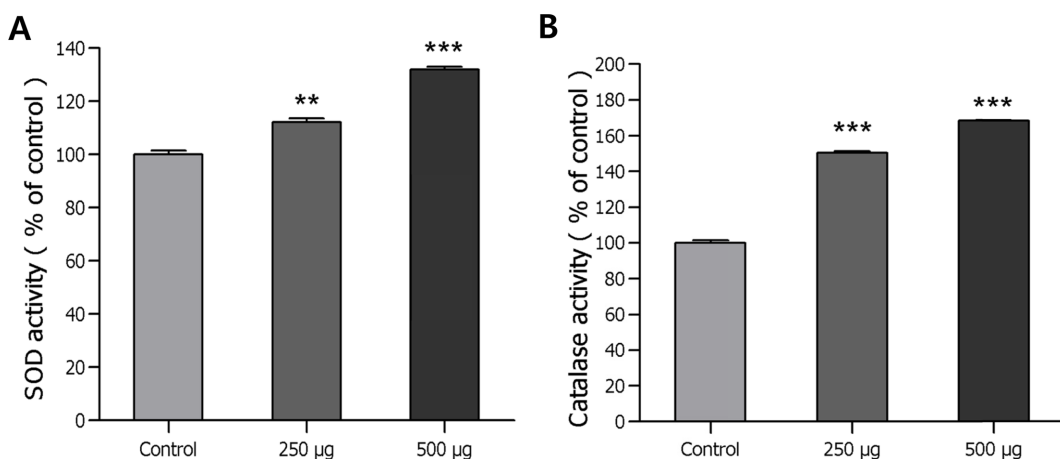


Fig. 3. Effect of ethyl acetate fraction of the dried ginger on the stress resistance proteins of wild type N2 nematodes. (A) The enzymatic reaction of xanthine with xanthine oxidase was used to generate ·O₂- and the SOD activity was estimated spectrophotometrically through formazan formation by NBT reduction. SOD activity was expressed as a percentage of the scavenged amount per control. (B) Catalase activity was calculated from the concentration of residual H₂O₂, as determined by a spectrophotometric method. Catalase activity was expressed in U/mg protein. 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*<0.01 and ****p*<0.001 by one-way ANOVA.

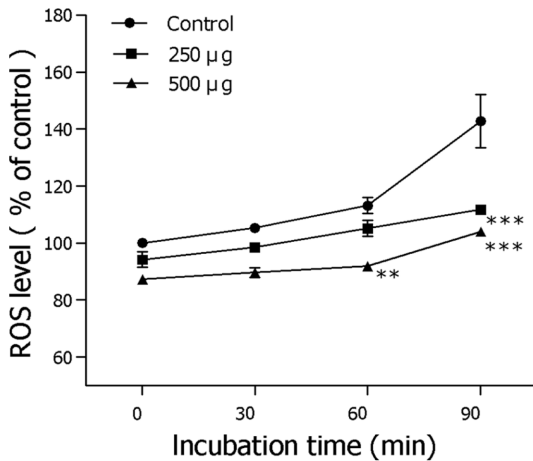


Fig. 4. Effect of ethyl acetate fraction of the dried ginger on the intracellular ROS accumulation of wild-type N2 nematodes. The worms were incubated with 50 µM juglone for 2 h, and subsequently treated with the fluorescent probe H₂-DCF-DA. Intracellular ROS accumulation was quantified spectrometrically at excitation 485 nm and emission 535 nm. Plates were read 30 min for 90 min. Data are expressed as the mean ± S.E.M. of three independent experiments (N=3). Differences compared to the control were considered significant at ***p*<0.01 and ****p*<0.001 by one-way ANOVA.

은 대조군과 비교하여 ethyl acetate층 500 µg/mL 투여군에서 약 14.6% (***p*<0.001)로 관찰되고, 활성 산소종을 감소시키는 것으로 확인되었다(Fig. 4).

Oxidative Stress 저항성 증가 효능 - 건강 ethyl acetate 분획이 선충의 스트레스 저항성에 미치는 영향은 oxidative stress 조건에서 선충을 배양하여 생존율을 확인하였다. 선충에 oxidative stress를 유도하기 위해서 juglone이 함유된 plate에서 배양한 대조군 선충의 최고 생존시간은 23시간이었으나, ethyl acetate분획 500 µg/mL 농도에서는 생존시간을 39시간으로 증가시켰다. 대조군의 평균 생존시간이 14.2±0.0시간이었으나 500 µg/mL 농도 처리군은 평균 생존시간을 28.8±0.5시간으로 91.9%의 생존 시간을 향상시켰다 (***p*<0.001)(Fig. 5, Table I).

형질 전환 선충 내 SOD-3의 발현 증가 효능 - 선충 내에서 oxidative stress에 저항하기 위한 단백질의 증가여부를

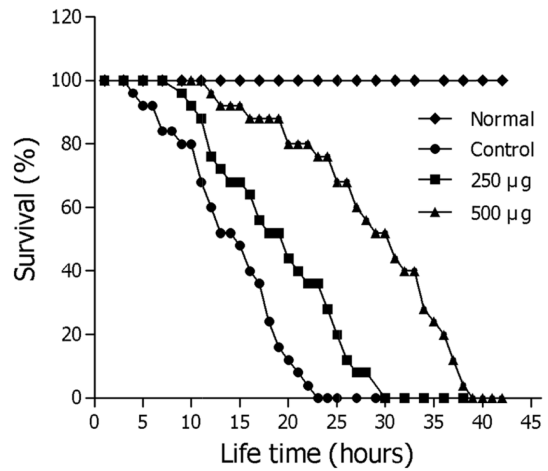


Fig. 5. Effect of ethyl acetate fraction of the dried ginger on the stress tolerance of wild-type N2 nematodes. For the oxidative stress assays, worms were transferred to 96-well plate containing 1 mM of juglone liquid culture, and then their viability was scored. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test. All experiments were done in triplicates.

확인하기 위해서 SOD 발현 유전자의 증가 여부를 확인하였다. SOD-3을 포함한 형질 전환 선충 CF1553을 사용하여 실험한 결과 CF1553 형질전환 선충에 건강 ethyl acetate층을 투여한 군이 처리되지 않은 선충에 비해 상당히 높은 SOD-3::GFP 발현율(21.3 %, ****p*<0.001)을 보여주었다(Fig. 6A, 6B).

고찰

건강은 오랫동안 세계적으로 향신료로서 사용되어 왔으며, 위액분비촉진, 살균작용 등의 효능이 있어 소화촉진, 오심, 복통, 설사 등의 약리학적 목적에도 이용되어 왔다.²²⁾ 본 연구는 20°C에서 20일 정도의 짧은 수명을 가지며 길이 약 1 mm 정도까지 자라는 몸이 투명한 예쁜꼬마선충을 모델로 사용하여 실험을 진행하였다.²³⁾ 건강의 분획 중 ethyl acetate 분획은 DPPH radical과, superoxide 소거활성시험에서 가장 강한 항산화력을 보여 주었다. 선충의 세포의 양을 정량한

Table I. Effect of ethyl acetate fraction of the dried ginger on the oxidative stress tolerance of *C. elegans*.

| Stress condition | Fraction | Mean lifespan (h) | Maximum lifespan (h) | Change in mean lifespan (%) | Log-rank test |
|------------------|-----------|-------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------|
| 1 mM Juglone | Control | 14.2 ± 0.0 | 23 | - | - |
| | 250 µg/mL | 19.1 ± 0.2 | 29 | 34.1 | *** <i>p</i> <0.001 |
| | 500 µg/mL | 28.8 ± 0.5 | 39 | 91.9 | *** <i>p</i> <0.001 |

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*<0.001.

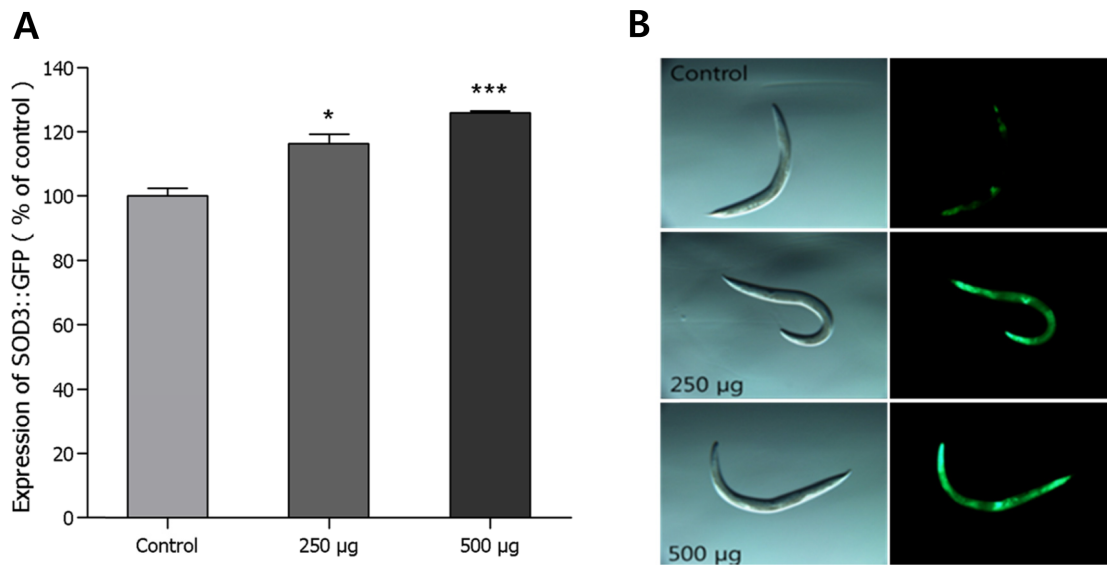


Fig. 6. Effect of ethyl acetate fraction of the dried ginger on the expression of SOD-3 was determined using transgenic nematodes. Mean GFP intensity of CF1553 mutant was represented as mean±S.E.M. of values from 19 to 25 animals per each experiment. The GFP intensity was quantified using Image software by determining average pixel intensity. Images of SOD-3::GFP expression of CF1553 worm in the presence or absence of ethyl acetate fraction. Data are expressed as the mean±standard deviation of three independent experiments (N=3). Differences compared to the control were considered significant at * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA.

후 선충 내의 항산화 효소의 활성을 알아본 결과 건강 ethyl acetate분획은 농도 의존적으로 SOD 및 catalase의 활성을 높이는 것으로 관찰되었다. 또한 선충에 ethyl acetate분획을 처리하고 juglone을 투여한 후 선충 세포 내 활성 산소종(ROS) 수치를 확인한 결과 상당한 감소 효과를 보여 주었다. Oxidative stress를 가하여 선충의 스트레스 저항능력을 확인한 결과 ethyl acetate분획 투여군이 juglone을 이용한 oxidative stress 조건하에서 대조군과 비교하여 생존율이 농도 의존적으로 상당히 증가하는 것으로 관찰되었다. 또한, GFP-fused transgenic strain CL2070을 이용하여 juglone으로 인한 oxidative stress 저항성 확인실험에서 형광 발현율이 상당히 증가함을 확인되어 oxidative stress에 저항성이 있는 단백질의 발현이 증가되었음을 확인하였다. 세포 호흡, 세포 손상, phagocytosis 및 주변의 산화물 등에 의해 부산물로 생성되는 활성 산소종(ROS)은 과량이 생성되면 체내의 항산화제의 결핍으로 인해 oxidative stress를 야기하는 것으로 보고되어 있으며, 스트레스에 저항할 수 있는 능력은 노화방지나 수명연장과 상당한 관련성이 있다고 보고되어 있다.²⁴⁻²⁶⁾ 건강의 ethyl acetate분획은 선충에 있어 체내의 항산화 효소의 활성을 증가시키며, 활성 산소종의 축적을 억제하고 스트레스에 대한 저항력을 높여 주므로 선충의 수명연장이나 노화 지연에 영향을 미칠 수 있을 것으로 추측된다.²⁷⁻²⁹⁾ 이러한 결과는 기존의 건강에서 보고된 항산화 효과와 항염증 효능이 있는 gingerol이나 shogaol 유도체와 같은 물질들이 이러한 선충의 스트레스 저항능력 및 항

산화 활성에 영향을 줄 것으로 생각되며,³⁰⁻³³⁾ 앞으로 활성 물질에 대한 물질의 분리와 구조확인 및 단일 물질 수준에서의 활성 확인이 필요할 것으로 사료된다.

결 론

건강의 ethyl acetate분획은 DPPH radical 소거시험과, superoxide 소거활성시험에서 강한 항산화력을 보여 주었으며, 예쁜꼬마선충 내의 항산화 효소인 SOD 및 catalase의 활성이 ethyl acetate분획 투여에 의해 농도 의존적으로 활성이 높아졌다. 또한 선충 세포 내의 ROS의 발생량은 ethyl acetate분획 투여군에서 농도 의존적으로 감소하는 효과를 보여 주었으며, 선충 내의 항산화능을 관찰하기 위해 juglone을 이용하여 oxidative stress를 유발한 후 선충의 생존도를 측정할 결과 ethyl acetate분획 투여군이 스트레스 조건하에서 대조군과 비교하여 생존율이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이와 관련하여 GFP-fused transgenic strain CL2070을 이용하여 juglone으로 야기된 oxidative stress 저항성 실험의 형광 발현율을 확인한 결과 형광 발현이 상당히 증가함이 확인되어 oxidative stress에 저항성이 있는 단백질의 발현이 증가되었음을 확인하였다. 이러한 결과로 볼 때 건강 및 ethyl acetate분획은 항산화 및 이와 관련된 질병의 예방 및 치료를 위한 물질개발의 자원으로서의 가치가 충분히 있을 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역 특화산업육성사업(R0004383)으로 수행된 연구결과입니다.

인용문헌

- 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.
- 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.
- Perrone, G. G., Tan, S. X. and Dawes, I. W. (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**: 1354-1368.
- 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 in Food Science & Technology* **22**: 689-697.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**: 1-13.
- 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.
- Shin, T. S., Kang, H. S., Kim, S. K., Lee, K. W. and Cho, B. W. (1999) Effect of natural and synthetic antioxidants on pH, POV, fatty acids composition and overall acceptability of cooked ground pork. *J. Agri. Tech. & Dev. Inst.* **3**: 1-9.
- But, P. P. H., Kimura, T., Guo, J.-X. and Sung, C. K. (1997) International collation of traditional and folk medicine, 400. World Scientific, Singapore.
- Ma, J., Jin, X., Yang L. and Liu, Z.-L. (2004) Diarylheptanoids from the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Phytochemistry* **65**: 1137-1143.
- Denniff, P., Macleod, I. and Whiting, A. A. (1980) Studies in the biosynthesis of [6]-gingerol, pungent principle of ginger (*Zingiber officinale*). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 2637-2644.
- Hasan, I. H., El-Desouky, M. A., Hozayen, G. and Abd el Aziz, G. M. (2016) Protective effect of *Zingiber officinale* against CCl₄-induced liver fibrosis is mediated through downregulating the TGF- β 1/Smad3 and NF- κ B/I κ B pathways. *Pharmacology* **97**: 1-9.
- Mukherjee, S., Mukherjee, N., Saini, P., Roy, P. and Babu, S. P. (2015) Ginger extract ameliorates phosphamidon induced hepatotoxicity. *Indian J. Exp. Biol.* **53**: 574-584.
- Wei, Q.-Y., Ma, J.-P., Cai, Y.-J., Yang, L. and Liu, Z.-L. (2005) Cytotoxic and apoptotic activities of diarylheptanoids and gingerol-related compounds from the rhizome of Chinese ginger. *J. Ethnopharmacol.* **102**: 177-184.
- Shoji, N., Iwasa, A., Takemoto, T., Ishida, Y. and Ohizumi, Y. (1982) Cardiotoxic principles of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *J. Pharm. Sci.* **71**: 1174-1175.
- 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.
- 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.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
- 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.
- 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.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Method. Enzymol.* **105**: 121-126.
- 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.
- Lee, S.-M. (2014) Quality characteristics of apple jam added with ginger. *Korean J. Culinary Res.* **20**: 79-88.
- 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.
- Saran, M. and Bors, W. (1990) Radical reaction in vivo – an overview. *Radiat. Environ. Biophys.* **29**: 249-262.
- Harman, D. (1956) Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**: 298-300.
- Berger, M. M. (2005) Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin. Nutr.* **24**: 172-183.
- Bokov, A., Chaudhuri, A. and Richardson, A. (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.* **125**: 811-826.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-247.
- Sun, Y. (1990) Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **8**: 583-599.

30. Ghasemzadeh A, Jaafar, H. Z. and Rahmat, A. (2015) Optimization protocol for the extraction of 6-gingerol and 6-shogaol from *Zingiber officinale* var. rubrum Theilade and improving antioxidant and anticancer activity using response surface methodology. *BMC Complement Altern. Med.* **15**: 258.
31. Masuda, Y., Kikuzaki, H., Hisamoto, M. and Nakatani, N. (2004) Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. *BioFactors* **21**: 293-296.
32. Justo, O. R., Simioni, P. U., Gabriel, D. L., Tamashiro, W. M., Rosa, Pde T. and Moraes, Â. M. (2015) Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line: the influence of vehicle type. *BMC Complement Altern. Med.* **15**: 390
33. Semwal, R. B., Semwal, D. K., Combrinck, S. and Viljoen, A. M. (2015) Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. *Phytochemistry* **117**: 554-568.
- (2016. 6. 10 접수; 2016. 6. 17 심사; 2016. 6. 21 게재확정)