

단삼의 예쁜꼬마선충 내의 항산화 효과

김영지 · 김준형 · 노윤정 · 김수진 · 황인현 · 김대근*

우석대학교 약학대학

Anti-oxidative Effect of *Salvia miltiorrhiza* Bunge in *Caenorhabditis elegans*

Yeong Jee Kim, Jun Hyeong Kim, Yun Jeong Noh, Su Jin Kim,
In Hyun Hwang, and Dae Keun Kim*

College of Pharmacy, Woosuk University, Jeonju, Jeonbuk 55338, South Korea

Abstract – Methanol extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Labiatae) root was investigated to research the anti-oxidative activity, by using a *Caenorhabditis elegans* model system. The methanol extract of this plant showed significant DPPH radical scavenging and superoxide quenching activities. Ethyl acetate soluble fraction of the methanol extract that showed the most potent DPPH radical scavenging and superoxide quenching activities. The ethyl acetate fraction was tested on its activities of superoxide dismutase (SOD), catalase, and oxidative stress tolerance in *C. elegans*. Furthermore, in order to see if regulation of stress-response genes is responsible for the increased stress tolerance of the ethyl acetate fraction treated *C. elegans*, we checked SOD-3 expression using a transgenic strain. Consequently, the ethyl acetate fraction of *S. miltiorrhiza* root increased the catalase and SOD activities in a dose-dependent manner in *C. elegans*. Besides, the ethyl acetate fraction-treated CF1553 worms showed higher SOD-3::GFP intensity than the non-treated ones.

Keywords – *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *Caenorhabditis elegans*, Anti-oxidative effect, Catalase, SOD

노화와 관련된 연구들은 꾸준히 지속되고 있으며, 이와 관련된 많은 연구 중에 free radical 이론은 다양한 이론 중에 비교적 많은 부분에서 설득력을 가지고 있다.¹⁻³⁾ Free radical은 인체 내의 다양한 물리화학적 조건이나 병리학적인 상태에서 생성되어 많은 질병의 발병 기전에 관여되고, 세포에서 일어나는 산소가 관련된 생화학적 반응의 부산물로 생성되어 적은 양에서는 문제가 없으나 과도한 양이 발생하였을 경우에는 세포의 구성 성분에 산화적 스트레스를 가하여 세포에 악영향을 끼쳐 세포 손상을 일으키고 노화를 촉진할 수 있다는 가능성을 제시하였다. 여기에는 hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$), superoxide radical($\cdot\text{O}_2^-$), peroxy radical($\cdot\text{RO}_2$), 및 peroxynitrite($\text{ONOO}\cdot$) 등이 포함되며 이러한 과도히 생성되어 산화적 손상을 일으키는 물질들을 방어하는데 항산화제들이 필요하다.^{4,5)} 인체는 나이가 들어갈수록 활성산소종에 의한 세포 내의 핵산, DNA, 단백질, 지질 등의 손상이 증가하고 이는 세포의 손상과 함께 미토콘드리아 등

의 조직의 기능장애를 일으키고 노화를 비롯한 암, 심장질환 및 퇴행성 질환을 초래하는 것으로 알려져 있다.^{6,7)} 이러한 free radical을 제거하기 위해서 생체 내에는 catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase 등의 효소가 존재하며,^{8,9)} 외부에서 투여하는 항산화 물질로는 vitamin A, C 및 E를 비롯하여 glutathione, carotenoid 및 flavonoid 등과 같은 물질들이 알려져 있다. 노화가 진행될수록 산화적 스트레스로부터 인체를 보호하는 방어기전은 더욱 불완전해지기 쉽기 때문에 건강을 유지하기 위해서는 외부에서 공급되는 항산화제의 공급이 필요하며, 강한 활성을 가지며 부작용이 적은 천연물 유래의 새로운 항산화제 개발이 필요하다.^{9,10)}

본 연구에서는 활혈거어(活血祛瘀), 양혈소종(涼血消腫), 청심안신(淸心安神)의 효능이 있어 월경부조(月經不調), 혈어경폐(血瘀經閉), 옹종창독(癰腫瘡毒), 심계실면(心悸失眠) 등을 치료하는데 이용되어¹¹⁾ 온 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge, Labiatae) methanol 추출물의 항산화 효능을 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 이용하여 확인해 보고자

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

실험을 실시하였다. 단삼 추출물의 용매분획으로부터 DPPH free radical 및 superoxide 소거능을 측정하여 가장 강한 항산화능을 나타낸 ethyl acetate 분획에 대하여 선충 내의 항산화 효소인 SOD와 catalase의 활성과 세포 내의 활성산소종의 축적 억제 능력을 측정하였다. 또한, juglone으로 유도된 oxidative stress에 대한 저항능력을 확인하고 이와 관련된 선충 내의 oxidative stress에 저항하는 단백질의 증가 여부를 SOD-3을 포함한 형질 전환 선충 CF1553을 이용하여 SOD 발현 유전자의 증가 여부를 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 실험에 사용한 단삼은 2018년에 보화당(전주)에서 구입하여 김대근교수가 검증한 후 실험에 사용하였으며, 표준품은 우석대학교 약학대학 생약표본실에 보관하고 있다(WS-18-003).

추출 - 단삼 500 g을 분쇄하여 methanol로 가끔 진탕하면서 50°C에서 5시간씩 2회 추출하였다. 그 추출액을 수욕상에서 감압농축하여 methanol 엑스 약 170 g을 얻었으며, 이 methanol 엑스를 증류수로 현탁시키고 상법에 따라 동량의 methylene chloride(2.4 g), ethyl acetate(5.7 g) 및 *n*-butanol(5.9 g)의 순으로 용매 분획하여 각각의 분획물을 확보하였다.

DPPH free radical 소거활성 측정¹²⁾ - 분획물 시료를 ethanol로 용해하여 96 well plate에 각 농도 별로 조제한 용액에 13 µM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 일정량씩 가하였다. 25°C에서 10초간 진탕한 후 30분간 방치한 후 microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조약물은 L-ascorbic acid를 사용하였다. 각 시료에 대하여 3회 반복하여 측정하였다.

Xanthin류 Superoxide 소거활성 측정¹³⁾ - Thuong등의 방법에 따라 Xanthine/xanthine oxidase에 의해 생성된 superoxide radical 소거활성을 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 30분간 배양시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거 활성은 시료와 대조군의 NBT의 환원 정도를 비교하였다.

예쁜꼬마선충의 배양¹⁴⁾ - 실험에 사용한 예쁜꼬마선충 (*Caenorhabditis elegans*, wild type)은 *Escherichia coli* OP50을 도말한 nematode growth medium(NGM) agar plate 상에서 배양하였다(20°C). 시료는 DMSO를 용매로 한 stock solution 상태로 멸균된 NGM plate(50°C)에 첨가되었으며, 최종 DMSO농도는 0.1%(v/v)를 유지하였다.

선충 체내의 항산화 효소 활성 측정^{15,16)} - 시료를 농도별로 조제한 plate에 성장 단계가 동일한 선충을 배양하였으

며, 성체가 된 후 2일째의 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 Ibrahim등의 방법을 응용하여 측정하였다. 10 mM phosphate buffer(pH 8.0)를 용매로 반응혼합물(1.6 mM xanthine과 0.48 mM NBT) 0.49 mL를 만든 뒤 농도별 시료 10 µL와 37°C에서 5분간 pre-incubation시켰다. 그 후 xanthine oxidase 100 µL(0.05 U/mL)을 첨가하고 37°C에서 20분 동안 incubation한 다음 69 mM SDS로 반응을 멈추고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catalase activity는 Aebi의 방법을 응용하여 25 mM H₂O₂에 농도별 시료 50 µL를 3분 동안 반응시키고 240 nm에서 흡광도를 측정하였다.

선충 세포 내 활성산소종(ROS) 분석¹⁷⁾ - 선충 내 활성산소종은 2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate(H₂DCF-DA)를 사용하여 측정하였다. 성장 단계가 동일한 N2 선충을 시료를 농도별로 제조한 plate에서 배양하여 성체가 된 후 4일째에 50 µM juglone을 함유한 M9 buffer에 넣고 2시간 노출시킨 뒤 96 well plate에 담긴 50 µL M9 buffer에 5마리씩 옮겼다. 마지막으로 50 µM H₂DCF-DA 50 µL를 첨가한 뒤 여기 485 nm, 방출 535 nm에서 흡광도를 각각 측정하였다.

Oxidative Stress 저항성 평가¹⁸⁾ - 성장 단계가 동일한 선충을 각각의 농도별 plate에서 배양하여 사용하였다. Oxidative stress에 의한 내성은 성체가 된 후 7일째에 일시적으로 선충을 2 mM juglone이 함유된 M9 buffer가 담긴 96 well plate에 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 3일째에 사용하였으며, 선충은 sodium azide(4%)로 마취시켰고 GFP 발현은 형광 실체 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 발현강도를 정량, 분석하기 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 - 단삼 분획 중에서 DPPH radical 소거 효과는 ethyl acetate 분획이 가장 좋은 소거 효과를 나

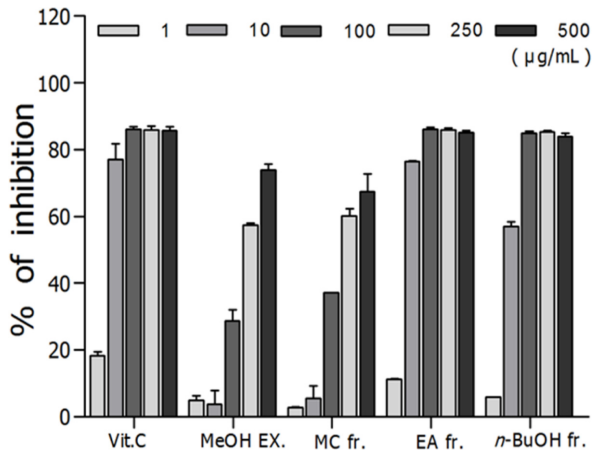


Fig. 1. DPPH radical scavenging effects of the methanol extract and its fractions of *Salvia miltiorrhiza*.

타냈으며 IC_{50} 값이 $4.54 \mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 비타민 C(IC_{50} : $4.19 \mu\text{g/mL}$)와 유사한 free radical 소거 효과를 나타냈다(Fig. 1).

Xanthine 유래 Superoxide 소거 활성 - NBT의 환원 정도를 비교하는 superoxide quenching 활성에서는 단삼 ethyl acetate 분획의 IC_{50} 값($0.93 \mu\text{g/mL}$)이 비타민 C의 IC_{50} ($4.07 \mu\text{g/mL}$) 값보다 높은 superoxide 소거 활성을 농도 의존적으로 관찰되었다(Fig. 2).

선충 체내의 항산화 효소 SOD 및 catalase 활성증가 효능 - Xanthine을 기질로 xanthine oxidase의 효소반응 과정 중에 생성되는 superoxide anion을 활용하여 SOD의 활성을 측정된 결과, Fig. 3A에서와 같이 단삼 ethyl acetate

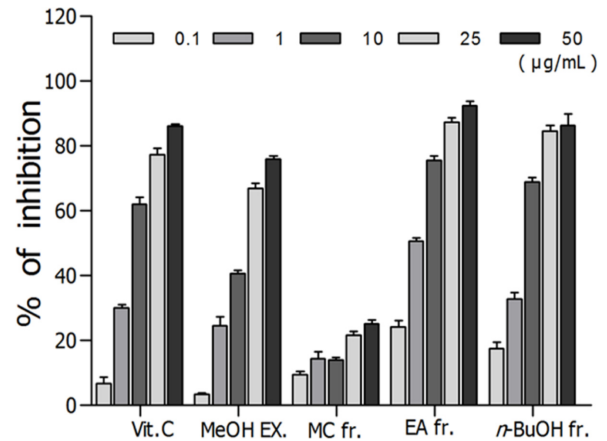


Fig. 2. Xanthine-originated superoxide quenching activities of the methanol extract and its fractions of *Salvia miltiorrhiza*.

분획 투여군은 SOD의 활성을 농도 의존적으로 증가시켰으며, ethyl acetate 분획 $500 \mu\text{g/mL}$ 투여군은 대조군과 비교하여 SOD 활성을 약 20.8% 정도 증가시켰다(** $p < 0.01$). 활성산소종의 일종인 hydrogen peroxide를 체내에서 대사시키는 catalase의 활성은 Fig. 3B에서 나타난 바와 같이 단삼 ethyl acetate 분획 $500 \mu\text{g/mL}$ 투여군이 대조군에 비해 약 53.3% catalase 활성을 증가시켰다(** $p < 0.001$)(Fig. 3).

선충 세포 내 ROS 감소 효능 - 단삼 ethyl acetate 분획의 농도별 세포 내 활성산소종의 감소 효능을 알아보기 위해 $H_2DCF\text{-DA}$ 와 선충 내부의 활성산소종을 반응시켜 형광을 관찰하였다. 활성산소종으로 인한 형광의 감소 폭은 대조군과 비교하여 ethyl acetate 분획 $500 \mu\text{g/mL}$ 투여군에서

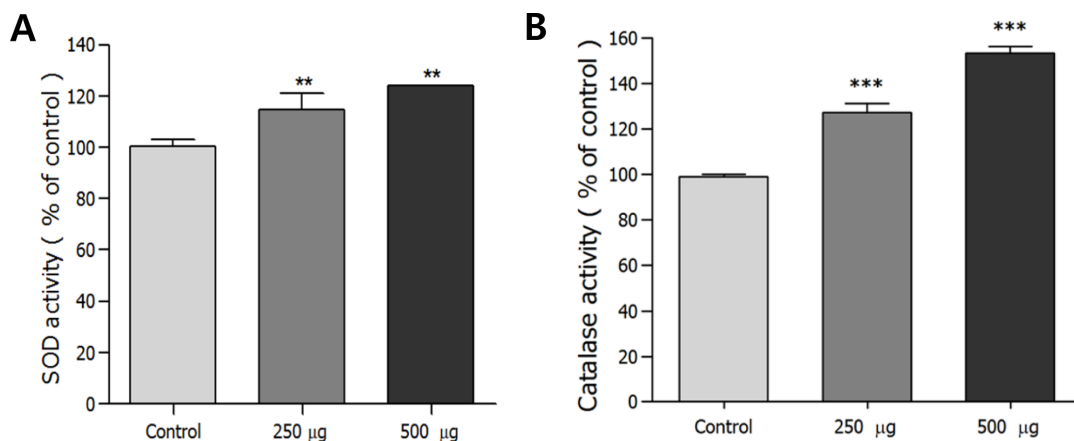


Fig. 3. Effects of the ethyl acetate fraction of *Salvia miltiorrhiza* on the antioxidant enzyme activity of wildtype N2 nematodes. (A) The enzymatic reaction of xanthine with xanthine oxidase was used to generate $\bullet\text{O}_2^-$ and the SOD activity was estimated spectrophotometrically through 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 ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA.

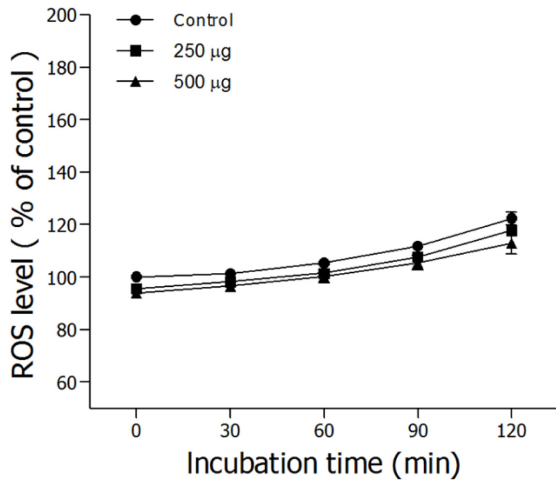


Fig. 4. Effect of the ethyl acetate fraction of *Salvia miltiorrhiza* on the intracellular ROS accumulation of wild-type N2 nematodes. The worms were incubated with 50 µM juglone for 2 h, and subsequently treated with the fluorescent probe H2-DCF-DA. Intracellular ROS accumulation was quantified spectrometrically at excitation 485nm and emission 535 nm. Plates were read 30 min for 120 min.

약 5.1% (** $p < 0.01$) 활성산소종을 감소시키는 것으로 유의성 있게 나타났으나 효능은 낮게 측정되었다(Fig. 4).

Oxidative stress 저항성 증가 효능 - 단삼 ethyl acetate 분획이 선충의 산화적 스트레스 조건에서 선충의 생존율에 미치는 영향을 확인하였다. 선충에 산화적 스트레스를 유도하기 위해서 2 mM juglone이 함유된 M9 buffer가 담긴 96 well plate에서 배양한 대조군 선충의 최고 생존시간은 24시간이었으나, ethyl acetate 분획 500 µg/mL 농도에서는 생존시간을 31시간으로 증가시켰다. 대조군의 평균 생존시간이 16.0±1.2시간이었으나 500 µg/mL 농도 처리군은 평균 생존시간을 21.8±1.4시간으로 36.4%의 생존 시간을 향상시켰다 (** $p < 0.001$)(Fig. 5, Table I).

형질 전환 선충 내 SOD-3의 발현 증가 효능 - 단삼 ethyl acetate 분획이 선충 내에서 oxidative stress에 저항하기 위한 단백질의 생성 여부를 확인하기 위해서 SOD 발현 유전자의 증가 여부를 확인하였다. SOD-3을 포함한 형질 전환 선충 CF1553을 사용하여 실험한 결과 단삼 ethyl acetate 분

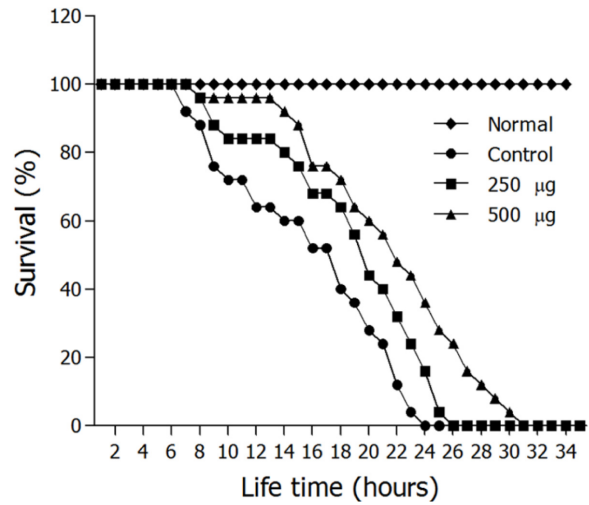


Fig. 5. Effect of the ethyl acetate fraction of *Salvia miltiorrhiza* on the stress tolerance of wild-type N2 nematodes. For the oxidative stress assays, worms were transferred to 96-well plate containing 2 mM of juglone liquid culture, and then their viability was scored. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test. All experiments were done in triplicates.

획 투여군이 처리되지 않은 선충군에 비해 상당히 높은 SOD-3::GFP 발현율(35.5%, *** $p < 0.001$)을 보여주었다(Fig. 6).

고찰

단삼 ethyl acetate 분획은 DPPH radical과 superoxide 소거활성시험에서 농도의존적으로 강한 항산화 활성을 보여주었다. 이러한 결과는 단삼의 함유성분으로 알려진 다수의 rosmarinic acid나 tanshinone 성분과 같은 화합물들에 의한 것으로 생각되며, 보고된 단삼 추출물의 항산화 효능들과 잘 부합되는 결과로 판단 된다.¹⁹⁻²¹⁾ 예쁜꼬마선충 내의 항산화 효소인 SOD 및 catalase의 활성을 확인해 본 결과 단삼 ethyl acetate 분획은 농도 의존적으로 SOD 및 catalase의 활성을 높이는 것으로 확인되어 free radical에 의해 야기되는 oxidative stress로부터 방어하는 기전에 도움이 될

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

Stress condition	Concentration	Mean lifespan (h)	Maximum lifespan (h)	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
2 mM Juglone	Control	16.0 ± 1.2	24	-	-
	250 µg/mL	18.9 ± 1.1	26	18.4	* $p < 0.05$
	500 µg/mL	21.8 ± 1.1	31	36.4	*** $p < 0.001$

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 * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

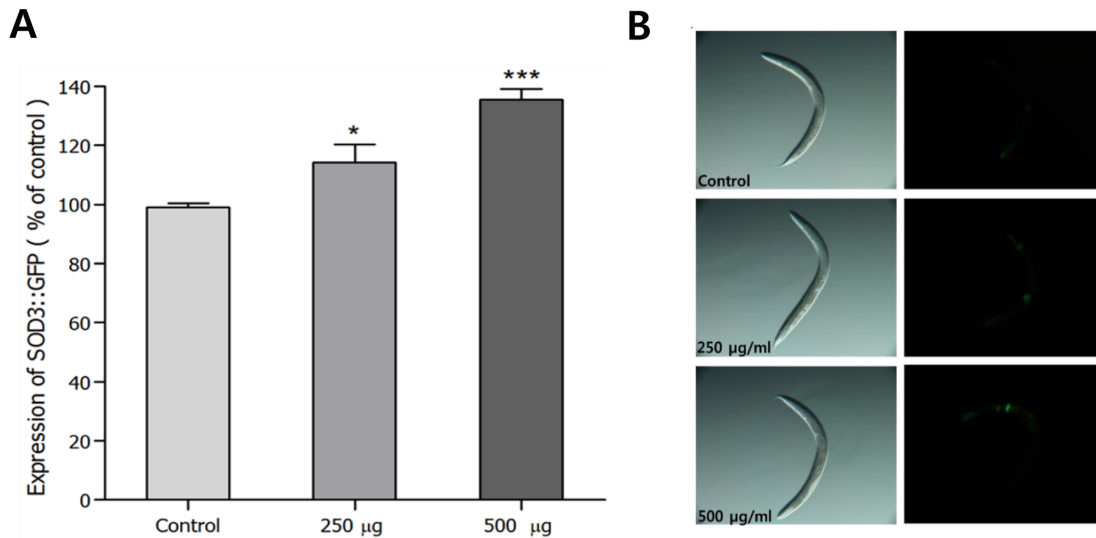


Fig. 6. Effect of the ethyl acetate fraction of *Salvia miltiorrhiza* on the expression of SOD-3 was determined using transgenic nematodes. Mean GFP intensity of CF1553 mutant was represented as mean \pm S.E.M. of values from 25 to 30 animals per each experiment. The GFP intensity was quantified using image software by determining average pixel intensity. Images of SOD-3::GFP expression of CF1553 worm in the presence or absence of the ethyl acetate fraction. Data are expressed as the mean \pm 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.

것으로 생각된다.²²⁾ 또한 juglone으로 유도한 선충의 oxidative stress에 대한 저항능력을 측정한 실험에서는 같은 stress 조건하의 대조군과 비교해 볼 때 단삼 ethyl acetate 분획 처리군의 생존율이 농도 의존적으로 크게 증가하였다. 이와 관련된 기전 중의 하나로써, 형질전환된 GFP-fused transgenic strain CF1553을 이용한 oxidative stress 저항성 확인실험에서 저항성 지표인자로서 SOD-3::GFP 형광 발현율을 측정해 본 결과, 형광 발현율이 농도 의존적으로 증가되는 것으로 나타나 oxidative stress에 저항하는 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 필요 이상으로 생성된 세포 내의 활성산소종과 각종 스트레스, 세포 손상 등에 의해 생성되는 활성산소종은 체내의 항산화 효소 등을 소멸시켜 oxidative stress를 야기시키며, 노화와 관련된 각종 퇴행성 질환을 비롯한 각종 암 발생 및 염증 생성 등에 관련성이 있음이 보고되어 있다.²³⁾ 단삼과 관련된 연구 중에 tanshinone I의 Parkinson's disease mouse model에서의 oxidative stress 억제효능과, tanshinone IIA의 간경화를 유도한 rat model에서의 oxidative stress를 억제한다는 보고들은 위와 같은 연구결과와 상당한 관련성이 있을 것으로 사료된다.^{24,25)} 단삼 ethyl acetate 분획이 SOD나 catalase 등의 항산화 효소의 활성을 증가시키고, oxidative stress에 대한 저항력을 높여 주는 효능은 암, 염증성 질환 등의 예방 및 치료에 도움을 줄 수 있으며, 노화를 억제하여 수명을 연장시키는데 어느 정도 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 이후에 이어지는 연구로 단일 물질 수준에서의 항산화 활성 및 기전 연구가 필요

할 것으로 사료된다.

결론

단삼 ethyl acetate 분획은 DPPH radical과, superoxide 소거활성 시험에서 강한 항산화력을 보여 주었으며, 예쁜꼬마선충 내의 항산화 효소인 SOD 및 catalase의 활성이 단삼 ethyl acetate 분획 투여에 의해 농도 의존적으로 높아졌다. 선충 세포 내 ROS의 측정량억제 실험에서 단삼 ethyl acetate 분획은 ROS 발생을 억제하는 하였으나 유의성은 보여 주지 못했다. Juglone을 처리한 oxidative stress 반응 관련 실험에서는 단삼 ethyl acetate 분획 투여군의 생존율이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이와 관련하여 예쁜꼬마선충의 mutant인 GFP-fused transgenic strain CF1553을 이용한 oxidative stress 저항성을 확인한 결과, oxidative stress에 저항성이 있는 단백질의 발현이 증가되었음을 확인하였다. 이러한 결과를 종합해 보면 단삼 ethyl acetate 분획은 항산화 및 이와 관련된 질병의 예방 및 치료를 위한 자원으로서의 가치가 있을 것으로 사료된다.

사사

이 논문은 2017년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(2017R1D1A3B03032146)로 이에 감사 드립니다.

인용문헌

1. Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A. and D'Arca, D. (2016) ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases. *Oxid. Med. Cell Longev.* doi: 10.1155/2016/3565127.
2. Luceri, C., Bigagli, E., Femia, A. P., Caderni, G., Giovannelli, L. and Lodovici, M. (2017) Aging related changes in circulating reactive oxygen species (ROS) and protein carbonyls are indicative of liver oxidative injury. *Toxicol. Rep.* doi: 10.1016/j.toxrep.2017.12.017
3. Merksamer, P. I., Liu, Y., He, W., Hirschev, M. D., Chen, D. and Verdin, E. (2013) The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging (Albany NY)* **5**: 144-150.
4. Cedikova, M., Pitule, P., Kripnerova, M., Markova, M. and Kuncova, J. (2016) Multiple roles of mitochondria in aging processes. *Physiol. Res.* **65**(Supplementum 5): S519-S531.
5. Vera Saltos, M. B., Naranjo Puente, B. F., Milella, L., De Tommasi, N., Dal Piaz, F. and Braca, A. (2015) Antioxidant and free radical scavenging activity of phenolics from *Bidens humilis*. *Planta Med.* **81**: 1056-1064.
6. Saidi Merzouk, A., Hafida, M., Medjdoub, A., Loukidi, B., Cherrak, S., Merzouk, S. A. and Elhabiri, M. (2017) Alterations of hepatocyte function with free radical generators and reparation or prevention with coffee polyphenols. *Free Radic. Res.* **51**: 294-305.
7. Niki, E. (2016) Antioxidant capacity of foods for scavenging reactive oxidants and inhibition of plasma lipid oxidation induced by multiple oxidants. *Food Funct.* **7**: 2156-2168.
8. Gomathi, D., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Vidya, B. and Uma, C. (2015) In vitro free radical scavenging activity of ethanolic extract of the whole plant of *Evolvulus alsinoides* (L.) L. *Chin. J. Integr. Med.* **21**: 453-458.
9. Waqas, M. K., Saqib, N. U., Rashid, S. U., Shah, P. A., Akhtar, N. and Murtaza, G. (2013) Screening of various botanical extracts for antioxidant activity using DPPH free radical method. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.* **10**: 452-455.
10. Sharma, S. K. and Singh, A. P. (2012) In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Nardostachys jatamansi* DC. *J. Acupunct. Meridian Stud.* **5**: 112-118.
11. Lee, K.-I., Kim, S.-H. and Seong, R.-K. (1996) Study on anti-tumor effect of *Salviae Miltorrhizae Radix* and isolation of active compound. *Korean J. Oriental Medical Pathology* **10**: 76-91.
12. 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.
13. 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 takesimense*. *Phytochemistry* **68**: 2432-2438.
14. Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
15. 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.
16. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Method. Enzymol.* **105**: 121-126.
17. Kim, H. N., Seo, H. W., Kim, B. S., Lim H. J., Lee, H. N., Park, J. S., Yoon, Y. J., Oh, J. W., Oh, M. J., Kwon, J., Oh, C. H., Cha, D. S. and Jeon, H. (2015) *Lindera obtusiloba* extends lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Prod. Sci.* **21**: 128-133.
18. 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.
19. Wu, C. F., Hong, C., Klauck, S. M., Lin, Y. L. and Efferth, T. (2015) Molecular mechanisms of rosmarinic acid from *Salvia miltiorrhiza* in acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Ethnopharmacol.* **176**: 55-68.
20. Cao, E. H., Liu, X. Q., Wang, J. J. and Xu, N. F. (1996) Effect of natural antioxidant tanshinone II-A on DNA damage by lipid peroxidation in liver cells. *Free Radic. Biol. Med.* **20**: 801-806.
21. Matkowski, A., Zielińska, S., Oszmiański, J. and Lamer-Zarawska, E. (2008) Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim., and *S. verticillata* L. *Bioresour. Technol.* **99**: 7892-7896.
22. Liu, L., Zuo, Z., Lu, S., Liu, A. and Liu, X. (2017) Naringin attenuates diabetic retinopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and NF-κB activation in vivo and in vitro. *Iran J. Basic Med. Sci.* **20**: 813-821.
23. Fariás, J. G., Molina, V. M., Carrasco, R. A., Zepeda, A. B., Figueroa, E., Letelier, P. and Castillo, R. L. (2017) Antioxidant therapeutic strategies for cardiovascular conditions associated with oxidative stress. *Nutrients* doi: 10.3390/nu9090966.
24. Jing, X., Wei, X., Ren, M., Wang, L., Zhang, X. and Lou, H. (2016) Neuroprotective effects of tanshinone I against 6-OHDA-induced oxidative stress in cellular and mouse model of Parkinson's disease through upregulating Nrf2. *Neurochem. Res.* **41**: 779-786.
25. Shu, M., Hu, X. R., Hung, Z. A., Huang, D. D. and Zhang, S. (2016) Effects of tanshinone IIA on fibrosis in a rat model of cirrhosis through heme oxygenase-1, inflammation, oxidative stress and apoptosis. *Mol. Med. Rep.* **13**: 3036-3042.

(2018. 12. 6 접수; 2018. 12. 21 심사;
2018. 12. 26 게재확정)