

H9c2 심근세포에서 제주모시풀(*Boehmeria quelpaertense*)로부터 분리된 flavonoids의 H₂O₂로 유도된 독성 보호 효과

우경완^{1†}, 심미옥^{1†}, 박 호¹, 정호경¹, 안병관¹, 함성호¹, 박종혁², 조현우^{1*}

¹한약진흥재단 한약자원본부 한약재연구팀, ²(주)루코

Protective Effects of Flavonoids from the *Boehmeria quelpaertense* against H₂O₂-Induced Cytotoxicity in H9c2 Cardiomyoblast Cells

Kyeong-Wan Woo^{1†}, Mi-Ok Sim^{1†}, Ho Bak¹, Ho Kyung Jung¹, Byeongkwan An¹, Seong-Ho Ham¹, Jong Hyuk Park² and Hyun-Woo Cho^{1*}

¹Traditional Korean Medicines Research Team, National Development Institute of Korea Medicine, Jangheunggun 59338, Korea

²Luco Co. Ltd, Gangneung 25440, Korea

Abstract - As a part of an infrastructure project on medicinal herb-based remedies, we conducted a phytochemical investigation of the 100% MeOH extract from the aerial part of *Boehmeria quelpaertense*; our findings resulted in the isolation of flavonoids (**1-2**), isoquercitrin (**1**) and hyperoside (**2**). The identification and structural elucidation of these compounds were based on ¹H-, ¹³C-NMR, and LC ESI IT-TOF MS data. All the compounds isolated from this plant were reported for the first time. In this study, we examined the antioxidant activity of the **1** and **2** on the hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress in a Rat Cardiomyoblast cell line (H9c2). The pretreatment of the flavonoids showed that it protects against H₂O₂-mediated cell death in the H9c2 cell line. Also, it decreases the intracellular reactive oxygen species (ROS) levels by the flavonoids in the H₂O₂-treated H9c2 cell line. These results showed that the **1** and **2** are a source of antioxidants. As a result, they might be helpful in preventing the progress of various oxidative stress mediated diseases, including myocardial infarction.

Key words - Anti-oxidant, *Boehmeria quelpaertense*, Flavonoid, Structure elucidation, Urticaceae

서 언

우리나라에는 모시풀속(*Boehmeria*) 식물 9종이 자생하고 있으며, 주로 잎의 형태와 크기, 지역에 따라 왕모시풀, 섬모시풀, 긴잎모시풀 등으로 분류하고 있다(An, 2011; Lee, 2006). 예로부터 모시풀은 섬유자원으로 이용되어 왔으며, 고려시대부터 재배하기 시작하여 1960년대 말까지 재배량이 증가하였다. 한 방에서는 모시풀의 뿌리를 저마근(苧麻根)이라 하여 양혈지혈(涼血止血), 혈열안태(血熱安胎), 청열이뇨(淸熱利尿), 해독(解毒)작용으로 사용하고 있다(Kim *et al.*, 2006). 최근 모시풀속

의 모시풀로부터 분리된 fatty acid는 항진균 활성 효과(Xu *et al.*, 2011)를, 왕모시풀에서 분리된 alkaloid는 위암 활성효과(Cai *et al.*, 2006)를 나타내었다. 이와 같이 모시풀속에 식물에 대한 활성성분 연구가 진행되었으나, 제주모시풀(*Boehmeria quelpaertense*)에 대한 활성 성분 연구가 이루어지지 않는 실정이다. 제주모시풀은 썩기풀과의 다년초로서 우리나라 제주도에 분포하고 있다. 높이는 1 m 자라며 왕모시풀에 비해 잎 뒷면이 짧고 털이 있고 엽병 또한 털이 있는 것이 특징이다(An, 2011).

고혈압, 동맥경화, 심근경색 등과 같은 심혈관계 질환은 심장의 지속적인 손상을 일으키게 되며 현대사회의 스트레스나 식생활에 의해 발병률이 증가되고 있다(You *et al.*, 2004). 이러한 심혈관계 질환은 지속적인 조직 손상을 야기하여 활성산소

*교신저자: johw7@nikom.or.kr

Tel. +82-61-860-2801

† These authors contributed equally to this work.

© 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

종(reactive oxygen species, ROS)을 급격하게 증가시키게 된다(Devasagayam *et al.*, 2004). 또한, 증가된 활성산소종은 또한 세포손상을 유도하게 되어 악순환이 반복되게 된다. 최근에는 천연물이나 천연성분을 이용하여 활성산소의 발생을 예방하려는 연구가 시도되고 있다(Cho *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2011).

이에 본 논문에서는 제주모시풀 전초를 methanol로 추출하여 극성 별 용매 분획 후 얻은 BuOH 분획에서 각종 column chromatography법을 이용하여 2종의 flavonoid를 분리하였고, ^1H -, ^{13}C -NMR, LC ESI IT-TOF MS를 통해 화학 구조를 동정하였다. 분리한 2종의 화합물은 이 식물로부터 처음 분리되었고, 분리된 화합물에 대한 심근세포에서 항산화 및 세포보호효과 활성을 측정하여 심혈관계 질환 예방 기능성 소재로서 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 추출 및 제조

본 연구에 사용한 제주모시풀은 쐐기풀과(Urticaceae)에 속하는 *Boehmeria quelpaertense*로서 목포대학교 한약자원학과 김휘 교수님의 식물학적 동정을 거쳤으며, 실험에 사용한 시료의 확증표본(TKM-2049)은 한약진흥재단 한약재연구팀에 보관하고 있다.

시약 및 기기

Column chromatography의 고정상으로 RP-C₁₈ silica gel (50 μm , YMC)을 사용하였다. RP TLC로는 Merck RP-C₁₈ F254s plates를 사용하였다. 성분 분리를 위해 Prep-HPLC는 Agilent A1200 series (Agilent, U.S.A) 장비를 이용하였고, 사용된 컬럼은 Luna 5 μm C₁₈(2) 100A column (250 \times 30.00 mm, Phenomenex)이다. 구조 동정에 사용된 NMR (Nuclear magnetic resonance) spectrum은 Varian 500 spectrometer (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz)으로 측정하였고, NMR 용매는 DMSO-*d*₆, CD₃OD (Sigma, USA)를 사용하였다. 세포 배양액인 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM)과 Fetal bovine serum (FBS), Streptomycin의 세포 배양 시약들은 Gibco (USA)에서 구입하여 사용하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS, CellTiter 96A Queous One Solution Cell Proliferation Assay)는 Promega (USA)에서, H₂O₂, 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DA)는 Sigma

(USA)에서 구입하여 사용하였다.

추출 및 분획

신선한 제주모시풀(2.5 kg)를 100% MeOH로 3시간, 3회 추출, 농축하여 MeOH extract 273 g을 얻었다. MeOH extract (273 g)을 증류수에 하고 *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol 로 극성순으로 용매 분획하여 각각 47, 5, 7, 40 g을 얻었다.

n-BuOH 분획으로부터 화합물의 분리

BuOH 분획물 40 g을 ODS gel (50 μm , 350 g, YMC, Japan)이 충전된 column (8 cm \times 100 cm)에 Acetonitrile-Water (1:9 \rightarrow 4:1 in 0.02% formic acid)을 용매 조건으로 하여 column chromatography를 실시하였고, 9개의 소분획(BQB1~7)을 얻었다. 그 중 BQB 4 분획물 25 g을 silica gel (70-230 mesh, Merck, Germany) 200 g이 충전된 glass column (3 cm \times 70 cm)에 로딩시키고 EtOAc-MeOH-Water (8:2:1.5) 조건으로 진행하였고, 소분획물은 TLC를 이용하여 유사한 분획을 합친 다음 농축하여 9개의 소분획물로 나누었다(BQB4-1 ~ BQB4-9). 이 중 BQB4-3을 ODS column (3 cm \times 25 cm, 5 μm , phenomenex, USA)이 장착된 prep-LC (Agilent, infinity 1260, USA)를 사용하여 화합물 **1** (90 mg)과 **2** (50 mg)를 순수하게 분리하였다.

화합물 **1** (Isoquercitrin): Yellow powder; LC ESI IT-TOF MS: m/z 465 [M+H]⁺; ^1H -NMR (500 MHz, CD₃OD, δ_{H}) 7.71 (1H, brs, H-2'), 7.58 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.38 (1H, s, H-8), 6.19 (1H, s, H-6), 5.26 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-1''), 3.72 (1H, dd, J = 12.0, 2.0 Hz, H-6''a), 3.58 (1H, dd, J = 12.0, 5.5 Hz, H-6''b); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, δ_{C}) 178.1 (C-4), 164.6 (C-7), 161.6 (C-5), 157.6 (C-2), 157.0 (C-9), 148.4 (C-4'), 144.5 (C-3'), 134.2 (C-3), 121.8 (C-1'), 121.6 (C-6'), 116.1 (C-2'), 114.6 (C-5'), 104.3 (C-10), 102.8 (C-1''), 98.5 (C-6), 93.3 (C-8), 77.0 (C-3''), 76.7 (C-5''), 74.3 (C-2''), 69.8 (C-4''), 61.1 (C-6'').

화합물 **2** (Hyperoside): Yellow powder; LC ESI IT-TOF MS: m/z 465 [M+H]⁺; ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ_{H}) 7.66 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H-6'), 7.53 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.81 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.39 (1H, s, H-8), 6.19 (1H, s, H-6), 5.37 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-1''); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, δ_{C}) 177.8 (C-4), 164.9 (C-7), 161.6 (C-5),

156.7 (C-9), 156.5 (C-2), 148.8 (C-4'), 145.3 (C-3'), 133.8 (C-3), 122.3 (C-6'), 121.3 (C-1'), 116.4 (C-5'), 115.5 (C-2'), 104.1 (C-10), 102.3 (C-1''), 99.3 (C-6), 93.8 (C-8), 76.1 (C-5''), 73.4 (C-3''), 71.6 (C-2''), 68.3 (C-4''), 60.4 (C-6'').

MeOH 추출물 LC-MS분석

제주모시풀 MeOH 추출물을 prominence UFLC system (LC-20AD pump, CTO-20A column oven, DGU-20A3 degasser, SPD-20A UV detector, SIL-20A XR autosampler, Shimadzu, Japan)을 사용하여 Table 1의 조건으로 측정하였고, 분리된 peak들은 ESI (electrospray ionization) interface를 통해 hybrid IT TOF mass spectrometer (Shimadzu LCMS-IT-TOF, Kyoto, Japan)로 분석하였다.

세포배양

Rat cardiomyoblast cell line인 H9c2는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였으며, DMEM에 10% FBS, 100 U/ml P/S를 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ Incubator에 배양하여 사용하였다.

세포독성

96 well plate에 50,000 cells/well의 H9c2 세포를 분주하고 세포를 안정화 시켰다. 시료를 첨가하고 24시간 동안 배양한 다음 10 µl의 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) solution을 분주한 후 CO₂배양기(37°C, 5% CO₂)에서 3시간 동안 배양시킨 뒤, 570 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

H₂O₂에 의한 세포의 손상으로부터 심장세포보호 효과 측정

세포를 96-well plates에 50,000 cells/well 분주한 뒤 세포를 안정화 시킨 다음 시료를 처리하고 30분 뒤 H₂O₂를 첨가하고 하루 더 배양한 후 MTS assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

유세포분석기(Flow cytometry)를 이용한 H₂O₂에 유도된 심장 세포내 활성산소종 감소 효과 측정

세포를 96-well plates에 5×10⁵ cells/well 농도로 100 µl씩 분주한 뒤 DCFH-DA를 세포 내에 형광 염색될 수 있게 30분 전처리한 후, H₂O₂와 시료를 동시에 처리하고 37°C에 3시간동안 배양하였다. 그 후 flow cytometry를 이용하여 관찰하고

Table 1. HPLC and LC-IT-TOF MS condition of *B. quelpaertense* extract

HPLC condition			
Column	Kinetex C ₁₈ 100A (1.7 µm, 2.1×100 mm)		
Flow rate	0.3 ml/min		
Injection volume	1 µl		
Column temperature	40°C		
	A: 0.1% formic acid in water		
	B: acetonitrile		
Mobile phase	Time	A (%)	B (%)
	0	90	10
	5	90	10
	22	70	30
MS condition			
Ionization mode	ESI, positive		
Capillary voltage (kV)	4.5		
CDL voltage (V)	10		
Detector voltage (kV)	1.7		
CDL temperature	200°C		
Heat block temperature	200°C		
Nebulizing gas	N ₂ , 1.5 L/min		
Collision gas	Ar		

histogram을 이용하여 정리하였다.

결과 및 고찰

화합물 분리 및 구조 분석

제주모시풀 전초(2.5 kg)를 100% MeOH로 추출하여 얻어진 추출물을 용매의 극성에 따라 *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol, H₂O로 분획하고 감압 농축하여 5개의 분획을 얻었다. 그 중 butanol 분획을 각종 column chromatography를 이용하여 2종의 화합물을 분리하였다(Fig. 1).

화합물 **1** (yellow powder)은 LC ESI IT-TOF MS에서 *m/z* 465 [M+H]⁺의 분자이온 피크가 관측되어 분자량을 464로 결정하였다. ¹H-NMR spectrum에서 1,3,4-trisubstitued proton δ_H7.71 (1H, brs, H-2'), 7.58 (1H, dd, *J*=8.5, 2.0 Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5')로부터 flavonoid의 B환을, δ_H6.38 (1H, s, H-8)와 6.19 (1H, s, H-6)의 signal로부터 flavonoid A환의 meta 위치에 존재하는 것을 관찰하여 quercetin 모핵을 갖는 것을 확인하였다. ¹³C-NMR spectrum에서 quercetin 모핵에 당 1개를 포함한 22개의 carbon peak를 확인하였다. 당의 chemical shift [δ_H5.26 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-1''); δ_C102.8

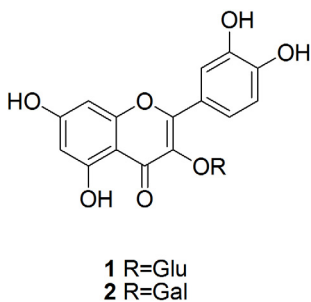


Fig. 1. Chemical structures of flavonoid derivatives (**1-2**) from the aerial part of *B. quelpaertense*.

(C-1''), 77.0 (C-3''), 76.7 (C-5''), 74.3 (C-2''), 69.8 (C-4''), 61.1 (C-6'')이 관찰되었고, glycopyranose로 판명하였다. 당의 anomeric proton의 *J* value (8.5 Hz)를 통해 β-결합하는 것을 확인하였다. 위의 모든 결과를 종합하여 기존 문헌(Lee *et al.*, 2014)과 비교한 결과 화합물 **1**을 isoquercitrin으로 동정하였다.

화합물 **2** (yellow powder)은 LC ESI IT-TOF MS에서 *m/z* 465 [M+H]⁺의 분자이온 피크가 관측되어 분자량을 464로 결정하였다. ¹H, ¹³C-NMR spectra에서 화합물 **1**과 유사한 양상을 나타내지만, 당의 carbon chemical shift의 차이를 나타내었다. ¹H-NMR spectrum에서 당의 anomeric proton은 δ_H5.37 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-1'')에 관찰되었고, ¹³C-NMR spectrum에서는 δ_C102.2 (C-1''), 76.2 (C-5''), 73.6 (C-3''), 71.6 (C-2''), 68.3 (C-4''), 60.5 (C-6'')가 확인되어 galactose로 결정하였다. δ_H5.37에 확인되는 anomeric proton의 coupling constant 값이 8.5 Hz로 galactose는 β-결합하는 것을 확인하였다. 위의 모든 결과를 종합하여 기존 문헌(Park *et al.*, 2010)과 비교한 결과 화합물 **2**을 hyperoside로 동정하였다. 2개의 화합물은 이 식물로부터 처음으로 분리 보고되는 화합물이다.

제주모시풀 MeOH LC-MS 분석

제주모시풀 MeOH 추출물 LC-MS 분석 결과 10~14분 사이에 총 5개의 major peak가 나타났고(Fig. 2), *n*-butanol 층에서 분리된 화합물은 각각 10.860분, 11.361분의 peak로 확인되었다. 10.112분과 11.037분에 확인되는 두 peak는 *m/z* 611 [M+H]⁺의 분자량이 검출되었으며, 146 dalton, 162 dalton 차이의 fragment ion signal *m/z* 465, 303 [M+H]⁺이 관찰되었다. 이 결과로 quercetin에 glucose, rhamnose가 결합한 화합물로 예측하였고, 표준품과 비교한 결과 11.037분 peak는 rutin으로 확인되었다(Fig. 3). 또한 10.112분 peak는 rutin과 동일한 분자량 및 fragment signal이 관찰되었으나, retention time이 다른 것으로 보아 당의 결합 위치가 다를 것으로 예상하였다. 13.772분

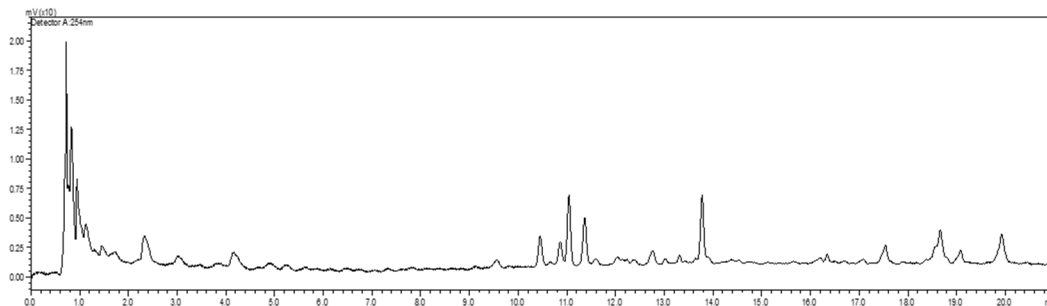


Fig. 2. LC-chromatogram of *B. quelpaertense* MeOH extract.

의 peak는 m/z 449 [M+H]⁺의 분자량이 검출되었으며, 162 dalton 차이의 fragment ion signal m/z 303 [M+H]⁺을 확인하였고, 표준품과 비교하여 quercitrin으로 확인하였다(Table 2).

화합물 1과 2의 H9c2세포에서의 세포생존율에 미치는 영향

화합물 1과 2의 세포독성을 나타내는 농도를 알아보기 위해 MTS 분석법을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. MTS는 살아 있는 세포에 있는 mitochondrial NADH-dehydrogenase와 반응하여 tetrazolium salt를 환원시켜 색상을 갖은 formazan을 형성하여 살아있는 세포를 정량화 할 수 있다(Desai *et al.*, 2006). 화합물 1 과 2를 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ M의 농도로 처리하였을 때 심장세포(H9c2)가 농도별로 세포생존률이 감소하였으나 통계적 유의성은 없는 것으로 나타났다(Fig. 4).

화합물 1과 2의 H9c2 cells에서 H₂O₂로 유도된 독성 보호효과

H₂O₂는 산화적 스트레스를 유발시키는 대표적인 물질로서 세포에 처리하게 되면 독성이 유도된다고 알려져 있다(Desai *et*

al., 2007). 독성보호 효과를 측정하기 위해 H9c2 cells에 화합물 1과 2를 독성이 없는 농도인 6.25, 12.5, 25 μ M의 농도로 세포

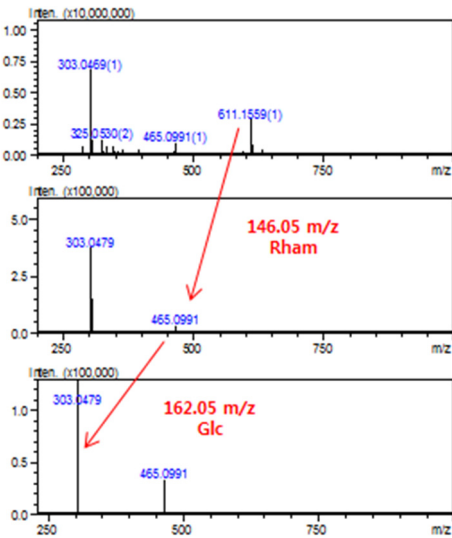


Fig. 3. MS/MS data of rutin.

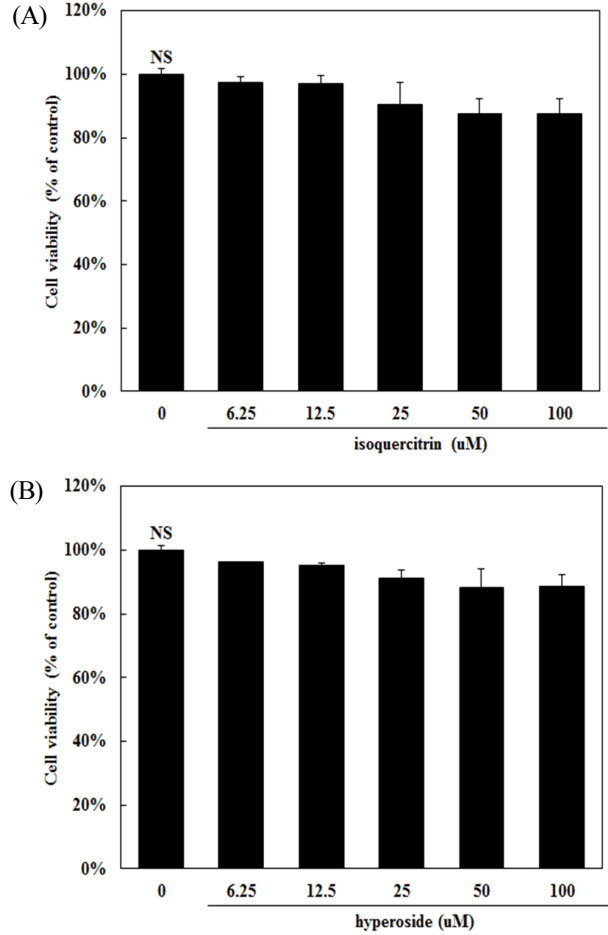


Fig. 4. Effect of flavonoids on cell viability in H9c2 cells. Cells were incubated for 24 hrs in the presence or absence of (A) isoquercitrin (B) hyperoside indicated dose. Cell viability was evaluated by MTS assay as described in materials and methods. NS: non-significant. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test. Data represent the mean \pm S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

Table 2. Positive ion MS fragmentation data of *B. quelpaertense* extract by LC-IT-TOF MS

No.	Rt (min)	Ionization Mode	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Identification
1	10.112	[M+H] ⁺	611.1559	465.0991, 303.0479	Rutin
2	10.860	[M+H] ⁺	465.1030	303.0502	Isoquercitrin
3	11.037	[M+H] ⁺	611.1588	465.1027, 303.0497	-
4	11.361	[M+H] ⁺	465.1027	303.0492	Hyperoside
5	13.772	[M+H] ⁺	449.1042	303.0478	Quercitrin

를 처리하고, H₂O₂에 의해 세포독성을 유발시켰다. H₂O₂에 의해 독성이 유도된 H9c2 세포는 정상군에 비하여 유의하게 세포 생존율이 감소하였다. H₂O₂ 단독처리군보다 화합물 1과 2를 처리하였을 때, 모두 농도의존적으로 유의성 있게 세포독성을 완화시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

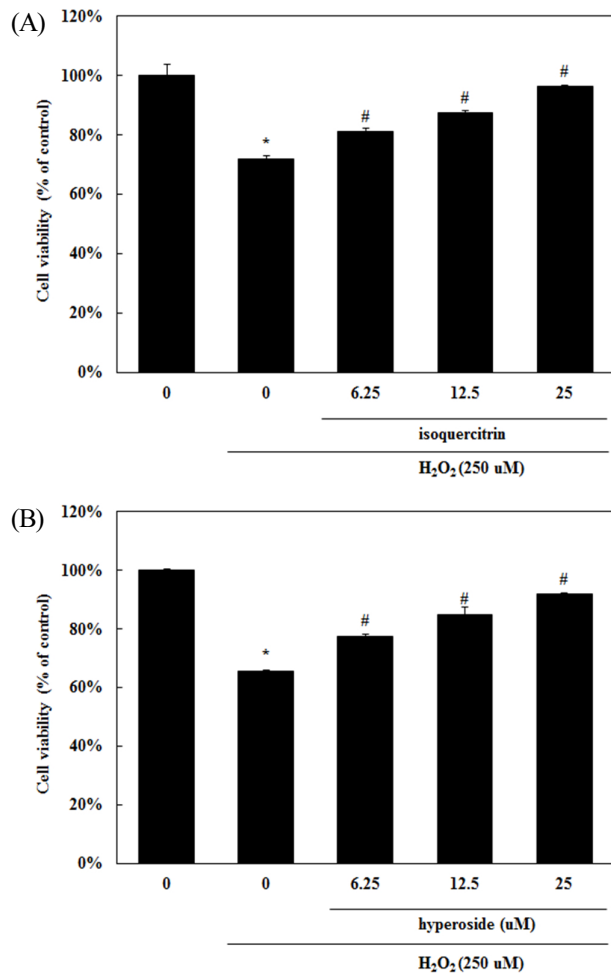


Fig. 5. Effect of flavonoids on hydrogen dioxide (H₂O₂)-mediated cytotoxicity in H9c2 cells. Cells were pre-treated with the indicated concentration of (A) isoquercitrin (B) hyperoside for 1 hr before being incubated with H₂O₂ (250 μM) for 24 hrs. Cell viability was evaluated by MTS assay as described in materials and methods. Statistical significance: *p<0.05 **p<0.01, when compared to the normal group; #p<0.05 ##p<0.01, when compared to the H₂O₂ alone treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test. Values shown are the mean ± S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

화합물 1과 2의 H9c2세포에서 H₂O₂로 유도된 세포내 활성 산소종(ROS)에 대한 영향

H9c2에 대한 H₂O₂에 의해 유도된 활성산소종(ROS)을 DCFH-DA라는 활성산소가 발생된 세포를 염색하는 형광시약을 이용해 측정하였다. H₂O₂에 의해 유도된 H9c2는 정상군에 비하여 유의하게 ROS-positive cell이 증가하였다. 화합물 1과 2를 6.25, 12.5, 25.0 μM의 농도로 세포를 처리하였을 때, H₂O₂ 단독 처리군보다 H9c2세포에서 농도의존적으로 유의성 있게 세포내 활성산소종을 완화시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6, 7). 이는 기존에 hyperoside (2)가 인간상피세포(ECV304)의 세포내 활성산소종의 감소와 같은 비슷한 결과를 얻을 수 있었다(Li *et al.*, 2008). 하지만 isoquercitrin (1)은 인간 소장세포에서 세포내 활성산소종의 감소하지 않았지만(Yokomizo *et al.*, 2006), 여러 연구들을 통해 isoquercitrin이 ABTS와 DPPH 라디칼 소거능이 등 항산화 능력이 뛰어난 것으로 알려져 있다(Shibano *et al.*, 2008; Regasini *et al.*, 2008; Masuoka *et al.*, 2006). 본 실험에서도 심장세포에서 세포내 활성 산소종을 감소시켜 항산화 효과가 뛰어난 것을 확인하였다.

적 요

제주모시물에서 각종 column chromatography법을 이용하여 2종의 flavonoid를 분리하여, ¹H-, ¹³C-NMR, LC ESI-IT-TOF MS를 통해 구조동정 할 수 있었다. 분리된 물질이 심장세포에서 높은 항산화 활성을 가지고 있으며, 활성 산소종의 작용 기전 연구 및 심근경색 질환의 예방과 치료에 효과적으로 사용할 수 있는 기초자료가 될 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2014년도 보건복지부 한약재 산업 육성을 위한 기반구축(한국 토종자원의 한약재 기반구축사업) 결과의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

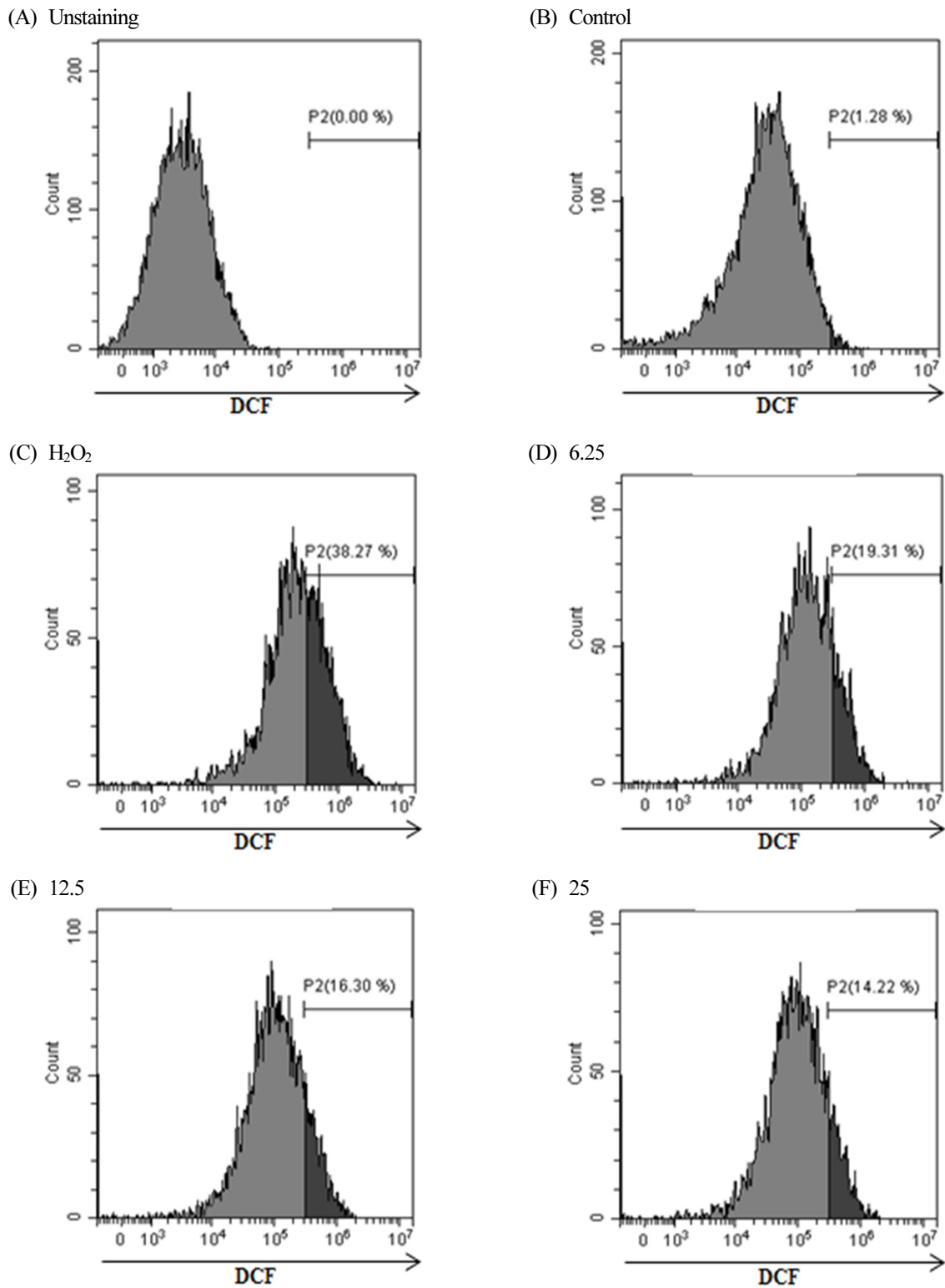


Fig. 6. Effect of isoquercitrin on hydrogen dioxide (H₂O₂)-mediated ROS induction in H9c2 cells. H9c2 were pre-treated with DCFH-DA for 30 min, followed by the indicated concentration of isoquercitrin and 1 mM of H₂O₂ treatment for 3 hrs incubation. Levels of intracellular ROS were measured by flow cytometry. (A) Unstaining, (B) Control, (C) H₂O₂-treated cells, isoquercitrin (D) 6.25 μM and H₂O₂-treated cells (E) 12.5 μM and H₂O₂-treated cells (F) 25 μM and H₂O₂-treated cells.

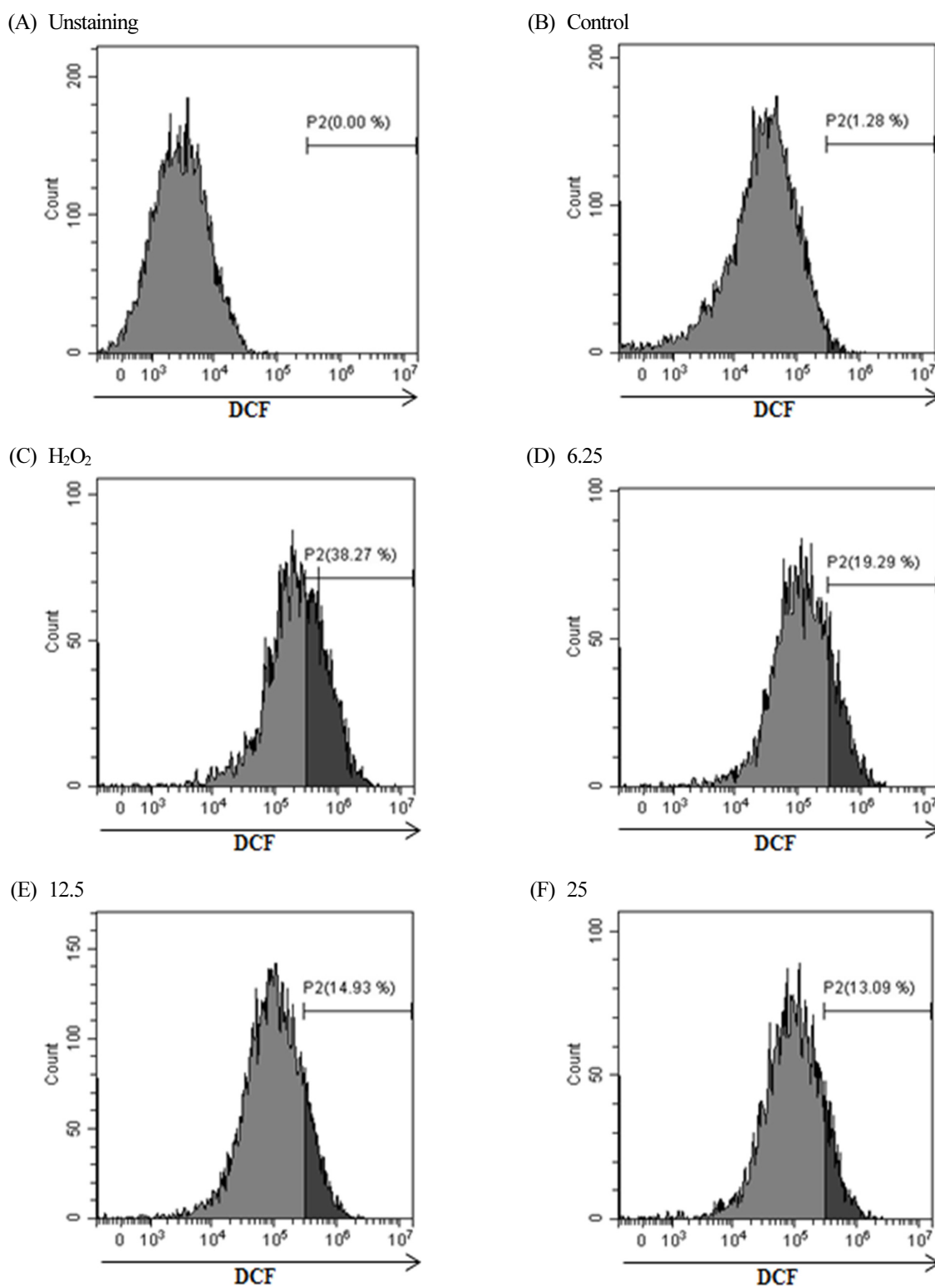


Fig. 7. Effect of hyperoside on hydrogen dioxide (H₂O₂)-mediated ROS induction in H9c2 cells. H9c2 were pre-treated with DCFH-DA for 30 min, followed by the indicated concentration of hyperoside and 1 mM of H₂O₂ treatment for 3 hrs incubation. Levels of intracellular ROS were measured by flow cytometry. (A) Unstaining, (B) Control, (C) H₂O₂-treated cells, hyperoside (D) 6.25 μ M and H₂O₂-treated cells (E) 12.5 μ M and H₂O₂-treated cells (F) 25 μ M and H₂O₂-treated cell.

References

- An, Y.S. 2011. In Endemic species of Korea. GeoBook, Seoul, Korea. p. 338 (in Korean).
- Cai, X.F., X. Jin, D. Lee, Y.T. Yang, K. Lee, Y.S. Hong, J.H. Lee and J.J. Lee. 2006. Phenanthroquinolizidine alkaloids from the roots of *Boehmeria pannosa* potently inhibit hypoxia-inducible factor-1 in AGS human gastric cancer cells. *J. Nat. Prod.* 69(7):1095-1097.
- Cho, K.I., S.W. Jung, J.H. Jang, D.Y. Lee, S.W. Park, I. Lee, S.H. Sin and B.S. Moon. 2005. Protective effects of Samul-tang on oxidative stress induced death of H9c2 cardioblast cells. *J. Korean Oriental. Med.* 26(1):174-186 (in Korean).
- Desai, A., T. Vyas and M. Amiji. 2008. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J. Pharm. Sci.* 97(7):2745-2756.
- Devasagayam, T.P.A., J.C. Tilak, K.K. Bloor, S. Sane Ketaki, S. Ghaskadbi Saroj and R.D. Lele. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Phys. India* 52:794-804.
- Kim, D.E., B. Kim, H.S. Shin, H.J. Kwon and E.S. Park. 2014. The protective effect of hispidin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells through Akt/GSK-3 β and ERK1/2 signaling pathway. *Exp. Cell. Res.* 327(2):264-275.
- Kim, S.M., D.I. Shin, H.S. Song, S.K. Kim and S.T. Yoon. 2006. Geographical distribution and habitat characteristics of *Boehmeria* in South Korea. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 14(1):14-18 (in Korean).
- Lee, K.Y., S.Y. Hong, H.J. Jeong, J.H. Lee, S.H. Lim, N.K. Heo, S. Kim and H.Y. Kim. 2014. Isolation and identification of α -glucosidase inhibitory compounds, hyperoside, and isoquercetin from *Eleutherococcus senticosus* leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43(12):1858-1864 (in Korean).
- Li, H.B., X. Yi, J.M. Gao, X.X. Ying, H.Q. Guan and J.C. Li. 2008. The mechanism of hyperoside protection of ECV-304 cells against tert-butyl hydroperoxide-induced injury. *Pharmacology* 82(2):105-113.
- Masuoka, N., T. Isobe and I. Kubo. 2006. Antioxidants from *Rabdosia japonica*. *Phytother. Res.* 20(3):206-213.
- Park, H.J., A. Nugroho, B. Jung, Y.H. Won, Y.J. Jung, W.B. Kim and J.S. Choi. 2010. Isolation and quantitative analysis of flavonoids with peroxynitrite-scavenging effect from the young leaves of *Heracleum moellendorffii*. *Korean J. Plant Res.* 23(5) 393-398.
- Regasini, L.O., J.C.R. Velloso, D.H.S. Silva, M. Furlan, O.M. Mascarenhas de Oliveira, N.M. Khalil, I.L. Brunetti, M.C.M. Young, E.J. Barreiro and V.S. Bolzani. 2008. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry* 69(8):1739-1744.
- Shibano, M., K. Kakutani, M. Taniguchi, M. Yasuda and K. Baba. 2008. Antioxidant constituents in the dayflower (*Commelina communis* L.) and their α -glucosidase inhibitory activity. *J. Nat. Med.* 62:349-353.
- Sun, X., G.B. Sun, M. Wang, J. Xiao and X.B. Sun. 2011. Protective effects of cynaroside against H₂O₂-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts. *J. Cell. Biochem.* 112(8):2019-2029.
- Yokomizo, A. and M. Moriwaki. 2006. Effects of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal caco-2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(6):1317-1324.
- You, B.S., J.E. Jung, J.Y. Park, J.M. Yun, I. Lee and B.S. Moon. 2004. Protective effects dohongsamul-tang on zinc-mediated cytotoxicity in H9c2 cardiomyoblast cells. *Kor. J. Orient. Physio & Patho.* 18(5):1374-1381 (in Korean).
- Xu, Q.M., Y.L. Liu, X.R. Li, X. Li and S.L. Yang. 2011. Three new fatty acids from the roots of *Boehmeria nivea* (L.) gaudich and their antifungal activities. *Nat. Prod. Res.* 25(6): 640-647.

(Received 7 August 2017 ; Revised 19 September 2017 ; Accepted 16 October 2017)