

FOOD&CHEMISTRY

Effect of Donganme (*Sorghum bicolor* L. Moench) against oxidative stress *in vitro* and in a cellular system in glial cells

Ji Myung Choi^{1,2,†}, Yeo Jin Kim^{1,†}, Ah Young Lee³, Eun Ju Cho^{1,*}

¹Department of Food Science and Nutrition, and Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 46241, Korea

²Department of Food and Nutrition, Kyungsoo University, Busan 48434, Korea

³Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea

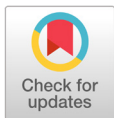
[†]These authors contributed equally to this work as the first authors.

*Corresponding author: ejcho@pusan.ac.kr

Abstract

In this study, we investigated the protective effects of ‘Donganme’ (*Sorghum bicolor* L. Moench) against oxidative stress under *in vitro* conditions and in a cellular system using C6 glial cells. The radical scavenging activities were observed using the substrates 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl (\bullet OH) radicals. The Donganme extract had an \bullet OH radical scavenging activity of 82.66% at a concentration of 100 μ g·mL⁻¹. Additionally, when DPPH was used as the substrate, the Donganme extract exhibited a strong radical scavenging activity in a concentration-dependent manner with an IC₅₀ value of 28.56 μ g·mL⁻¹. Furthermore, treating C6 glial cells with hydrogen peroxide (H₂O₂) reduced the cell viability and generated reactive oxygen species (ROS) and lactate dehydrogenase (LDH) compared to the normal levels, indicating that H₂O₂ induced oxidative stress. However, Donganme extracts increased the cell viability and inhibited ROS and LDH production against oxidative stress by H₂O₂ in the C6 glial cells. In particular, it showed effective cell protection with the cell viability, ROS production, and LDH release at 83.50, 88.06, and 14.87%, respectively, which were lower than the control or similar to the normal levels even at a low concentration of 100 μ g·mL⁻¹. The present study suggests that the Donganme extract was effective in protecting against oxidative stress in C6 glial cells through its antioxidant activity. Thus, Donganme could be a promising therapeutic agent for neurodegenerative diseases due to oxidative stress.

Keywords: anti-oxidant, C6 glial cell, Donganme, hydrogen peroxide (H₂O₂), *Sorghum bicolor* L. Moench



OPEN ACCESS

Citation: Choi JM, Kim YJ, Lee AY, Cho EJ. 2020. Effect of Donganme (*Sorghum bicolor* L. Moench) against oxidative stress *in vitro* and in a cellular system in glial cells. Korean Journal of Agricultural Science 47:497-508. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20200039>

Received: April 01, 2020

Revised: July 16, 2020

Accepted: July 21, 2020

Copyright: © 2020 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

뇌는 뉴런, 신경세포와 신경교세포 및 표피 세포를 포함한 많은 세포로 구성 되어있다. 특히 신경세포와 신경교세포의 경우 중추 신경계에서 주요한 역할을 하는 것으로 여겨진다(Ma et al., 2013; Ramalingam and Kim, 2014; Rodríguez et al., 2016). 신경교세포는 신경세포를 보호하고 지지하는데 필수적인 역할을 하며(Ramalingam and Kim, 2009, 2012), 신경교세포 중 microglia는 대식세포로서 활성화되며 염증 매개물질들을 생성하고 신경세포사멸을 유도한다. 신경세포의 사멸 및 단백질 응집, 활성화된 microglia는 염증반응을 일으켜 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환 및 기타 연령과 관련된 신경 퇴행성 질환을 일으키게 된다(Nunomura et al., 2007; Seo et al., 2008; Lee et al., 2018; Kim et al., 2019). 따라서, 신경교세포의 보호는 신경세포의 보호와 심혈관 및 신경 퇴행성 질환의 예방 및 치료적 요소로 작용한다(Park et al., 2017). 특히, 신경계의 경우는 다량의 산소를 소비하고, 지방산이 풍부하기 때문에 지질 과산화에 취약하며, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 제거하는 능력이 다른 조직에 비해 적어 산화적 스트레스를 받을 때 신경세포를 치명적으로 손상시키게 된다(Omodeo-Sale et al., 1997). 산화적 스트레스의 원인이 되는 ROS는 hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$), superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) 등이 있으며, 내외부적인 요인에 의해 신체 내에 과잉으로 쌓이게 되면서 노화 과정 및 세포 사멸, 또 다른 질병의 원인이 되어 신체 내에서 유해 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(Klein and Ackerman, 2003; Krause, 2007; Palmieri and Sblendorio, 2007; Woo et al., 2013). 특히, H_2O_2 는 산화적 스트레스를 통해 생성되는 가장 중요한 ROS 중 하나이며, 반응성이 높은 $\bullet\text{OH}$ 를 생성하여 주요 세포 구성 요소에 대한 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다(Satoh et al., 1996; Cho et al., 2009; Nirmaladevi et al., 2014; Choi et al., 2016). 현재 ROS를 감소시키거나 억제하는데 다양한 약물이 이용되고 있지만 합성 약물이 갖는 체내 부작용이 발생됨에 따라 최근에는 부작용과 독성이 적은 천연물을 소재로 한 치료예방법에 많은 관심이 상승하고 있으며, 새로운 생리 활성 소재의 개발이 중요하게 생각된다(Jin et al., 2014; Kim et al., 2014; Lee et al., 2014; Venkatesan et al., 2016).

수수(*Sorghum bicolor* L. Moench)는 외떡잎식물 벼 목에 속하며 전 세계적으로 식용과 사료로 널리 재배되는 작물이다. 원산지는 열대 아프리카로 아시아, 중미지역 및 유럽에서 가장 많이 이용되고 있다(Afify et al., 2011). 수수에는 phenolic acids, flavonoids, 그리고 tannins 등 항산화 효능을 가진 물질이 포함 되어있어 콜레스테롤 감소(Awika and Rooney, 2004), 항균활성(Kil et al., 2009), 항염증(Afify et al., 2012), 항암(Kwak et al., 2006; Park et al., 2012) 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 특히, 동안메는 국립식량과학원에서 육성한 메성 단수수로 이삭모양이 밀수형이며, 밀도가 조밀하다. 색상은 암적색으로 다른 수수보다 조금 진한 편이다. 동안메는 기능성이 강조되어 육성된 품종으로서 수량성이 높고, 우수한 항산화 활성(Woo et al., 2013) 및 항당뇨 활성이 보고된 품종이다(Choe et al., 2017; Jung et al., 2018). 국내에서 육성된 여러 수수 품종의 항산화 활성을 비교한 연구에서 동안메가 가장 항산화능이 가장 뛰어난 품종으로 확인되었다(Lee et al., 2016). 그러나, 아직까지 동안메를 활용한 다양한 기능성에 대한 연구가 부족한 실정이고, 특히 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호 효과 관련 연구는 전무한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 항산화 기능이 우수하다고 알려진 동안메를 이용하여 *in vitro* 실험을 통해 radical 소거능력을 측정하였고, C6 glial cell을 이용하여 신경세포 보호효과를 살펴보고자 하였다.

Materials and Methods

재료

본 연구에 사용된 수수(품종명: 동안메)는 국립식량과학원 남부작물부(Miryang, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 시료의 추출은 시료 10배 중량의 80% EtOH로 24시간 동안 3회 반복하여 추출한 뒤, 회수된 추출물을 진공상태인 40°C에서 진공 회전 농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하여 시료를 조제하였다. 동안메 건물에 대한 추출물의 수율은 8.4% (w/w)였다. 동안메 추출물은 0.25 g·mL⁻¹ 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 냉장 보관하며 실험에 사용되었다. Radical 소거능의 경우 100, 250, 500, 1000 µg·mL⁻¹의 농도로 실험 용매에 희석하여 각 실험에 사용하였으며, 세포 실험의 경우 세포 독성이 없었던 농도인 25, 50, 100 µg·mL⁻¹의 농도를 선별하여 배지에 희석하여 실험에 사용하였다.

시약

C6 glial cell은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 세포배양을 위한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)과 100 units/mL penicillin streptomycin, trypsin EDTA, fetal bovine serum (FBS)은 Welgene (Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 산화적 스트레스를 유도하기 위해 사용한 H₂O₂는 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하였으며, lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity detection kit는 Takara Bio (Siga, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), DMSO와 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate (DCF-DA), 2-deoxyribose 및 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. EDTA disodium salt dehydrate와 FeSO₄·7H₂O는 Daejung Chemicals & metals Co. Ltd. (Siheung, Korea)에서 구매하였다. Trichloroacetic acid (TCA)는 Biossang Inc. (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, thiobarbituric acid (TBA)는 Acros Organics Inc. (Morris Plains, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능 측정

동안메의 DPPH radical 소거능 측정은 Hatano et al. (1989)의 방법으로 실행하였다. DPPH를 빛에 노출시키지 않은 채 EtOH에 용해시켜 만든 60 µM DPPH 용액을 EtOH에 농도별로 희석시킨 동안메 추출물과 잘 혼합하여, 빛 노출이 안 되는 실온에서 30분 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 free radical 소거효과를 백분율과 IC₅₀로 나타냈으며, 모든 실험은 실험 군별 n = 5, 전체 2회 반복 실험하여 결과를 얻었다.

•OH radical 소거능 측정

Chung et al. (1997)의 방법으로 실행하였다. Fenton 반응에 따라 10 mM FeSO₄·H₂O-EDTA에 10 mM의 2-deoxyribose solution과 농도별 시료에 혼합한 다음, 10 mM의 H₂O₂를 첨가하여 37°C에서 4시간 반응시켰다. 그 후, 이 혼합액에 2.8% TCA와 1.0% TBA solution을 각각 첨가하여 20분 간 가열한 후 식혀 96-well plate에 분주하고 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 모든 실험은 실험 군 별 n = 5, 전체 2회 반복 실험하여 결과를 얻었다.

세포배양

C6 glial cell은 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% FBS를 혼합한 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양은 T75 flask를 이용하였으며, 배양액은 1 - 2일에 한 번씩 배지를 교환해 주었다. 세포 분화가 80%에 도달했을 때 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세포를 세척한 후 0.02% EDTA가 함유된 0.05% trypsin-EDTA로 부착된 세포를 분리하고 계대 배양하며 사용하였다. 세포 실험에서 normal군은 배지만 단독으로 처리하여 배양한 군, control군은 300 µM 농도의 H₂O₂를 처리하여 배양한 군으로 설정하여 실험을 진행하였으며 모든 실험은 실험 군 별 n = 5 이상, 전체 2회 반복 실험으로 결과를 얻었다.

세포 생존율 측정

Confluence 상태가 된 C6 glial cell을 96-well plate에 well 당 5×10^4 cells·mL⁻¹로 seeding하여 37°C에서 24시간 배양하여 세포를 부착시켰다. 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator 내에서 4시간 배양시키고, 그 후 세포의 산화적 손상을 유도하기 위하여 H₂O₂를 300 µM의 농도로 처리하여 동일한 조건에서 24시간 배양시켰다. 이후, 각 well의 배양액을 제거하고 5 mg·mL⁻¹의 MTT solution을 각 well에 주입한 뒤 4시간 재배양 시켰다. 그 후 생성된 보라색의 formazan 결정을 DMSO에 녹여 30분간 빛 노출이 안 되는 실온에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ROS 생성측정

세포가 confluence 상태가 되면 96-well black plate에 well 당 5×10^4 cells·mL⁻¹로 seeding하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 세포를 부착하였다. 24시간 후 시료를 처리하여 4시간 배양하였으며, 산화적 손상을 일으키기 위해 H₂O₂ (300 µM)를 처리하여 24시간 같은 조건에서 배양시켰다. 이 후, 각 well의 배양액을 제거하고 80 µM 농도의 DCF-DA 용액을 각 well에 주입하여 37°C에서 30분간 재 배양한 후 FLUO star OPTIMA (BMG Labtech, Ortenberg, Germany)를 이용하여 excitation 480 nm, emission 535 nm로 측정하였다.

LDH 분비능 측정

세포막 손상 억제 효과를 알아보기 위해 LDH assay를 이용하였다. C6 glial cell의 세포가 confluence 상태가 되면 96-well plate에 5×10^4 cells·mL⁻¹로 seeding하여 24시간 37°C에서 배양하였다. 24시간이 지난 후 시료 처리하여 4시간 배양 후, 상등액과 reaction mixture를 1 : 1의 비율로 혼합하여 30분간 빛 노출이 안 되는 실온에서 반응시켰다. 모든 시료들은 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석

본 실험에서 측정된 결과는 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation)로 나타내었다. 통계프로그램인 Statistical Package for the Social Sciences (version 23, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA, analysis of variance)을 구한 후 Duncan's multiple range test를 사용하여 유의수준 0.05에서 유의성을 검증하여 결과를 분석하였다.

Results and Discussion

동안메의 DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거능 측정은 비교적 안정적이고 간단하면서 재현성이 높아 다양한 천연소재로부터의 항산화 물질을 검색하는데 널리 이용되는 방법 중의 하나이다. 분자내 radical을 가지고 있는 DPPH와 항산화제가 반응을 하여 불가역적으로 DPPH를 DPPHH의 형태로 환원되어 보라색의 발색을 띠는 화합물을 만들고, 이것은 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자로 환원되어 짐에 따라 보라색에서 무색으로 가는 원리로서 흡광도로 변화를 측정하는 방법이다(Wang et al., 2005). DPPH radical 소거능 측정에서는 동안메 추출물을 100, 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 농도로 실험을 진행하였으며, 각 농도에서 64.51, 72.96, 80.36 및 89.24%의 소거능을 나타내어 농도 의존적으로 DPPH radical이 소거됨을 확인하였다(Table 1). 특히 1,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 에서 89.24%의 소거능을 보여 우수한 DPPH 소거능을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

Table 1. DPPH radical scavenging activity of Donganme sorghum a 80% ethanol extract.

Treatment ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Scavenging activity (%)
	Donganme extract
100	64.51 \pm 1.22d
250	72.96 \pm 2.97c
500	80.36 \pm 1.27b
1,000	89.24 \pm 0.95a
IC50	28.56 \pm 2.32

Values are mean \pm SD.

a - d: Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

동안메의 $\cdot\text{OH}$ radical 소거능

$\cdot\text{OH}$ radical은 free radical 및 생체 내에서 발생하는 ROS 중에서 산화적 손상에 가장 독성이 강하고 반응성이 강하고 결합력이 높은 free radical이다. 이는 단백질, 지질, DNA 손상 및 세포에 산화적 손상을 유발하여 다양한 질환을 초래하는 물질로서 알려져 있다(Halliwell and Aruoma, 1991). $\cdot\text{OH}$ radical 소거능 측정은 $\cdot\text{OH}$ 가 Fenton 반응에 의해 생성되거나 활성산소종인 ONOO의 분해에 의해 생성되는 것으로 항산화제의 활성 정도를 측정하는 방법이다. $\cdot\text{OH}$ radical 소거능 실험을 통해 제일 낮은 농도인 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 에서도 82.66%의 높은 $\cdot\text{OH}$ radical 소거능이 나타났다(Fig. 1). 따라서 동안메 추출물은 $\cdot\text{OH}$ radical에 대한 독성 제거 효과가 높은 것으로 확인되었다.

H_2O_2 로 산화적 스트레스를 유도한 C6 신경교세포 보호효과

MTT assay는 탈수소효소 작용에 의해 미토콘드리아의 능력을 이용하는 것으로 살아있는 세포에 시약으로 색을 입히고 그것을 측정하는 방법이다. 살아있는 세포가 많을수록 푸른 계열의 formazan이 생성되어 진한색이 나타나게 된다(Mosmann, 1983). 본 연구에서는 H_2O_2 에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 신경 세포 보호효과를 알아보기 위해 C6 glial cell을 이용하여 MTT assay를 시행하였다. MTT assay는 사전 연구를 통해 동안메 추출물의 모든 실험 농도(25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)가 신경교세포의 세포생존율에 영향을 미치지 않는 것을 확인한 후 실험을 진행하였다(data not shown). C6 세포에 H_2O_2 를 처리하여 산화적 스트레스를 유도한, control군은 아무것도 처리하지 않은 normal군에 비해 세포 생존율이 감소하여 75.24%의 생존율을 보였다(Fig. 2). 이로써 산화적 스트레스로 인해 신경교세포에 손상을 일으키는 것을 확인하였고 동안메 추출물을 농도별로 처리하였을 때 유의적으로 세포 생존율이 증가하는 것

을 확인하였다. $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서는 normal 군에 가장 가까운 생존율을 보였다. H_2O_2 만 처리한 control군과 대조했을 때 동안메 추출물이 농도 유의적으로 세포 생존율이 증가됨에 따라 신경교세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

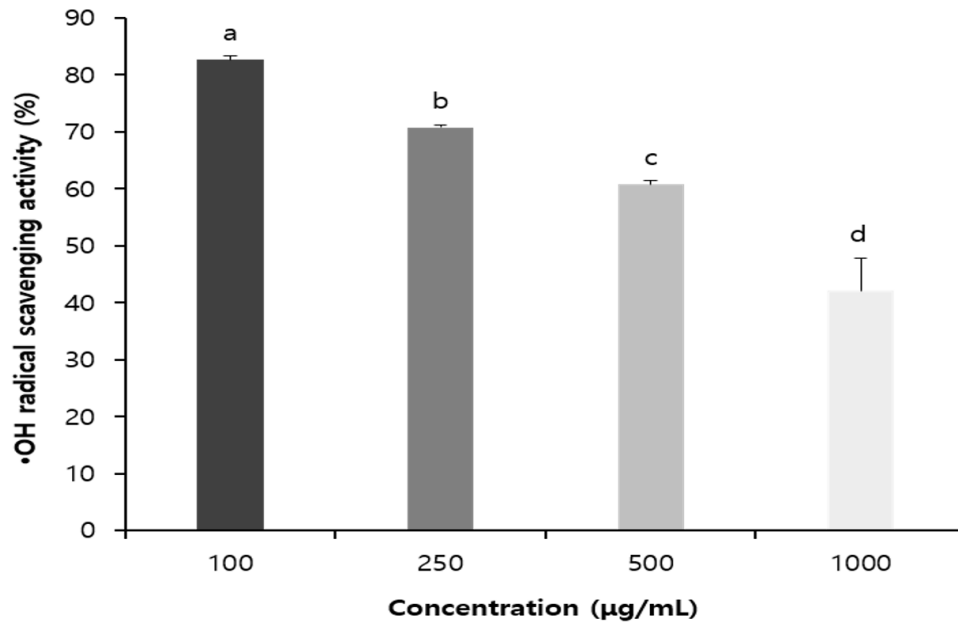


Fig. 1. •OH radical scavenging activity of Donganme sorghum a 80% ethanol extract. Values are mean \pm SD. a - d: The different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

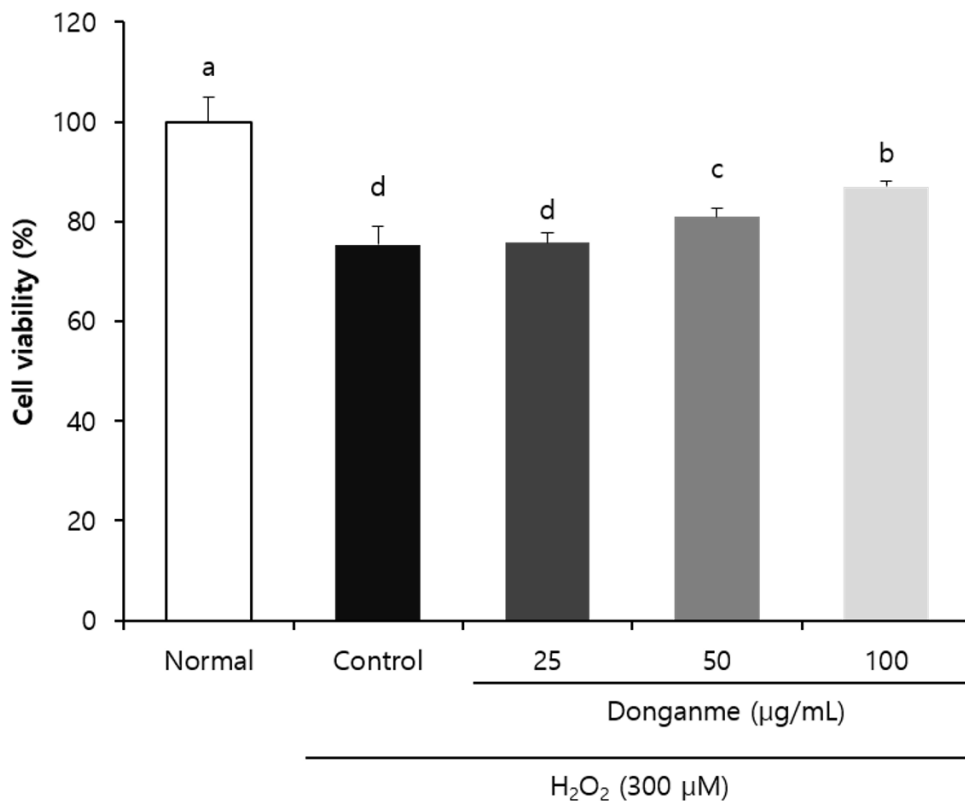


Fig. 2. Effects of 80% ethanol extract from Donganme sorghum on cell viability of C6 glial cells treated with H_2O_2 . Values are mean \pm SD. a - d: The different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

H₂O₂로 유도된 ROS 생성 억제 효과

ROS 검출에 사용되어지고 있는 DCF-DA는 세포 내 H₂O₂를 측정하는 대표적 물질인 DCF-DA를 이용하는 것으로, DCF-DA는 세포막을 자유롭게 통과하여 세포 내에서 esterase에 의해 acetate group이 제거되어 탈아세틸화 되며, H₂O₂, NO, peroxide, peroxynitrite와 같은 여러 ROS에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 DCF가 되는 방법이다 (Cathcart et al., 1983). 본 연구에서는 H₂O₂를 처리하여 C6 glial cell에서의 활성산소종 억제효과를 알아보았다. DCF-DA assay를 통해 동안메 추출물의 ROS 소거능을 살펴본 결과, H₂O₂ 300 μM의 농도를 C6 세포에 처리하였을 때 시간이 지남에 따라 ROS 생성율이 증가됨을 확인하였다(Fig. 3A). 60분을 기준으로 H₂O₂를 단독으로 처리한 control군의 ROS 생성율을 100%로 보았을 때(Fig. 3B), 아무것도 처리하지 않은 normal군은 93.72%로 나타나 control군에 대해 유의적으로 ROS 생성율이 낮아짐을 확인할 수 있었다. 또한, 동안메 추출물을 농도별로 처리하였을 때 ROS 생성율이 낮아지는 경향을 나타내는 것을 확인하여 동안메 추출물이 C6 세포에서 산화적 스트레스로 인한 손상에 대해 보호 효과를 나타냄을 확인하였다.

동안메의 LDH 분비능 측정

세포 내 LDH의 손실 및 배양 배지로의 방출은 세포막 손상으로 인한 세포 사멸의 지표가 되는 LDH assay를 이용하여 세포의 손상 정도를 알아보았다. Normal군은 LDH 방출 정도가 3.57%로 거의 방출되지 않았으나 H₂O₂를 단독으로 처리한 control군의 경우 23.28%로 normal군의 약 8배가량 높은 LDH 방출을 보였으며, 동안메 추출물을 농도별로 처리하였을 때 25, 50, 100 μg·mL⁻¹에서 각각 19.75, 18.86, 14.88%로 LDH 방출 정도가 control군에 비해 유의적으로 낮아졌다(Fig. 4).

수수는 조, 기장 등의 다른 잡곡류와 비교하였을 때 DPPH 및 ABTS radical 소거능이 뛰어난 것으로 확인되었으며, 특히 황금찰수수의 radical 소거능이 월등히 뛰어난 것으로 나타났다(Park et al., 2014). 동안메수수의 경우 국립식량과학원에서 육성한 품종으로 황금찰수수보다 항산화 활성이 높은 품종이다(Kim et al., 2018). 황금찰, 대풍, 남풍찰수수 등 다양한 수수 품종과 비교했을 때 총 polyphenol 함량, 총 flavonoid 함량, DPPH 및 ABTS radical 소거능 등의 활성이 뛰어나 현재까지 육성된 수수 품종 중에서 가장 항산화 활성이 우수한 것으로 확인된 품종으로 확인되었다(Lee et al., 2016; Kim et al., 2018). 동안메에는 polyphenol과 flavonoid 물질이 풍부하며, protocatechuic acid, chlorogenic acid, (+)-catechinic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, salicylic acid, caffeic acid, quercetin, naringin, hesperidin, naringenin 등의 활성물질이 존재한다. 여러 종류의 물질 중에서도 특히 동안메에는(+)-catechinic acid와 chlorogenic acid, salicylic acid 물질의 함량이 매우 높은 것으로 확인되었다(Ryu et al., 2017). 다양한 polyphenol 화합물은 O₂⁻, •OH, peroxy radical 등의 ROS 물질들을 효과적으로 소거하는 항산화능이 뛰어난 것으로 알려져 있다(Morel et al., 1993), 특히, chlorogenic acid와 salicylic acid는 기억을 담당하는 해마 신경세포의 분화를 활발하게 해주며, scopolamine 등의 물질로 기억력 손상을 입은 마우스에서 기억력 개선 효과를 나타내는 등 다수의 연구에서 신경세포 보호 효능 및 인지능력 개선 효능(Ito et al., 2008; Cetin et al., 2015; Heitman and Ingram, 2017; Singh et al., 2020)이 확인되어 본 연구 결과에도 동안메 속의 풍부한 polyphenol 물질과 대표적 활성물질인 chlorogenic acid 및 salicylic acid가 C6 신경교세포의 보호 효과에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

결과적으로, 동안메 추출물의 항산화 효과와 산화적 스트레스로부터 C6 신경교세포의 보호 효능을 통해 신경 퇴행성 질환의 효과적인 예방 및 치료제로서의 활용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

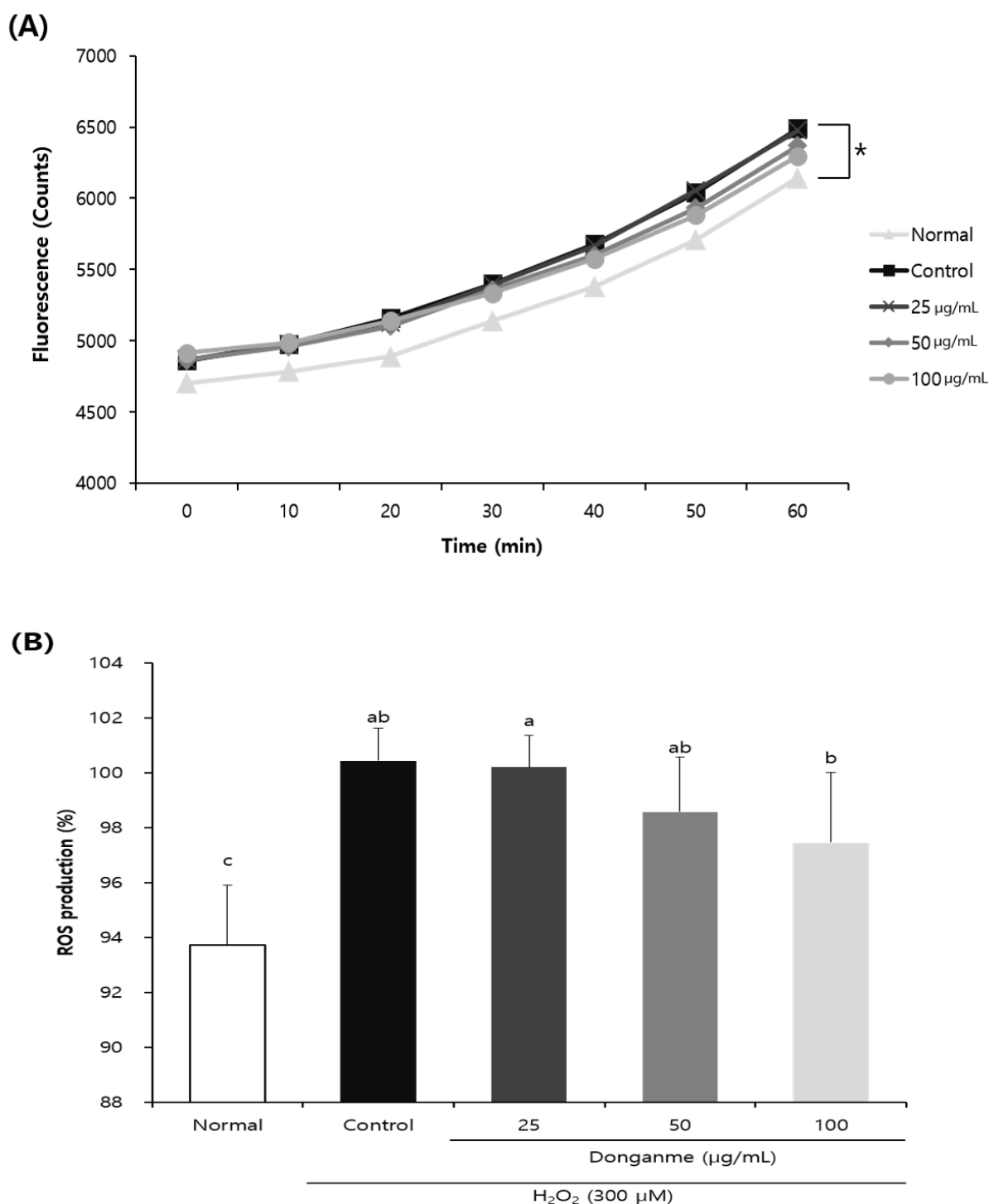


Fig. 3. Effects of 80% ethanol extract from Donganme sorghum on 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate (DCF-DA) assay of C6 glial cells treated with H₂O₂. (A) Time course of change in intensity of reactive of oxygen species (ROS) fluorescence within 60 min. (B) The intensity of ROS fluorescence at 60 min. Asterisks (*p < 0.05) shows the significant difference between the normal and control groups. Values are mean ± SD (Fig. 3B). a - d: The different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

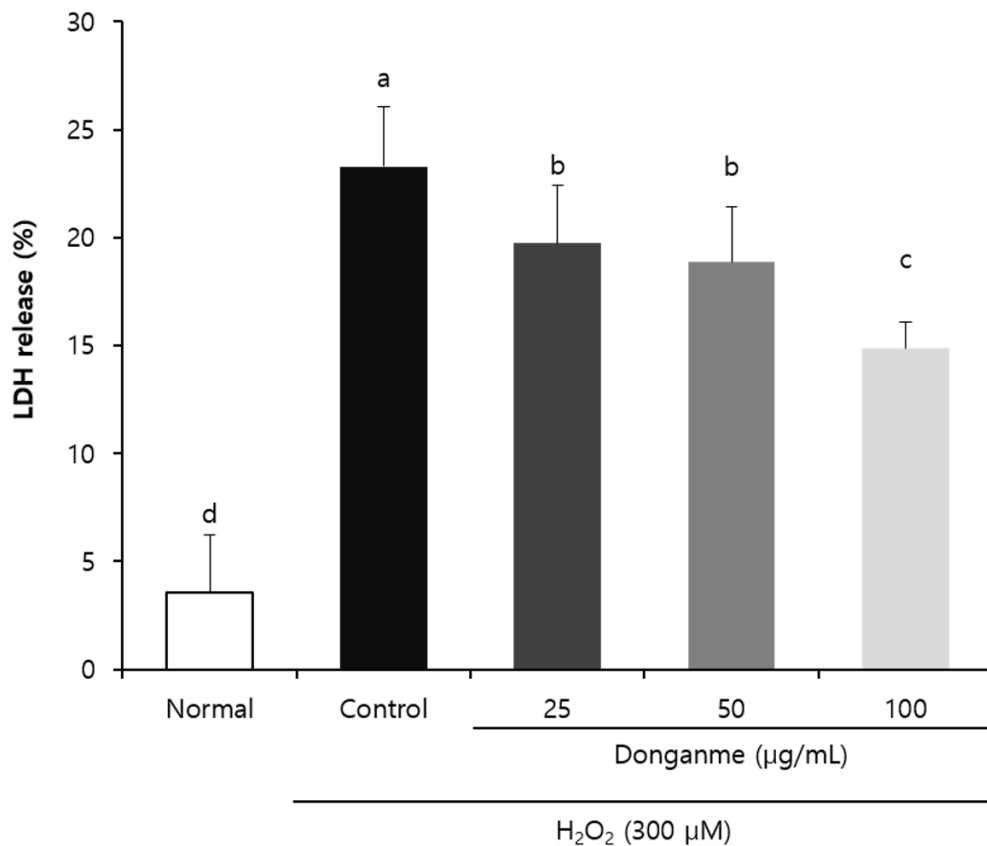


Fig. 4. Effects of 80% ethanol extract from Donganme sorghum on lactate dehydrogenase (LDH) release of C6 glial cells treated with H_2O_2 . Values are mean \pm SD. a - d: The different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Conclusion

본 연구에서는 동안메 추출물의 free radical 소거능과 C6 glial cell에서 H_2O_2 로 유도된 산화적 스트레스 개선 효과를 확인하였다. 그 결과 동안메 추출물은 우수한 free radical 소거능을 나타내었고, 특히 DPPH radical 소거능에서 $28.56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 IC_{50} 값을 보여 가장 우수한 radical 소거능임을 나타내었다. $\bullet\text{OH}$ radical 소거능을 알아본 결과, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서 82.66%의 높은 $\bullet\text{OH}$ radical 소거능을 확인할 수 있었다. 또한, 동안메 추출물이 H_2O_2 로 인해 산화적 스트레스가 유도된 C6 glial cell에서 세포 생존율을 증가시켰으며, ROS 생성과 LDH 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로 동안메 추출물은 우수한 항산화 능과 산화적 스트레스 개선을 통한 신경세포 보호 효과가 있음을 알 수 있었다.

Acknowledgements

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

Authors Information

Ji Myung Choi, <https://orcid.org/0000-0002-8869-9367>

Yeo Jin Kim, <https://orcid.org/0000-0002-1008-7459>

Ah Young Lee, <https://orcid.org/0000-0002-3489-7798>

Eun Ju Cho, <https://orcid.org/0000-0003-4282-3219>

References

- Afify AEMMR, El-Beltagi HS, El-Salam SMA, Omran AA. 2011. Bioavailability of iron, zinc, phytate and phytase activity during soaking and germination of white sorghum varieties. *PLOS ONE* 6:e25512.
- Afify AEMMR, El-Beltagi HS, El-Salam SMA, Omran AA. 2012. Biochemical changes in phenols, flavonoids, tannins, vitamin E, β -carotene and antioxidant activity during soaking of three white sorghum varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2:203-209.
- Awika JM, Rooney LW. 2004. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry* 65:1199-1221.
- Cathcart R, Schwiers E, Ames BN. 1983. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Analytical Biochemistry* 134:111-116.
- Cetin D, Hacimuftuoglu A, Tatar A, Turkez H, Togar B. 2015. The *in vitro* protective effect of salicylic acid against paclitaxel and cisplatin-induced neurotoxicity. *Cytotechnology* 68:1361-1367.
- Choe ME, Ko JY, Song SB, Park CH, Ko JC, Kwak DY. 2017. Changes in functional materials and antioxidant activity according to cultivation environment in the grain of sorghum 'Donganme'. *Journal of the Korean Society of International Agriculture* 29:400-407. [in Korean]
- Cho ES, Jang YJ, Hwang MK, Kang NJ, Lee KW, Lee HJ. 2009. Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals. *Mutation Research* 661:18-24.
- Choi EO, Jeong JW, Park C, Hong SH, Kim GY, Hwang HJ, Cho EJ, Choi YH. 2016. Baicalein protects C6 glial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis through regulation of the Nrf2 signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine* 37:798-806.
- Chung SK, Osawa T, Kawakishi S. 1997. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61:118-123.
- Halliwell B, Aruoma OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* 281:9-19.
- Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y. 1989. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI: effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37:2016-2021.
- Heitman E, Ingram DK. 2017. Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid. *Nutritional Neuroscience* 20:32-39.
- Ito H, Sun XL, Watanabe M, Okamoto M, Hatano T. 2008. Chlorogenic acid and its metabolite m-coumaric acid evoke neurite outgrowth in hippocampal neuronal cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72:885-888.
- Jin KS, Lee JY, Kwon HJ, Kim BW. 2014. Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Ardisia arborescens* ethanol extract. *Journal of Life Science* 24:713-720. [in Korean]
- Jung GH, Kim SK, Lee JE, Woo KS. 2018. Physicochemical characteristics of sorghum according to variety and seeding period. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 47:422-428. [in Korean]
- Kil HY, Seong ES, Ghimire BK, Chung IM, Kwon SS, Goh EJ, Heo K, Kim MJ, Lim JD, See D, Yu CY. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chemistry* 115:1234-1239.

- Kim JH, Kim MJ, Choi JM, Lee S, Cho EJ. 2019. Protective effects of *Cirsium japonicum* var. *maackii* against amyloid beta-induced neurotoxicity in C6 glial cells. *Korean Journal of Agricultural Science* 46:369-379. [in Korean]
- Kim JI, Jung TW, Kwak DY, Kim KY, Ko JY, Woo KS, Song SB, Lee JK, Lee MC, Oh IS, Choe ME. 2018. A new sorghum (*Sorghum bicolor* L.) cultivar with higher antioxidants. *Korean Journal of Breeding Science* 50:155-160. [in Korean]
- Kim MH, Kim SH, Yang WM. 2014. Mechanisms of action of phytochemicals from medicinal herbs in the treatment of Alzheimer's disease. *Planta Medica* 80:1249-1258.
- Klein JA, Ackerman SL. 2003. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *Journal of Clinical Investigation* 111:785-793.
- Krause KH. 2007. Aging: A revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Experimental Gerontology* 42:256-262.
- Kwak CS, Park SC, Lim SJ, Kim SA, Lee MS. 2006. Antioxidative and antimutagenic effects of Korean buckwheat, sorghum, millet and job's tears. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition* 33:921-929. [in Korean]
- Lee AY, Kim MJ, Lee S, Shim JS, Cho EJ. 2018. Protective effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* against oxidative stress in C6 glial cells. *Korean Journal of Agricultural Science* 45:509-519. [in Korean]
- Lee DS, Ko WM, Kim KS, Kim DC, Yoon CS, Cho KH, Cui X, Oh HC, Kim YC. 2014. The comparison between Hot-Water extracts and microwave extracts of scutellaria radix for antioxidant and neuroprotective effects. *Korean Journal of Pharmacognosy* 45:55-61. [in Korean]
- Lee KH, Ham H, Kim MJ, Ko JY, Kim HJ, Oh SK, Jeong HS, Woo KS. 2016. Effects of heating condition and cultivar on phenolic compounds and their radical scavenging activity on sorghum. *Academica Journal of Biotechnology* 4:347-352.
- Ma WW, Hou CC, Zhou X, Yu HL, Xi YD, Ding J, Zhao X, Xiao R. 2013. Genistein alleviates the mitochondria-targeted DNA damage induced by β -amyloid peptides 25-35 in C6 glioma cells. *Neurochemical Research* 38:1315-1323.
- Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Pasdeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J. 1993. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochemical Pharmacology* 45:13-19.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63.
- Nirmaladevi D, Venkataramana M, Chandranayaka S, Ramesha A, Jameel NM, Srinivas C. 2014. Neuroprotective effects of bikaverin on H₂O₂-induced oxidative stress mediated neuronal damage in SH-SY5Y cell line. *Cellular and Molecular Neurobiology* 34:973-985.
- Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Zhu X, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. 2007. Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets* 6:411-423.
- Omodeo-Sale F, Gramigna D, Campaniello R. 1997. Lipid peroxidation and antioxidant systems in rat brain: Effect of chronic alcohol consumption. *Neurochemical Research* 22:577-582.
- Palmieri B, Sblendorio V. 2007. Oxidative stress tests: overview on reliability and use-Part I. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 11:309-342.
- Park CH, Choi SH, Lee SW. 2017. Protective effects of *Glycyrrhiza uralensis* radix extract and its active compounds on H₂O₂-induced apoptosis of C6 glial cell. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 25:315-321. [in Korean]
- Park DH, Lee ST, Jun DY, Lee JY, Woo MH, Kim KY, Seo MC, Ko JY, Woo KS, Jung TW, Kwak DY, Nam MH, Kim YH. 2014. Comparative evaluation of antioxidant activities of ethanol extracts and their solvent fractions obtained from selected miscellaneous cereal grains. *Journal of Life Science* 24:26-38.
- Park JH, Darvin P, Lim EJ, Joung YH, Hong DY, Park EU, Park SH, Choi SK, Moon ES, Cho BW, Park KD, Lee HK, Kim MJ, Park DS, Chung IM, Yang YM. 2012. *Hwanggeumchal* sorghum induces cell cycle arrest, and suppresses tumor growth and metastasis through Jak2/STAT pathways in breast cancer xenografts. *PLOS ONE* 7:1-13.
- Ramalingam M, Kim SJ. 2009. The protective effects of insulin on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in C6 glial cells. *Biomolecules & Therapeutics* 17:395-401.

- Ramalingam M, Kim SJ. 2012. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *Journal of Neural Transmission* 119:891-910.
- Ramalingam M, Kim SJ. 2014. Insulin on hydrogen peroxide-induced oxidative stress involves ROS/Ca²⁺ and Akt/Bcl-2 signaling pathways. *Free Radical Research* 48:347-356.
- Rodríguez JJ, Butt AM, Gardenal E, Parpura V, Verkhatsky A. 2016. Complex and differential glial responses in Alzheimer's disease and ageing. *Current Alzheimer Research* 13:343-358.
- Ryu JM, Jang GY, Woo KS, Kim TM, Jeong HS, Kim DJ. 2017. Effects of sorghum ethyl-acetate extract on PC3M prostate cancer cell tumorigenicity. *Journal of Functional Foods* 37:449-459.
- Satoh T, Sakai N, Enokido Y, Uchiyama Y, Hatanaka H. 1996. Free radical-independent protection by nerve growth factor and Bcl-2 of PC12 cells from hydrogen peroxide-triggered apoptosis. *The Journal of Biochemistry* 120:540-546.
- Seo UK, Jung HW, Park YK. 2008. Chloroform fraction of zingiberis rhizoma recens modulates the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated BV2 microglial cells. *The Korea Journal of Herbology* 23:73-83.
- Singh SS, Rai SN, Birla H, Zahra W, Rathore AS, Dilnashin H, Singh R, Singh SP. 2020. Neuroprotective effect of chlorogenic acid on mitochondrial dysfunction-mediated apoptotic death of DA neurons in a Parkinsonian mouse model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020:6571484.
- Venkatesan R, Subedi L, Yeo EJ, Kim SY. 2016. Lactucopicrin ameliorates oxidative stress mediated by scopolamine-induced neurotoxicity through activation of the NRF2 pathway. *Neurochemistry International* 99:133-146.
- Wang KJ, Zhang YJ, Yang CR. 2005. Antioxidant phenolic compounds from rhizomes of *Polygonum paleaceum*. *Journal of Ethnopharmacology* 96:483-487.
- Woo KS, Kim JI, Ko JY, Lee JS, Song SB, Jung TW, Kim KY, Kwak DY, Oh IS, Jeong HS. 2013. Antioxidant activities of solvent fractions from methanolic extract of sorghum (*sorghum bicolor* L. Moench) according to varieties. *The Journal of Agricultural Science* 29:5-12. [in Korean]