



## Protective effects of *Carthamus tinctorius* L. seed on C6 glial cells treated with ethanol

Seung Hak Choi<sup>1</sup> · Chan Hum Park<sup>2</sup> · Eun Ju Cho<sup>3</sup> · Ji Hyun Kim<sup>4</sup> · Weon Taek Seo<sup>4</sup>

### 홍화씨 추출물의 *in vitro* 항산화 및 ethanol로 손상을 유도한 C6 신경교세포 보호 효과

최승학<sup>1</sup> · 박찬흠<sup>2</sup> · 조은주<sup>3</sup> · 김지현<sup>4</sup> · 서원택<sup>4</sup>

Received: 6 January 2021 / Accepted: 19 January 2021 / Published Online: 31 March 2021  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2021

**Abstract** Chronic alcohol is responsible for oxidative stress and neurodegenerative diseases such as dementia. In the present study, we investigated the antioxidant activity and protective effects of seed of *Carthamus tinctorius* L. on ethanol-induced C6 glial cells. Antioxidant effect of seed of *C. tinctorius* L. was measured by scavenging activity of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ), superoxide radical, and nitric oxide. The seed of *C. tinctorius* L. extract showed significant radical scavenging activities in a concentration-dependent manner. In particular, it revealed strong DPPH and  $\cdot\text{OH}$  scavenging activity, displaying more than 80% at 500 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively.

Treatment of 500 mM ethanol to C6 glial cell led to decline of cell viability and elevation of reactive oxygen species (ROS) generation. However, seed of *C. tinctorius* L.-treated groups significantly increased cell viability and decreased ROS levels, compared to ethanol-induced control group. These results suggest that seed of *C. tinctorius* L. would have protective effect against neuronal oxidative stress induced by alcohol.

**Keywords** Antioxidant · *Carthamus tinctorius* L. seed · Ethanol · Glial cells · Reactive oxygen species

Ji Hyun Kim (✉)  
E-mail: jihyunkim@gntech.ac.kr

Weon Taek Seo (✉)  
E-mail: wtseo@gntech.ac.kr

<sup>1</sup>Department of Physiology, College of Medicine, Inje University, Busan 47392, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 46241, Republic of Korea

<sup>4</sup>Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Republic of Korea

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.

## 서론

전 세계적으로 알코올 과다 섭취 또는 만성 섭취로 인한 알코올 중독은 체내 간, 신장, 뇌 등의 조직을 손상시켜 각종 질병의 원인이 되며, 특히 알코올 중독으로 인한 정신질환은 심각한 사회적·경제적 문제를 초래하고 있다[1] 알코올 섭취로 인한 대표적인 정신질환인 알코올성 치매는 인지능력 손상, 학습 및 기억력 저하, 문제해결능력 결핍, 언어능력 손상, 운동 기능 저하 등의 신경학적 기능 장애를 유발한다[2]. 정상적인 상태에서 알코올은 간에서 acetaldehyde로 분해되고, 이는 acetaldehyde dehydrogenase 효소에 의해 acetic acid로 분해되어 H<sub>2</sub>O와 CO<sub>2</sub>로 배출된다[3]. 그러나 알코올을 만성 섭취할 경우, acetaldehyde가 acetic acid로 분해되지 않고 체내에 축적되어 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 보고되었다[2,4].

산화적 스트레스는 체내 산화/항산화 체계의 불균형에 의해 발생하는 것으로, reactive oxygen species (ROS), nitric oxide

(NO), hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ), superoxide radical ( $\text{O}_2^-$ ) 등은 산화적 스트레스를 유도하는 대표적인 물질로 알려져 있다[5]. 뇌에서 ROS, NO, free radical 등의 산화적 손상을 유도하는 물질이 증가할 경우, 단백질, 지질, DNA 등의 biomolecules를 손상시켜 뇌 조직이 정상적인 기능을 수행하지 못하게 된다[5,6]. 뇌 내 신경교세포는 뇌의 전반적인 구조 유지, 신경전달물질 조절 기능, 시냅스 형성 및 가소성 조절 기능, 면역기능 등의 다양한 역할을 통해 뇌의 정상적인 기능 유지에 도움을 주는 것으로 알려져 있다[7,8]. 그러나 알코올 섭취로 인한 뇌 내 산화적 스트레스는 신경교세포를 손상시켜 신경교세포의 기능을 방해하고, 이는 결국 인지능력 및 기억력 손상을 유도한다[9]. 따라서 국내·외에서 알코올로 손상이 유도된 신경교세포를 보호하는 vitamin C, glycyrrhizin 등의 천연물 유래 소재를 발굴하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다[10-11].

홍화씨(*Carthamus tinctorius* L. seed)는 잇꽃이라고도 불리는 홍화의 종자로, linoleic acid, serotonin, kaempferol, acacetin 등의 생리활성성분을 함유하는 것으로 보고되었다[12-14]. 국내·외 연구에 의하면, 홍화씨는 항암, 항산화, 항염증, 지질 대사 개선 등의 다양한 체내 생리활성을 나타내는 것으로 보고되었으며, 식품으로써 식용유지 또는 골다공증, 관절염, 콜레스테롤 저하제의 기능성 원료로 사용되고있다[12,15,16]. 홍화씨는 홍화 줄기에 비해 *in vitro*에서 radical 소거능이 우수함이 보고된 바 있다[26]. 이전 연구에서 홍화씨 추출물은 뇌 내 산화적 스트레스 관련 지표 개선을 통해 알코올성 치매 동물모델의 인지능력 및 기억력 개선 효과를 나타내었다[17]. 그러나 홍화씨의 *in vitro* 항산화 활성 및 알코올로 산화적 스트레스가 유도된 신경교세포 보호 효과와 관련된 연구는 부족한 실정이다.

본 연구는 홍화씨 추출물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH),  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$ , NO 라디칼 소거 활성 측정을 통해 *in vitro* 항산화 활성을 확인하고, ethanol로 산화적 스트레스가 유도된 신경교세포에서의 세포 생존율 및 ROS 생성 억제능 측정을 통해 신경교세포 보호 효과를 확인하였다. 따라서 홍화씨 추출물의 항산화 및 산화적 손상에 대한 신경교세포 보호 소재로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 홍화씨 추출물 제조

홍화씨 추출물은 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부(Eumseong, Korea)에서 제공받아 실험에 사용하였으며, voucher specimen은 한국약용자원표본관에 보관되어 있다. 건조한 홍화씨를 분쇄 한 뒤, 70% ethanol을 이용하여 실온에서 3시간씩 2회 반복 추출하였다. 이를 왓만 여과지(No. 2, Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 불용성 물질을 제거하는 여과 단계를 거친 뒤, 60°C에서 감압농축 및 동결건조하여 시료를 제조하였다. 홍화씨 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 녹여 4°C에서 냉장보관하면서, 실험에 사용하였다.

### 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능 측정

각 농도 별(50, 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 알코올에 녹인 시료

100  $\mu\text{L}$ 와 동량의 60  $\mu\text{M}$  DPPH (Sigma Co.) 용액을 96 well plate에서 혼합하였다. 혼합물을 30분간 실온에서 반응시킨 뒤, microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료 첨가군을 비교하여 DPPH radical 소거능을 백분율(%)로 계산하여 나타내었다[18].

### Hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) 소거능 측정

각 농도 별(5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 시료와 10 mM  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -EDTA (Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd., Gyeonggi-do, Korea), 10 mM 2-deoxyribose (Sigma Co.), 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Junsei Co., Tokyo, Japan)를 혼합하여 4시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 그 뒤 혼합물에 그 후 혼합액에 2.8% trichloroacetic acid (TCA, Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan) 1 mL와 1.0% thiobarbituric acid (TBA, Acros Organics Co., Fair Lawn, New Jersey, USA) solution 1 mL을 첨가하여, 20분 동안 100°C에서 반응시킨 후 냉각시켰다. 이를 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정 한 뒤,  $\cdot\text{OH}$  radical 소거능을 백분율(%)로 계산하여 나타내었다[19].

### Superoxide radical ( $\text{O}_2^-$ ) 소거능 측정

중류수에 희석한 각 농도 별(5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 시료 500  $\mu\text{L}$ 에 0.1 M Tris-Hcl (pH 7.4) 100  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{M}$  phenazine methosulfate (PMS, Bio Basic Co., Toronto, Canada) 200  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{M}$  nitrotetrazolium blue chloride (NBT, Bio Basic Co., Toronto, Canada) 200  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{M}$  nicotinamide adenine dinucleotide (NADH, Bio Basic Co.) 400  $\mu\text{L}$ 를 첨가한 뒤, 이를 실온에서 10분간 반응시켰다. 반응물을 microplate reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정 한 뒤, 대조군과 시료 첨가군을 비교하여  $\text{O}_2^-$  radical 소거능을 백분율(%)로 계산하여 나타내었다[20].

### Nitric oxide (NO) radical 소거능 측정

농도 별(50, 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 시료에 10 mM sodium-nitroprusside (SNP, Sigma Co.) solution을 첨가하여 실온에서 150분간 반응시켰다. 그 뒤, 혼합액과 동량의 griess reagent (Sigma Co.)를 첨가하여 실온에서 반응시켰다. 30분 뒤, 반응물을 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정 한 뒤, 대조군과 시료 첨가군을 비교하여 NO radical 소거능을 백분율(%)로 계산하여 나타내었다[21].

### 세포 배양

C6 신경교세포는 한국세포주은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였다. C6 신경교세포는 100 units/mL의 penicillin-streptomycin (Welgene, Daegu, Korea) 및 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene)이 함유된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Welgene) 배지를 이용하여 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 T75-flask 내에서 1-2일에 한번씩 배양액을 바꾸어 주면서 배양하여, 세포분화 80% 이상에 도달하였을 때 phosphate buffered saline (pH 7.4)으로 세포를 세척한 후, 0.05% trypsin (Welgene)을 이용하여 세포를 분리한 뒤 원심분

리하여 집적된 세포를 배지에 넣고 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

**세포 생존율 측정**

C6 신경교세포가 confluence 상태가 되면 96-well plate에 5×10<sup>4</sup> cells/well의 밀도로 seeding하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배지에 희석한 농도 별(5, 10, 25, 50 µg/mL) 시료를 각 well에 처리하여 2시간 재배양한 뒤, 세포 손상을 유도하기 위해 500 mM EtOH (Duksan Co., Gyeonggi-do, Korea)을 처리하였다. 24시간 뒤, 각 well의 배지를 제거한 후 5 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma Co.) solution을 각 well에 주입하여 37 °C에서 4시간 동안 재배양하였다. MTT solution을 제거하고 생성된 formazan 결정을 빛을 차단한 상태에서 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[22].

**ROS 생성 억제능 측정**

C6 신경교세포가 80% 이상 confluence 상태가 되면 96-well black plate에 5×10<sup>4</sup> cells/well의 밀도로 seeding하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포가 잘 부착되면 시료를 각 농도 별(5, 10, 25, 50 µg/mL)로 처리하고 2시간 동안 재배양한 뒤, 세포의 산화적 손상을 유도하기 위해 500 mM EtOH을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각 well에 20 µM의 2'-7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma Co.) solution을 각 well에 주입하여 37 °C에서 30분 동안 재배양한 뒤, FLUO star OPTIMA (BMG labtech, Ortenberg, Germany)으로 excitation-480 nm, emission-535 nm에서 ROS 생성량을 측정하였다[23].

**통계분석**

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 실험 결과의 통계 분석은 SPSS statistics program (Version 20, IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하여 실시하였고, analysis of variance를 구한 후 Duncan's multiple test (*p* < 0.05)를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다. 모든 실험결과는 3반복 실험을 수행하여 결과를 제시하였다.

**결과 및 고찰**

DPPH radical은 안정된 상태에서 짙은 보라색을 띄고 있으나 항산화제에 의해 비라디칼로 전환되면서 색상에 변화가 생기는 원리로 free radical 소거능 측정을 통해 항산화 소재의 항산화 활성을 평가하는 데 이용된다[18,24]. 또한 DPPH radical 소거능은 천연물 유래 소재의 항산화 활성을 측정함에 있어, 안정적이고 간단하여 널리 사용되는 방법이다[25]. 홍화씨 추출물의 DPPH 소거능을 50, 100, 250, 500 µg/mL의 농도 별로 확인하였을 때, 각각 32.96, 50.19, 70.89, 86.99%의 수치를 나타내어, 농도의존적으로 DPPH radical 소거능이 증가함을 알 수 있었다(Table 1). 특히 홍화씨 추출물 500 µg/mL에서 가장 우수한 DPPH radical 소거능을 나타내었다. 홍화씨의 부위별 DPPH radical 소거능 측정 결과, 홍화씨 추출물은 대표적인 합성 항산

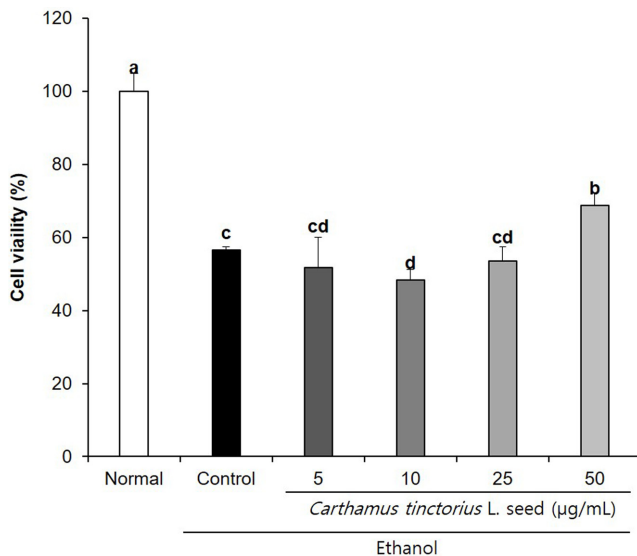
**Table 1** Radical scavenging activity of *Carthamus tinctorius* L. seed

Radical	Treatment (µg/mL)	Scavenging activity (%)
DPPH	50	32.96±1.05 <sup>d</sup>
	100	50.19±0.80 <sup>e</sup>
	250	70.89±0.54 <sup>b</sup>
	500	86.99±2.39 <sup>a</sup>
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	101.95±1.29
Hydroxyl radical	5	47.91±0.59 <sup>d</sup>
	25	81.24±0.06 <sup>e</sup>
	50	83.81±0.72 <sup>a</sup>
	100	83.93±0.17 <sup>a</sup>
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	5.51±0.11
Singlet oxide radical	5	6.58±0.90 <sup>e</sup>
	25	33.27±1.80 <sup>b</sup>
	50	36.52±0.77 <sup>a</sup>
	100	37.00±1.42 <sup>a</sup>
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	165.67±5.27
Nitric oxide	50	4.36±1.18 <sup>d</sup>
	100	19.40±1.09 <sup>e</sup>
	250	36.16±0.8 <sup>b</sup>
	500	47.30±1.7 <sup>a</sup>
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	150.98±9.15

Values are mean ± SD. <sup>a-d</sup>Means with the different letters are significantly different (*p* < 0.05) by Duncan's multiple range test. IC<sub>50</sub> is concentration of µg/mL required to scavenge radical by 50%.

화제인 BHA, BHT와 유사하거나 우수한 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, 홍화의 줄기 부위에 비해 홍화씨는 약 1.12배 우수한 DPPH radical 소거능을 나타내었다[12,26]. 이 외에도, 홍화씨 추출물로부터 분리한 serotonin 유도체와 luteolin, acacetone 등의 polyphenolic compounds는 *in vitro* DPPH radical 소거능이 우수한 것으로 보고되었다[13,14,27]. 따라서 홍화씨 추출물은 *in vitro* DPPH radical 소거능을 통해 항산화 활성을 나타내었으며, 이는 홍화씨 내 함유된 생리활성물질로부터 기인하였을 것으로 사료된다.

·OH radical은 ROS 중에서도 가장 높은 독성과 반응성을 가지고 있으며, 단시간 내 세포와 조직을 손상시키는 특징을 지니고 있다[28]. 또한, ·OH radical은 세포막 구성성분인 지질을 산화시킬 뿐 아니라, 세포 내 DNA 손상을 유도하여, 다양한 질환 발병과의 연관성이 보고되었다[29]. 본 연구에서 홍화씨 추출물의 ·OH radical 소거능을 5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도 별로 확인한 결과, 47.91, 81.24, 83.81, 83.93%의 ·OH radical 소거 활성을 나타내었다(Table 1). 특히 홍화씨 추출물은 25 µg/mL의 낮은 농도에서 80% 이상의 ·OH radical 소거 효과를 나타냄을 확인하였다. 이전 연구에 의하면, 홍화씨 추출물 내에 함유되어 있는 다양한 생리활성 물질 중에서 *N*-(*p*-coumaroyl) serotonin-5-*O*-β-D-glucoside, *N*-(*p*-coumaroyl)serotonin과 같은 세로토닌 유도체는 다른 생리활성 물질에 비해 우수한 ·OH radical 소거능을 나타낸 것으로 보고되었다[14]. 따라서 홍화씨 추출물은 serotonin 유도체와 같은 생리활성물질 조절을 통해 ·OH radical 소거능을 나타낸 것으로 사료된다.

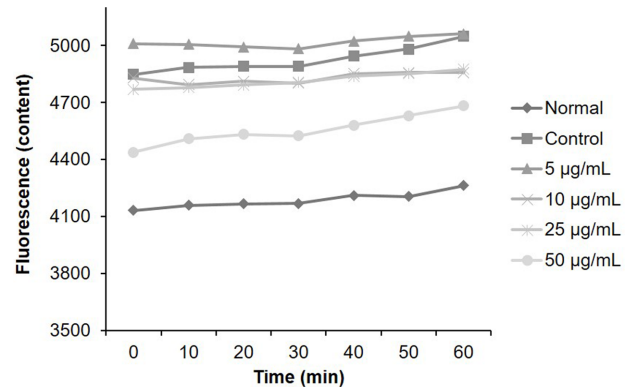


**Fig. 1** Effect of *Carthamus tinctorius* L. seed on cell viability in C6 glial cells treated with ethanol. Values are mean  $\pm$  SD. <sup>a-d</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test

$O_2^-$  radical은 신체 내 정상적인 대사 과정에서 생성되는 물질로써, 체내에서 많이 생성되는 ROS의 일종이다[30]. 그러나 외부의 산화적 자극에 의해 체내 산화적 스트레스가 유도되면,  $O_2^-$  radical은 과도하게 생성되어 세포를 손상시킨다[30,31]. 본 연구에서 홍화씨 추출물의  $O_2^-$  radical 소거능 활성을 측정한 결과, 홍화씨 추출물 5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 6.58, 33.27, 36.52, 37.00%의  $O_2^-$  radical 소거 효과를 나타내어, 홍화씨 추출물의 농도가 높아질수록  $O_2^-$  radical 소거능이 증가함을 알 수 있었다(Table 1). 이전 연구에서 홍화씨 추출물의 *in vitro*에서  $O_2^-$  radical 소거능을 측정한 결과, 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 42.74%의 수치를 나타냄을 알 수 있었다[32]. 또한 홍화씨 추출물에 함유된 생리활성물질의  $O_2^-$  radical 소거능을 각각 측정하였을 때, 다른 생리활성물질에 비해 polyphenol 화합물의 일종인 luteolin과 그 유도체인 luteolin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside의  $O_2^-$  저해 효과가 우수한 것으로 보고되었다[14].

체내에서 NO는 생리적인 현상, 신경전달 매개체 및 면역 반응 유지 등의 정상적인 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다 [33]. 하지만 과도한 NO 생성은 체내에서 염증 관련 인자들의 발현을 증가시켜, 조직 및 면역 기능 손상 등의 문제를 발생시킨다[34]. 본 연구에서 농도 별(50, 100, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ ) 홍화씨 추출물의 NO radical 소거능을 측정한 결과(Table 1), 각각 4.36, 19.40, 36.16, 47.30%의 수치를 나타내어 농도의존적으로 NO radical 소거능이 증가함을 알 수 있었다. 특히, 500  $\mu\text{g/mL}$ 에서 47.30%의 수치를 나타내어, 다른 농도에 비해 가장 우수한 NO radical 소거 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 또한 lipopolysaccharide (LPS)로 염증반응을 유도한 Raw 264.7 세포에 홍화씨 추출물의 처리 시, NO 생성량이 유의적으로 억제됨이 보고되었다[32,35]. 따라서 홍화씨는 산화적 손상 및 염증반응이 유도된 상태에서 NO 소거 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

홍화씨 추출물의 신경교세포 보호 효과를 확인하기 위해, C6

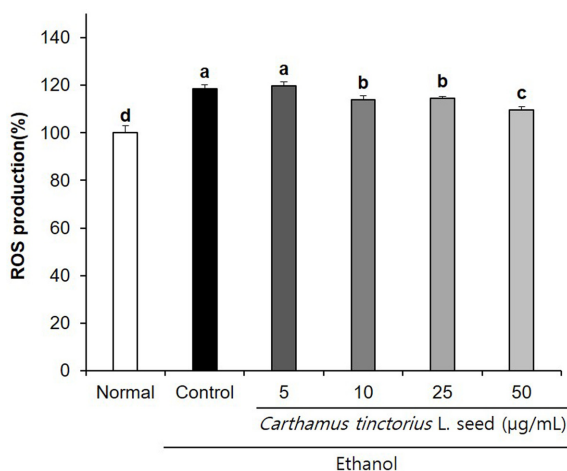


**Fig. 2** Time course of change in intensity of ROS fluorescence with *Carthamus tinctorius* L. seed. Values are mean  $\pm$  SD

신경교세포에 500 mM ethanol을 처리하여 세포 생존율을 측정하였다(Fig. 1). 아무것도 처리하지 않은 normal군의 세포 생존율을 100%로 하였을 때, ethanol을 처리한 control군에서 56.60%의 수치를 나타내어 ethanol에 의해 신경교세포 손상이 일어난 것을 알 수 있었다. 그러나 홍화씨 추출물을 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 68.77%의 수치를 나타내어 ethanol을 처리한 control군에 비해 유의적으로 세포 생존율이 증가함을 확인하였다. 따라서 홍화씨 추출물 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포 생존을 개선을 통해 ethanol에 대한 신경교세포 보호 효과를 확인할 수 있었다. 이전 연구에 의하면, ethanol을 처리한 신경교세포는 산화적스트레스, 염증반응 등을 매개하여 세포가 손상을 받아 세포생존율이 감소하는 것으로 보고되었다[36,37]. 본 연구에서도 ethanol을 처리한 control군은 세포 손상으로 인해 세포 생존율이 감소하였다. 반면 홍화씨 추출물을 처리했을 때 세포 생존율이 개선됨을 통해 홍화씨 추출물은 세포생존을 개선을 통해 신경교세포 보호 효과가 있는 것으로 사료된다. 홍화를 이용한 홍화 약침액은 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )로 산화적 손상이 유도된 신경교세포에서 세포사멸 개선을 통해 신경교세포 보호 효과를 나타내었다[38].

ROS는 산소의 정상적인 체내 대사과정에서 자연스럽게 생성되는 물질로써, 세포 신호 전달과 항상성 등의 조절 역할을 수행하고 있다[39]. 그러나 외부 자극으로 인해 과발현된 ROS는 세포 내 분자들을 비가역적, 비선택적으로 손상시켜 세포의 산화적 손상을 유도하게 된다[5,39]. 신경교세포는 신경세포와 함께 중추신경계를 구성하는 요소로써, ROS에 장시간 노출되면 염증반응을 일으켜 중추 신경계 손상을 유도한다[7,8].

홍화씨 추출물의 ethanol로 산화적 손상이 유도된 C6 신경교세포 내 ROS 억제 효과를 확인하기 위하여, C6 신경교세포에 ethanol을 처리하여 산화적 스트레스를 유발시킨 뒤, ROS 생성량 측정을 통해 신경교세포 보호 효과를 확인하였다(Fig. 2). Ethanol을 처리한 control군은 시간이 지남에 따라 normal군에 비해 ROS 생성량이 증가하는 것을 확인하여, ethanol 처리로 신경교세포에 산화적 손상이 유도됨을 알 수 있었다. 반면 홍화씨 추출물 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$  농도 처리 군에서는 control군에 비해 낮은 ROS 생성량을 보여 ethanol에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 신경교세포 보호 효과를 확인하였다(Fig.



**Fig. 3** The production of ROS treated with *Carthamus tinctorius* L. seed. Values are mean ± SD. <sup>a-d</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test

2). 60분 기준으로 normal군의 ROS 생성량을 100%로 하였을 때 ethanol을 처리한 control군의 경우 118.43%로 ROS 생성량이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 반면 홍화씨 추출물을 5, 10, 25, 50 µg/mL의 농도별로 처리한 결과, 농도 유의적으로 ROS 생성량이 억제된 것을 확인할 수 있었다. 특히, 홍화씨 추출물을 50 µg/mL 농도로 처리한 군에서 ROS 생성량은 109.53%의 수치를 나타내어, 우수한 ROS 소거 효과를 확인할 수 있었다. 따라서, 홍화씨 추출물은 ROS 생성 억제를 통해 ethanol로 산화적 스트레스가 유도된 C6 신경교세포 보호 효과가 있는 것으로 사료된다(Fig. 3). 이전 연구에서도 신경교세포에 ethanol을 처리했을 때 산화적 손상이 유도되어 ROS 생성이 증가되는 것으로 보고되었다[36]. 본 연구에서도 C6 신경교세포에 ethanol을 처리했을 때 처리하지 않은 군과 비교하여 ROS 생성이 유의적으로 증가하여 산화적 손상이 유도됨을 알 수 있었다. 반면 홍화씨 추출물(10, 25, 50 µg/mL)의 처리 시, ethanol로 증가된 ROS 생성량을 유의적으로 억제하여 신경교세포 보호 효과를 확인하였다. 홍화씨 추출물은 scopolamine으로 기억력 손상을 유도한 동물의 뇌에서 ROS 생성량을 유의적으로 억제시켰으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 손상을 유도한 Raw 264.7 세포에서도 ROS 생성을 유의적으로 저해시켰다[40,41]. 뿐만 아니라 ethanol로 알코올성 치매를 유도한 동물모델에서 홍화씨 추출물 100, 200 mg/kg/day 농도로 투여 시, 산화적 스트레스 관련 지표인 지질과산화 함량 및 NO 생성량 개선을 통해 인지능 및 기억력 개선을 나타냄을 확인하였다[17]. 이 외에도, 홍화씨 추출물은 산화적 손상을 유도한 Raw 264.7 세포에서 대표적인 항산화 작용기전인 nuclear factor E2-related factor 2 매개 항산화 작용기전 조절을 통해 ROS 생성을 억제시켜, 홍화씨는 다양한 항산화 작용기전을 조절하여 산화적 스트레스 억제 효과가 있는 것을 알 수 있었다[38]. 또한 이전 연구에서 홍화씨 80% 에탄올 추출물의 페놀 화합물 측정 결과, 리그난, 세로토닌 유도체, 플라보노이드 등 949.7 mg%의 페놀 화합물이 존재하는 것으로 보고되었다[42]. 특히 이들 중 플라보노이드 함량은 다른 화합물에 비해 미량으로 존재함에 따라, 홍화씨의

리그난 및 세로토닌 유도체가 항산화 활성을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다[42]. 본 연구에서는 홍화씨의 *in vitro* 항산화 및 신경교세포 보호 효능을 통해, 알코올성 치매 예방 및 개선용 소재로서의 가능성이 있는 것으로 사료된다.

## 초 록

만성 알코올 섭취는 산화적 스트레스 및 치매와 같은 신경퇴행성질환을 발병시킨다. 본 연구는 홍화씨 추출물의 *in vitro* 항산화 활성과 ethanol로 손상을 유도한 신경교세포에서의 보호 효과를 확인하기 위해 수행되었다. 홍화씨 추출물은 50, 100, 250, 500 µg/mL의 농도에서 농도 의존적으로 *in vitro*에서 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl radical (·OH), superoxide radical 및 nitric oxide radical 소거능이 증가하였다. 특히 DPPH 및 ·OH radical 소거능 측정 결과, 각각 500 µg/mL, 100 µg/mL의 농도에서 80% 이상의 radical 소거능을 나타내었다. 홍화씨 추출물의 신경교세포 보호 효과를 확인하기 위해, C6 신경교세포에 500 mM ethanol을 처리하여 산화적 손상을 유도하였다. Ethanol을 처리한 C6 신경교세포는 세포 생존율의 감소 및 reactive oxygen species (ROS) 생성량이 증가하여 세포 손상을 나타내었다. 반면 홍화씨 추출물을 처리하였을 때 세포 생존율 증가 및 ROS 생성 억제를 통해 ethanol로 유도된 신경교세포 손상에 대한 보호 효과를 나타내었다. 본 연구를 통해, 홍화씨는 알코올로 유도된 신경교세포의 산화적 스트레스에 대한 보호 효과가 있는 것으로 사료된다.

**Keywords** 신경교세포 · 에탄올 · 항산화 · 홍화씨 · 활성산소종

**감사의 글** 이 논문은 2020년도 경남과학기술대학교 교원 연구활성화 지원사업의 예산지원으로 수행되었음.

## References

1. Gunzerath L, Faden V, Zakhari S, Warren K (2004) National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism report on moderate drinking. *Alcohol Clin Exp Res* 28: 829–847
2. Harper C, Matsumoto I (2005) Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol* 5: 73–78
3. Cederbaum AI (2012) Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis* 16: 667–685
4. Tong M, Longato L, Nguyen QG, Chen WC, Spaisman A, de la Monte SM (2011) Acetaldehyde-mediated neurotoxicity: relevance to fetal alcohol spectrum disorders. *Oxidative Med Cell Longev* 2011
5. Finaud J, Lac G, Filaire E (2006) Oxidative stress. *Sports Med* 36: 327–358
6. Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, Maier CM, Narasimhan P, Goeders CE, Chan PH (2011) Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 14: 1505–1517
7. Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT (2010) The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J Clin Neurosci* 17: 6–10
8. Magaki SD, Williams CK, Vinters HV (2018) Glial function (and dysfunction) in the normal & ischemic brain. *Neuropharmacol* 134: 218–225

9. Augustyniak A, Michalak K, Skrzydlewska E (2005) The action of oxidative stress induced by ethanol on the central nervous system (CNS). *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 59: 464–471
10. Sánchez-Moreno C, Paniagua M, Madrid A, Martín A (2003) Protective effect of vitamin C against the ethanol mediated toxic effects on human brain glial cells. *J Nutr Biochem* 14: 606–613
11. Hagggho LS, Khezri SH, Froushani SMA (2019) The protective role of glycyrrhizin on ethanol-damaged B92 glial cells in vitro. *Armaghane danesh* 24: 333–345
12. Roh JS, Sun WS, Oh SU, Lee JI, Oh WT, Kim JH (1999) In vitro antioxidant activity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Food Sci Biotechnol* 8: 88–92
13. Kang GH, Chang EJ, Park SW (1999) Antioxidative activity of phenolic compounds in roasted safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Prev Nutr Food Sci* 4: 221–225
14. Kim EO, Oh JH, Lee SK, Lee JY, Choi SW (2007) Antioxidant properties and quantification of phenolic compounds from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Food Sci Biotechnol* 16: 71–77
15. Park GH, Hong SC, Jeong JB (2016) Anticancer activity of the safflower seeds (*Carthamus tinctorius* L.) through inducing cyclin D1 proteasomal degradation in human colorectal cancer cells. *Korean J Plant Res* 29: 297–304
16. Cho SH, Lee HR, Kim, TB, Choi SW, Lee WJ, Choi Y (2004) Effects of defatted safflower seed extract and phenolic compounds in diet on plasma and liver lipid in ovariectomized rats fed high-cholesterol diets. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 50: 32–37
17. Choi SH, Lee AY, Park CH, Shin YS, Cho EJ (2018) Protective effect of *Carthamus tinctorius* L. seed on oxidative stress and cognitive impairment induced by chronic alcohol consumption in mice. *Food Sci Biotechnol* 27: 1475–1484
18. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T (1989) Effects of the interaction of tannins with co-existing substances: Effects of tannins and VI related poly phenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull* 37: 2016–2021
19. Chung SK, Osawa T, Kawakishi S (1997) Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *J Biosci Biotech Biochem* 61: 118–123
20. Nishikimi N, Rao NA, Yagi K (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 46: 849–854
21. Marcocci L, Maguire JJ, Droxy-lefaix MT, Packer L (1994) The nitric oxide scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGB761. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 748–755
22. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55–63
23. Wang H, Joseph JA (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27: 612–616
24. Lee JM, Chan PS, Lee JH (2007) Comparison of oxidative stability for the thermally-oxidized vegetable oils using a DPPH method. *Korean J Food Sci Technol* 39: 133–137
25. Hong J, Wei MJ, Leem DG, Park KS, Yoon TH, No KM, Jeong JY (2010) Evaluation of antioxidants activity through the chemical assay. *J Biomed Res* 11: 1–8
26. Kim JH, Kim JK, Kang WW, Ha YS, Choi SW, Moon KD (2003) Chemical compositions and DPPH radical scavenger activity in different sections of safflower. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 733–738
27. Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS (2000) Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1127–1132
28. Halliwell B, Aruoma OI (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281: 9–19
29. Lipinski B (2011) Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2011
30. McCord JM (1995) Superoxide radical: controversies, contradictions, and paradoxes. *Proc Soc Exp Biol Med* 209: 112–117
31. Benov L (2001) How superoxide radical damages the cell. *Protoplasma* 217: 33–36
32. Hwang EY, Kim DH, Kim HJ, Hwang JY, Park TS, Lee IS, Son JH (2011) Antioxidant activities and nitric oxide production of medicine plants in Gyeongsangbukdo (*Carthamus tinctorius* seed, *Cyperus rotundus*, *Schizonepeta tenuifolia*, *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*, *Paeonia lactiflora*). *J Appl Biol Chem* 54: 171–177
33. Martina A, Jana P, Anna S, Tomas B (2012) Nitric oxide-Important messenger in human body. *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology*, 2: 98–106
34. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS (2007) Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15: 252–259
35. Kim DH, Hwang EY, Son JH (2013) Anti-inflammatory activity of *Carthamus tinctorius* seed extracts in Raw 264.7 cells. *J Life Sci* 23: 55–62
36. Loureiro SO, Heimfarth L, Reis K, Wild L, Andrade C, Guma FTRC, Gonçalves CA, Pessoa-Pureur R (2011) Acute ethanol exposure disrupts actin cytoskeleton and generates reactive oxygen species in C6 cells. *Toxicol In Vitro* 25: 28–36
37. Luo J, Miller MW (1996) Ethanol inhibits basic fibroblast growth factor-mediated proliferation of C6 astrocytoma cells. *J Neurochem* 67: 1448–1456
38. Kim HW, Cho SI, Kim IH (2009) Protective effects of pharmacopuncture solutions made by *Carthami flos*, *Cnidii rhizoma* and *Astragali radix* on C6 glioma cells. *J Pharmacopuncture* 12: 31–40
39. Alfadda AA, Sallam RM (2012) Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol* 2012
40. Shin HJ, Jin JH, Lee KG, Lee CH, Lee SR, Ha KT, Joo M, Jeong HS (2013) Nrf-2 mediated antioxidative effect of Korean and Chinese safflower seeds. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine* 27: 745–751
41. Kim JH, He MT, Kim MJ, Yang CY, Shin YS, Yokozawa T, Park CH, Cho EJ (2019) Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed attenuates memory impairment induced by scopolamine in mice via regulation of cholinergic dysfunction and oxidative stress. *Food Funct* 10: 3650–3659
42. Kim EO, Lee KT, Choi SW (2008) Chemical comparison of germinated- and ungerminated-safflower (*Carthamus tinctorius*) seeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1162–1167