생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn. 52(2) : 105 ~ 111 (2021)
https://doi.org/10.22889/KJP.2021.52.2.105

솔잎 부탄올 분획의 예쁜꼬마선충 내의 항산화 효과

김준형[1] · 김나영[2] · 권강무[2] · 황인현[2,3] · 김대근[2*,3]
[1]우석대학교 식품생명공학과, [2]우석대학교 약학과, [3]스마트융복합라이프케어연구소

Antioxidant Activities of *n*-Butanol Fraction of *Pinus densiflora* Siebold & Zucc. Needle in *Caenorhabditis elegans*.

Jun Hyeong Kim[1], Na Yeong Kim[2], Kang Mu Kwon[2], In Hyun Hwang[2,3], and Dae Keun Kim[2*,3]
[1]Department of Food and Biotechnology, Woosuk University, Wanju, Jeonbuk 55338, Korea
[2]Department of Pharmacy, Woosuk University, Wanju, Jeonbuk 55338, Korea
[3]Woosuk Institute of Smart Convergence Life Care, Wanju, Jeonbuk 55338, Korea

Abstract – To investigate the antioxidant activities of *Pinus densiflora* needle (Pinaceae), which is widely used as a traditional medicine in Korea, *Caenorhabditis elegans* model system was used. The *n*-butanol fraction of *P. densiflora* needle methanol extract showed the most potent DPPH radical scavenging and superoxide quenching activities in a dose-dependent manner. The *n*-butanol fraction was measured for the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase, and oxidative stress tolerance by using *C. elegans* with reactive oxygen species (ROS) level. In addition, to see that the regulation of the stress response gene is responsible for the increased stress tolerance of *C. elegans* treated by the butanol extract, SOD-3 expression was measured using a transgenic strain. As a result, the *P. densiflora* needle *n*-butanol fraction increased SOD and catalase activities, and decreased ROS accumulation, dose-dependently. Furthermore, the *n*-butanol fraction-treated CF1553 worm showed higher SOD-3::GFP intensity than the control.

Keywords – *Pinus densiflora*, *Caenorhabditis elegans*, Antioxidant, SOD, Catalase, ROS

산소는 인체 내에서 가장 중요한 전자수용체이나 unpaired electron을 받아들여 부분적으로 환원된 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 전환될 수 있는데 superoxide ($O^{\cdot-}_2$), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical($HO^{\cdot}$), peroxyl($ROO^{\cdot}$) 및 alkoxyl($RO^{\cdot}$) radical 등이 여기에 해당되며, 이것들은 free radical chain 반응의 생성과 전파에 연관되고 잠재적으로 세포에 큰 손상을 줄 수 있는 것으로 보고되어 있다.[1)] 활성산소를 제거하는 인체의 방어체계는 catalase, superoxide dismutase(SOD) 및 glutathione peroxidase(GPX) 등이 있어 대부분 이들 효소에 의해 대부분 소멸되지만 제거되지 못한 free radical은 DNA, 단백질, 세포막 등을 공격하여 기능을 저하시키며 심장병, 파킨슨병, 암, 관절염 등의 성인병 관련 질환을 유발하는 원인이 되고 있다.[2,3)] 따라서 인체는 이러한 과도한 ROS를 제거하기 위해 외부로부터 항산화제 공급을 통해 체내 방어체계를 강하게 구축하는데 도움을 주어야 한다. 합성 항산화제들은 값이 싸고 효과가 좋아 널리 사용되고 있으나 독성이 문제가 되고 있어 안전한 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있다.[4)] 천연 항산화제들은 많은 종류의 식물에서 존재하며 알려진 천연 항산화 물질로는 flavonoid 등을 위시한 페놀성 화합물을 비롯하여 커피콩에 존재하는 chlorogenic acid와 ascorbic acid, tocopherol, carotenoids 등이 알려져 있다.[5,6)]

소나무(*Pinus densiflora,* Pinaceae)의 솔잎은 간, 위, 심장 및 피부 관련 질환 등에 치료 효능이 알려져 있고, 오래 전부터 중풍, 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병과 같은 노화 관련 질환을 예방하는 목적으로 사용되어 왔으며, 주요 약리 성분으로는 정유성분과 flavonoid계 성분이 보고되어 있다.[4,7)] 특히, 솔잎의 열수추출물과 에탄올 추출물이 *in vitro* 상의 실험에서 항산화 효능이 보고되어 있으며, 이는 솔잎 중에 함유된 폴리페놀성 화합물에 기인한 효능임을 암시하는 내용으로 보고하였다.[4)]

본 연구에서는 예쁜꼬마선충(Caenorhabditis elegans) 실험 모델을 이용하여 솔잎 methanol 추출물의 *in vivo* 상에

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

서의 항산화 효능을 확인하기 위해 *n*-hexane, methylene choloride, ethyl acetate, *n*-butanol 분획물을 확보하고 각 분획에 대해 vitamin C를 대조군으로 하여 DPPH free radical 소거능과 riboflavin 유래 superoxide 억제 활성 실험을 먼저 시행하였다. 그 결과 *n*-butanol 가용 분획이 가장 강한 효능을 나타냈으며, 이에 *n*-butanol 가용 분획을 이용한 배지를 만들어 예쁜꼬마선충에 대한 *in vivo* 항산화 실험을 수행하였다. Juglone으로 유도된 oxidative stress에 대한 저항능력을 확인하고 예쁜꼬마선충 내의 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD)와 catalase(CAT)의 활성에 미치는 영향을 확인하였다. 또한, oxidative stress에 저항하는 단백질의 증가여부를 SOD-3을 포함한 형질 전환 선충 CF1553을 이용한 실험에서 SOD 발현 유전자의 증가여부를 확인하였으며, 이에 대한 몇 가지 결과를 확인하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 – 실험에 사용한 솔잎은 2019년 3월에 전북 완주군에서 채집 후 김대근 교수가 검증한 후에 음건 세절하여 사용하였으며, 표준품은 우석대학교 약학대학 생약표본실에 보관하고 있다(WS-19-007).

추출 – 솔잎 600 g을 건조하여 얻은 시료를 methanol로 진탕하면서 50°C에서 5시간씩 3회 온침 추출하였다. 그 추출액을 수욕상에서 감압 농축하여 methanol엑스 약 170.4 g을 얻었으며, 이 methanol엑스를 증류수로 현탁 시키고 동량의 *n*-hexane(10.38 g), methylene chloride(4.02 g), ethyl acetate (7.26 g) 및 *n*-butanol(21.6 g)의 순으로 순차적으로 용매 분획하여 각각의 분획물을 얻었다.

DPPH free radical 소거활성[8] – 96well plate에 솔잎 methanol 추출물을 EtOH로 각 농도별로 조제한 용액에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)(EtOH)을 일정량씩 가하였다. 10초간 진탕한 후 25°C에서 30분간 방치한 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조약물은 L-ascorbic acid를 사용하였다. 항산화 효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도와 비교하여 그래프로 나타내었다. 각 시료에 대한 DPPH radical 소거작용을 3회 반복하여 측정하였다.

Riboflavin 유래 superoxide 억제활성[9] – 솔잎 methanol 추출물의 superoxide 억제능력은 methionine, riboflavin, NBT로 구성된 평가시스템을 이용하여 광화학작용을 측정하였다. 반응혼합액은 2.6 μM riboflavin, 3 mM methionine, 75 μM NBT, 0.1 mM EDTA, PBS(pH 7.4) 및 여러 농도로 제조하였다. 혼합물은 light box에 넣은 후 5분마다 자리를 임의로 바꾸어 주면서 15분 동안 방치 하였다. Light box안의 온도는 20±1°C, 빛의 밝기는 5,500 lux를 유지하였다. Superoxide 억제능력은 blue formazane 형성억제가로 측정되는데 NBT의 빛 아래에서 blue formazane으로 환원되는 특성을 이용하며, 이 생성물을 560 nm에서 측정하였다.

***Caenorhabditis elegans*(예쁜꼬마선충) 배양**[10] – *C. elegans*를 *E. coli* OP50을 도말한 Nematode Growth Medium(NGM) agar plate에 20°C에서 배양하였다. 솔잎 *n*-butanol 분획물을 DMSO를 용매로 한 stock solution 상태로 멸균된 NGM plates(50°C)에 첨가하였다. 최종 DMSO 농도는 모든 상태에서 0.1%(v/v)를 유지하였다.

선충 내의 SOD, catalase 활성 측정[11,12] – 솔잎 *n*-butanol 분획물을 농도별로 조제한 plate에 성장 단계가 동일한 N2 선충을 배양하였다. 성체가 된 후 4일째에 선충을 모아 M9 buffer로 3회 세척 후 분쇄하여 효소 활성 측정에 사용하였다(homogenization buffer: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH7.5). 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 mL)를 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 incubation시킨 다음 69 mM SDS로 반응을 멈추고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catalase activity는 Aebi의 방법을 응용하여 25 mM H_2O_2에 농도별 시료 50 μL를 3분 동안 반응시키고 240 nm에서 흡광도를 측정하였다.

선충 세포 내 활성산소종(ROS) 분석[13] – 솔잎 *n*-butanol 분획물의 선충 세포 내 활성 산소종은 2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate(H_2DCF-DA)를 사용하여 측정하였다. 성장 단계가 동일한 선충을 솔잎 *n*-butanol 분획물을 농도별로 제조한 plate에서 배양하였다. 성체가 된 후 4일째 50 μM juglone을 함유한 M9 buffer에넣고 2시간 노출시킨 뒤 96 well plate에 담긴 50 μL M9 buffer에 5마리씩 옮겼다. 마지막으로 25 μM H_2DCF-DA 50 μL를 첨가한 뒤 여기 485 nm, 방출 535 nm에서 흡광도를 각각 측정하였다.

산화적 스트레스 저항성 평가[14,15] – 솔잎 *n*-butanol 분획물이 선충의 산화 스트레스 저항성에 미치는 영향을 알아보기 위해 산화적 스트레스 조건하에서 선충을 배양하여 생존율을 측정하는 실험을 수행하였다. 성체가 된 후 7일째 일시적으로 선충을 1 mM juglone이 함유된 M9 buffer가 담긴 96 well plate의 well에 옮기고 시간별로 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(4%)로 마취시켰고 GFP 발현은 형광 실체 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 발현 강도를 정량, 분석하기 위해 현미경을 이용한 사진 촬영과

Image J 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 모든 실험은 3회 반복하였다.

통계 분석 – 통계 자료의 값은 평균값 ± 표준오차(mean ± S.E.M.)로 표시 하였다. 그룹간의 통계적 유의성 검정은 Student's t-test를 통해서 분석하였고 선충의 연속적인 생존도는 Log-rank test 분석 방법을 이용하였다. p값은 $*p< 0.05$, $**p< 0.01$, $***p< 0.001$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

DPPH free radical 소거능 – 솔잎 *n*-butanol 분획물의 DPPH radical 소거 효과(IC_{50} value, 41.95 μg/mL)는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 농도의존적으로 나타났으며, 대조군인 비타민 C(IC_{50} value, 8.36 μg/mL)와 비교하여 높지 않게 측정되었으나 분획물 중 가장 좋은 활성을 보여주었다.

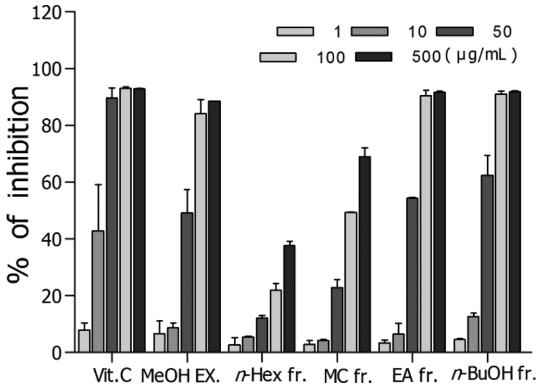

Fig. 1. DPPH radical scavenging effects of the methanol extract, and its fractions from the *Pinus densiflora* needle.

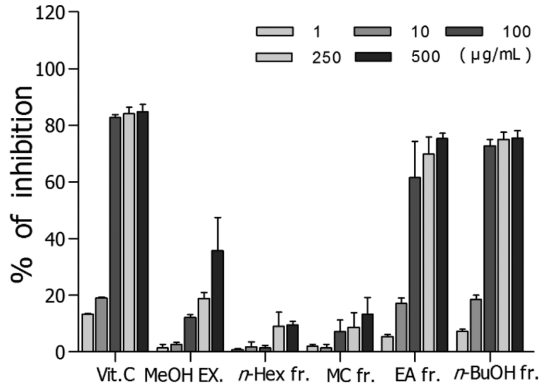

Fig. 2. Riboflavin-originated superoxide quenching activities of the methanol extract, and its fractions from the *Pinus densiflora* needle.

Superoxide 억제능 – Superoxide 억제능은 methionine, riboflavin, NBT로 구성된 평가시스템을 이용하여 광화학작용을 측정하는 것으로 시료의 superoxide 억제능을 평가하기 위해 수행되었다. 솔잎 *n*-butanol 분획물에서, superoxide 억제효과는 Fig. 2에서 보여지는 바와 같이 솔잎 *n*-butanol 분획물이(IC_{50} value, 175.2 μg/mL), 비타민 C(IC_{50} value, 32.25 μg/mL)보다는 효과가 떨어지지만 분획물 중 가장 좋은 superoxide 억제 효과를 나타내었다.

SOD, Catalase 활성 증가 효능 – Xanthine을 기질로 xanthine oxidase의 효소반응 과정 중에 생성되는 superoxide anion을 활용하여 솔잎 *n*-butanol 분획물의 SOD활성을 측정한 결과 Fig. 3A에서 나타난 바와 같이 예쁜꼬마선충의 솔잎 *n*-butanol 분획물 투여군은 SOD활성을 농도의존적으로 증가 시켰으며, 솔잎 *n*-butanol 분획물 250, 500 μg/mL 투여군은 대조군과 비교 하여 SOD 활성을 각각 약

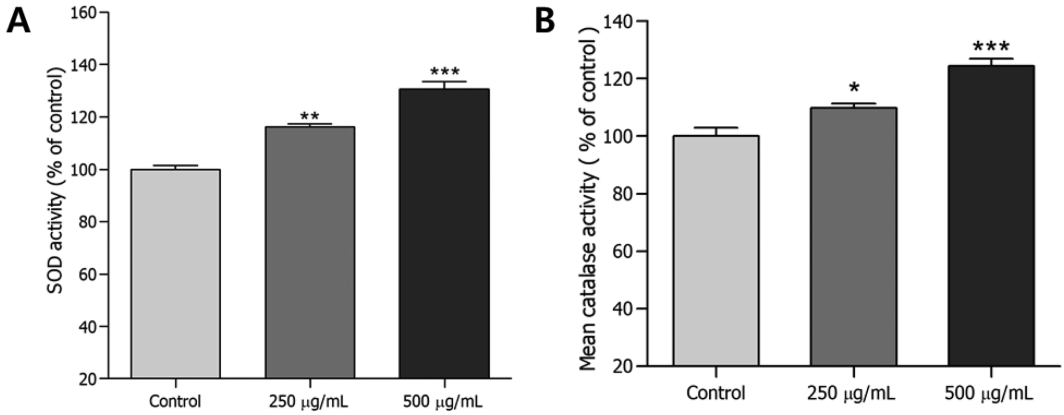

Fig. 3. Effects of *Pinus densiflora* needle *n*-butanol fraction on the antioxidant enzyme activity of wild-type N2 nematode. (A) The enzymatic reaction of xanthine with xanthine oxidase was used to generate •O2- and the SOD activity was estimated spectrophotometric through formazan formation by NBT reduction. The SOD activity was showed as a percentage of superoxide-scavenged amount per control. (B) Catalase activity was calculated from the concentration of residual H_2O_2, as determined by a spectrophotometric method. The catalase activity was expressed in U/mg protein. Data are expressed as the mean ± S.E.M. of three independent experiments. Differences compared to the control were considered significant at $*p<0.05$, $**p<0.01$ by one-way ANOVA.

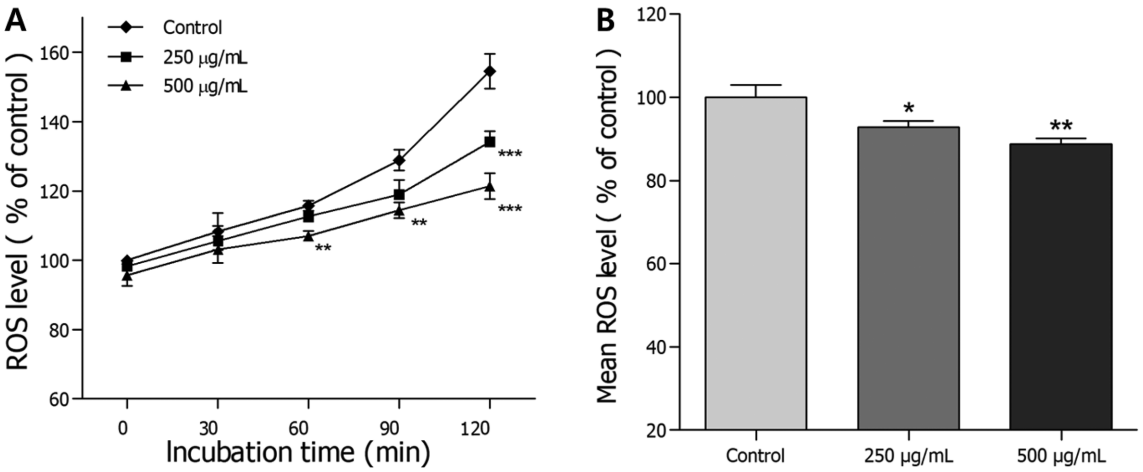

Fig. 4. Effects of *Pinus densiflora* needle *n*-butanol fraction on the intracellular ROS levels of wild-type N2 nematodes. Intracellular ROS accumulation was examined in a microplate fluorescence reader at 535 nm (emission) and 485 nm (excitation). (A) Plates were read for 120 min. (B) The average percentages of intracellular ROS accumulation were presented. Differences compared with the control were considered significant at *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 by the one-way ANOVA.

16.1%(**p<0.01), 30.6%(***p<0.001) 정도 증가시켰다. 한편, hydrogen peroxide를 체내에서 대사 시키는 catalase의 활성은 Fig. 3B에서 나타난 바와 같이 솔잎 *n*-butanol 분획물 250, 500 μg/mL 투여군이 대조군에 비해 catalase활성을 약 9.7%(*p<0.05), 26.1%(***p<0.001) 정도 증가시켰다 (Fig. 3).

ROS(reactive oxygen specise) 감소 효능 – 솔잎 *n*-butanol 분획물의 세포 내 활성산소종의 감소 효능을 알아보기 위해 H_2DCF-DA와 선충 내부의 활성산소종을 반응시켜 형광을 관찰하였다. 활성산소종 형광의 감소 폭은 대조군과 비교하여 솔잎 *n*-butanol 분획물 250 μg/mL 투여군에서 7.3%(*p<0.05), 500 μg/mL 투여군에서 평균 약 11.3% (**p<0.01) 활성산소종을 감소시키는 것으로 확인되었다(Fig. 4).

Oxidative Stress 저항성 증가 효능 – 솔잎 *n*-butanol 분획물의 선충의 산화적 스트레스 조건하에서 선충의 생존율에 미치는 영향을 확인하였다. 선충에 산화적 스트레스를 유도하기 위해서 1mM juglone이 함유된 M9 buffer가 담긴 96 well plate에서 배양한 대조군 선충의 최고 생존시간은 18시간이었으나, 솔잎 *n*-butanol 분획물 250 μg/mL에서는 생존시간을 21시간으로 증가 시켰으며, 500 μg/mL 농도에서는 생존시간을 23시간으로 증가시켰다. 대조군의 평균 생존시간이 9.1±0.9시간었으나 250 μg/mL 처리군에서는 10.7±1.0시간, 500 μg/mL 농도 처리군은 평균 생존 시간을 13.4±0.9시간으로 18.1%, 48.0%의 생존 시간을 각각 향상시켰다(**p<0.01, ***p<0.001)(Fig. 5, Table I).

형질 전환 선충 내 SOD-3의 발현 증가 효능 – 선충 내에서 솔잎 *n*-butanol 분획물 투여에 의한 oxidative stress에 저항하는 단백질의 증가 여부를 확인하기 위해서 SOD발현

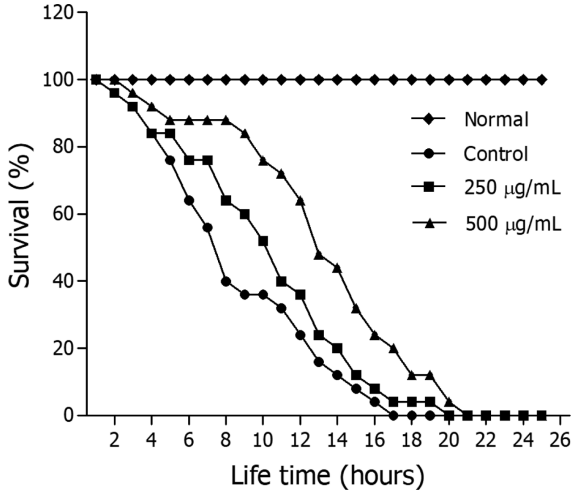

Fig. 5. Effects of *Pinus densiflora* needle *n*-butanol fraction on the stress tolerance of wild-type N2 nematodes. For the oxidative stress assays, worms were transferred to 96-well plate containing 1 mM of juglone liquid culture, and then their viability was scored. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test.

유전자의 증가 여부를 확인 하였다. SOD-3을 포함한 형질전환 선충 CF1553을 사용하여 실험한 결과 CF1553 형질전환 선충에 솔잎 *n*-butanol 분획물 250, 500 μg/mL 처리군이 처리되지 않은 선충에 비해 높은 SOD-3::GFP 발현율 (6.4%, 13.4%, *p<0.05, **p<0.01)을 보여 주었다(Fig. 6A, 6B).

고 찰

예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 형질전환된 mutant들을 이용

Table I. Effects of the *Pinus densiflora* needle *n*-butanol fraction 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	9.1 ± 0.9	18	-	-
	250 μg/mL	10.7 ± 1.0	21	18.1	$^{**}p<0.01$
	500 μg/mL	13.4 ± 0.9	23	48.0	$^{***}p<0.001$

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 $^{**}p<0.01$ and $^{***}p<0.001$.

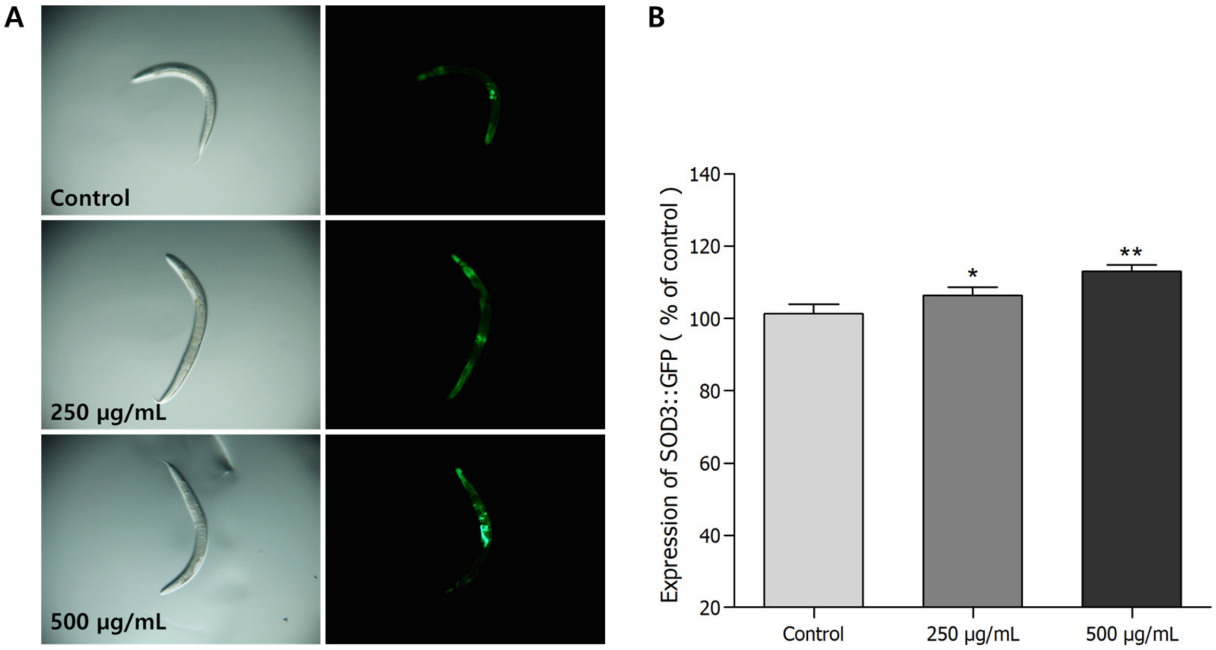

Fig. 6. Effect of *Pinus densiflora* needle *n*-butanol fraction on the expression of SOD-3 was determined using transgenic nematodes. (A) Images of SOD-3::GFP expression of CF1553 worm in the presence or absence of *Beta vulgaris* methanol extract. (B) The mean GFP intensity of mutant was represented as mean ± 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. Data are expressed as the mean ± standard deviation of three independent experiments. Differences compared with the control were considered significant at $^{*}p<0.05$ and $^{**}p<0.01$ by one-way ANOVA.

한 모델 시스템은 수명연장효능 평가를 비롯하여 다이어트, 치매, 파킨슨 질환 등 노화관련 연구에 다양하게 이용되고 있다.[16] 예쁜꼬마선충을 실험모델로 사용하여 솔잎 *n*-butanol 분획물에 대한 항산화 효능평가 실험을 수행하였다. 솔잎 *n*-butanol 분획물은 DPPH radical과 superoxide 소거활성시험에서 농도의존적으로 소거 활성이 증가됨을 보여 주었으며, 이와 같은 결과는 기 보고된 솔잎의 물 및 알코올 분획물의 항산화 효능들과 잘 부합되는 결과이다.[17,18] 솔잎 *n*-butanol 분획물은 예쁜꼬마선충 내의 항산화 효소인 SOD 및 catalase의 활성을 높이는 것으로 확인되어 이는 free radical에 의해 야기되는 oxidative stress로부터 방어하는 기전에 영향이 있을 것으로 예상되는 결과이다.[19] 솔잎 *n*-butanol 분획물의 선충의 oxidative stress에 대한 저항능력을 측정한 실험에서는 대조군과 비교해 볼 때 시료 처리군의 생존율이 농도 의존적으로 크게 증가하였다. 또한 GFP-fused transgenic strain CF1553의 mutant를 이용한 oxidative stress 저항성 실험에서 저항성 지표인자인 SOD-3::GFP 형광 발현량이 농도 의존적으로 증가시키는 것이 확인되어 oxidative stress에 저항하는 단백질이 생성되었음을 확인할 수 있었다.[20] 이와 같은 결과는 솔잎의 성분과 관련된 연구 중에 보고된 proanthocyanidin, 휘발성 oil 성분, flavonoid 화합물들의 항산화 효능과 관련성이 있을 것으로 사료된다.[21-23] ROS에 저항하는 인체 내의 방어 체계로 항산화 효소들이 작용하고 있으나 필요 이상으로 발생되는 ROS는 이러한 항산화 효소 등을 소멸시켜 oxidative stress를 야기시키며, 피부노화를 비롯한 각종 노화와 관련된 각종 질환과 각종 암 발생 또는 염증 생성 등에 관련성이 있음이 보고되어 있다.[24] 솔잎 *n*-butanol 분획물은 SOD나 catalase 등의 항산화 효소의

활성을 증가시키고, oxidative stress에 대한 저항력을 높여주는 효능은 암을 비롯한 각종 염증성 질환이나 stress로 인한 노화를 억제하는데 어느 정도는 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 이후에 솔잎 *n*-butanol 분획물에서 단일 물질 분리를 시도하여 단일 물질 수준에서의 예쁜꼬마선충 내의 항산화 활성 및 항노화 활성관련 연구 및 그에 따른 기전 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

솔잎 *n*-butanol 분획물의 항산화제로서의 가치가 있는지를 확인하기 위해 *in vitro* 실험인 DPPH free radical 및 superoxide 소거능을 확인한 결과에서 농도의존적으로 항산화 효능을 나타냈으며, 예쁜꼬마선충을 이용한 *in vitro* 항산화 실험에서는 SOD 및 catalase의 활성을 농도의존적으로 높이는 것을 확인하였다. 또한, 선충 세포 내의 ROS의 발생을 농도 의존적으로 감소시켰으며, juglone 투여로 인한 oxidative stress 조건하에서는 선충의 생존율을 농도의존적으로 증가시켰다. 이와 관련하여 항산화 효소인 SOD 발현 유전자에 GFP로 transgenic mutant CF1553을 이용한 oxidative stress 저항성 단백질 발현 실험에서는 oxidative stress에 저항성이 있는 SOD-3::GFP의 발현량 증가됨을 확인하였다. 본 결과는 솔잎 *n*-butanol 분획물은 항산화 및 이와 관련된 질병의 예방 및 치료를 위한 자원으로서의 가치가 충분히 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Riley, P. A. (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol*. **65**: 27-33.
2. Kowalska, K. and Milnerowicz, H. (2016) Pro/antioxidant status in young healthy women using oral contraceptives. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. **43**:1-6.
3. Patrik, P., Klaudia, J., Miriama, S. Vojtech, K., Christopher, J. R. and Marian, V. (2017) Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci*. **38**: 592-607.
4. Jeon, M. H., Park, M.-R., Park, Y. S., Hwang, H. J., Kim, S. G., Lee, S.-H. and Kim, M. (2011) Effect of pine (*Pinus densiflora*) needle extracts on antioxidant activity and proliferation of osteoclastic RAW 264.7 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. **40**: 525-530.
5. Wang, C. Y., Chen, Y. W. and Hou, C. Y. (2019) Antioxidant and antibacterial activity of seven predominant terpenoids. *Int. J. Food Properties*. **22**: 230-238.
6. Cardoso, S. M. and Fassio, A. (2020) The antioxidant capacities of natural products. *Molecules* **25**: 5676.
7. Cho, E. K., Song, H. J., Cho, H. E., Kim, M., Choi, I. S. and Choi, Y. J. (2009) Inhibitory effects ethanol extracts from pine buds (*Pinus densiflora*) on angiotensin converting enzyme, xanthine oxidase and nitric oxide synthesis. *Journal of Life Science* **19**: 1629-1636.
8. Wang, C. Y., Chen, Y. W. and Hou, C. Y. (2019) Antioxidant and antibacterial activity of seven predominant terpenoids. *Int. J. Food Properties*. **22**(1): 230-238.
9. 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.
10. Ginnopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase. I. occurrence in higher plants. *Plant Physiol. Biochem*. **59**: 309-314.
11. Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* **77**: 71-94.
12. 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.
13. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. **105**: 121-126.
14. 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.
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. Luo, S., Jiang, X., Jia, L., Tan, C.,Li, M., Yang, Q., Du, Y. and Ding, C. (2019) In vivo and in vitro antioxidant activities of methanol extracts from olive leaves on *Caenorhabditis elegans*. *Molecules* **704**: 1-14.
17. Venkatesan, T., Choi, Y.-W. and Kim, Y.-K. (2019) Effect of an extraction solvent on the antioxidant quality of *Pinus densiflora* needle extract. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **9**: 193-200.
18. Jeon, M. H., Park, M.-R., Park, Y. S. and Hwang, H. J. (2011) Effect of pine (*Pinus densiflora*) needle extracts on antioxidant activity and proliferation of osteoclastic RAW 264.7 Cells. *Journal-Korean Society of Food Science and Nutrition* **40**: 525-530.
19. Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J. and Valko, M. (2017) Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci*. **38**: 592-607.
20. Leite, N. R., de Araújo, L. C. A., Dos Santos da Rocha, P.,

Agarrayua, D. A., Ávila, D. S., Carollo, C. A., Silva, D. B., Estevinho, L. M., de Picoli Souza, K. and Dos Santos, E. L. (2020) Baru pulp (*Dipteryx alata* Vogel): Fruit from the Brazilian savanna protects against oxidative stress and increases the life expectancy of *Caenorhabditis elegans* via SOD-3 and DAF-16. *Biomolecules* **10**: 1106.

21. Park, Y. S., Jeon, M. H., Hwang, H. J., Park, M. R., Lee, S. H., Kim, S. G. and Kim, M. (2011) Antioxidant activity and analysis of proanthocyanidins from pine (*Pinus densiflora*) needles. *Nutr. Res. Pract*. **5**: 281-287.
22. Park, J. S. and Lee, G. H. (2011) Volatile compounds and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of the needles of *Pinus densiflora* and *Pinus thunbergii*. *J. Sci. Food Agric*. **91**: 703-709.
23. Jung, M. J., Choi, J. H., Chung, H. Y., Jung, J. H. and Choi, J. S. A new C-methylated flavonoid glycoside from *Pinus densiflora*. *Fitoterapia* **72**: 943-945
24. Jadoon, S., Karim, S., Bin Asad, M. H., Akram, M. R., Khan, A. K., Malik, A., Chen, C. and Murtaza, G. (2015) Anti-aging potential of phytoextract loaded-pharmaceutical creams for human skin cell longetivity. *Oxid. Med. Cell Longev*. **2015**: 709628.

(2021. 6. 7 접수; 2021. 6. 15 심사; 2021. 6. 16 게재확정)