

Antioxidant Effect of *Filipendula glaberrima* Nakai Extract in HepG2 Cells

Mijin Hong* and Dahyun Hwang†,**

Department of Biomedical Laboratory Science, Hoseo University, Asan-si, Chungcheongnam-do 31499, Korea

The imbalance of oxidative stress due to the excessive production of reactive oxygen species (ROS) leads to the pathogenesis of liver disease. To prevent this, the role of antioxidant mechanisms is important. Antioxidant studies have been reported on the *Filipendula glaberrima* Nakai. However, studies applied to HepG2 cells, which are human liver cells, have not yet been conducted. In this study, 70% ethanol extract of *Filipendula glaberrima* Nakai (FGE) was prepared and antioxidant activity was investigated. It was confirmed whether FGE pretreatment could reduce hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells. The increase in gene expression of antioxidant biomarkers and the scavenging ability of ROS were measured, and Hoechst 33342 staining was used to know the inhibitory effect of the apoptosis. As a result, FGE significantly increased *SOD* (2.6-fold), *CAT* (4.4-fold), *MT-1A* (3.1-fold), *GPx* (4-fold), and *G6PD* (2.4)-fold compared to the H₂O₂-treated group. FGE directly inhibited ROS production from 13.4 to 3.6 (the fluorescence mean of DCF-DA) and also reduced apoptotic cells from 45% to 10% (Hoechst 33342 staining) at 2.5 μg/mL. These results demonstrate the excellent antioxidant activity of FGE and show that it can be used as a functional food to prevent liver disease.

Key Words: Anti-oxidant, *Filipendula glaberrima* Nakai, HepG2, Functional foods

서 론

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 과도한 생성은 심혈관계 질환, 당뇨병, 고혈압, 간질환과 같은 만성질환과 자가면역질환 등의 다양한 질병을 유발한다(Valko et al., 2007). ROS는 superoxide anion (O₂⁻), hydroxy radical (-OH), hydrogen peroxide (H₂O₂) 등을 말하며 미토콘드리아 호흡의 부산물로 생성된다. 인체의 적당한 ROS는 세포 신호 전달, 신경 전달에 중요한 역할을 하며 또한 정상 조직에서 항상성 유지에 관여한다(Kwak and Lee, 2014). 그러나 인체가 과도하게 산화적 스트레스를 받을 경우 과잉의 ROS가 생성되고 이는 단백질, 지질, 핵산(DNA,

RNA)과 같은 세포 구성 요소를 손상 및 파괴시킨다(Zhang et al., 2016). 특히 H₂O₂는 다른 활성산소종보다 반감기가 길고 파괴적인 free radical 중 하나인 hydroxy radical (-OH)로의 변형이 쉽기 때문에 산화 손상의 주요 원인이 된다(Clarkson and Thompson, 2000). 따라서 활성산소종의 제거를 통한 질병의 예방 및 관리가 필요한 실정이며 만성질환의 예방과 노화 억제 등 생체 조절 기능이나 생체 방어능력을 지닌 일부 성분들을 이용한 기능성 식품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Chang et al., 2013; Cho et al., 2014).

간은 유해물질을 처리하기 위한 효소들을 생산하여 유해물질을 처리하는 일차적인 해독 작용을 하는 장기다(Kim et al., 2019). ROS 과잉 생성으로 인한 산화적 스트레

Received: March 2, 2022 / Revised: March 27, 2022 / Accepted: March 28, 2022

*Undergraduate student, ** Professor.

†Corresponding author: Dahyun Hwang. Department of Biomedical Laboratory Science, Hoseo University, 20, Hoseo-ro 79 beon-gil, Baebang-eup, Asan-si, Chungcheongnam-do 31499, Korea.

Tel: +82-41-540-9628, Fax: +82-41-540-9997, e-mail: hdh@hoseo.edu

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©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.

스의 불균형은 간 체내의 주위 간세포, 내피세포 그리고 간성상 세포(Hepatic stellate cell)에 영향을 주고 간섬유화를 촉진시킨다(Gandhi, 2012; Cichoż-Lach and Michalak, 2014). 이는 간 염증, 간경변증, 간세포암과 같은 간질환으로 이어질 수 있으며 이를 예방해 줄 수 있는 항산화제(antioxidant)가 생리활성 물질로서 크게 각광받고 있다(Leem et al., 2011; Mari et al., 2013).

현재 우리 주변에서 접할 수 있는 천연 항산화제로는 비타민 C, 플라보노이드류, 카로티노이드류, 탄닌, 안토시아닌, 토코페놀 등이 있으며 생체 내 노화를 억제하고 질병의 예방에 효과적인 것으로 알려져 있다(Atoui et al., 2005; Suh et al., 2019). 항산화제 중에서도 BHT (butylated hydroxytoluene)과 BHA (butylated hydroxyanisole)와 같은 합성 항산화제는 저렴하고 우수한 활성 효과를 가지지만 발암성 및 안전성에 대한 문제가 제기되면서 근래에는 합성 항산화제의 단점을 보완한 천연유래 항산화제 연구가 꾸준히 진행되고 있다(Kim et al., 2009; Na et al., 2016; Cha et al., 2017). 그러나 천연 항산화제의 경우, 합성 항산화제에 비해 생체 이용률이 낮기 때문에 비교적 낮은 항산화 활성을 보인다(Jeong et al., 2006). 항산화제의 이런 단점들을 보완하기 위해, 인체에 무해하면서 생체 이용률이 높아 항산화 효능이 우수한 천연 항산화제에 대한 지속적인 개발이 요구되어진다.

터리풀(*Filipendula glaberrima* Nakai, FG)은 깊은 산속에서 자라는 장미과 속의 여러해살이 식물이다. 본 속 식물의 대부분의 종이 한국, 일본, 만주 등 동북아시아에 자생하는데, 특히 FG는 한반도에만 분포하는 특산종으로 알려져 있다(Yeo et al., 1992). 또한 터리풀이 소염, 진통, 통풍의 치료 목적으로 사용되었다는 보고와 우수한 항산화 활성능을 가진 플라보노이드 계열 중 하나인 카테킨 성분을 포함한다는 보고가 있다(Yeo et al., 1992b; Lee et al., 2020). 지금까지 터리풀을 소재로 한 항산화 연구가 진행되어 왔으나 인체 간세포에 적용한 연구는 아직 진행된 바가 없다. 따라서 인체 간세포에 터리풀 추출물을 이용한 항산화 활성연구는 천연 항산화제로서의 고부가치가 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 천연물 소재인 터리풀 에탄올 추출물(ethanol extract of *Filipendula glaberrima* Nakai, FGE)의 항산화 효과를 평가하기 위해 인간 간암세포주인 HepG2에 H₂O₂로 유발된 산화적 스트레스에 대하여 이들 추출물이 세포를 보호할 수 있는지 알아보았다. 본 시료의 항산화 활성을 측정함으로써 간질환을 예방할 수 있는 건강

기능식품이나 천연생물자원의 소재로의 활용가능성을 보고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 추출방법

FGE는 경기도 경제과학진흥원 바이오센터(Suwon, Korea)에서 구입했다. FG의 지상부 부분(55.5 g)을 실온에서 하루 동안 70% 수성 에탄올(1 L)로 추출하였다. 이후 추출물을 여과하고(Advantec No.2) 40°C의 온도로 감압농축한 뒤(EYELA rotary evaporator, Tokyo, Japan) 동결 건조하여 잔류물 7.55 g을 얻었다. 건조된 추출물을 DMSO에 100 mg/mL 농도로 녹이고 증류수로 적절히 희석하여 실험에 사용하였다.

세포배양

본 실험에 사용된 세포는 인간 간암세포주인 HepG2로 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받았다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, Grand Island, NY, USA)과 1% penicillin-streptomycin (P/S; GenDEPOT, Katy, TX, USA)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; HyClone, San Angelo, TX, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

HepG2 세포의 세포독성 측정

FGE의 HepG2 세포에 대한 안전성을 측정하기 위해 HepG2 cell (5×10⁵ cell/mL)를 96 well plate에 200 μL씩 분주하고 16~20시간 정도 5% CO₂ incubator (37°C)에서 안정화하였다. FGE (0.625~2.5 μg/mL)로 24시간 처리하고 세포에 산화적 스트레스를 유발하기 위해 400 μM의 H₂O₂를 9시간 처리하였다.

세포독성을 측정하기 위해 상층액을 제거하고 SFM (Serum Free Media)에 녹인 10% EZ cytox (DoGenBio, Seoul, Korea) 100 μL를 첨가하였다. 30분 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상대 세포 생존율(%)은 음성 대조군에 대한 백분율로 표시되었다. 세포 형태는 도립현미경(CKX53, OLYMPUS, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)

HepG2 세포 (5×10⁵ cell/mL)를 24 well plate에 500 μL씩 분주하고 16~20시간 정도 5% CO₂ incubator (37°C)에서

Table 1. Primer list

Gene	Forward	Reverse
<i>SOD1</i>	5'-AAG GCC GTG TGC GTG CTG AA-3'	5'-CAG GTC TCC AAC ATG CCT CT-3'
<i>CAT</i>	5'-AAG GTT TGG CCT CAC AAG G-3'	5'-CGG CAA TGT TCT CAC ACA G-3'
<i>MT-1A</i>	5'-CTC GAA ATG GAC CCC AACT-3'	5'-ATA TCT TCG AGC AGG GCT GTC-3'
<i>GPx</i>	5'-GTG TAT GCC TTC TCG GCG CG-3'	5'-CGT TGC GAC ACA CCG GAG AC-3'
<i>G6PD</i>	5'-CCG GAT CGA CCA CTA CCT GGG CAAG-3'	5'-GTT CCC CAC GTA CTG GCC CAG GAC CA-3'
<i>GAPDH</i>	5'-ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC-3'	5'-TTG ATG TTA GTG GGG TCT CGC-3'

*Abbreviations: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), metallothioneins (MT-1A), glutathione peroxidase (GPx), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

안정화하였다. 그리고 FGE (0.625~2.5 µg/mL)로 24시간 처리하고 세포에 산화적 스트레스를 유발하기 위해 400 µM의 H₂O₂를 9시간 처리하였다. mRNA 수준에서 유전자의 발현 정도를 확인하기 위해 Total RNA Extraction Kit (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Daejeon, Korea)를 사용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)를 사용하여 cDNA로 역전사 시킨 후 qPCR은 Magnetic Induction Cycler PCR Machine (biomolecular systems, Coomera, Australia)을 사용하여 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 시약(TOYOBO, Osaka, Japan)에 의해 진행하였다. 본 실험에 사용된 primer의 염기서열은 Table 1에 나타내었으며, mRNA의 발현 변화는 2^{-ΔΔCt} method 방법을 사용하여 *GAPDH* 대조군을 1로 설정하여 표현하였다(Livak and Schmittgen, 2001).

활성산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거능 측정

HepG2 세포에 FGE를 처리하였을 때 ROS의 소거능을 보기 위하여 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma-Aldrich Co. St. Louis, U.S.A)를 사용하여 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS; *BD FACSAria™* II Cell Sorter)로 측정하였다. HepG2 세포를 6 well plate에 5×10⁵ cell/mL의 최종 농도가 되도록 세포 용액을 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 뒤, FGE (0.625~2.5 µg/mL)로 24시간 처리하고 400 µM의 H₂O₂를 12시간 처리하여 산화적 스트레스를 유발하였다. 배양 후 phosphate-buffered saline (PBS)으로 1회 세척하고 20 µM의 DCF-DA를 처리하였다. 20분 뒤 PBS로 세척한 다음 trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 회수하고 excitation 485 nm, emission 535 nm의 조건에서 FACS로 측정하였다.

Hoechst 33342 염색

HepG2 세포를 cell culture slide에 5×10⁴ cell/mL의 최종 농도가 되도록 세포 용액을 분주한 후 배양기에서 24시간 동안 배양한 뒤, FGE (0.625~2.5 µg/mL)로 24시간 처리하고 400 µM의 H₂O₂를 12시간 반응시켰다. PBS로 2회 세척 후, 10% formalin을 처리하여 1시간 고정시킨 뒤 PBS로 세척하고 Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, U.S.A)로 30분 동안 염색시키고, 염색 후 세척하여 형광 현미경 하에서 400배로 관찰하였다.

통계 처리

Windows용 SPSS 버전 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계 처리를 진행하였다. 모든 실험 결과는 실험의 평균 ± SD로 표시하였다. 각 그룹간 차이의 통계적 유의성은 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 사용하였고 *P* < 0.05 수준에서 검증하였다.

결 과

FGE의 HepG2 세포 세포독성

본 실험에서는 FGE이 HepG2 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2 세포에 대한 독성을 확인하였다(Fig. 1). 음성 대조군을 제외한 모든 군에 400 µM의 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였고, 400 µM의 H₂O₂ 단독 처리군에서는 음성 대조군 대비 유의적인 세포 생존율 감소(약 20%)를 나타냈다. 반면에 FGE의 0.625~2.5 µg/mL의 농도에서는 농도 유의적으로 증가된 세포 생존율을 보였으며 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다. 따라서 HepG2 세포에 FGE이 세포 생존율에 영향을 크게 미치지 않는 농도 범위에서 후속 실험을

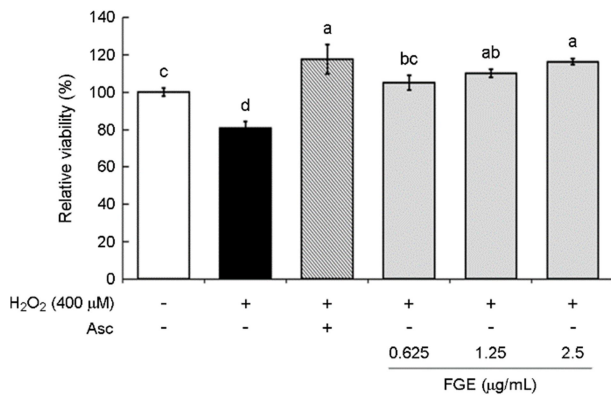


Fig. 1. Cytotoxic effects of FGE against H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with FGE (0.625, 1.25 and 2.5 μg/mL) for 24 h and then 400 μM H₂O₂ induced oxidative stress for a further 9 h. The cell viability was measured using EZ cytox. The present data were expressed mean ± SD. Different superscripts mean a significant difference among groups ($P < 0.05$) based on one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. FGE, ethanol extract of *Filipendula glaberrima* Nakai; NC, Negative control; Asc, Ascorbic acid.

진행하였다.

FGE의 항산화 활성 효과

본 연구에서는 RT-PCR을 이용하여 FGE의 항산화 방어 시스템인 3개의 주요 효소 및 단백질(SOD, CAT, MT-1A)과 glutathione 대사에 관여하는 효소들(GPx, G6PD)의 mRNA 발현양을 확인하였다(Fig. 2, Fig. 3). H₂O₂로 산화적 스트레스가 유도된 HepG2 세포에서 FGE는 모두 통계적으로 유의한 항산화 효과를 나타내었다.

FGE의 최고 농도인 2.5 μg/mL에서 H₂O₂ 단독 처리군 대비 SOD (2.6배), CAT (4.4배), MT-1A (3.1배), GPx (4배), G6PD (2.4)배로 mRNA 수준이 모두 유의적으로 증가하였다. 따라서 FGE는 mRNA 수준에서 모두 농도 의존적으로 항산화 활성 효과를 보인 것을 알 수 있다.

세포 내 ROS 소거 효과

HepG2 세포에 H₂O₂에 의해 유도된 세포 내 ROS 생성에 대한 FGE의 영향을 확인하고자 FACS를 이용해 DCF-DA를 검출하여 ROS 생성량을 측정하였다(Fig. 4). 이를 정량분석 한 결과, H₂O₂ 단독 처리군과 비교했을 때 평균 DCF-DA 형광 값이 FGE의 최고 농도인 2.5 μg/mL에서 13.4에서 3.6으로 3배 이상 감소 한 것을 볼 수 있다(Fig. 4B). 이것은 HepG2 세포에 H₂O₂로 유발된 ROS를 FGE가 소거시켰음을 나타내며 본 결과에 따라 FGE가 유의한

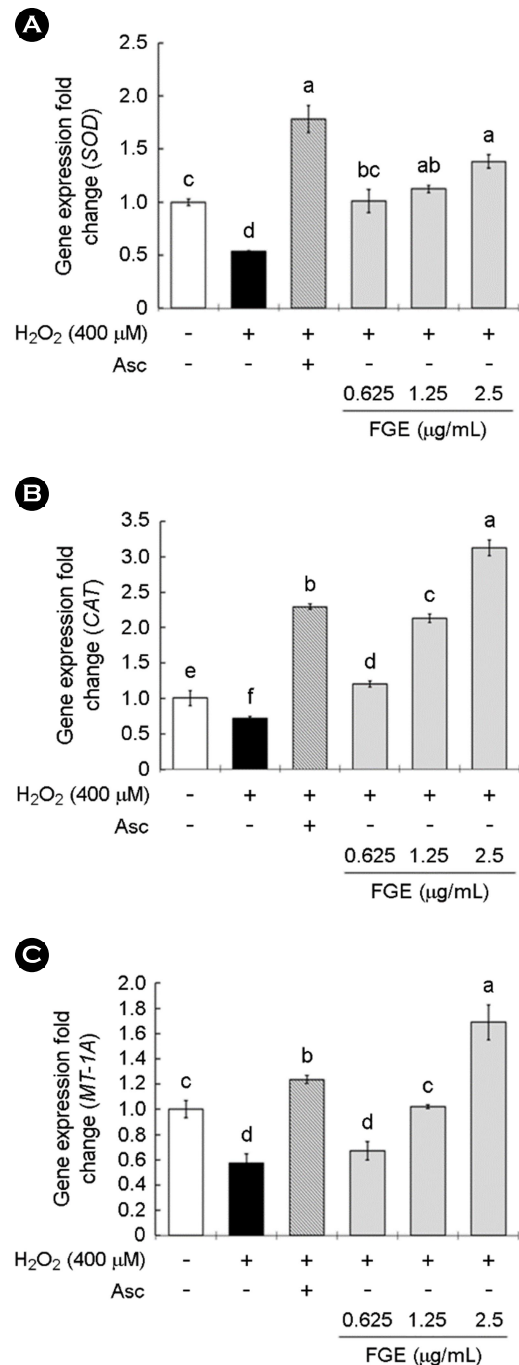


Fig. 2. Effect of FGE on the expression of (A) SOD, (B) CAT and (C) MT-1A genes in H₂O₂-induced HepG2 cells. HepG2 cells were treated with FGE (0.625, 1.25 and 2.5 μg/mL) for 24 h and then 400 μM H₂O₂ induced oxidative stress for a further 9 h. The mRNA expressions were analyzed by qRT-PCR. The cells were collected and (A) SOD, (B) CAT and (C) MT-1A mRNA level were estimated NC, Negative control; SFM, Serum Free Media. The present data were expressed mean ± SD. Different superscripts mean a significant difference among groups ($P < 0.05$) based on one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. FGE, ethanol extract of *Filipendula glaberrima* Nakai; NC, Negative control; Asc, Ascorbic acid.

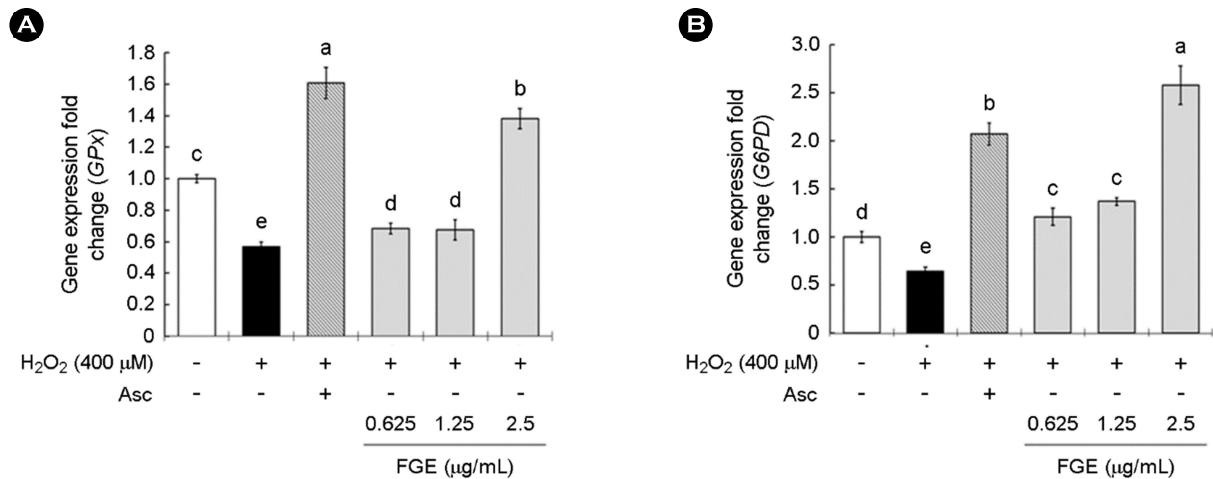


Fig. 3. Effect of FGE on the expression of (A) *GPx*, (B) *G6PD* genes in H₂O₂-induced HepG2 cells. HepG2 cells were treated with FGE (0.625, 1.25 and 2.5 μg/mL) for 24 h and then 400 μM H₂O₂ induced oxidative stress for a further 9 h. The mRNA expressions were analyzed by qRT-PCR. The cells were collected and (A) *GPx*, (B) *G6PD* mRNA level were estimated NC was treated with only the SFM (Serum Free Media). The present data were expressed mean ± SD. Different superscripts mean a significant difference among groups ($P < 0.05$) based on one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. FGE, ethanol extract of *Filipendula glaberrima* Nakai; NC, Negative control; Asc, Ascorbic acid.

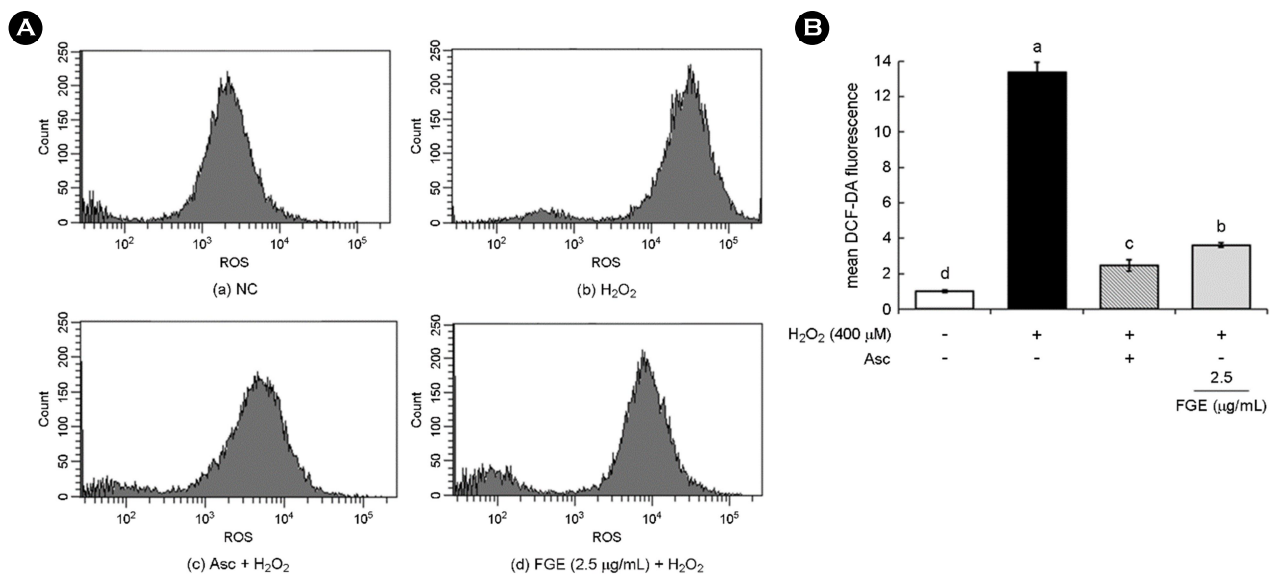


Fig. 4. Effect of FGE on the contents of ROS in H₂O₂-induced HepG2 cells. The cells were treated with FGE and then stimulated with 400 μM H₂O₂ for 12 h. (A) ROS was determined by FACS and (B) analysis of statistical results of FACS detection. The present data were expressed mean ± SD. Different superscripts mean a significant difference among groups ($P < 0.05$) based on one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. FGE, ethanol extract of *Filipendula glaberrima* Nakai; NC, Negative control; Asc, Ascorbic acid.

ROS 소거능이 있음을 확인하였다.

Apoptosis 억제 효과(Hoechst 33342)

H₂O₂ 유도에 대한 FGE의 세포 보호 효과를 평가하기 위해 Hoechst 33342 염색을 수행하였다(Fig. 5). H₂O₂ 단독

처리군에서는 생존 세포 수가 적으면서 세포 사멸이 진행되어 핵의 응축 및 분열 형태를 보이는 전형적인 apoptosis 특징을 나타내었다(Fig. 5A). 반면에, FGE를 농도 별로 처리한 군에서는 농도 의존적으로 정상적으로 온전한 핵 형태를 보이는 세포가 증가하였다. 이를 정량분석 한 결

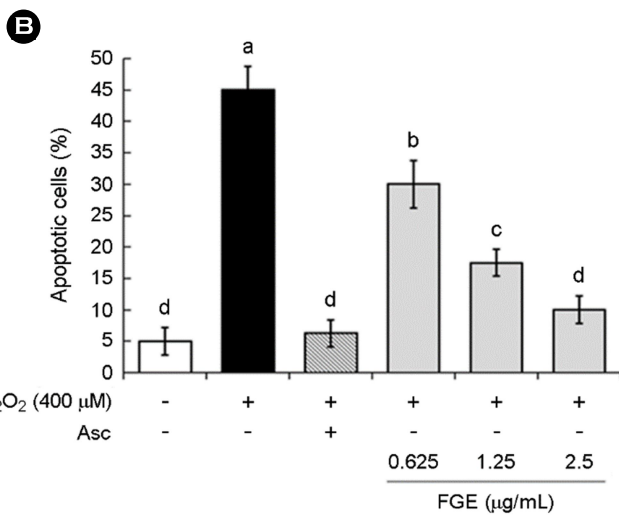
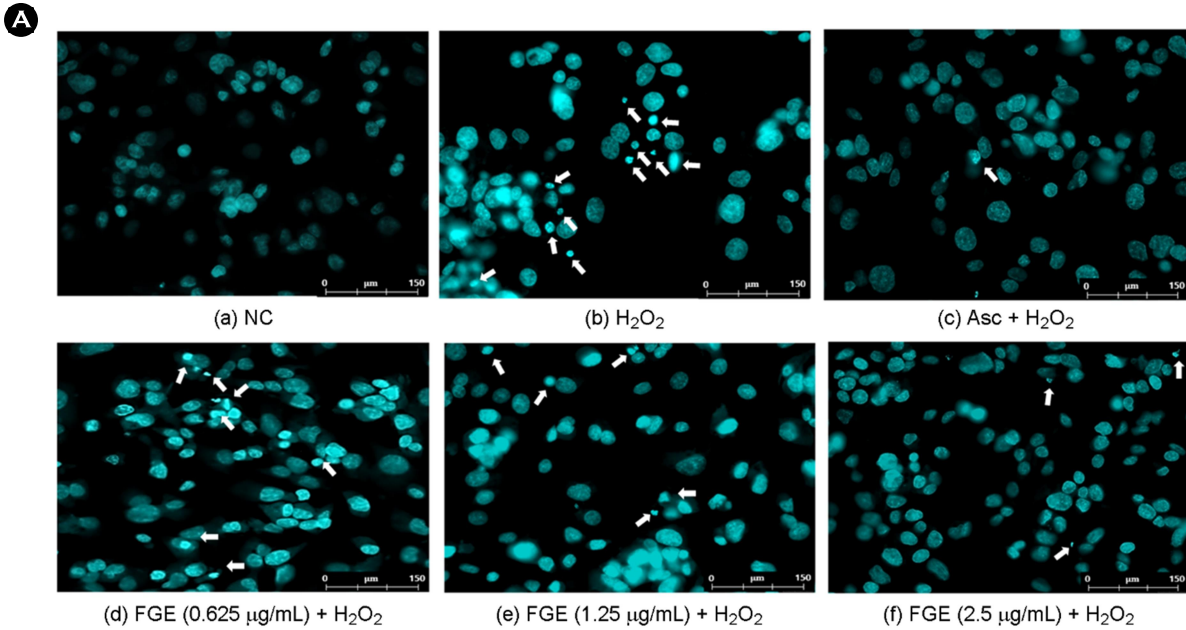


Fig. 5. Protective effect of FGE against H₂O₂-induced apoptosis in HepG2 cells. The cells were treated with FGE and then stimulated with 400 µM H₂O₂ for 12 h. Fixed cells were stained with Hoechst 33342 and examined by fluorescence microscope (Magnification×400). Apoptotic HepG2 cells are indicated by arrows. (A) The morphology of cell nucleus and (B) analysis of statistical results of apoptotic cells. FGE, ethanol extract of *Filipendula glaberrima* Nakai; NC, Negative control; Asc, Ascorbic acid.

과, apoptotic cell은 대조군(5%)와 비교했을 때 H₂O₂ 단독 처리군에서 45%로 크게 증가하였지만 FGE를 함께 처리했을 때, apoptotic cell이 30.0%, 17.5%, 10.0%로 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 5B). 따라서 본 결과에 따르면, FGE는 HepG2 세포에 작용하여 항산화 활성을 증진시킴으로써 H₂O₂에 의한 산화적 손상을 보호할 수 있음을 형태학적으로 확인하였다.

고 찰

미토콘드리아의 정상적인 호흡 대사과정에서 활성산소

는 소량씩 생성되고 세포의 기능 유지에 필수적인 물질이다(Kwak and Lee, 2014). 그러나 활성산소종 생성의 불균형으로 인한 과도한 산화적 스트레스는 노화 및 각종 질환들의 발병기전과 미토콘드리아의 기능 장애를 촉진시킨다(Maxwell, 1995). 산화적 스트레스는 간 염증, 간경화를 비롯한 다양한 간질환의 발병을 유발하는 주요 원인이 되며 간에 매우 취약하다고 알려져 있다(Sanchez-Valle et al., 2012).

본 연구는 *in vitro*에서 H₂O₂에 의해 유발된 산화 스트레스로부터 FGE의 HepG2 cell 보호 효과를 확인하기 위해 수행되었다. 간은 생체 내에서 해독 및 생화학적 대사

와 같은 중요한 기능을 수행하는 중심적인 기관으로 간세포가 산화스트레스에 대항하여 보호 효과를 관찰하기 위해 적합하다고 판단했고, 본 연구에서는 인간 간암세포주인 HepG2 세포주를 사용하였다(Gao et al., 2016). 일반적으로 HepG2 세포에 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유발시키기 위해 100~1,000 μM의 농도가 선택되어지는데, 본 연구에서는 세포에 약 20% 정도의 유의적인 독성을 유발하는 농도인 400 μM을 선택하여 실험을 진행하였다. FGE는 0.625~2.5 μg/mL의 농도에서 세포에 독성을 나타내지 않는 농도 범위에서 실험을 진행했다.

ROS는 생체 내 신체의 구성물질과 강한 반응성을 보이며 산화적 스트레스를 유발하는 물질로 세포의 산화과정을 일으키는 주원인이다(Choi et al., 2012). 그러나 인체 내에서 ROS의 지속적인 생성은 불가피하며, 그만큼 ROS의 소거를 통한 인체 내 대사의 균형을 중요하다. FGE의 직접적인 ROS 소거능을 보고자 H₂O₂를 처리하여 생성된 과도한 ROS 생성을 유발하여 DCF-DA를 처리해 FACS 분석을 실시하였다. 본 연구에서 FGE가 H₂O₂에 의해 과도하게 생성된 ROS를 효과적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 따라서 FGE의 ROS 소거능을 측정해 산화적 손상을 억제하는 효과를 검증하였다.

H₂O₂는 세포막 통과가 용이하며 산화적 스트레스를 증가시킴에 따라 미토콘드리아 막전위를 감소시켜 결국 apoptosis를 유발시키는 것으로 알려져 있다(Youn et al., 2015). Apoptosis가 진행되면 세포는 면역 반응을 일으켜, 핵의 응축 및 DNA가 조각나는 형태학적 특징을 보인다. 따라서 핵 내 DNA에 특이적으로 결합하는 형광 염색체인 Hoechst 33342를 사용하여 핵의 형태학적인 특징을 관찰했다(Kim et al., 2010). 그 결과 HepG2 세포주에 H₂O₂ 처리군의 세포핵에서 핵 응축과 분열로 인한 apoptotic body가 관찰된 반면, FGE를 농도 의존적으로 처리한 군에서는 정상 세포군의 형태와 유사한 핵의 형태를 관찰할 수 있었다. 이는 HepG2 세포에 FGE의 전처리가 H₂O₂로 유발된 산화적 손상으로부터 보호하는 효과가 있음을 예측해 볼 수 있다. 핵의 형태학적인 관찰을 통해 FGE의 산화적 스트레스로부터의 세포 보호 효과를 가시적으로 확인했다면 FGE의 우수한 항산화 활성을 검증하기 위해 항산화의 대표적인 바이오 마커들을 측정하였다. 본 연구에서는 주요 항산화 효소들의 유전자 발현양을 보기 위해 RT-PCR을 이용하였다. 그 결과 SOD, CAT, GPx, G6PD, MT-1A와 같은 항산화 바이오 마커에서 H₂O₂ 단독 처리한 대조군에 비해 mRNA 발현이 유의적으로 증가하였다.

우리 몸은 정상적으로 생체 기능을 유지하기 위해 다양한 내·외부적 자극에 대한 자체적인 방어 메커니즘을 가지고 있다. 대표적으로 SOD 및 CAT와 같은 항산화 효소, glutathione 대사계에 속하는 GPx, G6PD 그리고 다목적 단백질로 간주되는 MT-1A와 같은 항산화 방어시스템이 있다(Salla et al., 2016). 항산화 효소인 SOD와 CAT는 세포 내 과잉으로 생성되는 일차적인 radical의 과도한 형성을 제거하는데 기여하고 GSH는 환원 형태인 GSH와 산화 형태인 GSSG로 존재하며 GPx는 산화, 환원 반응을 통해 산화 스트레스를 제거하는 능력을 보유하고 있다(Clarkson and Thompson, 2000b; Zhang et al., 2009). 또한 G6PD의 활성이 감소할 경우 NADPH와 같은 glutathione을 환원형으로 유지시켜주는 보조인자의 생성을 저하시켜 세포 내의 자유라디칼이나 과산화물을 효과적으로 해독하지 못하게 된다(Kim et al., 2008). MT-1A은 중금속 이온(Cu, Cd, Hg, Pb, Pt)과 높은 친화력을 보여 SOD와 같은 항산화 효소에 대한 금속 보조인자를 제공함으로써 간접적인 항산화제로서 기능을 할 수 있다(Álvarez-Barrios et al., 2021). 즉, 인체의 정상적인 방어 메커니즘에 따른다면 인체의 세포 내에서 산화 환원 상태를 조절하여 ROS 생성 억제에 관여하지만, 이 시스템의 불균형은 과도한 ROS를 생성시켜 산화적 스트레스를 초래하고 결국 만성질환의 발병 기전으로서 영향을 미친다(Kim et al., 2012). 따라서, 본 결과는 FGE가 항산화 바이오 마커들의 유전자 발현을 증가시킴으로써 산화적 스트레스로부터 세포에 보호 효과를 보였다고 볼 수 있다. 즉, FGE가 H₂O₂로 인해 유발된 과도한 ROS의 생성으로 인해 HepG2 세포의 핵 응축 및 분열과 같은 초기 apoptotic body에 대한 보호 효과를 보인 것이 FGE의 항산화 방어 메커니즘 기작에 따른 것임을 나타내고 있다.

모든 결과를 종합하여 볼 때, FGE는 HepG2 간세포에 H₂O₂로 인해 유도된 산화적 스트레스로부터 보호 효과를 보였다. 이는 FGE의 우수한 항산화 효능을 증명하며 향후 간 손상 보호 및 간 기능 개선 효과를 갖는 간 건강의 기능성 소재로써 활용될 수 있을 것이라 사료된다. 반면, 본 연구에서는 세포에 FGE의 단독 처리에 의한 항산화 활성에 대한 영향을 조사하지 못했는데, 추후 FGE가 세포 증식 또는 항산화 유전자 활성화에 기여했는지 추가적인 검증이 필요할 것으로 사료된다. 또한, FGE에 의한 항산화 효과가 미토콘드리아의 내인성 신호 전달 경로에 어떻게 영향을 미치는지에 대한 추가적인 기전 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the Academic Research Fund of Hoseo University in (2021-0482).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

- Álvarez-Barrios A, Álvarez L, García M, Artime E, Pereiro R, González-Iglesias H. Antioxidant Defenses in the Human Eye: A Focus on Metallothioneins. *Antioxidants*. 2021. 10: 89.
- Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem*. 2005. 89: 27-36.
- Cha JY, Yoo HR, Kim YS, Seol IC, Jo HK. Inhibition of gene associated with Dyslipidemia and Antioxidative Effect of *Artemisia iwayomogi*, *Curcumae Radix* and *Raphani Semen* (ACR) on HepG2 cell model. *J Korean Med Sci*. 2017. 38: 43-58.
- Chang EH, Jeong SM, Park KS, Lim BS. Contents of Phenolic Compounds and trans-Resveratrol in Different Parts of Korean New Grape Cultivars. *Korean J Food Sci Technol*. 2013. 45: 708-713.
- Cho BO, Lee CW, So YK, et al. Protective Effect of Radiation-induced New Blackberry Mutant γ -B201 on H₂O₂-induced Oxidative Damage in HepG2 Cells. *Korean J Food Sci Technol*. 2014. 46: 384-389.
- Choi CH, Won DH, Hwang JP, Park SN. Antioxidative Effect of Extracts from Different Parts of *Juncus effusus* L. *J Soc Cosmet Scientists Korea*. 2012. 38: 275-282.
- Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2014. 20: 8082-8091.
- Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*. 2000. 72: 637S-646S.
- Gandhi CR. Oxidative stress and hepatic stellate cells: a paradoxical relationship. *Trends Cell Mol Biol*. 2012. 7: 1-10.
- Gao X, Li C, Tang Y, Zhang H, Chan S. Effect of *Hedyotis diffusa* water extract on protecting human hepatocyte cells (LO2) from H₂O₂-induced cytotoxicity. *Pharm Biol*. 2016. 54: 1148-1155.
- Jeong GT, Lee KM, Park DH. Study of Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Rumex crispus* Extract. *Korean J Chem Eng*. 2006. 44: 81-86.
- Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants. *Korean J Food Sci Technol*. 2012. 44: 337-342.
- Kim SH, Choi HJ, Oh HT, Chung MJ, Cui CB, Ham SS. Cytoprotective Effect by Antioxidant Activity of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* Ethyl Acetate Fraction in Human HepG2 Cells. *Korean J Food Sci Technol*. 2008. 40: 696-701.
- Kim HJ, Lee JM, Moon SH, Park HR. Protective Effect of *Prunella spica* Extracts against H₂O₂-Induced Cytotoxicity in PC12 Cells. *J Life Sci*. 2010. 20: 1121-1126.
- Kim JE, Bae SM, Nam YR, Bae EY, Ly SY. Antioxidant activity of ethanol extract of *Lycium barbarum*'s leaf with removal of chlorophyll. *J Nutr Health*. 2019. 52: 26-35.
- Kim YD, Mahinda S, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Jeju Native Citrus Peel during Maturation. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2009. 38: 462-469.
- Kwak CS, Lee JH. *In vitro* Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Ethanol Extracts from Sprout of Evening Primrose (*Oenothera lacinata*) and Gooseberry (*Actinidia arguta*). *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2014. 43: 207-215.
- Lee HD, L YJ, Kim H, Kim HG, Park CG, Lee SH. HPLC/UV Quantification of (+)-Catechin in *Filipendula glaberrima* from Different Regions and Flowering Stages. *Korean J Pharmacogn*. 2020. 51: 291-296.
- Leem HH, Kim EO, Seo MJ, Choi SW. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Eugenol and Its Derivatives from Clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2011. 40: 1361-1370.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} Method. *Methods*. 2001. 25: 402-408.
- Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Mitochondrial glutathione: Features, regulation and role in disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013. 1830: 3317-3328.
- Maxwell SRJ. Prospects for the Use of Antioxidant Therapies. *Drugs*. 1995. 49: 345-361.
- Na EJ, Jang HH, Kim GR. Review of Recent Studies and Research Analysis for Anti-oxidant and Anti-aging Materials. *Asian J Beauty Cosmetol*. 2016. 14: 481-491.
- Salla S, Sunkara R, Ogutu S, Walker LT, Verghese M. Antioxidant

- activity of papaya seed extracts against H₂O₂ induced oxidative stress in HepG2 cells. *LWT-Food Sci Technol.* 2016. 66: 293-297.
- Sanchez-Valle V, Chavez-Tapia N, Uribe M, Mendez-Sanchez N. Role of Oxidative Stress and Molecular Changes in Liver Fibrosis: A Review. *Curr Med Chem.* 2012. 19: 4850-4860.
- Suh HJ, Kim YS, Park SG, Park S. Antioxidant and antibacterial activities of hot water and enzyme extracts from plants containing tannin pigments. *Korean J Food Preserv.* 2019. 26: 667-672.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007. 39: 44-84.
- Yeo HS, Kim JW, Chung BS. Original Articles; Phytochemical Studies on the Constituents of *Filipendula glaberrima*. *Korean J Pharmacogn.* 1992. 23: 121-125.
- Youn Y, Ha YK, Hong SK, et al. Protective Effects of Mulberry (*Morus alba*) Sugar Extracts on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative stress in HepG2 Cell. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015. 22: 751-757.
- Zhang J, Wang X, Vikash V, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2016. 2016: 4350965.
- Zhang XH, Choi SK, Seo JS. Effect of Dietary Grape Pomace on Lipid Oxidation and Related Enzyme Activities in Rats Fed High Fat Diet. *J Nutr Health.* 2009. 42: 415-422.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2022.28.1.25>

Cite this article as: Hong M, Hwang D. Antioxidant Effect of *Filipendula glaberrima* Nakai Extract in HepG2 Cells. *Biomedical Science Letters.* 2022. 28: 25-33.