

꽃머느리밥풀 Ethyl acetate 분획물의 예쁜 꼬마선충에 대한 항산화 효과

김준형¹ · 박창범² · 박종현² · 권강무² · 황인현² · 마상용¹ · 오석흥¹ · 김대근^{2*}

¹우석대학교 식품생명영양학과, ²우석대학교 약학과

Antioxidant Activity of Ethyl acetate Fraction of *Melampyrum roseum* Maxim. in *Caenorhabditis elegans*

Jun Hyeong Kim¹, Chang Bum Park², Jong Hyun Park², Kang Mu Kwon², In Hyun Hwang², Sang Yong Ma¹, Suk-Heung Oh¹, and Dae Keun Kim^{2*}

¹Department of Food & Nutrition, Woosuk University, Wanju, Jeonbuk 55338, Korea

²Department of Pharmacy, Woosuk University, Wanju, Jeonbuk 55338, Korea

Abstract – *Caenorhabditis elegans* model system was used to investigate the antioxidant activity of methanol extract of *Melampyrum roseum* (Scrophulariaceae). The ethyl acetate soluble fraction of the *M. roseum* methanol extract showed the best DPPH radical scavenging activity. The ethyl acetate fraction was measured for the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase, and oxidative stress tolerance by using *C. elegans* along with reactive oxygen species (ROS) level. In addition, to confirm that the regulation of the stress response gene is responsible for the increased stress tolerance of *C. elegans* treated by the ethyl acetate fraction, SOD-3 expression was measured using a transgenic strain. As a result, the ethyl acetate fraction increased SOD and catalase activity, and decreased ROS accumulation in a dose-dependent manner. In addition, the ethyl acetate fraction-treated CF1553 worm showed higher SOD-3::GFP intensity than the control worm.

Keywords – *Melampyrum roseum*, *Caenorhabditis elegans*, Antioxidant activity, Catalase, SOD

여러 가지 생리적 역할을 수행하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 일반적으로 산소 대사의 부산물로 생성된다. 세포사멸의 필수적인 역할을 하는 것으로 알려진 ROS에 대한 연구는 오랫동안 수행되어 왔으며, ROS의 신호를 전달하는 분자로서의 역할과 면역학적 방어 체계에 도움을 주는 긍정적인 연구결과가 있는 반면 조직과 장기손상을 일으키는 부정적인 영향도 다수 보고되고 있다.^{1,2)} 산화적 스트레스는 세포와 조직에서 ROS의 생성과 축적 사이의 불균형과 이러한 반응 생성물을 대사하는 과정에서 발생하는 현상이므로, ROS와 항산화제 사이의 미세한 균형은 세포의 정상적인 기능을 위해 필수적이며, 과도한 수준의 ROS는 DNA, 지질, 단백질과 같은 세포 고분자에 손상을 주어 결국 괴사 및 세포 사멸을 초래하게 된다.^{3,4)} 생체는 유해한 ROS를 제거하기 위해 catalase, superoxide dismutase,

glutathione 및 glutathione S-transferase와 같은 항산화 시스템을 작동하여 산화와 항산화 균형을 유지하고 있다.⁵⁾ 지금까지 vitamin E, 플라보노이드, 폴리페놀과 같은 산화적 스트레스에 대처하기 위해 여러 항산화제가 꾸준히 연구되고 개발되어 실제 임상에 사용되고 있으나, 유해한 활성산소의 충분한 제거를 위한 안전한 천연 항산화제의 개발이 지속적으로 필요하다.³⁾

꽃머느리밥풀(*Melampyrum roseum* Maxim.)은 현삼과(Scrophulariaceae)의 1년생 초본식물로 국내에 자생하고 있으며, 중국에서 전초를 산화화(山羅花)라 부르며 청열해독 작용을 이용하여 용종창독에 사용하였다.⁶⁾ 꽃머느리밥풀에 대한 식물화학적 성분연구로는 iridoid 배당체로 mussaenoside가 보고되어 있으며,⁷⁾ 변종인 털머느리밥풀(*M. roseum* var. *hirsutum*)에서 몇 가지 flavonoid 성분이 보고되어 있고 기타 *Melampyrum*속 식물에서 다수의 iridoid glycoside 물질이 알려져 있다.⁶⁾ 이와 같이 꽃머느리밥풀에 대한 식물화학적 성분에 대한 연구는 많지 않았으며 약리학적 연구는 거의 이

*교신저자(E-mail): dkkim@woosuk.ac.kr

(Tel): +82-63-290-1574

루어지지 않은 것으로 확인되었다.

본 연구는 꽃머느리밥풀의 methanol 추출물을 용매로 계통분획하여 각 분획물에 대해 vitamin C를 대조군으로 DPPH free radical과 superoxide 소거능 실험을 하여 가장 강한 소거능을 보인 ethyl acetate 분획물을 확보한 후 이 분획에 대하여 수명연장 실험모델로 잘 알려진 예쁜꼬마선충 (*Caenorhabditis elegans*)을 이용하여 산화적 스트레스에 대한 저항 효능을 확인하였으며, 형질전환 mutant를 이용하여 산화적 스트레스에 저항할 수 있는 단백질의 발현 여부 실험을 통하여 몇가지 지견을 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 꽃머느리밥풀은 2017년 9월에 정읍군에서 채집 후 김대근 교수(우석대)가 검증한 후에 전초를 음건세절하여 사용하였으며, 표준품은 우석대학교 약학대학 생약표본실에 보관하고 있다(WS-17-008).

추출 및 분획 - 꽃머느리밥풀을 음건세절 후 얻은 시료 300 g을 methanol로 진탕하면서 5시간씩 50°C에서 2회 온침 추출하였다. 그 추출액을 수욕상에서 감압농축하여 methanol 엑스 약 75 g을 얻었으며, 이 methanol 엑스에 증류수로 현탁시키고 상법에 따라 동량의 *n*-hexane(7.1 g), methylene chloride(1.9 g), ethyl acetate(2.9 g) 및 *n*-butanol(13.6 g)의 순으로 용매 분획하여 각각의 분획물을 얻었다.

DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성⁷⁾ - 96 well plate에 시료를 ethanol로 각 농도별로 조제한 용액에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)(ethanol)을 일정량씩 가하였다. 10초간 진탕한 후 25°C에서 30분간 방치한 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조약물은 L-ascorbic acid를 사용하였다. 항산화효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도와 비교하여 그래프로 나타내었다. 각 시료에 대한 DPPH radical 소거작용을 3회 반복하여 측정하였다.

Riboflavin 유래 superoxide 억제활성⁸⁾ - 시료의 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 농도의 시료로 이루어졌다. 혼합물은 light box에 넣은 후 5분마다 자리를 임의로 바꾸어 주면서 15분 동안 방치하였다. Light box안의 온도는 20±1°C, 빛의 밝기는 5,500 lux를 유지하였다. NBT는 빛 아래에서 blue formazane으로 환원되어지는데, 이 생성물을 560 nm에서 측정하였다. Blue formazane 형성억제가 superoxide 억제능력이 된다.

예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)의 배양⁹⁾ - *C. elegans*는 *E. coli* OP50를 도말한 Nematode Growth Medium

(NGM) agar plate에 20°C에서 배양 되었다. 꽃머느리밥풀 분획물을 DMSO를 용매로 한 stock solution 상태로 멸균된 NGM plates(at 50°C)에 첨가되었다. 최종 DMSO 농도는 모든 상태에서 0.1%(v/v)를 유지하였다.

선충 체내의 항산화 효소(SOD, catalase) 활성 측정^{10,11)} - 시료를 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 Ibrahim등의 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 활성은 Aebi의 방법을 응용하여 25 mM H₂O₂에 농도별 시료 50 μL를 3분 동안 반응시키고 240 nm에서 흡광도를 측정하였다.

선충 세포 내 활성산소종(ROS) 분석¹²⁾ - 선충 세포 내 활성 산소종은 2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate (H₂DCF-DA)를 사용하여 측정하였다. 성장 단계가 동일한 선충을 시료를 농도별로 제조한 plate에서 배양하였다. 성체가 된 후 4일째 50 μM juglone을 함유한 M9 buffer에 넣고 2시간 노출시킨 뒤 96 well plate에 담긴 50 μL M9 buffer에 5마리씩 옮겼다. 마지막으로 25 μM H₂DCF-DA 50 μL를 첨가한 뒤 여기 485 nm, 방출 535 nm에서 흡광도를 각각 측정하였다.

산화적 스트레스 저항성 측정¹³⁾ - 성장 단계가 동일한 선충을 각각의 농도별 plate에서 배양하였다(EDZ 250, 500 μg/mL). Oxidative stress에 의한 내성은 기존 방법을 약간 변형하여 평가하였으며, 성체가 된 후 7일째에 일시적으로 선충을 1 mM juglone이 함유된 M9 buffer가 담긴 96 well plate의 well에 옮기고 시간 별로 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, Japan)으로 관찰하였다. 발현강도를 정량, 분석하기 위해 현미경을 이용한 사진 촬영과 ImageJ 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 radical 소거능 - DPPH radical 소거능 분석은 실험에서 사용된 시료의 DPPH radical 소거 활성을 평가하기 위해 수행되었다. 꽃머느리밥풀 분획물 중에서, DPPH radical 소거 효과는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 분획물들 중 ethyl acetate층(IC₅₀ value, 109.6 μg)이 효과가 가장 좋았으며, 대조군인 비타민 C(IC₅₀ value, 18.3 μg)보다 더 좋은 소거 효과를 보여주었다.

Superoxide 억제활성 - Superoxide 억제능은 methionine, riboflavin, NBT로 구성된 평가시스템을 이용하여 광화학작용을 측정하는 것으로 사용된 시료의 superoxide 억제 활성 평가하기 위해 수행되었다. 꽃머느리밥풀 분획물 중에서, superoxide 억제 효과는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 그 중 ethyl acetate 분획(IC₅₀ value, 24.3 μg)이, 비타민 C(IC₅₀ value, 9.0 μg)에 비해 더 좋은 superoxide 억제 효과를 나타내었다.

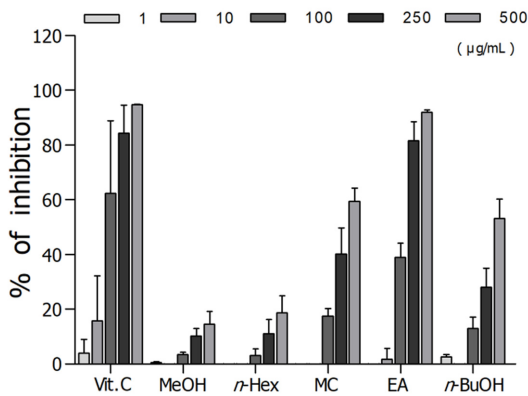


Fig. 1. DPPH radical scavenging effects of the methanol extract, and its fractions from *Melampyrum roseum*.

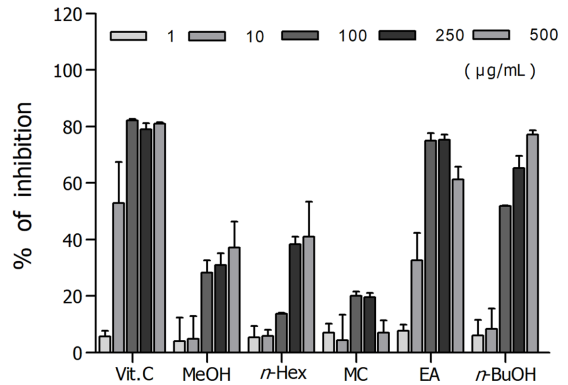


Fig. 2. Riboflavin-originated superoxide quenching activities of methanol extract, and its fraction from *Melampyrum roseum*.

용을 측정하는 것으로 사용된 시료의 superoxide 억제 활성 평가하기 위해 수행되었다. 꽃머느리밥풀 분획물 중에서, superoxide 억제 효과는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 그 중 ethyl acetate 분획(IC₅₀ value, 24.3 μg)이, 비타민 C(IC₅₀ value, 9.0 μg)에 비해 더 좋은 superoxide 억제 효과를 나타내었다.

항산화 효소(SOD, Catalase) 활성 증가 효능 - Xanthine을 기질로 xanthine oxidase의 효소반응 과정 중에 생성되는 superoxide anion을 활용하여 SOD의 활성을 측정한 결과 Fig. 3A에서 나타난 바와 같이 예쁜꼬마선충의 꽃머느리밥풀 ethyl acetate분획물 투여군은 SOD의 활성을 농도 의존적으로 증가시켰으며, ethyl acetate 분획 500 $\mu\text{g/mL}$ 투여군은 대조군과 비교 하여 SOD 활성을 약 26.7% 정도 증가시

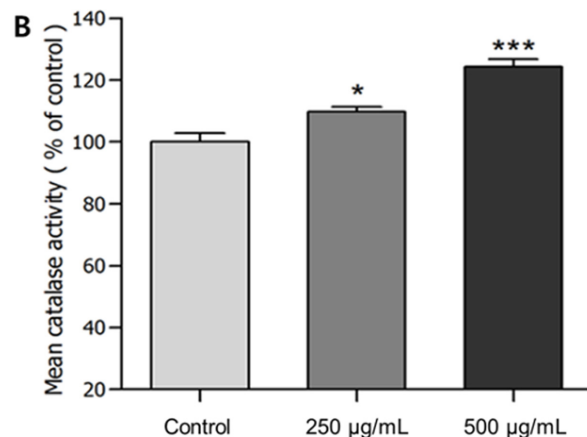
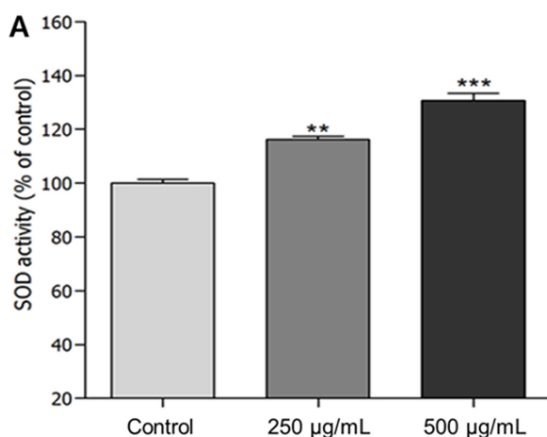


Fig. 3. Effects of ethyl acetate fraction of *Melampyrum roseum* on the antioxidant enzyme activity of wild-type N2 nematode. (A) The enzymatic reaction of xanthine with xanthine oxidase was used to generate $\bullet\text{O}_2^-$ and the SOD activity was estimated spectrophotometrically through formazan formation by NBT reduction. The SOD activity was shown 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 \pm S.E.M. of three independent experiments. Differences compared to the control were considered significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA.

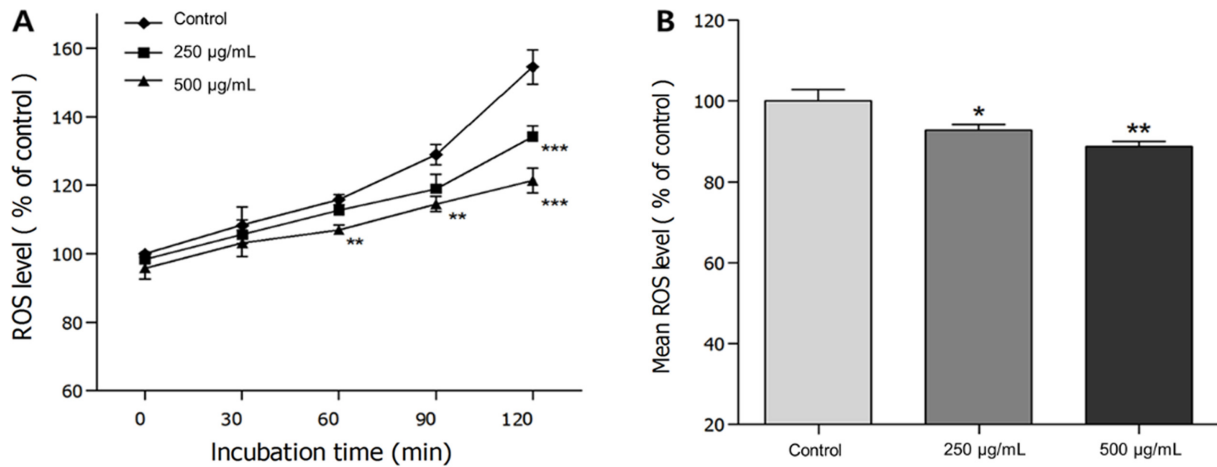


Fig. 4. Effects of ethyl acetate fraction of the *Melampyrum roseum* on the intracellular ROS levels of wild-type N2 nematodes. Intracellular ROS accumulation was examined in a microplate fluorescence reader at 535 nm (emission) and 485 nm (excitation). (A) Plates were read for 120 min. (B) The average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

켰다($***p<0.001$). 강력한 반응성을 가진 활성산소종인 hydrogen peroxide를 체내에서 대사시키는 catalase의 활성은 Fig. 3B에서 나타난 바와 같이 ethyl acetate 분획 500 µg/mL 투여군이 대조군에 비해 catalase 활성을 약 22.6% 정도 증가시켰다($***p<0.001$)(Fig. 3).

활성 산소종(ROS) 감소 효능 - 꽃머느리밥풀 ethyl acetate 분획의 농도별 세포 내 활성 산소종의 감소 효능을 알아보기 위해 H₂DCF-DA와 선충 내부의 활성 산소종을 반응시켜 형광을 관찰하였다. 활성산소종 형광의 감소 폭은 대조군과 비교 하여 꽃머느리밥풀 ethyl acetate 분획 500 µg/mL 투여군에서 평균 약 16.2% ($**p<0.01$) 활성산소종을 감소시키는 것으로 확인되었다(Fig. 4).

산화적 스트레스 저항성 증가 효능 - 꽃머느리밥풀의 ethyl acetate 분획을 juglone으로 산화적 스트레스를 유도한 선충의 생존율에 미치는 영향 평가실험에서 분획을 처리하지 않은 대조군 선충의 최고 생존시간은 20시간이었으나, ethyl acetate 분획 500 µg/mL 농도에서는 생존시간을 28시간으로 증가시켰다. 대조군의 평균 생존시간이 9.9±1.1시간이었으나 500 µg/mL 농도 처리군은 평균 생존 시간을 15.1±1.4시간으로 52.9%

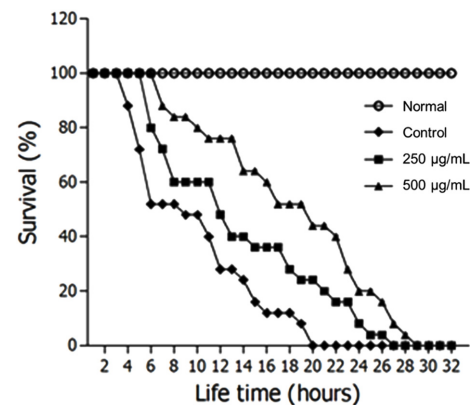


Fig. 5. Effects of ethyl acetate fractions of *Melampyrum roseum* on the stress tolerance of wild-type N2 nematodes. For the oxidative stress assays, worms were transferred to 96-well plate containing 1 mM of juglone liquid culture, and then their viability was scored. Statistical difference between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

의 생존 시간을 향상시켰다($***p<0.001$)(Fig. 5, Table I).
형질 전환 선충 내 SOD-3의 발현 증가 효능 - 선충 내

Table I. Effects of ethyl acetate fraction of *Melampyrum roseum* 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	9.9 ± 1.1	20	-	-
	250 µg/mL	12.7 ± 1.4	26	28.2	$**p<0.01$
	500 µg/mL	15.1 ± 1.4	28	52.9	$***p<0.001$

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 $***p<0.001$.

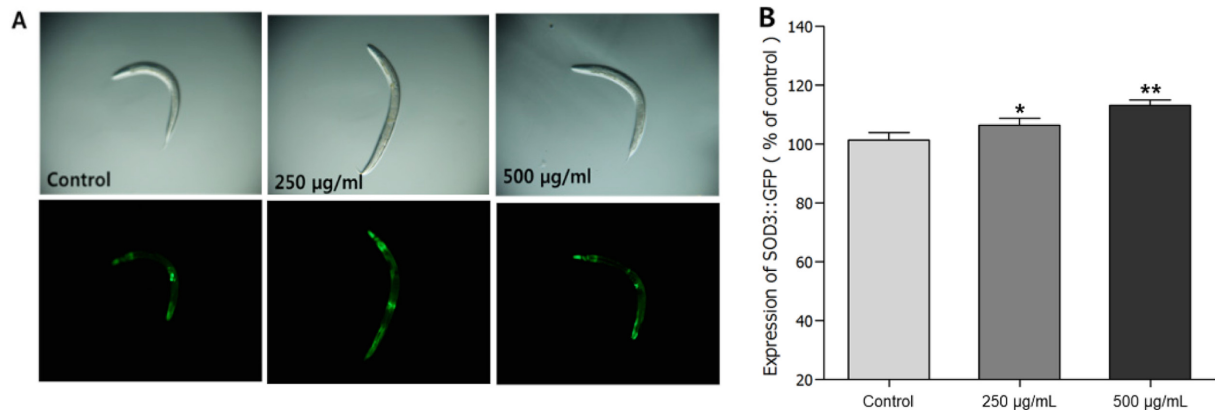


Fig. 6. Effect of ethyl acetate fraction of *Melampyrum roseum* on the expression of SOD-3 was determined using transgenic nematodes. (A) Images of SOD-3::GFP expression of CF1553 worm in the presence or absence of ethyl acetate fraction. (B) The mean GFP intensity of mutant was represented as mean \pm S.E.M. of values from 19 to 25 animals per each experiment. The GFP intensity was quantified using Image software by determining average pixel intensity. Data are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent experiments.

에서 oxidative stress에 저항하기 위한 단백질의 증가 여부를 확인하기 위해서 SOD발현 유전자의 증가 여부를 확인 하였다. SOD-3을 포함한 형질 전환 선충 CF1553을 사용하여 실험한 결과 CF1553 형질전환 선충에 꽃머느리밥풀 ethyl acetate 분획의 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리군이 처리되지 않은 선충에 비해 10% 증가된 SOD-3::GFP 발현율을 보여 주었다(Fig. 6A, 6B).

고 찰

본 연구에서는 잘 정립된 유전 경로를 기초로 다양한 mutant를 개발하여 항산화 활성을 비롯하여 여러가지 질병에 대한 실험 모델로 이용되는 예쁜꼬마선충을 사용하여 꽃머느리밥풀의 ethyl acetate 분획물에 대한 항산화 효과에 대한 실험을 하였다.^{15,16} 꽃머느리밥풀의 methanol 추출물의 분획물의 DPPH radical과, superoxide 소거활성시험에서, ethyl acetate 분획은 가장 강한 소거활성을 보여 주었다. Ethyl acetate 분획은 선충 내의 항산화 효소인 SOD 및 catalase의 활성을 높이는 것으로 확인되었으며, juglone으로 처리하여 산화적 스트레스를 가한 후 선충 세포 내 활성 산소종의 수치를 확인한 결과 상당한 ROS의 축적억제 효능을 나타내었다. Juglone을 처리한 후 ethyl acetate 분획 처리가 선충의 stress 저항능력에 미치는 영향을 확인한 결과 oxidative stress 조건하에서 대조군과 비교하여 생존율이 농도 의존적으로 상당히 증가하는 것이 확인되었다. 이와 관련하여, mutant(GFP-fused transgenic strain CL2070)를 이용하여 oxidative stress 저항성 단백질 발현 여부를 확인하는 실험에서 형광 발현율이 상당히 증가함이 확인되어 oxidative stress에 저항할 수 있는 단백질의 발현이 증가되

었음을 확인하였다.

Superoxide, singlet oxygen이나 peroxide 등의 ROS는 세포의 호흡 중에 필연적으로 생성되어 생체 내의 항산화 체계의 결핍으로 인한 방어할 수 있는 양 이상의 ROS가 생성되면 세포나 조직의 산화적 손상을 일으켜 노화나 암 등을 비롯하여 다양한 병리학적 현상을 초래하게 한다.^{17,18} 꽃머느리밥풀의 ethyl acetate 분획은 선충 체내의 SOD나 catalase 등의 항산화 효소의 활성을 증가시키며, ROS의 축적을 억제하고 스트레스에 대한 저항력을 높여 주므로 선충의 수명연장이나 노화 지연에 영향을 미칠 수 있을 것으로 추측된다.^{19,20} 이러한 결과는 *Melampyrum*속에서 보고된 apigenin, linarin, wogonin 등의 flavonoid 성분과 같은 phenol성 물질들이 이러한 선충의 항산화 활성 및 스트레스 저항능력에 부분적으로 영향을 줄 수 있을 것으로 생각되며,⁶ 앞으로 꽃머느리밥풀의 항산화 활성물질에 대한 물질의 분리와 구조확인 및 단일 물질 수준에서의 예쁜꼬마선충 내의 항산화 활성 연구 및 그 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

꽃머느리밥풀 ethyl acetate 분획은 DPPH free radical과, superoxide 소거실험에서 강한 항산화력을 보여주었으며, 예쁜꼬마선충을 이용한 항산화 실험에서는 SOD 및 catalase의 활성을 농도 의존적으로 높이는 것을 확인하였다. 선충 세포 내의 ROS의 발생을 농도 의존적으로 감소시켰으며, juglone 투여로 인한 oxidative stress 조건하에서는 선충의 생존율을 농도 의존적으로 증가시켰다. 이와 관련하여 mutant인 GFP-fused transgenic strain CL2070을 이용한 oxidative

stress 저항성 단백질 발현 증가를 확인하는 실험에서는 oxidative stress에 저항성이 있는 형광을 띤 단백질의 발현이 농도의존적으로 증가되었음을 확인하였다. 이러한 결과는 꽃머느리밥풀의 ethyl acetate 분획은 항산화 및 이와 관련된 질병의 예방 및 치료를 위한 천연자원으로서의 가치가 충분히 있음을 보여 주는 것으로 생각된다.

인용문헌

- Yang, S. and Lian, G. (2020) ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Mol. Cell Biochem.* **467**: 1-12.
- Villalpando-Rodriguez, G. E. and Gibson, S. B. (2021) Reactive oxygen species (ROS) regulates different types of cell death by acting as a rheostat. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2021**: 9912436.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D. and Bitto, A. (2017) Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**: 8416763.
- Senoner, T. and Dichtl, W. (2019) Oxidative stress in cardiovascular diseases: Still a therapeutic target? *Nutrients* **11**: 2090.
- Istomina, A., Yelovskaya, O., Chelomin, V., Karpenko A. and Zvyagintsev, A. (2021) Antioxidant activity of far Eastern bivalves in their natural habitat. *Mar. Environ. Res.* **169**: 105383.
- Roh, J. H., Moon, H. I. and Zee, O. P. (2000) Phytochemical constituents from *Melampyrum roseum* var. *hirsutum* Beauv. *Kor. J. Pharmacogn.* **31**: 157-162.
- Chung, B. S. and Kim, Y. H. (1982) Iridoid glycoside (IV); Studies on the iridoid glucoside *Melampyrum roseum* Max. *Kor. J. Pharmacogon.* **13**: 106-110.
- 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.
- Ginnopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase. I. occurrence in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **59**: 309-314.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
- 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.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**: 121-126.
- 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.
- 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.
- Chen, C., Zhou, M., Ge, Y. and Wang, X. (2020) SIRT1 and aging related signaling pathways. *Mech. Ageing Dev.* **187**: 111215.
- Zia, A., Farkhondeh, T., Pourbagher-Shahri, A. M. and Samarghandian, S. (2021) The role of curcumin in aging and senescence: Molecular mechanisms. *Biomed. Pharmacother.* **134**: 111119.
- Sreedhar, A., Aguilera-Aguirre, L. and Singh, K. K. (2020) Mitochondria in skin health, aging, and disease. *Cell Death Dis.* **11**: 444.
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A. and Hekimi, S. (2018) Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* **217**: 1915-1928.
- Liu, F., Luo, Q., Zhang, Y., Huang, K., Cao, X., Cui, C., Lin, K. and Zhang, M. (2020) Trans-generational effect of neurotoxicity and related stress response in *Caenorhabditis elegans* exposed to tetrabromobisphenol A. *Sci. Total Environ.* **703**: 134920.
- Wang, J., Deng, N., Wang, H., Li, T., Chen, L., Zheng, B. and Liu, R. H. (2020) Effects of orange extracts on longevity, healthspan, and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules* **25**: 351.

(2022. 5. 31 접수; 2022. 6. 14 심사;
2022. 6. 17 게재확정)