

FOOD & CHEMISTRY

Protective effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* against oxidative stress in C6 glial cells

Ah Young Lee¹, Min Jeong Kim¹, Sanghyun Lee², Jae Suk Shim³, Eun Ju Cho^{1*}

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

²Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

³Imsil Herbal Medicine Association, Imsil 55955, Korea

*Corresponding author: ejcho@pusan.ac.kr

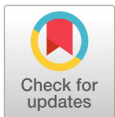
Abstract

This study was investigated the anti-oxidant property and neuro-protective effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* (CJM) against oxidative stress in hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced C6 glial cells. We measured the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, hydroxyl radical (\cdot OH), and superoxide (O₂⁻) radical scavenging activities of an ethanol extract and four fractions [*n*-Butanol, ethyl acetate (EtOAc), CHCl₃, and *n*-Hexane] from CJM. The results of this study show that the extract and all fractions from CJM had a dose-dependent DPPH radical scavenging activity. In particular, the EtOAc fraction exhibited the strongest scavenging effect with 88.23% at a concentration of 500 μ g/mL. In addition, the EtOAc fraction from CJM also effectively scavenged \cdot OH radicals and O₂⁻ radicals, compared to other extract and fractions. In C6 glial cells, H₂O₂ markedly decreased the cell viability as well as increased lactate dehydrogenase (LDH) release and reactive oxygen species (ROS) production. However, the EtOAc fraction of CJM attenuated the cellular damage from the oxidative stress by elevating the cell viability and inhibiting the LDH release and ROS over-production compared with the H₂O₂-treated control group. Our findings indicate that the EtOAc fraction from CJM has anti-oxidant effect and neuro-protective effect against oxidative stress, suggesting that it can be used as a natural antioxidant and therapeutic agent for the prevention of neurodegenerative disorders.

Keywords: antioxidant, *Cirsium japonicum* var. *maackii*, C6 glial cells, neurodegenerative disorder, oxidative stress

Introduction

인체 내 호기성 대사과정에서 생성되는 superoxide anion (O₂⁻), hydroxyl radical (\cdot OH), hydrogen peroxide (H₂O₂)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 정상세포 내에서 항산화 시스템과 균형을 이루면서 존재하지만 음주, 흡연과 같은 생활습관 또는 스트레스로 인해 과잉으로 생성되거나 축적이 되면 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하여 DNA, 지질, 단백질의 산화를 일으켜 세포 및 조직의 구조나 기능의 손상을 초래한다. 또한, 체내 세포의 사멸을 유도하여 심혈관 질환, 암, 당뇨, 치매 등 다양한 질병을 일으킬 수 있으며(Behl, 1999; Kirkinetzos



OPEN ACCESS

Citation: 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. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20180031>

DOI: <https://doi.org/10.7744/kjoas.20180031>

Received: April 10, 2018

Revised: May 9, 2018

Accepted: May 11, 2018

Copyright: © 2018 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.

and Moraes, 2001; Touyz, 2004; Waris and Ahsan, 2006), 최근에는 이러한 산화적 스트레스가 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 뇌졸중과 같은 뇌 질환의 주요 원인이라는 연구 결과들이 보고되고 있다(Montine et al., 2002; Jenner, 2003; Nunomura et al., 2006). 뇌 조직은 대부분 불포화 지방산으로 구성되어 있고 다른 장기에 비하여 산소 소모량이 높은 반면, 항산화 효소가 상대적으로 적어 산화적 손상으로부터 취약한 구조를 가지고 있다(Omodeo-Sale et al., 1997). 산화적 스트레스로 인한 지질 과산화물의 축적은 신경세포와 신경교세포 기능의 이상을 초래하며, 세포 내 ROS의 증가는 세포의 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다(Fleury et al., 2002; Narayanan et al., 2005). 이러한 퇴행성 질환의 예방과 치료에 있어 화학적으로 합성된 항산화제의 처리, 세포 이식, 외과적 수술 등 다양한 방법이 제시되고 있지만, 여러 가지 독성과 부작용이 보고되면서 비교적 안전하고 부작용이 적으면서 산화적 손상을 억제할 수 있는 천연물 소재에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 뇌 조직의 경우 일단 손상이 되면 그 기능을 회복하기 매우 어렵기 때문에, 신경세포 및 신경교세포를 보호할 수 있는 생리 활성 성분을 이용한 기능성 식·의약품 개발이 다양하게 시도되고 있다.

영경귀는 국화과의 다년생 초본으로 한국, 중국, 일본을 비롯한 북반구 온대지역에서 자생하고 있으며, 한방에서는 영경귀의 지상부를 대계초, 뿌리 부분을 대계근이라하여 빈혈, 해독, 이뇨 작용을 치료하는 약재로 사용해온 것으로 알려져 있다. 국내에 자생하는 영경귀속 식물로는 영경귀(*C. japonicum*), 큰 영경귀(*C. pendulum*), 고려영경귀 (*C. setidens*) 등 총 13종, 6변종이 확인되었으며(Jang et al., 2014), 영경귀의 생리 활성과 관련된 연구로는 지질 대사 개선(Lim et al., 1997), 간 기능 개선(Wan et al., 2014), 면역 증진(Liu et al., 2006), 항암(Lee et al., 2003), 및 항우울 효과(Park et al., 2006) 등이 보고되었다. 영경귀의 대표적인 활성 성분은 chlorogenic acid, apigenin, pectolinarin, luteolin, kaempferol 및 myricetin 등 flavonoid 화합물이 많이 함유되어 있다고 알려져 있다. 그 중 Liu et al. (2013)의 연구에 따르면 영경귀로부터 분리한 luteolin은 당뇨로 유도된 인지능력 손상에 대한 보호 효과를 가지는 것으로 나타났으며, apigenin은 알츠하이머 질환 동물 모델에서 인지능력 개선 효과 및 알츠하이머 질환의 주요 병리학적 특징으로 나타나는 amyloid beta의 생성을 억제한다고 보고하였다(Kim and Kim, 2003; Ganzera et al., 2005; Zhao et al., 2013). 또한, 국내에서 대량 재배되고 있는 영경귀는 *Cirsium japonicum* var. *maackii* (CJM) 식물로 flavonoid 화합물인 cirsimaritin과 cirsimarin이 주요 화합물이라고 보고하였다(Lee et al., 2017). 선행 연구에 따르면 CJM으로부터 분리한 cirsimaritin과 cirsimarin은 항당뇨 효과를 나타내었으며, 특히 cirsimaritin은 산화적 스트레스와 밀접한 관련이 있는 염증 반응 개선 효과(Shin et al., 2017), 갱년기 증상 개선 효과(Park et al., 2018) 및 항암 효과가 있다고 보고하였으나(Park et al., 2017), CJM 추출물 및 분획물의 산화적 스트레스로부터 신경교세포 보호 효과에 대한 연구는 전무하다.

따라서 본 연구에서는 CJM의 추출물 및 분획물의 *in vitro* radical 소거 활성을 측정하였으며, C6 glial cell을 이용하여 H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스로부터 영경귀의 신경교세포 보호 효과를 알아보고자 하였다.

Materials and Methods

실험재료 추출 및 분획

영경귀(*C. japonicum* var. *maackii*; CJM) 봄 지상부는 임실생약(Imsil, Korea)에서 제공받아 실험재료로 사용하였다. 영경귀 봄 지상부 5.71 kg을 ethanol (EtOH)로 환류냉각장치를 이용하여 추출하였고, 추출물 667.2 g을 얻었다. 추출물은 유기용매를 이용하여 각각 분획하였고, 분획물로 *n*-Hexane (213.6 g), CHCl₃ (39 g), EtOAc (67.6 g), *n*-BuOH (47 g) 분획물을 얻어 실험재료로 사용하였다(Lee et al., 2017). 각각의 추출물과 분획물은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Co., St Louis, MO, USA)에 녹여 4°C에서 저장하면서 희석하여 사용하였으며 시료 처리 시 DMSO의 처리 농도는 배지 대비 0.1% 이하가 되도록 하였다.

시약 및 재료

In vitro 항산화 활성을 측정하기 위하여 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2-deoxy-ribose는 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA), EtOH은 Duksan Co. Ltd. (Ansan, Korea)의 제품을 사용하였다. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 Daejung Chemicals & Metals Co. Ltd. (Siheung, Korea)에서, EDTA disodium salt dehydrate와 phosphoric acid는 Samchun Pure Chemical Co. Ltd. (Pyeongtaek, Korea)에서, H_2O_2 는 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서, thiobarbituric acid (TBA)는 Acros Organics (New Jersey, USA)에서, trichloroacetic acid (TCA)는 Kanto Chemical Co. Inc. (Tokyo, Japan)에서, Phenezine methsulfate (PMS), NADH disodium salt, nitrotetrazolium blue chloride (NBT)는 Bio Basic Inc. (Toronto, Canada)에서 구입하여 사용하였다.

DPPH radical 소거능

각 농도별 (100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 EtOH에 녹인 시료 100 μL 와 60 μM DPPH용액 100 μL 를 혼합하여 96 well plate에 분주하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료를 첨가한 실험군을 비교하여 DPPH radical 소거능을 백분율(%)로 나타내었다(Hatano et al., 1989).

$\cdot\text{OH}$ radical 소거능

$\cdot\text{OH}$ radical 소거능의 측정은 fenton 반응을 따랐으며, 10 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -EDTA 200 μL 와 10 mM 2-deoxyribose solution 200 μL 혼합 용액에 각 농도별 시료 용액 1400 μL 를 혼합한 후, 10 mM H_2O_2 를 첨가하여 4시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양된 혼합액에 2.8% TCA와 1.0% TBA 용액을 각각 1 mL씩 첨가하고 20분간 끓인 뒤 식혀 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료를 첨가한 실험군을 비교하여 $\cdot\text{OH}$ radical 소거능을 백분율(%)로 나타내었다(Chung et al., 1997).

O_2^- radical 소거능

증류수에 녹인 농도 별 시료 500 μL 와 0.1 M Tris-HCl (7.4 pH) 100 μL , 100 μM PMS 200 μL , 500 μM NBT 200 μL , 500 μM NADH 400 μL 를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료를 첨가한 실험군을 비교하여 O_2^- radical 소거능을 백분율(%)로 나타내었다(Nishikimi et al., 1972).

세포 배양

C6 glial cell은 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 배양을 위한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS), trypsin EDTA 용액은 WelGENE (Gunsan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Cell은 100 units/mL의 penicillin-streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM을 각각 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 1 - 2일에 한번 배양액을 바꾸어 주면서 배양하여 세포분화가 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline으로 세포를 세척한 후 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액으로 부착된 세포를 분리한 뒤 원심분리 하여 세포를 모은 다음 세포와 배지를 잘 혼합하여 계대배양 하였다.

Cell viability

세포가 confluence상태가 되면 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 seeding하여 2 - 4시간 37°C에서 배양한 후 세포가 잘 부착되면, DMSO에 녹인 시료를 세포 배지로 농도 별 (100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 희석한 뒤 각 well에 처리한다. 4시간 후, 산화적 스트레스를 유발하기 위해 H_2O_2 (500 μM)를 24시간 처리한 뒤, MTT solution (5 mg/100 mL)을 각 well에 주입하여 37°C에서 4시간 동안 재배양하였고, 생성된 formazan 결정을 빛을 차단한 상태에서 DMSO에 녹여 540 nm

에서 흡광도를 측정하였다(Mosmann, 1983).

Lactate dehydrogenase (LDH) 측정

세포가 confluence상태가 되면 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 seeding하여 2-4시간 37°C에서 배양한 후 세포가 잘 부착되면, DMSO에 녹인 시료를 세포 배지로 농도 별 (100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$)로 희석하여 각 well에 처리한다. 4시간 뒤 H_2O_2 (500 μM)를 처리하여 산화적 스트레스 유발하였고, 24시간 후 LDH cytotoxicity detection kit (Takara Bio, Shiga, Japan)의 방법에 따라 배양 상층액 100 μL 과 reaction mix 100 μL 를 새로운 96 well plate에 옮겨 실온에서 30분 방치한 뒤 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(Racher et al., 1990).

Reactive oxygen species (ROS) 측정

세포가 confluence상태가 되면 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 seeding하여 2-4시간 37°C에서 배양한 후 세포가 잘 부착되면, DMSO에 녹인 시료를 세포 배지로 농도 별 (100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$)로 희석한 뒤 각 well에 처리하여 4시간 배양한 뒤 H_2O_2 (500 μM)를 처리하여 산화적 스트레스 유발하였다. 24시간 후 80 μM 의 DCF-DA 용액을 각 well에 주입하여 37°C에서 30분 동안 재배양한 후 fluorescence (Ex-480 nm, Em-535 nm)로 측정하였다(Cathcart et al., 1983).

통계분석

대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 각 실험 결과로부터 ANOVA (analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple test를 이용하여 각 군의 평균 간의 유의성을 검정하였다.

Results and Discussion

ROS의 과생성에 따른 산화적 스트레스는 세포나 조직에 손상을 유도함으로써 사멸을 일으키고 각종 질병을 유발하며, 뇌 조직에서의 산화적 손상은 알츠하이머 질환과 같은 신경퇴행성 뇌 질환을 초래하여 학습·기억력의 감퇴를 일으킬 수 있다고 알려져 있다(Bamham et al., 2004). 특히 뇌는 불포화 지방산을 많이 함유하고 있고, Fe^{2+} , Cu^{2+} 등의 금속 이온이 풍부할 뿐만 아니라, 순환하는 산소가 집중되어있어 산화적 손상에 취약하다. 뇌 세포가 일단 손상을 받으면 기능 회복이 어렵기 때문에 산화적 스트레스로 유도된 뇌 조직 및 뇌 세포의 손상으로부터 보호할 수 있는 천연 항산화제에 대한 관심이 증가하고 있다. 이전 연구에 따르면 엉겅퀴의 봄 지상부는 가장 많은 양의 flavonoid 함량(Cirsimaritin, Cirsimarin)을 함유하고 있었으며, 가을 지상부와 비교하였을 때 더 효과적인 aldose reductase 억제 활성을 나타낸다고 보고하였다(Lee et al., 2017; Rodriguez et al., 2017). 따라서 본 연구에서는 엉겅퀴 봄 지상부로부터 얻은 추출물과 분획물의 항산화 효능을 탐색하고, 산화적 스트레스로부터 신경교세포 보호 효과를 검토하여 천연 항산화제로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

DPPH radical 소거능은 항산화 효과를 측정하기 위한 대표적인 방법으로, 자색을 띠는 DPPH radical이 수소 이온을 받아 안정한 분자를 형성하며 노란색으로 탈색되는 정도를 지표로 하여 항산화 효과를 측정하는 방법이다(Choi et al., 2003; Hong et al., 2010). CJM 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 효과를 측정한 결과(Table 1), 모든 추출물 및 분획물에서 농도의존적으로 소거능이 증가됨을 확인할 수 있었다. 특히 EtOAc 분획물 250 $\mu\text{g/mL}$ 와 *n*-BuOH 분획물 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 80% 이상의 소거능을 보였으며, EtOAc 분획물의 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 88.23%로 가장 높은 소거 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

ROS 중 반응성이 매우 큰 $\cdot\text{OH}$ radical은 체내 고분자의 산화에 크게 기여하며, 특히 DNA의 purine과 pyrimidine 염기를 공격하여 변형시키는 것으로 알려져 생체분자에 심각한 손상을 초래할 수 있다(Rice-Evans et al., 1996). CJM 추출

물 및 분획물의 ·OH radical 소거 효과를 확인한 결과(Table 2), *n*-BuOH 분획물을 제외한 추출물 및 분획물이 100 µg/mL 농도에서 80% 이상의 우수한 ·OH radical 소거 효과를 나타내었으며, 그 중에서 EtOAc 분획물 500 µg/mL의 농도에서 87.21%의 가장 높은 ·OH radical 소거 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

O₂⁻ radical은 주로 호기성 대사과정 중 미토콘드리아의 전자전달계에서 생성된다. O₂⁻ radical 자체의 반응성은 비교적 낮으나 ·OH, ONOO 등과 같이 반응성이 큰 free radical로 전환되어 세포 및 조직의 손상을 유발한다(Kamat, 2006; Lipinski, 2011). Table 3에는 CJM 추출물 및 분획물의 O₂⁻ radical 소거 효과를 측정 한 결과를 나타내었다. CJM의 *n*-BuOH, EtOAc, 및 CHCl₃ 분획물에서 농도 의존적으로 소거능이 증가하였으며, 그 중 EtOAc 분획물은 500 µg/mL의 농도에서 79.52% 값을 나타내어 가장 우수한 항산화 효과를 보였다. CJM 추출물과 분획물은 농도가 높아질수록 radical 소거능이 증가하였으나, *n*-hexane 분획물은 O₂⁻ radical 소거 효과를 나타내지 않았다. 이전 연구에 따르면, 엉겅퀴 뿌리의 MeOH 추출물은 ·OH radical 소거 효과 및 금속 chelating 효과가 있다고 보고하였으며(Yin et al., 2008), 잎의 EtOH 추출물은 ascorbic acid와 비슷한 정도의 DPPH radical 소거 효과를 가진다고 밝혀져(Lee et al., 2008), 본 연구와 종합하여 보았을 때 엉겅퀴는 탁월한 항산화 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

뇌는 10%의 신경세포와 90%의 신경교세포로 구성되어 있으며, 최근 연구에 따르면 신경교세포는 신경전달물질을 분비하고 신호전달에도 관여하며, 체내 macrophage와 유사한 작용을 한다고 알려져 있다(Block and Hong, 2005). 특히, 알츠하이머 질환의 발병과 신경교세포와의 연관성에 대한 많은 연구가 발표되면서 신경교세포의 작용이 신경독성을 매개하여 퇴행성질환을 예방하는 데에 중요한 역할을 할 것이라는 가능성이 부각되고 있다(Meda et al., 1995). 신경세포 및 신경교세포 사멸의 원인이 될 수 있는 ROS 중 H₂O₂는 세포의 운동이나 기능을 조절하는 신호전달 물질로 작용하기도 하지만 산화력이 매우 강하기 때문에 ·OH로 전환될 수 있으며, 인체 내에서 과도하게 축적되면 산화적 스트레스를 유발하게 된다(Sies, 2017). 따라서 H₂O₂는 산화적 스트레스가 유발된 환경에서 다양한 약리활성을 스크리닝하기 위해 *in vitro* 및 cellular system에서 많이 이용되고 있는 물질 중의 하나이다. Lee et al. (2017)의 연구에서는 CJM의 *n*-BuOH

Table 1. DPPH radical scavenging activity of CJM.

Treatment (µg/mL)	Scavenging activity (%)				
	EtOH Ext.	<i>n</i> -BuOH Fr.	EtOAc Fr.	CHCl ₃ Fr.	<i>n</i> -Hexane Fr.
100	29.95 ± 0.59c	59.21 ± 0.85c	65.04 ± 1.76b	31.80 ± 1.70c	14.15 ± 1.02c
250	49.77 ± 0.97b	74.78 ± 1.05b	86.31 ± 0.55a	49.40 ± 2.88b	21.65 ± 1.77b
500	66.10 ± 1.37a	87.35 ± 1.29a	88.23 ± 1.55a	68.38 ± 2.71a	37.55 ± 1.27a

Values are mean ± Standard deviation (n = 6).

DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; CJM, *Cirsium japonicum* var. *maackii*; Ext., extraction; Fr., Fraction.

a - c: Means with the different letters are significantly different among the concentrations of extract or fractions (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 2. OH radical scavenging activity of CJM.

Treatment (µg/mL)	Scavenging activity (%)				
	EtOH Ext.	<i>n</i> -BuOH Fr.	EtOAc Fr.	CHCl ₃ Fr.	<i>n</i> -Hexane Fr.
100	86.27 ± 0.25a	85.98 ± 0.09a	86.61 ± 0.13b	86.20 ± 0.16a	95.95 ± 0.17a
250	86.45 ± 0.30a	86.63 ± 0.10b	86.92 ± 0.15a	86.35 ± 0.09a	84.09 ± 0.30b
500	83.76 ± 0.07b	86.08 ± 0.19a	87.21 ± 0.26a	86.45 ± 0.33a	75.13 ± 0.33c

Values are mean ± Standard deviation (n = 6).

CJM, *Cirsium japonicum* var. *maackii*; Ext., extraction; Fr., Fraction.

a - c: Means with the different letters are significantly different among the concentrations of extract or fractions (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

와 EtOAc분획물이 가장 우수한 aldose reductase억제 활성 효과를 나타내었으며, 본 연구에서는 CJM EtOAc 분획물이 DPPH 및 O_2^- radical 을 가장 효과적으로 제거하였다. 알츠하이머 질환을 포함한 퇴행성 뇌 질환 환자의 경우 O_2^- radical 방어를 위한 항산화 효소인 superoxide dismutase 활성도가 낮은 것으로 보고됨에 따라(De Deyn et al., 1998), O_2^- radical 소거 효능이 가장 높았던 CJM EtOAc를 활성 획분으로 선정하여 H_2O_2 로 유도된 산화적 스트레스에 대한 C6 glial cell의 보호 효과를 알아보았다(Fig. 1). Mitochondrial dehydrogenase에 의해 보라색의 비수용성 formazan으로 환원시키는 MTT assay의 원리를 이용하여 세포 생존율을 확인한 결과, normal군 100% 대비 H_2O_2 를 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 control군은 55.90%로 세포 손상을 받은 것을 확인할 수 있었다. 그러나 CJM 추출물 100 μ g/mL의 농도에서 세포 생존율이 68.55%로 control군에 비해 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 특히 250과 500 μ g/mL의 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 나타내어 H_2O_2 로 유도된 신경 교세포 손상에 대한 보호 효과가 큰 것을 확인할 수 있었다. 또한, H_2O_2 로 손상된 세포막에 대한 CJM EtOAc 분획물의 보호 효과를 알아보기 위해 LDH assay를 수행한 결과, Fig. 2와 같이 control군 100% 대비 normal군은 60.94%를 나타내어 산화적 스트레스로 인해 신경교세포의 막이 손상되어 LDH의 방출량이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 CJM 추출물을 100, 250 과 500 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때 LDH 방출량이 각각 85.00%, 76.71%와 76.16%로 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과를 통해 영경귀는 산화적 스트레스로부터 신경교세포를 보호하는 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

DCF-DA는 세포막을 통과하여 세포 내에서 esterase에 의해 DCFH로 탈아세틸화가 된 뒤, 활성 산소종인 H_2O_2 에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 DCF로 변환된다(Cathcart et al., 1983). 이러한 원리를 이용하여 본 연구에서는 CJM

Table 3. OH radical scavenging activity of CJM.

Treatment (μ g/mL)	Scavenging activity (%)				
	EtOH Ext.	<i>n</i> -BuOH Fr.	EtOAc Fr.	$CHCl_3$ Fr.	<i>n</i> -Hexane Fr.
100	46.24 \pm 0.73a	48.43 \pm 0.08c	60.82 \pm 0.44c	30.89 \pm 0.20c	-
250	31.60 \pm 0.92b	67.86 \pm 0.52b	69.46 \pm 0.22b	45.01 \pm 0.31b	-
500	28.13 \pm 1.74c	75.70 \pm 0.45a	79.52 \pm 2.00a	47.43 \pm 1.25a	-

Values are mean \pm Standard deviation (n = 6).

CJM, *Cirsium japonicum* var. *maackii*; Ext., extraction; Fr., Fraction.

a - c: Means with the different letters are significantly different among the concentrations of extract or fractions (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

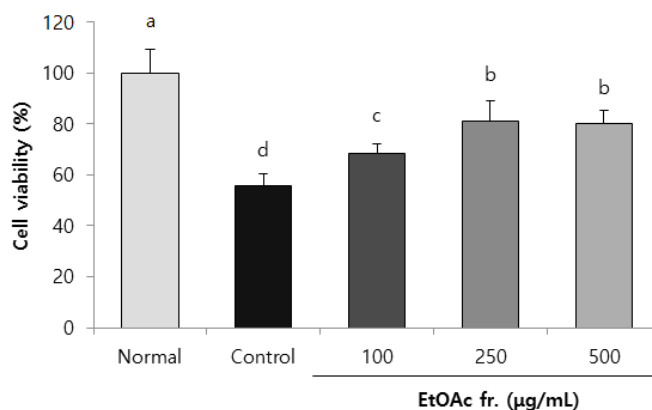


Fig. 1. Effect of EtOAc fraction (fr.) from *Cirsium japonicum* var. *maackii* (CJM) on cell viability in H_2O_2 -induced C6 glial cells. Values are mean \pm Standard deviation (n = 6). a - d: Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

추출물이 H_2O_2 로 유도된 ROS 생성 억제 효과를 나타내는지 DCF-DA assay를 통해 확인하였다. Fig. 3A와 같이 시간이 지남에 따라 모든 군에서 ROS 생성량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 H_2O_2 를 처리한 군은 normal군에 비해 ROS 생성량이 더 많이 증가한 것으로 보아 H_2O_2 처리로 인해 산화적 스트레스가 유도되었음을 알 수 있었다. 60분을 기준으로 ROS 생성량을 측정한 결과(Fig. 3B), control군 100% 대비 normal군에서는 76.80%로 ROS 생성량이 감소한 것을 확인할 수 있었으며, CJM EtOAc추출물을 100, 250과 500 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하였을 때 각각 96.28%, 95.93% 및 87.44%로 control군보다 통계적으로 낮은 ROS 생성량을 나타내었다. 특히, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 ROS의 과생성을 가장 효과적으로 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로 엉겅퀴의 산화적 스트레스로 유도된 신경세포 사멸과 세포막 손상 억제 효과는 ROS 소거 효과와 상관관계가 있으며, 이러한 활성은 엉겅퀴 속에 함유되어 있는 flavonoid성분들에 의해 항산화 활성을 나타낸 것으로 사료된다.

이전 연구에서 CJM의 CHCl_3 와 EtOAc 분획물로부터 hispidulin, cirsimaritin, apigenin 및 cirsimaritin을 분리하였고 (Rodriguez et al., 2018), hispidulin은 항산화 활성을 가지는 것으로 보고되었으며(Dabaghi-Barbosa et al., 2015), apigenin은 amyloid beta로 유도된 신경독성으로부터 보호 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Liu et al., 2011). 그 외에도 CJM의 EtOAc 분획물에서 luteolin-5-glucoside, apigenin-7-glucoside, luteolin, apigenin 및 lignan을 함유하고 있는 것을 확인하였으며(Jung et al., 2012, Jung et al., 2015), luteolin은 항산화 활성 및 H_2O_2 로 유도된 신경세포사멸에 대한 보호 효과가 있다고 보고하였다(Lin et al., 2015). 특히, luteolin-5-glucoside는 Nrf-2/HO-1 pathway를 활성화 시켜 ROS를 감소시킨다고 보고하여(Jung et al., 2017), 본 연구에서 나타난 엉겅퀴의 산화적 스트레스로부터 신경교세포 보호 효과 역시 엉겅퀴 속에 함유되어 있는 이러한 활성 물질들이 효과를 나타냈을 것으로 판단되며, 이에 대한 추가적인 메커니즘 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Conclusion

CJM의 추출물과 분획물 중에서 EtOAc 분획물이 DPPH, $\cdot\text{OH}$ 및 O_2^- radical 소거 효과가 가장 뛰어난 것을 확인할 수 있었으며, CJM의 EtOAc 분획물은 H_2O_2 로 산화적 스트레스가 유도된 C6 glial cell의 세포생존율을 증가시키고 LDH 방출량과 ROS의 과생성을 억제함으로써 신경교세포 손상에 대한 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 CJM의 항산화 활성과 신경교세포 보호 효과는 알츠하이머 질환과 같은 신경 퇴행성 질환의 예방 및 치료제로서의 활용 가능성이 있음을 제시할 수 있다.

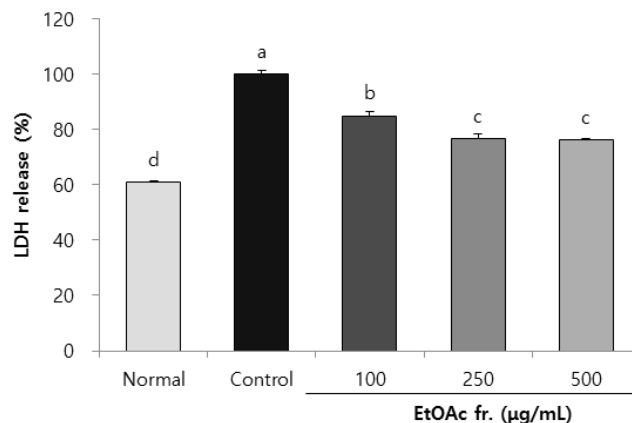


Fig. 2. Effect of EtOAc fraction (fr.) from *Cirsium japonicum* var. *maackii* (CJM) on lactate dehydrogenase (LDH) release in H_2O_2 -induced C6 glial cells. Values are mean \pm Standard deviation ($n = 6$). a - d: Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

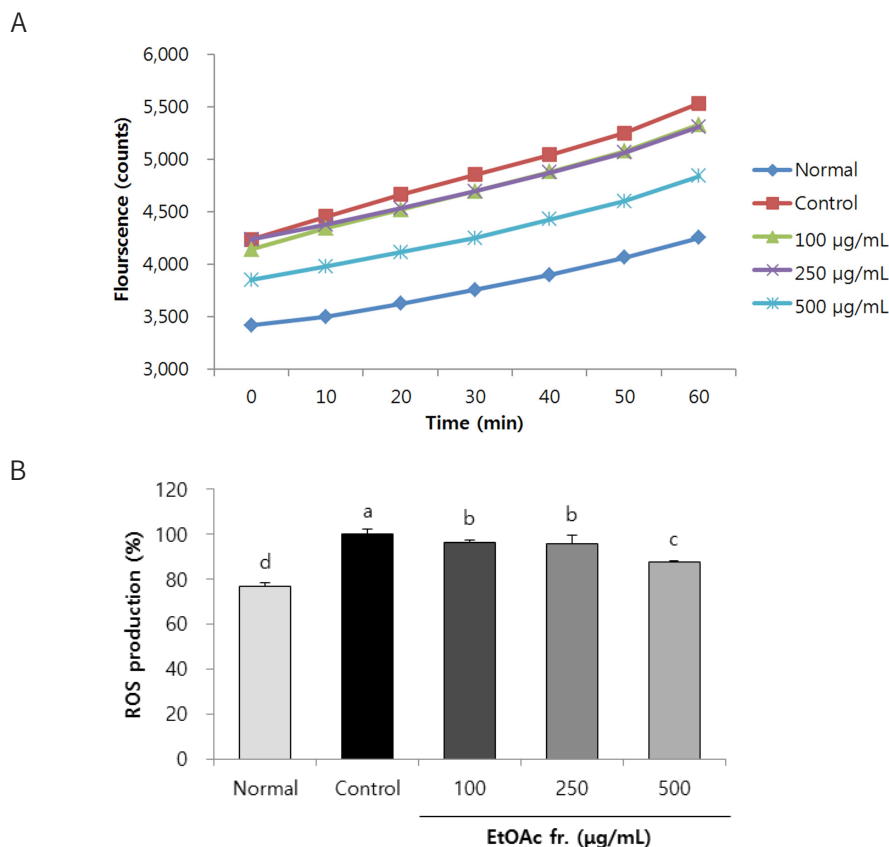


Fig. 3. Effect of EtOAc fraction (fr.) from *Cirsium japonicum* var. *maackii* (CJM) on reactive oxygen species (ROS) production in H_2O_2 -induced C6 glial cells. (A: Time course of change in intensity of ROS fluorescence with the EtOAc fraction from CJM; B: Production of ROS treated with the EtOAc fraction from CJM). Values are mean \pm Standard deviation ($n = 6$). a - d: Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Acknowledgements

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Bamham KJ, Masters CL, Bush AI. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drugs Discovery* 3:205-214.
- Behl C. 1999. Alzheimer's disease and oxidative stress: Implications for novel therapeutic approaches. *Progress in Neurobiology* 57:301-323.
- Block ML, Hong JS. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology* 76:77-98.
- Cathcart R, Schwiens E, Ames BN. 1983. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Analytical Biochemistry* 134:111-116.

- Choi CH, Song ES, Kim JS, Kang MH. 2003. Antioxidative activities of *Castanea crenata* Flos. methanol extracts. Korean Journal of Food Science and Technology 35:1216-1220. [in Korean]
- Chung SK, Osawa T, Kawakishi S. 1997. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassicainigra*). Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 61:118-123.
- Dabaghi-Barbosa P, Mariante Rocha A, Franco da Cruz Lima A, Heleno de Oliveira B, Benigna Martinelli de Oliveira M, Gunilla Skare Carnieri E, Cadena SM, Eliane Merlin Rocha M. 2015. Hispidulin: Antioxidant properties and effect on mitochondrial energy metabolism. Free Radical Research 39:1305-1315.
- De Deyn PP, Hiramatsu M, Borggree F, Goeman J, D'Hooge R, Saerens J, Mori A. 1998. Superoxide dismutase activity in cerebrospinal fluid of patients with dementia and some other neurological disorders. Alzheimer Disease and Associated Disorders 12:26-32.
- Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. Biochimie 84:131-141.
- Ganzer M, Pocher P, Stuppner H. 2005. Differentiation of *Cirsium japonicum* and *C. setosum* by TLC and HPLC-M. Phytochemical Analysis 16:205-209.
- Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda Y. 1989. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances, effects of tannins and related polyphenols on superoxide VI anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 37:2016-2021.
- Hong J, Wei MJ, Leem DG, Park KS, Yoon TH, No KM, Jeong JY. 2010. Evaluation of antioxidants activity through the chemical assay. Journal of Biomedical Research 11:1-8.
- Jang MR, Park HJ, Hong EY, Kim GH. 2014. Comparison of the anti-bacterial activity of domestic *Cirsium japonicum* collected from different regions. The Korean Journal of Food and Cookery Science 30:278-283. [in Korean]
- Jenner P. 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. Annals of Neurology 53:S26-S38.
- Jung HA, Jin SE, Min BS, Kim BW, Choi JS. 2012. Anti-inflammatory activity of Korean thistle *Cirsium Maackii* and its major flavonoid, luteolin 5-O-glucoside. Food and Chemical Toxicology 50:2171-2179.
- Jung HA, Park JJ, Min BS, Jung HJ, Islam MN, Choi JS. 2015. Inhibition of advanced glycation endproducts formation by Korean thistle, *Cirsium maackii*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 8:1-5.
- Jung HA, Roy A, Abdul QA, Kim HR, park HJ, Choi JS. 2017. Luteolin 5-O-glucoside from Korean milk thistle, *Cirsium maackii*, exhibits anti-inflammatory activity via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. Natural Product Science 23:183-191.
- Kamat JP. 2006. Peroxynitrite: A potent oxidizing and nitrating agent. Indian Journal of Experimental Biology 44:436-447.
- Kim SJ, Kim GH. 2003. Identification for flavones in different parts of *Cirsium japonicum*. Journal of Food Science and Nutrition 8:330-335.
- Kirkinezos IG, Moraes CT. 2001. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. Seminars in Cell and Developmental Biology 12:449-457.
- Lee HK, Kim JS, Kim NY, Kim MJ, Park SU, Yu CY. 2003. Antioxidant, antimutagenicity and anticancer activities of extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* KITA-MURA. Korean Journal of

- Medicinal Crop Science 11:53-61. [in Korean]
- Lee J, Rodriguez JP, Lee KH, Park JY, Kang KS, Hahm DH, Huh CK, Lee SC, Lee S. 2017. Determination of flavonoids from *Cirsium japonicum* var. *maackii* and their inhibitory activities against aldose reductase. *Applied Biological Chemistry* 60:487-496.
- Lee JH, Choi SI, Lee YS, Kim GH. 2008. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extract from leaves of *Cirsium japonicum*. *Food Science and Biotechnology* 1:38-45.
- Lim SS, Kim MH, Lee JH. 1997. Effect of *Artemisia princeps* var. *orientalis* and *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* on liver function, body lipid, and bile acid of hyperlipidemic rat. *Korean Journal of Nutrition* 30:797-802. [in Korean]
- Lin P, Tian XH, Yi YS, Jiang WS, Zhou YJ, Cheng WJ. 2015. Luteolin-induced protection of H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells and the associated pathway. *Molecular Medicine Reports* 12:7699-7704.
- Lipinski B. 2011. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxidative medicine and Cellular Longevity* 2011:809696.
- Liu S, Luo X, Li D, Zhang J, Qui D, Liu W, She L, Yang Z. 2006. Tumor inhibition and improved immunity in mice treated with flavone from *Cirsium japonicum* DC. *International Immunopharmacology* 6:1387-1393.
- Liu Y, Tia X, Gou L, Sun L, Ling X, Yin X. 2013. Luteolin attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Brain Research Bulletin* 94:23-29.
- Liu R, Zhang T, Yang H, Lan X, Ying J, Du G. 2011. The flavonoid apigenin protects brain neurovascular coupling against amyloid- β_{25-35} -induced toxicity in mice. *Journal of Alzheimer's Disease* 24:85-100.
- Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otcos L, Jr Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F. 1995. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon- γ . *Nature* 374:647-650.
- Montine TJ, Diana NM, Quinn JF, Beal MF, Markesbery WR, Roberts LJ, Morrow JD. 2002. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 33:620-626.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63.
- Narayanan S, Ruma D, Gitika B, Sharma SK, Pauline T, Sai Ram M, Ilavazhagan G, Sawhney RC, Kumar D, Banerjee PK. 2005. Antioxidant activities of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) during hypoxia induced oxidative stress in glial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 278:9-14.
- Nishikimi N, Rao NA, Yagi K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 46:849-854.
- Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA. 2006. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *Journal of Neuro pathology & Experimental Neurology* 65:631-641.
- Omodeo-Sale F, Gramigna D, Campaniello R. 1997. Lipid peroxidation and antioxidant systems in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *Neurochemical Research* 22:557-582.
- Park HK, Yoon SY, Choi JH, Ko HS, Suh YW, Lee YS, Kim GH, Chung MS, Cheon JH. 2006. The antidepressant effects of *Cirsium japonicum* in ICR mice. *Journal of Korean Society of Health* 50:429-435. [in Korean]
- Park JY, Kim HY, Shibamoto T, Jang TS, Lee SC, Shim JS, Hahm DH, Lee HJ, Lee S, Kang KS. 2017. Beneficial effects of a medicinal herb, *Cirsium japonicum* var. *maackii*, extract and its major

- component, cirsimaritin on breast cancer metastasis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27:3968-3973.
- Park JY, Yun H, Jo J, Baek JY, Lee SC, Choi YJ, Shim JS, Choi HJ, Lee S, Kang KS. 2018. Beneficial effects of *Cirsium japonicum* var. *maackii* on menopausal symptoms in ovariectomized rats. *Food and Function* 9:2480-2489.
- Racher AJ, Looby D, Griffiths JB. 1990. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. *Cytotechnology* 3:301-307.
- Rice-Evans CA, Miller N, Paganga G. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20:933-956.
- Rodriguez JP, Lee J, Park JY, Kang KS, Hahm DH, Lee SC, Lee S. 2017. HPLC-UV analysis of sample preparation influence on flavonoid yield from *Cirsium japonicum* var. *maackii*. *Applied Biological Chemistry* 60:519-525.
- Rodriguez JP, Lee YK, Woo DG, Shin JS, Geraldino PJL, Jacinto SD, Lee S. 2018. Flavonoids from *Cirsium japonicum* var. *maackii* pappus as inhibitors of aldose reductase and their simultaneous determination. *Chemical Papers* 72:81-88.
- Shin MS, Park JY, Lee J, Yoo HH, Hahm DH, Lee SC, Lee S, Hwang GS, Jung K, Kang KS. 2017. Anti-inflammatory effects and corresponding mechanisms of cirsimaritin extracted from *Cirsium japonicum* var. *maackii* Maxim. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27:3076-3080.
- Sies H. 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology* 11:613-619.
- Touyz RM. 2004. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: What is the clinical significance? *Hypertension* 44:248-252.
- Wan Y, Liu LY, Hong ZF, Peng J. 2014. Ethanol extract of *Cirsium japonicum* attenuates hepatic lipid accumulation via AMPK activation in human HepG2 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* 8:79-84.
- Waris G, Ahsan H. 2006. Reactive oxygen species: Role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis* 5:14.
- Yin Y, Heo SI, Wang MH. 2008. Antioxidant and antidiabetic activities of extracts from *Cirsium japonicum* roots. *Nutrition Research and Practice* 2:247-251.
- Zhao L, Wang JL, Liu R, Li XX, Li JF, Zhang L. 2013. Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer's disease mouse model. *Molecules* 189:9949-9965.