Korean Journal Of Agricultural Science

pISSN : 2466-2402
eISSN : 2466-2410

FOOD&CHEMISTRY

Cirsium japonicum var. *maackii* inhibits hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells

Min Jeong Kim[1], Sanghyun Lee[2], Hyun Young Kim[3], Eun Ju Cho[1,*]

[1]Department of Food Science and Nutrition, and Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 46241, Korea

[2]Department of Plant Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

[3]Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea

[*]Corresponding author: ejcho@pusan.ac.kr

Abstract

Over-produced reactive oxygen species (ROS) exert oxidative damage on lipids, proteins, and DNA in the human body, which leads to the onset of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD). In this study, we explored the cellular antioxidant effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* (CJM) against hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced oxidative stress in neuronal cells. The antioxidant activity was assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 2',7'-dichlorofluorescin diacetate and nitric oxide (NO) assays, and the molecular mechanisms were examined by Western blot analysis. H_2O_2 treatment of SH-SY5Y cells decreased cell viability and increased ROS and NO production compared to H_2O_2-untreated cells. However, CJM increased cell viability and decreased ROS and NO accumulation in the H_2O_2-treated SH-SY5Y cells compared to H_2O_2-treated control cells. Especially, the EtOAc fraction from CJM showed the strongest antioxidant effect compared with the other extracts and fractions. Therefore, we further examined the CJM mechanism against oxidative stress using the EtOAc fraction from CJM. The EtOAc fraction up-regulated the expressions of heme oxygenase-1, NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, and thioredoxin reductase 1. These results indicate that CJM promotes the activation of antioxidative enzymes, which eliminate ROS and NO, and further leads to an increase in the cell viability. Taken together, our results show that CJM exhibited an antioxidant activity in H_2O_2-treated SH-SY5Y cells, and it could be a novel antioxidant agent for the prevention or treatment of neurodegenerative disease such as AD.

Keywords: Alzheimer's disease, *Cirsium japonicum* var. *maackii*, hydrogen peroxide, oxidative stress, SH-SY5Y

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Kim MJ, Lee S, Kim HY, Cho EJ . 2021. *Cirsium japonicum* var. *maackii* inhibits hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells. Korean Journal of Agricultural Science 48:119-131. https://doi.org/10.7744/kjoas.20210006

Received: October 20, 2020

Revised: January 15, 2021

Accepted: January 19, 2021

Copyright: © 2021 Korean Journal of Agrcultural 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.

Introduction

산소는 생명활동에 반드시 필요하지만, 호기성 대사과정에서 끊임없이 발생하는 reactive oxygen species (ROS)는 세포와 조직에 치명적인 손상을 유발한다(Zorov et al., 2014). ROS는 대기 중 산소(O_2)가 부분적으로 환원되거나 흥분된 상태로, 체내에서 산소가 독성이 없는 H_2O로 전환되는 대사과정에서 발생하는 부산물이다. ROS는 superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (•OH) 등을 포함한다. O_2가 전자를 한 개 받으면 O_2^-를 구성하는데 이 물질은 매우 불안정하여서 항산화 효소의 작용에 의하여 보다 안정한 물질인 H_2O_2를 생성한다. H_2O_2의 대부분은 세포 내 항산화 효소에 의하여 독성이 없는 H_2O로 제거되나, 세포가 조절하지 못할 정도로 다량의 H_2O_2가 생성될 경우 H_2O_2가 전자를 한 개를 더 받아 •OH를 생성한다. 이들 ROS는 DNA와 지질을 산화하여 각각 DNA adduct 및 lipid peroxide등을 생성함으로써 세포 독성을 유발한다(Hemnani and Parihar, 1998; D'Autréaux and Toledano, 2007). ROS에 의한 산화적 스트레스는 생체 기능을 저하시켜 노화를 유발할 뿐만 아니라 만성퇴행성질환의 주요 원인으로 알려져 있다(Schieber and Chandel, 2014). 특히 알츠하이머 질환이나 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌 질환은 비가역적으로 진행하는 양상을 보이므로, 이들 질환의 치료는 발병을 예방하거나 진행을 막는 데에 초점을 두고 있다(Chong et al., 2005; Kim et al., 2009).

인체에서 중요한 역할을 담당하는 뇌는 불포화지방산이 풍부하고 산소 소비량이 많아 산화적 스트레스에 매우 민감한 기관으로 알려져 있다(Popa-Wagner et al., 2013). 따라서 과량의 ROS에 의해 항상성을 유지하지 못하여 산화적 스트레스가 발생하면 뇌 조직은 ROS에 의해 공격받아 지질과산화가 유발되며, 세포 내에 위치한 세포소기관들도 국소적인 손상을 입어 정상적인 구조 및 기능을 잃게 된다(Leutner et al., 2001; Popa-Wagner et al., 2013). 또한 aldehyde와 같은 지질과산화 산물은 뇌 세포 사멸을 초래하고 체내를 이동하며 또 다른 손상을 야기한다(Omodeo-Sale et al., 1997). 인체는 이러한 산화적 스트레스로부터 체내를 보호하기 위하여 다양한 항산화 방어체계를 작동하여 손상을 최소화한다. 예를 들어 nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf-2)는 산화적 스트레스에 의해 활성화되는 전사인자로, heme oxygenase-1 (HO-1), thioredoxin reductase 1 (TrxR1), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1)와 같은 항산화 효소의 전사를 활성화시켜 ROS를 제거한다(Yan et al., 2008). 그러나 항산화 방어계가 감당하지 못할 정도로 ROS가 많이 생성되면 ROS 생성과 소멸의 불균형이 일어나므로 항산화제를 이용하여 ROS를 조절하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(Kähkönen et al., 1999). 항산화제는 본연이 가진 OH기를 이용하여 직접 ROS를 산화시킬 뿐만 아니라, 체내 항산화 효소계를 활성화하여 ROS를 제거하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Soobrattee et al., 2005; Wang et al., 2010). 특히 천연물 유래 소재는 합성 소재에 비해 생체효소나 지방에 대한 변이원성, 그리고 독성으로부터 비교적 안전한 것으로 알려져 있어 항산화제를 제작하기 위한 신소재로 선호되어 왔다(Branen, 1975; Jeong et al., 2006).

예로부터 국화과(Compositae) 식물은 민간에서 약용 및 식용으로 널리 이용되어왔으며, 한방에서 해독, 해열, 항염증, 항산화 작용 등 효과를 지녀 다양한 약용 소재로 이용되어 왔다(Hwang et al., 2010). 그 중 엉겅퀴(*Cirsium japonicum* var. *maackii*)는 국내에 자생하는 국화과 식물로, 그 뿌리와 꽃은 대계근 및 대계화라 하여 지혈, 항균, 해독을 위해 한약처방으로 이용되었다(Park et al., 2019). 최근에는 다수의 연구로부터 엉겅퀴가 항염, 항암, 해독 등의 효과가 있음을 확인하였다(Jung et al., 2017; Park et al., 2017; Shin et al., 2017). 이들 효능은 항산화 활성으로부터 유래하는 것으로 알려져 있어 엉겅퀴는 우수한 항산화 효능을 나타낼 것으로 기대된다. 따라서 본 연구팀은 선행연구를 통해 엉겅퀴가 H_2O_2로 유도한 산화적 스트레스에 대해 신경교세포 보호 효과를 나타냄을 확인하였다(Lee et al., 2018). 그러나 현재까지 신경세포에서 엉겅퀴의 항산화 효능을 탐색한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 H_2O_2로 산화적 스트레스를 유발한 신경세포에 엉겅퀴를 처리한 후 항산화능 관련 실험을 수행하여 cellular system에서 엉겅퀴의 신경세포 보호 효과를 알아보고자 하였다.

Materials and Methods

실험 재료

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin, fetal bovine serum (FBS)은 Welgene Inc. (Daegu, Korea)에서 구매하였다. H_2O_2는 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Bio Basic Inc. (Toronto, Canada)에서, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Bio Pure Co. (Ontario, Canada)에서 제조하였으며, 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCF-DA)와 griess reagent는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 제조한 시약을 사용하였다. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane은 Millipore Co. (Billerica, MA, USA), radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer는 Elpis Biotech. (Daejeon, Korea), laemmli sample buffer는 BioRad (Hercules, CA, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

시료 추출 및 분획

엉겅퀴(*Cirsium japonicum* var. *maackii*)는 봄 지상부를 Imsil Herbal Medicine Association (Imsil, Korea)으로부터 제공받아 사용하였다. 엉겅퀴 봄 지상부(5.71 kg)는 ethanol (EtOH) 7 L을 이용하여 3반복으로 환류 냉각장치(65 - 75℃)가 부착된 추출기로 추출하였으며, 그 결과 추출물 667.2 g을 얻을 수 있었다. 추출물은 물에 현탁하여 4 종류, 즉 *n*-hexane, $CHCl_3$, ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH)의 유기용매 각 1L로 5회 반복하여 분획하였으며, 최종적으로 *n*-hexane (213.6 g), $CHCl_3$ (39.0 g), EtOAc (67.6 g), *n*-BuOH (47.0 g)의 분획물을 얻었다.

세포 배양

SH-SY5Y 신경세포는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. SH-SY5Y 세포는 10%의 FBS와 1%의 penicillin-streptomycin을 함유한 DMEM을 이용하여 배양하였다. 세포를 배양한 incubator는 37℃, 5%, CO_2를 유지하였다. 배양된 세포는 세포 분화가 최대에 도달했을 때 flask로부터 떼어낸 후 원심 분리하여 집적시켰으며, 새로운 배지에 세포를 골고루 분산시켜 계대배양하였다.

Cell viability 측정

SH-SY5Y 세포가 confluence 상태가 되면 96 well plate에 5×10^4 cells·mL^{-1}로 seeding하여 세포를 24시간 배양하였다. 엉겅퀴 추출 및 분획물은 DMEM에 희석하여 10 μg·mL^{-1}로 처리하였고, 4시간 뒤 300 μM H_2O_2를 처리하여 세포독성을 유도하였다. 세포를 24시간 배양한 후, 5 mg·mL^{-1} MTT solution을 처리하여 4시간 동안 세포 내 formazan을 생성을 유도하였고, DMSO로 결정을 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Mosmann, 1983).

Reactive oxygen species (ROS) 측정

세포가 confluence 상태가 되면 96 well black plate에 5×10^4 cells·mL^{-1}로 seeding하여 세포를 24시간 배양하였다. 배양한 세포에 엉겅퀴 추출 및 분획물을 10 μg·mL^{-1}로 전처리하고 4시간 뒤 300 μM H_2O_2를 처리하여 ROS 생성을 유발하였다. 세포를 24시간 배양한 뒤 80 μM DCF-DA를 처리하여 30분간 재배양한 후, excitation-480 nm, emission-535 nm에서 형광도를 측정하였다(Cathcart et al., 1983).

Nitric oxide (NO) 측정

세포가 flask에서 confluence 상태가 되면 96 well plate에 5×10^4 cells·mL^{-1}로 seeding하여 세포를 24시간 배양하였고, 그 후 엉겅퀴 추출 및 분획물을 10 μg·mL^{-1}로 처리하였다. 이후 세포를 4시간 동안 배양하고 300 μM H_2O_2를 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였다. 24시간 뒤, 상층액 100 μL를 새로운 96 well plate에 옮겨 담고 100 μL griess reagent solution을 주입하여 15분간 실온에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blotting

세포에 엉겅퀴 EtOAc 분획물을 5, 10, 25 μg·mL^{-1} 처리하고 300 μM H_2O_2를 주입하여 배양한 뒤, RIPA buffer와 protease inhibitor cocktail을 배합한 lysis buffer를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응물은 원심분리하여 상층의 단백질만을 취해 정량한 후 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel로 분리하였다. 단백질은 PVDF membrane에 transfer하여 1차 항체와 overnight 반응시킨 뒤, horseradish peroxidase가 tagging된 2차 항체와 반응시켜 면역반응을 유도하였으며, enhanced chemiluminescence (ECL) solution를 이용하여 단백질 발현을 확인하였다(Table 1).

Table 1. Antibodies used in Western blotting.

Antibody	Dilution	Catalog No.	Company
Primary			
HO-1	1 : 500	ab13243	Abcam
NQO1	1 : 500	3187	Cell signaling
TrxR1	1 : 500	15140	Cell signaling
β-actin	1 : 500	8457	Cell signaling
Secondary			
Anti-rabbit IgG HRP-linked	1 : 500	7074	Cell signaling

HO-1, heme oxygenase-1; NQO1, NAD(P)H quinone oxidoreductase 1; TrxR1, thioredoxin reductase 1.

통계분석

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, Statistical Package for the Social Sciences (version 25, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 각 실험결과로부터 analysis of variance를 구한 후, Duncan's multiple test로 사후검정을 실시하여 $p < 0.05$의 수준에서 유의성을 검정하였다.

Results and Discussion

엉겅퀴 추출 및 분획물의 H_2O_2로 인한 산화적 스트레스로부터 세포생존율 개선 효과

엉겅퀴 지상부는 다양한 생리활성 물질을 보유하고 있으며, 그 중에서도 봄 지상부는 가장 많은 양의 flavonoid를 함유하고 있다(Lee et al., 2017). 이전 연구에서 엉겅퀴 봄 지상부는 가을 지상부에 비해 더 강한 ER transcriptional activity를 보였고, aldose reductase를 효과적으로 소거하였는데 이러한 생리활성은 flavonoid 높은 함유량에 의한 것으로 사료되므로, 본 연구에서도 엉겅퀴 봄 지상부로부터 추출 및 분획물을 제조하여 실험에 사용하였다(Rodriguez et al., 2017; Park et al., 2018). SH-SY5Y 신경세포는 인지능 관련 연구분야에서 널리 이용되는 세포주로써,

이러한 신경세포에 산화적 스트레스를 가하면 세포 내 미토콘드리아의 구조와 기능에 변화를 일으켜 알츠하이머 질환과 같은 퇴행성 뇌 질환을 유발할 수 있다(Koo et al., 2009). 특히 SH-SY5Y 신경세포에 H_2O_2를 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 세포모델은 신경보호 효과를 나타내는 천연 소재를 탐색하는데 유용한 모델로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 SH-SY5Y 신경세포 및 H_2O_2를 이용하여 산화적 스트레스에 대한 엉겅퀴의 신경세포 보호 효과를 살펴보았다. 체내 대사과정에서 끊임없이 발생하는 ROS는 산화적 스트레스를 유발함으로써 세포에 치명적인 손상을 유발하는 원인물질로 작용한다(Janssen et al., 1993). 세포막 성분 중 산화되기 쉬운 불포화지방산은 ROS에 의한 손상에 취약한 것으로 알려져 있다(Floyd and Hensley, 2002). 뇌 조직은 다른 조직에 비해 불포화지방산 함량이 높은 반면 산소 소비량은 전체 산소 소비량의 20%를 차지할 정도로 높기 때문에 산화적 스트레스에 손상 받기 쉬우므로, 고강도의 산화적 스트레스에 장기간 노출될 경우 학습 및 기억력 감퇴를 동반한 신경퇴행성질환의 발병으로 이어질 수 있다(Bamham et al., 2004). 이에 따라 신경퇴행성질환의 예방 및 치료제를 개발하기 위해 항산화 활성을 보유한 천연물로부터 유용성분을 추출하고 그 활성 기전을 규명하여 기능성 소재화하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Lee et al., 2010). 본 연구에서는 신경세포에서 엉겅퀴의 산화적 손상 개선 효과를 살펴봄으로써 기능성 신소재로서의 가능성을 확인해보았다. 먼저 SH-SY5Y 신경세포에 H_2O_2를 처리한 뒤 엉겅퀴 추출 및 분획물이 세포 생존율에 미치는 영향을 살펴보았다. H_2O_2를 처리한 control군의 세포생존율은 49.03%로 normal군(100%)에 비해 50.97% 감소한 것을 확인하였다(Fig. 1). 반면, 엉겅퀴 추출 및 분획물을 처리했을 때 세포생존율이 증가하였는데, 모든 추출 및 분획물 처리군에서 control군에 비해 세포생존율이 유의적으로 상승하였다. 이러한 연구결과는 엉겅퀴가 amyloid beta로 유도된 세포 독성으로부터 C6 신경교세포를 보호하여 세포생존율을 증가시

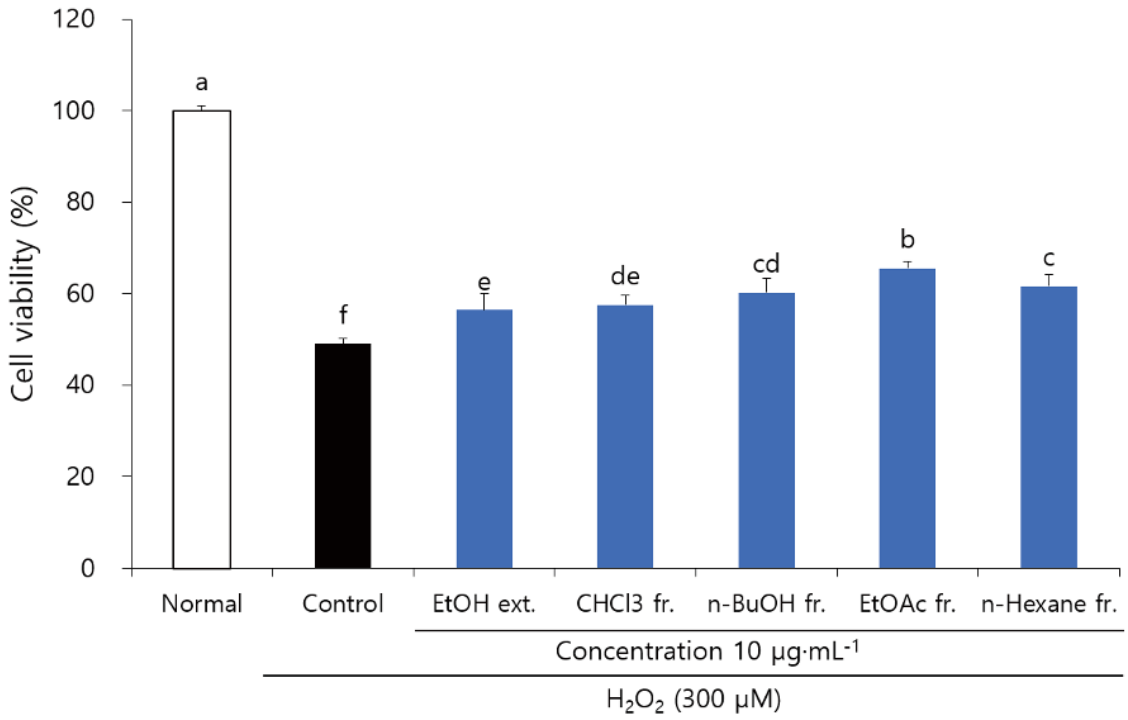

Fig. 1. Effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* on cell viability in SH-SY5Y cells treated with H_2O_2. Values are mean ± SD (n = 6). a - f: Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

킨다는 연구 결과와 유사하다(Kim et al., 2019). 엉겅퀴 추출 및 분획물 중에서는 EtOAc 분획물에서 65.61%로 가장 높은 세포생존율을 나타내어 EtOAc 분획물의 신경세포 보호 효과가 우수함을 알 수 있었다. 본 연구팀은 선행연구를 통해 EtOAc 분획물이 가장 우수한 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH), ·OH 및 O_2^- 라디칼 소거능을 나타내는 것을 확인하였으며, 후속연구에서는 H_2O_2로 유도된 산화적 스트레스에 대해 EtOAc 분획물이 신경교세포를 보호하는 것을 확인하였다(Lee et al., 2018). 이들 결과를 바탕으로 엉겅퀴는 H_2O_2로 유도된 세포손상에 대하여 신경세포 및 뇌 보호 효과를 나타내는 것으로 생각되며, 특히 EtOAc 분획물이 가장 효과적인 세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

엉겅퀴 추출 및 분획물의 ROS 소거 효과

H_2O_2는 호기성대사를 통해 미토콘드리아의 전자전달계에서 생산되는 대사산물로, 금속이온과 반응하여 더욱 반응성이 큰 ROS로 전환되어 세포 독성을 띤다(Yim et al., 1990). H_2O_2는 체내에서 끊임없이 생성되지만 항산화 효소계를 통해 빠르게 제거되어 독성이 없는 H_2O로 전환된다(Circu and Aw, 2010; Redza-Dutordoir and Averill-Bate, 2016). 그러나 외부적으로 H_2O_2를 처리하면 세포 내 ROS 축적량이 증가하여 세포 사멸 및 퇴화를 초래하는 것으로 알려져 있다 (Kang et al., 2013). 따라서 본 연구에서는 MTT 실험을 통해 확인한 엉겅퀴의 세포 보호 효과의 작용 기전을 규명하기 위하여 H_2O_2를 처리한 세포에서 ROS 소거 효과를 분석하였다. 그 결과, 시간이 지남에 따라 H_2O_2 처리로 인해 모든 군에서 ROS 생성량이 증가하였으며, 그 중 control군은 normal군에 비해 ROS 생성량이 크게 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2). 형광측정 후 60분을 기준으로 normal군(80.52%)의 ROS 생성량과 비교했을 때, control군(100%)은 ROS 생성이 19.48% 증가하여 ROS 생성량에 유의적인 차이가 발생함을 확인하였다. 한편, H_2O_2로 유도된 ROS 생성은 엉겅퀴 추출 및 분획물을 첨가함으로써 유의적으로 감소함을 확인하였는데, 엉겅퀴 추출 및 분획물을 10 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 첨가했을 때 모든 실험군에서 ROS 생성량이 control군에 비해 10% 이상 감소하였으므로 본 실험을 통해 엉겅퀴의 ROS 소거능을 확인하였다. 이러한 효과는 같은 국화과 식물 중 항산화 활성이 잘 알려진 금불초와 비교했을 때, H_2O_2를 처리한 신경세포에서 금불초의 EtOAc 및 *n*-hexane 분획물의 ROS 소거능이 엉겅퀴 추출 분획물과 유사한 정도로 나타나 엉겅퀴 또한 항산화 효과가 있음을 시사한다(Lee et al., 2009). Jung et al. (2009)에 따르면 엉겅퀴는 *in vitro*에서 total ROS 생성량을 효과적으로 감소시켰으며, 특히 극성을 띠는 EtOAc와 *n*-BuOH 분획물에서는 ROS 뿐만 아니라 DPPH, $ONOO^-$ 등의 라디칼 생성 또한 효과적으로 저해한 것으로 나타났다. 이러한 연구는 ROS의 축적을 분석한 본 실험의 결과와 일치하므로, 엉겅퀴의 세포 보호 효과는 ROS 생성 억제로부터 기인할 것으로 사료된다.

엉겅퀴 추출 및 분획물의 NO 소거 효과

NO는 산화반응을 통해 질소로부터 유래된 nitrogen radical로, 신경전달, 혈관이완, 면역반응과 같은 생리적 기능을 수행한다(Bredt and Snyder, 1992). 그러나 산화적 스트레스와 같은 외부 자극으로 인해 발현된 inducible nitric oxide synthase는 과잉의 NO를 생성하여 산화반응을 촉진함으로써 세포 독성을 유발한다(Brennan et al., 1999). 특히 NO는 O_2^-와 반응하여 $ONOO^-$로 전환되는데, $ONOO^-$는 반응성이 매우 커 주변의 분자들을 공격하므로 강력한 독성을 가진 물질로 알려져 있다(Koppenol et al., 1992). 뿐만 아니라 뇌 신경계에서 고농도의 NO로 인한 지속적인 염증반응은 면역-염증 기전을 교란하여 신경퇴행성질환에 관여할 수 있다고 보고되었다(Dawson and Dawson, 1998). 따라서 신경세포에서 엉겅퀴의 NO 소거 효과를 살펴보고자 H_2O_2 처리로 NO를 유발한 후 엉겅퀴 추출 및 분획물을 주입하여 그 효능을 확인하였다. H_2O_2만을 처리한 control군(100%)은 normal군(73.95%)에 비해 NO 생성량이 유의적으로 증가하여 H_2O_2로 인해 NO 생성이 증가되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 엉겅퀴 추출 및 분획물 처

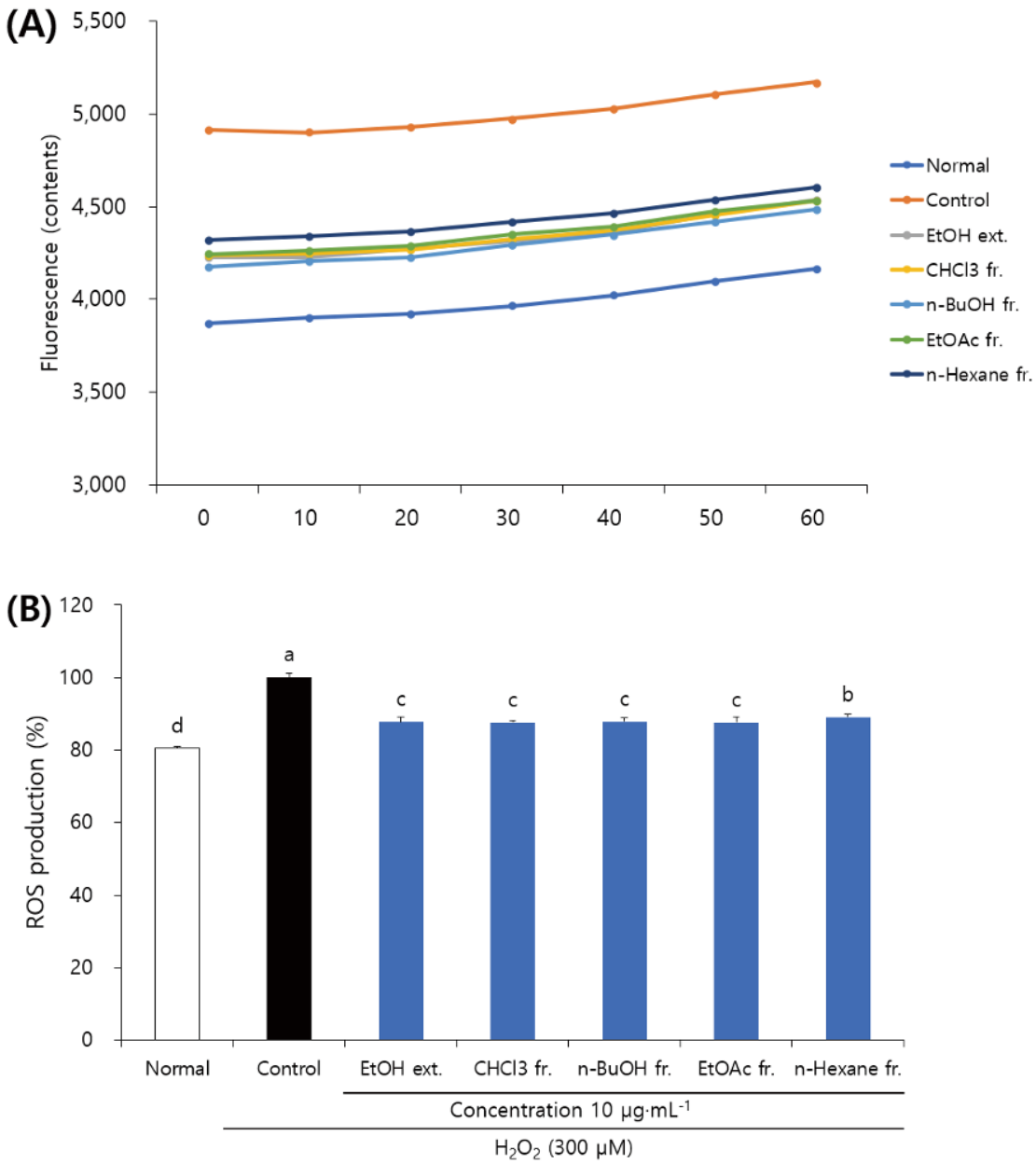

Fig. 2. Effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* on reactive oxygen species (ROS) production in SH-SY5Y cells treated with H_2O_2. (A) Time course of change in intensity of ROS fluorescence with *Cirsium japonicum* var. *maackii* treatment during 60 min. (B) The production of ROS treated with *Cirsium japonicum* var. *maackii*. Values are mean ± SD (n = 6). a - d: Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

리군은 control군에 비해 유의적으로 NO 생성량이 감소하였으며, 특히 $CHCl_3$ (74.65%), EtOAc (74.70%), *n*-hexane (75.57%) 분획물은 normal군과 유사하게 NO 생성을 억제하는 양상을 나타내었다. 본 결과는 항산화 효과가 뛰어난 국화과 식물 추출물이 NO 생성량을 감소시켜 산화적 스트레스를 감소시킨다는 기존의 연구와 일치한다(Min

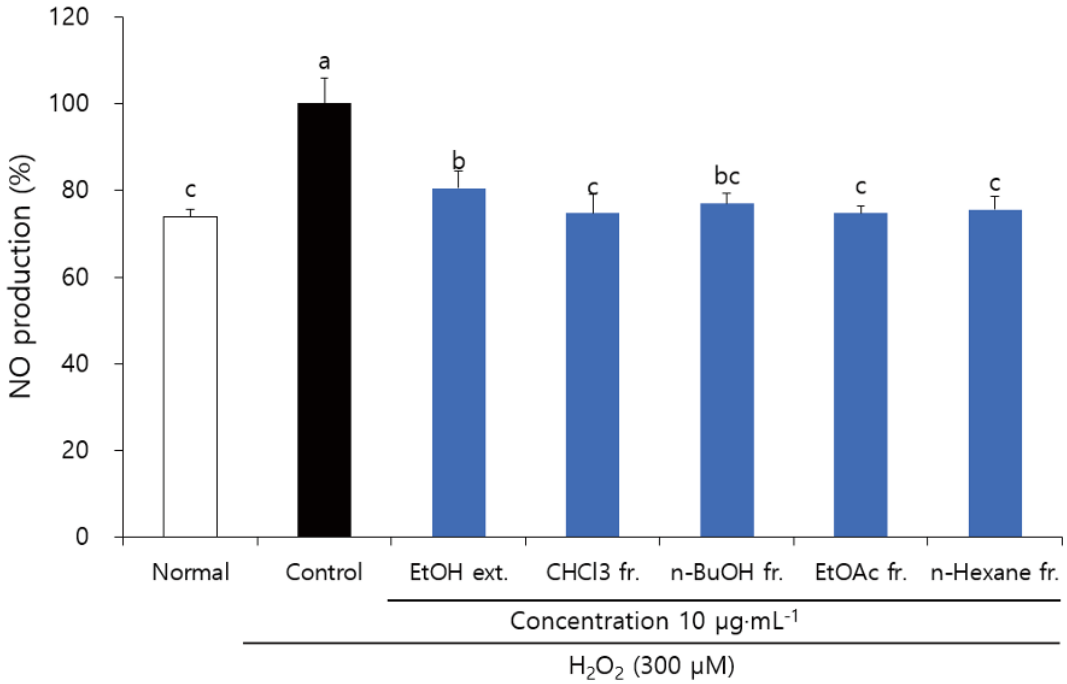

Fig. 3. Effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* on NO production in SH-SY5Y cells treated with H_2O_2. Values are mean ± SD (n = 6). a - c: Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

and Jhoo, 2013; Kim et al., 2019). 또한 커피콩의 항산화 물질인 Kahweol을 이용하여 NO 소거량을 측정했을 때와 유사한 정도로서, 엉겅퀴가 우수한 NO 소거능을 나타내는 것으로 볼 수 있다(Fürstenau et al., 2019). 이전 연구에서 엉겅퀴는 lipopolysaccharide (LPS)를 처리한 RAW264.7 대식세포에서 NO 생성을 억제하여 세포 손상을 감소시킨 것으로 보고되었다(Shin et al., 2017). 또한 엉겅퀴로부터 분리한 luteoilin 5-O-glucoside는 LPS 유도 RAW264.7 대식세포에서 iNOS의 발현을 저해시켜 NO 생성을 감소시켰다(Jung et al., 2012). 따라서 엉겅퀴는 NO생성을 억제하여 산화적 스트레스로부터 세포 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다. 또한 용매별 추출 및 분획물 중에서 EtOAc 분획물이 항산화 효과를 통해 가장 효과적으로 세포를 보호하는 것으로 확인되었다.

엉겅퀴의 항산화 기전 탐색

ROS는 세포 내 항산화 체계에 손상을 주어 항산화 효소의 활성을 저해하거나 작용을 방해하며, 그 결과 소거되지 못한 ROS가 체내에 축적되어 세포 손상을 일으킨다(Jacobson et al., 1990; Kim and Kim, 1991). 이러한 세포 내 비정상적인 ROS 축적에 대하여 세포는 일련의 방어 유전자를 활성화시킴으로써 산화적 스트레스에 대응한다. Heme oxygenase (HO)는 heme을 CO, biliverdin, free heme iron으로 분해하는 microsomal 효소로, 이들 분해산물은 항산화, 항염증 및 세포사멸 억제 등의 생리적 기능을 수행한다(Kim et al., 2006). HO-1은 HO 단백질 중 산화적 스트레스와 밀접한 관련을 가진 isoform으로, 뇌 허혈, 파킨슨병, 알츠하이머 질환 등과 같은 뇌 손상 상태에서 발현이 증가하여 신경보호 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Nimura et al., 1996; Schipper et al., 1998; Takahashi et al., 2004; Takeda et al., 2004). TrxR1은 뇌의 신경세포 형성에 중요한 역할을 수행하며, NADPH 의존적인 Trx의 환원을 촉매한다(Soerensen et al., 2008). TrxR1에 의해 환원된 Trx은 ROS로 인한 세포 손상 및 사멸을 억제하는 것으

로 알려져 있다(Cebula et al., 2015). NQO1은 퀴논계 화합물을 환원시키는 효소로서, 특히 O_2^-를 제거하여 세포 내 산화환원 반응의 항상성을 유지하는 데 기여한다(Keum et al., 2006). 이들 항산화 효소는 cellular defensive phase 2 detoxifying antioxidant enzyme로서 Nrf-2에 의해 조절되는 주요한 항산화 기전 중 하나로, H_2O_2를 포함한 다양한 산화적 자극에 의해 유도되므로 생체 방어에 있어 중요한 역할을 한다(Kim et al., 2006; Gazaryan and Thomas, 2016). 본 연구에서는 엉겅퀴의 항산화 기전을 탐색하기 위하여 세포생존율 및 NO 소거능이 가장 높았던 EtOAc 분획물을 활성분획으로 선정하여 기전 연구를 진행하였다. H_2O_2를 처리한 control군에서 normal군에 비해 HO-1, NQO1, TrxR1의 단백질 발현이 증가함을 확인하였다(Fig. 4). 이는 H_2O_2가 산화적 스트레스를 가함으로써 이들 항산화 효소의 단백질 발현을 증가시킨다는 이전 연구와 일치하였다(Lee et al., 2008; Weinreb et al., 2011). 한편, 엉겅퀴

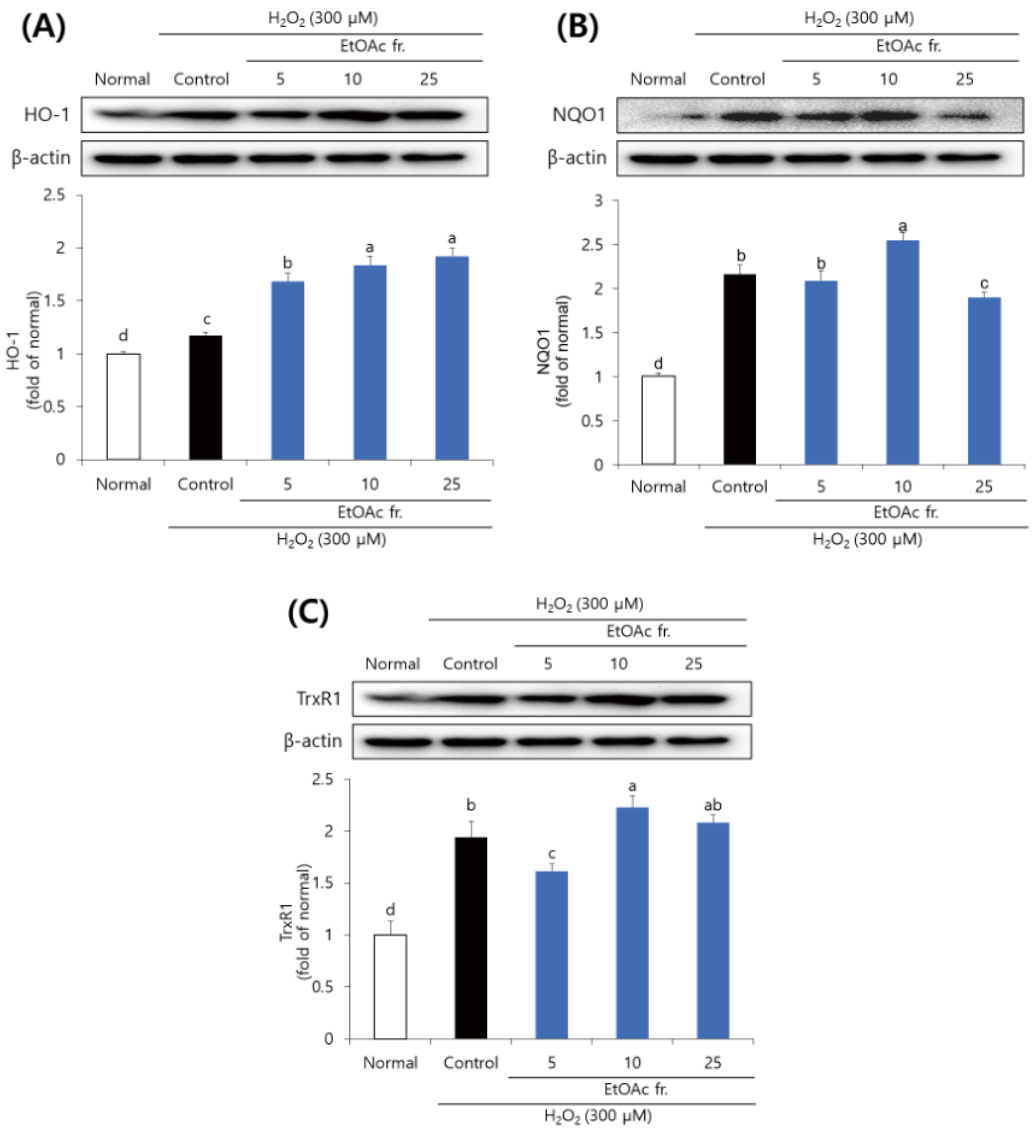

Fig. 4. Effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* on protein levels of (A) heme oxygenase-1 (HO-1), (B) NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), (C) thioredoxin reductase 1 (TrxR1), and β-actin in SH-SY5Y cells treated with H_2O_2. Values are mean ± SD (n = 3). a - d: Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test. β-actin was used as a loading control.

EtOAc 분획물을 5 - 25 μg·mL^{-1} 처리했을 때, HO-1은 모든 농도에서 normal군에 비해 단백질 발현이 현저히 증가한 것을 확인하였으며, 25 μg·mL^{-1} 농도에서 control군 대비 약 1.6배 발현이 증가하였다. 또한 NOQ1과 TrxR1의 단백질 발현은 10 μg·mL^{-1} 농도에서 가장 높은 발현 수치를 보였으며, control군과 유의적인 차이를 나타내었다. 따라서 엉겅퀴 EtOAc 분획물은 HO-1, NQO1, TrxR1와 같은 항산화 효소 발현을 유의적으로 증가시켜, H_2O_2로 유도된 산화적 손상에 대한 항산화 효과를 보이는 것으로 확인되었다. 엉겅퀴 EtOAc 분획물에는 cirsimarin, hispidulin, luteolin, apigenin과 같은 생리 활성물질이 함유되어 있으며, 이들 물질은 항산화 효소계의 발현을 유도하여 항산화 활성을 나타내는 것으로 보고되었다(Jung et al., 2012). Hispidulin은 국소 뇌 허혈 동물모델에서 Nrf2 단백질 발현을 증가시켜 항산화 효소 활성을 촉진하였으며, luteolin은 p62/Keap1/Nrf2 pathway를 촉진하여 downstream protein인 HO-1 및 NQO1 단백질 발현을 증가시켜 뇌 손상 보호 효과를 나타내었다(An et al., 2018; Tan et al., 2020). 또한 엉겅퀴로부터 분리한 flavonoids는 Nrf2 및 HO-1 단백질 발현을 증가시켜 산화적 스트레스로 인한 간세포 손상을 억제한 것으로 보고되었다(Jung et al., 2017). 이러한 결과를 종합하여 엉겅퀴는 신경세포에 H_2O_2와 같은 산화적 손상이 가해졌을 때, 항산화 효소계를 활성화시켜 HO-1, TrxR1, NOQ1 등의 항산화 단백질의 발현을 촉진하여 ROS 생성을 억제하고, 그 결과 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 것으로 사료된다.

Conclusion

본 연구는 H_2O_2를 처리한 신경세포에서 엉겅퀴 추출 및 분획물의 산화적 스트레스 개선 효과를 확인하였다. 엉겅퀴 추출 및 분획물은 H_2O_2로 저해된 세포생존율을 증가시켰으며, ROS 및 NO의 과잉 생성을 억제함으로써 산화적 스트레스에 대한 개선 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 그 중에서 가장 우수한 항산화 활성을 나타낸 EtOAc 분획물로 신경세포 내 항산화 기전을 탐색한 결과, HO-1, TrxR1, NQO1의 항산화 단백질의 발현을 증가시킴으로써 산화적 스트레스를 감소시키는 것으로 확인되었다. 따라서 엉겅퀴는 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하며, 이러한 결과는 엉겅퀴가 알츠하이머 질환과 같은 신경퇴행성질환에 대하여 이들 질환의 예방 또는 치료 물질로서 활용될 수 있음을 시사한다.

Conflict of Interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgements

본 연구는 보건장학회의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Authors Information

Min Jeong Kim, https://orcid.org/0000-0001-7276-0672
Sanghyun Lee, https://orcid.org/0000-0002-0395-207X
Hyun Young Kim, https://orcid.org/0000-0003-2241-2877
Eun Ju Cho, https://orcid.org/0000-0003-4282-3219

References

An P, Wu T, Yu H, Fang K, Ren Z, Tang M. 2018. Hispidulin protects against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. Journal of Molecular Neuroscience 65:203-212.

Bamham KJ, Masters CL, Bush AI. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Nature Reviews Drugs Discovery 3:205-214.

Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. Journal of the American Oil Chemists' Society 52:59-63.

Bredt DS, Snyder SH. 1992. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. Neuron 8:3-11.

Brennan PA, Downie IP, Langdon JD, Zaki GA. 1999. Emerging role of nitric oxide in cancer. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 37:370-373.

Cathcart R, Schwiers E, Ames BN. 1983. Detection of picomole levels of hydroperoxides using afluorescent dichlorofluorescein assay. Analytical Biochemisry 134:111-116.

Cebula M, Schmidt EE, Arnér ES. 2015. TrxR1 as a potent regulator of the Nrf2-Keap1 response system. Antioxidants and redox signaling 23:823-853.

Chong ZZ, Li F, Maiese K. 2005. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. Progress in Neurobiology 75:207-246.

Circu ML, Aw TY. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. Free Radical Biology and Medicine 48:749-762.

D'Autréaux B, Toledano MB. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8:813-824.

Dawson VL, Dawson TM. 1998. Nitric oxide in neurodegeneration. In Progress in Brain Research 118:215-229.

Floyd RA, Hensley K. 2002. Oxidative stress in brain aging: Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. Neurobiology of Aging 23:795-807.

Fürstenau CR, de Souza ICC, de Oliveira MR. 2019. The effects of kahweol, a diterpene present in coffee, on the mitochondria of the human neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to hydrogen peroxide. Toxicology in Vitro 61:104601.

Gazaryan IG, Thomas B. 2016. The status of Nrf2-based therapeutics: current perspectives and future prospects. Neural Regeneration Research 11:1708-1711.

Hemnani TARUNA, Parihar MS. 1998. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. Indian Journal of Physiology and Pharmacology 42:440-452.

Hwang IG, Kim HY, Shin SL, Lee CH, Lee JS, Jang KI, Jeong HS. 2010. Biological activities of *Coreopsis tinctoria* Nutt. flower extracts. Horticultural Science & Technology 28:857-863. [in Korean]

Jacobson JM, Michael JR, Jafri JMH, Gurtner GH. 1990. Antioxidants and antioxidant enzymes protect against pulmonary oxygen toxicity in the rabbit. Journal of Applied Physiology 68:1252-1259.

Janssen YM, Van BH, Borm PJ, Mossman BT. 1993. Cell and tissue responses to oxidative damage. A Journal of Technical Methods and Pathology 69:261-274.

Jeong GT, Lee KM, Park DH. 2006. Study of antimicrobial and antioxidant activities of *Rumex crispus* extract. Korean Chemical Engineering Research 44:81-86. [in Korean]

Jung HA, Abdul QA, Byun JS, Joung EJ, Gwon WG, Lee MS, Kim HR, Choi JS. 2017. Protective effects of flavonoids isolated from Korean milk thistle *Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum on *tert*-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. Journal of Ethnopharmacology 209:62-72.

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, Kim YS, Choi JS. 2009. Quantitative HPLC analysis of two key flavonoids and inhibitory activities against aldose reductase from different parts of the Korean thistle, *Cirsium maackii.* Food and Chemical Toxicology 47:2790-2797.

Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47:3954-3962.

Kang SW. 2013. Role of reactive oxygen species in cell death pathways. Hanyang Medical Reviews 33:77-82.

Keum YS, Han YH, Liew C, Kim JH, Xu C, Yuan X, Shakarjian MP, Chong S, Kong AN. 2006. Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD [P] H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) by a phenolic antioxidant, butylated hydroxyanisole (BHA) and its metabolite, tert-butylhydroquinone (tBHQ) in primary-cultured human and rat hepatocytes. Pharmaceutical Research 23:2586-2594.

Kim EH, Kim SH, Na HK, Surh YJ. 2006. Chemoprevention and chemoprotection through heme oxygenase-1 induction and underlying molecular mechanisms. Environmental Mutagens and Carcinogens 26:97-112. [in Korean]

Kim JS, Oh SJ, Moon DH. 2009. Molecular imaging in neurodegenerative diseases. Journal of the Korean Medical Association 52:151-167. [in Korean]

Kim SO, Jeong JS, Choi YH. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Aster yomena* in RAW 264.7 macrophages. Journal of Life Science 29:977-985. [in Korean]

Kim YS, Kim SU. 1991. Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. Journal of Neuroscience Research 29:100-106.

Koo U, Lee HJ, Lee DH, Lee HJ, Ham AR, Mar WC. 2009. Neuroprotective effects of some plant extracts against dopamine-induced oxidative stress on neuronal cell. Korean Journal of Pharmacognosy 40:41-45. [in Korean]

Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. 1992. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. Chemical Research in Toxicology 5:834-842.

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 45:509-519. [in Korean]

Lee HJ, Cho HS, Park E, Kim S, Lee SY, Kim CS, Kim DK, Kim SJ, Chun HS. 2008. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. Toxicology 250:109-115.

Lee HP, Zhu X, Casadesus G, Castellani RJ, Nunomura A, Smith MA, Lee HG, Perry G. 2010. Antioxidant approaches for the treatment of Alzheimer's disease. Expert Review of Neurotherapeutics 10:1201-1208.

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 NH, Hong JI, Kim JY, Chiang MH. 2009. Antioxidant properties and protective effects of *Inula britannica* var. *chinensis regel* on oxidative stress-induced neuronal cell damage. Korean Journal of Food Science and Technology 41:87-92. [in Korean]

Leutner S, Eckert A, Müller WE. 2001. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. Journal of Neural Transmission 108:955-967.

Min KC, Jhoo JW. 2013. Antioxidant activity and inhibitory effect of *Taraxacum officinale* extracts on nitric oxide production. Korean Journal of Food Science and Technology 45:206-212. [in Korean]

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferationand cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65:55-63.

Nimura T, Weinstein PR, Massa SM, Panter S, Sharp FR. 1996. Heme oxygenase-1 (HO-1) protein induction in rat brain following focal ischemia. Molecular Brain Research 37:201-208.

Omodeo-Sale F, Gramigna D, Campaniello R. 1997. Lipid peroxidation and antioxidant systems in rat brain: Effect of chronic alcohol consumption. Neurochemical Research 22:577-582.

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.

Park YE, Kwon GS, Kim BH, Lee JB. 2019. Evaluation of the usefulness of the fermented thistle (*Cirsium japonicum*) with *Lactobacillus rhamnosus* BHN-LAB105 for antioxidative and whitening effects. Asian Journal of Beauty and Cosmetology 17:1-13. [in Korean]

Popa-Wagner A, Mitran S, Sivanesan S, Chang, E, Buga AM. 2013. ROS and brain diseases: The good, the bad, and the ugly. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2013.

Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 1863:2977-2992.

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.

Schieber M, Chandel NS. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Current Biology 24:R453-R462.

Schipper HM, Liberman A, Stopa EG. 1998. Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease. Experimental Neurology 150:60-68.

Shin MS, Park JY, Lee J, Yoo HH, Hahm DH, Lee SC, Lee S, Hwang QS, 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.

Soerensen J, Jakupoglu C, Beck H, Förster H, Schmidt J, Schmahl W, Schweizer U, Conrad M, Brielmeier M. 2008. The role of thioredoxin reductases in brain development. PloS one 3:e1813.

Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 579:200-213.

Takahashi T, Morita K, Akagi R, Sassa S. 2004. Heme oxygenase-1: A novel therapeutic target in oxidative tissue injuries. Current Medicinal Chemistry 11:1545-1561.

Takeda A, Itoyama Y, Kimpara T, Zhu X, Avila J, Dwyer BE, Perry G, Smith MA. 2004. Heme catabolism and heme oxygenase in neurodegenerative disease. Antioxidants & Redox Signaling 6:888-894.

Tan X, Yang Y, Xu J, Zhang P, Deng R, Mao Y, He J, Chen Y, Zhang Y, Ding J, Li H, Shen H, Li X, Dong W, Chen G. 2020. Luteolin exerts neuroprotection via modulation of the p62/Keap1/Nrf2 pathway in intracerebral hemorrhage. Frontiers in Pharmacology 10:1551.

Wang X, Ye XL, Liu R, Chen HL, Bai H, Liang X, Zhang XD, Wang Z, Li WI, Hai CX. 2010. Antioxidant activities of oleanolic acid *in vitro*: Possible role of Nrf2 and MAP kinases. Chemico-Biological Interactions 184:328-337.

Weinreb O, Bar-Am O, Prosolovich K, Amit T, Youdim MB. 2011. Does 1-(R)-aminoindan possess neuroprotective properties against experimental Parkinson's disease? Antioxidants & Redox Signaling 14:767-775.

Yan W, Wang HD, Hu ZG, Wang QF, Yin HX. 2008. Activation of Nrf2–ARE pathway in brain after traumatic brain injury. Neuroscience Letters 431:150-154.

Yim MB, Chock PB, Stadtman ER. 1990. Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. Proceedings of the National Academy of Sciences 87:5006-5010.

Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. Physiological Reviews 94:909-950.