



ORIGINAL ARTICLE

Antioxidative Effects of *Parnassia palustris* L. Extract on Ferrous Sulfate-Induced Cellular Injury of Cultured C6 Glioma Cells

Young-Mi Seo¹, Seung-Bum Yang²¹Department of Nursing, Wonkwang Health Science University, Iksan, Korea²Department of Medical Non-Commissioned Officer, Wonkwang Health Science University, Iksan, Korea

파킨슨씨병 유발물질인 황산철로 손상된 배양 신경아교세포에 대한 물매화 추출물의 항산화 효과

서영미¹, 양승범²¹원광보건대학교 간호학과, ²원광보건대학교 의무부사관과

ARTICLE INFO

Received November 17, 2022
Revised 1st December 2, 2022
Revised 2nd December 6, 2022
Accepted December 6, 2022

Key words

Antioxidative effect
Ferrous sulfate
Oxidative stress
Parkinsonism

ABSTRACT

This study sought to evaluate the mechanism of cellular injury caused by ferrous sulfate (FeSO₄) and the protective effects of *Parnassia palustris* L. (PP) extract against FeSO₄-induced cytotoxicity of cultured C6 glioma cells. FeSO₄ is known to cause neurotoxicity and induce Parkinson's disease. The antioxidative effects of PP, such as superoxide dismutase (SOD)-like and superoxide anion-radical (SAR)-scavenging activities, as well as effects on cell viability, were studied. FeSO₄ significantly decreased cell viability in a dose-dependent manner and the XTT₅₀ value, the concentration of FeSO₄ which reduced the cell viability by half, was measured at 63.3 μM in these cultures. FeSO₄ was estimated to be highly cytotoxic by the Borenfreund and Puerner toxicity criteria. Quercetin, an antioxidant, significantly improved cell viability, damaged by FeSO₄-induced cytotoxicity. While evaluating the protective effects of the PP extract on FeSO₄-induced cytotoxicity, it was observed that the extract significantly increased cell viability compared to the FeSO₄-treated group. Also, the PP extract showed superoxide dismutase (SOD)-like and superoxide anion radical (SAR)-scavenging activities. Based on these findings, it can be concluded that FeSO₄ induced oxidative stress-related cytotoxicity, and the PP extract effectively protected against this cytotoxicity via its antioxidative effects. In conclusion, natural antioxidant sources such as PP may be agents useful for preventing oxidative stress-related cytotoxicity induced by heavy metal compounds such as the FeSO₄, a known Parkinsonism inducer.

Copyright © 2022 The Korean Society for Clinical Laboratory Science.

서론

전 세계가 빠르게 고령화 사회로 접어들면서 노인인구의 증

가와 함께 파킨슨병을 포함한 뇌졸중, 치매와 같은 퇴행성 뇌질환의 발병율이 날로 증가하고 있다. 파킨슨병은 WHO에 의하면 1990년에는 300만 명이었으나 2015년에는 620만 명으로 증가하였으며, 2040년에는 1,420만 명으로 증가된다[1]. 이에 비하여, 아직까지 질환의 완쾌를 위한 독성기전이나 적절한 치료법 및 효과적인 치료제 개발이 미흡한 상태이다. 더욱이, 환경오염에 따른 미세먼지나 중금속, 수질오염과 같은 외부적 요인들에 의하여 질환에 대한 이환율이 점차 높아지고 있으며, 중금속

Corresponding author: Young-Mi Seo

Department of Nursing, Wonkwang Health Science University, 514 Iksan-daero, Iksan 54538, Korea

E-mail: dudn0408@wuu.ac.kr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2836-647X>

중 황산철(FeSO_4)은 파킨슨병의 원인물질로 알려져 있다[2]. 파킨슨병(Parkinsonism)은 치매나 루게릭질환과 같은 신경퇴행성질환으로 진전(tremor)을 비롯한 근경직(rigidity), 운동부전(akinesia)과 같은 3가지를 주 증상으로 하는 난치성 뇌병변으로, 1817년 영국 의사인 제임스 파킨슨(James Parkinson)에 의해 발견되어 명명된 질환이다[3]. 파킨슨병의 직접적인 요인으로는 내부적 요인에 의한 흑질내 도파민계 신경세포의 소실에 기인하며, 간접적으로는 환경적 요소에 의해 도파민신경세포의 손상이나 퇴화에 의한다고 알려져 있다[4]. 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환은 현재까지 효과적인 치료방법이나 치료약제도 많지 않아 완치에 많은 어려움이 따르고 있다. 파킨슨병의 치료로는 수술적 요법으로 시상하핵(subthalamic nucleus)에 대한 전극법과 시상파괴술을 실행하는 방법이 있는데 이 경우 모두 후유증이 심하다는 단점이 있다. 그러므로 주로 약물요법을 시행하는데, 현재 미국 FDA 승인을 받은 레보도파나 트리헥시페닐(*trihexyphenidyl*)과 같은 항콜린성 약제가 사용되고 있다[5]. 최근 연구동향은 화합물, 항체, 줄기세포, 유전자 등에서 치료약제가 개발되고 있다[6]. 그렇지만 이들 약제들도 장기간 투여 시 독성으로 인한 부작용이 심하기 때문에 독성이 없으면서도 치료적 효능이 높은 대체물질의 개발이 시급해졌다. 최근, 중금속인 철(Fe)이 파킨슨병의 유발물질 하나로 알려지면서 이에 대한 연구가 시도되고 있다. 즉, 철화합물이 도파민계의 신경세포에 산화적 손상을 유발하여 세포를 퇴행케 함으로서 파킨슨병을 초래한다고 제시된 바 있다[2]. 따라서, 본 연구에서는 이를 근거로 철화합물에 의한 신경독성이 도파민계 신경세포가 아닌 타 신경세포에서도 산화적 손상과 관련된 신경독성을 나타내는가를 알아보기 위하여 아교세포(neuroglial cell)의 일종인 배양 C6 glioma 세포주를 재료로 철화합물의 독성을 조사하였다. 이 같은 가능성의 하나로써, 납을 비롯한 카드뮴이나 알루미늄과 같은 몇몇 중금속화합물들이 붕괴되면서 자유라디칼을 생성하고, 생성된 자유라디칼의 독성이 산화적 손상과 관련이 있다고 제시된 바 있다[7]. 한편, 각종 식물에는 항산화제를 비롯한 항바이러스, 항균, 항독에 유익한 활성성분들을 다량 함유하고 있다고 밝혀지면서 이들 성분들을 이용한 병변의 치료적 접근을 시도하고 있다[8]. 식물 중 물매화(*Parnassia palustris* L. PP)는 일명 풀매화라고도 불리는데, 생약명으로는 매화초라고 한다. PP는 우리나라 전역의 산과 들에 서식하고 있는 범의귀과(Saxifragaceae)에 속하는 여러해살이 풀로서 잎은 달걀모양으로 끝은 뾰족하고 가장자리는 톱니모양이 아니고 매끄럽게 되어 있다. 흰색의 꽃은 7~9월경에 개화하는데 열매는 달걀모양으로 그 안에 작은 종자들이 많이 들어 있으며, 전초는 여름에 채

취하여 햇볕에 말려 사용한다[9]. PP는 성질은 차가우며 맛은 쓴데 여기에는 루틴(rutin)을 비롯한 퀘세틴(queracetin), 캠페롤(kaempferol), 알칼로이드(alkaloid), 하이페린(hyperin)과 같은 플라보노이드(flavonoid)계통의 여러 성분들이 함유되어 있어 오래전부터 항독을 비롯한 황달, 간염, 창종, 용종, 동맥염과 같은 질환에 사용되어 왔다[10]. 특히, 커큐민(curcumin)을 비롯한 캠페롤(kaempferol), 루틴(rutin), 퀘세틴(queracetin), 탄닌(tannin), 하이페린(hyperin) 등은 페놀성 플라보노이드계통의 성분들로서 뛰어난 항산화 작용이 있다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다[11]. PP에 대한 연구로는 PP종의 차이에 대한 유전학적 연구나 또는 함유성분들에 대한 연구가 대부분이고 항염을 비롯한 항균이나 항독은 물론, 항산화에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다[12]. 근래, 세포배양법이 발달함에 따라 실험에 적합한 병변모델을 제작한 후 질환에 대한 기전규명을 비롯하여 물질의 효능 및 화학약제의 안전성 검사와 같은 다양한 정량적 분석에 사용되고 있다[13]. 본 연구는 파킨슨병 유발물질의 하나인 황산철(FeSO_4)에 대한 신경독성을 신경세포주인 C6 glioma 세포를 이용해 산화적 손상 측면을 조사하였다. 또한, FeSO_4 의 독성에 대한 PP 추출물의 영향을 항산화 측면에서 분석함으로써 산화적 손상과 관련된 질환적 중금속화합물 독성에 효과적인 반응을 하는 대체물질을 천연소재로부터 알아보려 하였다.

재료 및 방법

1. 약제 제조

본 실험에 사용한 시약으로 FeSO_4 , quercetin, alcohol, pyrogallol, nitroblue tetrazolium (NBT), phosphate buffered saline (PBS), dimethyl sulfoxide (DMSO), hydrogen peroxide (H_2O_2), HCl, xanthine, Tris-HCl buffer 및 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, disodium salt (XTT)는 Sigma사(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 또한, FeSO_4 의 제조는 소태아혈청(FBS: fetal bovine serum, Gibco, USA)이 없는 최소필수배지(MEM: minimum essential medium, Gibco, USA)을 사용하여 50, 100, 150, 200 μM 의 각 저장액을 만들어 사용하였다. XTT (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 저장액은 PBS에 희석하여 사용하였다.

2. 물매화(PP) 채취 및 추출

전북 익산에 있는 야산에서 8~9월에 전초를 채취하여 햇볕에서 말린 다음 시료를 냉동 보관하여 사용하였다. 추출을 위해

시료 80.6 g과 약 280 mL의 증류수를 1,000 mL 환저플라스크에 넣어 3시간 동안 가열한다. 이 과정을 3회 반복하여 얻은 액을 모아 3,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 감압농축시켜서 수율이 2.9%인 2.3 g의 시료를 얻었다. 상기 시료를 필요시 실험목적에 맞도록 희석 사용하였다.

3. 세포 배양 및 세포생존율(cell viability) 분석

C6 glioma 세포주(ATCC, CCL 107)의 배양은 trypsin 효소를 사용하여 분리하였으며 분리된 세포는 혈청함유 배양액에서 잘 섞은 다음 1×10^5 cells/well의 밀도로 96-well 배양용기에 분주하였다. 분주한 후 72시간 동안 36°C, 5% CO₂의 항온기에서 배양하였으며, 배양 세포에 농도별로 약제를 처리한 후 세포생존율을 분석하였다. 세포생존율 분석은 Mosmann [14]의 방법으로 약제를 처리한 세포에 각 well당 XTT (50 µg/mL) 10 µL를 넣고 4시간 동안 항온기에서 배양하였다. 배양완료 후 DMSO로 처리한 다음 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) 450 nm에서 흡광도를 측정해서 대조군과 비교 조사하였다.

4. FeSO₄의 처리

Pyo 등[15]의 연구결과를 바탕으로 배양 C6 glioma 세포에 FeSO₄가 30~70 µM의 농도로 포함된 배양액에서 각각 48시간 동안 처리한 후에 세포생존율에 대한 XTT₅₀값을 측정하였다.

5. 퀘세틴(Quercetin, QU)의 항산화능 측정 및 FeSO₄에 대한 영향

Chung 등[16]의 연구결과를 바탕으로 QU의 항산화능 조사를 위해 25 µM H₂O₂를 배양 세포에 처리전, QU 35 µM과 QU 45 µM의 각각의 농도를 2시간 동안 처리하여 이에 대한 영향을 세포생존율로 조사하였다. 또한, FeSO₄에 대한 QU의 영향을 파악하기 위해 XTT₅₀ 농도의 FeSO₄ 처리전에 QU 35 µM과 45 µM을 2시간 동안 처리하고 각각의 세포생존율을 조사하였다.

6. PP 추출물의 세포독성 측정 및 FeSO₄에 대한 추출물 처리

PP 추출물의 독성 조사를 위하여 90~150 µg/mL 각각 농도의 추출물을 배양 세포에 48시간 동안 처리 후 세포생존율 조사하였다. 조사결과에서 추출물의 최대허용한계농도를 확인하고 한계농도 바로 이하의 두개의 농도를 분석에 사용하였다. 또한, FeSO₄에 대한 PP 추출물의 영향조사는, XTT₅₀ 농도의 FeSO₄ 처리전, 110 µg/mL와 130 µg/mL의 추출물을 2시간 동안 처리하고 세포생존율로 각각의 영향을 조사하였다.

7. PP 추출물의 성분함량 분석

폴리페놀(polyphenol)분석은 A.O.A.C. [17]에 의한 방법에 따라, 0.2 mL 추출시료와 phenol reagent 0.2 mM을 같이 3분간 반응시킨 후 0.4 mL sodium carbonate로 1시간 처리하여 ELISA reader로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약은 Tannic acid로 하여 검량곡선을 작성하였다. Flavonoid 분석은 Nieva Moreno 등[18]에 의한 방법에 준해, 25°C에서 시료용액 0.1 mL, 10% aluminum nitrate, 에탄올 4.7 mL, 1 M potassium acetate 혼합물 0.2 mL를 40분 동안 반응시킨 후 ELISA reader로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약을 rutin으로 하여 검량곡선을 작성하였다.

8. SOD-유사 활성 측정

SOD-유사 활성은 Marklund와 Marklund [19]에 의한 방법에 의해, 10 mM pyrogallol과 Tris-HCl buffer를 시료에 처리하여 25°C에서 10분 동안 반응시켰다. 반응 후 HCL로 처리한 다음 ELISA reader로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사 활성은 대조군에 대한 백분율로 표시하였으며, SOD-유사능은 QU를 양성대조군으로 하여, SOD-유사능(%)=[(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도)×100]-100으로 나타냈다.

9. Seroxide anion-radical (SAR) 소거 활성 측정

SAR-소거 활성의 측정은 nitroblue tetrazolim (NBT)의 방법에 따라 시료용액 0.1 mL, 0.4 mL potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.4 mM xanthine에 NBT를 가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 반응이 완료되면 1 N HCl 1 mL를 가한 후 ELISA reader, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. SAR-소거 활성은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다. SAR-소거능은 QU를 양성대조군으로 하여, SAR-소거능(%)=100-[(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도)×100]으로 나타냈다.

10. 통계 처리

결과값은 SPSS/WIN (20.0) 프로그램을 이용하여 Mean±SD로 표기하였으며, 군간의 비교는 one way ANOVA로 분석하였고, 사후 분석은 Tukey HSD으로 하였다. 유의수준은 $P < 0.05$ 에서 채택하였다.

결 과

1. FeSO₄의 세포독성 측정

FeSO₄의 독성을 확인하기 위하여 배양 C6 glioma 세포에 FeSO₄를 30~70 μM 농도로 각각 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 결과, 처리농도에 따라 세포생존율의 유의한 감소를 나타냄으로서 독성을 보였다($P<0.001$). FeSO₄, 30 μM, 50 μM, 70 μM에서 대조군에 비해 각각 73.8%, 64.3%, 42.9%의 세포 생존율을 보였으며, XTT₅₀ 값은 63.3 μM의 처리에서 나타났다 (Table 1). 세포독성에 대한 사후분석 결과 70 μM, 50 μM, 30 μM, 대조군의 순으로 세포독성이 높게 나타났다.

2. Quercetin (QU)의 항산화능 측정

QU에 대한 항산화능 조사를 위해 25 μM H₂O₂를 배양 세포에 처리하기 전에 QU 35 μM과 QU 45 μM을 각각 2시간 동안

처리하였다. 그 결과, H₂O₂의 처리에서는 대조군에 비하여 세포 생존율이 38.0% (0.19±0.01)로 나타난 반면, 35 μM과 45 μM의 QU의 처리에서는 각각 72.0% (0.36±0.02)와 76.0% (0.38±0.02)로 나타났다. 이는 H₂O₂ 단독처리와 달리 모두 세포 생존율이 유의하게 증가하였다($P<0.001$) (Table 2). QU의 항산화능 사후분석 결과 세포생존율이 대조군, 45 μM QU, 35 μM QU, 25 μM H₂O₂ 순으로 높게 나타났다.

3. FeSO₄의 독성에 대한 QU의 영향

FeSO₄의 세포독성에 대한 항산화제인 QU의 영향은 XTT₅₀ 농도의 FeSO₄를 배양 세포에 처리하기 전에 QU 35 μM과 QU 45 μM을 2시간 동안 처리하였다. 그 결과, FeSO₄의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 35.1% (0.20±0.03)로 나타났다으나 35 μM과 45 μM CA의 처리에서는 각각 47.4% (0.27±0.01)와 59.6% (0.34±0.02)로 나타났다($P<0.001$)

Table 1. The cytotoxicity of FeSO₄ by XTT assay

Concentrations of FeSO ₄ (μM)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD	(%)			
Control ^a	0.42±0.02	100	208.53	<.001	a>b>c>d
30 ^b	0.31±0.02	73.8			
50 ^c	0.27±0.02	64.3			
70 ^d	0.18±0.01	42.9			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.
Abbreviation: FeSO₄, ferrous sulfate.

Table 2. The antioxidative ability of QU on the H₂O₂ in cultured C6 glioma cells

Concentrations of QU (μM)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD	(%)			
Control ^a	0.50±0.03	100	417.61	<.001	a>d>c>b
25 H ₂ O ₂ ^b	0.19±0.01	38.0			
35/25 H ₂ O ₂ ^c	0.36±0.02	72.0			
45/25 H ₂ O ₂ ^d	0.38±0.02	76.0			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.
Abbreviations: QU, quercetin; H₂O₂, hydrogen peroxide.

Table 3. The effect of QU on the cytotoxicity induced by FeSO₄ in cultured C6 glioma cells

Concentrations of QU (μM)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD	(%)			
Control ^a	0.57±0.03	100	393.15	<.001	a>d, c>b
FeSO ₄ (XTT ₅₀) ^b	0.20±0.03	35.1			
35/FeSO ₄ (XTT ₅₀) ^c	0.27±0.01	47.4			
45/FeSO ₄ (XTT ₅₀) ^d	0.34±0.02	59.6			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.
Abbreviations: QU, quercetin; FeSO₄, ferrous sulfate.

(Table 3). FeSO₄의 세포독성의 QU 영향에 대한 사후분석결과는 대조군, 45 μM QU와 35 μM QU, FeSO₄ (XTT₅₀) 순으로 세포생존율이 높게 나타났다.

4. PP 추출물의 세포독성

PP 추출물의 독성분석은 각각 90~150 μg/mL 농도의 추출물을 넣은 배양액에서 세포를 노출시킨 결과 90 μg/mL와 110 μg/mL 농도에서 세포생존율이 대조군에 비하여 97.4% (0.38±0.02)와 94.9% (0.37±0.02)로 각각 나타났다. 또한, 130 μg/mL와 150 μg/mL 농도에서 세포생존율은 각각 92.3% (0.36±0.03)와 89.7% (0.35±0.01)로 나타났다(P<0.001) (Table 4) (Figure 1). PP 추출물의 독성에 대한 사후분석결과는 110 μg/mL, 130 μg/mL, 150 μg/mL 간에는 통계적인 차이는 없었으나 110 μg/mL, 130 μg/mL, 150 μg/mL 순으로 세포생존율이 높았다. 90 μg/mL는 대조군, 110 μg/mL, 130 μg/mL와 통계적인 차이가 없었으나 150 μg/mL와는 통계적인 차이가 있었다. 대조군은 150 μg/mL와 세포생존율이 통계적으로 차이를 보였기에 대조군에 비해서 세포생존율이 유의하게

감소를 보이는 최대 허용한계 농도는 150 μg/mL 이상에서 나타나는 것으로 확인되었다. 따라서 본 실험에서는 PP 추출물을 150 μg/mL 이하의 농도를 사용하였다.

5. PP 추출물의 성분함량 분석

PP 추출물성분 중 polyphenol의 함량은 42.8 mg/g으로, flavonoid 함량은 32.9 mg/g으로 각각 나타났다(Figure 2).

6. FeSO₄의 세포독성에 대한 PP 추출물의 영향

FeSO₄의 세포독성에 대한 PP 추출물의 영향은 XTT₅₀ 농도의 FeSO₄를 배양 세포에 처리하기 전에 각각 110 μg/mL와 130 μg/mL의 추출물을 처리한 결과, FeSO₄의 처리를 한 세포생존율은 대조군에 비하여 39.4% (0.13±0.01)로 나타났는데 비하여 110 μg/mL 추출물 처리에서는 51.5% (0.17±0.01)로 나타났다. 또한 130 μg/mL 추출물 처리에서는 60.6% (0.20±0.01)로 나타나 FeSO₄의 처리와 달리 유의한 증가를 보였다(P<0.001) (Table 5). 사후분석결과 대조군, 130 μg/mL PP 추출물, 110 μg/mL PP 추출물, FeSO₄ 순으로 세포생존율이 높게 나타났다.

Table 4. The cytotoxicity of PP extract on cultured C6 glioma cells by XTT assay

Concentrations of PP extract (μg/mL)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD	(%)			
Control ^a	0.39±0.03	100	5.07	.002	a>e
90 ^b	0.38±0.02	97.4			
110 ^c	0.37±0.02	94.9			
130 ^d	0.36±0.03	92.3			
150 ^e	0.35±0.01	89.7			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviation: PP, *Parnassia palustris* L.

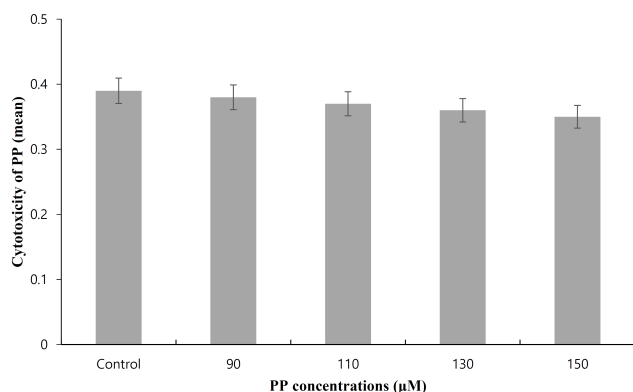


Figure 1. The cytotoxicity of *Parnassia palustris* L. (PP) extract on cultured C6 glioma cells. Cultured cells were incubated with PP extract at concentrations of 90, 110, 130 and 150 μg/mL. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.

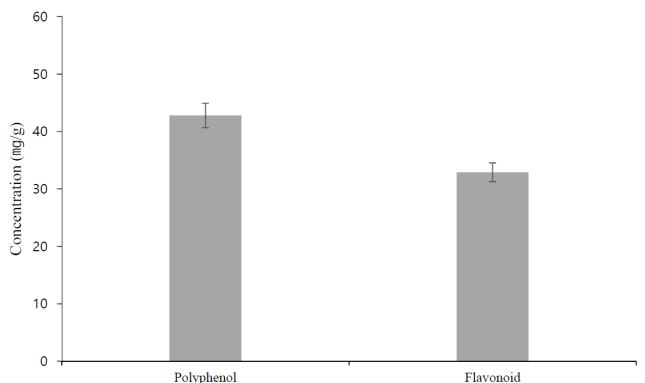


Figure 2. The component of *Parnassia palustris* L. (PP) extract. Data are mean±SD. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.

Table 5. The protective effect of PP extract on the cytotoxicity induced by FeSO₄ in cultured C6 glioma cells

Concentrations of PP extract (µg/mL)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD	(%)			
Control ^a	0.33±0.002	100	293.71	<.001	a>d>c>b
FeSO ₄ ^b	0.13±0.001	39.4			
110/FeSO ₄ (XTT ₅₀) ^c	0.17±0.01	51.5			
130/FeSO ₄ (XTT ₅₀) ^d	0.20±0.001	60.6			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: PP, *Parnassia palustris* L.; FeSO₄, ferrous sulfate.

Table 6. The SOD-like activity of PP extract determined at a wavelength of 420 nm

Concentrations of PP extract (µg/mL)	SOD-like activity (420 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD	(%)			
Control ^a	0.38±0.02	100	241.19	<.001	a>c, d>b
45 µM QU ^b	0.62±0.02	163.2			
110 ^c	0.43±0.02	113.6			
130 ^d	0.45±0.02	118.4			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: PP, *Parnassia palustris* L.; QU, quercetin; SOD, superoxide dismutase.

7. SOD-유사 활성 측정

SOD-유사 활성을 측정하기 위하여 PP 추출물 시료 110 µg/mL와 130 µg/mL 농도를 처리하여 분석하였다. 110 µg/mL 농도 결과는 활성이 대조군에 비하여 113.6%로 나타났으며, 130 µg/mL의 처리에서는 118.4%로 나타났다(Table 6). 110 µg/mL와 130 µg/mL 농도에서 SOD-유사 활성능은 각각 13.6%와 18.4%로 이는 모두 대조군보다 유의한 유사 활성능의 증가를 나타냈다. 특히, 130 µg/mL 농도에서는 양성 대조군인 QU의 소거능인 63.2 ($P<0.001$)의 거의 30%인 것으로 나타났다(Figure 3). SOD-유사 활성능의 사후분석 결과 QU, 130 µg/mL PP 추출물과 110 µg/mL PP 추출물, 대조군 순으로 활성능이 높은 것으로 나타났다.

8. SAR-소거 활성 측정

PP 추출물에 대한 SAR-소거 활성의 정도를 측정하기 위하여 추출물 시료 110 µg/mL와 130 µg/mL를 각각 분석한 결과 110 µg/mL 추출물의 처리에서는 80.4%로 나타났으며, 130 µg/mL의 처리에서는 67.4%로 나타났다(Table 7). 따라서, SAR-소거능은 110 µg/mL와 130 µg/mL에서 각각 19.6% ($P<0.01$)와 32.6%로 나타나 모두 대조군에 비해서 높은 저해능을 나타냈다 ($P<0.001$). 특히, 130 µg/mL 농도에서는 양성대조군인 QU의 소거능인 69.6% ($P<0.001$)의 45%이상인 것으로 나타났다(Figure 4). 사후분석결과 소거능은, QU, 130 µg/mL PP 추출

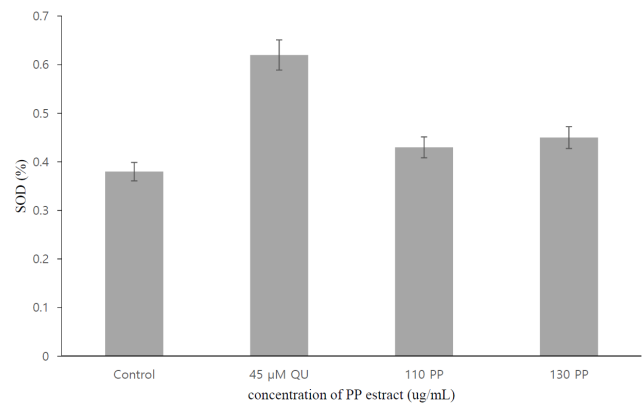


Figure 3. The superoxide dismutase (SOD)-like ability of *Parnassia palustris* L. (PP) extract determined at a wavelength of 420 nm. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.

물, 110 µg/mL PP 추출물, 대조군 순으로 높았다.

고 찰

파킨슨병은 치매와 마찬가지로 질환에 이환될 경우 정상적인 일상생활이 어려울 뿐만 아니라 인간으로서의 삶의 영위가 위협 받게 된다. 특히, 환경이 오염되면서 미세먼지나 중금속 및 오염된 대기와 수질로 인해 파킨슨병과 같은 난치성 질환이 높은 빈도로 발병하고 있다[20]. 특히, 중금속 중 황산철(FeSO₄)은 파킨슨병의 유발물질로 알려지면서 이의 신경독성에 대해 많은 관

Table 7. The SAR scavenging activity of PP extract at a wavelength of 560 nm

Concentrations of PP extract ($\mu\text{g/mL}$)	SAR-scavenging activity (560 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean \pm SD	(%)			
Control ^a	0.46 \pm 0.01	100	622.49	<.001	a>c>d>b
45 μM QU ^b	0.14 \pm 0.02	30.4			
110 ^c	0.37 \pm 0.01	80.4			
130 ^d	0.31 \pm 0.02	67.4			

The data indicate the mean \pm SD for triplicate experiments.

Abbreviations: PP, *Parnassia palustris* L.; QU, quercetin; SAR, superoxide anion radical.

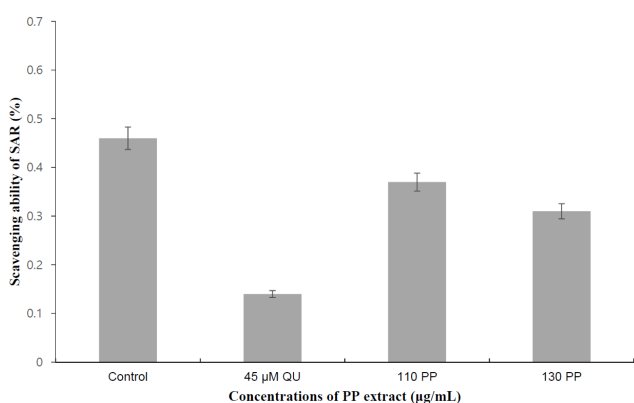


Figure 4. The superoxide anion radical (SAR)-scavenging ability of *Parnassia palustris* L. (PP) extract determined at a wavelength of 560 nm. The data indicate the mean \pm SD for triplicate experiments.

심이 집중되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 FeSO_4 의 신경독성을 산화적 손상 측면에서 알아보기 위하여 C6 glioma 세포를 배양하여 조사하였다. 이를 위해, 배양중인 세포에 30~70 μM 농도의 FeSO_4 를 각각 48시간 동안 처리한 결과 농도의존적으로 세포생존율을 유의하게 감소시켰으므로 세포독성을 나타냈다. 또한 이 과정에서 XTT₅₀값이 63.3 μM 에서 나타남으로서 Borenfreund와 Puerner [21]의 독성판정기준에 의하여 고독성(highly-cytotoxic)인 것으로 나타났다. 본 결과는 Pyo 등 [15]이 피부세포에 대한 FeSO_4 의 세포독성을, Jung [13]이 섬유아세포에 대한 FeSO_4 의 세포독성을 보고한 연구 결과와 일치하였다. 이같이 FeSO_4 가 C6 glioma 세포에 신경독성을 보인 것은 FeSO_4 가 카드뮴 화합물처럼 세포내 DNA합성을 방해하였거나[22], 또는 세포내 단백질합성계에 영향을 주었을 가능성을 배제할 수는 없지만[23], 그 보다는 FeSO_4 의 산화적 손상에 기인한 가능성이 클 것으로 생각된다. 따라서, 본 연구에서는 FeSO_4 의 독성에 산화적 손상이 관여되었는지를 알아보기 위하여 배양 세포에 FeSO_4 를 처리하기 전에 항산화제의 하나인 35 μM 과 45 μM 농도의 QU를 각각 처리한 결과, 세포생존율이

FeSO_4 만을 처리한 경우인 35.1%에 비하여 각각 47.4%와 59.6%로 FeSO_4 만을 처리한 것과 달리 모두 세포생존율이 유의하게 증가하였다. 본 결과는 항산화제인 QU가 FeSO_4 의 독성을 방어한 것으로서 이는 FeSO_4 의 독성은 산화적 손상이 연관되어 있음을 증명하고 있다. 본 연구는 항산화제인 vitamin E가 FeSO_4 의 독성을 방어하였다는 연구 보고와도 일치하였다[13]. 한편, FeSO_4 의 독성에 대한 PP 추출물의 방어효과에 대한 조사가 있어서, 배양 세포에 FeSO_4 를 처리하기 전에 추출물 110 $\mu\text{g/mL}$ 과 130 $\mu\text{g/mL}$ 농도를 2시간 동안 사전 처리한 결과 FeSO_4 만의 처리인 세포생존율 39.4%에 비하여 51.5%와 60.6%로 FeSO_4 만의 처리에 비하여 모두 유의한 증가를 보였다. 본 결과는 PP 추출물이 FeSO_4 의 독성을 방어한 것으로서 이는 PP 추출물처럼 flavonoid 성분들을 함유하고 있는 청미래덩굴(*Smilax china* L., SC) 추출물이 FeSO_4 의 독성을 방어하였다는 연구 보고와도 일치하였다. 이 같은 현상은 PP나 SC 추출물속에 함유되어 있는 kaempferol이나 quercetin, rutin, tannin과 같은 페놀화합물계통의 flavonoid 성분들의 단독 또는 복합적인 항산화 작용에 기인한 것으로 생각된다. 따라서, 본 연구에서는 PP 추출물속 총 flavonoid와 polyphenol의 함량을 조사하였다. 총함량을 조사한 이유는 위의 각 성분들의 항산화 효능은 이미 잘 알려져 있기 때문에 이들 각 성분들의 효능보다는 총량적 분석을 시행한 것이다. 그 결과, 총 polyphenol과 총 flavonoid 양은 각각 42.8 mg/g과 32.9 mg/g으로 나타났다. 이 결과는 이소람네티닌(isorhamnetin)이나 quercetin과 같은 플라보노이드계통의 성분을 함유하고 있어 높은 항산화능을 나타내고 있는 부들(*Typha orientalis* L., TO) 추출물의 43.5 mg/g, 23.8 mg/g에 비하면, 다소 낮으나 거의 비슷한 함량을 나타내고 있음을 알 수 있었다[24]. 따라서, 본 연구에서는 PP 추출물에 대한 항산화능을 SOD-유사능과 SAR-소거능의 분석을 통해 알아보았다. SOD-유사능은 세포내 항산화계에 위치하고 있는 SOD 효소로서 catalase (CAT)와 함께 대사과정

에서 생성된 자유라디칼을 물로 변환시켜 인체에는 아무런 산화적 손상이 가지 않도록 해주는 기능을 담당하고 있는데 이 같은 유사능력을 측정하는 것이다[19]. 본 연구에서 PP 추출물시료 110 µg/mL와 130 µg/mL의 유사능은 각각 13.6%와 18.4%로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 유사능의 증가를 나타냈다. 본 결과는 Yoon과 Sohn [24]이 연구 보고한 부들(TO) 추출물에서의 21.3% (120 µg/mL)에 비하면 다소 낮으나 거의 비슷한 유사능을 보였다. 한편, SAR-소거능에 있어서는 PP 추출물시료 110 µg/mL와 130 µg/mL의 소거능은 대조군에 비하여 각각 19.6%와 32.6%로 나타나 모두 유의한 소거능의 증가를 나타냈다. 이는 Jung 등[25]이 금은화(*Lonicerae flos*) 추출물에서 보고한 35.8% (100 µg/mL)에 거의 비등한 소거능을 나타냈다. SAR-소거능은 superoxide 음이온 라디칼을 소거하는 능력을 말하는 것으로서 즉, 항산화능을 측정하는 분석법이다[26]. 위에서와 같이 PP 추출물이 SOD-유사능과 SAR-소거능을 보인 것은 PP 추출물속에 함유된 항산화 성분들의 상호작용의 결과라고 생각한다. 따라서, PP 추출성분과 같이 항산화능이 높은 천연물들에 대하여 다양한 분석을 통해 내재된 각 성분들의 생리활성을 더욱 자세히 밝힘으로써 병변 치료의 대체물질 개발에 있어 유용한 자료를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

요약

본 연구는 배양 C6 glioma 세포를 재료로 파킨슨병의 유발 물질인 황산철(FeSO_4)의 신경독성과 이에 대한 물매화(*Parnassia palustris* L., PP) 추출물의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 세포생존율을 비롯한 슈퍼옥사이드(SOD)-유사능 및 과산화수소음이온 라디칼(SAR)-소거능과 같은 항산화 효과를 분석하였다. 본 연구에서 FeSO_4 는 처리농도에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시켰으며, 이 과정에서 XTT_{50} 값이 63.3 µM로 나타나 Borenfreund and Puerner의 독성판정기준에 따라 고독성 (highly-toxic)인 것으로 나타났다. 또한, 항산화제의 일종인 quercetin은 FeSO_4 의 독성으로 손상된 세포생존율을 유의하게 증가시켰다. 한편, PP 추출물은 FeSO_4 만을 처리한 것에 비하여 세포생존율을 유의하게 증가시켰으며, 동시에 SOD-유사능과 SAR-소거능과 같은 항산화능을 나타냈다. 이상의 결과로부터, FeSO_4 의 세포독성에 산화적 손상이 관여하고 있으며, PP 추출물은 항산화 효과에 의하여 FeSO_4 에 의한 세포독성을 효과적으로 방어하였다. 결론적으로, 물매화 추출물과 같은 천연물은 FeSO_4 와 같이 산화적 손상과 관련된 질환을 유발시키는 중금속화합물에 의한 독성을 개선 내지는 치료하는데 유용한 소재

라고 생각된다.

Acknowledgements: This paper was supported by Wonkwang Health Science University in 2022.

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Seo YM¹, Professor; Yang SB², Professor.

REFERENCES

- Dorsey ER, Bastiaan RB. The Parkinson pandemic—a call to action. *JAMA Neurology*. 2018;75:9-10. <https://doi.org/10.1001/jamaneuro.2017.3299>
- Finkelstein DI, Billings JL, Adlard PA, Ayton S, Sedjater A, Masters CL, et al. The novel compound PBT434 prevents iron mediated neurodegeneration and alpha-synuclein toxicity in multiple models of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2017;5:1-16. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0456-2>
- Gibb WRG, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry Res*. 1988;51:745-752. <http://doi.org/10.1136/jnnp.51.6.745>
- Yang KH. A study of degeneration of the dorsal vagal nucleus in Parkinson's disease and Lewy body disease. *Kor J Gerontol*. 1997;7:52-57.
- Kanthasamy AG, Kitazawa M, Kanthasamy A, Anantharam V. Dieldrin-induced neurotoxicity: relevance to Parkinson's disease pathogenesis. *Neurotoxicology*. 2005;26:701-719. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2004.07.010>
- Lee DY, Heo YS, Kim KH. Analysis of technology trends and technology convergence for Parkinson's disease therapeutics: Based on global patent information. *Korea Convergence Society*. 2020;3:135-143. <https://doi.org/10.15207/JKCS.2020.11.3.135>
- Lee SH, Seo YM. Alleviating effects of *Euphorbiae humifusae* L. extract on the neurotoxicity induced by lead. *Korean J Clin Lab Sci*. 2018;50:501-510. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2018.50.4.501>
- Chung JH, Rim TS, Seo YM. Protective effect of *Albizia julibrissin* leaf extract on the cytotoxicity induced by cupric acetate metallic mordant. *J Environ Health Sci*. 2019;45:520-528. <https://doi.org/10.5668/JEHS.2019.45.5.520>
- Jeong TS, Kim JG. *Parnassia palustris* population differences in three Korean habitat types. *Landscape and Ecological Engineering*. 2017;13:93-105. <https://doi.org/10.1007/s11355-016-0305-7>
- Hu YL, Li QQ, Zhang CH, Zhang J, Zhang CH, Cui ZH, et al. Flavonoids from *Parnassia palustris* Linn (Saxifragaceae). *Biochem Syst Ecol*. 2013;48:70-72. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.12.014>
- Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta*. 2001;212:323-331. <https://doi.org/10.1007/s004250000400>
- Yu H, Guo F, Liu D, Zhang Z. Complete chloroplast genome sequence of *Parnassia palustris* (Celastraceae). *Mitochondrial*

- DNA PartB. 2019;4:1503-1504. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1598808>
13. Jung JY, Seo YM, Jung IJ. Antioxidative effect of *Crataegi fructus* extract on the cytotoxicity of FeSO₄, hair dye component. *J Invest Cosmetol*. 2013;9:355-360.
 14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 1983;65:55-63.
 15. Pyo AJ, Yoon MY, Yang HO. Cytotoxicity and protective effects of *Smilax china* L. extract on melanogenesis by FeSO₄, an autooxidant of melanin formation. *Kor J Aesth & Cosm*. 2013;11:77-83.
 16. Chung JH, Lee GW, Seo YM. Protective Effect of *Aster tataricus* L. Extract on the dermal cytotoxicity induced by sodium bromate, oxidant of hair dye. *Biomed Sci Letters*. 2019;25:348-356. <https://doi.org/10.15616/BSL.2019.25.4.348>
 17. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official method of analysis. 12th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C. USA. 2005. p127-130.
 18. Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the three radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol*. 2000;71:109-114. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00189-0)
 19. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974;47:468-474.
 20. de-Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006;5:525-535. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70471-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70471-9)
 21. Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth*. 1985;9:7-9. <https://doi.org/10.1007/BF01666038>
 22. Coogan TP, Bare RM, Waalkes MP. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1992;113:227-233. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(92\)90118-C](https://doi.org/10.1016/0041-008X(92)90118-C)
 23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-protein reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-271.
 24. Yoon KC, Sohn YW. Antioxidative effect of *Typha orientalis* L. extract on the oxidative stress induced by cytotoxicity of cadmium sulfate. *JEHS*. 2019;45:62-70. <https://doi.org/10.5668/JEHS.2019.45.1.62>
 25. Jung JY, Jung IJ, Jekal SJ. The protective effect of *Lonicerae flos* extract on cultured C6 glioma cells damaged by aluminum of dementia inducer. *Korean J Clin Lab Sci*. 2017;49:271-278. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2017.49.3.271>
 26. Kim TY, Jekal SJ. Antioxidative effect of *Chelidonium majus* extract on cultured NIH3T3 fibroblasts injured by cadmium chloride of toxicant. *Kor J Clin Lab Sci*. 2016;48:1-7. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2016.48.1.1>