

매자나무 Ethyl acetate 분획물의 예쁜 꼬마선충 내의 항산화 효과

최지우¹ · 김준형² · 이재혁^{3*} · 김대근^{1*}

¹우석대학교 약학과, ²우석대학교 식품생명공학과, ³남부대학교 응급구조학과

Antioxidant Activity of Ethyl acetate Fraction of *Berberis koreana* Palibin in *Caenorhabditis elegans*

Ji Woo Choi¹, Jun Hyeong Kim², Jae Hyeok Lee^{3*}, and Dae Keun Kim^{1*}

¹Department of Pharmacy, Woosuk University, Wanju, Jeonbuk 55338, Korea

²Department of Food and Biotechnology, Woosuk University, Wanju, Jeonbuk 55338, Korea

³Department of Emergency Medical Rescue, Nambu University, Gwangju 62271, Korea

Abstract – Ethyl acetate (EA) soluble fraction of the *Berberis amurensis* (Berberidaceae) methanol extract showed the potent DPPH radical scavenging activity through *Caenorhabditis elegans* model system. The EA 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, SOD-3 expression was conducted using a transgenic strain (CF1553) to confirm that the regulation of the stress response gene is responsible for the increased stress tolerance of *C. elegans* treated by the EA fraction. As a result, the EA soluble fraction of *B. amurensis* increased SOD and catalase activity, and decreased ROS accumulation in a dose-dependent manner. Furthermore, the EA fraction-treated CF1553 worm showed higher SOD-3::GFP intensity than the control worm.

Keywords – *Berberis koreana*, *Caenorhabditis elegans*, Antioxidant activity, ROS, SOD

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 생체 내에서 산소의 산화 과정에서 생성되는데 NADPH oxidases, xanthine oxidase 및 mitochondria 등과 관련되어 있다.¹⁾ ROS는 세포의 핵산, 지질, 단백질 등을 손상시켜 그들의 기능 변화를 일으키고, 세포의 노화를 촉진하며 면역력을 약화시켜 다양한 염증성 질환 및 암을 비롯한 고혈압, 동맥경화, 뇌졸중 등의 질병을 초래한다고 보고되고 있다.²⁾ 인체는 산화적 스트레스를 유도하는 ROS를 제거하기 위하여 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GPX), peroxiredoxin(PRX) 및 glutathione S-transferase(GST)와 같은 항산화 방어기전을 가지고 있다.^{3,4)} 이러한 효소들의 항산화 방어기전과 더불어 유해한 활성산소를 제거하기 위한 천연물 항산화 효능이 물질을 찾기 위한 연구는 지속적으로 이루어지고 있다. 기존에 알려진 vitamin A, C, E와 더불어 천연물에서 확인되는 polyphenol 화합물들은 우수한 유해 활성산소종을 제거하는 효능이 다수의 논문이 보여

주고 있다. 안전하고 자연스럽게 섭취할 수 있으면서 과도한 ROS를 제거할 수 있는 천연 생리활성 물질의 탐색과 기능성 식품을 개발하려는 다양한 연구가 필요하다.⁵⁾

매자나무(*Berberis koreana*, Berberidaceae)는 한국특산식물로 대체로 널리 분포하고 있으며, 소염, 진통, 항균, 항암 및 호흡기 질환 예방을 목적으로 사용되어온 낙엽관목으로 항산화 및 항균 활성이 보고되어 있다.^{6,7)} 본 연구는 국내 자생 천연물 중 항산화 및 항노화 활성이 우수한 물질을 찾는 검색과정에서 매자나무 methanol 추출물의 우수한 DPPH radical 소거활성을 확인하고, 매자나무 추출물의 분획물을 제조한 후 예쁜꼬마선충을 이용하여 *in vivo*에서 항산화 능력을 측정하였다. 매자나무 methanol 추출물을 용매를 이용하여 분획한 다음 각 분획물에 대해 vitamin C를 대조군으로 DPPH free radical 소거능을 측정한 후 가장 강한 소거능을 보인 ethyl acetate 분획물을 확보하였다. 이 분획에 대하여 수명 관련 실험모델로 이미 알려진 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 이용하여 산화적 스트레스 등에 대한 저항 효능을 확인하였다.⁸⁾ 또한 산화적 스트레스에 저항하는 단백질의 증가 여부를 확인하기 위해 형질전환 선충을 이용하여 유전

*교신저자(E-mail): dkkim@woosuk.ac.kr, jhlee@nambu.ac.kr
(Tel): +82-63-290-1574, +82-62-970-0162

자 발현 증가 여부 실험을 실시한 후 몇 가지 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 매자나무는 전초를 2023년 1월에 산림청 국립수목원에서 제공받아 김대근 교수가 검증한 후에 음건세절하여 사용하였으며, 표준품은 우석대학교 약학대학 생약표본실에 보관하고 있다(WS-22-009).

추출 및 분획 - 매자나무를 음건세절 후 얻은 시료 500 g 을 methanol로 50 °C에서 5시간씩 2회 온침 추출하였다. 그 알코올 추출액을 수욕상에서 농축하여 methanol 엑스 약 43 g을 얻었으며, 이 methanol 엑스를 증류수로 현탁시킨 후 동량의 *n*-hexane(2.9 g), methylene chloride(1.4 g), ethyl acetate(0.6 g)과 *n*-butanol(14.5 g)으로 분획하여 각각의 분획물을 확보하였다.

DPPH Free Radical 소거법에 의한 항산화 활성⁹⁾ - 96 well plate를 이용하여 각각의 시료를 ethanol로 각 농도별로 조제하고, 여기에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)(ethanol)을 일정량씩 가하고, 10초간 진탕한 후 25 °C에서 30분간 반응시킨 다음 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control로 vitamin C를 사용하였으며, 각 시료에 대하여 3회 반복하여 결과를 확인하였다.

예쁜꼬마선충(Caenorhabditis elegans) 배양¹⁰⁾ - 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)은 *E. coli* OP50를 도말하고 20 °C에서 Nematode Growth Medium (NGM) agar plate상에서 배양하여 사용하였다. DMSO에 용해한 매자나무 분획을 멸균한 NGM plate(50 °C)에 첨가하며, 최종 DMSO 농도는 0.1%(v/v)를 유지하였다.

선충 체내의 항산화 효소(SOD, catalase) 활성^{11,12)} - 매자나무 시료를 농도별로 조제한 plate에 성장 단계가 동일한 N2 선충을 배양하였다. 성체가 되고 2일째에 모은 선충을 M9 buffer로 세척 후 분쇄하여 효소의 활성을 측정하였다(homogenization buffer: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5). SOD 활성은 10 mM phosphate buffer (pH 8.0)를 용매로 반응 혼합물(1.6 mM xanthine과 0.48 mM NBT 0.49 mL)을 만든 뒤 시료 10 µL를 가한 뒤 37 °C에서 5분간 pre-incubation시켰다. 다음에 xanthine oxidase 100 µL (0.05 U/mL)를 첨가하고 37 °C에서 20분 동안 incubation시킨 다음 69 mM SDS로 반응을 멈추고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹¹⁾ Catalase 활성은 25 mM H₂O₂에 매자나무 분획의 농도별 시료 50 µL를 3분 동안 반응시키고 240 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹²⁾

선충 세포 내 활성 산소종(ROS) 분석¹³⁾ - 선충 세포 내 ROS는 2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate(H₂DCF-

DA)를 사용하여 측정하였다. 시료를 농도별 첨가한 plate에 성장 단계가 동일한 선충을 배양하였는데, 성체가 된 후 4 일째되는 선충을 50 µM juglone을 함유한 M9 buffer에 넣고 2시간 노출시킨 다음, M9 buffer가 50 µL씩 담긴 96 well plate에 5마리씩 옮겼다. 여기에 100 µM의 H₂DCF-DA 50 µL를 첨가한 뒤 흡광도를 여기 485 nm, 방출 535 nm에서 각각 측정하였다.

산화적 스트레스 저항성 측정¹⁴⁾ - Oxidative stress에 의한 내성은 성체가 된 후 7일째에 일시적으로 선충을 1 mM juglone이 함유된 M9 buffer가 담긴 96 well plate에 옮기고 시간 별로 생존율을 확인하였다.

형질전환 선충 내 SOD-3::GFP 형광 측정 - 형질 전환된 선충(mutant)으로 SOD-3::GFP 유전자를 포함하는 선충 CF1553을 농도별로 투여된 배지에서 배양하였다. 성체가 된 후 3일째에 선충을 sodium azide(4%)로 마취시켰고 발현된 GFP를 형광 실체 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 발현강도를 정량분석은 현미경을 이용한 사진 촬영과 ImageJ 소프트웨어를 사용하였다.

통계 분석 - 통계 자료의 값은 평균값 ± 표준오차(mean ± S.E.M.)로 표시하였다. 그룹 간의 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 - 매자나무 분획물 중에서, DPPH radical 소거 효과는 *n*-hexane 분획이 135.3 µg/mL, methylene chloride 분획이 75.3 µg/mL, ethyl acetate 분획이 24.1 µg/mL와 *n*-butanol 분획이 87.7 µg/mL의 IC₅₀값을 나타내어 그 중에서 ethyl acetate 분획이 가장 높은 소거능을 보여 주었다(vitamin C, IC₅₀ value, 7.9 µg/mL)(Fig. 1).

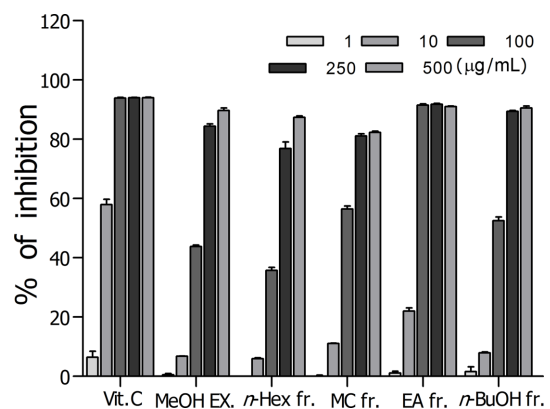


Fig. 1. DPPH radical scavenging effects of the methanol extract, and its fractions from *B. koreana*.

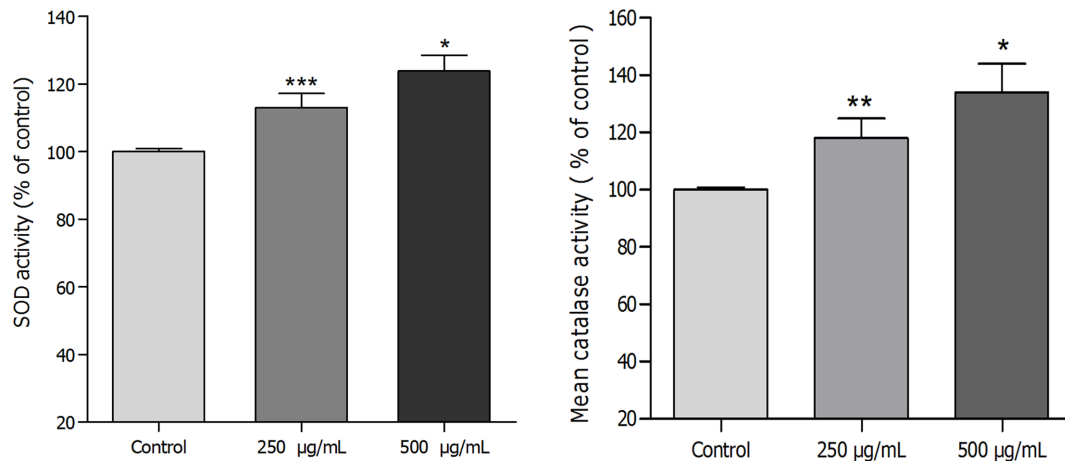


Fig. 2. Effects of ethyl acetate fraction of *B. koreana* on the antioxidant enzyme activity of wild-type N2 nematode. (A) The enzymatic reaction of xanthine with xanthine oxidase was used to generate $\cdot\text{O}_2^-$ and the SOD activity was estimated spectrophotometrically through formazan formation by NBT reduction. The SOD activity was showed 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.

항산화 효소(SOD, Catalase) 활성 증가 효능 - Xanthine을 기질로 xanthine oxidase의 효소반응으로 생성되는 superoxide anion을 측정하여 SOD의 활성을 확인한 결과, 매자나무 ethyl acetate 분획물 투여군은 SOD의 활성을 농도의존적으로 증가시켰다. Ethyl acetate 분획 500 µg/mL 투여군은 대조군에 비해 SOD 활성을 약 23.9% 증가시켰다($*p<0.05$). 활성산소종의 일종인 hydrogen peroxide를 대사시키는 catalase의 활성은 ethyl acetate 분획 500 µg/mL 투여군이 대조군에 비해 약 34.0% 증가시키는 것으로 확인되었다($**p<0.01$)(Fig. 2).

활성 산소종(ROS) 감소 효능 - 매자나무 ethyl acetate 분획의 세포 내 ROS의 감소 효능은 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 와 선충 내부의 활성 산소종을 반응시켜 형성된 형광을 관찰하는 것으로, 형광의 감소폭은 대조군과 비교하여 매자나무 ethyl acetate 분획 500 µg/mL 투여군에서 평균 약 33.19% ($*p<0.05$) ROS를 감소시키는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

산화적 스트레스 저항성 증가 효능 - 매자나무 ethyl acetate 분획의 산화적 스트레스에 미치는 영향 평가에서 분획을 처리하지 않은 대조군 선충의 최고 생존시간은 22시간이었으나, ethyl acetate 분획 500 µg/mL 농도에서 생존시

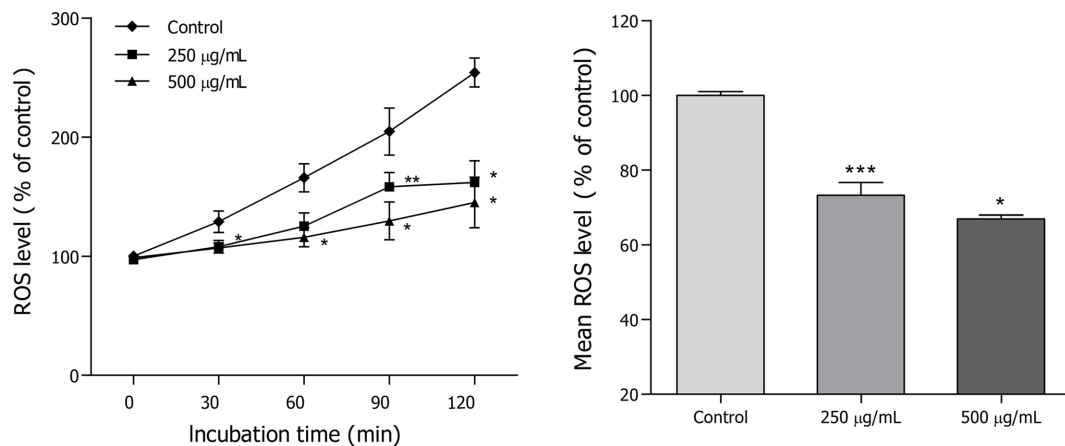


Fig. 3. Effects of ethyl acetate fraction of the *B. koreana* on the intracellular ROS levels of wild-type N2 nematodes. Intracellular ROS accumulation was examined in a microplate fluorescence reader at 535 nm (emission) and 485 nm (excitation). (A) Plates were read for 120 min. (B) The average percentages of intracellular ROS accumulation were presented. Differences compared with the control were considered significant at $*p<0.05$, $**p<0.01$ and $***p<0.001$ by the one-way ANOVA.

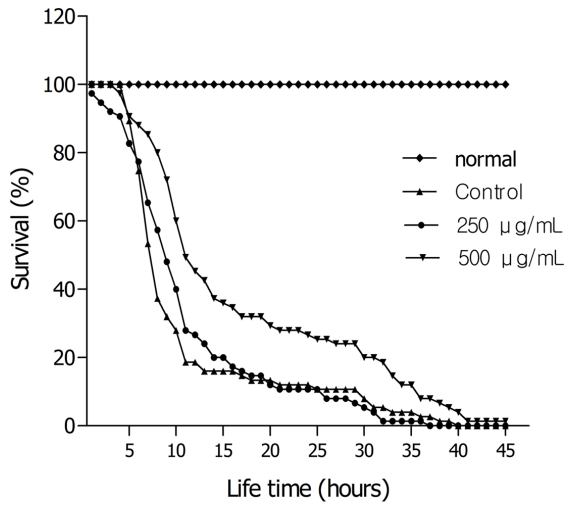


Fig. 4. Effects of ethyl acetate fractions of *B. koreana* on the stress tolerance of wild-type N2 nematodes. For the oxidative stress assays, worms were transferred to 96-well plate containing 1 mM of juglone liquid culture, and then their viability was scored. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test.

간을 40시간으로 증가시켰다. 대조군의 평균 생존 시간이 20.0 ± 0.7 시간이었으나 500 µg/mL 농도 처리군은 32.7 ± 1.1 시간으로 63.5%의 생존 시간을 향상시켰다 (** $p < 0.01$) (Fig. 4, Table I).

형질 전환 선충 내 SOD-3의 발현 증가 효능 - 매자나무 ethyl acetate 분획의 선충 내에서 산화적 스트레스에 대한 저항 단백질의 증가 여부를 알려주는 SOD발현 유전자의 증가 여부를 SOD-3을 포함한 형질 전환 선충 CF1553을 사용하여 실험하였다. 결과적으로 CF1553 형질전환 선충에 ethyl acetate 분획 500 µg/mL 처리군이 대조군에 비해 39.6%의 상승된 SOD-3::GFP 발현율을 보여 주었다 (* $p < 0.05$, (Fig. 5A, 5B).

고 찰

예쁜꼬마선충은 염기서열과 유전자 구조가 완전히 밝혀졌으며, 수명연장등의 항노화모델이나 화학물질의 환경영향평가 모델 등 다양한 용도로 사용되고 있다. 이 모델을 이용하여 매자나무 ethyl acetate 분획에 대한 항산화 효과

Table I. Effects of ethyl acetate fraction of *B. koreana* on the oxidative stress tolerance of *C. elegans*

Stress condition	Fraction	Mean lifespan (h)	Maximum lifespan (h)	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
1mM Juglone	Control	20.0 ± 0.7	22	-	-
	250 µg/mL	23.7 ± 1.0	29	18.5	-
	500 µg/mL	32.7 ± 1.1	40	63.5	** $p < 0.01$

Mean lifespan presented as mean \pm 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. Difference compared to the control was considered significant at ** $p < 0.01$.

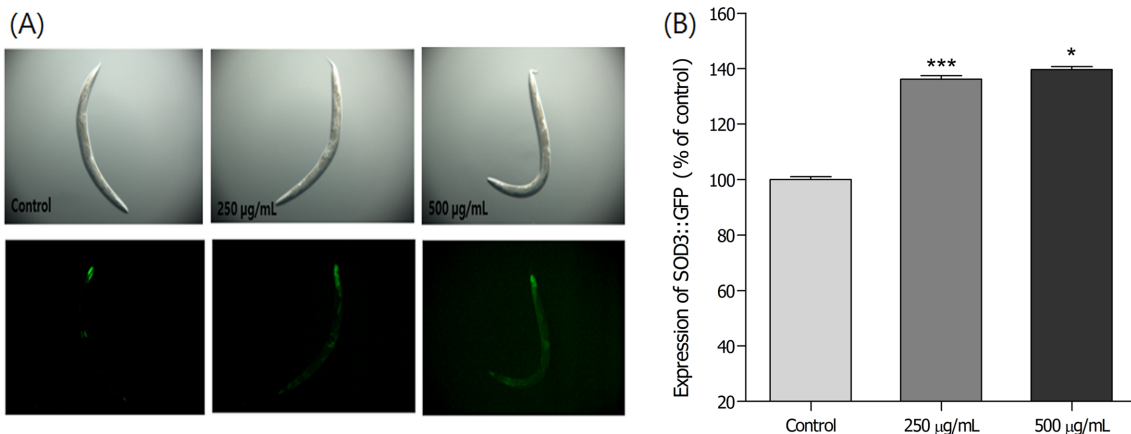


Fig. 5. Effect of ethyl acetate fraction of *B. koreana* on the expression of SOD-3 was determined using transgenic nematodes. (A) Images of SOD-3::GFP expression of CF1553 worm in the presence or absence of ethyl acetate fraction. (B) The mean GFP intensity of mutant was represented as mean \pm S.E.M. 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. Differences compared with the control were considered significant at * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA.

에 대한 실험을 진행하였다^{15,16} 매자나무 methanol 추출물 분획물의 DPPH radical 소거활성 실험에서, ethyl acetate 분획이 가장 강한 효과를 보여 주었다. Ethyl acetate 분획은 선충 내 항산화 효소인 SOD 및 catalase의 활성을 높였으며, juglone을 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 선충 내의 ROS의 수치를 측정된 결과 강한 ROS의 축적억제 효능을 보여 주었다. 산화적 스트레스를 juglone을 처리하여 발생시킨후 ethyl acetate 분획을 처리한 결과 대조군과 비교하여 생존율이 농도 의존적으로 상당히 증가하는 것을 확인하였다. 이와 관련된 기전연구의 하나로 형질전환 선충 (GFP-fused transgenic strain CF1553)를 이용하여 산화적 스트레스 저항 단백질 발현 여부를 확인한 결과 형광 발현율이 크게 증가함이 확인되어 산화적 스트레스에 저항할 수 있는 단백질이 상당량 발현 되었음이 확인되었다.

정상적인 세포 활동의 부산물로 생성되는 적당량의 ROS의 생성은 중앙 세포의 발생을 억제하는등 신호 전달 경로에서 중요한 역할을 하지만 과잉의 ROS생산은 암, 심혈관, 신경 퇴행 및 대사 장애 등의 질병과 염증이나 노화와 관련이 있음이 보고되어 있다. 또한, 산화적 스트레스는 DNA 손상을 통해 중앙의 시작, 진행 및 치료에 대한 저항성을 촉진하여 세포 대사, 돌연변이나 유전자 불안정성을 초래할 수 있음이 보고되어 있다.¹⁷

매자나무 ethyl acetate 분획은 선충 체내의 항산화효소인 SOD나 catalase 등의 활성을 증가시키며, ROS의 축적을 억제하고 산화적 스트레스에 대한 저항력을 높여 주므로 선충의 수명연장에 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상된다.¹⁸ 이러한 결과는 기존의 매자나무 껍질의 DPPH와 xanthine oxidase 소거효과와 항염, 항암활성이 있음을 보고한 결과와 잘 부합되는 결과이며,^{19,21} 매자나무에서 보고된 phenolic 화합물 성분 등이^{22,23} 이러한 선충의 항산화 활성 및 스트레스 저항능력에 영향을 줄 것으로 생각된다. 앞으로 매자나무의 활성물질에 대한 물질의 분리와 구조확인 및 단일 화합물의 선충 내의 항산화 활성 연구 및 그 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

매자나무 ethyl acetate 분획은 강한 DPPH free radical 소거활성을 나타냈으며, 예쁜꼬마선충 내의SOD 및 catalase의 활성을 농도 의존적으로 높여 주었다. 선충 세포 내의 ROS의 발생을 농도 의존적으로 감소시켰으며, juglone으로 유도된 산화적 스트레스 조건에서 선충의 생존율을 농도 의존적으로 증가시켰다. 형질전환 선충인 GFP-fused transgenic strain CF1553을 이용한 산화적 스트레스 관련 단백질 발현 여부 실험에서는 대조군에 비해 농도 의존적으로 상승된 형광발현율을 보여주어 산화적 스트레스에 저항하는 단백질

이 발현됨이 확인되었다. 이러한 결과는 매자나무 ethyl acetate 분획은 항산화 및 이와 관련된 질병에 대처하기 위한 자원으로서의 가치가 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Bouviere, J., Fortunato, R. S., Dupuy, C., Werneck-de-Castro, J. P., Carvalho, D. P. and Louzada, R. A. (2021) Exercise-stimulated ROS sensitive signaling pathways in skeletal muscle. *Antioxidants (Basel)* **10**: 537.
2. Jelic, M. D., Mandic, A. D., Maricic, S. M. and Srdjenovic, B. U. (2021) Oxidative stress and its role in cancer. *J. Cancer Res. Ther.* **17**: 22-28.
3. Abd Al Moaty, M. N., El Ashry, E. S. H., Awad, L. F., Mostafa, A., Abu-Serie, M. M. and Teleb, M. (2022) Harnessing ROS-Induced oxidative stress for halting colorectal cancer via thiazolidinedione-based SOD inhibitors. *ACS Omega* **7**: 21267-21279.
4. Galasso, M., Gambino, S., Romanelli, M. G., Donadelli, M. and Scupoli, M. T. (2021) Browsing the oldest antioxidant enzyme: catalase and its multiple regulation in cancer. *Free Radic. Biol. Med.* **172**: 264-272.
5. Liu, Z. Q. (2022) Why natural antioxidants are readily recognized by biological systems? 3D architecture plays a role! *Food Chem.* **380**: 132143.
6. Yoo, S. J., Lee, K. B. and Kwak, J. H. (1986) Studies on the seasonal variation of contents in *Berberis koreana*. *Kor. J. Pharmacogn.* **17**: 123-128.
7. Ha, J. H., Kwon, M. C., Seo, Y. C., Choi, W. Y., Chung, E. K., Chung, A. R., Kim, J. C., Ahn, J. H. and Lee, H. Y. (2010) Comparison of anticancer activities of *Berberis koreana* extracts obtained by different extraction processes. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**: 233-239.
8. Durán, B., A., Manzano, S., G., Sánchez, I., G., Arribas, M., V., M., Bartolomé, B., Buenhombre, M., S., Guadarrama, A., Buelga, C., S. and Paramás, A., M., G. (2019) Antioxidant characterization and biological effects of grape pomace extracts supplementation in *Caenorhabditis elegans*. *Foods* **75**: 1-14.
9. 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.
10. Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
11. 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.
12. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**:

- 121-126.
13. 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.
 14. 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.
 15. Kang, S.-H., Jeong, I.-S. and Lim, H.-S. (2021) A method for the classification of water pollutants using machine learning model with swimming activities videos of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of the Korea Institute of Information and Communication Engineering* **25**: 903-909.
 16. Luo, S., Jiang, X., Jia, L., Tan, C., Li, M., Yang, Q., Du, Y. and Ding, C. (2019) In vivo and in vitro antioxidant activities of methanol extracts from olive leaves on *Caenorhabditis elegans*. *Molecules* **704**: 1-14.
 17. Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S. and Dmitriev, A. A. (2019) ROS generation and antioxidant defense Systems in normal and malignant cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**: 6175804.
 18. Dilberger, B., Baumanns, S., Schmitt, F., Schmiendl, T., Hardt, M., Wenzel, U. and Eckert, G. P. (2019) Mitochondrial oxidative stress impairs energy metabolism and reduces stress resistance and longevity of *C. elegans*. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**: 6840540.
 19. Qadir, S. A., Kwon, M. C., Han, J. G., Ha, J. H., Chung, H. S., Ahn, J. and Lee, H. Y. J. (2009) Effect of different extraction protocols on anticancer and antioxidant activities of *Berberis koreana* bark extracts. *Biosci. Bioeng.* **107**: 331-338.
 20. Yoo, K. Y., Hwang, I. K., Kim, J. D., Kang, I. J., Park, J., Yi, J. S., Kim, J. K., Bae, Y. S. and Won, M. H. (2008) Anti-inflammatory effect of the ethanol extract of *Berberis koreana* in a gerbil model of cerebral ischemia/reperfusion. *Phytother. Res.* **22**: 1527-1532.
 21. Kim, K. H., Choi, S. U. and Lee, K. R. (2018) Bioactivity-guided isolation of cytotoxic triterpenoids from the trunk of *Berberis koreana*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**: 1944-1947.
 22. Kim, K. H., Choi, S. U., Ha, S. K., Kim, S. Y. and Lee, K. R. (2009) Biphenyls from *Berberis koreana*. *J. Nat. Prod.* **72**: 2061-2064.
 23. Kim, K. H., Moon, E., Choi, S. U., Kim, S. Y. and Lee, K. R. (2011) Biological evaluation of phenolic constituents from the trunk of *Berberis koreana*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**: 2270-2273.
- (2023. 6. 7 접수; 2023. 6. 14 심사;
2023. 6. 16 게재확정)