

## 인진쑥 노루궁뎅이 버섯균사체 발효물의 항산화 활성

김승섭<sup>1</sup> · 경인구<sup>2</sup> · 이미라<sup>2</sup> · 김동구<sup>2</sup> · 신지영<sup>2</sup> · 양진이<sup>1</sup> · 이광호<sup>1</sup> · 음원식<sup>3</sup> · 강정훈<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>청주대학교 바이오메디컬학과, <sup>2</sup>(주)코시스바이오 기업부설연구소, <sup>3</sup>한림대학교 바이오메디컬학과  
(2014년 11월 20일 접수; 2014년 12월 9일 수정; 2014년 12월 16일 채택)

### Antioxidative activities of *Artemisia capillaris*-Fermented *Hericium erinaceum* Mycelium

Seung-Sub Kim<sup>1</sup> · Inn-Goo Kyeong<sup>2</sup> · Mi-La Lee<sup>2</sup> · Dong-Goo Kim<sup>2</sup> · Ji-Young Shin<sup>2</sup>  
Jin-Yi Yang<sup>1</sup> · Gwang-Ho Lee<sup>1</sup> · Won-Sik Eum<sup>3</sup> · Jung-Hoon Kang<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biomedical Science, Cheongju University, Chungbuk 360-764, Korea

<sup>2</sup>R & D Center, Cosis Bio Corporation Limited, Chungbuk 365-863, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Biomedical Science, Hallym University, Gangwondo 200-702, Korea

(Received November 20, 2014; Revised December 9, 2014; Accepted December 16, 2014)

**요약** : 노루궁뎅이 버섯균사체(*Hericium erinaceum*)를 인진쑥(*Artemisia capillaris*)에 배양하여 조제한 AC-HE 열수 추출물이 생체고분자의 산화적 손상과 세포사멸을 보호할 수 있는지를 관찰하였다. AC-HE의 항산화 활성을 DPPH radical, ABTS radical, peroxy radical 소거활성 측정을 통해 알아보았다. 그 결과 DPPH radical 소거활성은 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 61.73%, ABTS radical 소거활성은 250  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 97.39%, peroxy radical 소거활성은 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 44.18%로 나타났다. AC-HE는 DNA의 산화적 손상을 효과적으로 억제하였다. 또한 생체고분자물질인 사람의 혈청단백질의 산화적 손상을 억제하였다. 세포에  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리하였을 때 세포생존율에 비하여 발효물을 100  $\mu\text{g/mL}$  농도로 전 처리한 세포생존율은 11.47% 증가했으며, 발효물을 50  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리했을 경우 세포 내 ROS의 축적이 유의적으로 감소되었다. 따라서 AC-HE는 항산화 활성뿐만 아니라 산화적 스트레스에 의해 야기되는 세포 독성에 대한 보호 작용이 뛰어난 것으로 사료되었다.

**주제어** : 산화적 변형, 생체고분자, 항산화 활성, 활성산소종

**Abstract** : The hot water extract from *Artemisia capillaris* fermented with *Hericium erinaceum* mycelium (AC-HE) were assessed for the protection against oxidative modification of biological macromolecules and cell death. Antioxidant activity of AC-HE evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical and peroxy radical scavenging assays. AC-HE showed 61.73% DPPH radical scavenging activity at 500  $\mu\text{g/mL}$ , 97.39% ABTS radical scavenging activity at 250  $\mu\text{g/mL}$ , and 44.18% peroxy radical

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: jhkang@cju.ac.kr)

scavenging activity at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . AC-HE were shown to significantly inhibited DNA strand breakage induced by peroxy radical. AC-HE also prevented peroxy radical-mediated human serum albumin modification. AC-HE effectively inhibited  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced cell death and significantly increased of the 11.47% cell survival at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . AC-HE also decreased intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated cells. The results suggested that AC-HE can contribute to antioxidant and protected cells from oxidative stress-induced cell injury.

*Keywords* : oxidative modification, biological macromolecules, antioxidant activity, reactive oxygen species.

## 1. 서론

호기성 환경에서 생활하는 인간의 생명활동에 산소는 필수적인 분자이지만 환경오염 물질, 대사 이상, 광화학 반응 및 체내 효소계 등 각종 요인에 의하여 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 생체내에서 적절히 소거되지 않으면 세포에 치명적인 독성을 일으킨다[1-3]. 활성산소종은 세포내의 생체고분자물질들을 비 가역적, 비 선택적으로 공격하여 산화적 손상을 유발 시키며, 세포사멸을 유도하게 된다. 또한 암을 비롯한 면역 질환, 파킨슨병, 뇌졸중, 치매, 퇴행성 뇌질환, 허혈성 심장 질환 등 각종 질병을 유발한다[4-6]. 따라서 활성산소의 생성을 억제하기 위한 목적으로 항산화 기능을 가진 건강기능성식품의 섭취를 통해, 질병예방과 체질개선을 위한 방안이 주목 받고 있다[7].

국화과(Compositae) 쑥속(*Artemisia*)에 속하는 인진쑥(*Artemisia capillaris*)은 한국을 비롯하여 아시아 및 유럽등에 분포하고, 번식력이 강한 다년생 초본으로서 일명 사철쑥(*Artemisia capillaris* Thunb.), 더위지기(*Artemisia iwayomogi*), 제비쑥(*Artemisia angustissima*)등으로 불리우며 생약명으로는 인진호, 인진, 추호라고도 불린다[8]. 인진쑥의 녹엽 내 palmitic acid, linoleic acid, linolenic acid 등의 필수 지방산을 많이 함유하고 있어서 영양학적으로 매우 우수하며 칼슘과 칼륨의 함량이 높아 알칼리성 식품으로 알려져 있으며, 비타민 A와 C의 함량이 산야채류 중에서 가장 높은 것으로 알려져 있다[9]. 인진쑥은 ethanol 추출물이 뛰어난 항산화 활성을 보이며[10], scoparone, capilartemisin A와 B, cirsimaritin, genkwanin, rhamnocitrin 등 4종의 flavonoids 생리활성 물질을 가지고 있다고 알려

져 있다[11].

최근 버섯이 식용뿐만이 아닌 약용으로 이용되고 있으며, 대표적인 약용버섯 중 하나인 노루궁뎅이 버섯(*Hericium erinaceum*)은 동남아시아, 유럽, 일본 등에 분포되어 가을철 활엽수의 고목이나 생목에서 주로 발생한다. 노루궁뎅이버섯에는 탄수화물, 아미노산, 효소, 무기염류, 및 비타민 등이 풍부하며[12,13], 9,10-dihydroxy-8-oxo-12-octadecenic acid와 chitin, heteroxyloglucan, galactoxyloglucan, glucoxyloprotein, glucoxyloxy, xylan 등의 다당체[14], erinacines A, B, C, D[15], hericenones A, B, C, D, E, F, G, H[16-18]등이 포함되어 있다. 노루궁뎅이 버섯의 자실체 생산은 광선, 온도, 습도의 제어를 필요로 하며 유효성분의 추출수율이 낮아 식용이외의 산업화는 미비한 실정이다. 자실체 발생이전 단계인 균사체의 액체배양에 의한 항산화 활성, 항암활성[19], 면역증강 활성[20] 등의 생리활성에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다[21,22]. 또한 *Hericium erinaceum*는 치매억제 기능의 성분인 신경성장인자(nerve growth factor; NGF)물질이 분리되어 치매억제기능[23], 뿐만 아니라 노화억제 기능이 보고되고 있다[24].

현재 다양한 식용식물과 버섯류로부터 생리활성물질에 대한 연구는 활발히 진행되고 있으나 인진쑥과 노루궁뎅이 버섯균사체를 이용한 연구는 찾아보기 어려운 실정이다. 따라서 본 연구에서는 인진쑥을 천연물배지로 하여 노루궁뎅이 버섯균사체를 배양 발효시켜 제조한 발효물의 항산화 활성을 확인하고자 하였다. 이와 같은 연구는 노루궁뎅이 버섯균사체 발효물을 이용한 기능성 식품 개발 및 상업화에 기초적 자료를 제공할 것이며, 향후 보다 더 다양한 실험을 통해 발효물의 유효성분을 이용한 기능성 식품개발 연구에

도움이 될 것으로 기대된다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료

본 실험에 사용한 인진쑥(*Artemisia capillaris*, AC)은 2013년 4월에 강원도 정선군에서 채취한 것을 사용하였으며, 균주로 사용한 노루궁뎅이 버섯(*Hericium erinaceum*, HE)균사체는 충북농업기술원(Chungbuk, Korea)으로부터 분양받아 potato dextrose agar(PDA, Difco, Detroit, MI, USA) 사면배지에서 25°C에서 10일간 배양한 후 4°C에 보존한 노루궁뎅이 버섯균사체를 사용하였다. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), phosphate buffer saline (PBS), trichloroacetic acid (TCA), thiobarbituric acid (TBA), human serum albumin (HSA), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dimethyl sulfoxide (DMSO), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), 등은 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, sodium dodecyl sulfate (SDS)는 Bio-Rad (Hercules, California, USA)로부터 구입하였다. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)는 Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany)에서 구입하여 사용하였고, 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)는 Wako(Chuo-Ku, Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 인진쑥 발효

인진쑥의 발효는 인진쑥을 수세한 후 실온에서 3-4일간 건조시켜 수분함량을 조절한 다음 건조물 100 g에 1.5배수의 물을 첨가하여 3시간 동안 침지 시켜준 후 121°C의 고온에서 2시간 동안 고압멸균 하였다. 고압멸균 시킨 인진쑥을 냉각한 후 10% 노루궁뎅이 버섯균사체를 접종하여 25°C에서 60일간 배양(multi room incubator, Vision Scientific, Gyeonggi-do, Korea)한 후 60°C에서 2일간 건조시켜 발효 인진쑥을 제조 하였다. 이와 같은 발효물의 열수 추출물 제조를 위해 인진쑥 발효물에 20배의 증류수를 첨가하고 homogenizer (Ultra-turrax T-50, KG-IKA-

Labortechnik, Staufen, Germany)로 5,000 rpm에서 10분간 분쇄한 후 121°C에서 4시간 동안 열수 추출하였으며, 여과지(No. 2, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 잔사와 추출액을 분리하고 잔사는 다시 반복 추출 하였다. 2회 반복 추출 후 총 열수 추출액을 4°C에서 30분 동안 7,600 xg로 원심분리하여 불용성 침전물을 제거하고 상층액을 농축 및 동결건조 하여 실험에 사용하였다.

### 2.3. 항산화 활성 측정

#### 2.3.1. DPPH radical 소거활성

DPPH radical 소거활성을 Brand-Williams 등 [25]의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.1 mM DPPH 900  $\mu$ L를 DMSO 50  $\mu$ L와, AC-HE 50  $\mu$ L를 혼합하여 실온에서 20분간 반응 시킨 후 원심분리(10,000  $\times$ g, 5 min)를 통해 불순물을 제거하고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 다음 식(1)에 의해 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \{1 - (A_{\text{Experiment}}/A_{\text{Control}})\} \times 100 \quad (1)$$

#### 2.3.2. ABTS radical 소거활성

ABTS radical 소거활성을 Brand-Williams 등 [25]의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.5 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 37°C 암실에서 12시간 동안 반응 시킨 후 희석하여 사용하였다. ABTS 900  $\mu$ L에 DMSO 50  $\mu$ L와, AC-HE 50  $\mu$ L를 혼합하여 실온에서 10분간 반응 시킨 후 734 nm에서 흡광도 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 다음 식(2)에 의해 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \{1 - (A_{\text{Experiment}}/A_{\text{Control}})\} \times 100 \quad (2)$$

#### 2.3.3. Peroxyl radical 소거활성

Peroxyl radical 소거활성을 Ohkawa 등[26]의 방법을 변형하여 측정하였다. 50 mM AAPH와 10 mM 2-deoxy-D-ribose를 함께 첨가하여 thiobarbituric acid와 반응할 수 있는 물질인 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)를 유도하기 위해 37°C에서 2시간 동안 반응 시

키고, 1X PBS 용액, 2.8% TCA 용액, 1% TBA 용액을 각각 200  $\mu$ L씩 첨가하고 100°C에서 10분간 가열한다. 반응액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다. Peroxyl radical 소거활성은 다음 식(3)에 의해 백분율로 나타내었다.

$$\text{Peroxyl radical scavenging activity (\%)} \\ = \{1 - (A_{\text{Experiment}}/A_{\text{Control}})\} \times 100 \quad (3)$$

## 2.4. 생체고분자의 산화적 손상에 대한 보호 작용

### 2.4.1. DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

Peroxyl radical에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용을 Kang과 Kim[27]의 방법을 이용하였다. DNA는 pUC19 100  $\mu$ g/mL을 사용하고 DNA의 산화적 손상을 유발시키기 위해 10 mM AAPH를 사용하여 peroxyl radical 생성시켰다. 반응액에 AC-HE를 첨가하여 37°C에서 6시간 동안 반응 시킨 후 gel electrophoresis를 통해 산화적 손상에 대한 보호 작용을 확인하였다.

### 2.4.2. HSA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

HSA의 산화적 손상에 대한 보호 작용을 확인하기 위해 Laemmli [28]의 방법을 이용하였다. HSA의 산화적 손상을 유발시키기 위해 50 mM AAPH를 사용하였고, AC-HE를 첨가하여 37°C에서 6시간 동안 반응 시킨 후 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통해 단백질 띠의 형태를 확인하였다.

## 2.5. 세포사멸에 대한 보호 작용

### 2.5.1. 세포배양 및 세포생존율 측정

세포배양을 위해 NIH3T3 fibroblast 세포를 직경 100 mm culture dish에서 10% bovine calf serum (BCS), 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin을 함유한 DMEM 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기(MCO 17AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 37°C로 배양하여 사용하였다. 세포를 96 well plate에 분주하고 12시간 배양 한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(2 mM/mL)을 처리하여 산화적 스트레스에 의한 세포사멸을 유도하였다. 세포의 생존율은 MTT assay를 통해

ELISA reader(Labsystems Multiskan MCC/340)을 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다 [29,30].

### 2.5.2. ROS 생성 관찰

세포내 ROS 생성 관찰은 DCF-DA염색법을 이용하여 측정하였다[29,30]. 세포를 3×10<sup>4</sup> 크기로 cover glass위에 깔아준 후 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 배양기를 통해 12시간 배양한 후 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 ROS 생성을 유도하였으며, 2~3회 세척 후 20  $\mu$ M DCF-DA를 1시간 동안 반응 시킨 후 형광현미경(Nikon eclipse 80i, Tokyo, Japan)을 통해 확인하였다.

## 2.6. 통계처리

실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험값은 3회 이상 반복 실시한 결과를 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 95%(*P*<0.05)의 유의수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 구간의 유의적 차이를 검증하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 항산화 활성 측정

#### 3.1.1. DPPH radical 소거활성

활성산소는 체내 조직 및 기관에 산화적 스트레스를 일으켜 노화와 질병의 원인이 되고 있으며, 산소를 에너지 대사에 사용하는 NADPH oxidase system을 가진 모든 생물에서 필연적으로 발생하는 것이므로 세포는 이로부터 안전하기 위한 여러 가지 항산화물질과 항산화효소 등의 산화적 손상에 대한 방어기작을 가지고 있다. 그러나, 과도하게 생성된 활성산소는 세포내 생체 고분자에 산화적 손상을 유도하며 최종적으로 세포사멸을 유도한다고 밝혀져 있다[31,32]. 따라서 AC-HE가 세포활성을 유지하는 항산화 활성이 있는지를 확인하기 위하여 발효물의 농도에 따른 radical 소거활성을 측정하였다. DPPH를 이용한 전자공여능 측정법은 식물 추출물의 항산화

활성을 간단히 측정할 수 있어 많이 사용되고 있다. DPPH radical 소거활성의 경우 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid 50  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 79.52%의 DPPH radical 소거활성을 보였으며 AC-HE 250  $\mu\text{g/mL}$  농도와 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 각각 14.60%, 61.73% 활성을 나타냈다(Fig. 1). AC-HE의 DPPH radical 소거활성은 같은 농도에서 양성대조군 보다는 낮게 나타났지만 이는 대조군에 비하여 모두 유의적으로 증가하였고 ( $p < 0.01$ ), 발효물 농도에 비례해서 활성이 증가됨을 알 수 있었다.

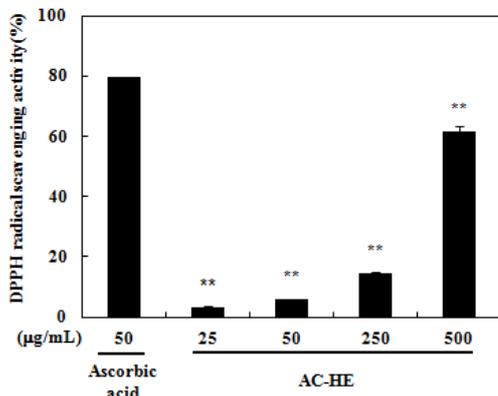


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of fermented *Artemisia capillaris* with *Hericium erinaceum* mycelium(AC-HE). The reaction mixture contained 0.1 mM DPPH in the presence or absence of various concentration of AC-HE at 37°C for 20 min. The values represent the mean  $\pm$  S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the ascorbic acid treated group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

식물체에 널리 분포되어 있는 페놀성 물질은 다양한 구조와 분자량을 가지며, 항산화, 항균, 항암 등의 생리활성을 나타낸다[33]. 또한 세포벽, 다당류, 리그닌 등과 에스테르 결합이 되어 중합체로 존재하며, 수산기를 통한 수소 공여와 페놀 고리구조의 공명 안정화에 의해 항산화 능력을 나타낸다고 보고되었다[34,35]. 인진숙의 총 폴리페놀 함량은 60.07 mg/g이며, 총플라보노이드 함량은 20.86 mg/g이라 보고 한 바 있다[36]. 약용 식물의 경우 총 폴리페놀 함량이 30 mg/g 이상

이면 뛰어난 항산화 활성을 나타낸다고 알려져 있으므로[37], 멸균으로 인한 폴리페놀 함량의 감소가 예상되어짐에도 불구하고 AC-HE의 DPPH radical 소거활성은 뛰어난 것으로 판단된다.

### 3.1.2. ABTS radical 소거활성

ABTS radical 소거활성 측정방법은 DPPH radical 소거활성과 마찬가지로 인위적으로 radical을 제거하는 작용으로 DPPH radical 소거활성과 유의적인 상관성을 보이는 것으로 알려져 있다[38]. ABTS radical 소거활성은 항산화 물질에 의해 radical 특유의 짙은 청록색이 하늘색 및 투명색으로 탈색되는 것을 이용한 측정법으로 이는 hydrogen-donating antioxidant와 chain breaking antioxidant를 측정할 수 있고 aqueous phase 및 organic phase 모두에 적용이 가능하다는 점이 특징이다[39]. 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid의 ABTS radical 소거활성은 10  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 87.69%로 나타났으며 AC-HE의 경우 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 89.36%의 활성을 나타내었고, 250  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 97.39%의 활성을 나타냈다(Fig. 2).

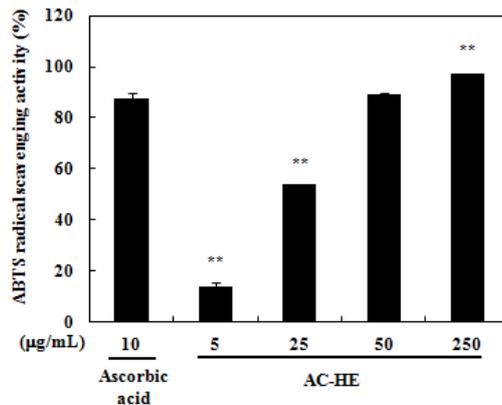


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of fermented *Artemisia capillaris* with *Hericium erinaceum* mycelium(AC-HE). The reaction mixture contained 7 mM ABTS and 2.5 mM potassium persulfate in the presence or absence of various concentrations of AC-HE at 37°C for 10 min. The values represent the mean  $\pm$  S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the ascorbic acid treated group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

AC-HE의 ABTS radical 소거활성도 같은 농도에서 양성대조군 보다는 낮은 것으로 나타났지만 발효물의 농도가 증가함에 따라 활성이 유의하게( $p < 0.01$ ) 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 기존의 연구결과에 의하면 많은 식물체에서 폴리페놀 함량이 높았던 에틸아세테이트와 클로로포름 분획물이 높은 ABTS radical 소거활성을 나타내어 폴리페놀함량과 항산화 활성이 밀접한 연관성을 가지고 있음을 시사하고 있다[40]. 따라서 AC-HE의 ABTS radical 소거활성도 인진숙에 포함되어 있는 높은 농도의 폴리페놀 성분에 기인하는 것으로 사료되었다.

### 3.1.3. Peroxyl radical 소거활성

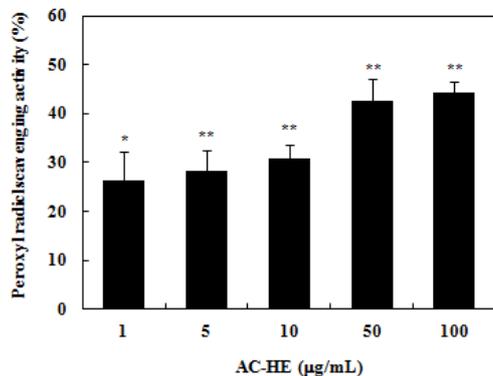


Fig. 3. Peroxyl radical scavenging activity of fermented *Artemisia capillaris* with *Hericium erinaceum* mycelium(AC-HE). The reaction mixture contained 10 mM deoxyribose and 50 mM AAPH in the presence or absence of various concentrations of AC-HE at 37°C for 2 h. The values represent the mean±S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

AAPH는 지질과산화의 initiator로 용액 상에서 산소 radical 중에 하나인 peroxy radical을 생성하는 화학물질로 잘 알려져 있다[41]. Peroxyl radical은 2-deoxy-D-ribose와 반응하여 TBA와 반응할 수 있는 물질(TBARS)로 전환시키며 이는 분홍색을 띄게 된다. 따라서 TBARS 생성 억제 정도를 측정하여 peroxy radical 소거활성을 관찰하였다. AC-HE는 농도가 증가함에

따라 TBARS 생성을 억제하였다. Peroxyl radical 소거활성은 1 µg/mL에서 26.47% 였고 100 µg/mL에서는 44.18%로 이는 control군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다( $p < 0.01$ )(Fig. 3).

Peroxyl radical은 다양한 생리적 및 병리적 과정에서 나타나며[42,43], 지질과산화과정 중에 나타나는 탄소 radical과 산소가 반응하여 생성되므로 지질과산화물의 생성과 밀접한 관련이 있다. 따라서 AC-HE에 의한 peroxy radical 소거활성은 세포내의 지질과산화 생성을 억제하여 이와 관련된 여러 질병을 예방하는데 도움을 줄 것으로 사료된다.

### 3.2. 생체고분자의 산화적 손상에 대한 보호 작용

#### 3.2.1. DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

AC-HE이 DNA의 산화적 손상을 억제하는지를 알아보았다. 앞서도 언급했듯이 AAPH는 용액 상에서 peroxy radical을 효과적으로 생성하며 이들은 지질이나 DNA와 반응하여 산화적 손상을 유도한다[44,45]. pUC19 DNA 100 µg/mL에 산화적 손상을 일으키기 위해 발효물을 처리하지 않은 상태와 처리한 상태에서 10 mM AAPH 처리하여 37°C에서 6시간 반응시켰다. 반응액을 전기영동한 후 agarose gel 상의 DNA 형태를 관찰한 결과 pUC19 DNA는 supercoil form (I)으로 나타났으며(Fig. 4, lane 1), DNA의 산화적 손상이 일어난 경우는 strand breakage가 일어나 nicked circular form (II)이 관찰되었다(Fig. 4, lane 2). 반면 50, 100, 500, 1000 µg/mL의 농도로 AC-HE를 처리했을 때는 농도가 증가함에 따라 strand breakage가 억제되었으며 500 µg/mL에서 부터는 완전히 억제되었다.

생체 내에서 활성산소에 의한 DNA의 변형에 관한 연구는 많이 알려져 있다. 일반적으로 활성산소에 의한 DNA의 손상이 일어날 경우, DNA cleavage 또는 fragmentation 현상이 일어나며 deoxyguanosine 분자가 8-hydroxy deoxyguanosine으로 변형되는 현상이 일어난다[46-48]. 이와 같은 현상은 돌연변이나 노화, 암 등과 같은 질병의 원인이 되고 있다[49,50]. 따라서 AC-HE는 DNA의 산화적 손상을 보호함으로써 노화 및 질병 예방에 도움이 될 것으로 생각된다.

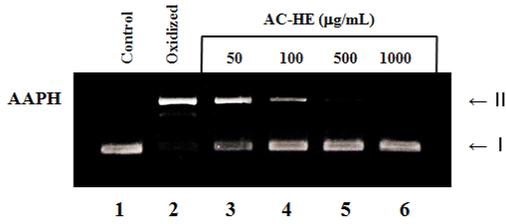


Fig. 4. Protective effects of fermented *Artemisia capillaris* with *Hericium erinaceum* mycelium(AC-HE) on DNA strand breakage induced by peroxy radical. pUC 19 DNA was incubated with 10 mM AAPH in the presence of various concentrations of AC-HE at 37°C for 6 h. Lane 1, control DNA; lane 2, lane 1 + AAPH; lane 3, lane 2 + 50 µg/mL AC-HE; lane 4, lane 2 + 100 µg/mL AC-HE; lane 5, lane 2 + 500 µg/mL AC-HE; lane 6, lane 2 + 1000 µg/mL AC-HE.

3.2.2. HSA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

HSA 단백질에 50 mM AAPH를 처리하여 산화적 손상을 유발한 후 AC-HE의 단백질 보호 영향을 알아보았다. AAPH는 용액 상에서 peroxy radical을 생성하고 이로 인해 HSA의 산화적 손상이 일어난다. HSA 단백질에 산화적 손상이 일어나면 펩티드 결합이 파괴되면서 단백질 띠가 거의 사라졌다(Fig. 5A, lane 2). 반면 발효물을 농도별로 처리한 결과 처리 농도에 비례하여 HSA 단백질 띠의 밀도가 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.01$ ). HSA 단백질 띠를 밀도 측정기로 측정 한 결과 500 µg/mL농도에서 AC-HE를 처리한 단백질 띠의 밀도가 AAPH만을 처리한 군에 비해 26.02% 이상 보호 되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5B).

활성산소 종에 의한 단백질의 손상은 아미노산 변형[51], 단백질의 cross-linking[52], 단백질의 절단 형태로 나타난다. 특히, 단백질에 대한 산화적 손상은 단백질의 구조와 기능을 변화시키므로 노화 및 많은 질병의 원인이 되고 있다[53,54]. 세포내 대표적인 항산화 효소인 Cu,Zn-SOD는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 peroxy radical에 의해 변형되어 효소의 활성이 낮아지고, 단백질로부터 전이금속이 방출된다는 보고가 있다[55,56]. 한편 미토콘드리아

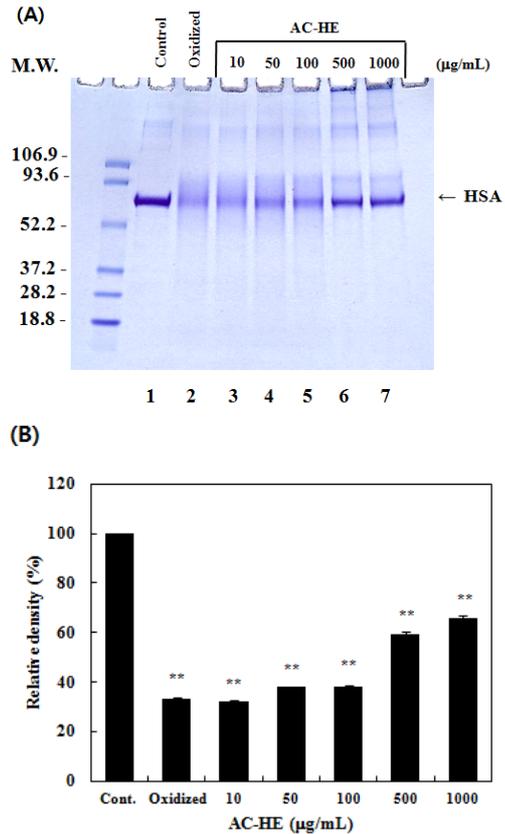


Fig. 5. Protective effects of fermented *Artemisia capillaris* with *Hericium erinaceum* mycelium(AC-HE) on oxidative modification of HSA induced by peroxy radical. HSA was incubated with 50 mM AAPH in the presence of various concentrations of AC-HE at 37°C for 6 h. Lane 1, control HSA; lane 2, lane 1 + AAPH; lane 3, lane 2 + 10 µg/mL AC-HE; lane 4, lane 2 + 50 µg/mL AC-HE; lane 5, lane 2 + 100 µg/mL AC-HE; lane 6, lane 2 + 500 µg/mL AC-HE; lane 7, lane 2 + 1000 µg/mL AC-HE. The values represent the mean±S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

의 전사전달 단백질인 cytochrome c의 산화적 손상이 파킨슨병을 유도하는 α-synuclein 단백질의 응집과 밀접한 관련이 있다는 보고도 있다 [57]. 또한, 알츠하이머병, 파킨슨씨병과 같은 퇴

행성 뇌질환에서 나타나는 공통적인 현상 중에 하나가 neurofilament의 변형 및 축적인데 이와 같은 현상은 여러 요인에 의해 일어날 수 있으나 활성산소에 의한 단백질의 산화적 변형이 중요한 이유 중 하나일 것으로 추측되고 있다[58-60]. 따라서 AC-HE는 세포내 단백질의 변형을 억제함으로써 노화 및 퇴행성 질병 예방에 도움이 될 것으로 생각된다.

### 3.3. 세포사멸에 대한 보호 작용

#### 3.3.1. 세포생존율 측정

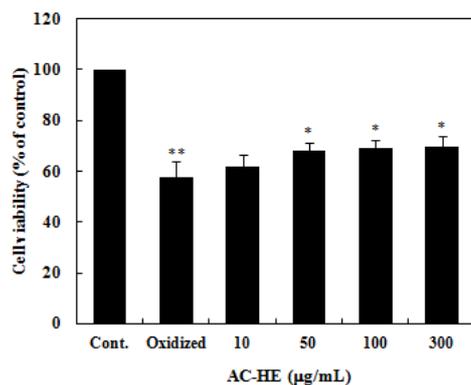


Fig. 6. Protective effects of fermented *Artemisia capillaris* with *Hericium erinaceum* mycelium(AC-HE) on cell death induced by  $H_2O_2$ . NIH3T3 fibroblast cells were treated with 2 mM  $H_2O_2$  in the presence or absence of varying concentrations of AC-HE for 24 h, and cell viabilities were estimated by with a colormetric assay using MTT. The values represent the mean  $\pm$  S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

세포내  $H_2O_2$  처리한 후 세포사멸에 AC-HE가 어떤 영향을 미치는 지를 관찰하였다.  $H_2O_2$ 를 처리하기 2시간 전에 AC-HE를 농도별로 처리하고  $H_2O_2$ 를 2 mM/mL로 처리하여 배양한 결과  $H_2O_2$ 를 처리한 세포의 생존율은 57.67%로 정상 세포보다 42.33% 감소하였으나 발효물을 100  $\mu$ g/mL을 처리한 농도에서는 생존율이 69.14%로 나타남으로서  $H_2O_2$  처리군에 비하여 유의한 증가

를 나타냈으며( $p < 0.01$ ), 정상세포 수준으로 회복되는 것으로 확인되었다(Fig. 6). 뇌허혈이나 근위 축성측삭경화증(ALS)과 같은 병리적상태에서의  $H_2O_2$ 는 뇌 조직에 과량 축적됨으로서 세포독성을 나타내게 된다[61]. 또한 뇌 조직에서 iron과  $H_2O_2$ 의 상호작용에 의한 신경세포 사멸이 촉진된다고 보고 되어있다[62,63]. 따라서 AC-HE에 의한 세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과는 세포사멸 억제에 영향을 줄 것으로 생각된다.

#### 3.3.2. ROS 생성에 대한 영향

세포내 ROS생성에 발효물이 미치는 영향을 관찰하였다. 다음 그림의 Control 표시 부분에 나타나는 형광정도에 비해  $H_2O_2$  표시 상단에 나타나는 형광정도가 더 높게 나타났다. 이는  $H_2O_2$ 를 처리한 세포에서 ROS가 생성되었음을 나타낸 것이며 이와 같은 조건에 AC-HE 50  $\mu$ g/mL을 처리한 결과 형광정도가 현저히 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 7). ROS에 의한 산화적 스트레스는 apoptosis를 촉진 시키며[64], ROS의 생성 증가는 malondialdehyde와 caspase-3 과발현 촉진으로 인한 세포사멸을 가속화 시킨다고 알려져 있다[65-67]. 따라서 본 연구결과는 AC-HE의 항산화 활성과  $H_2O_2$ 에 의해 유도된 세포사멸 억제능 및 세포 내 ROS 소거능과 상관관계가 있으며, 이러한 활성이 ROS에 의해 야기되는 각종 질환을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

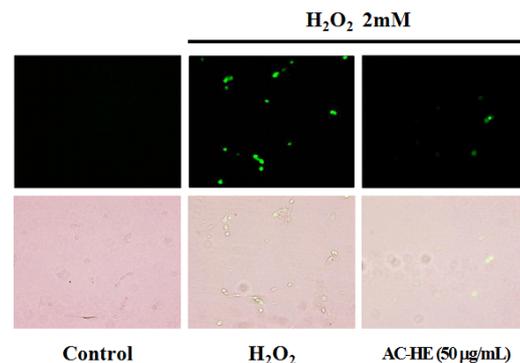


Fig. 7. Protective effects of fermented *Artemisia capillaris* with *Hericium erinaceum* mycelium(AC-HE) on the generation of ROS induced by  $H_2O_2$ . 2 mM  $H_2O_2$  was added to the cells for 40 min, and then examined by fluorescence microscopy after staining with DCF-DA.

#### 4. 결론

본 연구에서는 인진쑥을 천연물배지로 하여 노루궁뎅이 버섯균사체를 배양 발효시켜 제조한 발효물의 항산화 활성을 확인한 결과, 항산화 활성 및 생체고분자의 산화적 손상에 대한 보호 작용, 세포사멸에 대한 보호 작용을 가지고 있음을 시사하였다.

1. AC-HE는 DPPH radical, ABTS radical, peroxy radical 소거활성을 나타냈으며, 발효물의 농도가 증가함에 따라 활성이 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 증가하였다.
2. AC-HE는 peroxy radical에 의한 DNA의 산화적 손상과 HSA의 산화적 변형을 억제하였다.
3. AC-HE는  $H_2O_2$ 에 의한 세포사멸을 억제하여 세포생존율의 유의한 증가를 보였으며, 세포내의 ROS 생성 억제도 현저히 감소시켰다.

이상과 같은 결과를 통해, 노루궁뎅이버섯 균사체-인진쑥 발효물은 항산화 활성을 가지며 세포의 산화적 손상을 효과적으로 억제하는 것으로 판단되어 이를 이용한 기능성 식품 개발 및 상업화에 기초적 자료를 제공할 것으로 사료된다.

#### 감사의 글

본 연구는 2013년도 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업육성(R&D) 기술개발 사업(과제번호: R0002323)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

#### References

1. G. B. Bulkey, The role of oxygen free radicals in human disease processes, *Surgery*, **94**(3), 407(1993).
2. D. H. Halliwell, and T. E. Barry, Reactive oxygen species in living system, *Am. J. Medicine*, **91**(3C), 14(1991).
3. C. S. Moody, and H. M. Hassan, Mutagenicity of oxygen free radicals, *Proc.*

*Natl. Acad. Sci.*, **79**(9), 2855(1982).

4. J. M. McCord, The superoxide free radical: Its biochemistry and pathophysiology, *Surgery*, **94**(3), 412(1983).
5. D. Harman, A theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, **11**(3), 298(1956).
6. R. P. Hertzberg, and P. B. Drevan, Cleavage of DNA with EDTA-iron(II): reaction condition and product analysis, *Biochemistry*, **23**(17), 3934(1984).
7. M. Nose, and N. Fijino, Antioxidative activities of some vegetable foods and active component of avocado epicarp, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **29**(2) 507 (1982).
8. H. J. Lee, E. H. Hwang, H. H. Yu, I. S. Song, C. M. Kim, M. C. Kim, J. H. Hong, D. S. Kim, S. B. Han, K. J. Kang, E. J. Lee, H. W. Chung, The analysis of nutrients in *Artemisia capillaris* Thunberg, *J Korean Soc food sci Nutr*, **31**(3), 361 (2002).
9. H. T. Kim, J. W. Kim, M. K. Lim, S. G. Yeo, K. H. Jang, T. H. Oh, K. W. Lee, Antimicrobial effects of *Artemisia capillaris* extracts on the pathogenic bacteria in vitro, *J Vet Clin.*, **24**(2), 130(2007).
10. S. D. Lee, H. H. Park, D. W. Kim, B. H. Bang, Bioactive constituents and utilities of *Artemisia* sp. as medicinal herb and foodstuff, *Korean J. Food & Nutr.*, **13**(5), 490(2000).
11. X. J. Wang, H. Sun, Z. S. Liu, Quantitative analysis of 6,7-dimethylesculetin and capillarisine in *Artemisia capillaris* Thunb. and prescriptions containing the crude drug. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.*, **19**(11), 667(1994).
12. Y. Kabir, S. Kimura, Dietary mushroom reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rat(SHR). *J Nutr Sci Vitaminol*, **35**(1), 91(1989).
13. Y. Kabir, M. Yanmaguchi, S. Kimura, Effect of shitake (*Lentinus edodes*) and maitake (*Grifola frondosa*) mushroom on blood pressure and plasma lipids of

- spontaneously hypertensive rat, *J Nutr Sci Vitaminol*, **33**(5), 341(1987).
14. Z. Wang, D. Luo, Z. Liang, Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus* Pers, *Carbohydr Polym.*, **57**(3), 241(2004).
  15. H. Kawagishi, A. Shimada, R. Shira, K. Okamoto, F. Ojima, H. Sakamoto, Y. Isiguro, S. Furukawa, Erinacines A, B, and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*, *Tetrahedron Lett*, **35**(10), 1569(1994).
  16. H. Kawagishi, M. Ando, T. Mizuno, Hericenone A and B as cytotoxic principles from the mushroom *Hericium erinaceum*, *Tetrahedron Lett*, **31**(3), 373(1990).
  17. H. Kawagishi, M. Ando, H. Sakamoto, S. Yoshida, F. Ojima, Y. Ishiguro, N. Ukai, T. Mizuno, Hericenones C, D, and E, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Hericium erinaceum*, *Tetrahedron Lett*, **32**(35), 4561(1991).
  18. K. Ueda, M. Tsujomori, S. Kodani, A. Chiba, M. Kubo, K. Masuno, A. Sekiya, K. Nagai, H. Kawagishi, An endoplasmic reticulum (ER) stress-suppressive compound and its analogues from the mushroom *Hericium erinaceum*, *Bioorg Med Chem*, **16**(21), 9467(2008).
  19. T. Mizuno, T. Wasa, H. Ito, C. Suzuki, N. Ukai, Antitumor-active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, an edible and medicinal mushroom called yamabushitake or houtou, *Biosci Biotechnol Biochem*, **56**(2), 347(1992).
  20. K. Mori, S. Inatomi, K. Ouchi, Y. Azumi, T. Tuchida, Improving effects of the mushroom Yamabushitake (*Hericium erinaceus*) on mild cognitive impairment: a double-blind placebo-controlled clinical trial, *Phytother Res.*, **23**(3), 367(2009).
  21. B. K. Yang, J. B. Park, C. H. Song, Hypolipidemic effect of an Exo-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Hericium erinaceus*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **67**(6), 1292(2003).
  22. S. P. Kim, Y. H. Choi, M. Y. Kang, S. H. Nam, Effect of the extract by extraction procedures from *Hericium erinaceus* on activation of macrophage, *J Korean Soc Appl Biol Chem*, **48**(3), 285(2005).
  23. H. Kawagishi, A. Shimada, S. Hosokawa, H. Mori, H. Sakamoto, Y. Ishiguro, S. Sakemi, J. Bordner, N. Kojima, and S. Furukawa, Erinacines E, F and G stimulators of nerve growth factor(NGF)-synthesis from the mycelia of *Hericium erinaceum*, *Tetrahedron Letters*, **37**(41), 7299(1996).
  24. S. H. Park, J. S. Chang, and K. R. Lee, Effect of *Hericium erinaceus* extract on cancer cell growth and expression of cell cycle associated proteins, *J of Korean Society of Food Science and Nutrition*, **32**(6), 931(2003).
  25. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Sci Technol*, **28**(1), 25(1995).
  26. H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem*, **95**(2), 351(1979).
  27. J. H. Kang, S. M. Kim, DNA cleavage by hydroxyl radicals generated in the Cu,Zn-Superoxide dismutase and hydrogen peroxide system, *Mol Cells*, **7**(6), 777(1997).
  28. U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**(5259), 680(1970).
  29. E. H. Ahn, D. W. Kim, M. J. Shin, Y. N. Kim, H. R. Kim, et al., PEP-1-ribosomal protein S3 protects dopaminergic neurons in an MPTP-induced Parkinson's disease mouse model, *Free Radic Biol Med*, **55**, 36(2013).

30. M. J. Kim, D. W. Kim, J. H. Park, S. J. Kim, C. H. Lee, et al., PEP-1-SIRT2 inhibits inflammatory response and oxidative stress-induced cell death via expression of antioxidant enzymes in murine macrophages, *Free Radic Biol Med*, **63**, 432(2013).
31. C. Behl, J. B. Davis, R. Lesley, D. Schubert, Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity, *Cell*, **77**(6), 817(1994).
32. B. Halliwell, C. E. Cross, Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress, *Environ Health Perspect*, **10**, 5(1994).
33. Y. J. Oh, H. R. Seo, Y. M. Choi, D. S. Jung, Evaluation of antioxidant activity of the extracts from the aerial parts of *Cnidium officinale* Makino, *Korean J of Medicinal Crop Science*, **18**(6), 373(2010).
34. K. Hermann, Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxylbenzoic acid compounds in foods, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **28**(4), 315(1989).
35. S. Yusof, H. M. Ghazali, and G. S. King, Naringin content in local citrus fruits, *Food Chemistry*, **37**(2), 113(1990).
36. M. J. Jung, Y. Yin, S. I. Heo, M. H. Wang, Antioxidant and anticancer activities of extract from *Artemisia capillaries*, *Korean J Pharmacogn*, **39**(3), 194(2008).
37. S. I. Heo, H. J. Jung, M. K. Kim, M. H. Wang, Antioxidative activities and tyrosinase inhibitory effects of Korean medicinal plants, *J Appl Biol Chem*, **50**(3), 115(2007).
38. Y. M. Lee, J. H. Bae, H. Y. Jung, J. H. Kim, D. S. Park, Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean edible wild plants, *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**(1), 29(2011).
39. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized method for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplement, *J Agric Food Chem.*, **53**(10), 4290(2005).
40. Y. M. Choi, K. W. Yu, N. S. Han, J. H. Koh, J. S. Lee, Antioxidant activities and antioxidant compounds of commercial red wines, *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **35**(9), 1286(2006).
41. E. Niki, A. Kawakami, M. Saito, Y. Yamamoto, J. Tsuchiya, Y. Kamiya, Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity, *J Biol. chem.*, **260**(4), 2191(1985).
42. T. A. Dix, J. Aikens, Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation, *Chem Res Toxicol*, **6**(1), 2(1993).
43. T. Sawa, T. Akaike, K. Kida, Y. Fukushima, K. Takagi, H. Maeda, Lipid peroxyl radicals from oxidized oils and heme-iron: implication of a high-fat diet in colon carcinogenesis, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, **7**(11), 1007(1998).
44. E. Niki, Antioxidants in relation to lipid peroxidation, *Chem Phys Lipids*, **44**(2-4), 227(1987).
45. K. Hiramoto, H. Hohkoh, K. Sako, K. Kikugawa, DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride(AAPH), *Free Radic Res Commun*, **19**(5), 323(1993).
46. B. N. Ames, Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases, *Science*, **221**(4617), 1256(1983).
47. P. A. Cerutti, Prooxidant states and tumor promotion, *Science*, **227**(4685), 375(1985).
48. J. L. Sagripanti, K. H. Kraemer, Site-specific oxidative DNA damage at polyguanosines produced by copper plus hydrogen peroxide, *J Biol Chem.*, **264**(3), 1729(1989).
49. T. Finkel, N. J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature*, **408**(6809), 239(2000).
50. S. Kawanishi, Y. Hiraku, S. Oikawa, Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging, *Mutat Res.*, **488**(1), 65(2001).

51. E. R. Stadtman, B. S. Berlett, Fenton chemistry. Amino acid oxidation, *J Biol Chem.*, **266**(26), 17201(1991).
52. K. J. Davies, M. E. Delsignore, Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure, *J Biol Chem.*, **262**(20), 9908(1987).
53. R. L. Levine, C. N. Oliver, R. M. Fulks, E. R. Stadtman, Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **78**(4), 2120(1981).
54. A. J. Rivett, R. L. Levine, Metal-catalyzed oxidation of *Escherichia coli* glutamine synthetase: correlation of structural and functional changes, *Arch Biochem Biophys*, **278**(1), 26(1990).
55. S. Y. Choi, H. Y. Kwon, O. B. Kwon, J. H. Kang, Hydrogen peroxide-mediated Cu,Zn-superoxide dismutase fragmentation: protection by carnosine, homocarnosine and anserine, *Biochim Biophys Acta.*, **1472**(3), 651(1999).
56. H. Y. Kwon, S. Y. Choi, M. H. Won, T. Kang, J. H. Kang, Oxidative modification and inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, *Biochim Biophys Acta*, **1543**(1), 69(2000).
57. M. Hashimoto, A. Takeda, L. J. Hsu, T. Takenouchi, E. Masliah, Role of cytochrome c as a stimulator of alpha-synuclein aggregation in Lewy body disease, *J Biol Chem.*, **274**(41), 28849(1999).
58. M. J. Carden, J. Q. Trojanowski, W. W. Schlaepfer, and V. M. Lee, Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns, *J Neurosci*, **7**(11), 3489(1987).
59. R. Perrot, J. Eyer, Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders, *Brain Res Bull.*, **80**(4-5), 282(2009).
60. I. G. Kyeong, W. S. Eum, S. Y. Choi, J. H. Kang, Oxidative modification of neurofilament-L and neuronal cell death induced by the catechol neurotoxin, tetrahydropapaveroline, *Toxicol Lett*, **217**(1), 59(2013).
61. D. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, D. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, et al., Mutation in Cu,Zn-superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, *Nature*, **362**(6415), 59(1993).
62. B. Halliwell, and J. M. Gutteridge, The importance of free radicals and catalytic metal ions in human disease, *Mol Aspects Med.*, **8**(2), 89(1985).
63. Z. Radak, S. Kumagai, A. W. Taylor, H. Naito, S. Goto, Effects of exercise on brain function: role of free radical, *Appl Physiol Nutr Metab.*, **32**(5), 942(2007).
64. R. Groszami, and G. Dawson, Does ceramide play a role in neural cell apoptosis? *J Neurosci Res.*, **60**(2), 141(2000).
65. C. F. Chen, S. Y. Lang, P. P. Zuo, N. Yang, X. Q. Wang, C. Xia, Effects of D-galactose on the expression of hippocampal peripheral-type benzodiazepine receptor and spatial memory performances in rats, *Psychoneuroendocrinology*, **31**(7), 805(2006).
66. X. Cui, P. Zuo, Q. Zhang, X. Li, Y. Hu, J. Long, et al., Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid, *J Neurosci Res.*, **83**(8), 1584(2006).
67. W. S. Sun, H. Q. Yu, H. Zhang, Y. L. Zheng, J. J. Wang, L. Luo, Quercetin attenuates spontaneous behavior and spatial memory impairment in D-galactose-treated mice by increasing brain antioxidant capacity, *Nutrition Research*, **27**(3), 169(2007).