Free radical scavenging activity and protective effect of three *glycyrrhiza* varieties against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in C6 glial cells

Ji Hyun Kim¹ · Min Ji Cho² · Chan Hum Park³ · Eun Ju Cho² · Hyun Young Kim¹

종류별 감초의 라디칼 소거능 및 H₂O₂에 의한 C6 glial 세포의 산화적 스트레스 개선 효과

김지현¹ · 조민지² · 박찬흠³ · 조은주² · 김현영¹

Received: 15 September 2020 / Accepted: 13 October 2020 / Published Online: 31 December 2020
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2020

Abstract Oxidative stress is common cause of neurodegenerative diseases. The purpose of this study is to investigate the *in vitro* free radical scavenging activity and protective effect of three *Glycyrrhiza* species including *Glycyrrhiza uralensis*, *G. glabra*, and a new variety of *Glycyrrhiza* (Shinwongam, SW) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in C6 glial cells. *In vitro* assays, radical scavenging activities of *G. uralensis*, *G. glabra*, and SW against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, [•]OH, and O₂^{•-} increased as concentration-dependent manner. In addition, the SW was found to contain the highest polyphenol and flavonoid contents. The treatment of H₂O₂ to C6 glial cell induced oxidative stress, whereas *G. uralensis*, *G. glabra*, and SW significantly

increased the cell viability as dose-dependent manner. In particular, SW exerted stronger protective effect on H₂O₂-induced cytotoxicity, than *G. uralensis* and *G. glabra*. Furthermore, reactive oxygen species (ROS) formation was significantly elevated by H₂O₂ in C6 glial cells. However, treatments of *G. uralensis*, *G. glabra*, and SW decreased ROS formation. In addition, SW decreased pro-inflammatory related protein expression levels such as inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2, compared to H₂O₂-treated control group. These results indicated that *G. uralensis* and *G. glabra*, especially SW, may be useful for preventing from oxidative stress-induced neuronal damage by regulating inflammatory reaction.

Ji Hyun Kim and Min Ji Cho equally contributed to the work.

Eun Ju Cho (✉)
E-mail: ejcho@pusan.ac.kr

Hyun Young Kim (✉)
E-mail: hykim@gntech.ac.kr

¹Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Republic of Korea

²Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 46241, Republic of Korea

³Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Keywords *Glycyrrhiza glabra* · *Glycyrrhiza uralensis* · Hydrogen peroxide · Oxidative stress · Shinwongam

서 론

신경퇴행성질환은 다양한 원인에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으며, 그 중에서도 체내 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)의 과량 축적으로 인한 산화적 스트레스는 신경퇴행성질환 발병의 주요 원인 중 하나이다[1,2]. ROS는 superoxide anion ([•]O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical ([•]OH) 등을 포함하며, 이는 인체 내 호흡을 통한 대사과정에서 발생되지만 과량 축적 시 이들의 높은 반응성으로 인해 세포 및 조직에 손상을 일으킨다[3]. 특히 뇌에서 과다한 ROS의 생성으로 유도된 염증반응과 뇌신경세포의 사멸은 인지능력 및 기억력 손

상의 대표적인 원인으로 알려져 있다[4]. 따라서 산소로부터 유래된 ROS를 조절하거나 제거할 수 있는 물질로 알려진 항산화제들의 개발을 통한 신경퇴행성질환 예방 및 치료에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[5,6].

감초(*Glycyrrhiza*, licorice)는 콩과 식물(Legumiosae)에 속하는 다년생 초본으로, 한국, 중국 및 일본에서 한약재로써 널리 이용되고 있는 약용식물이다. 현재 우리나라에서 약용으로 유통되는 감초의 대부분은 만주감초(*Glycyrrhiza uralensis*)로 주로 식품분야에서 사용되는 것으로 알려져 있고, 최근 유럽감초(*G. glabra*)의 수입량도 증가하고 있다[7]. 감초에 관한 국내·외 연구로는 항산화, 항염증, 항균 및 항당뇨 등의 생리활성이 보고되었다[8-11]. 감초는 단맛을 내는 주요성분인 glycyrrhizic acid 등의 glycyrrhizin 계열 화합물과 liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin 등의 flavonoid 계열 화합물을 포함하여, 항산화 활성이 우수한 성분을 함유하는 것으로 알려져 있다[7,12]. 신원감(Shinwongam, SW)은 *G. uralensis*와 *G. glabra*를 교배시켜 재배한 국내산 신품종 감초로 근장, 근경, 지근수가 많아 *G. uralensis*보다 한국 토양에 적응력이 높은 것으로 알려져 있다[13]. 또한 감초의 주요 활성물질인 liquiritin과 glycyrrhizic acid의 함량이 *G. uralensis* 및 *G. glabra*보다 높게 함유되어 있다[13]. 그러나 종류별 감초 추출물의 *in vitro* 라디칼 소거능과 산화적 스트레스로부터 신경교세포 보호 효과에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 *G. uralensis*, *G. glabra* 및 SW 추출물의 radical 소거능 측정을 통해 *in vitro* 항산화 활성을 확인하고, H₂O₂로 산화적 스트레스가 유도된 C6 glial cell에서 3가지 감초 추출물의 신경교세포의 보호 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

2016년 재배된 *G. uralensis*, *G. glabra* 및 SW의 추출물은 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부(Eumseong, Korea)에서 제공받아 사용하였으며, voucher specimen은 한국약용자원표본관에 보관되어 있다. 건조시킨 *G. uralensis*, *G. glabra* 및 SW은 50% ethanol을 이용하여 상온에서 72시간 동안 침지 후, 여과 및 감압 농축하여 시료를 조제하였다. 각 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Co., St Louis, USA)에 녹여 4 °C에서 보관하면서, 실험 시 희석하여 사용하였다.

시약

In vitro 항산화 활성 측정 실험에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2-deoxyribose는 Sigma사에서, FeSO₄·7H₂O는 Daejung Chemicals & Metals Co. Ltd (Siheung, Korea)에서, EDTA disodium salt dehydrate 및 phosphoric acid는 Samchun Pure Chemical Co. Ltd (Pyeongtaek, Korea)에서 구매하여 사용하였다. Thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA)는 각각 Acros Organics (Fair Lawn, New Jersey, USA), Kanto Chemical Co. Inc (Tokyo, Japan)에서 구매하였으며, phenazine methosulfate (PMS), nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) disodium salt, nitrotertrazolium blue chloride (NBT) 시약은 Bio Basic Co. (Toronto, Canada)사에서 구매하여 실험에 사용하였다. C6

glial cell은 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 세포 배양을 위해 사용된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지, fetal bovine serum (FBS)과 100 units/mL penicillin streptomycin, trypsin EDTA 용액은 Welgene (Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 세포의 산화적 스트레스를 유도하기 위해 사용한 H₂O₂는 Junsei (Tokyo, Japan)사에서 구입하여 사용하였고, cell viability를 측정하기 위해 사용한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 및 ROS 생성량 측정을 위한 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능

각 농도별 추출물(5, 10, 25, 50, 100 µg/mL)을 EtOH에 녹인 시료 100 µL와 60 µM DPPH용액 100 µL를 96-well plate에 혼합하여 30분간 실온에서 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료를 첨가한 실험군을 비교하여 DPPH radical 소거능을 다음의 계산식을 이용하여 백분율(%)로 나타내었다[14].

DPPH radical scavenging activity (%) = $(Abs_c - Abs_s) / Abs_c \times 100$
(Abs_c: Absorbance of control, Abs_s: Absorbance of sample)

Hydroxyl radical (·OH) 소거능

·OH radical 소거능 측정은 Fenton 반응을 따랐으며, 0.2 M phosphate buffer saline (PBS)에 농도별 시료 용액 1400 µL에 10 mM FeSO₄·7H₂O-EDTA 200 µL, 10 mM 2-deoxyribose solution 200 µL, 10 mM H₂O₂ 200 µL를 첨가하였다. 그 후 4 시간 동안 37 °C에서 배양 한 뒤, 2.8% TCA 1 mL와 1.0% TBA solution 1 mL를 첨가하여 20분 동안 100 °C로 가열하고 실온에서 냉각시킨 뒤 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료를 첨가한 실험군을 비교하여 ·OH radical 소거능을 다음의 계산식을 이용하여 백분율(%)로 나타내었다[15].

·OH radical scavenging activity (%) = $(Abs_c - Abs_s) / Abs_c \times 100$
(Abs_c: Absorbance of control, Abs_s: Absorbance of sample)

Superoxide radical (O₂⁻) 소거능

각 농도별 추출물(5, 10, 25, 50, 100 µg/mL)을 증류수에 녹인 시료 500 µL와 0.1 M tris-HCl (pH 7.4) 100 µL, 0.1 mM PMS 200 µL, 0.5 mM NBT 200 µL, 0.5 mM NADH 500 µL를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 뒤, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료를 첨가한 실험군을 비교하여 O₂⁻ radical 소거능을 다음의 계산식을 이용하여 백분율(%)로 나타내었다[16].

O₂⁻ radical scavenging activity (%) = $(Abs_c - Abs_s) / Abs_c \times 100$
(Abs_c: Absorbance of control, Abs_s: Absorbance of sample)

총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin과 Denis의 방법에 따라 측정하였다[17]. 증류수에 녹인 시료 200 µL와 증류수 1800 µL를 혼합 후, phenol

reagent 200 μ L를 혼합하여 실온에서 5분간 방치한 뒤, 2 mL의 7% Na_2CO_3 를 혼합하여 실온에서 90분간 방치시킨 후, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 결과는 garlic acid를 시료와 동일한 방법으로 분석하여 작성한 표준 검량선으로부터 시료의 총 페놀 함량을 산출하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법에 따라 측정하였다 [18]. 증류수에 녹인 시료 100 μ L와 증류수 400 μ L를 혼합한 뒤, 5% NaNO_2 용액 30 μ L를 가하여 6분간 방치하였다. 10% AlCl_3 30 μ L를 더하여 6분간 방치 후, 4% NaOH 400 μ L를 더하여 15분간 방치 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 결과는 quercetin을 시료와 동일한 방법으로 분석하여 작성한 표준 검량선으로부터 시료의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

세포 배양

실험에 사용한 C6 glial cell은 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 1-2일에 한번 배양액을 바꾸어 주면서 배양하였다. 세포가 T75-flask에 80% 이상 분화되었을 때, PBS (pH 7.4)으로 세포를 세척 한 후, 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액으로 부착된 세포를 분리하고 원심 분리를 통해 집적시킨 후, 피펫을 이용하여 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

Cell viability 측정

세포가 80% 이상 confluence 상태가 되면 96-well plate에 3×10^4 cells/well 농도로 seeding하여 37 °C에서 24시간 동안 배양한 다음 세포가 잘 부착되면, 농도별로 희석한 시료를(5, 10, 25, 50, 100 μ g/mL) 각 well에 처리하여 1시간 배양한 뒤, 산화적 스트레스를 유발하기 위해 H_2O_2 (400 μ M)를 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후, 각 well의 배지를 제거하고 5 mg/mL의 MTT solution 200 μ L씩 첨가하여 37 °C에서 4시간 동안 재배양하였다. 4시간 뒤, MTT solution을 제거하고 생성된 formazan 결정을 빛이 차단된 상태에서 DMSO에 30분간 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[19].

Reactive oxygen species (ROS) 측정

세포가 80% 이상 confluence되면 3×10^4 cell/mL로 96-well black plate에 seeding하여 4시간 동안 37 °C에서 배양하였다. 배양 후 세포가 부착되면 농도별로 희석한 시료를(5, 10, 25, 50, 100 μ g/mL) 각 well에 처리하고 1시간 재배양한 후 산화적 스트레스 유발을 위한 H_2O_2 (400 μ M)를 첨가하여 24시간 배양하였다. 24시간 뒤, 80 μ M DCF-DA용액을 각 well에 처리하고 30분간 배양 후 FLUO star OPTIMA (BMG labtech, Ortenberg, Germany) excitation-480 nm, emission-535 nm로 측정하였다 [20].

Western blot analysis

염증 관련 단백질 발현을 확인하기 위하여 배양한 세포에

RIPA buffer를 첨가하여 4 °C, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 상층액의 단백질을 분리하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad protein assay kit (Hercules, CA, USA)를 이용하였고, sample buffer (Bio-Rad)와 혼합하여 sample을 제조하여 실험에 사용하였다. 각각의 시료를 10 또는 13% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 5% skim milk로 상온에서 50분 동안 blocking 하여 1차 항체인 inducible nitric oxide synthase (iNOS, Calbiochem, Darmstadt, Germany)와 cyclooxygenase-2 (COX-2, Merk, Darmstadt, Germany)를 PBS-T와 각각 1:2000, 1:1000의 비율로 희석하여 4 °C에서 overnight 반응시킨 후, 2차 항체인 anti-rabbit IgG HRP-linked antibody (Cell signaling, Beverly, MA, USA)를 1:1000의 비율로 PBS-T와 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 PBS-T로 15분간 4번 세척 후 enhanced chemiluminescence solution과 반응시킨 후 Chemi imaging system Q6 (Davinch-Chemi™, Seoul, Korea)을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

통계분석

대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었고, 결과 분석은 SPSS 20 (IBM, Armonk, NY, USA) 프로그램을 이용하여 각 실험 결과로부터 ANOVA (analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple test ($p < 0.05$)를 이용하여 각 군의 평균 간의 유의성 검정을 하여 결과를 분석하였다.

결과 및 고찰

체내 과량의 free radical 및 ROS 생성으로 인한 산화적 스트레스는 알츠하이머 질환 및 파킨슨병과 같은 신경퇴행성질환의 대표적인 원인으로 알려져 있으며, 국내·외 다양한 연구에서 천연물 유래 항산화 소재를 이용하여 이들 질환의 예방 및 치료에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[1,5,6]. 본 연구에서는 *G. uralensis*, *G. glabra*, SW 등 3가지 감초 추출물의 *in vitro*에서 DPPH, $\cdot\text{OH}$, O_2^- radical 소거능과 H_2O_2 로 산화적 손상이 유도된 신경교세포 보호 효과를 확인하고자 하였다. DPPH assay는 시료 중의 항산화 물질과 반응 시 DPPH radical이 환원되면서 변화하는 색깔의 차이를 이용한 측정법으로, 시료의 항산화 활성을 평가하는데 주로 이용된다[21]. 본 연구에서 *G. uralensis*, *G. glabra*, SW 등 3가지 감초 추출물의 DPPH 소거능을 측정된 결과(Table 1), 각 추출물은 농도가 증가할수록 유의적으로 DPPH 소거능이 증가함을 알 수 있었다. SW 추출물의 DPPH 소거능 측정 결과, 5, 10, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도에서 각각 5.00, 12.09, 24.45, 39.78, 62.69%의 수치를 나타내었으며, 특히 100 μ g/mL 농도에서 60% 이상의 DPPH 소거능을 나타내었다. 특히 모든 농도에서 SW 추출물이 *G. uralensis*, *G. glabra*추출물에 비해 유의적으로 높은 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, 가장 낮은 IC_{50} 수치를 나타내어 SW 추출물의 우수한 DPPH radical 소거능을 확인하였다. 이전 연구에 의하면, 종류별 감초 추출물의 100 μ g/mL 농도에서 DPPH radical 소거능을 측정된 결과, *G. uralensis* 추출물에

Table 1 DPPH radical scavenging activity of *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza glabra*, and Shinwongam

Treatment ($\mu\text{g/mL}$)	Scavenging activity (%)		
	GU	GB	SW
Control		0.00 $\pm$ 0.00	
5	4.59 $\pm$ 0.91 ^{aE}	2.85 $\pm$ 1.01 ^{bE}	5.00 $\pm$ 0.54 ^{aE}
10	7.22 $\pm$ 2.02 ^{bD}	8.37 $\pm$ 2.83 ^{bD}	12.09 $\pm$ 1.90 ^{aD}
25	14.63 $\pm$ 0.77 ^{cC}	20.23 $\pm$ 1.39 ^{bC}	24.45 $\pm$ 1.35 ^{aC}
50	20.40 $\pm$ 1.05 ^{cB}	35.52 $\pm$ 0.90 ^{bB}	39.78 $\pm$ 1.10 ^{aB}
100	32.17 $\pm$ 0.60 ^{cA}	57.44 $\pm$ 0.50 ^{bA}	62.69 $\pm$ 1.50 ^{aA}
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	845.53 $\pm$ 76.51	85.67 $\pm$ 1.44	67.03 $\pm$ 1.95

Values are means $\pm$ SD ($n=6$). ^{a-c}Means with the different small letters are significantly different ($p<0.05$) between different samples within same concentration, while ^{A-E}Means with the different capital letters are significantly different between different concentration within same sample by Duncan's multiple range test. IC₅₀ is the concentration in $\mu\text{g/mL}$ required to inhibit the formation of DPPH radical by 50%. GU, *Glycyrrhiza uralensis*; GB, *Glycyrrhiza glabra*; SW, Shinwongam

Table 2 $\cdot\text{OH}$ radical scavenging activity of *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza glabra*, and Shinwongam

Treatment ($\mu\text{g/mL}$)	Scavenging activity (%)		
	GU	GB	SW
Control		0.00 $\pm$ 0.00	
5	41.94 $\pm$ 0.66 ^{b,D}	37.61 $\pm$ 0.12 ^{c,E}	43.83 $\pm$ 0.23 ^{a,E}
10	62.30 $\pm$ 0.06 ^{b,C}	59.75 $\pm$ 0.25 ^{c,D}	63.51 $\pm$ 0.06 ^{a,D}
25	77.72 $\pm$ 0.11 ^{a,B}	76.89 $\pm$ 0.21 ^{b,C}	77.50 $\pm$ 0.14 ^{a,C}
50	83.15 $\pm$ 0.07 ^{a,A}	81.81 $\pm$ 0.16 ^{b,B}	81.08 $\pm$ 0.32 ^{c,B}
100	83.32 $\pm$ 0.28 ^{b,A}	84.07 $\pm$ 0.04 ^{a,A}	84.34 $\pm$ 0.21 ^{a,A}
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	6.56 $\pm$ 0.09	8.02 $\pm$ 0.03	5.84 $\pm$ 0.03

Values are means $\pm$ SD ($n=6$). ^{a-c}Means with the different small letters are significantly different ($p<0.05$) between different samples within same concentration, while ^{A-E}Means with the different capital letters are significantly different between different concentration within same sample by Duncan's multiple range test. IC₅₀ is the concentration in $\mu\text{g/mL}$ required to inhibit the formation of $\cdot\text{OH}$ radical by 50%. GU, *Glycyrrhiza uralensis*; GB, *Glycyrrhiza glabra*; SW, Shinwongam

비해 *G. glabra* 추출물의 DPPH radical 소거능이 우수함이 보고 되어, 본 결과와 유사한 결과를 나타냄을 알 수 있었다[22]. 열처리한 감초 추출물의 DPPH 소거능 측정을 통해 IC₅₀을 계산한 결과 0.86-2.36 g/L의 수치를 나타내어, 본 연구에서 사용한 SW 추출물은 열처리한 감초 추출물에 비해 높은 DPPH radical 소거능을 나타냄을 알 수 있었다[23].

$\cdot\text{OH}$ radical은 체내에서 반응성이 매우 높고, 반응 속도가 빠르며, 여러 free radical 중에서 가장 강력한 산화력을 갖는 것으로 알려져 있다[24]. 이는 H₂O₂, ONOO⁻ 등에 의해 생성되며, 지질, DNA 등 생체 분자를 손상시켜 신경퇴행성질환을 포함한 다양한 질환 발병에 관여하는 것으로 보고되었다[25]. *In vitro* $\cdot\text{OH}$ radical assay는 H₂O₂와 O₂⁻로부터 $\cdot\text{OH}$ radical이 형성되는 Fenton 반응의 원리를 이용하여 측정하였다[26]. 본 연구에서 *G. uralensis*, *G. glabra*, SW 등 3가지 감초 추출물의 $\cdot\text{OH}$ radical 소거능을 측정한 결과(Table 2), 모든 감초 추

Table 3 O₂⁻ radical scavenging activity of *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza glabra*, and Shinwongam

Treatment ($\mu\text{g/mL}$)	Scavenging activity (%)		
	GU	GB	SW
Control		0.00 $\pm$ 0.00	
5	3.18 $\pm$ 0.74 ^{c,E}	13.74 $\pm$ 0.58 ^{a,E}	5.96 $\pm$ 0.64 ^{b,E}
10	13.46 $\pm$ 1.17 ^{c,D}	30.18 $\pm$ 1.62 ^{a,D}	21.18 $\pm$ 0.15 ^{b,D}
25	45.81 $\pm$ 1.66 ^{c,C}	55.86 $\pm$ 1.42 ^{a,C}	50.03 $\pm$ 0.96 ^{b,C}
50	58.26 $\pm$ 1.42 ^{b,B}	61.47 $\pm$ 0.46 ^{a,B}	55.62 $\pm$ 1.16 ^{c,B}
100	61.40 $\pm$ 1.75 ^{b,A}	65.25 $\pm$ 0.17 ^{a,A}	61.21 $\pm$ 0.31 ^{b,A}
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	41.60 $\pm$ 0.86	29.18 $\pm$ 0.51	39.38 $\pm$ 0.27

Values are means $\pm$ SD ($n=6$). ^{a-c}Means with the different small letters are significantly different ($p<0.05$) between different samples within same concentration, while ^{A-E}Means with the different capital letters are significantly different between different concentration within same sample by Duncan's multiple range test. IC₅₀ is the concentration in $\mu\text{g/mL}$ required to inhibit the formation of O₂⁻ radical by 50%. GU, *Glycyrrhiza uralensis*; GB, *Glycyrrhiza glabra*; SW, Shinwongam

출물이 농도 의존적으로 $\cdot\text{OH}$ radical 소거 효과가 증가하는 것을 확인하였다. 특히 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 70% 이상의 소거 효과를 나타내어 3가지 감초 추출물의 우수한 $\cdot\text{OH}$ radical 소거 효과를 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 *G. uralensis*, *G. glabra*, SW 추출물은 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 83.15, 81.81, 81.08%의 수치를 나타내었고, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 각각 83.32, 84.07, 84.34%의 수치를 나타내어 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 3가지 감초 추출물의 $\cdot\text{OH}$ radical 소거능이 비슷한 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

O₂⁻은 전자 환원반응을 통해 세포와 조직에 독성을 일으켜 질병을 유발시키며, 이는 노화와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다[24]. 특히 O₂⁻는 $\cdot\text{OH}$, H₂O₂ 등의 반응성이 강한 radical 생성에 관여하여 조직을 손상시킨다[24]. 본 연구에서 PMS/NADH로 유발된 O₂⁻ radical에 의해 NBT가 자색의 formazan으로 환원되는 원리를 이용한 O₂⁻ radical assay를 통해 3가지 감초 추출물의 O₂⁻ radical 소거능을 측정하였다[16]. *G. uralensis*, *G. glabra*, SW 등 3가지 감초 추출물의 농도별 O₂⁻ radical 소거능을 측정한 결과(Table 3), 3가지 감초 추출물은 농도 의존적으로 O₂⁻ radical 소거능이 증가함을 확인하였다. 특히 *G. glabra* 추출물이 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 60% 이상의 가장 높은 O₂⁻ radical 소거능을 나타내었다. 이전 연구에서 감초 추출물의 O₂⁻ radical 소거능을 측정한 결과, 약 50%의 O₂⁻ radical 소거능을 나타내어 본 연구와 유사한 수치를 나타냄을 알 수 있었다[27].

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로써, 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소 단백질과 같은 분자들과 결합하는 성질로 인해 항암, 항염증 및 항산화 등의 다양한 생리활성 기능을 갖는 것으로 알려져 있다[28]. 플라보노이드는 식물이 함유하고 있는 노란색을 띤 천연 물질을 총칭하며, 항산화, 항균, 면역증강, 모세혈관 강화 등 다양한 생리활성을 나타낸다[29]. 특히 페놀 및 플라보노이드는 우수한 항산화 활성을 나타내며, 이들 함량이 높을수록 항산화 활성이 높다고 알려져 있다[29,30]. 본 연구에서 *G. uralensis*, *G. glabra*,

Table 4 Total phenolic and flavonoid contents of extract from *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza glabra*, and Shinwongam

	Garlic acid equivalent (mg/ext g)	Quercetin equivalent (mg/ext g)
Control	0.00±0.00	0.00±0.00
GU	145.16±0.39 ^c	1608.33±434.18 ^c
GB	149.30±0.29 ^b	2238.89±120.87 ^b
SW	169.69±0.80 ^a	3791.67±82.34 ^a

Values are means ± SD ($n=6$). ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. GU, *Glycyrrhiza uralensis*; GB, *Glycyrrhiza glabra*; SW, Shinwongam

SW 등 3가지 감초 추출물의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과(Table 4), 3가지 감초 추출물 중 SW 추출물은 가장 높은 페놀 및 플라보노이드 함량을 갖는 것을 확인하였다. 따라서, 다른 감초 추출물에 비해 SW 추출물은 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 높아 항산화 활성이 우수한 것으로 사료된다.

뇌는 신경세포와 신경교세포 등으로 구성되며, 이 중 신경교세포는 뇌 손상 초기에 활성화되어 손상된 신경세포나 이물질을 제거하는 포식작용을 하는 등 체내 macrophage와 유사한 작용을 하기 때문에 brain macrophage로 불리기도 한다 [31]. 전체 뇌 세포의 5-10%를 차지하고 있는 신경교세포는 유해한 자극 (stress)으로 뇌 손상이 유도되었을 때 활성화 되어 신경염증 (neuroinflammation)을 유도한다[31,32]. 이는 염증매개인자인 iNOS, COX-2 등과 염증성 cytokine인 interleukine (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- β 등을 과발현시켜 신경세포 사멸을 유도한다[33]. 이와 같은 작용으로 신경교세포의 손상은 알츠하이머병, 파킨슨병과 같은 신경퇴행성질환의 발병에 기여하는 것으로 알려져 있다[34]. 따라서 뇌 손상으로부터 신경교세포를 보호 할 수 있는 여러 천연물 소재 개발에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[35,36]. 본 연구에서 ROS의 일종인 H₂O₂로 산화적 손상이 유도된 C6 glial cell을 이용하여 *G. uralensis*, *G. glabra*, SW 등 3가지 감초 추출물의 신경교세포 보호 효과를 확인하였다. 세포 생존율을 측정된 결과(Fig. 1), 아무것도 처리하지 않은 normal군을 100%라고 하였을 때, H₂O₂만을 처리한 control군의 경우 36.02%의 낮은 세포 생존율을 나타내어 H₂O₂에 의한 C6 glial cell의 산화적 손상을 확인하였다. 반면 *G. uralensis*, *G. glabra*, SW 등 3가지 감초 추출물을 처리하였을 경우, control군에 비해 높은 세포 생존율을 수치를 확인하였으며 특히 100 μ g/mL에서 50% 이상의 세포 생존율을 나타내어 산화적 손상에 대한 보호 효과가 있음을 알 수 있었다. 특히 50과 100 μ g/mL의 농도에서 SW추출물은 다른 감초 추출물에 비해 각각 66.56, 76.42%의 수치를 나타내어 우수한 세포 생존율 개선 효과를 확인하였다. H₂O₂로 산화적 손상이 유도된 신경교세포에서 감초추출물을 5, 10, 25 μ g/mL 농도의 처리 시 유의적으로 세포 생존율이 증가하였으며, lipopolysaccharide (LPS)로 신경염증이 유도된 신경교세포에서 감초추출물을 2.5, 5, 10, 20 μ g/mL의 농도로 처리 시 유의적으로 세포 생존율이 증가되어 감초 추출물의 신경교세포 보호 효과가 보고된 바 있다[37,38]. 본 연구에서도 이와 유사하게 감초 추출물의 처리 시 세포 생존율이 증가하여 신경교세포 보호

Fig. 1 Effect of extract from *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza glabra*, and Shinwongam on cell viability of C6 glial cells treated with H₂O₂. Values are means ± SD ($n=6$). ^{a-b}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. NS, non-significance; GU, *Glycyrrhiza uralensis*; GB, *Glycyrrhiza glabra*; SW, Shinwongam

효과를 확인하였고, 특히 다른 감초 추출물에 비해 SW 추출물의 세포 생존율 개선 효과가 가장 우수함을 알 수 있었다.

ROS는 체내 정상적인 산화과정 중에 생성되나, 과량 생성 시 높은 반응성을 갖는 성질로 인해 세포의 지질, 단백질, 핵산 등의 손상을 일으킨다[3]. 본 연구에서 DCF-DA assay를 이용하여 산화적 손상이 유도된 C6 glial cell의 ROS 생성량을 측정된 결과(Fig. 2), 60분 기준으로 H₂O₂만을 처리한 control군의 경우 normal군보다 유의적으로 높은 ROS 생성량을 나타내어 세포의 산화적 손상이 유발되었음을 확인하였다. 반면 *G. uralensis*, *G. glabra*, SW 등 3가지 감초 추출물을 처리하였을 때, control군보다 유의적으로 낮은 ROS 생성량을 나타내었고, 특히 50과 100 μ g/mL의 농도에서 SW추출물은 다른 감초 추출물에 비해 유의적으로 가장 낮은 ROS 생성량을 확인하였다. 또한, 본 연구에서 5, 100 μ g/mL의 농도에서 *G. uralensis* 추출물은 *G. glabra* 추출물에 비해 유의적으로 ROS 생성량이 낮았다. 이는 이전 연구에서 *G. uralensis* 추출물과 *G. glabra* 추출물의 *in vitro* ROS 소거능을 측정된 결과, *G. uralensis* 추출물의 ROS 소거능이 더욱 우수하게 나타나 본 결과와 유사함을 알 수 있었다[39]. 뿐만 아니라 본 연구에서 SW 추출물은 *G. uralensis* 및 *G. glabra* 추출물에 비해 유의적으로 낮은 ROS 생성량을 나타내어, ROS 생성 억제 효과를 통한 항산화 활성을 확인할 수 있었다. 감초의 대표적인 활성성분은 glycyrrhizic acid, liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin, licochalcone A 등의 생리활성성분을 함유하는 것으로 보고되었다[7,12-13]. 이전 연구에 의하면, 감초의 활성성분인 glycyrrhizic acid는 산화적 손상이 유도된 신경세포에서 항산화 효소 활성 증가를 통해 ROS 소거능을 나타내었으며, isoliquiritigenin과 glycyrrhizic acid는 산화적 손상을 유도한 신경교세포에서 ROS 생성 억제 효과를 통해 신경교세포 보호 효과가 보고되었다[37,40]. 따라서 이들 생리활성 성분들의 작용으로 인해 ROS 소거를 통한 산화적 스트레스 개선 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

세포의 산화적 손상 시, iNOS는 hepatocytes, smooth muscle

Fig. 2 Effect of extract from *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza glabra*, and Shinwongam on ROS production of C6 glial cells treated with H_2O_2 . Values are means $\pm$ SD ($n=6$). ^{a,b}Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test. NS, non-significance; GU, *Glycyrrhiza uralensis*; GB, *Glycyrrhiza glabra*; SW, Shinwongam

cells, bone marrow cells, monocytes, macrophages 등 다양한 세포에서 발현되어 다량의 NO를 생성시키고 세포독성, 유전자 변이, 신경손상, 조직손상 등을 일으켜 염증반응을 악화시킨다 [41]. COX는 arachidonic acid로부터 prostaglandins (PGs)을 생합성하는 효소로 COX-1과 COX-2 두 가지의 isoform으로 존재한다[42]. COX-1은 체내 대부분의 조직에 항상 발현되어 있어 혈소판 형성, 위장 세포 보호 및 신장 기능 유지 등의 생리적인 역할을 통해 체내 항상성을 조절하는 기능을 하며, COX-2는 손상시 발현된 염증성 cytokine에 유도되어 염증 관련 PGs인 prostaglandin E2를 과량 생성시켜 염증반응을 악화시킨다 [42,43]. 본 연구에서는 H_2O_2 로 산화적 손상을 유도한 C6 glial cell에 50 μ g/mL의 농도로 *G. uralensis*, *G. glabra* 및 SW 추출물을 처리하여 염증성 단백질인 iNOS 및 COX-2 단백질 발현을 확인하였다(Fig. 3). Normal군에 비해 H_2O_2 만을 처리한 control군에서 iNOS, COX-2와 같은 염증성 인자 발현이 유의적으로 증가하여 염증성 자극이 유발되었음을 확인하였다. 그러나, 감초 3종 추출물을 각각 처리한 군의 경우 control군에 비

해 유의적으로 낮은 단백질 발현을 나타내어 염증반응에 대한 보호 효과를 확인하였다. iNOS 단백질의 경우 SW 처리군이 가장 낮은 발현을 나타내었으며, COX-2 단백질은 *G. uralensis* 처리군이 가장 낮은 단백질 발현을 나타내었다. 따라서 *G. uralensis*, *G. glabra* 및 SW 등 3가지 감초 추출물은 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 조절을 통한 염증반응 개선 효과가 있음을 확인하였다. 이전 연구에 의하면, *G. uralensis* 및 *G. glabra* 추출물은 각각 150, 50 μ g/mL의 농도에서, LPS로 염증반응이 유도된 Raw264.7 대식세포의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현을 유의적으로 억제시켜 염증반응 개선 효과가 보고되었다[44,45]. 뿐만 아니라, 감초의 대표적인 활성성분인 glycyrrhizic acid, liquiritin, liquiritigenin은 LPS로 신경염증이 유도된 신경교세포에서 iNOS, COX-2와 같은 염증매개인자 발현을 감소시켰으며, TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 염증성 cytokines 발현을 유의적으로 감소시켜 신경교세포 보호 효과를 나타냄이 보고되었다[46]. 따라서 본 연구에서 3가지 감초 추출물의 항산화 및 신경교세포 보호 효과는 이들 활성성분의 생리활성 작용으로 인한 것으로 사료된다.

본 연구에서 *G. uralensis*, *G. glabra* 및 SW 등 3가지 감초 추출물의 DPPH, $\cdot OH$, O_2^- radical 소거능 측정을 통해 *in vitro* 항산화 활성을 확인하였고, 특히 SW 추출물은 다른 추출물에 비해 페놀 및 플라보노이드 함량이 높음을 확인하였다. 또한 H_2O_2 로 산화적 스트레스가 유도된 C6 glial cell에서 SW 추출물은 다른 감초 추출물에 비해 ROS 생성 억제 및 iNOS 단백질 발현 억제 효과가 높은 것을 알 수 있었다. 따라서 *G. uralensis*, *G. glabra* 및 SW 등 감초 추출물은 산화적 스트레스에 대한 신경교세포 보호 효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글 이 논문은 2020년도 경남과학기술대학교 교원 연구활성화 지원 사업의 예산지원으로 수행되었음.

초 록

산화적 스트레스는 신경퇴행성 질환 발병의 원인으로 알려져 있다. 본 연구는 대표적인 감초 종류인 *Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis*와 신흥종 감초인 신흥감(SW)의 *in vitro* free radical 소거능을 통한 항산화 활성과 H_2O_2 유도 산화적 스트레스에 대

Fig. 3 Effect of extract from *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza glabra*, and Shinwongam on iNOS and COX-2 protein expressions of C6 glial cells treated with H_2O_2 . Values are means $\pm$ SD ($n=3$). ^{a,c,e}Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test. β -Actin was used as a loading control. GU, *Glycyrrhiza uralensis*; GB, *Glycyrrhiza glabra*; SW, Shinwongam

한 C6 glial cell 보호 효능을 확인하고자 하였다. *In vitro* assay에서 *G. uralensis*, *G. glabra*, SW 추출물은 농도유의적으로 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, $\cdot\text{OH}$, O_2^- radical 소거능이 증가하여 *in vitro* 항산화 활성을 확인하였다. 또한, SW 추출물은 *G. uralensis*, *G. glabra* 추출물에 비해 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 가장 우수하였다. H_2O_2 로 산화적 스트레스를 유도한 C6 glial cell에 3가지 감초 추출물을 각각 처리 시, 농도의존적으로 세포 생존율이 증가와 reactive oxygen species 소거능이 증가하여 3가지 감초 추출물의 산화적 손상에 대한 신경교세포 보호 효과를 확인하였다. 특히, SW 추출물은 *G. uralensis*, *G. glabra* 추출물에 비해 우수하게 C6 glial cell 보호 효과를 나타내었다. 또한, 3가지 감초 추출물의 신경교세포 보호 메커니즘을 확인하기 위해, 염증 관련 단백질 발현을 측정하였다. 3가지 감초 추출물은 H_2O_2 만을 처리한 control군에 비해 inducible nitric oxide synthase 및 cyclooxygenase-2 발현 감소를 통해 염증반응 조절을 통한 신경교세포 보호 작용기전을 확인하였다. 본 연구는 *G. uralensis*, *G. glabra*, SW 등 3가지 감초 추출물이 산화적 손상이 유도된 신경교세포 보호에 유용한 소재로서의 가능성이 있는 것으로 사료된다.

Keywords 산화적 스트레스 · *Glycyrrhiza glabra* · *Glycyrrhiza uralensis* · Hydrogen peroxide · Shinwongam

References

- Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD (2004) Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52: 794–804
- Valko M, Leibfriz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44–84
- Rimessi A, Previati M, Nigro F, Wieckowski MR, Pinton P (2016) Mitochondrial reactive oxygen species and inflammation: Molecular mechanisms, diseases and promising therapies. *Int J Biochem Cell Biol* 81: 281–293
- Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H (1999) Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol* 9: 93–117
- Albarracín SL, Stab B, Casas J, Sutachan JJ, Samudio I, Gonzalez J, Gonzalo L, Capani F, Morales L, Barreto GE (2012) Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutr Neurosci* 15: 1–9
- Ghosh N, Ghosh R, Mandal SC (2011) Antioxidant protection: a promising therapeutic intervention in neurodegenerative disease. *Free Radic Res* 45: 888–905
- Ha JH, Lee HM, Kwon SS, Kim HS, Kim MJ, Jeon SH, Jeong YM, Hwang JP, Park JH, Choi YK, Park J, Park SN, Park DS (2013) Screening of effective extraction conditions for increasing antioxidant activities of licorice extracts from various countries of origin. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 39: 259–269
- Kim SJ, Kwon DH, Lee JH (2006) Investigation of antioxidative activity and stability of ethanol extracts of licorice root (*Glycyrrhiza glabra*). *Korean J Food Sci Technol* 38: 584–588
- Shul'ts EE, Petrova TN, Shakirov MM, Chernyak EI, Tolstikov GA (2000) Flavonoids of roots of *Glycyrrhiza uralensis* growing in siberia. *Chem Nat Compd* 36: 362–368
- Kim HJ, Jang HN, Bae JY, Ha JH, Park SN (2014) Antimicrobial activity, quantification and bactericidal activities of licorice active ingredients. *Korean J Microbiol Biotechnol* 42: 386–392
- Jang DE, Song J, Hwang IG, Lee SH, Choe JS, Hwang KA (2017) Determination of glycyrrhizic acid content and anti-diabetic effect of *Glycyrrhiza uralensis* depending on cultivation region. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 46: 39–45
- Kondo K1, Shiba M, Nakamura R, Morota T, Shoyama Y (2007) Constituent properties of licorices derived from *Glycyrrhiza uralensis*, *G. glabra*, or *G. inflata* identified by genetic information. *Biol Pharm Bull* 30: 1271–1277
- National Institute of Horticultural and Herbal Science (2014) Annual Reports. Wanju: National Institute of Horticultural and Herbal Science 2014: 58–59
- Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T (1989) Effects of the interaction of tannins with co-existing substances: Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull* 37: 2016–2021
- Kim JW, Minamikawa T (1997) Hydroxy radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 118–123
- Nishikimi M, Appaji N, Yagi K (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 46: 849–854
- Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239–243
- Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109–114
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55–63
- Wang H, Joseph JA (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27: 612–616
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53: 1841–1856
- Ha JH, Lee HM, Kwon SS, Kim HS, Kim MJ, Jeon SH, Jeong YM, Hwang JP, Park JH, Choi Y, Park J, Park SN, Park DS (2013) Screening of effective extraction conditions for increasing antioxidant activities of licorice extracts from various countries of origin. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 39: 259–269
- Woo KS, Jang KI, Kim KY, Lee HB, Jeong HS (2006) Antioxidative activity of heat treated licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) extracts. *Korean J Food Sci Technol* 38: 355–360
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1–14
- Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S (2019) Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* 24: E1583
- Gutteridge JM (1987) Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA. *Biochem J* 243: 709–714
- Chung HY, Kim HB (2000) *In vitro* studies on the superoxide scavenging activities, the cytotoxic and the immunomodulating effects of thirteen kinds of herbal extracts. *Korean J Food Sci Technol* 32: 699–705
- Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM, Haddad MA, Al-Hiary M (2019) Natural polyphenols: chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *J AOAC Int* 102: 1397–1400
- Kumar S, Pandey AK (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal* 2013: 162750
- Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2: 270–278
- Lue LF, Walker DG, Rogers J (2001) Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures. *Neurobiol Aging* 22: 945–956
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the

- CNS. Trends Neurosci 19: 312–318
33. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS (2004) Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. J Neuroinflammation 1:14
 34. Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D (2008) Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. J Cell Mol Med 12: 762–780
 35. Quincozes-Santos A, Andreazza AC, Nardin P, Funchal C, Gonçalves CA, Gottfried C (2007) Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. Neurotoxicology 28: 886–891
 36. Lee AY, Wu TT, Hwang BR, Lee J, Lee MH, Lee S, Cho EJ (2016) The neuro-protective effect of the methanolic extract of *Perilla frutescens* var *japonica* and rosmarinic acid against H₂O₂-induced oxidative stress in C6 glial cells. Biomol Ther 24: 338–345
 37. Park CH, Kim JH, Choi SH, Shin YS, Lee SW, Cho EJ (2017) Protective effects of *Glycyrrhiza uralensis* Radix extract and its active compounds on H₂O₂-induced apoptosis of C6 glial cells. Korean J Medicinal Crop Sci 25: 315–321
 38. Lee SE, Lee JH, Park CG, Kim HD, Lee YJ, Seo KH, Jeong HS, Chang JK, Kim DH (2019) Evaluation of the *in vitro* activity of *Glycyrrhiza* cultivar roots. Korean J Medicinal Crop Sci 27: 115–125
 39. Han SB, Gu HA, Kim SJ, Kim HJ, Kwon SS, Kim HS, Jeon SH, Hwang JP, Park SN (2013) Comparative study on antioxidative activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts by country of origin. J Soc Cosmet Scientists Korea 39: 1–8
 40. Kao TC, Shyu MH, Yen GC (2009) Neuroprotective effects of glycyrrhizic acid and 18beta-glycyrrhetic acid in PC12 cells *via* modulation of the PI3K/Akt pathway. J Agric Food Chem 57: 754–761
 41. Nussler AK, Billiar TR (1993) Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. J Leukoc Biol 54: 171–178
 42. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annu Rev Biochem 69: 145–182
 43. Wu KK, Liou JY (2005) Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase. Biochem Biophys Res Commun 338: 45–52
 44. Bak JP, Son JH, Kim YM, Lee EU, Leem KY, Kim EH (2011) Suppression of inflammatory macrophage response by *Glycyrrhiza uralensis* herbal acupuncture extract. Korean J of Acupunct 28: 49–58
 45. Li C, Eom T, Jeong Y (2015) *Glycyrrhiza glabra* L. extract inhibits LPS-induced inflammation in RAW macrophages. J Nutr Sci Vitaminol 61: 375–381
 46. Yu JY, Ha JY, Kim KM, Jung YS, Jung JC, Oh S (2015) Anti-Inflammatory activities of licorice extract and its active compounds, glycyrrhizic acid, liquiritin and liquiritigenin, in BV2 cells and mice liver. Molecules 20: 13041–13054