

글루타메이트에 의한 산화적 스트레스를 받은 HT22 세포주에서 원화 메탄올 추출물의 신경세포 보호 활성

노경옥 대학원생¹, 김경한 교수², 이한샘 연구원³, 김민아 연구원³, 이기현 교수^{1*}

1. 동신대학교 한의과대학 한의예과
2. 우석대학교 한의과대학 예방의학교실
3. 한국한의학진흥원

Neuroprotective Effect of Methanol Extraction of *Daphne genkwa* Flos against Glutamate-induced Oxidative Stress in HT22 Cells

Kyoung Ok No¹, Kyeong-Han Kim², Han-Saem Lee³, Min-A Kim³, Gihyun Lee^{1*}

1. College of Korean Medicine, Dongshin University
2. Department of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Woosuk University
3. National Institute for Korean Medicine Development

Abstract

Purpose: In this study, the neuroprotective effect of the methanol extract of *Daphne genkwa* Flos (DGF-ex) against glutamate-induced neurotoxicity was studied in mouse hippocampal HT22 cells.

Materials and Methods: We conducted the cytoprotective effect of DGF-ex against a 24-hour-stress-induced condition by glutamate in HT22 cells. The inhibitory effect of DGF-ex on cellular necrosis and apoptosis and ROS (reactive oxygen species) was observed using fluorescence microscopy. To further clarify its antioxidant efficacy, assays on SOD (superoxide dismutase) regulation and DPPH/ABTS radical scavenging ability were also conducted. A chemical profile of DGF-ex was also obtained via UPLC analysis.

Results: Pretreatment with DGF-ex significantly reduced glutamate-induced loss of cell viability and release of LDH (lactate dehydrogenase). DGF-ex showed similar effects to the antioxidant quercetin (15 μ M) in the evaluation of DPPH/ABST radical scavenging

Correspondence: 이기현(Gihyun Lee)

Daejeong 4 Building, Dongshin University, Naju-si, Jeonnam-do, 58245, Rep. of Korea

Tel: +82-61-330-3511, E-mail: glee@dso.ac.kr

Received 2021-09-10, revised 2021-10-18, accepted 2021-10-24, available online 2021-10-27

doi:10.22674/KHMI-9-2-5



activity and SOD activity evaluation. In addition, DGF-ex remarkably downregulated the glutamate-induced programmed HT22 cell death, which was shown in the normalization of the cellular necrosis and apoptosis ratio.

Conclusion: These results exhibit DGF-ex has the ability to protect against glutamate-induced cytotoxicity in the HT22 cell line via the drug candidate's antioxidant capacity. This research confirmed the DGF-ex as a valuable drug candidate for the prevention and treatment of oxidative stress-mediated neurodegenerative diseases.

Keywords: Daphne genkwa Flos, glutamate-induced cytotoxicity, HT22 hippocampal neurons

서론

중추신경계의 퇴행성 뇌질환(알츠하이머 증후군, 파킨슨 증후군, 헌팅턴 증후군 등)의 원인 중 산화적 스트레스(oxidative stress)가 중요한 요인으로 밝혀졌다.^{1,2)} 이러한 산화적 스트레스는 항산화 시스템의 기능이 저하되면서 체내의 산화계와 항산화계의 불균형으로 일어나거나 체내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 많이 발생하는 것으로 알려져 있다.³⁾

글루타메이트(glutamate)는 중추신경계에서 중심적인 흥분성 신경전달물질로 신경세포에서 학습 및 기억에 중요한 역할을 하지만, 소량의 글루타메이트는 흥분성 신경독성을 일으켜 신경세포의 사멸을 일으키며⁴⁾ 지나치게 글루타메이트의 양이 많아지면 활성산소종의 생산이 증가하게 된다.⁵⁾

마우스 헤마 유래 세포주인 HT22 세포주는 글루타메이트 수용체가 없는 세포주로서 글루타메이트를 HT22 세포에 처리하였을 때 신경흥분 독성이 아닌 산화적 스트레스로 인하여 세포가 손상을 받으며, 산화적 스트레스로 인한 퇴행성 뇌질환 연구에서 널리 사용되는 실험모델 중의 하나로 알려져 있다.⁶⁾

원화(Daphne genkwa Flos)는 팔꽃나무과(Thymeleaceae)의 팔꽃나무의 꽃봉오리를 건조한 것으로 약성은 따뜻하고 맛은 맵고 쓰다. 주로 비, 폐, 신경으로 들어가서 효능을 발휘한다.^{7,8)} 원화에 대해서는 독성이 있다고 기록된 문헌들이 많으나, 예로부터 이노제, 진해제, 거담제, 낙태 및 항종양 목적으로도 사용되었다.⁹⁾ 원화에서 분리한 일부 화합물(yuanhuahine, yuanhualine, yuanhuacine, yuanhuadine, yuanhuagine daphnane diterpene esters)이 정상 폐 상피세포(normal lung epithelial cell)에는 독성이 없지만 폐암(human lung cancer) 세포에 항암활성 12-53nM의 IC₅₀를 보였다고 보고되었다.¹⁰⁾ 이처럼 팔꽃나무에서 항암(anti-cancer), 항염증(anti-inflammation), 그리고 항보체(anti-complement) 효과가 있음이 알려졌다.¹¹⁻¹⁴⁾ 신경전구세포에 Foxa2와 Nurr1이 발현되도록 조작하여 파킨슨병 동물모델 쥐의 뇌에 이식한 경우 행동장애를 감소시킨다고 알려져있으며,¹⁵⁾ 팔꽃나무의 줄기(stem)와 뿌리(root) 추출물에서 분리한 성분이 Nurr1의 전사 기능을 활성화하고, 파킨슨병의 동물모델에서 신경 보호 효과가 있음이 밝혀졌다.¹⁶⁾ 하지만, 지금까지 원화의 신경세포보호 활성에 대하여 보고된 바는 거의 없다.

본 연구진은 여러 종류의 천연물의 추출물을 대상으로 신경세포보호 활성을 탐색하던 중 원화의 메탄올 추출물이 유의성 있는 뇌신경세포 보호 활성을 나타내어 다양한 농도에서 뇌신경세포 보호 활성 및 항산화능을 평가하고자 본 연구를 수행하였다.



본론

1. 실험재료 및 방법

1) 시약 및 재료

세포주 배양을 위하여 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS (fetal bovine serum), PS (penicilin streptomycin)는 Thermo Fisher Scientific Inc. Korea 에서 구입하였다. 세포의 생존율 및 독성을 측정하기 위해 Quanti-MAX WST-8 cell viability assay kit 와 Quantit-LDHTM cytotoxicity assay kit 는 Biomax (BIOMAX Co., Ltd.)에서 구입하였다. 항산화 측정을 위해 EZ-SOD assay kit (DG-SOD400)는 Dogen (DoGenBio Co., Ltd)에서 구입하였으며, ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt], DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), potassium persulfate 은 Sigma-Aldrich 에서 구입하였다. ab176749 Apoptosis/Ncrosis Assay Kit, ab113851 DCFDA/H2DCFDA-Cellular Ros Assay Kit 는 abcam 사에서 구입하였다. L-Glutamic acid monosodium.salt, Quercetin ($\geq 95\%$ HPLC)는 Sigma-Aldrich 에서 구입하였다.

2) 원화 메탄올 추출물의 제조

원화 메탄올 추출물(Methanol Extration of Daphne Genkwa Flos, DGF-ex)은 한국한의학진흥원에서 추출한 후 한국한의학진흥원 천연물소재은행에서 보관하고 있으며, 그 일부를 분양받아 실험에 사용하였다. 추출방법은 대우약품사(Daegu, Korea)로부터 구매한 원화 600g 을 70% 메탄올을 3.5L 에 담고, 3 시간 동안 환류추출 후 용매를 분리 여과하였다. 동일한 양의 70% 메탄올로 동일한 조건에서 한 번 더 추출한 다음, 추출액을 모아 감압농축하고, 동결건조 과정을 통해 72.28g 의 추출물을 얻었다.(수율 12.12%)

3) UPLC 분석을 통한 원화 메탄올 추출물의 Finger Printing 패턴 확인

원화 메탄올 추출물(DGF-ex)이 가지고 있는 지표물질의 finger printing 패턴을 보기 위해 UPLC 분석을 하였다. 분석은 ACQUITY UPLCTH BEH C₁₈ (2.1 × 50 mm, 1.7 μm; Waters, USA)의 역상 컬럼을 통해 이뤄졌으며, 이동상으로는 0.1% formic acid 를 포함하는 물(solvent A)과 0.1% formic acid 를 포함하는 메탄올(solvent B)을 사용하였다. 컬럼에 샘플을 2μl injection 한 후 9 분까지 solvent B 를 0%에서 100%로 변화시켰으며, 1 분간 100%를 유지시켰다. 그 후 1 분 안에 다시 0%까지 감소시키고 이를 2 분간 유지하였다. 이 때 유속은 0.3 ml/min 이며, 검출파장은 280nm 에서 측정하였다.

4) HT22 세포 배양

쥐의 해마 유래 세포주인 HT22 cell 을 이용 10% FBS (fetal bovine serum), 1% PS (penicillin-streptomycin)을 포함하는 DMEM 배지를 사용하여 5% CO₂, 37℃의 조건에서 배양하였다.

5) 세포 생존율 측정

WST assay 를 이용 세포 생존율(cell viability)를 측정하였다. 96-well plate 에 배양한 세포주를 0.8×10^4 cells/well 의 농도로 100 μ l 씩 분주(seeding)하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 24 시간 동안 배양하였다. control well 에는 10 μ l 의 PBS 를, negative control well 에는 5 μ l 의 PBS 를 positive control well 에는 quercetin 5 μ l 첨가하였다. 나머지 well 에도 각각 5 μ l 씩 서로 다른 농도의 DGF-ex (100, 50, 25 μ g/ml)를 처리하였다. 약 1 시간 배양한 후 control 을 제외한 모든 well 에 5 μ l 의 glutamate 를 첨가하였다(total vol. 110 μ l/well, 최종농도: glutamate 9mM, quercetin 15 μ M, DGF-ex 100, 50, 25 μ g/ml). 처리 후 24 시간 배양하고, 모든 well 에 10 μ l/well 의 WST-8 을 처리하였다. 약 1 시간 재배양 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyval, CA, USA)를 사용하여 450nm 에서 흡광도 변화를 측정하였다. 아래와 같이 대조군을 기준으로 각 실험군에 대한 세포 생존율을 백분율로 나타내었으며, 같은 조건에서 3 회 반복한 실험 결과값을 통계처리하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

A: absorbance of Positive/Negative control or sample
 B: absorbance of control (without sample)

6) LDH (Lactate dehydrogenase) 분석

LDH 의 양은 세포독성에 의해 손상된 세포에서 세포 외로 분비되는 것으로 세포독성 평가를 하는 대표적인 방법 중의 하나이다.¹⁷⁾ Quantit-LDHTM cytotoxicity assay kit (BIOMAX Co., Ltd.) 를 사용하여 분석하였으며, 위 세포 생존율(cell viability)을 측정하기 위한 동일 조건, 동일 plate 에서 배지의 상등액 10 μ l 를 취하여 kit 의 프로토콜에 따라 세포독성 평가를 진행하였다. ELISA reader 를 이용 450nm 에서 흡광도 변화를 측정하였으며, 실험값은 LDH 분비량의 백분율(%)로 표시하였으며, 같은 조건에서 3 회 반복한 실험 결과값을 통계처리하였다.

7) 원화 메탄올 추출물의 DPPH/ABTS 라디칼 소거능 측정과 SOD (superoxide dismutase) 유사 활성 측정

DPPH 에 대한 수소 공여 효과로 측정하는 라디칼 소거능은 Blois¹⁸⁾의 방법을 참고하여 측정하였다. 일정 농도(200, 100, 50, 25 μ g/ml)로 섞은 DGF-ex 에 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) 용액 0.2mM 을 첨가하여 잘 혼합한 후 빛이 차단된 장소에서 30 분간 반응시킨 후 517nm 에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 의 환원에 의한 흡광도를 조사하였고 조사한 데이터를 바탕으로 50% DPPH 의 radical 을 소거하는 데 필요한 sample 의 농도(SC₅₀)를 계산하였다. 대조구로는 15 μ M 의 quercetin 을 사용하였다. 결과값은 추출물 첨가구와 대조구를 비교하여 라디칼의 소거 활성을 백분율(%)로 나타내었으며 같은 조건에서 3 회 반복한 실험 결과값을 통계처리하였다.

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 라디칼 소거능은 Arano et al.¹⁹⁾과 Re et al.²⁰⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. ABTS 용액 7mM 에 potassium persulfate 용액 2.45mM 을 혼합하여 암 조건에서 약 하루 동안 반응시킨 후 734nm 에서 흡광도 값이



0.7±0.02 가 되도록 조절하여 사용하였다. 반응시킨 ABTS 용액을 시료와 혼합하여 암 조건에서 5 분간 재반응시켜 734nm 에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 15µM 의 quercetin 을 사용하였다. 결과값은 추출물 첨가구와 대조구를 비교하여 라디칼의 소거 활성을 백분율(%)로 나타내었으며 같은 조건에서 3 회 반복한 실험 결과값을 통계처리하였다.

EZ-SOD assay kit (Dogenbio Co., Korea)를 이용하여 SOD 유사활성을 측정하였다. 희석한 sample 을 각 sample well 과 무처리구 2(blank 2)의 well 에 20µL 씩 넣어주고 무처리구 1(blank 1)와 무처리구 3(blank 3) well 에는 ddH₂O 를 20µL 씩 각각 넣어주었다. 각 well 에 WST working solution 200µL 를 무처리구 2(blank 2)와 무처리구 3(blank 3)의 well 에 dilution buffer 를 20µL 씩 넣어주었다. enzyme working solution 을 무처리구 1(blank 1)과 sample well 에 20µL 씩 각각 넣어준 후 plate 를 37°C에서 20 분간 반응시켰다. 450nm 에서 흡광도를 측정하였다. 결과값은 같은 조건에서 3 회 반복하여 결과 값을 통계처리하였다.

$$\text{SOD activity (\%)} = \frac{(\text{OD blank 1} - \text{OD blank 3}) - (\text{OD sample} - \text{OD blank 2})}{(\text{OD blank 1} - \text{OD blank 3})} \times 100$$

8) 세포 내 ROS 및 Apoptosis/Necrosis 측정

세포생존을 분석과 동일한 방법으로 HT22 cell 에 quercetin, DGF-ex 과 glutamate 를 처리하고 37°C, 5% CO₂ 의 조건에서 5 시간 배양 후 Cellular ROS Assay Kit (abcam Inc.)를 이용하여 실험 후 형광현미경을 이용하여 촬영하였으며, 동일 조건에서 8 시간 배양 후 Apoptosis/Necrosis Assay Kit (abcam Inc.)를 이용하여 실험 후 형광현미경을 이용하여 촬영하였다.

2. 실험결과 및 고찰

1) UPLC 분석을 통한 원화 메탄을 추출물의 Finger Printing 패턴 확인

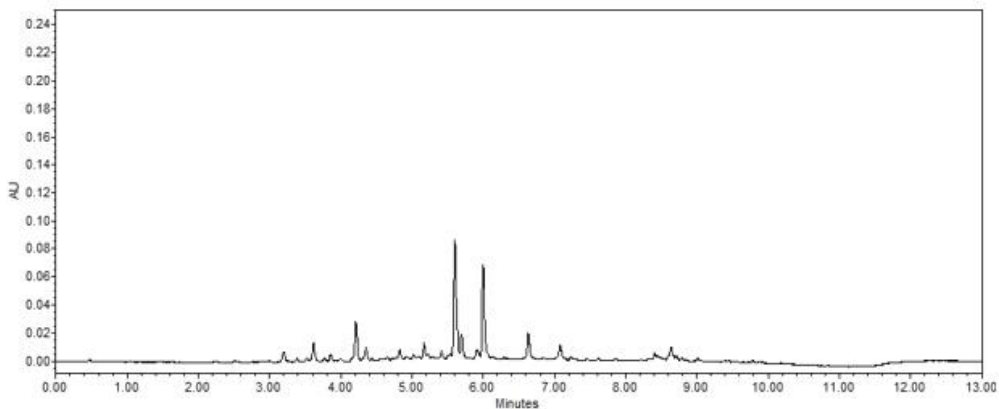


Fig. 1. Finger Printing pattern of DGF-ex through UPLC analysis.

원화의 주요성분은 genkwanin, apigenin, sitosterol 로 알려져 있다.^{21,22)} 본 연구에서 원화의 성분은 정확히 확인할 수 없었으나 DGF-ex 의 finger printing 패턴은 다음과 같았다. Fig. 1 과 같이 검출파장 280nm 에서 retention time 5.6 분과 6.2 분에서 주위 피크보다 높은 피크가 관찰되었다.

2) HT2 세포의 증식에 미치는 Quercetin 과 Glutamate 의 영향

Fig. 2 A 와 같이 glutamate 가 처리된 배지에서 HT2 신경세포의 생존율은 glutamate 의 농도가 높아질수록 세포의 생존율은 유의적으로 감소되어 9mM 처리군의 경우 61.24%의 생존율을 보였다. quercetin 이 처리된 배지의 HT2 신경세포는(Fig. 2 B) quercetin 처리 농도가 15 μ M 일 때 93.27%의 생존율을 보였다. 따라서 HT2 신경세포에 세포독성 및 세포손상을 유발시키기 위한 glutamate 의 농도는 9mM 로, 이에 양성대조군인 quercetin 은 15 μ M 의 농도로 설정하였다.

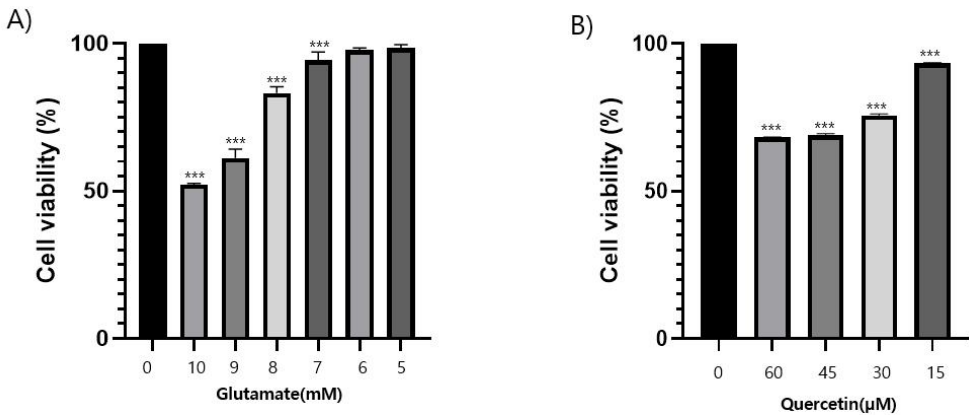


Fig. 2. Effects of glutamate and quercetin on cell viability in the HT2 cell line, a mouse hema-derived cell line. Cells were treated with various concentrations of glutamate (A) and quercetin (B) for 24 h. The cell viability was determined by an WST-8 assay. The results were expressed as the mean \pm SD obtained from three independent experiments (***)p<0.001 compared with the control group).

3) 글루타메이트에 의한 산화적 스트레스가 HT2 세포의 생존율에 미치는 원화 메탄올 추출물의 영향

WST 분석과 LDH 분석을 통하여 DGF-ex 의 전처리가 glutamate 에 의한 세포손상에 미치는 영향을 알아보았다. Fig. 3 A 와 같이 대조군에 비해 glutamate 처리군은 세포 생존율이 41.2% 감소하였다. 그러나 DGF-ex 를 100, 50 및 25 μ g/ml 을 처리하였을 때 glutamate 에 의한 독성을 유의성 있게 감소시켰으며 양성대조군인 quercetin 처리군의 생존율은 85.7%였으며 DGF-ex 100 μ g/ml 처리구의 경우 75.8%로 양성대조군과 비슷한 결과값이 관찰되었다. 이러한 세포생존율을 LDH 분석을 통하여 재확인 한 결과 Fig. 3 B 와 같이 glutamate 처리군에서 46.4% 증가하였으나 25, 50 및 100 μ g/ml 농도의 DGF-ex 처리는 LDH 양이 각각 56, 36, 24%로 유의성 있게 감소시켰다. 이상의 결과는 DGF-ex 가 HT2 세포에서 glutamate 에 의한 세포손상에 대해 보호 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.



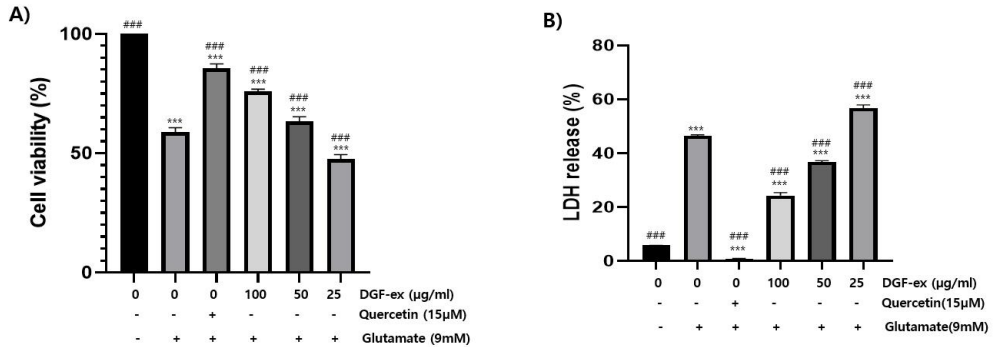


Fig. 3. The protective effect of DGF-ex against glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cell line, a mouse he-ma-derived cell line. Cells were treated with or without DGF-ex and quercetin at the indicated concentrations for 1 h. Then, they were incubated again with or without 9 mM glutamate for 24 h. (A) Cell viability was determined by an WST-8 assay. (B) Cell damage was determined by measuring LDH release into the extracellular medium. The results are expressed as the mean±SD obtained from three independent experiments (**P<0.001 compared with the control group; ###p<0.001 compared with the glutamate-treated group.)

4) 원화 메탄을 추출물의 DPPH/ABTS⁺ 라디칼 소거능 평가와 SOD 유사활성능 평가

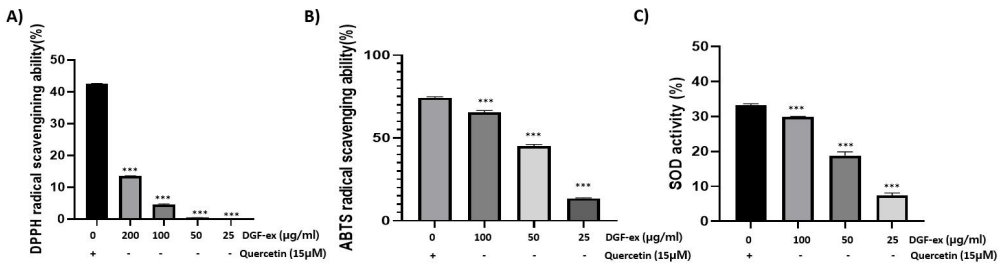
세포 내 활성산소(ROS) 중에서 가장 강력한 유해인자인 과산화 작용을 제어하기 위해서는 라디칼 인자를 제어하는 것이 효과적이다. DPPH는 화학적으로 안정화된 자유라디칼을 가지고 있는 물질로 방향족 화합물(ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy) 등에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는데, 이것은 다양한 천연 소재로부터 항산화물질을 검색하는 데 많이 이용되고 있다.²³⁾ DPPH 라디칼 소거 활성은 DPPH 라디칼을 50% 소거(SC₅₀)하는 데 필요한 물질의 농도로 표기할 수 있으며 우수한 활성을 가진 물질일수록 농도가 낮다. 비교적 안정화된 free radical 인 ABTS⁺ 또한 DPPH 라디칼과 함께 항산화 활성을 평가하는 데 많이 이용되고 있다.

ABTS를 과산화효소(peroxidase), 과산화수소(H₂O₂)와 반응시켜 활성 양이온인 ABTS⁺이 형성되면 추출물의 항산화력에 의해 ABTS⁺이 소거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 수치로 나타내어 추출물의 항산화 활성을 평가할 수 있다.²⁴⁾ ABTS⁺ 라디칼 소거 활성과 DPPH 라디칼 소거 활성과는 결과에서 차이를 나타내었는데 이는 반응속도가 빠른 ABTS⁺ 라디칼과는 달리 DPPH 라디칼의 반응속도는 화합물에 따라서 매우 다르다고 알려져 있으며²⁵⁾ ABTS⁺ 라디칼은 DPPH 라디칼과 달리 극성과 비극성 물질 모두와 반응하여 소거되며 ABTS⁺ 라디칼과 잘 반응하는 항산화 물질이 DPPH 라디칼과는 전혀 반응하지 않을 수도 있다고 알려져 있다.²⁶⁻²⁸⁾

Fig. 4 A·B에서도 결과값의 차이를 보였다. ABTS⁺ 라디칼 소거능 측정에서는 대조구인 quercetin이 74.3%, DGF-ex (100~25 μg/ml)에서 65.4%, 45%, 27%의 소거능을 나타내었다. 또한 DPPH 라디칼의 SC₅₀는 DGF-ex 0.43±0.06mg/ml, quercetin 0.005±0.0001mg/ml 이고 ABTS⁺ 라디칼의 SC₅₀는 DGF-ex 0.06±0.004mg/ml, quercetin 0.003±0.0001mg/ml 으로 나타났다. SOD은 뇌 조직을 포함한 여러 인체 조직들에 존재하는 항산화 효소(antioxidant enzyme)로서 ROS의 해독에 중요한 역할을 한다.²⁹⁾ 또한 SOD 유사활성능 평가에서 슈퍼옥사이드 음이온(superoxide anion)을 과산화수소(H₂O₂)와 산소(O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 매우



중요한 항산화 효소로서 잔틴산화효소(xanthine oxidase)에 의해 생성된 슈퍼옥사이드 음이온이 사용된 시료에 의해 제거된 비율을 관찰함으로써 항산화에 대한 효능을 평가하기도 한다.³⁰⁾ 즉, 효소의 활성이 증가하면 일반적으로 항산화에 대한 효능이 있다고 볼 수 있다. 실험 결과값을 살펴 보면 quercetin의 처리구에서 33.29%의 활성을 보였으며 100 μ g/ml의 DGF-ex에서 29.91%로 대조구인 quercetin 처리구와의 활성 차이가 미미하였다. 따라서 위 실험 결과 DGF-ex은 DPPH 라디칼 소거능 평가와 ABTS⁺ 라디칼 소거능 평가 및 SOD 유사활성능 평가에서 양성 대조구인 quercetin 처리구와 100 μ g/ml의 DGF-ex의 항산화능 비교 결과값이 유사한 값을 나타내었다.



Name	SC ₅₀ (mg/ml) ¹⁾	
	DPPH radical	ABTS radical
DGF-ex	0.43±0.06	0.06±0.004
Quercetin	0.005±0.0001	0.003±0.0001

Fig 4. DPPH & ABTS⁺ radical scavenging assay and SOD activity for the anti-oxidant effect of DGF-ex. The results are expressed as the mean±SD obtained from three independent experiments (***P<0.001 compared with the quercetin group)

¹⁾SC₅₀ value : scavenging concentration for 50% of radical

5) 글루타메이트에 의한 산화적 스트레스가 HT22 세포 내 ROS의 증가와 Apoptosis/Necrosis에 미치는 원화 메탄을 추출물의 영향

DGF-ex의 ROS 소거를 통한 glutamate로 유도된 HT22 세포 사멸에 대한 보호 활성평가를 확인하였으면 결과는 Fig. 5 A·B와 같이 DCF (fluorescence intensity of dichlorofluorescein) intensity fold가 glutamate 처리구에서 7.5로 가장 높았으며, quercetin 처리구 1.9, DGF-ex 100 μ g/ml 처리구는 2.0으로 양성대조구인 quercetin 처리구와 비슷한 결과 값을 얻었다. 또한 Fig. 5 C와 같이 glutamate 처리구에서 apoptosis 및 necrosis가 많이 관찰된 반면 quercetin과 DGF-ex 100 μ g/ml 처리구에서는 apoptosis 및 necrosis가 감소함을 확인할 수 있었다.

이는 glutamate로 산화스트레스를 유도하여 HT22 세포에서 ROS가 증가하였으나 quercetin 처리구와 DGF-ex 100 μ g/ml 처리구에서 ROS의 증가 억제력을 통하여 세포의 사멸(apoptosis 및 necrosis)을 감소시켰다.



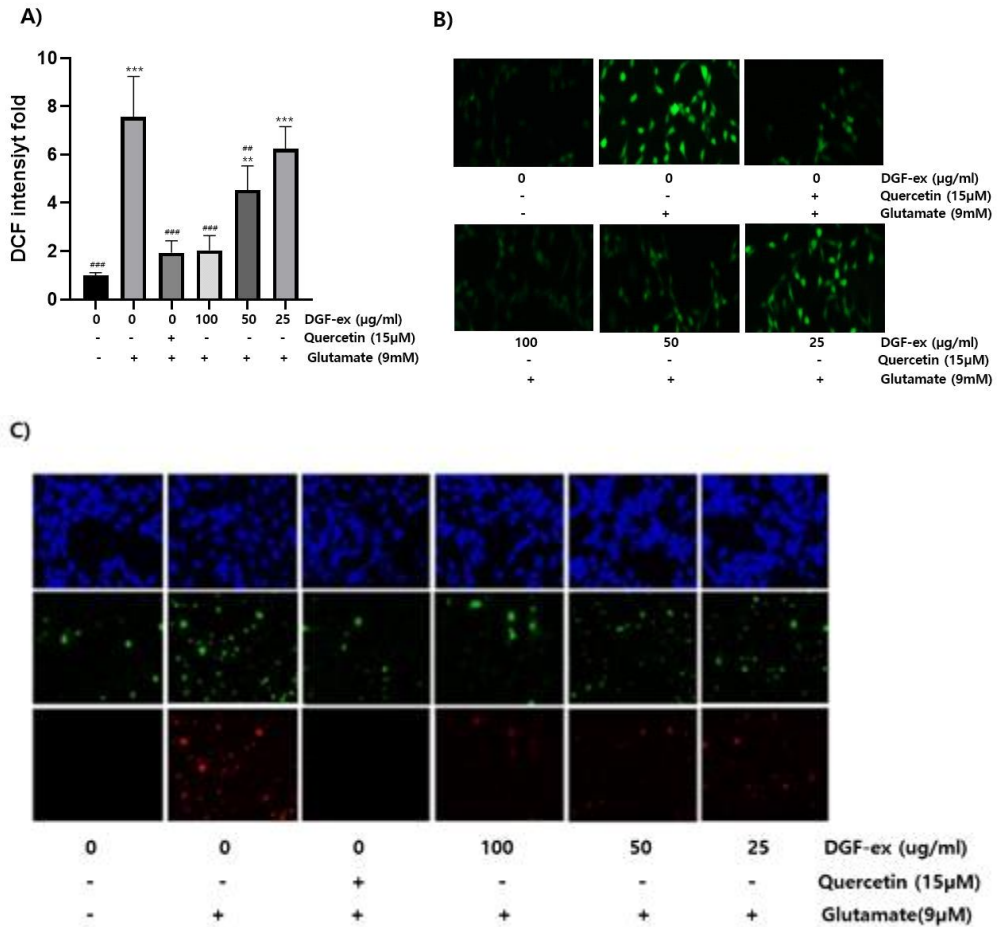


Fig. 5. A) and B) Cell were incubated with glutamate 9 mM and with or with out drugs candidate for 5 hours before ROS analysis C) Cell were incubated with glutamate 9 mM and with or with out drugs candidate for 8 hours before apoptosis/necrosis analysis. Fluorescent images were acquired using a fluorescent microscope. Blue color is viable cell, green color is apoptotic cell and red color is necrotic cell and. Scale bar, 75 μm. The results are expressed as the mean±SD obtained from three independent experiments (***P<0.001, **P<0.01 compared with the quercetin group and ###P<0.001, ##P<0.01 compared with the glutamate-treated group)

결론

본 연구 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 원화 메탄을 추출물(DGF-ex)의 UPLC 분석을 통한 패턴을 확인하였다.
2. 원화 메탄을 추출물의 글루타메이트(glutamate)로 유도된 뇌신경세포 독성 및 손상에 대한 유의적인 보호 효과가 있음을 확인하였다.
3. 원화 메탄을 추출물은 항산화능을 평가하는 DPPH/ABTS⁺ 라디칼 소거능 평가와 SOD 유사활

성능 평가에서 양성 대조군인 quercetin 처리구와 비슷한 항산화능을 가지고 있음을 확인하였다.

4. 원화 메탄을 추출물 25 μ g/ml, 50 μ g/ml 그리고 100 μ g/ml 로 농도를 점차 증가시킴에 따라 글루타메이트에 의해 유도된 HT22 신경세포의 apoptosis, necrosis 및 ROS 증가를 유의적으로 감소시켰으며 이는 양성 대조군인 quercetin 처리구와 비슷한 관찰 양상을 보였다.

따라서 원화 메탄을 추출물은 HT22 신경세포의 노화 및 손상을 예방할 수 있는 후보물질로서 가치가 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 동신대학교 학술연구비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Da-Qing Jin et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of mace lignan in murine hippocampal cell line and primary culture of rat microglial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;331:1264-9.
2. Chol Seung Lim et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the methanolic extract of *Neorhodomela aculeate* in hippocampal and microglial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2006;29(6):1212-6.
3. Joseph T. Coyle and Pamela Puttfarcken. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993;262:689-95.
4. Matthew R. Hayne, Heather L. Scott, Peter R. Dodd. Glutamate mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. 2004;45:583-95.
5. Dennis W. Choi. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neuroscience Letters*. 1985;58:293-7.
6. Youna Lee et al. Proteomic analysis of glutamate-induced toxicity in HT22 cells. *Proteomics*. 2007;7:185-93.
7. 楊倉良, 毒藥本草. 北京:中國中醫藥出版社. 1993:503-7.
8. 서부일, 정국영. 알기 쉬운 본초학. 개정판 2쇄 대구:대구한의대학교 출판부. 2012:139-40.
9. Jiangsu New Medical College. The encyclopedia of traditional Chinese medicine. 2nd ed.. Shanghai:Shanghai Science and Technology Press. 1985.
10. Ji-Young Hong, Joo-Won Nam, Eun-Kyoung Seo, and Sang Kook Lee. Daphnane diterpene esters with anti-proliferative activities against human lung cancer cells from *Daphne genkwa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2010;58(2):234-7.
11. Bo-Young Rark et al. Isolation of flavonoids, a biscoumarin and an amide from the flower buds of *Daphne genkwa* and the evaluation of their anti-complement



- activity. *Phytotherapy Research*. 2006;20(7):610-3.
12. Bo-Young Park et al. (-)-Syringaresinol inhibits proliferation of human promyelocytic HL-60 leukemia cells via G1 arrest and apoptosis. *International Immunopharmacology*. 2008;8(7):967-73.
 13. Bo-Young Park et al. Daphnane diterpene esters isolated from flower buds of *Daphne genkwa* induce apoptosis in human myelocytic HL-60 cells and suppress tumor growth in Lewis lung carcinoma (LLC)-inoculated mouse model. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;22:111(3):496-503.
 14. Chae Hee Hong et al. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002;83(1-2):153-9.
 15. Hyun-Seob Lee et al. Foxa2 and Nurr1 synergistically yield A9 nigral dopamine neurons exhibiting improved differentiation, function, and cell survival. *Stem Cells Journals*. 2010;31:28(3):501-12.
 16. Baek Soo Han, et al. Daphnane diterpenes from *Daphne genkwa* activate Nurr1 and have a neuroprotective effect in an animal model of Parkinson's disease. *Journal of Natural Products*, 2016; 79(6):1604-9.
 17. Deryk T. Loo and Jill R. Rillema. Measurement of cell death. *Methods in Cell Biology*. 1998;57:251-64.
 18. Blois, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 1958;181:1199-200.
 19. Marino B. Arnao, Antonio Cano, and Manuel Acosta. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2001;73:239-44.
 20. Roberta Re et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999;26:1231-7.
 21. 농림수산식품교육문화정보원. 생명지원정보서비스. Available from: <http://www.bris.go.kr> (accessed 2021-09-01).
 22. 약한정보원. Available from: <http://www.health.kr> (accessed 2021-09-01).
 23. M R Al-Sereiti, K M Abu-Amer, and P Sen. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*. 1999;37:124-30.
 24. Kyoung-Myoung Kang and Shin-Ho Lee. Effects of extraction methods on the antioxidant activity of *Artemisia* sp. *Journal of the Korean Society of Food and Nutrition*. 2013;42:1249-54.
 25. Dejian Huang, Boxin Ou, and Ronald L. Prior. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53:1841-56.
 26. Roberta Re et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999;26:1231-7.
 27. Kyoung-Hee Kim et al. Antioxidant activity of panax ginseng flower-buds fermented with various microorganisms. *Journal of the Korean Society of Food and Nutrition*

- on. 2013;42(5):663-9.
28. Min-Ju Kim et al. Characteristics of fermented dropwort extract and vinegar using fermented dropwort extract and its protective effects on oxidative damage in rat glioma C6 cells. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2013;45(3):350-5.
 29. Wang Qi et al. Cardamonin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice by restraining oxidative stress and inflammation associated with Nrf2 signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;122:109547.
 30. J. M. McCord, I. Fridovich, The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfide, and oxygen, *Journal of Biological Chemistry*. 1963;244(22):6053.

© The Author(s) 2021, khmi.or.kr

