활성산소 소거활성에 따른 꾸지뽕잎 추출물의 신경세포 보호 효과

강용경 · 이은아 · 박해룡[†]

경남대학교 식품생명학과

Neuroprotective Effect according to Reactive Oxygen Species Scavenging Activity from Extracts of *Cudrania tricuspidata* Leaves

Young-kyoung Kang, Eun-Ah Lee and Hae-Ryong Park[†]

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Changwon 631-701, Korea

Abstract

In an attempt to identify the neuroprotective effect of *Cudrania tricuspidata* (CT) leaves against ROS (reactive oxygen species)-induced oxidative stress in neuronal cells, the extracts from CT leaves were investigated using PC12 cells and N18-RE-105 cells. The methanolic and ethanolic extracts from CT were denoted as CTM (*Cudrania tricuspidata* Leaves methanolic extracts) and CTE (*Cudrania tricuspidata* Leaves ethanolic extracts), respectively. The neuroprotective effects of the extracts were measured by DCF-DA assay, MTT reduction assay, and LDH release assay. The PC12 cells exposed to H₂O₂-induced oxidative stress and the N18-RE-105 cells exposed to glutamate-induced oxidative stress were treated with various concentrations of CTM and CTE. The results, CTM treatments resulted in the induction of a dose-dependent protective effect in PC12 cells and N18-RE-105 cells. Interestingly, CTE also showed neuroprotective effect in PC12 cells and N18-RE-105 cells. Therefore, these results suggest that CTM and CTE could be a new potential candidate as neuroprotective agents against ROS-induced oxidative stress in neuronal cells.

Key words : neuroprotective effect, *Cudrania tricuspidata*, ROS, oxidative stress

1. 서 론

현대사회는 고령화에 접어들면서 우리나라의 65세 이상 노년층의 인구가 전체 인구의 11%에 이르고 있으며, 2050년에는 38.2%로 증가될 것으로 예측하고 있다. 이는 인구 고령화에 따른 만성질환의 예방대책이 절실히 요구되며 특히, 노화 및 이와 관련된 각종 퇴행성 신경질환과 심혈관계질환 등이 전체 사망원인 중 압도적 우위를 차지함에 따라 사회적인 문제로 관심이 대두되고 있는 실정이다. 특히, 퇴행성 신경질환은 정상적인 노화과정과는 달리 비정상적인 신경세포의 죽음에 의하여 뇌나 척수의 기능이 마비되어 인지능력, 보행능

력 그리고 운동능력 등이 감소하게 되는 질환이다. 이러한 퇴행성 신경질환의 대표적인 원인 중 하나가 바로 활성산소 (oxygen free radical)(Hess ML과 Anson NH 1984, Yoon MY 등 2007)이다. 이는 mitochondria 내의 전자전달계 및 백혈구 세포의 활성화 등 정상적인 세포기능을 유지하는데 중요한 역할을 담당하는 세포 내 신호전달물질로 작용한다. 체내 대사에 필요한 산소는 호흡을 통해 유입되고, 체내로 유입된 산소의 2% 정도는 활성산소가 된다(Chai Y 등 2006). 이러한 활성산소가 체내에 적정량 존재할 때에는 생체방어 과정 중 하나로 병원체나 이물질에 대한 살균작용을 통해 병원체로부터 인체를 보호하는 작용을 하지만 과다하게 발생할 경우 생명현상을 둔화시키거나 신경세포를 사멸시킬 수 있다(Cho IY와 Sheen YY 등 2009, Sagara Y 1998b). 이와 같은 역할을 하는 활성산소는 4개의 전자에 의해서 환원되어 강력한 산화제가 되고, 그것을 ROS (reactive oxygen species), 활성산소종이라고 한다. 산소 분자가 한 개, 두 개 혹은 세 개의 전자에 의해 환원된 것을 O₂⁻ (superoxide radical), H₂O₂ (hydrogenperoxide)

[†]Corresponding author : Hae-Ryong Park, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Changwon, 631-701, Korea
Tel: +82-55-249-2689
Fax: +82-0505-999-2171
E-mail: parkhy@kyungnam.ac.kr

혹은 OH[•] (hydroxyl radical), ¹O₂ (singlet oxygen)이라고 하며 이들은 인체 내에서 화학적 또는 효소적 반응에 의해 생성되고 있다(Halliwell B와 Aruoma OI 1991, James AGC 등 2010, Kim JH 등 2009, Lee YS 2007).

이러한 활성산소가 가장 치명적으로 작용하는 부위가 바로 인간의 뇌이다. 뇌는 체중의 2% 밖에 되지 않지만 전체 산소 소비량의 20% 정도를 소모하고 있기 때문에 체내에서 가장 많은 활성산소가 발생하는 부위이다. 그러므로 뇌는 다른 장기들에 비하여 산소 이용률이 높아 활성산소가 많이 발생하게 되고, 산소에 의해 쉽게 산화되는 과산화지질의 함량 또한 높아 활성산소로부터 쉽게 파괴된다. 그리고 뇌에는 이러한 활성산소를 제거해 주는 항산화제가 상대적으로 적기 때문에 다른 장기들 보다 쉽게 산화적 스트레스 상태에 놓이게 되고 이로 인하여 신경세포가 사멸하게 되는 것이다. 또한 신경세포는 제한된 증식력과 분화력으로 세포의 수가 태어나면서부터 한정되어있기 때문에(Lenaz G 1998, Rhee SG 1999) 상대적으로 저 연령대의 사람보다 고 연령대의 사람들이 신경세포 사멸빈도가 높은 것이다. 그리고 호흡을 통해 발생하는 활성산소뿐만 아니라 다른 여러 가지 요인들에 의하여 과도하게 활성산소가 발생하게 될 때 우리는 각종 퇴행성 신경질환의 위험에 놓이게 된다(Benzi G와 Moretti A 1995, Sagara Y 등 1998a).

활성산소를 소거시키기 위해 세포 내에서는 catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase (SOD) 등의 항산화효소와 glutathione, uric acid 등과 같은 여러 비효소적 항산화물질들로 인해 활성산소에 의한 산화적 손상으로부터 세포는 보호되어지며, 특히 glutathione peroxidase는 환원형 glutathione (GSH)을 산화형 glutathione (GSSG)으로 산화시키면서 H₂O₂를 제거하며 GSSG는 glutathione reductase에 의해 다시 GSH로 환원되어 인체 내에서 균형을 이루면서 존재하게 된다. 세포 내에 독성 또는 산화적 손상이 일어난 경우에는 GSSG가 서서히 증가하게 되어 GSH/GSSG의 불균형을 초래하여 세포사멸이 일어나게 된다. 이러한 GSH은 활성산소에 의한 세포 손상을 방지하고 세포 내 해독작용을 담당하는 중요한 물질로 여겨지고 있다(Kato S 등 1993). GSH의 구성 아미노산 중 하나인 glutamate는 중추신경계에서 주요한 흥분성 신경전달물질로서 신경계에 필수적인 요소로 작용하지만 뇌속의 과다한 축적은 뇌세포의 사멸과 변성을 초래하여 알츠하이머와 같은 퇴행성 뇌 질환을 야기하는 것으로 알려져 있다(Choi WH 등 2005). 또한 glutamate의 농도 증가가 신경세포의 괴사를 초래하는 것으로 알려지면서 이와 관련된 연구가 활발히 이루어졌으며, 이상의 내용으로부터 활성산소를 조절하거나 제거할 수 있는 물질로 알려진 항산화제들과 ROS 소거활성을 가진 물질의 연구 및 개발이 활발히 진행되고 있으며 그 중요성이 커지고 있다는 사실을 확인할 수 있었다(Jeong GS 등 2009, Kwon GR 등 2009).

본 연구팀에서는 ROS 소거활성과 신경세포 보호 효과를 갖는 추출물을 탐색하기 위하여 국내·외에서 자생하고 있는 약용식물 추출물을 대상으로 실험을 실시한 결과, 꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*) 잎 추출물로부터 강력한 활성을 확인할

수 있었다. 본 연구에서 사용된 꾸지뽕잎은 뽕나무과에 속하는 꾸지뽕나무의 잎으로 flavonoids, xanthonenes, benzenoids, rutin, morphine 등의 성분을 함유하고 있으며 한방에서는 다양한 생리활성을 가진 것으로 추측하여 습진, 유행성 이하선염, 폐결핵, 타박상, 급성관절염 등을 치료하는 민간요법으로 사용되고 있다(Kang DG 등 2002). 그 외에 과산화지질 생성 억제활성, 항균활성, 항암활성, 면역조절활성, 항산화활성, 신경세포 보호 효과(Cho EJ 등 2003, Zou YS 등 2004, Lee BW 등 2005, Shi L과 Fu Y 2011, Jeong CH 등 2010) 등의 생리활성 연구가 진행되고 있다. 이 같은 선행연구 중, 신경세포 보호 효과에 대한 연구를 실시한 자료에 의하면 꾸지뽕을 이용한 부위별(뿌리, 잎, 과일, 줄기) 물 추출물 연구를 통해 산화적 스트레스로부터 신경세포를 강력하게 보호하는 부위를 확인한 결과, 잎에서 H₂O₂가 유도하는 산화적 스트레스로 인한 세포독성을 효과적으로 억제시킬 수 있음을 확인한 바 있다(Jeong CH 등 2010). 그러나 최근까지 꾸지뽕잎을 100% methanol과 ethanol 등의 유기용매로 추출한 추출물을 통해 세포 내 수준에서의 ROS 소거활성과, 산화적 스트레스로 발생하는 세포독성 및 glutamate가 유도하는 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 효과에 대한 연구는 아직 수행된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 퇴행성 신경질환을 효과적으로 예방할 수 있는 물질을 탐색하기 위한 목적으로 꾸지뽕잎을 100% methanol, ethanol의 유기용매를 사용하여 추출물을 제조하고, 그 유효성분들이 H₂O₂가 유도하는 ROS 생성을 억제하고, 각기 다른 신경세포주에서 H₂O₂ 및 glutamate가 유도하는 다양한 산화적 스트레스로부터 손상된 신경세포를 보호하는 효과를 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 실험재료

본 실험에서 사용된 꾸지뽕잎은 경남 산청군에서 자생하는 것을 추출하여 실험에 사용하였다. 신경세포주 배양을 위해 필요한 fetal bovine serum (FBS), horse serum (HS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin은 Gibco-BRL (Grand Island, NT, USA)에서 구입하였고, 꾸지뽕잎 추출물의 신경세포 보호 효과를 확인하기 위해 실험에 사용된 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), hydrogen peroxide solution (H₂O₂), 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCF-DA), dimethylsulfoxide (DMSO)는 Sigma chemical Co. (St. Louis, MO, USA), lactate dehydrogenase (LDH) release assay kit는 WaKo Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)로부터 제품을 구입하였다. 그 외의 연구에 사용된 여러 가지 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

2. 추출물 제조

꾸지뽕잎 5 g에 methanol을 200 mL, ethanol을 200 mL 가하여 3일간 상온에서 추출한 후, 여과지(5C, 110 mm, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하였다. 이 추출액을 40℃에서 회전감압 농축기(EYELA N-1000, Tokyo, Japan)를 이용하여 감압 농축하여 각 용매 추출물을 얻었다. 꾸지뽕잎 methanol, ethanol 추출물을 CTM과 CTE로 명명하였고, 각각 10 mg/mL로 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹여 적당한 농도로 희석하여 세포주에 DMSO의 최종농도가 1%가 되도록 처리하였다.

3. 세포주 배양

본 실험에 사용된 세포주는 rat pheochromocytoma PC12와 hybridoma N18-RE-105로서 각각 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 사용하였다. 세포배양을 위해 DMEM medium에 10% FBS, 5% HS를 첨가하였고, PC12 세포주에는 100 unit/mL의 penicillin, 100 mg/mL의 streptomycin을 첨가하고, N18-RE-105 세포주에는 1 × HAT supplement를 첨가하여 사용하였다. 95%의 습도가 유지되는 37℃, 5% CO₂ incubator (MCO-18AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

4. ROS 발생량 측정

CTM과 CTE의 ROS 소거활성을 측정하기 위하여 PC12 세포주를 이용하여 DCF-DA assay를 실시하였다. PC12 세포주를 96 well plate에 1 × 10⁵ cells/mL로 분주하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. CTM과 CTE를 농도 별(10, 50, 100 µg/mL)로 처리하여 30분간 배양한 뒤 1 mM H₂O₂를 처리하고 30분 동안 배양하였다. ROS의 양을 측정하기 위하여 ethanol로 희석된 10 µM DCF-DA 시약을 처리하여 30분간 배양하고 상등액 100 µL를 취해 형광 plate로 옮긴 후 fluorescence microplate reader (GENios)를 사용하여 형광강도 (excitation 485 nm, emission 535 nm)를 측정하였다. DCF 형광강도에 대한 증가율은 정상군과 비교하여 fold로 계산하였다.

5. MTT 분석을 통한 세포생존율 측정

CTM과 CTE의 신경세포 보호 효과를 측정하기 위하여 MTT reduction assay를 실시하였다. PC12 세포주는 1 × 10⁵ cells/mL로 맞추어 96 well plate에 각각 100 µL씩 첨가하여 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, CTM과 CTE를 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 제조하여 세포주에 처리하여 30분 동안 배양하고, 최종처리 농도가 0.5 mM H₂O₂가 되도록 처리하여 2시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 뒤 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT (5 mg/mL) 용액을 10 µL씩 첨가하여 1시간 동안 반응시켜 formazan 형성을 확인하고 formazan이 흩어지지 않게 상등액을 완전히 제거한 다음, 100 µL의 DMSO를 첨가하여 formazan을 녹인 후 ELISA reader

(Model 680, BioRad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. N18-RE-105 세포주의 경우 5 × 10⁴ cells/mL로 맞추어 CTM과 CTE를 PC12 세포주에 처리한 같은 농도로 실시하여 30분 동안 배양한다. 이후 최종처리 농도가 20 mM의 glutamate가 되도록 처리하고 24시간 동안 배양하여 PBS 완충액에 녹인 MTT (5 mg/mL) 용액을 10 µL씩 각 well에 처리하여 1시간 동안 다시 반응시켰다. Formazan 형성을 확인한 후, 위와 동일한 방법으로 세포생존율을 측정하였으며, 꾸지뽕잎 추출물들을 처리하지 않고 배양시킨 대조군 세포를 100%로 하였을 때의 상대적인 세포생존율을 구하였다.

6. LDH 측정에 의한 세포독성 확인

신경세포주에 대한 CTM과 CTE의 세포독성 효과를 측정하기 위하여 LDH (lactate dehydrogenase) release assay를 실시하였다. PC12 세포주는 1 × 10⁵ cells/mL로 맞추고, 100 µL씩 96 well plate에 분주하여 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 뒤, CTM과 CTE를 각각 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 세포주에 처리하였다. 이후 30분간 CO₂ incubator에서 배양시킨 후 세포주에 대해 산화적 스트레스를 유도하기 위해 최종처리 농도가 0.5 mM H₂O₂가 되도록 처리한 뒤 2시간 배양하였다. N18-RE-105 세포주의 경우 5 × 10⁴ cells/mL로 맞추고 24시간 동안 배양시킨 후, CTM과 CTE의 최종처리 농도가 10, 50, 100 µg/mL의 농도가 되도록 세포주에 처리하여 30분 동안 배양한 뒤 최종처리 농도인 20 mM의 glutamate에 노출시켜 24시간 동안 배양하였다. 세포로부터 방출된 LDH를 측정하기 위해 배양액 중 상등액을 새로운 96 well plate에 50 µL 분주하여 이 배양액에 LDH reagent를 50 µL씩 첨가하고, 상온에서 10분간 반응시켰다. 반응이 완료되면 stop solution인 1 N HCl을 100 µL씩 첨가하여 반응을 중지시키고, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생존하는 세포의 LDH 측정을 위해 배양액을 제거한 후, 0.5% triton X-100 용액을 50 µL 첨가하여 40 rpm으로 10분간 shaking 시켜 세포벽을 깨트리고 LDH reagent 50 µL를 첨가하여 반응시켰다. 반응이 완료되면 stop solution인 1 N HCl을 100 µL씩 첨가하여 반응을 중지시키고, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH에 의한 세포독성의 백분율은 배양액과 살아있는 세포에서 총 LDH에 대한 배양액으로부터 유리된 LDH의 값으로 계산하여 H₂O₂ 실험군, glutamate 실험군과 비교한 값을 나타내었다.

7. 통계처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치 ± 표준편차(SD)를 구하고 각 추출물의 세포독성 정도를 비교하기 위해 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고 Scheffe's test를 이용하여 대조군과 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

III. 결과 및 고찰

1. CTM, CTE의 ROS 소거활성

활성산소종의 하나인 H_2O_2 를 PC12 세포주에 처리 시간과 농도를 달리하였을 때 발생하는 ROS의 양을 확인한 결과(Fig. 1), H_2O_2 를 1 mM 농도에서 30분간 처리하였을 때 정상군에 비하여 약 15배 정도 높은 ROS가 발생하였으며, 이를 통해 ROS 발생 조건을 획득할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 PC12 세포주에 1 mM H_2O_2 를 처리하여 30분간 반응시켰을 때 CTM과 CTE의 ROS 소거능을 알아보았다. 정상군과 H_2O_2 처리군 그리고 H_2O_2 와 각 추출물을 농도 별로 처리한 실험군을 비교하여 활성을 측정한 결과, Fig. 2와 같이 무처리 정상군에 비해 H_2O_2 를 30분간 처리한 군은 ROS 발생량이 27.2배 증가하였지만, CTM과 CTE를 각각 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 시 CTM을 처리한 군에서는 16.5, 9.9, 6.0배로 ROS 발생량이 억제되었고 CTE를 처리한 군에서도 역시 17.3, 10.8, 6.4배로 ROS 발생량이 농도 의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다. Lee HJ 등(2011)의 연구에 의하면 꾸지뽕잎 70% methanol과 70% ethanol 추출물의 DPPH radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 기능이 비교대조군인 1% Vitamin-C보다 10% 가량 더 우수하다는 것으로 나타내었다. 이는 *in vitro* 항산화효과 실험을 토대로 꾸지뽕잎의 항산화활성을 확인한 결과이다. 그러나 본 연구에서는 DCF-DA assay를 이용하여 세포주 수준에서 꾸지뽕잎 추출물이 직접적으로 ROS 생성을 억제 할 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

Fig. 1. ROS levels on various concentrations of H_2O_2 in PC12 cells. To induce intracellular oxidation, the PC12 cells were treated with 0.1, 0.5, 1 mM of H_2O_2 for 30, 60, 90, 120min. The increase of DCF fluorescence was calculated as fold compared with the normal group. Significant vs. control cells (**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Fig. 2. Inhibitory activity of CTM and CTE on H_2O_2 -induced ROS production in PC12 cells. The cells pretreated with indicated concentrations (10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) of CTM and CTE for 30 min were exposed to 1 mM of H_2O_2 . Intracellular ROS levels were measured by fluorescent probe DCF-DA. CTM and CTE decreased H_2O_2 -induced ROS production. The values represent triplicate independent experiments. Significant vs. H_2O_2 -treated cells (**: $p < 0.001$; ***: $p < 0.001$).

2. PC12 세포주에 대한 CTM, CTE의 신경세포 보호 효과

세포 내에서 유전자 발현 변화조절과 세포활동·모양 등을 조절하는 H_2O_2 는 신호전달 물질로서 작용하며, 생체의 정상적인 범위에서 10^{-9} - 10^{-7} M로 항상 생성되고 있지만 구리(Cu^{2+})나 철(Fe^{2+})이온 존재 하에 hydroxyl radical로 전환되어 산화적 스트레스를 유발함에 따라 세포손상을 일으켜 퇴행성 신경질환, 암 등의 각종 질병을 일으키게 된다(Oda A 등 2010, Pavlica S와 Gebhardt R 2010, Zaidi A 등 2009). 본 연구에서는 H_2O_2 가 유발하는 산화적 스트레스로부터 PC12 세포주를 보호하는 꾸지뽕잎 추출물의 효과를 확인하기 위해 mitochondria의 산화환원 반응을 통한 세포생존율을 측정하는 MTT reduction assay 방법을 이용하여 정상군과 H_2O_2 처리군, 그리고 H_2O_2 와 CTM, CTE를 각각 농도 별로 처리한 실험군의 세포생존율을 비교하였다. 그 결과, Fig. 3A와 같이 정상군에서 세포생존율을 100%로 하였을 때 H_2O_2 단독 처리군은 20.7%로 정상군에 비해 약 80%가 더 사멸하였으나 CTM을 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리한 군은 각각 29.6, 69.1, 74.4%의 농도 의존적인 세포생존율을 나타내었으며 CTE를 처리한 군에서도 각각 43.4, 71.7, 73.7%의 수준으로 생존하여 꾸지뽕잎 추출물인 CTM과 CTE 모두 신경세포 보호 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 꾸지뽕잎 추출물들의 신경세포 보호작용은 부분적으로 mitochondria 보호기전에 의

Fig. 3. Protective effect of CTM and CTE on H_2O_2 -induced cytotoxicity in PC12 cells (A: MTT reduction assay, B: LDH release assay). The Cells were pretreated with various concentrations (10, 50, 100 μ g/mL) of CTM and CTE for 30 min and then treated with 0.5 mM of H_2O_2 for 2 h. (A) After MTT assay, the MTT reduction rate (mean $\pm$ SD of triplicate determination) was calculated by setting each of control survivals in the absence of H_2O_2 , CTM and CTE. (B) As the results of LDH release assay, data were normalized to the activity of LDH released from vehicle-treated cells (100%) and expressed as percentage of the control (obtained separate plating). Significant vs. H_2O_2 -treated cells (*: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ###: $p < 0.001$).

해 일어남을 추측할 수 있었다. Mitochondria는 다른 세포 내 소기관 보다 산화적 스트레스를 쉽게 받는 기관 중 하나로 산화적 스트레스를 받게 되면 ATP 생산량이 감소되어 물질대사가 원활히 되지 않아 세포의 기능을 소실하게 되어 세포사를 일으키게 되는 것이므로, CTM과 CTE를 처리하였을 때 농도 의존적인 세포 보호 효과를 보였으므로 이 같은 결론을 도출할 수 있었다. 또한 뇌신경세포는 상대적으로 많은 불포화지방산을 함유하여 산화적 스트레스에 매우 취약한 구조적 특성을 가지고 있으므로 신경세포 보호 효과와 신경세포막과의 관계를 알아보려고 동일한 조건에서 LDH (lactate dehydrogenase) release assay를 실시하였다(Fig. 3B) (Kim JH 등 2009). H_2O_2 로 유도된 신경세포막 손상으로부터 꾸지뽕잎 추출물의 신경세포 보호 효과를 알아보기 위해 세포질 성분의 LDH 방출량을 측정하였다. 그 결과, 0.5 mM H_2O_2 를 30분간 단독 처리하였을 때 84.4%로 정상군에 비해 약 61%가 더 사멸되었음을 알 수 있었고 CTM을 농도 별(10, 50, 100 μ g/mL)로 처리하였을 때 83.8, 52.3, 33.1%로 사멸하였다. CTE를 처리하였을 때 78.6, 32.6, 27.6%로 LDH 방출량이 감소하여 정상군의 수준으로 세포가 보호되었다는 것을 확인할 수 있었다. 세포배양에서 LDH의 방출수준을 알아봄으로써 세포손상 정도와 비례관계를 가진다는 것을 알 수 있었으며, 꾸지뽕잎 추출물 처리군에서 H_2O_2 가 유도하는 산화적 스트레스로 인한 세포손상으로부터 농도 의존적으로 신경세포를 보호함에 따라 효과적으로 LDH 방출량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

결과적으로 CTM과 CTE는 H_2O_2 에 의해 발생된 ROS를 소거함으로써 산화적 스트레스로부터 유도되는 mitochondria 파괴와 membrane 손상으로 인한 세포사를 강력하게 억제한다는 것을 시사하고 있다.

3. N18-RE-105 세포주에 대한 CTM, CTE의 신경세포 보호 효과

Glutamate는 척추동물의 중추신경계에서 가장 중요한 흥분성 신경전달물질 (Chen L와 Huang LY 1991, Coyle JT와 Puttfarcken P 등 1993)로 뇌 조직 중에서 기억력과 학습력에 관여한다고 알려진 소뇌편도, 해마 등에 집중적으로 분포되어 있는 세 종류의 수용체인 quisqualate, N-methyl-D-aspartate (NMDA) 및 kainite 수용체에 작용하여 다양한 생리작용의 발현에 관여한다(Monaghan DT 등 1989). 또한, 뇌의 원활한 기능 유지에 꼭 필요하나 일단 뇌가 손상을 받으면 신경세포 내에서 밖으로의 유출이 증가되고 안으로의 유입은 감소되어 결과적으로 세포 밖의 glutamate 농도를 급속히 증가하게 된다. 세포 내 glutamate 농도가 10^{-3} M이내와 세포 밖의 농도가 10^{-6} 에서 10^{-5} M일 때가 정상 수치이나 50 M까지 상승하게 되면 독성을 유발함에 따라 cystine의 유출을 증진시키거나 glutamate-cystine의 anti-porter를 억제함으로써 경쟁적으로 cystine의 흡수를 막음으로써 glutathione (GSH)는 점점 감소하게 되고 ROS는 점점 과잉으로 축적되어 신경세포의 괴사를 초래하는 산화적 스트레스를 유발하게 된다(Fonnum F 1984, Hara J 등 2009, Wieloch T 1985). 본 연구에서는 꾸지뽕잎

Fig. 4. Neuroprotective effect of CTM and CTE on the glutamate-stressed N18-RE-105 cells (A: MTT reduction assay, B: LDH release assay). Values are mean with standard error of triplicate experiments. Cells were pretreated with the indicated concentration of CTM and CTE for 30 min, and then further treated with 20 mM glutamate for 24 h. (A) The MTT reduction rate was the difference in absorbance values between the treated and control wells divided by the control absorbance. (B) The LDH release rate was presented as percentage of control values. The results from the LDH release assay were normalized to the activity of LDH released from the H_2O_2 -treated cells (100%) which had been obtained by separately plating. Data (mean $\pm$ SD of triplicate determinations) are representative of at least three independent experiments. Significant vs. glutamate-treated cells (***: $p < 0.001$; ###: $p < 0.001$).

성분 중에서 glutamate로부터 유도되는 세포독성으로부터 신경세포를 보호하는 효과를 확인하기 위하여 뇌신경계 세포주 hybridoma N18-RE-105로 PC12 세포주와 동일한 조건 하에서 무처리 정상군과 20 mM glutamate를 처리한 대조군을 비교하기 위해 MTT reduction assay를 실시하였다. 그 결과(Fig. 4A), 무처리 정상군의 세포생존율을 100%로 하였을 때 glutamate를 단독으로 처리하면 35.1%로 약 64.9%가 더 사멸하는데 반해 CTM을 10, 50, 100 μ g/mL 처리한 군은 각각 54.5, 76.2, 70.7%의 수준으로 생존하였고 CTE를 처리한 군에서는 각각 64.6, 70.2, 61.6%가 생존하여 강력한 세포 보호 효과를 나타내었다. 다음으로 CTM과 CTE의 신경세포 보호활성 기전 연구를 위하여 세포막 손상 정도에 따른 배양액 속의 LDH의 방출 양을 측정한 결과는 Fig. 4B와 같이, 20 mM glutamate 처리군에서 67.3% 정도의 LDH 방출량으로 무처리 정상군에 비해 약 35.4%가 더 사멸하는데 반해 CTM을 명시된 농도(10, 50, 100 μ g/mL)로 처리하였을 때 49.2, 31.3, 32.1%로 감소하는 세포사를 보였다. 또한, CTE를 동일한 농도로 처리하였을 때도 43.0, 31.5, 35.7%로 LDH 방출량이 감소하여 정상군의 수준으로 세포가 보호되었다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 glutamate의 독성에 의한 세포막 손상으로 방출되는 LDH양을 측정하여 방출되는 LDH가 감소된다는 것을 확인함으로써 꾸지뽕잎 추출물이 신경세포막 손상을 강력하게 억제하여 방출되는 LDH양을 효율적으로 감소시킴을 확인하였다.

이상의 결과로부터 고농도의 glutamate가 독성을 유발함에 따라 cystine의 유출 또는 glutamate-cystine의 anti-porter를 억제함으로써 cystine의 흡수를 막아 glutathione (GSH)의 감소로 과잉축적된 ROS로 인한 산화적 스트레스가 유도하는 신경세포의 괴사를 CTM과 CTE가 효과적으로 억제하여 신경세포를 보호하는 효과를 가진다는 것을 알 수 있었다.

IV. 결론

본 연구는 꾸지뽕잎 추출물이 ROS 생성을 저해하여 산화적 스트레스가 유도하는 세포독성을 억제하여 신경세포를 보호하는 효과를 갖는다는 것을 확인하기 위해 PC12 세포주와 N18-RE-105 세포주를 이용하여 DCF-DA assay, MTT reduction assay, LDH release assay를 실시하였다. H_2O_2 로 산화적 스트레스가 유도된 PC12 세포주에 대해 꾸지뽕잎 추출물을 methanol 추출물(CTM)과 ethanol 추출물(CTE)로 나누어 ROS 소거능을 확인해본 결과, CTM과 CTE 모두 효과적인 ROS 소거활성을 나타내었다. 또한, H_2O_2 에 의해 산화적 스트레스를 받은 PC12 세포주와 glutamate에 노출된 N18-RE-105 세포주에 대한 CTM과 CTE의 세포 보호 효과 실험을 실시한 결과, 두 추출물 모두 산화적 스트레스로부터 유도되는 세포독성을 억제하여 신경세포 보호 효과를 나타내었다.

이상의 결과로부터 꾸지뽕잎 추출물은 ROS의 생성을 억제하고 신경독성을 유도하는 H_2O_2 나 glutamate에 의한 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하는 효과를 확인할 수 있었

으며, 퇴행성 신경질환을 예방하거나 치료할 수 있는 의약품의 개발이 명확하게 제시되지 않은 시점에서 새로운 치료제로서의 가능성을 제시하였다.

V. 감사의 글

이 연구결과물은 2012학년도 경남대학교 학술연구장려금지원에 의한 것임

참고문헌

- Benzi G, Moretti A. 1995. Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and glutathione system. *Free Radic Biol Med* 19(1): 77-101
- Chai Y, Niu L, Sun XL, Ding JH, Hu G. 2006. Iptakalim protects PC12 cells against H₂O₂-induced oxidative injury via opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 350(2): 307-314
- Chen L, Huang LY. 1991. Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid. *Neuron* 7(2): 319-326.
- Cho EJ, Yokozawa T, Rhyu DY, Kim HY, Shibahara N, Park JC. 2003. The inhibitory effects of 12 medicinal plants and their component compounds on lipid peroxidation. *Am J Chin Med* 31(6): 907-917
- Cho IY, Sheen YY. 2009. Effect of dioxin on the change of mitochondrial inner membrane potential and the induction of ROS. *J Environ Toxicol* 24(1): 33-41
- Choi WH, Oh YS, Ahn JY, Kim SR, Ha TY. 2005. Antioxidative and protective effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* extracts on glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Korean J Food Sci Technol* 37(3): 479-483
- Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262(5134): 689-695
- Fonnum F. 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42(1): 1-11
- Halliwell B, Aruoma OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281(1-2): 9-19
- Hara J, Gerashchenko D, Wisor JP, Sakurai T, Xie X, Kilduff TS. 2009. Thyrotropin-releasing hormone increases behavioral arousal through modulation of hypocretin/orexin neurons. *J Neurosci* 29(12): 3705-3714
- Hess ML, Manson NH. 1984. Molecular oxygen : friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 16(11): 969-985
- James AG, C, Matthew P, Dominique RA, Joseph KE, Isabella TT, Aseem K, Gregory MR, Tai TC. 2010. Protective effects of methyl gallate on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 393(4): 773-778
- Jeong CH, Choi GN, Kim JH, Kwak JH, Jeong HR, Kim DO, Heo HJ. 2010. Protective effects of aqueous extract from *Cudrania tricuspidata* on oxidative stress-induced neurotoxicity. *Food Sci Biotechnol* 19(4): 1113-1117
- Jeong GS, Lee DS, Kwon TO, Lee HS, An RB, Kim YC. 2009. Cytoprotective constituents of the heartwood of *Caesalpinia sappan* on glutamate-induced oxidative damage in HT22 cells. *Biol Pharm Bull* 32(5): 945-949
- Kang DG, Hur TY, Lee GM, Oh H, Kwon TO, Sohn EJ, Lee HS. 2002. Effects of *Cudrania tricuspidata* water extract on blood pressure and renal functions in NO-dependent hypertension. *Life Sci* 70(22): 2599-2609
- Kato S, Ishita S, Sugawara K, Mawatari K. 1993. Cystine/ glutamate antiporter expression in retinal Muller glial cells: implications for DL-alpha-aminoacidipate toxicity. *Neuroscience* 57(2): 473-482
- Kim JH, Jeong CH, Choi GN, Kwak JH, Choi SG, Heo HJ. 2009. Antioxidant and neuronal cell protective effects of methanol extract from *Schizandra chinensis* using an in vitro system. *Korean J Food Sci Technol* 41(6): 712-716
- Kwon GR, Moon IS, Lee WC. 2009. Neuroprotective effects of *Pinelliae Rhizoma* water-extract by suppression of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential loss in a hypoxic model of cultured rat cortical cells. *Life Sci* 19(5): 598-606
- Lee BW, Lee JH, Lee ST, Lee HS, Lee WS, Jeong TS, Park KH. 2005. Antioxidant and cytotoxic activities of xanthenes from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg Med Chem Lett* 15(24): 5548-5552
- Lee HJ, Do JR, Kwon JH, Kim HK. 2011. Physiological activities of extracts from different parts of *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc Food Sci Nutr* 40(7): 942-948
- Lee YS. 2007. Antioxidative and physiological activity of extracts of *Angelica dahurica* leaves. *Korean J Food Preserv* 14(1): 78-86

- Lenaz G. 1998. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2): 53-67
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. 1989. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol* 29: 365-402
- Oda A, Tamaoka A, Araki W. 2010. Oxidative stress up-regulates presenilin 1 in lipid rafts in neuronal cells. *J Neurosci Res* 88(5): 1137-1145
- Pavlica S, Gebhardt R. 2010. Protective effects of flavonoids and two metabolites against oxidative stress in neuronal PC12 cells. *Life Sci* 86(3-4): 79-86
- Rhee SG. 1999. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 31(2): 53-59
- Sagara Y, Dargusch R, Chambers D, Davis J, Schubert D, Maher P. 1998a. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 24(9): 1375-1389
- Sagara Y. 1998b. Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol. *J Neurochem* 71(3): 1002-1012
- Shi L, Fu Y. 2011. Isolation, purification, and immunomodulatory activity in vitro of three polysaccharides from roots of *Cudrania tricuspidata*. *Acta Biochim Biophys Sin* 43(5): 418-424
- Wieloch T. 1985. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 230(4726): 681-683
- Yoon MY, Kim JY, Hwang JH, Cha MR, Lee MR, Jo KJ, Park HR. 2007. Protective effect of methanolic extracts from *Dendrobium nobile* Lindl. on H₂O₂-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J. Korean Soc Appl Biol Chem* 50(1): 63-67
- Zaidi A, Fernandes D, Bean JL, Michaelis ML. 2009. Effects of paraquat-induced oxidative stress on the neuronal plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Free Radic Biol Med* 47(10):1507-1514
- Zou YS, Hou AJ, Zhu GF, Chen YF, Sun HD, Zhao QS. 2004. Cytotoxic isoprenylated xanthenes from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorganic Med Chem* 12(8): 1947-1953