

글루타메이트로 유발한 HT22세포 독성에 대한 백두산 식물 추출물의 보호 효과

리빈[#] · 정길생^{1#} · 안인파² · 이동성 · 변에리사 · 윤권하¹ · 김윤철^{*}
원광대학교 약학대학, ¹원광대학교 의산방사선연구센터, ²연변대학교 약학대학

Neuroprotective Effects of Plant Extracts from Baekdu Mountain on Glutamate-induced Cytotoxicity in HT22 cells

Bin Li[#], Gil-Saeng Jeong^{1#}, Ren-Bo An², Dong-Sung Lee, Erisa Byun, Kwon-Ha Yoon¹ and Youn-Chul Kim^{*}

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

¹Institute for Radiological Imaging Science, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

²College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China

Abstract – Oxidative stress is considered to play an important role in a variety of neurodegenerative disorders of central nervous system. The immortalized mouse hippocampal cell line, HT22, phenotypically resembles neuronal precursor cells but lacks functional ionotropic glutamate receptors, thus excluding excitotoxicity as a cause for glutamate triggered cell death. Therefore, HT22 cells are a useful model for studying oxidative glutamate toxicity. In this study, we examined whether the methanol extracts of some native plants at Mt. Baekdu could protect HT22-immortalized hippocampal cells against glutamate-induced oxidative stress. Seventy-eight plants sources were collected at Mt. Baekdu, and extracted with methanol. These extracts had been screened the protective effects against glutamate-induced oxidative damage in HT22 cells at the 100 and 300 µg/ml. Of these, thirteen methanolic extracts, *Acer mono* (leaf), *Artemisia stolonifera* (aerial part), *Carduus crispus* (aerial part), *Carex mongolica* (whole plant), *Clematis hexapetala* (whole plant), *Galeopsis bifida* (aerial part), *Galium verum* (whole plant), *Ganoderma lucidum* (whole plant), *Ixeris chinensis* (whole plant), *Malva verticillata* (aerial part), *Polygonum senticosum* (whole plant), *Rebes mandshricum* (branch), and *Taraxacum mongolicum* (aerial part), showed significant protective effects against glutamate-induced oxidative damage in HT22 cells.

Keywords – Glutamate, HT22, Methanolic extracts, Mt. Baekdu, Cytoprotection

산화적 스트레스 (oxidative stress)는 체내 활성산소종 (ROS)이 많이 생성되거나 항산화 시스템의 기능이 저하되면서 체내의 산화계와 항산화계의 불균형으로 일어나는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 생활수준이 향상되고 인간의 수명이 증가함에 따라 노화 및 노화에 관련된 각종 질병에 대한 관심이 높아지고 있으며, 산화적 스트레스가 알츠하이머 증후군, 파킨슨 증후군, 헌팅턴 증후군과 같은 중추신경계의 퇴행성 뇌질환의 중요한 요인으로 밝혀졌다.^{2, 3)}

글루타메이트 (glutamate)는 잘 알려진 신경전달물질의 하나로서 과다 분비될 경우 신경흥분독성과 산화적 스트레스로 인해 뇌 세포 손상을 초래하게 된다.⁴⁾ 생쥐의 해마유래

세포주인 HT22 세포주는 글루타메이트 수용체가 없는 세포주로서 글루타메이트와 함께 처리할 때 신경흥분독성이 아닌 산화적 스트레스로 인하여 세포가 손상을 받으며, 산화적 스트레스로 인한 퇴행성 뇌질환 연구에 있어서 유용한 실험 모델 중의 하나로 알려져 있다.⁵⁾ 본 연구에서는 글루타메이트로 독성을 유발한 생쥐의 해마유래 세포주인 HT22 세포주를 대상으로 백두산 자생식물 추출물이 세포생존율에 대한 증가 여부를 관찰하여 뇌 세포 보호 활성을 평가하였다.

백두산은 북한의 양강도 삼지연군(三池淵郡)과 중국 동베이지방(동북지방; 만주)의 지린성(길림성)이 접하여 있으며 해발 고도는 2,744 m이고, 총면적은 8,000 km²이며, 또한 백두산 식물의 분포는 2,000 m에 달하는 고도 차이로 인하여, 다양한 식물들이 분포하고 있다.⁶⁾ 따라서, 본 연구는 위와

*교신저자 (E-mail): yckim@wku.ac.kr
(FAX): 063-852-8837

Table I. Protection of MeOH extracts from plants of Baekdu mountain on glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells.

Plant samples	Parts	Protection %	
		100 µg/ml	300 µg/ml
<i>Acanthopanax senticosus</i> Harms.	bark	0.2	53.7
<i>Acanthopanax sessiliflorus</i> (Rupr. & Maxim.) S. Y. Hu	branch	2.2	44.3
<i>Acer mono</i> Maxim.	leaf	51	69.6
<i>Acer triflorum</i> Kom.	leaf, branch	54.7	46.7
<i>Allium macrostemon</i> Bunge	root	-	-
<i>Allium tuberosum</i> Rottler	seed	-	-
<i>Alopecurus aequalis</i> Sobol.	whole plant	29.5	42.9
<i>Angelica dahurica</i> Benth. et Hook.	root	-	79.7
<i>Aquilegia oxysepala</i> Trautv. et Mey.	aerial part	34.7	42.6
<i>Arabis pendula</i> L.	aerial part	31.4	48.6
<i>Arisaema amurense</i> var. <i>Violaceum</i> Engl.	root	8.5	5
<i>Artemisia siversiana</i> (Ehrh.) Willd.	aerial part	7.2	66.9
<i>Artemisia stolonifera</i> (Maxim.) Kom.	aerial part	71.7	65.1
<i>Asparagus schoberioides</i> Kunth.	aerial part	-	60.8
<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	root	-	74.7
<i>Axyris amaranthoides</i> L.	aerial part	55.4	2.5
<i>Bupleurum chinense</i> DC.	root	16.1	-
<i>Caltha palustris</i> L. var. <i>sibirica</i> Regel	aerial part	-	20.2
<i>Carduus crispus</i> L.	aerial part	72.9	80.1
<i>Carex mongolica</i> A.I. Baranov & Skvortz.	whole plant	67.2	59
<i>Caulophyllum robustum</i> Maxim.	aerial part	-	16.8
<i>Cirsium pendulum</i> Fisch.	aerial part	50.5	30.9
<i>Cirsium setosum</i> (Willd.) M. Bieb.	aerial part	18	58.8
<i>Clematis hexapetala</i> Pall.	whole plant	66.6	55.8
<i>Codonopsis pilosula</i> (Franch.) Nannf.	root	-	-
<i>Cynanchum ascyrifolium</i> Matsum.	aerial part	27.7	60.8
<i>Delphinium maackianum</i> Regel	aerial part	-	-
<i>Dianthus chinensis</i> L.	whole plant	11.8	71.3
<i>Doellingeria scaber</i> (Thunb.) Nees.	aerial part	48.1	41.1
<i>Epimedium koreanum</i> Nakai	aerial part	43.4	-
<i>Erigeron canadensis</i> L.	aerial part	-	36.5
<i>Euonymus alatus</i> (Thunb.) Sieb.	branch	-	73.7
<i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) Gaertn.	whole plant	15	64.5
<i>Galeopsis bifida</i> Boenn.	aerial part	51.5	84.6
<i>Galium verum</i> L.	whole plant	72.7	81.7
<i>Ganoderma lucidum</i> Karsten.	whole plant	57.3	70.3
<i>Ginkgo biloba</i> L.	leaf	15.7	69.4
<i>Heracleum mantegazzianum</i> Hance	root	-	-
<i>Impatiens noli-tangere</i> L.	whole plant	68.8	48.7
<i>Ixeris chinensis</i> (Thunb.) Nakai	whole plant	71.7	83.4
<i>Jeffersonia dubia</i> (Maxim.) Benth. et Hook.	whole plant	1.6	53.4
<i>Leonurus macranthus</i> Maxim.	aerial part	56.2	-

Table I. Continued

Plant samples	Parts	Protection %	
		100 µg/ml	300 µg/ml
<i>Lespedeza juncea</i> (L.f.) Pers.	aerial part	39.3	57.8
<i>Ligusticum acutilobum</i> Siebold & Zucc.	root	-	16.2
<i>Lycium chinense</i> Miller	fruit	-	-
<i>Malva verticillata</i> L.	aerial part	57	66.1
<i>Menispermum dauricum</i> DC.	aerial part	37.5	55.4
<i>Morus alba</i> L.	root bark	23.8	79.7
<i>Oryza sativa</i> L.	fruit	-	-
<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	root	-	-
<i>Pedicularis resupinata</i> L.	aerial part	13.1	15.9
<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i> for. <i>viridi</i>	leaf	18.1	-
<i>Platycodon grandiflorum</i> A. DC	root	-	-
<i>Polygonatum odoratum</i> (Miller) Druce	root	-	-
<i>Polygonum senticosum</i> (Meisn.) Franch.	whole plant	67.2	58.2
<i>Polygonum sieboldii</i> De Vriese.	aerial part	46.3	31.2
<i>Potamogeton distinctus</i> Bennet.	whole plant	31.3	23
<i>Pulsatilla dahurica</i> (Fisch. ex DC.) Spreng.	aerial part	39.3	14.8
<i>Ranunculus repens</i> L.	aerial part	-	-
<i>Ranunculus japonicus</i> Thunb.	whole plant	-	-
<i>Ribes mandshuricum</i> (Maxim.) Kom.	branch	78.4	79.6
<i>Rubia cordifolia</i> L.	aerial part	26.1	35.1
<i>Salsola collina</i> Pall.	whole plant	12.2	52.4
<i>Sanguisorba parviflora</i> (Maxim.) Takeda	aerial part	-	42.7
<i>Saussurea pulchella</i> Fisch. ex DC.	aerial part	-	-
<i>Securinega suffruticosa</i> (Pall.) Rehd.	branch	6.1	78.1
<i>Sedum aizoon</i> L.	aerial part	-	23.2
<i>Sophora flavescens</i> Ait.	root	76.4	32
<i>Synurus deltoids</i> Nakai	aerial part	-	18.2
<i>Syringa reticulata</i> (Blumb) Hara	bark	22.4	7.4
<i>Taraxacum mongolicum</i> Hand-Mazz.	aerial part	68.1	76.8
<i>Tilia amurensis</i> Rupr.	branch	26.6	62.4
<i>Tribulus terrestris</i> L.	whole plant	-	53.2
<i>Trifolium lupinaster</i> L.	aerial part	53.5	-
<i>Typha orientalis</i> Presl.	pistil	56.1	71
<i>Veronica anagallis-aquatica</i> L.	whole plant	27.1	50.7
<i>Vicia uni juga</i> A. Br.	aerial part	55.1	43
<i>Zea mays</i> L.	pistil	32.1	74.1

같은 다양한 백두산 식물 자원의 MeOH 추출물로부터 글루타메이트를 산화적 스트레스 유발 물질로 사용하여, 이에 대한 뇌 세포 보호 활성을 탐색하였으며, 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 백두산 식물의 MeOH 추출물은 2007년 5월에 중국 연변대학교 약학대학에 제공 받

았으며, 각각의 식물 MeOH 추출물은 DMSO에 녹여 50 mg/ml의 농도로 stock solution을 제조하였으며 이를 DMEM 배지로 희석하여 사용하였다.

시약 및 기기 - DMEM 배지와 trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Gibco Laboratories사에서 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone Laboratories사에서 구입하였다. L-glutamate, Trolox와 3'-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma사에서 구입하였다. 96-Well tissue culture plates와 기타 tissue culture dishes는 Nunc사 제품을 이용하였다. 흡광도는 BioRad사의 Microplate Reader를 이용하여 측정하였다.

HT22 세포배양 및 뇌 세포 보호활성 측정 - 생쥐 해마 유래 HT22 세포주는 목인희 교수 (서울대학교)로부터 분양하여 사용하였으며, 글루타메이트로 독성을 유발한 세포주에 대한 보호활성 측정은 정 등의 방법⁷⁾에 따라 실시하였다. 간략하게 설명하면, HT22 세포 (2×10^5 cells/well)를 10% heat-inactivated FBS, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 µg/ml)을 함유한 DMEM 배지에 분주하고 5% CO₂ 배양기 내에서 37°C에서 24시간 배양한 다음, 백두산 식물 MeOH추출물의 시료 용액 (100, 300 µg/ml)과 5 mM 글루타메이트를 처리한 후 12시간 동안 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였으며, 세포생존율은 MTT법을 활용하여 측정하였고, 양성대조약물로는 Trolox (100 µM)를 사용하였다. 또한, 모든 실험치는 대조군에 대한 세포보호율을 평균치로 표시하였으며, 각각 3회 반복 실험치를 이용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

백두산 식물 MeOH 추출물로부터 뇌 세포 보호활성물질을 발견할 목적으로 산화적 손상을 유발하는 글루타메이트를 생쥐 해마 세포 유래의 HT22 세포주에 처리한 후 세포 생존율을 증가시키는 추출물을 검색하였다. 총 78종의 백두산 식물 MeOH 추출물을 각각 100, 300 µg/ml의 농도에서 뇌 세포 보호효과를 검색한 결과를 Table I에 나타내었다.

300 µg/ml의 농도에서 *Galeopsis bifida*의 지상부 MeOH 추출물이 84.6%의 세포 보호율을 나타내어 가장 좋은 효과를 보였으며, 이를 포함한 32종의 추출물이 50% 이상의 세포 보호율을 나타내었다. 100 µg/ml의 농도에서는 *Ribes mandshuricum*의 가지 부분의 MeOH 추출물이 78.4%의 세포 보호율을 나타내어 가장 좋은 효과를 보였으며, 이를 포함한 22종의 추출물이 50% 이상의 세포 보호율을 나타내었다. 또한, 100, 300 µg/ml의 농도 모두에서 50% 이상의 세포 보호율을 나타낸 추출물은 13종이었으며, 이 중 농도 의존적으로 세포보호율이 증가된 추출물은 *Acer mono* (leaf), *Carduus crispus* (aerial part), *Galeopsis bifida* (aerial part), *Galium verum* (whole plant), *Ganoderma lucidum* (whole

plant), *Ixeris chinensis* (whole plant), *Malva verticillata* (aerial part), *Rebes mandshuricum* (branch), *Taraxacum mongolicum* (aerial part)의 9종이었다. 한편, 대표적인 항산화 물질로 알려진 Trolox를 양성 대조약물로 사용하였으며, 이 물질은 100 µM에서 76.4%의 보호율을 나타내었다.

퇴행성 뇌 질환에 관한 연구는 지난 10여 년간 진행되어 왔으며, 그 주요한 기전은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았지만 체내의 산화와 항산화의 부조화로 인하여 생기는 산화적 스트레스가 퇴행성 뇌 질환에서 뇌 세포 손상을 일으키는 주요한 인자 중의 하나로 알려져 있다. 글루타메이트는 체내에서 cystine/glutamate transport system X_c⁻을 통하여 cystine 섭취를 억제함으로써 glutathione level을 저하시키고 최종적으로 세포는 산화적 스트레스로 인한 손상을 받게 되며, 글루타메이트에 의한 산화적 스트레스가 뇌 세포 손상을 일으키는 기전은 퇴행성 뇌 질환의 주요한 요인이기도 하다.^{8,9)} 그러므로, 본 연구의 뇌 세포 보호 활성 검색을 통하여 그 효과가 인정된 9종의 백두산 식물 MeOH 추출물에 대해서는 활성 물질 분리, 정제 연구와 각각의 뇌 보호 기전에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론

백두산 식물 MeOH 추출물로부터 뇌 세포 보호활성 추출물의 탐색을 목적으로, 백두산 유래 78종의 식물 MeOH 추출물을 글루타메이트로 유발한 HT22 세포주에 대한 보호 활성을 검색하였으며, 그 중 유의한 보호활성을 나타내는 것으로는 *Acer mono* (leaf), *Carduus crispus* (aerial part), *Galeopsis bifida* (aerial part), *Galium verum* (whole plant), *Ganoderma lucidum* (whole plant), *Ixeris chinensis* (whole plant), *Malva verticillata* (aerial part), *Rebes mandshuricum* (branch), *Taraxacum mongolicum* (aerial part)의 9종이었다.

사사

This study was supported by grants of the Oriental Medicine R&D Project (03-PJ9-PG6-SO02-0001), Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea.

이용문헌

1. Coyle, J.T., Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*. **262**: 689-695.
2. Jin, D. Q., Lim, C. S., Hwang, J. K., Ha, I. H. and Han, J. S. (2005) Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of mace lignan in murine hippocampal cell line and primary culture of rat microglial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**:

- 1264-1269.
3. Lim, C. S., Jin, D. Q., Sung, J. Y., Lee, J. H., Choi, H. G., Ha, I. H. and Han, J. S. (2006) Antioxidant and anti-inflammatory activities of the methanolic extract of *Neorhodomela aculeate* in hippocampal and microglial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 1212-1216.
 4. Satoh, M., Nakatsuka, D., Watanabe, Y. and Nagata, I. (2000) Neuroprotection by MAPK/ERK kinase inhibition with U0126 against oxidative stress in a mouse neuronal cell line and rat primary cultured cortical neurons. *Neurosci.* **288**: 163-166.
 5. Lee, Y. R., Park, H. W., Park, S. G., Cho, S. Y., Myung, P. K., Park, B. C. and Lee, D. H. (2007) Proteomic analysis of glutamate-induced toxicity in HT22 cells. *Proteomics*, **7**: 185-193.
 6. 주팅청, 옌중카이, 주서우요우 (2005) 백두산 식물도감, 10-12. 도서출판 일진사, 서울.
 7. Jeong, G. S., Li, B., Lee, D. S., Byun, E., Kang, D. K., Lee, H. S. and Kim, Y. C. (2007) Cytoprotective constituents of *Alipinia katsumadai* seeds against glutamate-induced oxidative injury in HT22 cells. *Nat. Prod. Sci.* **13**: 268-272.
 8. Tan, S., Schubert, D. and Maher, P. (2001) Oxytosis: a novel form of programmed cell death, *Curr. Top. Med. Chem.* **1**: 497-506.
 9. Rössler, O. G., Bauer, I., Chung, H. Y. and Thiel, G. (2004) Glutamate-induced cell death of immortalized murine hippocampal neurons: neuroprotective activity of heme oxygenase-1, heat shock protein 70, and sodium selenite. *Neurosci. Lett.* **362**: 253-257.

(2008년 7월 10일 접수)