

A Screen for Dual-protection Molecules from a Natural Product Library against Neuronal Cell Death and Microglial Cell Activation

Ju-Sik Min^{1,2} and Dong-Seok Lee^{1*}

¹School of Life Sciences, BK21 Plus KNU Creative BioResearch Group, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Future Biotechnology Research Division, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea

Received March 20, 2015 / Revised April 4, 2015 / Accepted April 4, 2015

Natural products and natural product structures play a general and highly significant role in drug discovery and development process because it has various merits and potentials for new drug source that have extensive clinical experience, development time contraction, excellent stability and safety. In several neurological disorders, neuronal death and excessive activation of microglia (neuro-inflammation) are observed. A number of drug discovery-related neuronal cell death and neuro-inflammation was studied from natural products, respectively. However, until now, it has not been possible to study dual-protection molecules recorded in the Natural Product library. In the present study, using the natural product-derived library of the Institute for Korea Traditional Medical Industry, we investigated dual-protective molecules against glutamate (a classical excitatory neurotransmitter)-induced oxidative stress mediated neuronal cell death and LPS-induced excessive activated microglial cells (immune cells of the brain). Chrysophanol, extracted from *Rheum palmatum*, had dual-protective effects against both glutamate-induced neuronal cell death and LPS-induced NO production, triggering proinflammatory cytokines and microglia activation and resulting in neuroinflammation. Flow-cytometry analysis revealed that chrysophanol had a scavenger effect, scavenging glutamate- and LPS-induced reactive oxygen species (ROS) produced by neuronal and microglial cells, respectively. Based on the present study, chrysophanol may have an important protective role against neuronal cell death and neuroinflammation in the brain. The results may be helpful for studying drug development candidates for treating central nervous system disorders.

Key words : Microglial cell, natural product, neuroinflammation, neuronal cell, reactive oxygen species

서 론

천연물을 기반으로 한 신약 개발은 일반적으로 오랜 기간 동안의 원료 약물로써 사용해 온 경험에 의한 다양한 임상적 결과의 축적과 이로 인한 안정성(stability)과 안전성(safety)의 확보 및 신약 개발 시간의 단축과 같은 이점을 가지며, 합성물질에 의한 약물의 개발이 활발해지고 있음에도 불구하고 여전히 천연물 유래의 분자들은 신약의 개발에서 성공률이 높은 의약학적 주요원천이라 할 수 있다[20]. 특히, 천연물 유래 물질 구조 분석을 통한 신경질환 발병기전의 억제 물질 개발은 다양한 부작용의 최소화 측면에서 장점이 있을 것으로 예상되며 신경질환의 치료 및 예방 연구에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

다양한 신경질환의 대표적인 현상 중 하나인 신경세포 사멸

은 다양한 원인에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으며, 그 중에서도 포유류의 중추신경계(central nervous system)의 대표적인 신경전달 물질 중 하나로 알려진 글루타민산염(glutamate)의 과다 분비에 의한 흥분독성(excitotoxicity)은 신경세포 사멸의 주요원인 중의 하나이다[2, 5, 11, 15]. 이러한 신경세포 사멸의 기전으로 과도한 glutamate에 의한 산화적 스트레스(Oxidative stress)가 세포내의 과도한 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 증가가 그 원인으로 알려져 있다[6, 14, 18]. 또한, 뇌조직에 존재하는 유일한 면역 세포로의 역할을 수행하는 미세아교세포(microglia cells)는 신경세포를 포함한 주변 세포의 손상이나 죽음에 의한 유해 상태에 노출 혹은 독성 단백질의 축적이거나 병원체의 침투와 같은 유해한 자극(stress)이 발생하면 미세아교세포의 활성이 증가하여 뇌염증(Neuroinflammation)을 유도하게 된다[13]. 이러한 미세아교세포의 과도한 활성화는 중추신경 질환에서 관찰되는 표지인자로 과잉의 ROS와 NO가 생산되고 이로 인한 pro-inflammatory cytokine을 분비를 유도한다[3, 10, 16, 19].

그래서 과도한 glutamate에 의한 신경세포 사멸과 미세아교세포의 과도한 활성화에 의한 뇌염증 억제를 위한 뇌 세포내의 ROS 생성 억제물질의 개발은 신경질환의 치료 및 예방에 가장 핵심적인 연구라고 할 수 있으나, 현재까지 신경세포

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-7366, Fax : +82-53-943-6925

E-mail : lee1@knu.ac.kr

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.

사멸과 뇌염증 두 가지를 동시에 억제하는 물질 개발 시도는 거의 없었다[12].

본 연구에서는 먼저, 천연물 라이브러리로부터 신경세포에서 glutamate의 흥분독성에 의한 세포사멸과 동시에 미세아교세포 활성화로 인한 NO 분비를 억제하는 물질을 탐색하고 도출된 물질이 ROS 생성의 억제능력을 확인함으로써 신경질환의 치료 및 예방 신약개발 후보 물질 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 천연물 라이브러리는 한국한방산업진흥원(KOTMIN)에서 제공받았으며, 총 240개의 물질을 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 용매로 하여 500 µg/ml의 농도로 제공되었으며, 각 세포에 적용된 최종 농도는 2.5 µg/ml로 처리되었다.

세포주와 세포배양조건

실험에 사용한 HT22 세포는 생쥐 해마 조직, BV2 세포는 생쥐의 미세아교세포에서 각각 유래하였으며, 두 세포주의 배지는 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% antibiotics (100 mg/l streptomycin, 100 U/ml penicillin)을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, WelGENE, Korea) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포의 생존율 측정(MTT assay)

세포의 생존율을 측정하기 위해 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 사용하였다. 96well plate에 HT22 또는 BV2세포를 well 당 1.0×10⁴개를 분주하고 24시간 뒤 라이브러리 상의 천연물의 농도가 2.5 µg/ml가 되도록 처리하였다. 1시간 뒤 각각의 HT22 또는 BV2세포에 10mM의 glutamate 또는 LPS (1 µg/ml)를 각각 처리 후 24시간 배양한 다음 배지를 제거하고 MTT 시약을 0.5 mg/ml의 농도로 1시간 동안 처리하였다. 그 후 상등액을 제거하고 DMSO를 200 µl씩 분주하여 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 후 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 비 처리 대조군의 측정값을 세포 생존율 100%로 설정한 후 각 처리군과 비교를 통해 세포의 생존율을 확인하였다.

미세아교세포에서 분비되는 Nitric oxide (NO)의 측정

천연물 처리 여부에 따른 세포에서 분비되는 Nitric oxide (NO)의 생산량의 차이를 측정하기 위해서 96well plate에 BV2 세포를 well 당 1.0×10⁴개를 분주하고 24시간 뒤 라이브러리 상의 천연물을 2.5 µg/ml가 되도록 처리하였다. 1시간 뒤 Lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/ml)를 처리한 뒤 24시간 배양 후 각각을 상등액 100 µl를 원심분리(700g, 5min)하여 부유한

세포를 제거한 이후 새로운 96well plate에 옮겨 분주하였다. 각 well의 배지에 NO detection kit (iNtRon, Seoul, Korea)의 N1 buffer를 각 well에 50 µl씩 첨가 후 실온에서 10분 동안 반응 후 50 µl의 N2 buffer를 첨가하고 다시 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 값은 동일한 실험에서 수행한 NO의 표준 정량곡선과 비교하여 배지에 포함된 NO의 양을 확인하였다.

ROS 측정을 위한 flow-cytometry 분석

세포내의 ROS를 측정하기 위해 6well plat에 세포를 well 당 1.0×10⁵개를 분주하고 24시간 뒤 천연물농도 2.5 µg/ml가 되도록 처리하였다. 1시간 뒤 HT22 세포주에는 glutamate (10mM)를 BV2 세포주에는 LPS (1 µg/ml)를 각각 처리한 후 12시간 동안 배양한 다음 각 세포를 PBS로 2회 수세하고 0.05% Trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 수집한 다음 PBS로 1회 수세 후 10µM의 Dichlorofluorescin diacetate (DCFDA) 200 µl를 이용하여 37°C, CO₂ incubator에서 30분간 반응시켰다. 그 후 세포를 다시 수집한 다음 PBS로 2회 수세 후 flow-cytometry (FACSCalibur; BD Biosciences, NJ)를 이용하여 세포내 ROS 양을 측정하였다.

결과 및 고찰

Glutamate 처리에 의한 신경세포 사멸 억제 물질 검출

천연물 라이브러리 물질 중 Glutamate 처리에 따른 신경세포의 사멸을 억제하는 물질을 검출하기 위해, 생쥐 해마유래 세포주인 HT22 세포에 2.5µg/ml의 농도의 천연물을 각각 처리한 후 glutamate를 처리하여 그 변화를 MTT assay를 통하여 확인하였다. 그 결과 glutamate 단독 처리군의 세포 생존율은 44.30±11.36%로 나타났으며(Fig. 1) glutamate 처리에도 불구하고 85% 이상의 생존율을 나타낸 천연물은 고삼에서 추출한 (-)-Maackiain (90.9±4.7%), 천근초에서 추출한 1,3,6-trihydroxy-2-methyl-9,10-anthraquinon (87.5±5.7%), 적하수오에서 추출한 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside (89.9±9.5%), 승마에서 추출한 27-deoxyactein (94.3±3.8%), 고금에서 추출한 Baicalein (96.5±7.9%), 선복화에서 추출한 Britanin (89.0±7.0%), 대황에서 추출한 Chrysophanol (95.7±4.0%), 오미자에서 추출한 Gomisin J (89.9±7.4%), 강진향에서 추출한 Latifolin (99.9±11.8%), 후박에서 추출한 Magnolol (94.9±1.1%), 수련에서 추출한 Nuciferine (99.8±12.3%), 현호색으로부터 추출한 Tetrahydrocoptisine (94.0±10.2%)으로 나타났으며 이는 Fig. 1과 Table. 1에 정리하였다.

LPS 처리에 의한 미세아교세포의 Nitric oxide (NO) 생산을 억제하는 물질 검출

생쥐 미세아교세포유래 세포주인 BV2 세포에 LPS 처리에

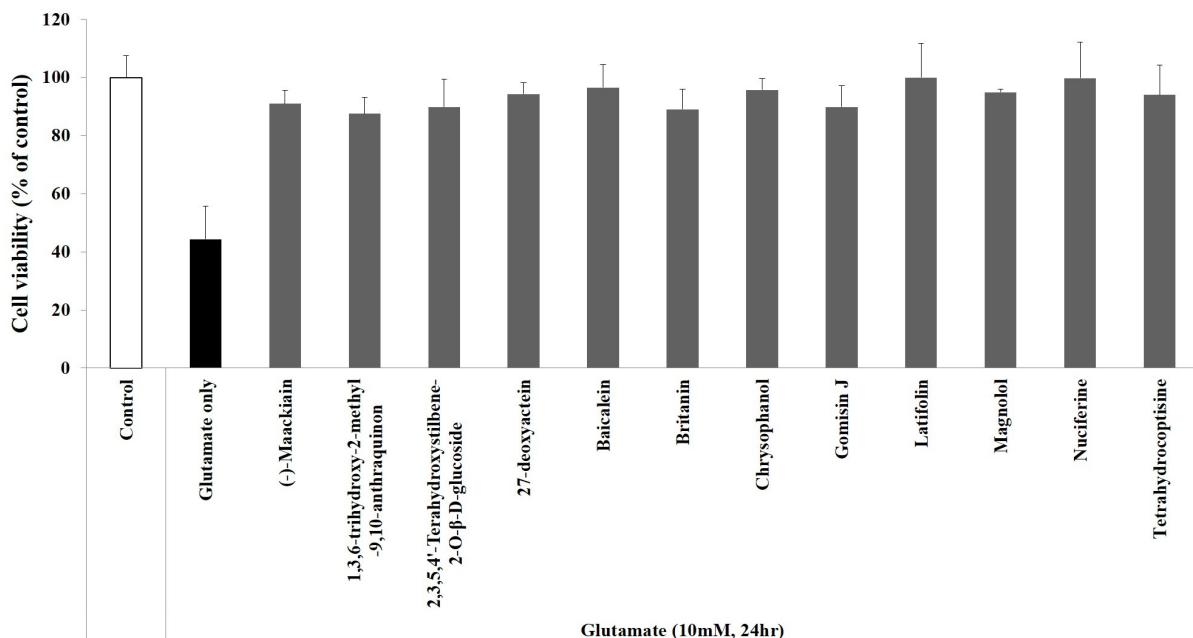


Fig 1. Molecules have a protective effect against glutamate-induced neuronal cell death. HT22 cells (1.0×10^4) were seeded in 96-well plates. Following 24 hr of incubation, they were treated with 10 mM glutamate for 24 hr (Glutamate only), and without treated (Control), and pre-treated with natural products isolated molecules at 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration. Cell viability was assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. The percentage of surviving cells was measured relative to the control values.

따른 Toll Like Receptor (TLR)-4 신호 전달 경로에 의해 활성화되어 증가되는 NO의 분비를 억제하는 물질을 천연물 라이브러리 중에 물질을 검출하기 위해 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 천연물을 각각 처리한 후 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리한 다음 24시간 배양 후 NO의 분비량을 측정하였다.

그 결과, 비처리 대조군의 배지 속 NO의 양은 1.7 ± 0.4 mM로 측정된 반면, LPS 단독 처리군에서는 37.7 ± 2.1 mM로 약 22배 이상 증가한 것으로 측정 되었으며(Fig. 2), 240종의 천연물 라이브러리를 처리한 세포에서는 중에 22 종의 천연물이 세포에서 LPS 처리에도 불구하고 NO의 양은 3.0 mM 이하로 측정 되었다(Fig. 2). 또한, 세포 생존율 측정(MTT assay)한 결과에서는 비처리 대조군 세포의 생존율($100 \pm 2.5\%$)에 비해 LPS 단독 처리군의 생존율은 $72.31 \pm 6.4\%$ 로 나타났다(Fig. 3.). 이러한 차이는 LPS에 의한 자극이 BV2세포에서 정상적으로 유도된 것으로 판단되며, LPS 단독처리군의 생존율과 천연물을 처리한 군의 비교를 통해 처리한 천연물의 세포독성이 없음을 확인하였고, NO의 분비량을 감소하게 한 22개의 물질 중 세포의 생존율의 변화가 LPS 단독 처리군과 비교하여 감소치가 20% 미만인 물질은 총 13가지 물질이 검출되었으며, 이는 우방자에서 추출한 Arctiin, 울금에서 추출한 Bisdemethoxycurcumin, 대황에서 추출한 Chrysophanol, 산초나무잎에서 추출한 Collinin, 슬모초에서 추출한 Imperatorin, 보골지에서 추출한 Isopsoralen, 감초에 추출한 Licoricidin과 Lindenenal acetate, 삼백초의 뿌리에서 추출한 Manassantin A와 Manas-

santin B, 고금에서 추출한 Wogonin, 신선초에서 추출한 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde, 천심련에서 추출한 andrographolide이며, 이는 Table. 1에 정리하였다.

Glutamate와 LPS처리에 의한 신경세포 사멸과 미세아교세포 NO생성을 동시에 억제하는 물질의 ROS 억제능력 확인

Table 1에서 신경세포(HT22)와 미세아교세포(BV2)에 glutamate와 LPS처리에 신경세포 사멸과 NO 생성 억제를 동시에 억제하는 물질은 대황에서 추출한 Chrysophanol이 유일하였다. Chrysophanol이 속해있는 anthraquinone family는 anthracenedione 혹은 dioxoanthracene로 불리며 화학식 $C_{14}H_8O_2$ 을 기본 골격으로 이루어진 방향족의 유기분자들의 집단으로 대표적인 화합물로는 중앙 고리 부분에 keto groupe을 가진 9,10-anthraquinone이 있으며, 이 화합물의 유도체들은 장내용물의 배설을 촉진하는 하제(laxatives, purgatives)로 사용되는 dantron, emodin과 aloe emodin [4, 8, 21], 말라리아 치료제인 rufigallol [21], 항종양제인 mitoxantrone [1] 등이 있으며, Chrysophanol의 경우에는 항암제[9, 17]와 항균성[7] 등의 다양한 약리적 기능을 하는 것으로 알려져 있으나 신경과 미세아교세포의 보호효과에 대한 연구는 자세하게 이루어지지 않은 것으로 확인되었다. 이러한 Chrysophanol의 기존 연구결과와 구조적인 특성에 의해 신경세포와 미세아교세포의 과도한 활성화를 억제할 수 있는 능력은 Chrysophanol의 항산화 능력에 기인할 것으로 예상되었으며, 이를 확인하기

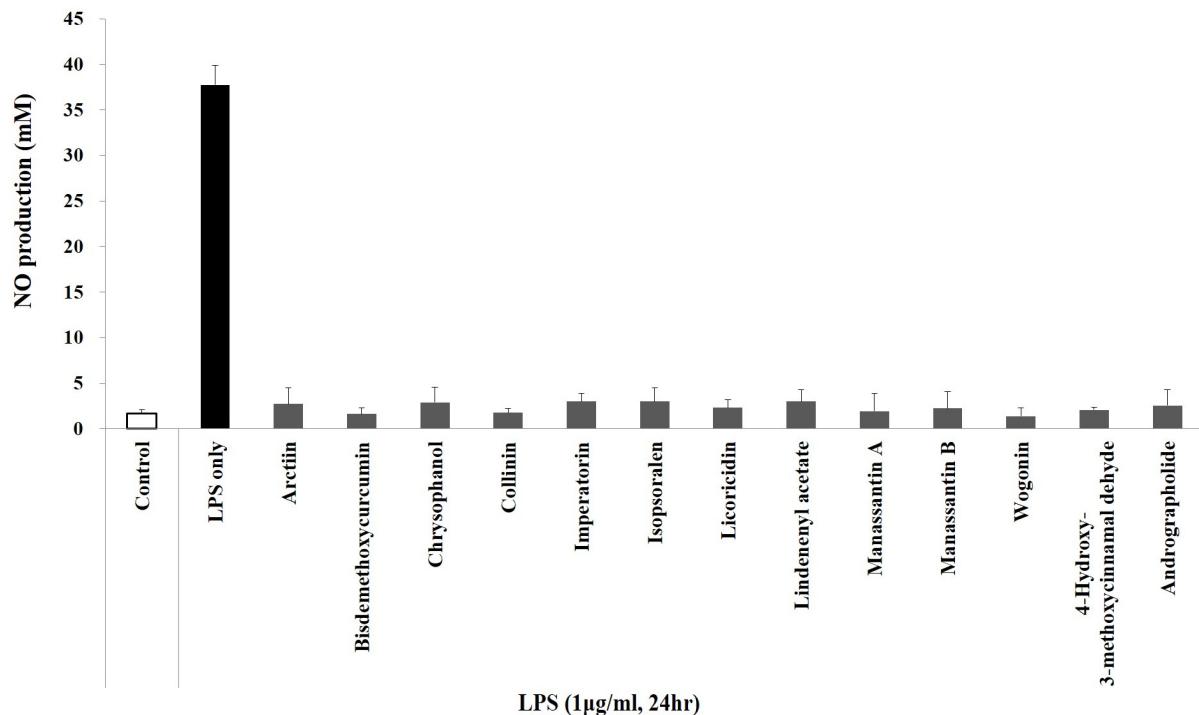


Fig. 2. Protective molecules attenuate LPS induced-NO secretion. BV2 cells (1.0×10^4) were seeded in 96-well plates. Following 24 hr of incubation, they were treated with LPS (1 μ g/ml) for 24 hr, and without treated (Con), and pre-treated with natural products molecules at 2.5 μ g/ml concentration. The amount of NO production in medium was detected by NO detection kit after 24 hr of LPS (1 μ g/ml) treatment. Data are the means \pm SEM (n=3).

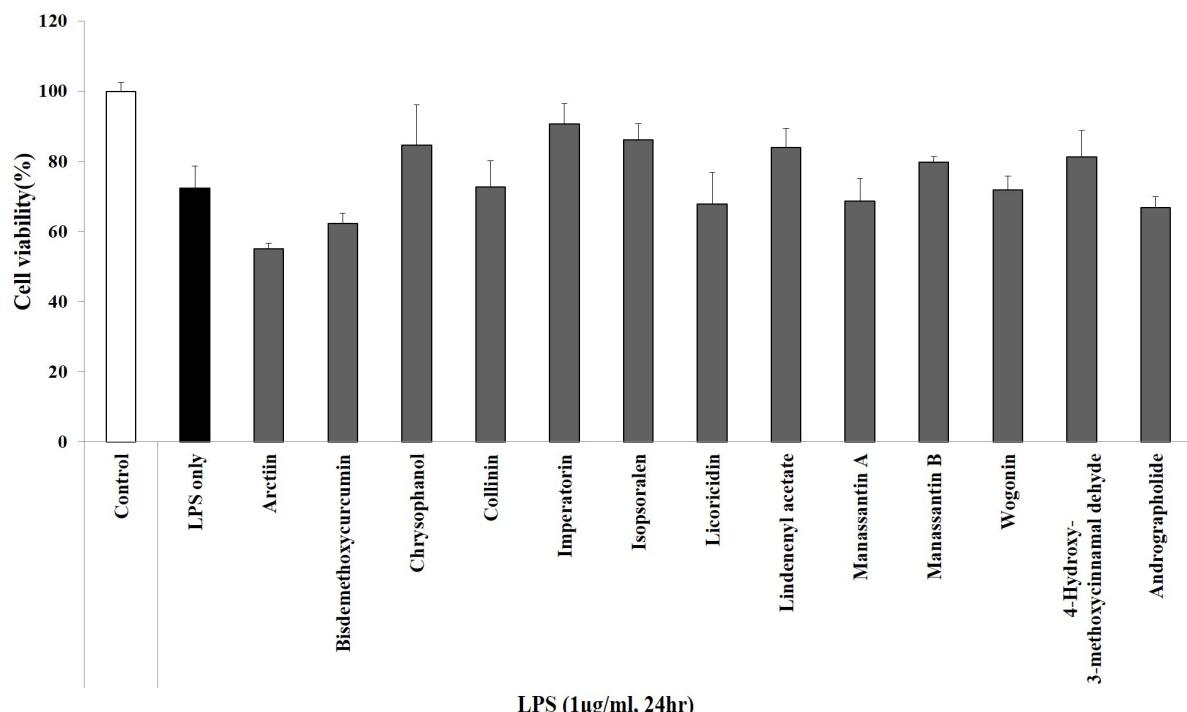


Fig. 3. Protective molecules have little synergy effect with LPS treatment. BV2 cells (1.0×10^4) were seeded in 96-well plates. Following 24 hr of incubation, they were treated with LPS (1 μ g/ml) for 24 hr, and without treated (Con), and pre-treated with natural products molecules at 2.5 μ g/ml concentration. Cell viability was assessed by the MTT reduction assay. The percentage of surviving cells was measured relative to the control values.

Table 1. The bi-effective molecule candidates against oxidative stress induced neuronal cell death and neuroinflammation

Name	Origin	Cell viability (HT22)	NO production (BV2)
(-)Maackiaen	<i>Sophorae Radix</i> (고삼)	90.9±4.7%	-
1,3,6-trihydroxy-2-methyl-9,10-anthraquinon	<i>Rubiae Radix</i> (천조근)	87.5±5.7%	-
2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside	<i>Polygoni Multiflori Radix</i> (적하수오)	89.9±9.5%	-
27-deoxyactein	<i>Cimicifugae Rhizoma</i> (승마)	94.3±3.8%	-
Baicalein	<i>Scutellariae Radix</i> (고금)	96.5±7.9%	-
Britanin	<i>Inulae Flos</i> (선복화)	89.0±7.0%	-
Chrysophanol	<i>Rheum palmatum</i> (대황)	95.7±4.0%	2.9±1.6 mM
Gomisin J	<i>Schisandrae Fructus</i> (오미자)	89.9±7.4%	-
Latifolin	<i>Dalbergia odorifera</i> (강진향)	99.9±11.8%	-
Magnolol	<i>Magnoliae Cortex</i> (후박)	94.9±1.1%	-
Nuciferine	<i>Nupharis Rhizoma</i> (천골)	99.8±12.3%	-
Tetrahydrocoptisine	<i>Corydalis Tuber</i> (현호색)	94.0±10.2%	-
Arctiin	<i>Arctii Fructus</i> (우방자)	-	2.7±1.7 mM
Bisdemethoxycurcumin	<i>Curcumae Radix</i> (율금)	-	1.6±0.6 mM
Collinin	<i>Zanthoxyli Pericarpium</i> (산초잎)	-	1.8±0.4 mM
Imperatorin	<i>Urena Lobata</i> (슬모초)	-	3.0±0.9 mM
Isopsoralen	<i>Psoralea Semen</i> (보풀자)	-	3.0±1.5 mM
Licoricidin	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (감초)	-	2.3±0.9 mM
Lindenetyl acetate	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (감초)	-	3.0±1.3 mM
Manassantin A	<i>Saururi Herba</i> (삼백초)	-	1.9±1.9 mM
Manassantin B	<i>Saururi Herba</i> (삼백초)	-	2.2±1.8 mM
Wogonin	<i>Scutellariae Radix</i> (고금)	-	1.4±0.9 mM
4-Hydroxy-3-methoxycinnamal dehyde	<i>Angelica Keiskei</i> (신선초)	-	2.1±0.3 mM
Andrographolide	<i>Andrographis Paniculata</i> (천심련)	-	2.9±1.6 mM

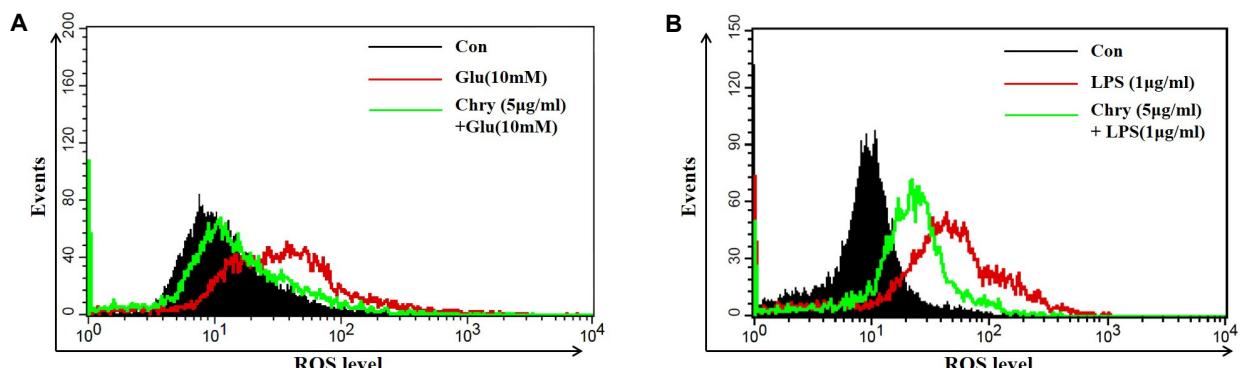


Fig. 4. Chrysophanol prevents glutamate and LPS-induced intracellular ROS formation. (A) HT22 cells and (B) BV2 cells were seeded into 6-well plates. Following 24 hr of incubation, they were treated with 10mM glutamate (Glu) or LPS 12 hr (LPS), and without treated (Control), and pre-treated Chry (2.5 µg/ml) for 1 hr before glutamate or LPS treatment (Chry + Glu or Chry + LPS). Intracellular ROS generation was significantly increased when cells were treated with glutamate or LPS for 12 hr. Levels of ROS were measured with DCF fluorescence.

위해 세포 내 ROS 생성 변화를 DCFDA를 통해 확인하였다 (Fig. 4). 그 결과, HT22 세포에서는 glutamate에 의해 ROS가 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며 이는 Chrysophanol의 전 처리를 통해 억제할 수 있는 것을 확인하였다. 또한 BV2 세포에서도 LPS에 의해 증가된 ROS를 Chrysophanol이 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구결과를 종합하여 보면 천연물 라이브러리를 이용하여 신경세포와 미세아교세포에서 glutamate와 LPS에 의한 신경세포 사멸과 뇌염증을 모두 억제할 수 있는 물질을 검색한 결과 대황에서 추출한 Chrysophanol이 검출되었으며, 더욱이 검출된 Chrysophanol은 각 세포에서 glutamate와 LPS에 의한 산화적 스트레스로 과도한 ROS 생성을 제거하는 것으로

판단된다.

이러한 결과를 바탕으로 Chrysophanol에 대한 보다 깊은 추가 연구를 통하여 산화적 스트레스 유도 신경세포 사멸과 뇌의 면역을 담당하는 미세아교세포의 과잉 활성화에 따른 뇌염증을 동시에 억제하는 약물로의 개발을 앞으로 하고자 한다.

감사의 글

본 연구에 사용된 천연물은 한국한방산업진흥원에서 분양 받아 사용하였으며, 한국연구재단 이공분야 기초연구사업(NRF-2014R1A2A1A11054095) 및 한국생명공학연구원 주요 사업(KGM4611411)의 지원에 의해 수행되었음.

References

1. Alberts, D. S., Griffith, K. S., Goodman, G. E., Herman, T. S. and Murray, E. 1980. Phase I clinical trial f mitoxantrone: a new anthracenedione anticancer drug. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **5**, 11-15.
2. Andre, V. M., Cepeda, C. and Levine, M. S. 2010. Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act. *CNS Neurosci. Ther.* **16**, 163-178.
3. Bal-Price, A. and Brown, G. C. 2001. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J. Neurosci.* **21**, 6480-6491.
4. Brusick, D. and Mengs, U. 1997. Assessment of the genotoxic risk from laxative senna products. *Environ. Mol. Mutagen.* **29**, 1-9.
5. Cowan, C. M., Fan, M. M. Y., Fan, J., Shehadeh, J., Zhang, L. Y. J., Graham, R. K., Hayden, M. R. and Raymond, L. A. 2008. Polyglutamine-modulated striatal calpain activity in YAC transgenic huntington disease mouse model: impact on NMDA receptor function and toxicity. *J. Neurosci.* **28**, 12725-12735.
6. Davis, J. B. and Maher, P. 1994. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* **652**, 169-173.
7. Fosse, C., Le Texier, L., Roy, S., Delaforge, M., Gregoire, S., Neuwels, M. and Azerad, R. 2004. Parameters and mechanistic studies on the oxidative ring cleavage of synthetic heterocyclic naphthoquinones by Streptomyces strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 446-456.
8. Gattuso, J. M. and Kamm, M. A. 1994. Adverse effects of drugs used in the management of constipation and diarrhoea. *Drug Saf.* **10**, 47-65.
9. Huang, Q., Lu, G., Shen, H. M., Chung, M. C. and Ong, C. N. 2007. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Med. Res. Rev.* **27**, 609-630.
10. Jekabsone, A., Neher, J. J., Borutaite, V. and Brown, G. C. 2007. Nitric oxide from neuronal nitric oxide synthase sensitises neurons to hypoxia-induced death via competitive inhibition of cytochrome oxidase. *J. Neurochem.* **103**, 346-356.
11. Johnson, K. A., Conn, P. J. and Niswender, C. M. 2009. Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **8**, 475-491.
12. Kang, T. H., Bae, K. H., Yu, M. J., Kim, W. K., Hwang, H. R., Jung, H., Lee, P. Y., Kang, S., Yoon, T. S., Park, S. G., Ryu, S. E. and Lee, S. C. 2007. Phosphoproteomic analysis of neuronal cell death by glutamate-induced oxidative stress. *Proteomics* **7**, 2624-2635.
13. Kreutzberg, G. W. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **19**, 312-318.
14. Li, Y., Maher, P. and Schubert, D. 1998. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C regulates glutamate-induced nerve cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7748-7753.
15. Lo, E. H., Dalkara, T. and Moskowitz, M. A. 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 399-415.
16. McNaught, K. S. and Brown, G. C. 1998. Nitric oxide causes glutamate release from brain synaptosomes. *J. Neurochem.* **70**, 1541-1546.
17. Shoemaker, M., Hamilton, B., Dairkee, S. H., Cohen, I. and Campbell, M. J. 2005. *In vitro* anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs. *Phytother. Res.* **19**, 649-651.
18. Stanciu, M., Wang, Y., Kentor, R., Burke, N., Watkins, S., Kress, G., Reynolds, I., Klann, E., Angiolieri, M. R., Johnson, J. W. and DeFranco, D. B. 2000. Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J. Biol. Chem.* **275**, 12200-12206.
19. Stewart, V. C., Heslegrave, A. J., Brown, G. C., Clark, J. B. and Heales, S. J. 2002. Nitric oxide-dependent damage to neuronal mitochondria involves the NMDA receptor. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 458-464.
20. Wermuth, C. G. 2003. *Journal.* pp. 3-28., 2nd ed., Amsterdam : Boston, MA, USA
21. Winter, R. W., Cornell, K. A., Johnson, L. L., Ignatushchenko, M., Hinrichs, D. J. and Riscoe, M. K. 1996. Potentiation of the antimalarial agent rufigallol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1408-1411.

초록 : 신경세포 사멸과 미세아교세포활성화 억제 동시 가능 천연물질 탐색 연구

민주식^{1,2} · 이동석^{1*}

(¹경북대학교 자연과학대학 생명과학부, BK21플러스 첨단복합 생명과학인력 양성사업단, ²한국생명공학연구원 미래기술연구본부)

천연물을 기반으로 한 신약 개발은 일반적으로 오랜 기간 동안의 원료 약물로써 사용해 온 경험에 의한 다양한 임상적 결과의 축적과 이로 인한 안정성(stability)과 안전성(safety)의 확보 및 신약 개발 시간의 단축과 같은 이점 을 가지고 있어, 천연물 유래 약물 연구는 꼭 필요한 실정이다. 다양한 신경질환에서 신경세포의 사멸과 미세아교 세포의 과도한 활성화 즉 뇌염증이 관찰되며 이를 억제할 수 있는 물질에 대한 연구는 활발히 진행 중이지만, 현재까지 신경세포 사멸과 뇌염증을 동시에 억제하는 물질 개발 시도는 거의 없었다. 따라서, 본 연구에서는 천연물에서 추출한 물질로 총 240개로 구성된 라이브러리로부터 신경전달물질 중의 하나인 glutamate 과잉처리에 의 한 산화적 스트레스 유도 신경세포(HT22) 사멸과 LPS에 의한 미세아교세포(BV2)의 과도한 활성화 즉 뇌염증의 표지 인자 중 하나인 NO의 생산량의 감소 효과가 동시에 나타나는 물질을 검출한 결과, 대황에서 추출한 Chrysophanol이 검출되었으며 더욱이 Chrysophanol이 신경세포와 미세아교세포 모두에서 glutamate와 LPS에 의해 각각 유도된 세포내 활성산소(ROS) 발생을 억제하는 것을 확인하였다. 앞으로 Chrysophanol에 대한 보다 깊은 연구를 통하여 산화적 스트레스에 의한 신경세포 사멸과 미세아교세포의 과잉 활성화에 따른 뇌염증의 발생 을 동시에 억제하는 신경질환의 치료 및 예방 신약개발 후보 물질 가능성을 제시 하고자 한다.