

Effects of Flavonoids and Their Glycosides on Oxidative Stress in C6 Glial Cells

Ji Hyun Kim¹, Hyun Young Kim^{2*} and Eun Ju Cho^{1*}

¹Department of Food Science and Nutrition, and Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 46241, Korea

²Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea

Received September 24, 2019 / Revised October 10, 2019 / Accepted November 22, 2019

Oxidative stress induced by the over-production of reactive oxygen species (ROS) in the brain is the most common cause of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. In the present study, we investigated the protective effects of flavonoids and their glycosides, namely kaempferol, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin, and quercetin-3-β-D-glucoside, against H₂O₂-induced oxidative stress in the C6 glial cells. The H₂O₂-treated glial cells exhibited decreased cell viability and increased ROS production when compared with normal cells. However, cells treated with each of the four flavonoids/glycosides demonstrated significantly increased viability and suppressed ROS production when compared with the H₂O₂-treated control group. These results indicate that flavonoids/glycosides attenuate oxidative stress induced by H₂O₂ in C6 glial cells. To confirm the protective molecular mechanisms, we measured pro-inflammatory factors such as inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and interleukin-1β. H₂O₂ treatment was seen to elevate these factors and decrease IκB-α in the C6 glial cells, while the flavonoids/glycosides induced a down-regulation of the pro-inflammatory factors and increased IκB-α, indicating a neuroprotective effects through attenuation of the inflammation. In particular, quercetin and its glycoside showed a higher neuroprotective effect than the kaempferol treatments. These results suggest that these flavonoids and their glycosides could be promising therapeutic agents for neurodegenerative diseases *via* the attenuation of oxidative stress.

Key words : Kaempferol, kaempferol-3-O-glucoside, oxidative stress, quercetin, quercetin-3-β-D-glucoside

서론

생체 내 다양한 대사 과정 중 발생하는 hydroxyl radical (OH), superoxide anion (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) 등의 reactive oxygen species (ROS)는 반응성이 매우 높아, DNA, 단백질, 지질 등의 생체 분자를 손상시킨다[2, 25]. 정상적인 상태에서 ROS는 체내 항산화 효소 등의 작용에 의해 독성이 없는 물질로 전환되나, 과량의 ROS가 생성되고 이를 적절히 제거하지 못할 경우 산화/항산화 체계 불균형을 일으켜 산화적 스트레스가 유발된다[25, 27]. 특히, 뇌는 구리, 철분 등의 금속 성분과 불포화 지방산이 풍부하게 함유되어 있어 다른 조직에 비해 산화적 손상에 취약한 편이며, 산화적 손상은 알츠하이머 질환과 같은 신경퇴행성 질환의 원인으로 알려

져 있다[24]. 또한, 뇌에서 산화적 스트레스가 유발 되었을 때, nuclear factor kappa B (NF-κB) pathway 활성화로 인한 염증 매개 인자 및 염증성 cytokines 분비 증가를 통한 염증 반응이 유발되며, 이는 뇌 신경세포 및 신경교세포의 사멸을 유도하여 신경퇴행성 질환을 일으킨다[26, 37]. 따라서, 국내외 많은 연구들은 독성과 부작용이 적은 식이 항산화제를 이용하여 산화적 스트레스 개선을 통한 신경퇴행성 질환 예방 및 개선에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[22, 30].

Flavonoid는 식물 유래 소재에서 발견되는 폴리페놀 계열의 생리활성물질로써, 천연에서 대부분 aglycone에 당이 붙은 배당체 형태로 존재한다[31]. Flavonoid는 우수한 항산화 활성을 나타내어, 신경퇴행성 질환 보호 효능이 있는 것으로 알려져 있다[16]. 특히, flavonoid의 다양한 성분 중에서 kaempferol은 산화적 손상이 유도된 신경세포에서 ROS 생성 억제 및 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 조절을 통한 신경세포 사멸 억제 효과를 나타내었으며, 치매 동물의 뇌 조직에서 항산화 효소 활성 증가 및 염증성 cytokine 발현 억제를 나타내었다[13, 32]. 또한, quercetin은 phosphoinositide 3 kinase/protein kinase B/glycogen synthase kinase3β (PI3K/Akt/GSK3β), nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf-2), MAPK pathway 조절을 통한 항산화 활성과 nitric oxide 생성 억제, 염증성 cytokines 분비 억제 등을 통한 항염증 활성

*Corresponding authors

Tel : +82-55-751-3277, Fax : +82-55-751-3279

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

Tel : +81-51-510-2837, Fax : +82-51-583-3648

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

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.

을 통해 신경 보호 효과를 나타내었다[11, 12, 37]. Kaempferol, quercetin 및 이들 flavonoid가 풍부하게 함유된 천연물 유래 소재의 추출물 처리 시 산화적 손상이 유도된 신경교세포 또는 신경세포에서 ROS 생성 억제, 세포 사멸 억제 등을 통해 산화적 손상에 대한 신경 보호 효능이 보고되었다[7, 9, 10, 21, 29, 32]. 뿐만 아니라, 뇌의 산화적 손상이 유도된 동물모델에서 quercetin의 섭취 시, ROS, malondialdehyde, protein carbonyls, nitric oxide 등의 산화적 손상 지표의 개선이 보고되었다[5]. 이와 같이 kaempferol과 quercetin은 항산화 및 항염증 활성이 우수하여 신경퇴행성 질환 예방 및 치료 소재로서의 가능성이 제시되었다. 그러나 kaempferol, quercetin을 포함한 flavonoid의 배당체와 aglycone의 활성 비교에 관한 연구는 부족한 실정이다. 본 연구에서는 kaempferol, quercetin 및 그 배당체들의 활성 비교를 통해 flavonoid의 구조와 신경교세포의 산화적 스트레스 보호 효과와의 관련성을 비교해 보고자 한다. 본 연구에서는 대표적인 flavonoid의 일종인 kaempferol과 quercetin 및 그 배당체의 H₂O₂ 유도 C6 glial 세포에서 세포 생존율, ROS 소거능, 염증 관련 단백질 발현 측정을 통해, 이들 flavonoid의 산화적 손상에 대한 신경교세포 보호 효과를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

시약

Hydrogen peroxide (H₂O₂)는 Junsei (Tokyo, Japan)사에서 구입하였으며, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin streptomycin, trypsin EDTA 시약은 Welgene (Daegu, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 세포 생존율과 ROS 소거능 측정에 사용한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Bio Basic (Toronto, Canada)에서, 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Sigma (Saint Louis, USA)사에서 구입하였다. 단백질 발현 측정에 사용한 RIPA buffer는 Elpis Biotech. (Daejeon, Korea)에서, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane은 Millipore (Billerica, MA, USA)에서, enhanced chemiluminescence (ECL)는 Bio-Rad (Hercules, USA)사에서 구입하였다. 1차항체인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), IκB-α는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, MA, USA)사에서, IL-1β와 2차항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

실험재료

실험에 사용한 kaempferol, quercetin, quercetin-3-β-D-glucoside는 Sigma (St Louis, MO, USA)사에서 구매하였으며, kaempferol-3-O-glucoside는 Extrasynthese (Genay, France)

사에서 구매하였다. 각 flavonoid의 구조는 Fig. 1과 같다.

세포 배양 및 시료의 처리

본 실험에 사용한 쥐의 신경교세포인 C6 glial 세포는 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 100 units/ml의 penicillin streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 사용하였다. 세포의 confluence가 80%에 도달하였을 때 멸균된 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세포를 세척 후, 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액으로 부착된 세포를 분리한 뒤 원심분리를 통해 세포를 집적시켜 계대배양하여 실험에 사용하였다. Flavonoids의 산화적 손상에 대한 신경교세포 보호 효과를 확인하기 위해, C6 glial 세포를 seeding하여 잘 부착시킨 뒤, 각 flavonoid를 세포에 4시간 배양시킨 후, 세포의 산화적 손상 유도를 위해 250 μM H₂O₂ 처리하여 24시간 배양시켰다.

세포 생존율 측정

세포 생존율 측정을 위해 5 mg/ml의 MTT solution을 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 상층액을 제거한 뒤 DMSO에 보라색의 formazan 결정을 녹여 낸 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[19].

ROS 소거능 측정

ROS 소거능 측정을 위해 10 μM DCF-DA solution을 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 30분간 반응시킨 뒤, FLUOstar OPTIMA (BMG lavtech., Ortenberg, Germany) excitation-480 nm, emission-535 nm로 측정하였다[3].

단백질 발현 측정

단백질 발현 측정을 위해 Western blotting을 수행하였다.

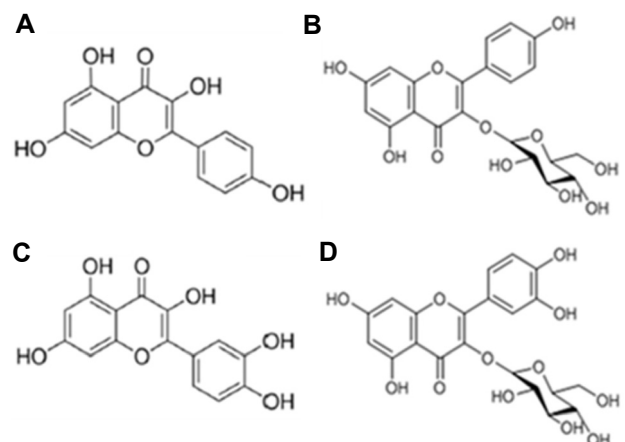


Fig. 1. The chemical structures of flavonoids including kaempferol (A), kaempferol-3-O-glucoside (B), quercetin (C), and quercetin-3-β-D-glucoside (D).

Cell scraper를 이용하여 세포를 회수한 뒤, RIPA buffer를 첨가하여 4°C, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 정량한 단백질은 10% sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 PVDF membrane에 transfer하였다. 상온에서 5% skim milk를 사용하여 blocking 시킨 뒤, 1차 항체인 iNOS, COX-2, IκB-α, IL-1β를 4°C에서 overnight 처리하였으며, 2차 항체는 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, ECL solution을 membrane에 도포시켜 Chemiluminescence image system (Davinch-Chemi™, Seoul, Korea)을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다. 정량화된 수치는 Image J software를 이용하여 측정하였다.

통계 분석

각 실험은 3회 반복 실험을 통하여 결과를 얻었으며, 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 각 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정을 위해 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 프로그램을 이용하여 analysis of variance (ANOVA)를 구한 후 Duncan's multiple test ($p < 0.05$)를 실시하였다.

결과 및 고찰

Flavonoid의 세포 생존율 개선 효과

H₂O₂는 호기성 대사과정에서 생성되는 대사산물으로써, 세포막을 자유롭게 통과하여 다른 조직의 손상을 일으킨다[6]. 특히, H₂O₂는 구리 또는 철과 같은 금속과 Fenton 반응을 일으켜 생체 분자의 손상을 일으키는 독성 물질로써, 뇌에서 H₂O₂의 과다 생성 시 산화적 스트레스, 염증 반응 등을 통해 신경교세포를 사멸시킨다[8, 28]. Flavonoid의 산화적 손상에 대한 신경교세포 보호 효과를 알아보기 위해, H₂O₂로 산화적 손상을 유도한 C6 glial 세포를 이용하여 세포 생존율을 살펴보았다 (Table 1). 아무것도 처리하지 않은 normal군을 100%라고 하였을 때, H₂O₂만을 처리한 control군의 경우 55.31%의 낮은 세포 생존율을 나타내어 H₂O₂에 의한 C6 glial 세포의 산화적 손상을 확인하였다. 반면 kaempferol, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin, quercetin-3-β-D-glucoside의 4가지 flavonoid를 0.25, 0.5, 1 μM의 농도로 각각 처리 시 모든 농도에서 60% 이상의 세포 생존율을 확인하여 flavonoid는 산화적 손상에 대한 보호 효과가 있음을 알 수 있었다. 이전 연구에 의하면, H₂O₂로 산화적 손상이 유도된 세포에 천연물 유래 소재의 시료 처리 시 60% 이상의 세포 생존율을 나타내어, 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과가 있는 것으로 보고되었다[33]. 본 연구에서도 4가지 flavonoid의 처리 시, 60% 이상의 세포 생존율을 나타내었을 뿐만 아니라, H₂O₂를 처리한 control군에 비해 유의적으로 세포 생존율이 증가함을 통해, 각 시료는

Table 1. Effect of flavonoids on cell viability of C6 glial cells treated with H₂O₂

Treatment (μM)		Cell viability (%)
Normal		100.00±1.38 ^a
H ₂ O ₂ -treated control		55.31±0.62 ^c
Kaempferol	0.25	60.02±1.34 ^d
	0.5	61.56±1.90 ^{cd}
	1.0	62.81±2.05 ^{cd}
Kaempferol-3-O-glucoside	0.25	62.94±1.80 ^c
	0.5	60.83±1.88 ^{cd}
	1.0	62.72±0.65 ^{cd}
Quercetin	0.25	60.05±1.45 ^d
	0.5	63.27±0.85 ^{bc}
	1.0	65.68±2.19 ^b
Quercetin-3-β-D-glucoside	0.25	61.39±2.24 ^{cd}
	0.5	61.59±2.95 ^{cd}
	1.0	62.99±1.12 ^c

Values are means ± SD from three independent experiments. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

산화적 손상에 대한 세포 생존율 개선을 통해 신경교세포 보호 효능이 있는 것으로 사료된다. 또한, kaempferol, quercetin과 quercetin-3-β-D-glucoside를 처리하였을 경우 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가함을 확인하였으며, 특히 quercetin 1 μM의 농도로 처리하였을 때 가장 높은 세포 생존율 수치를 나타내어 다른 flavonoid에 비해 우수한 신경교세포 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 이전 연구에 의하면, 산화적 손상이 유도된 C6 신경교세포에서 quercetin의 처리 시 세포 생존율을 개선을 통해 신경교세포 보호 효능이 보고되었다[4, 7]. 또한, quercetin과 kaempferol이 풍부하게 함유된 camellia, 와송 등 천연물 유래 소재의 추출물은 H₂O₂로 산화적 스트레스가 유도된 신경세포에서 세포 생존율을 유의적으로 개선시키는 것으로 보고되었다[10, 21]. 따라서, 이들 flavonoid는 세포 생존율 개선을 통해 신경세포 보호 효능을 나타내는 것으로 사료된다.

Flavonoid의 ROS 소거 효과

ROS의 과다 축적으로 인한 산화적 손상은 신경교세포의 사멸을 일으켜 AD의 원인이 된다[24]. 이전 연구에 의하면, C6 glial 세포에 H₂O₂를 처리 시, 과량의 ROS 생성을 통해 산화적 손상을 유발하여 신경교세포를 사멸시키는 것으로 보고되었다[23]. 세포 내 ROS를 측정하는 대표적인 물질인 DCF-DA는 세포막을 통과하여 세포 내 esterase에 의해 비형광성 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 ROS에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 DCF가 된다[3]. 본 연구에서 flavonoid의 세포 내 ROS 생성량을 DCF-DA의 산화에 의한 형광도의 변화를 이용하여 ROS 생성량을 측정하여 산화적 손상

에 대한 신경교세포 보호 효과를 확인하였다. H₂O₂를 처리 후 ROS 생성량을 측정한 결과, 시간이 지남에 따라 ROS의 생성량이 증가하는 것을 확인하였고 normal군에 비해 H₂O₂를 처리한 control군은 유의적으로 높은 ROS 생성량을 나타내어 세포의 산화적 손상이 유발되었음을 확인하였다(Fig. 2). 60분 기준으로 ROS 생성량을 측정한 결과 kaempferol, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin, quercetin-3-β-D-glucoside의 4가지 flavonoid의 처리 시, 모든 농도에서 H₂O₂만을 처리한 control군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타내어 ROS 생성 억제력을 통한 신경교세포 보호 효과를 확인하였다(Table 2). 4가지 flavonoids 중에서 kaempferol-3-O-glucoside, quercetin과 quercetin-3-β-D-glucoside을 처리한 경우, 농도의존적으로 ROS 생성 감소를 확인하였다. 특히, kaempferol과 kaempferol 배당체인 kaempferol-3-O-glucoside를 처리한 군에 비해, quercetin과 quercetin 배당체인 quercetin-3-β-D-glucoside를 처리한 군에서 더 낮은 ROS 생성량을 나타내어 kaempferol에 비해 quercetin이 우수하게 신경교세포 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 본 연구와 유사하게 quercetin은 산화적 손상이 유도된 C6 신경교세포에서 ROS 생성을 유의적으로 억제하여 신경교세포를 보호 하는 것으로 보고되었다[4, 7]. 또한, kaempferol은 산화적 손상이 유도된 신경세포에서 ROS 소거능 증가를 나타내어 산화적 손상에 대한 신경세포 보호 효능이 보고되었다[32]. 따라서 kaempferol 및 quercetin은 뇌에서 ROS 생성 억제를 통한 항산화 작용으로 인해 신경 보호 효능이 있는 것으로 사료된다.

Flavonoid의 염증 관련 단백질 발현 개선 효과

뇌에서 산화적 손상 시, NF-κB는 I-κB와 분리되어 핵 내로 이동하고, 핵 내로 이동한 NF-κB는 iNOS, COX-2, IL-1β, tumor necrosis factor-α 등의 pro-inflammatory factor의 발현을

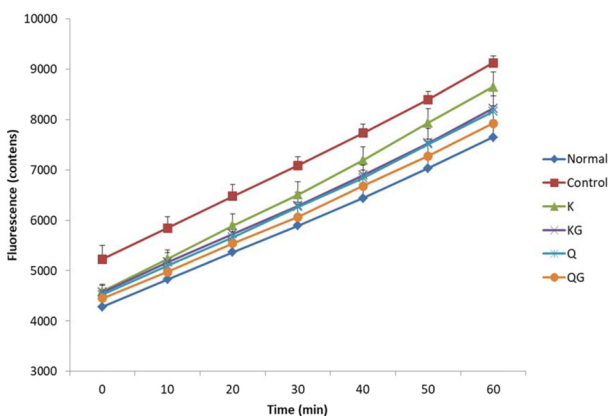


Fig. 2. Fluorescence intensity changes during 60 min in C6 glial cells treated with H₂O₂. Values are means ± SD from three independent experiments. K, kaempferol (1 μM); KG, kaempferol-3-O-glucoside (1 μM); Q, quercetin (1 μM); QG, quercetin-3-β-D-glucoside (1 μM).

증가시켜 뇌 세포 사멸을 일으킨다[17]. NO는 신경전달물질의 하나로써 세포 내 항상성 유지, 신경전달물질의 운반 등과 같은 기능을 지니며, NO 합성경로(NO synthase pathway; NOS)를 통해 endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), iNOS 등의 중간 생성물을 발현시킨다[15]. NO 합성 경로에 의해 생성되는 중간 생성물 중 eNOS와 nNOS는 염증 자극에 대한 반응이 아닌 구성성분으로 소량 발현되지만, iNOS는 염증성 자극에 의해 지속적으로 다량 생성되어 염증 반응에 관여한다고 알려져 있다[15]. Cyclooxygenase는 염증 반응 조절에 중추적인 역할을 하며, 두 가지 종류의 isoform이 존재하는데 COX-1은 거의 모든 세포에 존재하며 생리적 작용에 관여한다[1]. 반면, COX-2는 염증반응을 확장시키며 염증 반응에 관여하는 prostaglandin을 포함한 각종 prostanoids를 생성하며 중추신경계의 염증반응과 퇴행성 변화에 관여한다고 보고되었다[1, 18]. 또한, 이전 연구에 의하면 H₂O₂를 처리한 C6 glial 세포는 NF-κB pathway 활성화를 통해 iNOS, COX-2, IL-1β와 같은 pro-inflammatory factor의 발현을 증가시켜 신경교세포 사멸을 일으키는 것으로 보고되었다[14]. 본 연구에서 H₂O₂로 산화적 손상을 유도한 C6 glial 세포에서 1 μM의 농도로 flavonoids를 처리하였을 때 염증 관련 단백질 발현을 확인해보았다(Fig. 3). Normal군에 비해 H₂O₂를 처리한 control군에서 iNOS, COX-2, IL-1β와 같은 염증성 인자 발현의 증가와 IκB-α의 발현 감소를 통해 H₂O₂의 처리로 인한 control군의 산화적 손상을 확인하였다. 반면 kaempferol, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin, quercetin-3-β-D-glucoside를 1 μM의 농도로 처리하였을 경우 iNOS, COX-2, IL-1β

Table 2. Effect of flavonoids on level of reactive oxygen species of C6 glial cells treated with H₂O₂ for 60 min

Treatment (μM)		DCFH fluorescence intensity (%)
Normal		100.00±3.38 ^e
H ₂ O ₂ -treated control		119.28±1.80 ^a
Kaempferol	0.25	107.36±3.46 ^{cd}
	0.5	106.47±2.05 ^{cd}
	1.0	113.11±3.85 ^b
Kaempferol-3-O-glucoside	0.25	111.70±1.71 ^{bc}
	0.5	108.78±1.34 ^{bcd}
	1.0	107.50±4.89 ^{cd}
Quercetin	0.25	110.97±3.05 ^{bc}
	0.5	107.96±2.79 ^{bcd}
	1.0	106.70±4.02 ^{cd}
Quercetin-3-β-D-glucoside	0.25	109.05±3.29 ^{bc}
	0.5	109.21±2.58 ^{bc}
	1.0	103.57±4.53 ^{de}

Values are means ± SD from three independent experiments. ^{a-e}Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

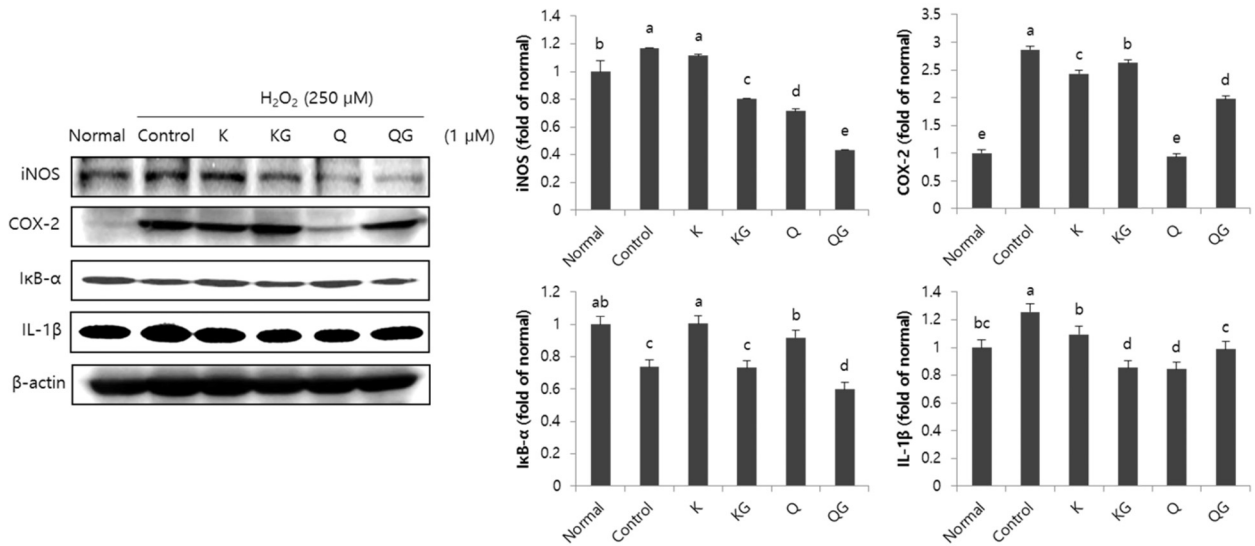


Fig. 3. Effect of flavonoids on expressions of inflammation-related proteins such as iNOS, COX-2, IκB-α and IL-1β in C6 glial cells treated with H₂O₂. Values are means ± SD from three independent experiments. ^{a-e}Means with the different letters are significantly different (*p*<0.05) by Duncan's multiple range test. β-Actin was used as a loading control. K, kaempferol; KG, kaempferol-3-O-glucoside; Q, quercetin; QG, quercetin-3-β-D-glucoside.

와 같은 염증성 인자 발현의 감소와 IκB-α의 발현 증가를 통해 염증 반응을 개선시킴을 확인하였다. 특히, kaempferol과 kaempferol 배당체인 kaempferol-3-O-glucoside를 처리한 군에 비해, quercetin과 quercetin 배당체인 quercetin-3-β-D-glucoside를 처리한 군에서 염증성 인자인 iNOS, COX-2 및 IL-1β 발현이 더 낮게 나타남을 통해 kaempferol에 비해 quercetin의 염증반응 개선 효과가 우수함을 알 수 있었다. Kaempferol과 quercetin은 lipopolysaccharides로 염증반응이 유도된 BV2 microglial 세포에서 NF-κB pathway 억제를 통해 iNOS, COX-2 단백질 발현 감소를 나타내었으며, MAPK와 protein kinaseB/AKT, heme oxygenase-1 발현 조절 등을 통해 신경교 세포의 염증 반응 개선 효과를 나타내었다[12, 20]. Kaempferol 배당체인 kaempferol-3-O-glucoside는 뇌 손상이 유도된 동물 모델에서 NF-κB pathway 조절을 통해 IL-1β, iNOS, TNF-α 등의 pro-inflammatory factor 발현을 억제시켰다[34]. 또한, 뇌 손상 동물 모델에서 kaempferol, quercetin 및 이들 배당체가 풍부하게 함유된 천연물 유래 소재의 추출물 섭취 시 뇌에서 염증 매개 인자 발현을 감소시키는 것으로 보고되어, 이들 flavonoid는 뇌에서 항염증 활성이 우수함을 알 수 있었다[36]. 본 연구에서도 kaempferol 및 quercetin은 뇌 신경교세포의 손상 시 염증성 인자 조절을 통한 항염증 작용으로 신경교세포 보호 효능을 나타내는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2013R1A1A

2011228).

References

1. Aïd, S. and Bosetti, F. 2011. Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: therapeutic implications. *Biochimie* **93**, 46-51.
2. Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373-399.
3. Cathcart, R., Schwieters, E. and Ames, B. N. 1984. Detection of picomole levels of lipid hydroperoxides using a dichlorofluorescein fluorescent assay. *Methods Enzymol.* **105**, 352-358.
4. Chen, T. J., Jeng, J. Y., Lin, C. W., Wu, C. Y. and Chen, Y. C. 2006. Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology* **223**, 113-126.
5. Denny Joseph, K. M. and Muralidhara. 2013. Enhanced neuroprotective effect of fish oil in combination with quercetin against 3-nitropropionic acid induced oxidative stress in rat brain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **40**, 83-92.
6. DiGuseppi, J. and Fridovich, I. 1984. The toxicology of molecular oxygen. *Crit. Rev. Toxicol.* **12**, 315-342.
7. Gitika, B., Sai Ram, M., Sharma, S. K., Ilavazhagan, G. and Banerjee, P. K. 2006. Quercetin protects C6 glial cells from oxidative stress induced by tertiary-butylhydroperoxide. *Free Radic. Res.* **40**, 95-102.
8. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 501-514.
9. Jazvinščak Jembrek, M., Vuković, L., Puhović, J., Erhardt, J. and Oršolić, N. 2012. Neuroprotective effect of quercetin

- against hydrogen peroxide-induced oxidative injury in P19 neurons. *J. Mol. Neurosci.* **47**, 286-299.
10. Jeong, C. H., Kim, J. H., Choi, G. N., Kwak, J. H., Kim, D. O. and Heo, H. J. 2010. Protective effects of extract with phenolics from *Camellia (Camellia japonica)* leaf against oxidative stress-induced neurotoxicity. *Food Sci. Biotechnol.* **19**, 1347-1353.
 11. Jiang, W., Luo, T., Li, S., Zhou, Y., Shen, X. Y., He, F., Xu, J. and Wang, H. Q. 2016. Quercetin protects against okadaic acid-induced injury *via* MAPK and PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathways in HT22 hippocampal neurons. *PLoS One* **11**, 0152371.
 12. Kang, C. H., Choi, Y. H., Moon, S. K., Kim, W. J. and Kim, G. Y. 2013. Quercetin inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglial cells by suppressing the NF- κ B pathway and activating the Nrf2-dependent HO-1 pathway. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 808-813.
 13. Kouhestani, S., Jafari, A. and Babaei, P. 2018. Kaempferol attenuates cognitive deficit *via* regulating oxidative stress and neuroinflammation in an ovariectomized rat model of sporadic dementia. *Neural. Regen. Res.* **13**, 1827-1832.
 14. Lee, A. Y., Wu, T. T., Hwang, B. R., Lee, J., Lee, M. H., Lee, S. and Cho, E. J. 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.
 15. Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L. and Snyder, S. H. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* **120**, 227-237.
 16. Malar, D. S. and Devi, K. P. 2014. Dietary polyphenols for treatment of Alzheimer's disease-future research and development. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **15**, 330-342.
 17. Meffert, M. K. and Baltimore, D. 2005. Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci.* **28**, 37-43.
 18. Minghetti, L. 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **63**, 901-910.
 19. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
 20. Park, S. B., Lee, D. S., Kang J. Y., Kim, J. M., Park, S. K. Kang, J. E., Kwon, B. S., Park, S. H. Lee, C. J. and Heo, H. J. 2017. Protective effect on neuronal cells of *Orostachys japonicus* A. Berger extract against reactive oxygen species-induced neuronal cytotoxicity and active compounds. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **49**, 524-531.
 21. Park, S. E., Sapkota, K., Kim, S., Kim, H. and Kim, S. J. 2011. Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 1008-1025.
 22. Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J. and Valko, M. 2017. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 592-607.
 23. Ramalingam, M. and Kim, S. J. 2014. Insulin on hydrogen peroxide-induced oxidative stress involves ROS/Ca²⁺ and Akt/Bcl-2 signaling pathways. *Free Radic. Res.* **48**, 347-356.
 24. Reed, T. T. 2011. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 1302-1319.
 25. Salim, S. 2017. Oxidative stress and the central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **360**, 201-205.
 26. Sawikr, Y., Yarla, N. S., Peluso, I., Kamal, M. A., Aliev, G. and Bishayee, A. 2017. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: the preventive and therapeutic potential of polyphenolic nutraceuticals. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **108**, 33-57.
 27. Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* **82**, 291-295.
 28. Spasojević, I., Bajić, A., Jovanović, K., Spasić, M. and Andjus, P. 2009. Protective role of fructose in the metabolism of astroglial C6 cells exposed to hydrogen peroxide. *Carbohydr. Res.* **344**, 1676-1681.
 29. Takashima, M., Ichihara, K. and Hirata, Y. 2019. Neuroprotective effects of Brazilian green propolis on oxytosis/ferroptosis in mouse hippocampal HT22 cells. *Food Chem. Toxicol.* **132**, 110669.
 30. Thapa, A. and Carroll, N. J. 2017. Dietary modulation of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1583.
 31. Xiao, J. 2017. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**, 1874-1905.
 32. Yang, E. J., Kim, G. S., Jun, M. and Song, K. S. 2014. Kaempferol attenuates the glutamate-induced oxidative stress in mouse-derived hippocampal neuronal HT22 cells. *Food Funct.* **5**, 1395-1402.
 33. Youn, Y., Kim, H. Y., Park, H. M., Lee, S. H., Park, J. R., Hong, S. G. and Kim, Y. G. 2015. Protective effects of mulberry (*Morus alba*) sugar extracts on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cell. *Kor. J. Food Preserv.* **22**, 751-757.
 34. Yu, L., Chen, C., Wang, L. F., Kuang, X., Liu, K., Zhang, H. and Du, J. R. 2013. Neuroprotective effect of kaempferol glycosides against brain injury and neuroinflammation by inhibiting the activation of NF- κ B and STAT3 in transient focal stroke. *PLoS One* **8**, 55839.
 35. Zaplatic, E., Bule, M., Shah, S. Z. A., Uddin, M. S. and Niaz, K. 2019. Molecular mechanisms underlying protective role of quercetin in attenuating Alzheimer's disease. *Life Sci.* **224**, 109-119.
 36. Zhang, S., Qi, Y., Xu, Y., Han, X., Peng, J., Liu, K. and Sun, C. K. 2013. Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation. *Neurochem. Int.* **63**, 522-532.
 37. Zhang, X., Wu, J. Z., Lin, Z. X., Yuan, Q. J., Li, Y. C., Liang, J. L., Zhan, J. Y., Xie, Y. L., Su, Z. R. and Liu, Y. H. 2019. Ameliorative effect of supercritical fluid extract of *Chrysanthemum indicum* Linné against D-galactose induced brain and liver injury in senescent mice *via* suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *J. Ethnopharmacol.* **234**, 44-56.

초록 : Flavonoids 및 그 배당체의 산화적 스트레스에 대한 신경교세포 보호 효과

김지현¹ · 김현영^{2*} · 조은주^{1*}

(¹부산대학교 식품영양학과, ²경남과학기술대학교 식품과학부)

뇌에서 과량의 reactive oxygen species (ROS) 생성에 의해 유발되는 산화적 스트레스는 알츠하이머 질환과 같은 신경퇴행성 질환의 원인으로 알려져 있다. 본 연구에서는 kaempferol, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin, quercetin-3-β-D-glucoside와 같은 flavonoid와 그 배당체의 H₂O₂ 유도 산화적 스트레스에 대한 C6 신경교세포 보호 효과를 확인하였다. H₂O₂만을 처리한 control군은 아무것도 처리하지 않은 normal군에 비해 세포 생존율 감소와 ROS 생성 증가를 통해 C6 신경교세포의 산화적 손상이 유도되었음을 확인하였다. 반면 4가지 flavonoid를 각각 처리한 군의 경우, H₂O₂를 처리한 control군에 비해 세포 생존율 증가와 ROS 생성 감소를 통해 산화적 손상 억제를 통한 신경교세포 보호 효과를 확인하였다. Flavonoid의 신경교세포 보호 작용 메커니즘을 규명하기 위해, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), and interleukine (IL)-1β 등의 염증 관련 단백질 발현을 측정하였다. H₂O₂를 처리한 control군은 normal군에 비해 iNOS, COX-2, IL-1β 단백질 발현 증가와 IκB-α 발현 감소를 통해 신경교세포의 산화적 손상으로 인한 염증 반응을 확인하였다. 반면, 4가지 flavonoid를 각각 처리한 군의 경우 iNOS, COX-2, IL-1β 단백질 발현 감소와 IκB-α 발현 증가를 나타내어, 염증 반응 개선을 통한 신경교세포 보호 효과를 확인하였다. 특히, quercetin과 그 배당체인 quercetin-3-β-D-glucoside를 처리한 군은 kaempferol과 그 배당체인 kaempferol-3-O-glucoside를 처리한 군에 비해 우수한 신경교세포 보호 효과를 나타내었다. 본 연구는 4가지 flavonoid가 신경교세포에서 산화적 스트레스 억제를 통해 신경퇴행성 질환을 예방 및 치료할 수 있을 것으로 사료된다.