

PC12와 BV2 세포에서 동충하초 추출물의 인지능력 개선 효과

최순희¹ · 승오탁² · 이명선^{1†}

^{1†}대전대학교 자연과학대학 뷰티건강관리학과 대학원

²중부대학교 한방건강관리학과

(2019년 6월 7일 접수: 2019년 6월 17일 수정: 2019년 6월 18일 채택)

Improving Effect to Cognitive Ability of *Cordyceps militaris* Extract in PC12 and BV2 cells

Soon-Hee Choi¹ · O-Tak Seung · Myung-Sun Lee^{1†}

^{1†}Department of beauty healthcare, Graduate School, Daejeon University

²Department of Oriental Health Care, Joongbu University

(Received June 7, 2019; Revised June 17, 2019; Accepted June 18, 2019)

요약 : 본 연구는 동충하초 추출물을 PC12 및 BV2 세포에서 인지능력 개선에 대한 효능을 평가하고자 하였다. 동충하초 추출물을 증류수로 추출하여 PC12 및 BV2 세포로 MTT 분석을 통해 세포 생존율을 확인하고 L-glutamate로 유도한 PC12 세포를 통해 세포 보호 효능과 아세틸콜린 함량 및 아세틸콜린에스테라제 활성을 평가하였다. 또한, LPS로 유도한 BV2 세포를 통해 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E2 (PGE2) 생성량 등의 항염증 효능을 측정하고 western blot 분석을 통해 NK- κ B, p38, JNK, caspase-3 등의 단백질 발현량을 확인하였다. 동충하초 추출물은 200 μ g/ml 농도를 제외하고 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다. L-glutamate로 유도한 PC12 세포에서 유의성있게 세포 보호 효능과 아세틸콜린 함량의 증가, 아세틸콜린에스테라제 활성 감소가 나타났다. 또한, 동충하초 추출물은 NO 및 PGE2 생성량과 NK- κ B, p38, JNK, caspase-3 등의 단백질 발현을 억제하였다. 이와 같은 결과는 동충하초 추출물이 인지능력에 대한 예방 및 개선 효능이 있음을 나타낸다. 따라서 동충하초 추출물은 인지능력 개선을 위한 새로운 천연 소재로 활용될 수 있다.

주제어 : 동충하초, 신경세포, 미세아교세포, 인지능력 개선, 천연 소재

Abstract : The aim of this study is to evaluate the efficacy of *cordyceps militaris* extracts for the improvement of cognitive dysfunction in PC12 and BV2 cells. *Cordyceps militaris* extracts was prepared by extracting with distilled water. Cell viability was assessed by MTT assay using PC12 cells and BV2 cells. Confirmed effects of L-glutamate induced cytotoxicity test, Acetylcholine (ACh) concentration, and Acetylcholinestase (AChE) activity in PC12 cells. Anti-inflammatory activities of *cordyceps militaris* extracts was measured through changes in the levels of nitric oxide (NO), and

[†]Corresponding author

(E-mail: leesun1460@hanmail.net)

prostaglandin E2 (PGE₂) on lipopolysaccharide(LPS)-induced BV2 cell. In addition, we measured the expression of NF- κ B, p38, JNK, and caspase-3 in western blot analysis. *Cordyceps militaris* extracts showed no cytotoxicity at the concentrations of 1, 10, and 100 μ g/ml except for the concentration of 200 μ g/ml. *Cordyceps militaris* extracts protected the cell and exhibited significant increases in the ACh concentration and a significant decrease in the AChE activity in L-glutamate induced PC12 cells. Moreover, *cordyceps militaris* extracts inhibited the productions NO, and PGE2 level and the protein expression of NF- κ B, p38, JNK, caspase-3 in LPS-induced BV2 cells. These results indicate that *cordyceps militaris* extracts possible prevented and improved cognitive dysfunction symptoms. Thus, *cordyceps militaris* extracts may be a novel natural material option for the improvement of cognitive dysfunction.

Keywords : *cordyceps militaris*, *neurons cells*, *microglia cells*, *improvement of cognitive dysfunction*, *herbal raw material*

1. 서론

의학 기술의 발달과 생활 수준이 향상됨에 따라 대한민국 65세 이상 인구수는 2010년 약 542만 명에서 2015년 약 656만 명으로 증가하였다 [1]. 이로 인해 노인성 질환에 대한 사회적 관심도는 매우 높아져 치매 (Dementia), 알츠하이머 (Alzheimer's disease) 등과 같은 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이와 같은 노인성 질환의 공통적인 특성은 인간의 고유한 뇌 기능인 기억력 및 집중력, 언어 구사 능력, 판단력, 지능 등의 인지능력 저하에서 비롯된 것으로 효과적인 인지능력 개선 효능을 가진 천연물 소재 탐색은 고령화 사회에 필수적이라 할 수 있다[2].

인지능력의 저하에 대한 원인으로는 뇌의 위축, 신경섬유의 다발성 병변 등이 각종 단백질과 미토콘드리아의 기능 상실과 caspase 활성화에 의한 뇌세포의 세포자멸사 기전(apoptosis mechanism)과 염증, 산화적 스트레스, 아세틸콜린 에스테라제(acetylcholinesterase, AChE)의 증가에 의한 것으로 알려져 있다[3,4].

이와 같은 인지능력 개선을 위해 현재 사용되는 대표적인 치료제로는 α -tocopherol, selegiline, NMDA-glutamate 수용억제제 (N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, NMDA antagonist), 아세틸콜린 효소억제제 (acetylcholinesterase inhibitor, AChEI) 등이 사용되어 지고 있으나, 단기적 효능만이 나타나거나 및 간 손상, 오심과 구토 등의 부작용이 보고되고 있어[5], 부작용의 위험성이 적고 효과적인 천연

연물을 활용한 소재를 찾고자 머위[6], 더덕[7], 섬애쑥[8], 비파엽[9], 산사[10], 복분자[11] 등이 효능이 다양한 연구를 통해 밝혀졌다.

본 연구에 사용한 동충하초(*Cordyceps Militaris*)는 겨울에 곤충의 체내에 서식하며 영양분을 흡수하고 여름에 숙주를 파괴시켜 곤충 밖으로 자실체가 자라나는 버섯 종류 중 하나로 맥각균목(clavicipitales), 맥각균과(calvicitaceae), 자낭균강(ascomycota)에 속하며 세계 각지에서 채집이 가능하다[12]. 동충하초의 대표적 성분인 cordycepin(3'-deoxyadenosine)이 면역력 증강 [13]과 항암[14], 항염증[15], 항균[16] 등에 효능이 보고되고 있으며, 동충하초 추출물은 국내 연구를 통해 항암[12], 지질대사[17], 파골세포[18], 천식[19], 당뇨[20] 등에 효능이 있다고 밝혀졌으나 아직 인지능력 개선에 관한 연구는 진행된 바가 없다.

이에 따라 본 연구에서는 신경세포 분화와 신경 분비가 용이한 PC12 세포 및 중추신경계 대식세포이자 미세아교세포(microglial cell)인 BV2 세포를 활용하여 신경세포 기능 장애 물질 (glutamate) 보호 및 acetylcholine (ACh) 함량, acetylcholinesterase (AChE) 활성, 항염증, 단백질 발현 등 인지능력과 관련된 다양한 인자를 ELISA 또는 western blot 기법을 통해 확인함으로써 동충하초 추출물이 인지능력 저하에 대한 예방과 개선 효능을 가진 새로운 천연 소재로서의 가능성을 과학적으로 검증하고 더 나아가 다른 질환에 응용할 수 있는 기초적 자료를 제공하고자 하였다. 효능 검증과 동시에 여러 분야에

신규 소재로서의 활용이 가능하도록 기초적 자료를 제공하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

국내산 동충하초(*Cordyceps Militaris* 이하, CM으로 표기) 분말은 청원농산(Korea)에서 구매하여 -20°C의 냉동고에 보관하며 실험에 이용하였다.

2.2. 시약 및 기기

시약은 Gel red (Sigma Co., U.S.A.), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS : Welgene, Korea), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), Lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), CCK-8 assay kit (Dojindo, Korea), Nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), Dimethyl sulfoxide (DMSO : Sigma Co., U.S.A.), Penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), Streptomycin (Hyclone Co., U.S.A.), Agarose (FMC Co., U.S.A.), Trypan blue (Sigma Co., U.S.A.), Choline/Acetylcholine Assay kit (abcam Co., U.S.A.), total RNA prep kit (Intronbio., Korea), Pro-prep protein Extraction Solution (Intronbio. Co., U.S.A.), Precision Plus Protein Dual color Standards (BIO-RAD Co., Japan), LDS Sample Buffer (4x) (Intronbio. Co., U.S.A.), 30% Acrylamide/Bis Solution 29:1(3.3%C) (BIO-RAD Co., Japan), Skim Milk (BD Co., France), NF-kappa-B Rabbit mAb (Cell Signaling Co., U.S.A.), Caspace-3 Rabbit mAb (Cell Signaling Co., U.S.A.), Caspace-9 Rabbit mAb (Cell Signaling Co., U.S.A.), JNK Rabbit mAb (Cell Signaling Co., U.S.A.), Beta-actin Rabbit mAb (Cell Signaling Co., U.S.A.), Pierce BCA Proein Assay Kit (Thermo Co., U.S.A.), Anti-rabbit IgG (Cell Signaling Co., U.S.A.), TEMED (BIO-RAD Co., Japan) 등을 사용하였다. 또한, 기기는 CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), Clean bench (Vision scientific Co., Korea), ELISA

reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), Light Microscope (Carl Zeiss, Co., Germany), Fusion-SL (Vilber Lourmat., Deutschland) 등을 사용하였다.

2.3. 추출물 제조

동충하초 50 g에 증류수 800 ml을 넣고 120°C에서 3시간 동안 열수추출 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하고 초저온 냉동고(-80°C)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2.4. 세포 배양

실험에 사용된 PC12 세포는 10% 열비활성화 혈청(heat-inactivated horse serum), 5% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 함유된 RPMI 배지에서 배양하였다. PC12 세포에 100 ng/ml의 7S nerve growth factor를 9일 동안 처리하여 세포를 분화시켰다. 실험 하루 전에 세포를 1% FBS가 포함되어 있는 RPMI 배지로 옮겨 배양하고 실험을 진행하였다.

BV2 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 ml을 넣어 부유시켰다. 100 mm dish에 9 ml의 배지를 넣고, 세포를 부유시켜 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 배양하고 실험을 진행하였다.

2.5. 세포 독성 측정

PC12와 BV2 세포는 96 well plate에 1.5×10⁵ cells/well로 분주하여 세포배양기에서 24시간 처리하였다. 실험 시작 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, CM 추출물을 각각 1, 10, 100, 200 (µg/ml)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. PC12 세포는 배양 후 10 µl의 CCK-8 용액을 첨가하여 30분간 반응시켜 10분간 원심 분리하고 PBS로 세척하였다. 이후 배지를 제거한 다음 100 µl dimethyl sulfoxide (DMSO)를 넣어 formazan 결정체를 용해하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다. BV2 세포는 배양 후 배양 후 10 µl의 CCK-8 용액을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

2.6. L-glutamate로 유도된 신경세포 보호

효능 측정

PC12 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주하여 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 실험 시작 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, 추출물을 각각 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도와 L-glutamate를 20 mM의 농도로 처리하여 독성을 유발한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl 의 CCK-8 용액을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 반응 후 10분간 원심 분리하고, PBS로 세척하였다. 배지를 제거한 다음 100 μl DMSO를 넣어 formazan 결정체를 용해시킨 후 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

2.7. Acetylcholine (ACh) 및

Acetylcholinesterase (AChE) 활성 측정

PC12 세포를 12 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주하여 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 실험 시작 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, CM 추출물을 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도에 L-glutamate를 20 mM의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 원심 분리한 상청액 50 μl 와 1% hydroxylamine 50 μl 를 혼합하고 FeCl_3 (10% in 0.1 N HCl) 500 μl 를 첨가한 후 540 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

AChE 측정은 96 well plate에 원심 분리한 상청액을 50 μl 씩 분주하여 50 μl 의 standard와 Colorimetric Reaction Mix (choline + AChE) 50 μl 씩 넣은 뒤 30분간 반응을 시킨 후 570 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

2.8. Nitric oxide(NO) 생성량

BV2 세포를 96 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 CM 추출물을 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도에 LPS를 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 동시에 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후 Nitric oxide detection kit의 N1 buffer 50 μl 를 각 well에 처리하여 10분간 상온에서 반응시키고 N2 buffer 50 μl 를 추가로 처리하여 10분간 반응시켰다. 반응 후 540 nm에서 흡광도의 변화를 측정하고 대조군에 대한 NO 생성량을 백분율로 표시하였다.

2.9. Prostaglandin E2 (PGE₂) 생성량 측정

BV2 세포를 96 well plate에 1.5×10^5 cells/well

로 분주하여 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 CM 추출물을 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도에 LPS를 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 동시에 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후 상청액 500 μl 를 획득하여 원심 분리를 진행하고 96 well plate에 150 μl 씩 분주하여 PGE₂ mouse monoclonal antibody를 50 μl 씩 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후, PGE₂ conjugate 50 μl 를 첨가하여 상온에서 2시간 반응하고 세척완충제 (Wash buffer) 400 μl 를 이용하여 세척 한 후, substrate solution 200 μl 를 첨가하여 빛을 차단하고 30분 반응시켰다. 540 nm에서 흡광도의 변화를 측정하기 전 stop solution 50 μl 를 첨가하여 반응을 멈추었다.

2.10. 단백질 발현 측정

BV2 세포를 96 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 CM 추출물을 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도에 LPS를 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 동시에 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 원심 분리하여 모은 세포를 PBS로 2회 세척하고, cell lysis buffer로 cell을 harvest하여 얼음에서 30분간 반응시킨다. 반응 후 다시 원심 분리하여 상청액으로 단백질 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링하여 LDS Sample Buffer (4x)와 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 12% SDS-PAGE에 전기영동 한 후, 5% skim milk로 1h blocking 하였다. NF-kappa-B Rabbit mAb, JUN Rabbit mAb, p38 Rabbit mAb, caspase-3 Rabbit mAb, caspase-9 Rabbit mAb, β -actin Rabbit mAb, anti-rabbit IgG을 ECL detection 용액으로 확인하였다.

2.11. 통계처리

모든 실험결과는 3회 반복 측정하였으며 평균 값 \pm 표준편차(mean \pm S.D)로 표시하였다. 대조군 대비 실험군간의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을 이용하였고, Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다(*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포독성

PC12 및 BV2 세포에서 CM 추출물의 세포 생존율을 확인한 결과, CM 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서는 대조군에 비해 99% 이상의 생존율이 확인되었으나 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 PC12 세포는 75%, BV2 세포에서는 88%의 생존율이 나타나 독성이 확인되었다(Fig. 1A, B). 이와 같은 결과를 바탕으로 이후의 모든 실험은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도까지 진행하였다.

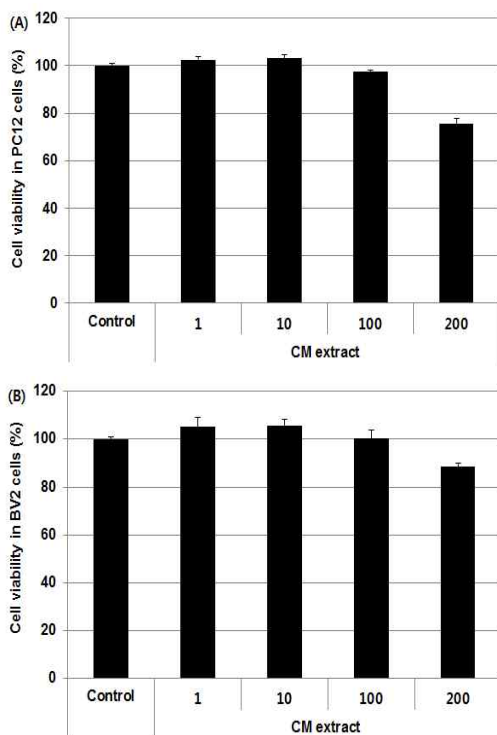


Fig. 1. Effects of cell viability on CM extracts in PC12 (A) and BV2 (B) cells. Each cell was treated with 1, 10, 100, and 200 ($\mu\text{g/ml}$) of CM extract for 24hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D.

3.2. L-glutamate로 유도된 PC12 신경세포 보호 효과

Glutamate는 흥분성 신경 전달 물질로써 신경

세포의 성장과 이동을 조절하고, 다양한 뇌 기능 수행에 있어 필수적인 요소로 작용하지만, 뇌 속의 과다한 생성과 축적은 뇌 신경 세포벽의 지방 산화를 촉진하여 뇌 신경의 세포 자멸을 통해 치매와 알츠하이머와 같은 인지능력 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다[21-23].

L-glutamate로 유도된 PC12 신경세포에서 CM 추출물의 보호 효능을 확인한 결과, CM 추출물은 L-glutamate만을 처리한 군에 비해 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 유의성 있는 ($p < 0.001$) 증가가 나타나 신경세포 보호 효능이 확인되었다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 CM 추출물이 glutamate의 과생성에 의한 세포 자멸을 보호할 수 있으며, 이를 통해 인지능력 저하를 미연에 방어할 수 있는 예방제로서의 역할이 가능한 것으로 판단된다. 따라서 고령화 사회로 진행되고 있는 현시점에서 인지능력 저하를 예방할 수 있는 하나의 건강기능식품 또는 의약품의 원료로 활용될 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

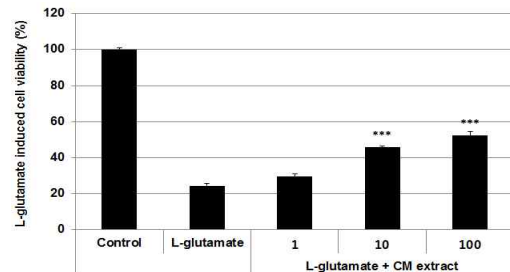


Fig. 2. Effects of L-glutamate-induced cell viability on CM extracts in PC12 cells. Cells were treated with 1, 10, and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of CM extract in the presence of 20 mM L-glutamate for 24hr. Cell viability was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, *** : $p < 0.001$ vs L-glutamate group)

3.3. 아세틸콜린 함량 및 아세틸콜린에스테라제 활성

아세틸콜린(ACh)은 acetyl CoA와 choline acetyltransferase (ChAT)의 효소 작용으로 합성되며, 아세틸콜린에스테라제의 작용으로 acetate와 choline으로 분해된다[24]. ACh는 신경세포에서 발견되는 신경전달물질로써 뇌의 신경 전달물

질계 중 가장 중요한 시스템 중 하나인 콜린성 시스템을 통해 중추신경계의 학습과 기억, 분화를 담당하게 된다[24]. 이는 대표적인 중추신경계 이상 질환인 알츠하이머 환자에게서 ACh 함량이 현저하게 감소되어 있어 인지능력 저하에 대한 개선 시 ACh 함량을 높여주는 연구가 중요한 지표라고 할 수 있다[25].

아세틸콜린에스테라제(AChE)의 증가는 ACh 함량 감소와 마찬가지로 인지능력 저하와 관련이 깊다. AChE는 아세틸콜린의 분해 시 콜린작용성 전달(cholinergic transmission)을 저해하고 인지 능력과 관련된 다양한 질환의 발병에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[24,25]. 또한, AChE 활성의 증가는 체내 신경전달이 저하됨으로써 기억력과 학습 능력이 현저히 떨어트리는 중요한 지표로 현대 의학에서는 AChE 억제제를 통한 ACh 함량을 증가시키는 방법을 활용하고 있다[26].

본 연구에서 L-glutamate로 유도된 PC12 신경세포에서 CM 추출물의 아세틸콜린 함량 및 아세틸콜린에스테라제 활성을 확인한 결과, CM 추출물은 L-glutamate만을 처리한 군에 비해 아세틸콜린 함량은 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 농도에서, 아세틸콜린에스테라제는 모든 농도에서 유의성 있는 p 값 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)의 증가와 감소가 각각 확인되었다(Fig. 3A, B). 이와 같은 결과는 앞서 언급한 알츠하이머 질환에서 ACh 함량이 감소한다

는 보고[25]와 치료방법을 고려하였을 때, CM 추출물은 ACh 함량 감소와 AChE 활성 억제 등의 길항작용을 통해 알츠하이머를 비롯한 인지능력 개선 효능에 활용될 수 있음을 시사하고 있다.

3.4. Nitric oxide 및 Prostaglandin E2 생성량

Microglia cell인 BV2 세포는 뇌의 염증과 퇴행성 변화에서 중요한 역할을 하는 중추신경계 대식세포이며, 염증 발생 시 활성화된 microglia cell은 염증 매개물질인 prostaglandin과 nitric oxide 등을 억제하게 된다[27]. 특히, LPS와 같은 내독소가 중추신경계에 침투하게 되면 인지능력 뿐만 아니라 바이러스성 뇌염으로 인한 기억력 감퇴와 언어 능력의 저하가 발생하게 되는데 BV2 세포는 이와 같은 질환 방어에 있어 중요한 세포라 할 수 있다.

NO는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성되는 2차 신호 전달 물질로 뇌 기능과 신경보호, 신경변성 등에 연관되어 있다[28]. 또한, PGE₂의 증가는 급성 염증 단계에서 효과적이고 신속하게 감소가 되지 않을 경우, 염증 초기 단계를 만성단계로 유도하게 되므로 PGE₂는 염증 단계에서 가장 중요하다고 할 수 있다. 특히, 중추신경계에서 염증이 만성으로 진행될 경우 뇌세포 손상을 바탕으로 신경병, 말초신경, 척수 및 대뇌피질의 변성을 통해 신체에

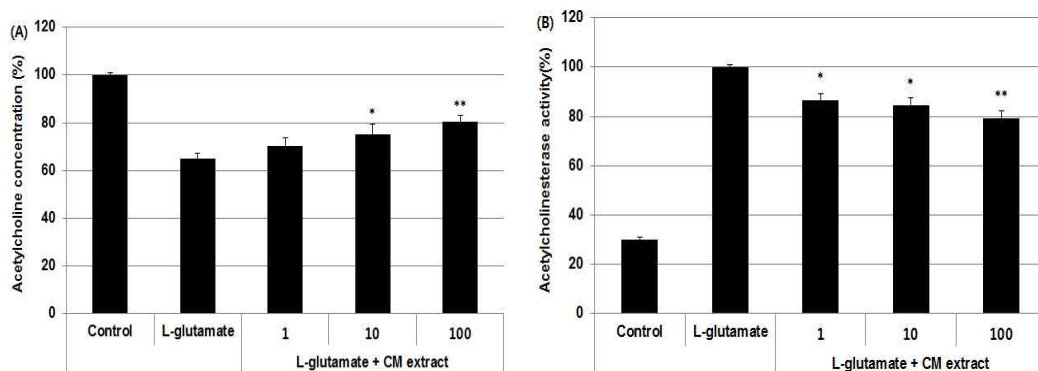


Fig. 3. Effects of L-glutamate-induced acetylcholine concentration(A), and Acetylcholinesterase activity(B) on CM extracts in PC12 cells. Cells were treated with 1, 10, and 100 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of CM extract in the presence of 20 mM L-glutamate for 24hr. Acetylcholine concentration and acetylcholinesterase activity were measured using an ELISA assay. The results were expressed as mean \pm S.D. (significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ vs L-glutamate group)

심각한 손상을 초래하게 되므로 중추신경계의 효과적인 염증 제거는 인지능력 개선과 예방에 필수적이다.

본 연구에서 LPS로 유도된 BV2 세포에서 CM 추출물의 NO 및 PGE₂ 생성량을 확인한 결과, CM 추출물은 LPS만을 처리한 군에 비해 NO 생성량은 모든 농도에서, PGE₂ 생성량은 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 유의성 있는 p 값 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)의 감소가 확인되었다(Fig. 4A, B). 이와 같은 결과는 CM 추출물이 LPS에 의해 과생성된 NO 및 PGE₂ 생성량을 효과적으로 감소시킴에 따라 중추신경계에 바이러스 침투로 인한 염증성 뇌 신경 손상이 발생할 경우, 대식세포인 BV2 세포를 통해 효과적으로 감소시킬 수 있으며, 동시에 만성 염증 단계로 진행되는 것을 방지할 수 있음을 보여주고 있다.

3.4. 단백질 발현량

모든 동물 세포 유형에서 발견되는 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)는 microglia 세포에서 염증 신호체계에서 염증 물질과 염증성 사이토카인의 합성을 유도하고 염증에 따른 뇌 조직과 신경세포를 손상시켜 시냅스와 학습, 기억 등의 과정에 연관되는 것으로 알려져 있다[29,30]. 특히, 다양한 연구를 통해 신경계에서 성장인자(Brain-derived neurotrophic factor; BDNF, Nerve

growth factor; NGF) 및 glutamate와 같은 시냅스 전달에 의해 활성화되면 NF- κ B가 시냅스 가소성을 변조시킴으로써 부분적으로 학습 및 기억을 조절하게 된다고 보고되어 뇌 세포에서 NF- κ B의 역할은 매우 중요하다고 할 수 있다 [31,32].

p38 mitogen-activated protein kinase (p38)과 c-JUN N-terminal kinases (JNK)는 활성산소종, 염증 신호, 단백질 합성 억제, LPS 등과 같은 다양한 스트레스 자극에 반응하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)의 한 종류로 미토콘드리아에 존재하거나 핵에서 작용하는 수많은 단백질의 활성 변화, T 세포 분화 및 세포 사멸 경로 등에서 역할이 수행되어[33], p38 저해제는 자가 면역질환과 염증 질환에 대한 치료제로 활용되고 JNK의 활성화는 포유류와 곤충에서 염증 반응에 기여하는 것으로 알려져 있다 [34]. 또한, cysteine계의 단백질 분해 효소인 caspase는 알츠하이머와 같은 신경세포 자멸 과정에서 아밀로이드 베타 4A 전구체 단백질(amyloid-beta 4A precursor protein) 절단에 관여하는 우선적 단백질인 caspase-3가 조절되지 않아 중추신경계 세포를 무분별하게 살해하게 되어 인지능력을 떨어트리게 되므로 인지능력 저하시 중추신경계와 관련된 다양한 매개체의 효과적인 조절은 매우 중요하다고 할 수 있다.

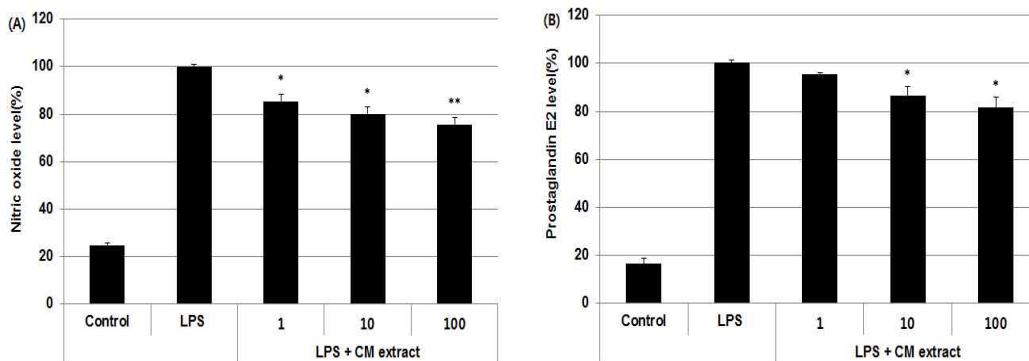


Fig. 4. Effects of LPS-induced nitric oxide (A), and prostaglandin E2 (B) level on CM extracts in BV2 cells. Cells were treated with 1, 10, and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of CM extract in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS for 24hr. Nitric oxide and Prostaglandin E2 level were measured using an ELISA assay. The results were expressed as mean \pm S.D. (Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ vs LPS group).

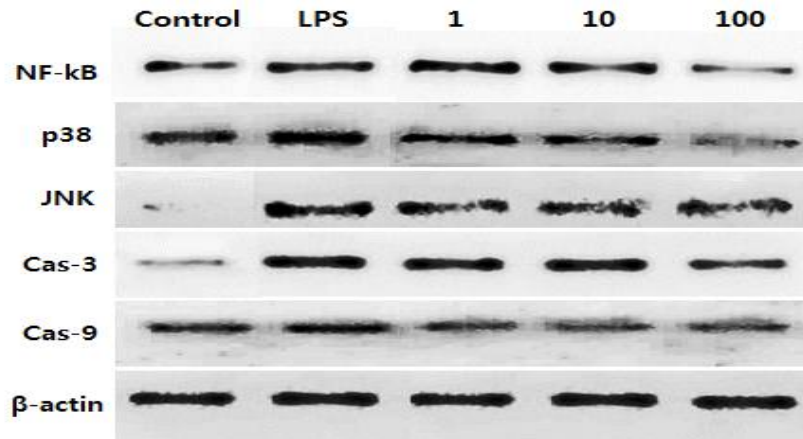


Fig. 5. Effects of LPS-induced NK- κ B, p38, JNK, and caspase-3 protein expression on CM extracts in BV2 cells. Cells treated with 1, 10, and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of CM extracts in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS for 24hr. Solubilized total protein (20 μg) was electrophoresed in 12% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membrane.

본 연구에서 LPS로 유도된 BV2 세포에서 CM 추출물의 NF- κ B 및 p38, JNK, caspase-3 등과 같은 단백질 발현량을 확인한 결과, CM 추출물은 LPS만을 처리한 군에 비해 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 단백질 발현량 감소가 확인되었다(Fig. 5). 이와 같은 결과는 CM 추출물이 중추신경계에 발생하는 염증 과정을 NF- κ B, p38과 같은 매개체 감소를 통해 해소하고 JNK 감소를 통해 T 세포의 분화로 염증 단계 회복을 p38 저해제와 유사한 효능을 가질 수 있으며, 무분별한 세포사멸로 인한 인지능력 저하 역시 방지할 수 있는 효과적인 천연물임을 NK- κ B, p38, JNK, caspase-3 등 관련 매개체의 효능 결과가 부합됨으로써 뒷받침하고 있다.

4. 결론

본 연구는 PC12 및 BV2 세포에서 동충하초 추출물에 대한 인지능력 개선 효과를 확인하기 위해 세포독성 및 관련 인자를 확인한 결과는 다음과 같으며, 본 결과를 바탕으로 인지능력 저하에 대한 예방과 개선 효능을 가진 새로운 천연소재로서 활용될 수 있다.

1. 동충하초 추출물은 PC12 및 BV2 세포의 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 독성이 나타났다.
2. 동충하초 추출물은 PC12 세포의 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 신경세포 보호 효과가 확인되었으며, 아세틸콜린 함량은 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서, 아세틸콜린에스테라제는 모든 농도에서 유의성 있는 증가와 감소가 각각 확인되었다.
3. 동충하초 추출물은 BV2 세포의 모든 농도에서 NO 생성량이, PGE₂ 생성량은 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 유의성 있는 감소가 확인되었다.
4. 동충하초 추출물은 BV2 세포의 NF- κ B 및 p38, JNK, caspase-3 등과 같은 단백질 발현량을 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 감소가 확인되었다.

References

1. Korean Statistical Information Service, 2017. Available from : URL : http://kosis.kr/statisticsList/statisticsList_01List.jsp?vwcd=MT_ZTITLE&parentId=D#SubCont.
2. T. Y. Jung, W. C. Jeong, J. H. Park, "Therapeutic Potential of Jeongjihwan for the Prevention and Treatment of Amnesia." *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, Vol.25, No.1, pp. 37-47, (2011).
3. J. L. Cummings, M. Mega, K. Gray, S. Rosenberg-Thompson, D. A. Carusi, J. Gornbein, "The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia", *Neurology*, Vol.44, No.12, pp. 2308-2014, (1994).
4. G. Binetti, M. S. Mega, E. Magni, A. Padovani, L. Rozzini, A. Bianchetti, M. Trabucchi, J. L. Cummings, "Behavioral disorders in Alzheimer disease: a transcultural perspective", *Arch Neurol*, Vol.55, No.4, pp. 539-544, (1998).
5. J. H. Kim, Q. Wang, J. M. Choi, S. Lee, E. J. Cho, "Protective role of caffeic acid in an A β 25-35-induced Alzheimer's disease model", *Nutrition research and practice*, Vol.9, No.5, pp. 480-488, (2015).
6. Q. Wang, A. Y. Lee, J. M. Choi, D. G. Lee, H. Y. Kim, S. H. Lee, E. J. Cho, "In vitro radical scavenging effect and neuroprotective activity from oxidative stress of *Petasites japonicus*", *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol.45, No.2, pp. 147-153, (2014).
7. B. R. Yun, J. W. Lee, M. R. Eom, H. J. Ko, H. Y. Lee, D. S. Park, H. C. Chung, C. J. Ma, "Effect of Steamed *Codonopsis lanceolata* on Spatial Learning and Memory in Mice", *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol.45, No.1, pp. 48-54, (2014).
8. G. J. Ha, D. S. Lee, T. W. Seung, C. H. Park, S. K. Park, D. E. Jin, N. K. Kim, H. Y. Shin, H. J. Heo, "Anti-amnesic and Neuroprotective Effects of *Artemisia argyi* H.(Seomae mugwort) Extracts", *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.47, No.3, pp. 380-387, (2015).
9. D. Bae, J. Kim, J. R. Na, Y. Kim, J. Y. Lee, S. Kim, "Anti-amnesic Effect of *Eriobotrya japonica* Leaf Extract on Scopolamine-induced Memory Impairment in Rats", *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol.43, No.6, pp. 799-806, (2014).
10. S. B. Wang, E. M. Ahn, J. W. Jung, "The fruits of *Crataegus pinnatifida* Bunge ameliorates learning and memory impairments induced by scopolamine", *Kor. J. Herbology*, Vol.24, No.4, pp. 65-71, (2009).
11. M. R. Choi, M. Y. Lee, J. E. Hong, J. Y. Lee, J. W. Chun, T. H. Kim, H. K. Shin, E. J. Kim, "The aqueous extract of *Rubus coreanus* Miquel improves scopolamine-induced memory impairment in ICR mice", *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol. 41, No.2, pp. 192-196, (2012).
12. J. W. Jeong, Y. H. Choi, "Anti-cancer Properties and Relevant Mechanisms of Cordycepin, an Active Ingredient of the Insect Fungus *Cordyceps* spp", *Journal of Life Science*, Vol. 25, No.5, pp. 607-614, (2015).
13. H. M. Lee, Y. J. Lee, T. S. Park, "Tumor growth inhibitory and immunomodulatory activities of *Cordyceps militaris* water extracts in ICR mice bearing sarcoma-180 solid tumor", *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol.33, No.1, pp. 59-65, (2004).
14. J. W. Jeong, C. Y. Jin, C. Park, S. H. Hong, G. Y. Kim, Y. K. Jeong, J. D. Lee, Y. H. Yoo, Y. H. Choi, "Induction of apoptosis by cordycepin via reactive oxygen species generation in human leukemia cells", *In Vitro Toxicol*, Vol.25, No.4, pp. 817-824, (2011).
15. J. W. Jeong, C. Y. Jin, G. Y. Kim, J. D. Lee, C. Park, G. D. Kim, W. J. Kim, W.

- K. Jung, S. K. Seo, I. W. Choi, Y. H. Choi, "Anti-inflammatory effects of cordycepin via suppression of inflammatory mediators in BV2 microglial cells", *Int Immunopharmacol*, Vol.10, No.12, pp. 1580-1586, (2010).
16. J. W. Jeong, C. Y. Jin, C. Park, M. H. Han, G. Y. Kim, S. K. Moon, C. G. Kim, Y. K. Jeong, W. J. Kim, J. D. Lee, Y. H. Choi, "Inhibition of migration and invasion of LNCaP human prostate carcinoma cells by cordycepin through inactivation of Akt". *Int J Cancer Oncol*, Vol.40, No.5, pp. 1697-1704, (2012).
 17. M. S. Lee, B. S. Koo, "Effects of Cordyceps militaris extract powder on plasma lipids and glucose in rats", *J. Korean Soc. Food Cult.*, Vol.19, No.2, pp. 217-222, (2004).
 18. K. H. Choi, J. E. Yoo, G. S. Hwang, D. Y. Yoo, "Effects of Cordyceps militaris (CM) on osteoclastogenesis and gene expression", *Obstet Gynecol Sci*, Vol.25, No.3, pp. 16-26, (2012).
 19. H. S. Jeong, J. R. Lee, S. C. Kim, "Effects of Cordyceps sinensis Water Extract on the Cytokine in Ovalbumin-induced Asthma Mouse", *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, Vol. 20, No.4, pp. 973-979, (2006).
 20. D. S. Seo, J. K. Kang, M. H. Jeong, M. Kwon, C. B. Park, "Anti-diabetic Effects of Isaria tenuipes in OLETF Rats as an Animal Model of Diabetes Mellitus Type II", *J. Food Hyg. Saf.*, Vol.28, No.2, pp. 152-157, (2013).
 21. M. F. Beal, "Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases". *FASEB J*, Vol.6, No.15, pp. 3338-3344, (1992).
 22. D. W. Choi, "Excitotoxic cell death". *J. Neurobiol*, Vol.23, No.9, pp. 1261-1276, (1992).
 23. M. Naito, H. Umegaki, A. Iguchi, "Protective effects of probucol against glutamate-induced cytotoxicity in neuronal cell line PC12", *Neurosci. lett*, Vol.186, No.2, pp. 211-213, (1995).
 24. D. J. Choe, H. Y. Ahn, Y. W. Kim, T. H. Kim, M. D. Kim, Y. S. Cho, "Improvement Effect of Stachys sieboldii MIQ. According to Mixing Ratio of Calcium on Memory Impairment in Scopolamine-induced Dementia Rats", *Journal of Life Science*, Vol.26, No.7, pp. 812-818, (2016).
 25. P. Davies, A. J. Maloney, "Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease", *The Lancet*, Vol.308, No.8000, p. 1403, (1976).
 26. V. N. Talesa, "Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease", *Mech Ageing Dev*, Vol.122, No.16, pp. 1961-1969, (2011).
 27. I. H. Hur, S. Y. Sim, K. J. KIM, "Anti-inflammatory effect of various solvent extract from Atractylodes japonica on Lipopolysaccharide-induced Inflammation in BV2 cells", *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*, Vol.20, No.2, pp. 36-46, (2007).
 28. C. H. Hong, S. K. Hur, O. J. Oh, S. S. Kim, K. A. Nam, S. K. Lee. "Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells", *J Ethnopharmacol*, Vol.83, No.1, pp. 153-159, (2002).
 29. T. D. Gilmore, "Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives", *Oncogene*, Vol.25, No.51, p. 6680, (2006).
 30. T. D. Gilmore, "The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction", *Oncogene*, Vol. 18, No.49, pp. 6842-6844, (1999).
 31. M. K. Meffert, J. M. Chang, B. J. Wiltgen, M. S. Fanselow, D. Baltimore, "NF- κ B functions in synaptic signaling and behavior", *Nature neuroscience*, Vol.6, No.10, p. 1072, (2003).
 32. A. Zaheer, M. A. Yorek, R. Lim, "Effects of glia maturation factor overexpression in

- primary astrocytes on MAP kinase activation, transcription factor activation, and neurotrophin secretion”, *Neurochemical research*, Vol.26, No.12, pp. 1293–1299, (2001).
33. H. Sellou, T. Lebeaupin, C. Chapuis, R. Smith, A. Hegele, H. R. Singh, M. Kozłowski, S. Bultmann, A. G. Ladurner, G. Timinszky, S. Huet, “The poly (ADP-ribose)-dependent chromatin remodeler Alc1 induces local chromatin relaxation upon DNA damage”, *Molecular biology of the cell*, Vol. 27, No.24, pp. 3791–3799, (2016).
34. U. Oltmanns, R. Issa, M. B. Sukkar, M. John, K. F. Chung, “Role of c-jun N-terminal kinase in the induced release of GM-CSF, RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells”, *Br J Clin Pharmacol*, Vol.139, No.6, pp. 1228–1234, (2003).