

1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-β-D-glucose가 인간 유래 신경모세포주인 SK-N-SH세포의 인지기능 표지자에 미치는 영향

윤현석¹ · 박소연¹ · 김윤희^{1,*}
¹대구대학교 식품영양학과

Effect of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose on markers of cognitive function in human neuroblastoma SK-N-SH cell line

Hyeon Seok Yoon¹, So Yeon Park¹, and Yoon Hee Kim^{1,*}
¹Department of Food and Nutrition, Daegu University

Abstract Cognitive impairment and Alzheimer's disease are serious social problems associated with the rising elderly population in Korea. 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-β-D-glucopyranose (PGG) is a gallotannin isolated from medicinal plants such as *Rhus chinensis*. This study was performed to evaluate the effect of PGG on biomarkers related to cognitive function in human neuroblastoma SK-N-SH cells. Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity is considered to be one of the main therapeutic strategies. PGG inhibited AChE activity in the test tube as well as in SK-N-SH cells. In addition, PGG induced protein and mRNA expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which is a mammalian neurotrophin that plays major roles in the development, maintenance, repair, and survival of neuronal populations. As one of the underlying molecular mechanisms that induce BDNF expression, PGG induced the activation of Ca²⁺/calmodulin (CaM)-dependent protein kinase II (CaMKII)-cAMP response element binding protein (CREB) pathway. In conclusion, PGG may be an useful material for improving cognitive function.

Keywords: penta galloyl glucose, tannin, acetylcholinesterase, brain-derived neurotrophic factor, cognitive function

서 론

통계청 보도자료에 따르면 우리나라는 급속한 고령화로 인하여 2020년 65세 이상 고령인구가 15.7%로, 2025년 20.3%, 2060년 43.9%가 될 것으로 예상하였다(Statistics Korea, 2020). 이러한 인구의 고령화에 따른 노인 인구 증가로 최근 10년간 치매 수진자수는 2009년 대비 4배, 치매 전 단계인 경도인지장애 수진자수는 19배로 급증하였다(Health insurance review & assessment service, 2020).

나이가 들어감에 따라 특히 인지와 관련된 뇌의 용적이 감소하는 등 뇌 기능의 장애가 초래되며(Bruno 등, 2019), 이러한 인지행동의 변화와 기억의 손실은 치매의 주요 증상이다(Abhijit 등, 2017). 치매환자들에게 donepezil과 choline alfoscerate 등과 같은 약물이 처방되고 있으나(Whang과 Park, 2019; Knight 등, 2018), 현재 치료방법은 주로 치매와 관련된 인지 손상을 감소시키는 일시적인 치료를 제공함으로써 증상 완화에 초점을 맞추고 있다(Abhijit 등, 2017). 치매는 예방이 중요한 만큼 인지기능 향상에 도움을 줄 수 있는 기능성 소재 탐색에 대한 연구가 필요하다.

한편, 치매의 치료제로 사용되고 있는 donepezil과 같은 약물의 작용 기전은 acetylcholinesterase (AChE)를 억제하는 것이다(Abhijit 등, 2017; Kandiah 등, 2017). AChE 저해제는 기억과 학습에 중추적인 역할을 담당하는 신경전달물질인 acetylcholine (ACh)의 분해를 억제하고, 뇌에서 AChE 수준을 증가하며 콜린작용성전달(cholinergic transmission)을 증가시켜 인지기능에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Briggs 등, 2016; Kandiah 등, 2017). 따라서 AChE 억제 활성을 측정하는 것은 치매치료제 개발에 있어서 중요한 치료 전략으로 간주된다.

또한, 인지기능 감소는 노화하는 뇌에서 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)와 같은 신경영양성인자(neurotrophic factor)의 변화와 관련이 있다. BDNF와 같은 신경영양성인자는 뇌 기능의 발달, 분화, 유지, 가소성을 유지하는데 있어 중요한 역할을 하는 성장인자로서 신경의 생존, 축삭 성장, 시냅스 가소성 등의 조절자 역할을 한다(Barbacid, 1995; Corpuz 등, 2019). 또한, 우울증, 조울증, 조현병과 같은 정신질환이나 알츠하이머성 치매, 파킨슨 병, 뇌전증 등 신경퇴행성 질환을 가진 환자의 혈액과 뇌에서 BDNF 농도가 낮다는 것이 알려져 있어(Chen 등 2017), BDNF는 정신질환이나 신경퇴행성 질환과 같은 병리적 상태의 평가나 치료 효과를 평가하는 생물학적 표지자이다(Bruno 등, 2019). cAMP response element binding protein (CREB)는 BDNF를 비롯한 뉴런 생존과 인지에 관련된 다양한 유전자의 발현을 유도하는 전사인자이며(Corpuz 등, 2019), Ca²⁺/calmodulin (CaM)-dependent protein kinase II (CaMKII)는 CREB의 상위 기전으로 뇌에 풍부하며 다양한 기질에 특이성을 나타내는 효소로 신경세포의 생존 및 사멸 조절에 관여한다(Araki 등, 2020). 신경영양성인자인

*Corresponding author: Yoon Hee Kim, Department of Food and Nutrition, College of Engineering, Daegu University, Gyeongbuk 38453, Korea
Tel: +82-53-850-6834
Fax: +82-53-850-6839
E-mail: kimyh0128@daegu.ac.kr
Received September 10, 2021; revised November 2, 2021; accepted November 3, 2021

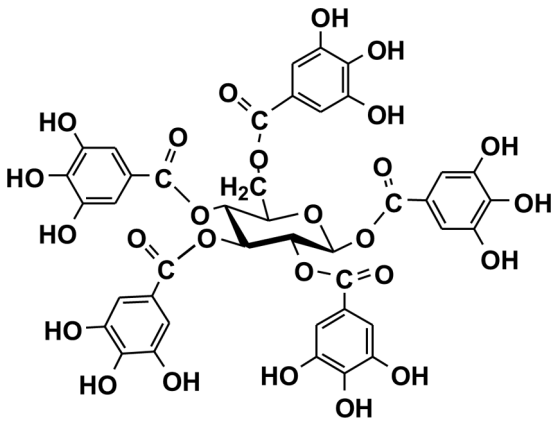


Fig. 1. Chemical structure of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose.

BDNF의 발현과 이를 유도하는 신호전달체계에 대한 연구는 인지기능 개선을 위한 치료 전략일 수 있다.

본 연구팀에서 관심을 가지고 있는 물질인 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose (PGG)는 붉나무(*Rhus chinensis*), 모란(*Paeonia suffruticosa*)과 같은 식물에 포함된 gallotannin 성분으로 glucose의 1, 2, 3, 4, 6번 탄소에 galloyl기가 결합된 구조이다(Fig. 1). Ren 등(2006)의 연구에 따르면 glucose의 1, 2, 3, 4번 위치에 결합된 galloyl기가 항당뇨효과에 있어서 중요하다고 보고하였다. 인지능이나 신경계질환에 대해 현재까지 알려진 PGG의 생리활성으로는 소교세포인 BV-2 microglia 세포에서 항염증 효과(Mendonca 등, 2017), amyloid beta 단백질의 침착 억제 효과(Fujiwara 등, 2009), beta-secretase 억제효과(Lee 등, 2005b)가 보고되었으나 BDNF 발현이나 AChE 억제효과와 같은 인지기능과 관련된 지표들에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 PGG가 인간 유래 신경모세포종 세포주인 SK-N-SH 세포에서 인지기능과 관련된 지표들에 미치는 영향에 대해 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

세포배양에 사용되는 fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, 0.5% Trypsin-EDTA는 Hyclone (Logan, UT, USA)에서, Eagle's minimum essential medium (EMEM)는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구매하여 사용하였다. Acetylcholinesterase assay kit와 western blot 분석에 사용한 일차 항체 anti-p-CaMKII, anti-CaMKII, anti-p-CREB, anti-CREB는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. Quanti-Max™ WST-8 Cell Viability Assay Kit는 BIOMAX (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 PGG와 donepezil hydrochloride는 Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA)로부터 구매하였다. 일차 항체 중 anti-BDNF와 anti-β-actin는 Solarbio Science and Technology Co., Ltd. (Beijing, China)에서 구매하였다. 이차 항체인 anti-rabbit IgG-HRP, anti-mouse IgG-HRP는 Cell signaling technology (Danvers, MA, USA)에서 구매하여 사용하였다. RNA PrimeScript™ RT Reagent Kit는 Takara (Tokyo, Japan)에서 구매하였다. LightCycler® 480 SYBR Green 1 Master Mix는 Roche Diagnostics (Mannheim, Germany)에서 구매하였다.

세포주 및 세포배양

인간 유래 신경모세포종 세포주인 SK-N-SH 세포는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 함유하는 EMEM 배지에서 2~3일에 한번씩 계대배양하며 실험에 사용하였다.

시험관에서 acetylcholine esterase 활성 측정

PGG가 acetylcholinesterase 효소 활성에 미치는 영향은 acetylcholinesterase assay kit (Abcam)로 측정하였다. 96 well plate에 500 mU/mL acetylcholinesterase (AChE)용액 50 μL에 PGG의 처리 최종 농도가 0, 0.1, 1, 10 μM이 되도록 50 μL를 혼합하였다. AChE의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는 donepezil 처리군을 양성대조군으로 설정하였으며 500 mU/mL AChE용액 50 μL에 10 μM donepezil 50 μL을 처리하였다. 음성대조군에는 500 mU/mL AChE용액 50 μL에 assay buffer 50 μL를 혼합하였다. 이후 기질로서 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)-acetylthiocholine iodide를 50 μL씩 각 군에 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. AChE 저해 활성은 대조군 대비 % 활성으로 아래의 식으로 계산하여 산출하였다.

AChE activity (%)=

$$\frac{(\text{대조군 OD} - \text{음성대조군 OD}) - (\text{PGG 처리군 OD} - \text{음성대조군 OD})}{\text{대조군 OD} - \text{음성대조군 OD}} \times 100$$

세포 증식 측정

PGG가 SK-N-SH 세포의 증식에 미치는 영향을 검토하기 위하여 SK-N-SH 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cells/200 μL/well의 세포수가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. PGG를 농도별(0, 0.1, 1, 10 μM)로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 Quanti-Max™ WST-8 Cell Viability Assay Kit (BIOMAX, Seoul, Korea)을 이용해 세포 증식능을 490 nm 파장에서 micro plate reader (SUNRISE™ BASIC TECAN, Tecan Austria, Salzburg, Austria)를 사용하여 측정하였다. 세포 증식은 대조군 대비 생존률(%)로 계산하여 산출하였다.

$$\text{Cell viability rate (\%)} = \frac{\text{실험군 OD}}{\text{대조군 OD의 평균}} \times 100$$

세포에서 acetylcholine esterase 활성 측정

PGG가 SK-N-SH 세포의 AChE 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 SK-N-SH 세포를 60-mm diameter dish에 1×10⁶ cells/5 mL/dish의 세포수가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. PGG를 농도별(0, 0.1, 1, 10 μM)로 처리한 후 24시간 동안 추가 배양하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 Cell lysis buffer를 이용해 세포용해물을 얻었다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준화한 Bio-Rad Protein Assay kit를 사용하여 정량하였다. 단백질 농도가 같도록 조정된 후 세포용해물에서의 AChE 활성을 acetylcholinesterase assay kit (Abcam)로 측정하였다. 구체적으로는 500 mU/mL acetylcholinesterase (AChE)용액 50 μL에 PGG 처리군의 세포용해물 50 μL를 혼합하였다. AChE의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는 donepezil 처리군을 양성대조군으로 설정하였으며 500 mU/mL AChE용액 50 μL에 10 μM donepezil 50 μL을 처리하였다. 음성대조군에는 500 mU/mL AChE용액 50 μL에 cell lysis buffer 50 μL를 혼합하였다.

이후 기질로서 5,5'-DTNB-acetylthiocholine iodide를 50 μL씩 각 군에 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. AChE 저해 활성은 아래의 식으로 계산하여 산출하였다.

$$\text{AChE activity (\%)} = \frac{(\text{대조군 OD} - \text{음성대조군 OD}) - (\text{PGG처리군 OD} - \text{음성대조군 OD})}{\text{대조군 OD} - \text{음성대조군 OD}} \times 100$$

Western blot 분석

PGG가 인지기능 표지자 단백질의 발현에 미치는 영향을 검토하기 위해서 SK-N-SH 세포를 6 well plate에 2×10⁵ cells/3 mL/well의 세포수가 되도록 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. PGG의 최종 농도가 0, 0.1, 1, 10 μM가 되도록 하여 24시간 동안 SK-N-SH 세포에 처리하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 Cell lysis buffer를 이용해 세포용해물을 얻었다. 단백질 농도는 BSA를 표준화한 Bio-Rad Protein Assay kit를 사용하여 정량하였다. 단백질 농도가 같도록 조정 한 후 2×sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer를 가하고 100°C에서 5분간 끓였다. Mini-PROTEAN system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 10% SDS polyacrylamide gel을 만들어 각 well에 10 μg에 해당하는 단백질이 되도록 각 시료를 loading하고 전기영동을 시행하였으며 이어서 Immobilon® transfer membranes 0.45 μm (Millipore, Bedford, MA, USA)에 transfer시켰다. Membrane을 1×blocking buffer (Biofact Biofactory, Daejeon, Korea)로 실온에서 1시간 동안 blocking 한 후 일차 항체 anti-p-CaMKII (Thr286, #ab32678, 1:1000, Abcam), anti-CaMKII (#ab22609, 1:1000, Abcam), anti-p-CREB (Ser133, #ab32096, 1:5000, Abcam), anti-CREB (#ab32515, 1:500, Abcam), anti-BDNF (#K008206P, 1:500, Solarbio), anti-β-actin (#K200058M, 1:3000, Solarbio)을 각각 처리하여 4°C에서 하룻밤 배양하였다. Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (TBST, pH 8.0)로 세척한 다음 이차항체(HRP-conjugated anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG, 1:5000, Cell Signaling)에 1시간 동안 실온에서 배양하였다. TBST로 세척하고 ECL solution (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) 기질로 반응시킨 후 Fusion Solo system (Vilber, Lourmat, France)를 이용하여 band를 확인하였다. 단백질 band의 강도는 Image J software (NIH, Bethesda, MA, USA)를 사용하여 분석하였다.

RNA 추출 및 cDNA 합성

PGG가 BDNF mRNA 발현에 미치는 영향을 검토하기 위해서 SK-N-SH 세포를 6 well plate에 1×10⁵ cells/3 mL/well의 세포수가 되도록 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. PGG를 농도별로 처리한 후 3, 6 또는 24시간 배양하였다. 세포배양액을 제거한 후 PBS로 세척 후 TRIzol® reagent를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. RNA 정량 후 RNA PrimeScript™ RT Reagent Kit (Takara)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.

Quantitative real time-PCR 분석

BDNF mRNA 발현양을 검토하기 위해서 LightCycler® 480 SYBR Green 1 Master Mix (Roche Diagnostics)를 사용하여 LightCycler® 96 system (Roche Diagnostics)으로 측정하였다. PCR 반응의 특이도를 확인하기 위해서 증폭할 때마다 melting curve

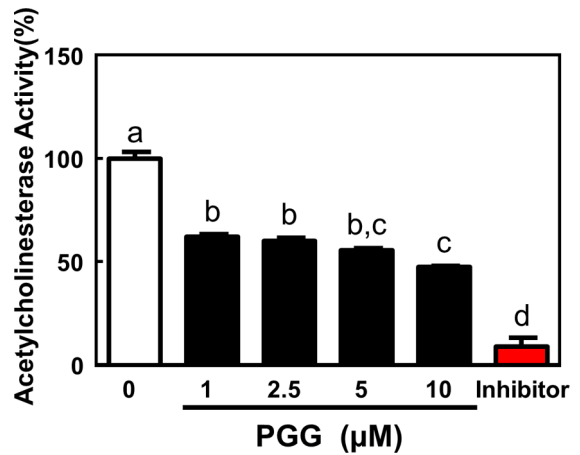


Fig. 2. Inhibitory effect of PGG on acetylcholinesterase (AChE) activity. AChE activity on test tube experiments was evaluated by enzyme assay method using acetylcholinesterase assay kit. The data are reported as the mean±SEM (n=3). Statistical significance is based on the difference compared with 0 μM PGG by one-way ANOVA followed by Dunnett's test (***)*p*<0.001. Different letters in the same column indicate a significant difference by one-way ANOVA followed by Tukey's test (*p*<0.05).

분석을 수행하였고 GAPDH을 기준으로 2^{-ΔCt}로 계산하였으며 유전자의 발현량은 대조군을 1으로 간주하여 상대적인 값으로 나타내었다. Primer는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 제작하여 사용하였고 염기서열은 다음과 같다: BDNF Forward 5'-GAGAGCTG GCCAAGTCTTCA-3', Reverse 5'-GTCAAGCTGTGCTTCCAGAGTTA-3', GAPDH Forward 5'-CCTGGCCAAGGTCATCCATGA-3', Reverse 5'-TGTCATACCAGGAAATGAGCT-3'.

통계분석

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 GraphPad Prism Verson 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 실험 결과는 mean±standard error of mean (SEM)으로 나타냈으며, 각 그룹 간의 통계적 유의성을 one-way ANOVA를 통한 Dunnett test, two-way ANOVA를 통한 Bonferroni test 또는 student t-test를 통해서 검정하였다. *p*값은 *p*<0.05를 통계적 유의차가 있다고 판단했다.

결과 및 고찰

PGG가 AChE 활성 저해에 미치는 영향

노화나 퇴행성 신경질환인 알츠하이머성 질환이나 파킨슨 질환을 앓는 환자에게서 AChE의 분비가 증가되고 이 효소는 신경 전달물질인 ACh을 분해하여 신경전달을 억제하며 인지기능을 억제한다고 보고되었다(Jabril과 Gilbert, 2019; Kandiah 등, 2017). 또한, AChE는 β-amyloid와 복합체를 형성하여 신경독성을 가지는 것으로 알려져 있다(Jabril과 Gilbert, 2019). 따라서 AChE 활성을 저해하는 것은 신경보호효과 뿐만 아니라 인지기능 개선에 도움을 줄 수 있어 신경보호효과나 인지기능 개선의 지표로 측정된다. 이에 본 연구에서도 PGG가 AChE 활성에 미치는 영향을 acetylcholinesterase assay kit (Abcam)를 이용해 시험관에서 측정하였다. 그 결과, 대조군인 0 μM PGG군의 AChE 활성이 100±3.19%일 때에 비해 AChE의 저해제(Kandiah 등, 2017)인 10 μM donepezil을 양성대조군으로 처리한 군의 AChE 활성이

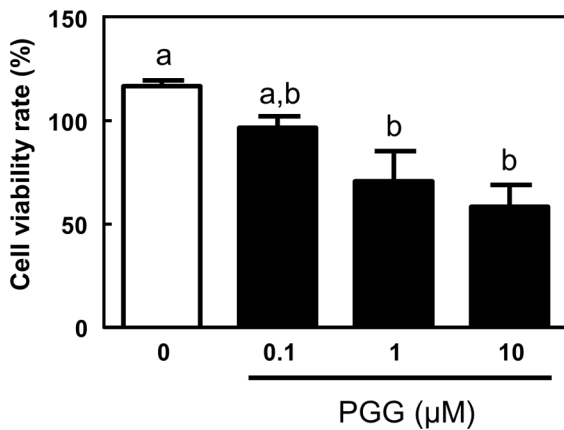


Fig. 3. Effect of PGG on cell proliferation in SK-N-SH cells. Cells were treated with the indicated concentration of PGG for 24h. Cell proliferation was determined by One Solution Assay Kit. The data are reported as the mean±SEM (n=3). Statistical significance is based on the difference compared with 0 μM PGG by one-way ANOVA followed by Dunnett's test (* p <0.05, ** p <0.01). Different letters in the same column indicate a significant difference by one-way ANOVA followed by Tukey's test (p <0.05).

9.10±4.07%로 약 90% 저해되었다. PGG처리에 의해서도 AChE 활성이 저해되었으며, 특히 1 μM PGG처리에 의해 AChE 활성이 62.25±1.14%로 약 38% 억제되었다(** p <0.001, Fig. 2). 이상의 결과로부터 PGG는 AChE 활성을 억제하여 인지기능 개선 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

PGG가 SK-N-SH 세포 증식에 미치는 영향

인간 유래 신경모세포종인 SK-N-SH 세포는 신경세포의 보호 연구(Kim 등, 2018; Lee 등, 2019a)나 인지기능 개선 연구(Baek 등, 2005; Guo 등, 2017)에 주로 사용되는 세포주이다. PGG가 SK-N-SH세포주에서 인지기능 관련 표지자에 미치는 영향을 검토하기 위해 앞서 PGG가 SK-N-SH 세포 증식에 미치는 영향을 WST-8 Cell Viability Assay Kit (BIOMAX)를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 대조군인 0 μM PGG처리군의 세포 생존률이 100±2.36%일 때 1 μM PGG 처리군의 세포생존률은 60.58±12.62%로 감소하여 SK-N-SH 세포 증식이 억제되었으나, 0.1 μM PGG 처리군은 대조군에 비해 유의적인 차이가 없었다(* p <0.05, ** p <0.01, Fig. 3). 이상의 결과로부터 PGG는 SK-N-SK 세포 증식에 영향을 줄 수 있는 것으로 확인되었으며, 추후 실험에서는 이를 반영하여 실험을 진행하였다.

PGG가 SK-N-SH 세포의 AChE 활성에 미치는 영향

앞선 시험관 시험에서 PGG가 AChE 활성을 저해하였기 때문에 PGG가 신경모세포종인 SK-N-SK 세포에서도 AChE 활성 저해 효과를 가지는지를 확인하기 위해서 세포에서도 실험을 진행하였다. PGG를 SK-N-SH세포에 24시간 처리한 후 동일한 단백질 양을 함유하는 세포 용해물에서의 AChE 활성을 acetylcholinesterase assay kit (Abcam)를 이용해 측정하였다. 그 결과, 대조군인 0 μM PGG군에서 AChE 활성은 2.07±0.06 mU/μg protein인 것에 비해 AChE 억제제인 10 μM donepezil군은 0.76±0.01 mU/μg protein으로 약 64% 억제되었다. 10 μM PGG 처리에 의해서는 1.65±0.06 mU/μg protein으로 AChE 활성이 약 21% 억제되었다(** p <0.01,

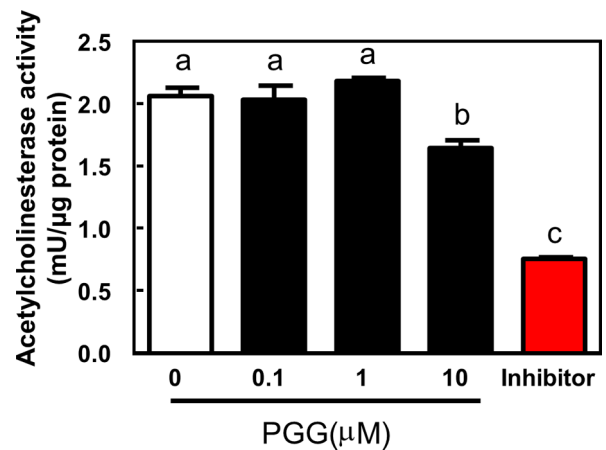


Fig. 4. Inhibitory effect of PGG on acetylcholinesterase activity in SK-N-SH cells. Cells were treated with the indicated concentration of PGG for 24h. AChE activity in PGG treated SK-N-SH cells was evaluated by enzyme assay method using acetylcholinesterase assay kit. The data are reported as the mean ± SEM (n=3). Statistical significance is based on the difference compared with 0 μM PGG by one-way ANOVA followed by Dunnett's test (** p <0.01, *** p <0.001). Different letters in the same column indicate a significant difference by one-way ANOVA followed by Tukey's test (p <0.05).

*** p <0.001, Fig. 4). ACh는 choline과 acetyl-CoA로부터 합성되는 신경전달물질로, 시냅스 간극(synaptic cleft)으로 분비되어 ACh 수용체에 결합하여 학습과 기억에 기여하는데, 시냅스에서 AChE에 의해 분해된다. AChE 활성 증가로 인한 ACh의 기능 저하는 알츠하이머성 질환으로 이어지기 때문에, AChE의 활성을 억제하는 천연물에 대한 연구가 이루어지고 있다(Patel 등, 2018). 이상의 결과로부터 PGG는 시험관에서 뿐만 아니라 신경세포에서도 AChE 활성을 억제하는 것으로 나타나, 인지기능에 긍정적인 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

PGG가 신경영양성인자인 BDNF 발현에 미치는 영향

BDNF는 뉴런의 증식, 시냅스 기능, 시냅스 가소성, 인지기능에 있어서 중요한 역할을 하는 신경영양성인자(neurotrophin) 중의 하나이다(Guo 등, 2017). 우울증은 전두엽과 해마의 신경퇴행과 관련이 있으며 우울증 환자의 전두엽과 해마에서 BDNF가 현저히 감소된 것이 알려져 있어(Gold, 2021), BDNF는 정신질환이나 신경퇴행성 질환과 같은 병리적 상태의 평가나 치료 효과를 평가하는 생물학적 표지자이다(Bruno 등, 2019). 따라서 본 실험에서는 PGG가 신경영양성인자인 BDNF의 단백질 발현에 미치는 영향을 western blot 법을 통해 측정하였다. 그 결과, 세포증식에 영향을 미치지 않는 농도인 0.1 μM PGG를 24시간 처리한 군에서 BDNF 단백질 발현이 대조군이 1일 때 비해 1.68배 증가하였다(Fig. 5A). 0.1 μM PGG를 24시간 처리하였을 때 BDNF의 단백질 발현이 증가하였기에 0.1 μM PGG 처리 시간대별로 BDNF 단백질 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과, 0.1 μM PGG를 6시간처리군, 12시간처리군에서도 BDNF의 발현이 증가하였다(Fig. 5B). PGG가 BDNF의 단백질 발현양을 증가시켰으므로, BDNF mRNA의 발현에 미치는 영향을 reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통해 측정하였다. 그 결과, 0.1 μM PGG를 3시간처리군에서부터 BDNF의 mRNA 발현이 증가하였다(Fig. 5C). Guo 등(2017)의 연구에 의하면 살충제에 포함

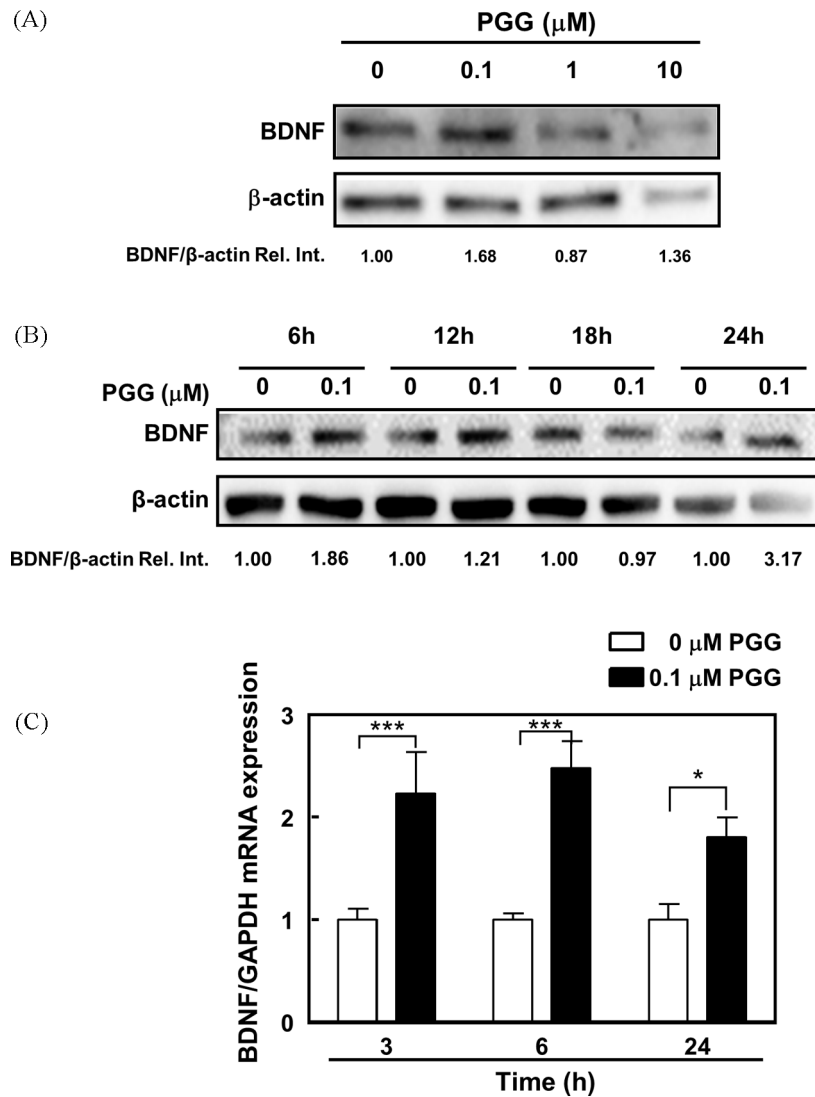


Fig. 5. Effect of PGG on (A and B) BDNF protein and (C) mRNA expression in SK-N-SH cells. (A and B) Cells were treated with indicated concentration of PGG for indicated time. Protein of whole cell lysates was resolved on 10% SDS-PAGE for BDNF. β-Actin expression is shown as a loading control. Relative intensity is indicated by the intensity of band of BDNF protein divided by intensity of band of β-actin. (C) mRNA expression. Different letters in the same column indicate a significant difference by one-way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$).

된 오염물질 중 하나인 perfluorooctane sulfonate (PFOS)의 노출은 신경세포에서 BDNF의 mRNA와 단백질 발현을 억제하고 신경독성을 유도한다고 보고하였다. Corpuz 등(2019)은 발효된 쌀로부터 분리된 peptide가 BDNF의 발현을 증가한다고 보고하였다, BDNF는 신경세포의 생존, 분화, 기능에 관련되고 기억과 학습에 중요한 인자(Bekinschtein 등, 2007; Guo 등, 2017)로 알려져 있기 때문에 SK-N-SH세포에서 PGG처리에 의한 BDNF 발현 증가 효과는 인지기능 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

PGG가 BDNF 발현을 증가시키는 분자적 기전에 미치는 영향

BDNF의 증가는 중추신경계에서 신경세포 성장, 세포 분화와 증식에 관여하여 기억 형성과 시냅스 가소성에 관련되며 장기 기억에 중요한 역할을 한다(Bekinschtein 등, 2007). BDNF의 발현을 촉진하는 촉진인자(promoter)는 L-type voltage gated calcium channel (L-VGCC)이나 n-methyl-d-aspartate (NMDA) 수용체의 활성화에 의해 활성화된다. 그 후 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein

kinase (CaMK)의 serine과 threonin 잔기가 활성화되며, 활성화된 p-CaMKII는 CREB의 인산화를 일으킨다(Luca 등, 2020; Wang 등, 2017; Lisman 등, 2012). CREB는 BDNF와 같은 기억 및 시냅스 가소성과 관련된 유전자의 발현을 조절하는 전사인자로 p-CREB로 인산화된 후 표적 유전자인 BDNF의 발현을 증가시킨다(Numakawa 등, 2018; Deogracias 등, 2004). 따라서, CaMKII-CREB 신호 경로는 BDNF 발현에 있어 중요한 경로라고 할 수 있다. 이에 PGG가 BDNF의 발현을 증가시키는 분자적 기전을 파악하기 위해서 우선 p-CaMKII (Thr 286) 및 CaMKII 발현에 미치는 영향을 western blot법을 통해 측정하였다. 그 결과, 0 μM PGG군에서 CaMKII에 대한 p-CaMKII의 발현양을 1로 두었을 때, PGG 처리에 의해 p-CaMKII의 발현양이 최대 2.89배 증가하였다. 특히, 세포증식에 영향을 주지 않는 농도인 0.1 μM PGG처리군에서도 p-CaMKII의 발현이 2.13배 증가하여(Fig. 6), PGG가 CaMKII의 인산화를 유도하는 것으로 나타났다. CaMKII의 발현도 PGG처리에 의해 감소하였는데, 이는 PGG가 세포자가소화화

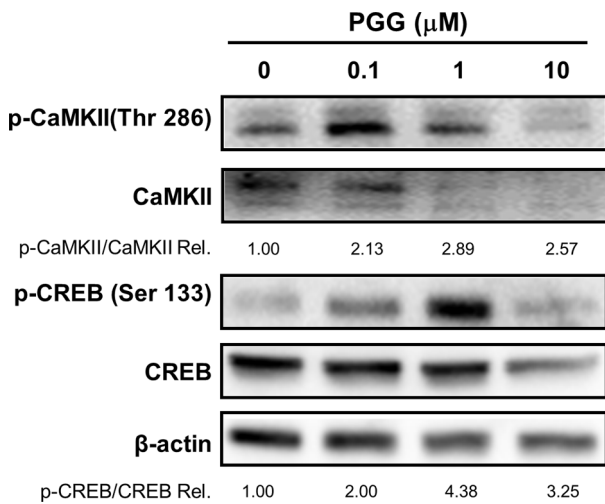


Fig. 6. Effect of PGG on molecular marker of cognitive function in SK-N-SH cells. Cells were treated with indicated concentration of PGG for 24 h. Protein of whole cell lysates was resolved on 10% SDS-PAGE for p-CaMKII, CaMKII, p-CREB, CREB, and BDNF. β -actin expression is shown as a loading control. Relative intensity is indicated by the intensity of band of BDNF protein divided by intensity of band of β -actin.

력(autophagy)를 유도하여 항바이러스효과(Tu 등, 2018)나 항암효과(Dong 등, 2014)를 나타낸다는 기존의 연구와 관련이 있을 것으로 생각된다. CaMKII의 활성화에 의해 CREB가 활성화되고 그 결과 BDNF의 전사를 활성화하기 때문에(Luca 등, 2020), PGG의 처리가 p-CREB (Ser 133) 및 CREB 발현에 미치는 영향을

western blot법을 통해 측정하였다. 그 결과, 대조군인 0 μM PGG 처리군에서 CREB에 대한 p-CREB의 발현양을 1로 두었을 때, PGG 처리에 의해 p-CREB의 발현양이 최대 4.38배 증가하였으며, 0.1 μM PGG처리군에서도 p-CREB의 발현이 2배 증가하였다. 이상의 결과로부터 p-CREB (Ser 133)는 BDNF의 촉진인자인 cAMP response element (CRE)에 결합하여 BDNF의 전사를 촉진한다고 보고한 것과 같이(Deogracias 등, 2004), PGG는 CaMKII-CREB 신호 경로를 통해 BDNF의 발현을 증가하는 것으로 생각된다.

요 약

인구의 고령화에 따른 노인 인구 증가로 지난 10년간 치매환자수와 경도인지장애 환자수가 급증하였다. 치매는 예방이 중요한 만큼 인지기능 향상에 도움을 줄 수 있는 기능성 소재 탐색에 대한 연구가 필요하다. 한편, PGG는 다양한 약용식물에 함유되어있는 gallotannins로 소교세포에서 항염증효과, amyloid beta 단백질 침착 억제효과, beta-secretase 억제효과가 알려져 있으나 인지 기능과 관련된 지표들에 대한 연구는 부족한 실정이다. 이에 본 연구에서는 PGG가 신경모세포주인 SK-N-SH세포에서 인지 기능과 관련된 인자에 미치는 영향을 검토하고 관련 기전에 대해 평가하였다. 퇴행성질환 등에서 그 분비가 증가되는 AChE 효소활성이 PGG 처리에 의해 시험관실험과 세포실험에서 모두 억제되었다. 또한, PGG는 neurotrophin 중의 하나인 BDNF mRNA 및 단백질 발현을 증가하였다. 이러한 PGG의 BDNF 발현 증가에 대한 분자적 기전을 확인하기 위해 CAMKII-CREB 신호경로를 측정한 결과, PGG는 CAMKII를 인산화하였고, BDNF의 전사인자인 CREB를 활성화하였다. 이상의 결과로부터, hydrolyzed

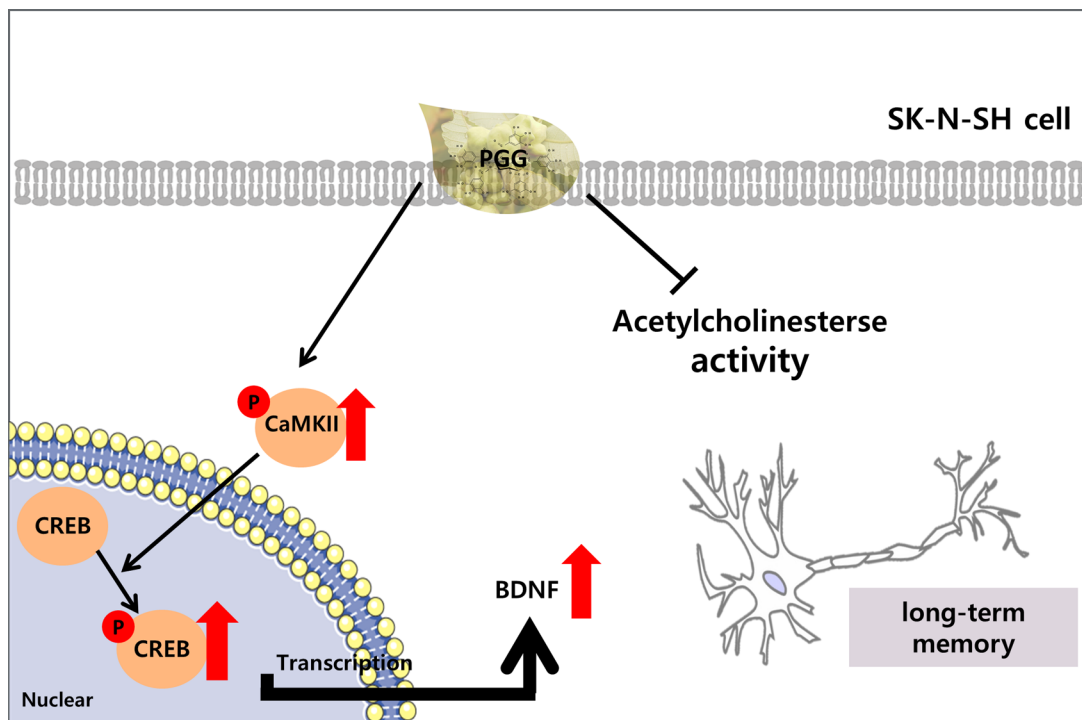


Fig. 7. Effect of PGG on marker of cognitive function in SK-N-SH cell. PGG inhibits acetylcholinesterase activity and increases expression of BDNF through activation of CaMKII-CREB pathway. Because BDNF is essential to promote persistence of long-term memory, PGG might be effective for long-term memory.

tannins의 하나인 PGG가 신경세포에서 CAMKII-CREB 경로를 활성화함으로써 BDNF의 발현을 증가시킬 뿐만 아니라 AChE 활성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 8). 추가적으로 이러한 PGG의 효과가 인지기능이 저하된 동물모델 등에서도 효과가 있는지를 검토할 필요가 있다. 이러한 자료가 축적이 된다면 향후 PGG가 인지기능 개선을 위한 기능성 소재로서의 사용될 가능성이 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2018학년도 대구대학교 학술연구비지원(20180254)에 의한 논문으로 이에 감사드립니다.

References

- Abhijit D, Raktim B, Anuradha M, Devendra KP. Natural products against Alzheimer's disease: Pharmacotherapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnol. Adv.* 35: 178-216 (2017)
- Araki S, Osuka K, Takata T, Tsuchiya Y, Watanabe Y. Coordination between Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Neuronal Nitric Oxide Synthase in Neurons. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 7997 (2020)
- Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 148-155 (1995)
- Baek H, Chang GT, Kim JH. Experimental study on the effects of Bohyulanshin-tang on brain-derived neurotrophic factor expression in SK-N-SH cell line. *J. Physiol. Pathol. in Korean Med.* 2: 139-145 (2005)
- Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilacqua LR, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron.* 53: 261-277 (2007)
- Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin. Med (Lond).* 16: 247-253 (2016)
- Bruno LG, Janine D, Hans CK, Rudi AJOD, Elke B, Erik FJV. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol. Neurobiol.* 56: 3295-3312 (2019)
- Chen S, Jiang H, Liu Y, Hou Z, Yue Y, Zhang Y, et al. Combined serum levels of multiple proteins in tPA-BDNF pathway may aid the diagnosis of five mental disorders. *Sci. Rep.* 7: 6871 (2017)
- Corpuz HM, Fujii H, Nakamura S, Katayama S. Fermented rice peptides attenuate scopolamine-induced memory impairment in mice by regulating neurotrophic signaling pathways in the hippocampus. *Brain Res.* 1720: 146322 (2019)
- Deogracias R, Espliguero G, Iglesias T, Rodríguez-Peña A. Expression of the neurotrophin receptor trkB is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons. *Mol. Cell Neurosci.* 26: 470-480 (2004)
- Dong Y, Yin S, Jiang C, Luo X, Guo X, Zhao C, et al. Involvement of autophagy induction in penta-1,2,3,4,6-O-galloyl-beta-D-glucose-induced senescence-like growth arrest in human cancer cells. *Autophagy.* 10: 296-310 (2014)
- Fujiwara H, Tabuchi M, Yamaguchi T, Iwasaki K, Furukawa K, Sekiguchi K, et al. A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid beta proteins in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 109: 1648-1657 (2009)
- Gold PW. The PPAR γ system in major depression: pathophysiological and therapeutic implications. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 9248 (2021)
- Guo XX, He QZ, Li W, Long DX, Pan XY, Chen C, et al. Brain-derived neurotrophic factor mediated perfluorooctane sulfonate induced-neurotoxicity via epigenetics regulation in SK-N-SH cells. *Int. J. Mol. Sci.* 18: 893 (2017)
- Health insurance review & assessment service. Available from: <https://www.hira.or.kr/bbsDummy.do?pgmid=HIRAA020041000100&brdScnBltNo=4&brdBltNo=10146&pageIndex=18>. Accessed Sep. 21, 2020.
- Jabril E, Gilbert Blaise. The role of acetylcholinesterase inhibitors such as neostigmine and rivastigmine on chronic pain and cognitive function in aging: A review of recent clinical applications. *Alzheimers Dement (NY).* 5: 175-183 (2019)
- Kandiah N, Pai MC, Senanarong V, Looi I, Ampil E, Park KW, et al. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and parkinson's disease dementia. *Clin. Interv. Aging.* 12: 697-707 (2017)
- Kim YH, Im AR, Park BK, Paek SH, Choi G, Kim YR, et al. Anti-depressant-Like and Neuroprotective Effects of Ethanol Extract from the Root Bark of *Hibiscus syriacus* L. *Biomed. Res. Int.* 2018: 7383869 (2018)
- Knight R, Khondoker M, Magill N, Stewart R, Landau S. A systematic review and meta-analysis of the effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors and memantine in treating the cognitive symptoms of dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 45: 131-151 (2018)
- Lee HI, Gwak JY, Chung MJ. Inhibitory effects of *Platycodon Grandiflorum*, *Codonopsis lanceolata*, *Corn Silk*, and *Acanthopanax senticosus* against Nitric Oxide-Induced cytotoxicity in SK-N-SH Cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 48: 823-832 (2019)
- Lee HJ, Seong YH, Bae KH, Kwon SH, Kwak HM, Nho SK, et al. Beta-secretase (BACE1) inhibitors from *Sanguisorbae Radix*. *Arch. Pharm. Res.* 28: 799-803 (2005)
- Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* 13: 169-182 (2012)
- Luca CDA, Luisa S, Floriana V. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 7777 (2020)
- Mendonca P, Taka E, Bauer D, Cobourne-Duval M, Soliman KF. The attenuating effects of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose on inflammatory cytokines release from activated BV-2 microglial cells. *J. Neuroimmunol.* 15: 9-15 (2017)
- Numakawa T, Odaka H, Adachi N. Action of brain-derived neurotrophic factor in the neurogenesis and neuronal function, and its involvement in the pathophysiology of brain diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 3650 (2018)
- Patel SS, Raghuvanshi R, Masood M, Acharya A, Jain SK. Medicinal plants with acetylcholinesterase inhibitory activity. *Rev. Neurosci.* 29: 491-529 (2018)
- Ren Y, Himmeldirk K, Chen X. Synthesis and structure-activity relationship study of antidiabetic penta-O-galloyl-D-glucopyranose and its analogues. *J. Med. Chem.* 49: 2829-2837 (2006)
- Statistics Korea. 2020 Statistics on the Aged. Available from: <http://kostat.go.kr/portal/eng/pressReleases/1/index.board?bmode=read&bSeq=&aSeq=388599&pageNo=10&rowNum=10&navCount=10&currPg=&searchInfo=&sTarget=title&sTxt=>. Accessed Sep. 28, 2020.
- Tu Z, Gong W, Zhang Y, Feng Y, Liu Y, Tu C. Inhibition of Rabies virus by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-d-glucose involves mTOR-dependent autophagy. *Viruses* 10: 201 (2018)
- Wang Y, Yin F, Guo H, Zhang J, Yan P, Lai J. The Role of Dopamine D1 and D3 Receptors in N-Methyl-D-Aspartate (NMDA)/GlycineB Site-Regulated Complex Cognitive Behaviors following Repeated Morphine Administration. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 20: 562-574 (2017)
- Whang SG, Park HG. An analysis on prescribing patterns of Alzheimer's dementia treatment and choline alfoscerate using HIRA claims data. *Kor. J. Clin. Pharm.* 29: 1-8 (2019)