

금은화에서 분리한 luteolin의 신경세포보호 활성

김은서¹ · 마충제^{1,2*}

¹강원대학교 의생명과학대학 생물소재공학과

²강원대학교 의생명과학연구소

Neuroprotective Activity of Luteolin Isolated from *Lonicera japonica*

Eun Seo Kim¹ and Choong Je Ma^{1,2*}

¹Department of Medical Biomaterials Engineering, College of Biomedical Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

²Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Abstract – In the previous study, we reported that luteolin isolated from *Lonicera japonica* methanolic extract had potent neuroprotective activities in neuronal cell death injured by excessive glutamate. In this study, we tried to confirm the neuroprotective activities of luteolin in glutamate injured HT22 cells and establish mechanisms of neuroprotective action of luteolin. We used HT22 cell death injured by glutamate as a bioassay system. Luteolin decreased reactive oxygen species increased by excessive glutamate treatment in HT22 cells. Also, Ca²⁺ concentration was decreased by luteolin treatment. Luteolin made mitochondrial membrane potential maintain to normal condition. It also increased not only glutathione reductase but also peroxidase to the control level. And it increased amount of glutathione, an endogenous antioxidant. These results suggested that luteolin isolated from *L. japonica* showed potent neuroprotective activity through the anti-oxidative pathway.

Keywords – *Lonicera japonica*, Luteolin, Neuroprotection, Antioxidant, Alzheimer's disease

현대 의학 기술의 비약적인 발전은 인간의 평균 수명 및 기대 수명을 크게 연장시켰고, 이로 인하여 인구 중 노인이 차지하는 비율 또한 매우 증가하였다. 이에 따라 인간의 노화에 의한 질병의 유병률이 크게 증가하였는데, 알츠하이머와 같은 퇴행성 신경계 질환도 마찬가지로 해마다 환자의 수가 증가하고 있다.¹⁾ 특히, 알츠하이머와 같은 치매는 노령화가 급속도로 진행되고 있는 우리 사회에 크나큰 사회적 문제로 인식되고 있으며 전체 노인 중 약 10%가 치매 환자일 정도로 심각한 사회문제로 대두되고 있다.²⁾ 더욱이 치매는 환자 자신뿐 아니라 이를 돌보는 가족들에게도 고통을 주는 사회적 문제이지만, 이에 대한 치료제로 개발된 것은 불과 1-2 종에 불과할 뿐이고, 개발된 치료제 중 대부분은 근본적인 치료가 아닌 증상의 완화나 경감에만 효과가 있는 실정이다.^{3,4)} 이러한 이유로 알츠하이머의 치료제 개발은 매우 중요한 과제로 대두되고 있다. 글루타메이트 (glutamate)는 중추신경계에서 뇌의 발달 과정 중에 신경세

포의 분화나 이동, 생존을 위하여 매우 중요한 역할을 하는 주요 흥분성 신경 전달 물질이다.⁵⁾ 그러나 과도한 양의 글루타메이트는 신경세포의 손상을 야기하는데, 흥분성 신경 독성과 산화적인 스트레스의 형태로 신경세포의 사멸을 야기한다고 알려져 있다.⁶⁾ 신경 세포에 고농도의 글루타메이트를 처리하게 되면 뇌신경 세포에서 활성 산소 종이 증가하고, 세포 내 칼슘 이온과 산화질소의 농도가 증가한다고 알려져 있다. 또한, 생체 내에서 내재적으로 생산되는 항산화 물질인 글루타치온 (glutathione)의 생성 및 대사와 관련된 효소인 글루타치온 퍼옥시다아제 (glutathione peroxidase) 및 글루타치온 리덕타제 (glutathione reductase)의 활성을 낮추어 결과적으로 글루타치온 (glutathione)의 생성량을 감소시키게 되어 일련의 증상의 결과로서 뇌신경세포가 사멸에 이르게 한다고 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾ 치매의 원인 질환에는 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 퇴행 및 파킨슨병 등과 같이 다양한 종류가 있으나 가장 흔한 것은 알츠하이머병과 혈관성 치매이다. 알츠하이머병은 발병 기전이나 원인은 아직 정확하게 알려져 있지 않지만, 알츠하이머 환자의 뇌를 관찰한 결과 몇 가지 원인이라고 보여지는

*교신저자(E-mail): cjma@kangwon.ac.kr
(Tel): +82-33-250-6565

부분들이 보고되어 있다.¹⁰⁾ 병변을 보이는 뇌에 베타 아밀로이드 단백질이 과도하게 생성되어 침착됨으로써 뇌신경세포가 정상적인 작용을 하지 못하게 하고, 결과적으로 뇌신경세포를 사멸하게 한다고 알려져 있으며, 뇌신경 세포 내에 포함된 타우 단백질이 과인산화되어 뇌세포의 골격을 유지하지 못하게 하여 신경세포의 사멸을 야기한다는 보고도 있다. 또한, 산화적 스트레스 및 염증반응 등도 뇌신경세포를 사멸하게 하여 알츠하이머병의 발병에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.¹¹⁻¹⁴⁾ 이러한 다양한 원인으로 신경세포가 사멸하게 되면 뇌와 같은 신경계 기관의 손상으로 이어져 결과적으로 인간에게 알츠하이머, 파킨슨병 등과 같은 퇴행성 뇌신경질환을 야기하게 된다. 그러므로, 뇌신경세포를 보호하는 물질은 퇴행성 뇌신경계 질환 치료제 개발의 주요한 타겟이 될 수 있다.

이에 본 연구진은 과량의 glutamate 투여로 인한 신경독성 및 산화적 스트레스에 의한 신경세포의 사멸을 막아주어 신경세포 보호 활성을 나타내는 천연물을 찾기 위하여 수종의 천연물 추출물을 glutamate로 신경 독성을 유발한 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포를 검색계로 하여 신경세포 보호 활성을 검색하였다. 실험 결과, 금은화(*Lonicera japonica*)의 총 메탄올 추출물이 유의성 있는 강력한 신경세포 보호 활성을 나타냄을 확인할 수 있었고,¹⁵⁾ 금은화 총 메탄올 추출물로부터 신경세포 보호 활성을 나타내는 활성 물질을 활성지향적 분리기법을 적용하여 분리하고 활성을 평가하여 수종의 신경세포 보호 활성 화합물을 발견하였다.¹⁶⁾

본 연구에서는 대뇌 피질세포에서 신경세포 보호 활성이 보고된 금은화 추출물로부터 분리 정제한 luteolin의 마우스 유래 해마 세포인 HT22 세포에서의 신경세포 보호 활성을 다시 한번 확인하고 약리 활성의 작용기전을 밝히고자 하였다. glutamate로 신경 독성을 유도한 HT22 세포를 활성 검색계로 하여 신경 세포의 사멸과 관련된 바이오 마커의 변화를 평가하여 luteolin의 약리 작용 기전을 규명하는 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료 – Dulbecco's modified eagle medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS)은 Gibco(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였고, Glutamic acid, MTT solution, Trolox, NADPH, DTNB, GSSG-R(Glutathione disulfide reductase), GSSG oxidase, GSH(L-glutathione reduced), 2,7-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA), Fura-2AM, Rhodamin 123, Triton X-100, penicillin과 streptomycin은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO)는 대정화금^(주)에서 구입하여 사용하였다. Luteolin은 기존에 분리하고 구조 동정한 화합물을 사용하였다(Fig. 1).¹⁷⁾

HT22 세포 배양 – 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포의 세포 배양은 기존에 발표했던 원의 방법을 수정하여 수행하였다.¹⁸⁾ 요약하면, HT22 세포는 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂로 조절된 CO₂ incubator에서 배양하였다. DMEM 배지에는 10%의 FBS와 1%의 penicillin/streptomycin을 포함되었다. 활성평가를 위하여 시료나 독성물질을 처리하기 전까지 세포가 최적의 조건으로 배양될 수 있도록 2-3일 마다 한 번씩 subculture 해 주었다.

뇌신경세포 보호 활성 측정 – 뇌신경세포 보호 활성은 기존의 방법을 수정하여 진행하였다.¹⁸⁾ 세포 생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 배양된 HT22 세포를 48 well plate에 2.0×10⁴/well의 농도로 seeding 하고 37°C, 5%의 CO₂의 조건으로 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 후 control과 glutamate 처리군에는 배지 30 mL를 처리하고, 시료 투여군에는 1 μM, 10 μM, 100 μM 농도의 luteolin을 처리하였으며, positive control 처리군에는 50 μM Trolox를 투여하였다. 투여한 지 한 시간 후 control 그룹을 제외한 모든 well에 4 mM의 glutamate 30 mL를 투여하였다. 처리 후 24 시간 incubation 하고, 모든 well에 150 μL의 MTT solution (1 mg/mL in PBS)을 가하였다. 상온에서 3시간이 지난 후 각 well에 남아 있는 DMEM 배지를 suction하여 모두 제거하고 DMSO 300 μL를 처리하고 빛을 차단한 상태에서 30 분간 두어 formazan crystal을 충분히 녹여주었다. 다 녹인 solution을 96 well plate에 200 μL씩 분주하고 ELISA reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 같은 조건에서 3회 반복하였고, 얻어진 결과값을 통계처리 하였다.

세포 내 ROS 측정 – HT22 세포의 상대적인 free radical의 양은 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 사용하는 Goodman과 Mattson의 방법으로 측정하였다.¹⁹⁾ HT22 세포에 trolox(50 mM) 및 luteolin(1 mM, 10 mM, 100 mM)를 처리하고 1시간 후 4 mM의 glutamate를 처리하였다. 8 시간 배양 후 100 μM의 DCF-DA를 40 μL 첨가하고 1 시간 동안 반응시킨 후 배지를 제거하고 PBS로 3회 세척한 후 1.0%의 triton X-100으로 세포를 37°C에서 15 분간 녹여낸 후 형광도를 측정하였다. 형광도는 490 nm에서 exciting 시킨 후 525 nm에서 emission light를 측정하였다. 실험은 같은 조건에서 3회 반복하였고, 얻어진 결과 값을 통계처리 하였다.

세포 내 Ca²⁺ 농도 측정 – 배양된 HT22 세포에 trolox와 luteolin을 처리하고 1시간 후 4 mM의 glutamate를 처리하였다. 배양한 HT22 세포에 20 μM의 Fura-2AM 10 μL를 투여한 후 1 시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 3회 세척하고 난 뒤 1.0%의 Triton X-100 150 μL로 37°C에서 15 분간 녹여내었다. 형광도는 340 nm에서 exciting 시킨 후 510 nm에서 emission light를 측정하였다. 실험 결과는 세 번 반복하여 측정된 값

을 통계처리 하였다.

미토콘드리아 막전위 손상 억제 효과 측정 - HT22 세포에 trolox(50 mM) 및 luteolin(1 mM, 10 mM, 100 mM)를 처리하고 1시간 후 4 mM의 glutamate를 처리하여 신경독성을 유발하였다. 10 µL의 rhodamine 123을 첨가하고 37°C에서 30 분간 반응시키고 PBS로 3회 세척한 후 1.0%의 Triton X-100 150 µL로 37°C에서 15 분간 녹여내었다. 형광도는 488 nm에서 exciting 시킨 후 525 nm에서 emission light를 측정하였다. 실험 결과는 세 번 반복하여 측정된 값을 통계처리 하였다.

글루타치온 총 함량 및 항산화 효소 활성 측정 - HT22 세포에 trolox(50 mM) 및 luteolin(1 mM, 10 mM, 100 mM)를 처리하고 1시간 후 4 mM의 glutamate를 처리하여 신경독성을 유발하였다. 24 시간 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 10,000 g, 4°C 조건으로 30 분간 원심분리를 하여 170 mL의 상층액을 수집하여 항산화 효소와 글루타치온의 양을 측정하였다. 글루타치온 총 함량을 측정하기 위해서 세포 상층액 또는 글루타치온 표준품을 5 unit/mL glutathione reductase 및 0.3 mM NADPH가 담긴 반응액에 첨가하였다. 0.5 mM DTNB를 첨가하여 37°C에서 30초 동안 반응시킨 다음 microplate reader를 이용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 글루타치온의 양은 표준품 글루타치온의 표준치를 기준으로 하여 결정하였다. Glutathione peroxidase와 glutathione reductase의 활성을 측정하기 위하여 각각을 반응시킨 후 340 nm에서 각각 흡광도를 측정하였다. 실험 결과는 세 번 반복 실험 이후 측정된 값을 통계처리 하였다.

결과 및 고찰

MTT assay를 통한 뇌신경세포 보호 활성 측정 - 건조된 금은화 총 8 kg으로부터 총 메탄올 추출물 861 g을 얻어 이를 용매 극성에 따라 순차적으로 n-hexane, CHCl₃, EtOAc, n-BuOH로 분획하였다. 금은화 총 메탄올 추출물과 각 분획물을 사용하여 글루타메이트로 신경 독성을 유발시킨 일차 배양한 대뇌 피질세포에서의 신경세포 보호 활성을 평가한 결과 총 메탄올 추출물과 CHCl₃ 분획에서 글루타메이트 신경독성에 의한 세포 사멸을 유의성 있게 차단하여 세포의 생존율을 증가시킨다는 결과를 얻었다. CHCl₃ 분획으로부터 다양한 분리 기법을 통하여 활성 물질을 분리하였고 그 구조를 동정하였다. 이들의 신경세포 보호활성을 평가하여 금은화 총 메탄올 추출물의 CHCl₃ 분획으로부터 분리한 luteolin (Fig. 1)이 신경세포 보호 활성을 보임을 보고하였다.¹⁶⁾ 이러한 luteolin을 사용하여 고농도의 glutamate로 흥분성 신경독성을 유발시킨 마우스 유래 해마 세포주인 HT22 세포를 활성검색체로 하여 신경세포 보호활성 평가 실험을 수

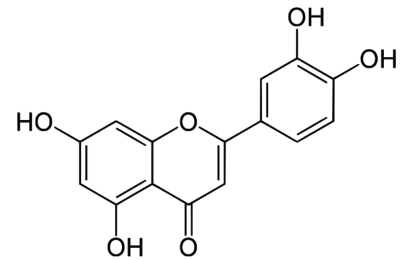


Fig. 1. Structure of luteolin isolated from *L. japonica*.

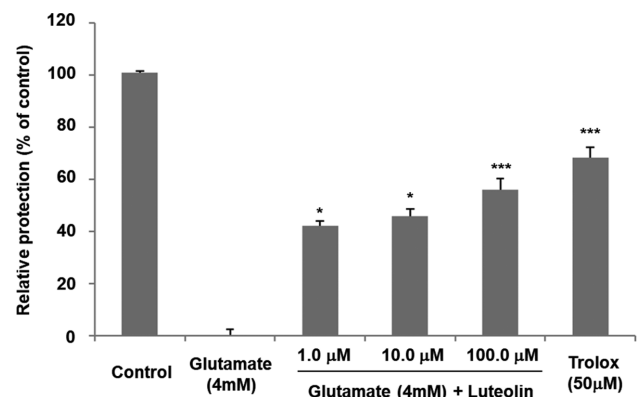


Fig. 2. Effect of luteolin (1.0, 10.0 and 100.0 mM) on glutamate-induced death of HT22 cells. Data expressed as mean ± the standard error of the mean. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 versus the glutamate-treated group

행하였다. 4 mM의 glutamate를 처리하여 HT22 세포에 신경독성을 유도한 후 MTT assay를 통하여 luteolin의 신경세포 보호 활성을 평가하였다. Luteolin의 농도를 1.0 mM, 10.0 mM, 100.0 mM로 하여 전처리 한 후 1 시간 뒤에 4 mM의 glutamate를 처리하였고 24 시간 뒤에 세포의 생존율을 평가하였다. 실험 결과를 통하여 luteolin이 농도의존적으로 유의성 있는 신경세포 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 2). Glutamate는 뇌를 포함한 중추신경계에서 신경 전달을 담당하는 매우 중요한 물질로서 정상적인 상태의 세포 안에는 약 10⁻³ M의 농도로 분포하고 있고, 세포 밖에서는 10⁻⁶~10⁻⁵ M의 농도를 유지하며 분포한다고 알려져 있다.²⁰⁾ 하지만, 뇌손상과 같은 병변이 발생한 지역에서의 글루타메이트의 농도는 매우 높게 나타나며 이처럼 과도한 양의 glutamate는 흥분성 신경독성을 유발하거나 산화적인 스트레스를 나타내어 신경세포를 죽인다는 보고가 있다.⁶⁾ Luteolin이 어떠한 작용기전을 통하여 glutamate의 신경독성에 의한 HT22 세포의 사멸을 막아주는지 확인하기 위하여 항산화와 관련한 다양한 바이오 마커의 변화를 평가하는 실험을 진행하였다. 항산화와 관련한 바이오 마커로서 세포 내 ROS, Ca²⁺ 농도, 미토콘드리아 막전위의 손상 억제 및 glutathione 총 함량과 glutathione reductase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소 등을 평가하였다.

Luteolin이 ROS의 생성에 미치는 영향 - 뇌에서 글루타메이트의 농도가 증가하면세포내 활성산소종(ROS)의 급증으로 인해 신경독성이 발생한다. 활성산소 생성은 주로 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 등과 같은 급성 뇌손상 질환 및 만성 퇴행성 신경질환의 발생과 신경세포의 사멸과 연관이 있다.²¹⁾ Luteolin이 glutamate에 의하여 손상을 입은 신경세포의 사멸에 대한 보호 작용을 나타내는 것이 ROS의 생성량과 관계가 있는지 확인하기 위하여 형광 시약 DCF-DA를 사용하였다. Luteolin의 투여가 과량의 glutamate에 의하여 증가한 ROS의 생성량을 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시킴을 확인할 수 있었다. 1.0 mM의 luteolin 투여군에서는 29.8%의 감소를 보였으며 luteolin의 투여 농도가 증가할수록 ROS의 생성 감소량 또한 증가하여 100.0 mM의 luteolin을 투여한 실험군에서는 거의 정상상태 수준으로 ROS의 생성량을 감소시켜 주었다(Fig. 3). 이 결과를 통해 luteolin은 농도 의존적으로 강력한 ROS 생성 억제능을 가지며 ROS로 인한 세포 사멸을 막아준다는 것을 확인할 수 있었다.

Luteolin이 세포 내 Ca²⁺ 농도에 미치는 영향 - Glutamate에 의한 신경세포의 사멸과정 중 세포 내 Ca²⁺의 증가 또한 매우 잘 알려진 중요한 과정이다.²²⁾ Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenyl-hydrazone 화합물에 의하여 활성 산소의 생성을 억제하면 세포 내 Ca²⁺의 증가를 억제할 수 있다는 보고가 있다.²³⁾ 또한, 코발트에 의하여 Ca²⁺의 세포 내로의 유입을 차단할 경우, 과량의 glutamate를 처리하여도 활성 산소의 생성은 크게 증가하지 않는다는 보고도 있다.²⁴⁾ 이러한 연구 결과들은 활성 산소의 생성 및 축적이 세포 내 Ca²⁺의 농도와 서로 밀접하게 작용하고 있음을 시사할 수 있겠다.²⁵⁾ Luteolin이 glutamate로 세포 사멸을 유도한 HT22 세포에서 세포 내 Ca²⁺ 이온의 농도에 미치는 영향을 평가하기 위하여 형광 염료인 Fura-2AM을 사용하였다. Luteolin

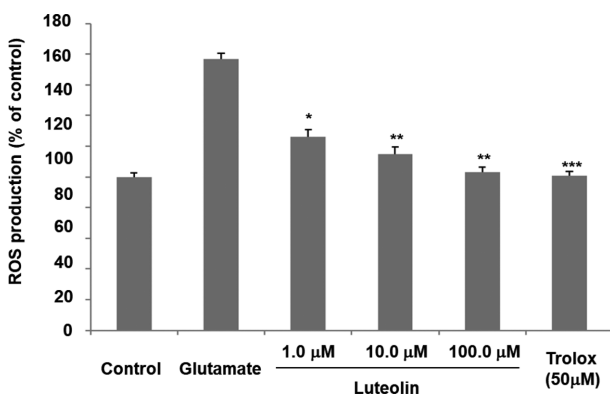


Fig. 3. Effect of luteolin (1.0, 10.0 and 100.0 mM) on reactive oxygen species production in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as mean \pm the standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group

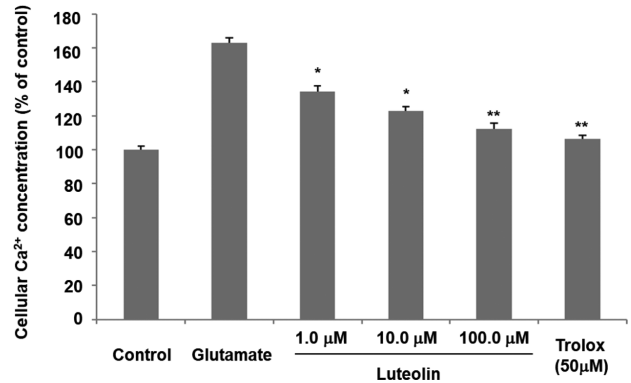


Fig. 4. Effect of luteolin (1.0, 10.0 and 100.0 mM) on calcium ion influx in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as mean \pm the standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group

의 투여가 과량의 glutamate에 의하여 증가한 Ca²⁺의 세포내 농도를 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시킴을 확인할 수 있었다. 1.0 mM의 luteolin 투여군에서는 17.7%의 감소를 보였으며 luteolin의 투여 농도가 증가할수록 Ca²⁺의 농도 또한 감소하여 100.0 mM의 luteolin을 투여한 실험군에서는 거의 양성 대조군인 Trolox 투여군과 비슷한 수준으로 Ca²⁺의 농도를 감소시켜 주었다(Fig. 4).

Luteolin이 미토콘드리아의 막전위 손상에 미치는 효과 - 글루타메이트의 신경독성은 미토콘드리아의 막 전위의 붕괴를 유발하여 apoptosis를 유발하는 여러 인자와 cytochrome C의 방출을 초래하여 세포를 사멸하게 한다.²⁶⁾ 미토콘드리아 막의 탈분극은 apoptosis의 유도에 매우 중요한 단계이며 이에 따라 세포 내 활성 산소의 증가를 야기하게 된다.²⁷⁾ 따라서 형광염료 rhodamine 123을 사용하여 미토콘드리아 막 전위를 측정하여 glutamate에 의한 미토콘드리아 손상에 대한 luteolin의 보호 효과를 평가하였다. 실험 결과, luteolin을 투여한 그룹에서 glutamate에 의하여 감소한 막전위를 농도 의존적으로 회복시켜 주었고 100.0 mM의 luteolin을 투여하였을 때 미토콘드리아의 막전위는 대조군을 100%로 하였을 때 93.2%에 해당하는 값으로 양성대조군인 trolox를 투여한 그룹과 비슷한 활성(95.4%)을 나타냈다(Fig. 5).

Luteolin이 글루타치온 함량과 항산화 효소 활성에 미치는 영향 - 글루타치온은 세포내 항산화제로서 glutamate의 신경 독성에 의하여 증가한 ROS의 생성을 억제하는 데에 매우 중요한 역할을 한다.²⁸⁾ 따라서, luteolin이 글루타치온 및 그와 결합성과 관련한 효소인 글루타치온 리덕타제 및 글루타치온 퍼옥시다아제의 활성에 미치는 영향을 평가하였다. Luteolin의 투여가 과량의 glutamate 투여에 의한 신경독성으로 인하여 감소한 글루타치온의 총 생성량을 농도 의존적으로 유의성 있게 증가시킴을 확인할 수 있었다. 1.0

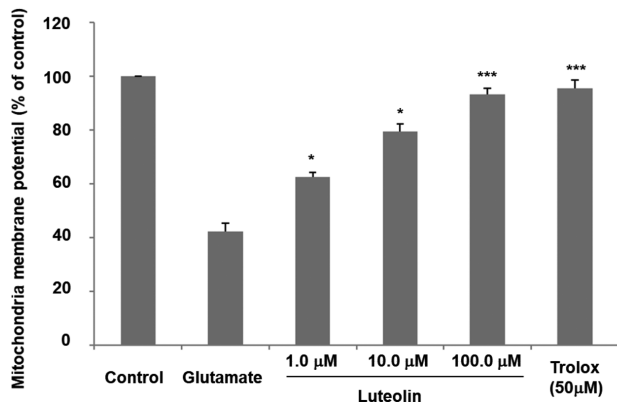


Fig. 5. Effect of luteolin (1.0, 10.0 and 100.0 mM) on glutamate-induced disruption of mitochondrial membrane potential in HT22 cells. Data expressed as mean ± the standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group

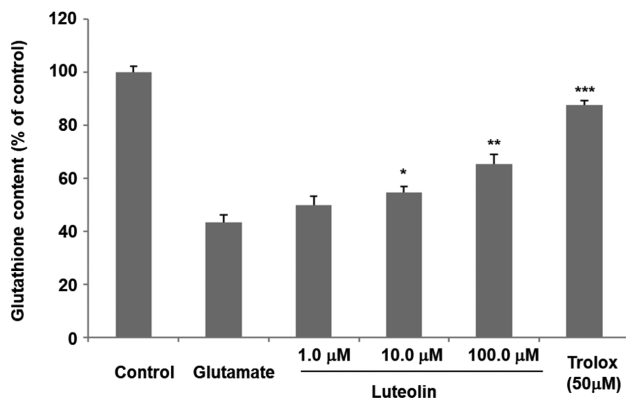


Fig. 6. Effect of luteolin (1.0, 10.0 and 100.0 mM) on glutathione level in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as mean ± the standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group

mM의 luteolin 투여군에서는 15.3%의 증가를 보였으며 luteolin의 투여 농도가 증가할수록 글루타치온 총 생성량이 증가하여 100.0 mM의 luteolin을 투여한 실험군에서는 glutamate만 투여한 군에 비하여 글루타치온의 함량이 50.1% 증가함을 보였다(Fig. 6). 또한, luteolin은 100.0 mM의 농도에서 glutamate만 투여한 군에 비하여 글루타치온 리덕타제의 활성을 71.5% 증가시켰고, 이는 양성대조군인 Trolox 투여군(78.1%)과 비슷한 수치였다(Fig. 7). Luteolin은 글루타치온 퍼옥시다제의 활성 또한 증가시켰는데 100 mM의 농도에서 glutamate만 투여한 군에 비하여 65.3% 증가시켰고, 양성대조군인 Trolox 투여군은 glutamate만을 투여한 군에 비하여 72.5% 증가시켜 이와 비슷한 수준이었다(Fig. 8).

Luteolin은 당근, 고추, 셀러리, 올리브, 페퍼민트 등과 같은 다양한 식품이나 약용으로 사용되는 식물에서 가장 흔하게

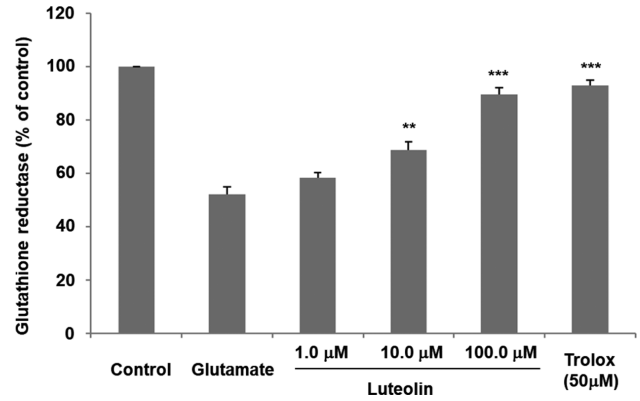


Fig. 7. Effect of luteolin (1.0, 10.0 and 100.0 mM) on glutathione reductase in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as mean ± the standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group

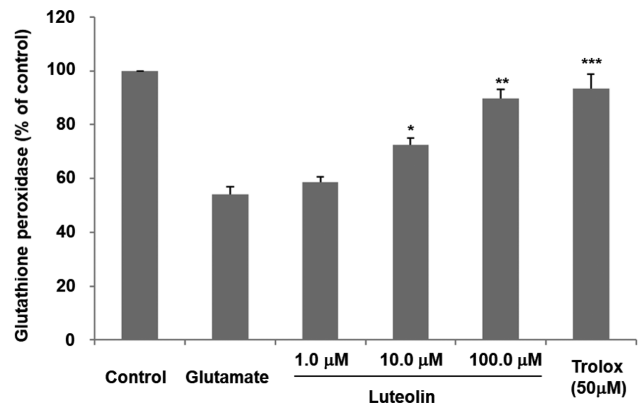


Fig. 8. Effect of luteolin (1.0, 10.0 and 100.0 mM) on glutathione peroxidase in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as mean ± the standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group

존재하는 플라보노이드 성분 중 하나이다.²⁸⁾ Luteolin은 지금까지 다양한 연구를 통하여 항암 활성, 항염 활성, 항산화 활성, 골다공증 치료 등과 같은 생리활성이 보고되어 있다.^{29,30)} 알츠하이머에 대한 연구도 보고되어 있지만 주로 *b*-amyloid에 대한 영향을 살펴본 논문이었으며, HT22세포에서 glutamate에 대한 영향을 보고한 것은 거의 발견할 수 없었다.³¹⁾ Luteolin은 구조가 비교적 복잡하지 않은 flavonoid의 구조를 가지고 있으며 작용기전을 연구한 결과 glutamate에 의한 신경세포의 사멸을 야기하는 산화적 스트레스에 대항하여 항산화 활성을 보임으로써 신경세포 보호 활성을 나타냄을 확인할 수 있었고, 향후 수미로 테스트나 수동회피 시험과 같은 동물 행동실험을 추가로 진행하여 좋은 결과를 얻는다면 알츠하이머 병과 같은 퇴행성 뇌신경계 질환의 치료제 및 예방약으로 개발할 수 있는 가능성이 있을 것으로 생각된다.

결 론

본 실험 결과를 종합하여 보면, 금은화 추출물로부터 분리한 luteolin이 glutamate의 흥분성 신경독성에 의한 신경세포의 사멸을 보호한다는 점을 확인할 수 있었다. Luteolin은 세포 내 활성 산소종의 생성을 감소시키고, Ca²⁺ 농도를 낮추어 주었으며, 미토콘드리아의 막전위를 정상으로 회복시켜주어 glutamate로 인하여 발생하는 신경세포의 사멸을 막아주는 역할을 하였고, 생체 내에서 강력한 항산화제로 작용하는 글루타치온의 생성을 증가시켰으며 glutathione reductase, glutathione peroxidase와 같은 효소의 활성을 증가시켰다. 이러한 연구 결과를 통하여 플라보노이드 성분인 luteolin의 신경세포 보호활성은 전반적으로 항산화 활성을 통하여 나타남을 확인할 수 있었다. 종합적으로 luteolin이 현대 큰 사회적 문제 중 하나인 하나인 알츠하이머 병의 치료 및 예방제의 후보 물질로서의 가능성이 있음을 시사하며 향후 동물 행동실험을 통하여 기억력이나 인지능 개선 활성을 평가하여 활성을 검증해 볼 만한 가치가 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성+(R&D, S3087870)”사업의 지원을 받아 수행된 연구결과임.

인용문헌

- Bradley, M. A., Markesbery, W. R. and Lovell, M. A. (2010) Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein in the brain in preclinical Alzheimer disease. *Free Rad. Biol. Med.* **48**: 1570-1576.
- Fiest, K. M., Roberts, J. I., Maxwell, C. J., Hogan, D. B., Smith, E. E., Frolkis, A. F., Cohen, A., Kirk, A., Pearson, D., Pringsheim, T., Venegas-Torres, A. and Jette, N. (2016) The prevalence and incidence of dementia due to Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Can. J. Neurol. Sci.* **43**: S51-S82.
- Folch, J., Petrov, D., Ettcheto, M., Abad, S., Sanchez-Lopez, E., Garcia, M. L., Olloquequi, J., Beas-Zarate, C., Auladell, C. and Camins, A. (2016) Current research therapeutic strategies for Alzheimer's disease treatment. *Neural Plast.* Article ID 8501693.
- Aisen, P. S., Gauthier, S., Ferris, S. H., Saumier, D., Haine, D., Garceau, D., Duong, A., Suhy, J., Oh, J., Lau, W. C. and Sampalis, J. (2011) Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease - a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the Alphase Study). *Arch. Med. Sci.* **7**: 102-111.
- Lin, M. T. and Beal, M. F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**: 787-795.
- Kim, M. S., Seo, J. Y., Oh, J., Jang, Y. K., Lee, C. H. and Kim, J. S. (2017) Neuroprotective effect of halophyte *Salicornia herbacea* L. is mediated by activation of heme oxygenase-1 in mouse hippocampal HT22 cells. *J. Med. Food* **20**: 140-151.
- Yan, M. H., Wang, X. L. and Zhu, X. W. (2013) Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Rad. Biol. Med.* **62**: 90-101.
- Carrano, A., Hoozemans, J. J. M., van der Vies, S. M., Rozemuller, A. J. M., van Horssen, J. and de Vries, H. E. (2011) Amyloid beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Antioxid. Redox. Signal* **15**: 1167-1178.
- Helmut, S. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 916-921.
- Mattson, M. P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**: 631-639.
- Kuhla, B., Haase, C., Flach, K., Luth, H. J., Arendt, T. and Munch, G. (2007) Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation. *J. Biol. Chem.* **282**: 6984-6991.
- Srivastava, S., Sithu, S. D., Vladykovskaya, E., Haberzettl, P., Hoetker, D. J., Siddiqui, M. A., Conklin, D. J., D'Souza, S. E. and Bhatnagar, A. (2011) Oral exposure to acrolein exacerbates atherosclerosis in apoE-null mice. *Atherosclerosis* **215**: 301-308.
- Sultana, R. and Butterfield, D. A. (2010) Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **19**: 341-353.
- Seidler, N. W. and Squire, T. J. (2005) A beta-polyacrolein aggregates: novel mechanism of plastic formation in senile plaques. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **335**: 501-504.
- Weon, J. B., Yang, H. J., Lee, B., Yun, B.-R., Ahn, J. H., Lee, H. Y. and Ma, C. J. (2011) Neuroprotective activity of the methanolic extract of *Lonicera japonica* in glutamate-injured primary rat cortical cells. *Pharmacog. Mag.* **7**: 284-288.
- Weon, J. B., Yang, H. J., Lee, B., Yun, B.-R. and Ma, C. J. (2011) Neuroprotective compounds isolated from the methanolic extract of *Lonicera japonica*. *Nat. Prod. Sci.* **17**: 221-224.
- Qi, L.-W., Chen, C.-Y. and Li, P. (2009) Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in Flos *Lonicerae Japonicae* by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **23**: 3227-3242.
- Jung, Y. S., Weon, J. B., Yang, W. S., Ryu, G. and Ma, C. J.

- (2018) Neuroprotective effects of Magnoliae Flos extract in mouse hippocampal neuronal cells. *Sci. Rep.* **8**: 9693.
19. Goodman, Y. and Mattson, M. P. (1994) Selected forms of *b*-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid *b*-peptide induced oxidative injury. *Exp. Neurol.* **128**: 1-12.
 20. Meldrum, B. S. (2002) Concept of activity-induced cell death in epilepsy: historical and contemporary perspectives. *Prog. Brain Res.* **135**: 3-11.
 21. Kim, D. H., Kim, D. W., Jung, B. H., Lee, J. H., Lee, H., Hwang, G. S., Kang, K. S. and Lee, J. W. (2019) Ginsenoside Rb2 suppresses the glutamate-mediated oxidative stress and neuronal cell death in HT22 cells. *J. Ginseng Res.* **43**: 326-334.
 22. Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P. and Schubert, D. (1998) The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J. Cell Biol.* **141**: 1423-1432.
 23. Song, J. H., Shin, M.-S., Hwang, G. S., Oh, S. T., Hwang, J. J. and Kang, K. S. (2018) Chebulinic acid attenuates glutamate-induced HT22 cell death by inhibiting oxidative stress, calcium influx and MAPKs phosphorylation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **28**: 249-253.
 24. Ishige, K., Schubert, D. and Sagara, Y. (2001) Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* **30**: 433-446.
 25. Kerksick, C. and Willoughby, D. (2005) The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2**: 38-44.
 26. Tobaben, S., Grohm, J., Seiler, A., Conrad, M., Plesnila, N. and Culmsee, C. (2011) Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. *Cell Death Differ.* **18**: 282-292.
 27. Park, J. S., Park, J. H. and Kim, K. Y. (2019) Neuroprotective effects of myristargenol A against glutamate-induced apoptotic HT22 cell death. *RSC Adv.* **9**: 31247-31254.
 28. Lopez-Lazaro, M. (2009) Distribution and biological activities of flavonoid luteolin. *Mini Rev. Med. Chem.* **9**: 31-59.
 29. Chen, C. Y., Kao, C. L. and Liu, C. M. (2018) The cancer prevention, anti-inflammatory and anti-oxidation of bioactive phytochemicals targeting the TLR4 signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 2729.
 30. Zheng, Li. (2021) Luteolin stimulates proliferation and inhibits late differentiation of primary rat calvarial osteoblast induced by high-dose dexamethasone via Sema3A/NRP1/Plexin A1. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **22**: 1538-1545.
 31. Nabavi, S. F., Braidy, N., Grotzi, O., Sobarzo-Sanchez, E., Daglia, M., Skalicka-Wonziak, K. and Nabavi, S. M. (2015) Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Res. Bull.* **119**: 1-11.
- (2022. 1. 26 접수; 2022. 2. 23 심사;
2022. 3. 2 게재확정)