



Neuroprotective effects of *Salacca wallichiana* extract against glutamate-induced oxidative stress in mouse Hippocampal HT22 cells

Ji Hun Byeon¹ · Ye Yeong Hong¹ · Jungwhoi Lee² · Thet Thet Mar Win³ · Su Su Hlaing⁴ · Song-I Han² · Jae Hoon Kim^{1,2}

쥐 해마 HT22 세포에서 글루타메이트 유도 산화 스트레스에 대한 *Salacca wallichiana* 추출물의 신경 보호 효과

변지훈¹ · 홍예영¹ · 이중희² · Thet Thet Mar Win³ · Su Su Hlaing⁴ · 한송이² · 김재훈^{1,2}

Received: 27 April 2023 / Accepted: 2 June 2023 / Published Online: 15 June 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract Glutamate is an excitatory neurotransmitter distributed in the central nervous system of mammals. However, high concentrations of glutamate are known to cause neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and stroke by causing nerve cell death. In this study, the antioxidant activity and neuroprotective effect of subtropical natural products were analyzed. Among 11 subtropical plant extracts mainly tested, *Sallacca wallichiana* extract (SE) showed the greatest free radical scavenging activity. Then, we confirmed through WST-1 assay that SE protected HT22 cells against glutamate-induced cell death

in a concentration-dependent manner. The protective effects of SE against glutamate-induced apoptosis in HT22 cells were also confirmed by flow cytometry analysis using Annexin V/PI double staining. We also confirmed using H₂DCF-DA single staining that SE inhibits glutamate-induced intracellular reactive oxygen species. And we were confirmed through that SE inhibited glutamate-induced phosphorylation of Mitogen-activated Protein kinases. Consequently, our results propose that SE may contribute to the development of therapeutics to prevent neurodegenerative diseases.

Keywords Apoptosis · Glutamate · HT22 cells · Mitogen-activated protein kinase · Reactive oxygen species · *Salacca wallichiana*

Jae-Hoon Kim (✉)
E-mail: kimjh@jejunu.ac.kr

Song-I Han (✉)
E-mail: hoyanbk07@jejunu.ac.kr

¹Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Science, Jeju National University, Republic of Korea

²Subtropical/tropical Organism Gene Bank, Jeju National University, Republic of Korea

³Department of Botany, Yangon University, Myanmar

⁴Dawei University, Tanintharyi Region, Myanmar

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.

서론

현대 사회는 고령화 사회로 접어들기 시작했으며, 2019 세계인구 전망 개정판에서는 한국을 포함한 대부분의 국가에 노인 인구의 증가를 정량화 했다. 그 결과 65세 이상 노인층의 인구 수가 2050년에는 약 3배 가까이 증가할 것으로 예측한다고 보고되었다[1]. 신경퇴행성 질환으로 알려진 Alzheimer disease, Parkinson disease, Huntington disease 등은 주로 노년층에서 많이 발생하기 때문에, neurodegenerative disorders 환자의 수도 또한 급격히 증가할 것으로 예상되고 있다[2]. 이러한 신경퇴행성 질환의 원인 중 하나로 보고된 것은 Oxidative stress로 인

해 발생하는 신경세포의 사멸이다[3]. Oxidative stress는 세포내 과도한 reactive oxygen species (ROS) 축적에 의해 체내의 prooxidant와 antioxidant의 불균형에 의해서 일어난다[4]. 신경계에서 과잉으로 발생한 ROS는 핵산, 단백질, 지질 및 세포 내 거대 분자들의 손상을 유발하여 apoptosis를 일으킨다[5]. 여러 다양한 요인들이 oxidative stress를 촉진할 수 있지만, 그 중 신경전달물질로 알려진 glutamate가 신경세포에 과도하게 분비되면 oxidative stress를 유발하는 것으로 보고되어 있다[3].

Glutamate는 포유류의 중추신경계에 분포하는 흥분성 신경전달물질로 기억, 인지, 학습, 그리고 신경 발달 등에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 하지만 과도한 glutamate는 신경세포에 독성을 일으키게 되고, 그로 인해 신경세포 사멸이 발생하여 여러 신경퇴행성질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 높은 농도의 glutamate로 유도되는 신경 세포 사멸은 glutamate receptor에 의해 발생하는 excitotoxicity와 non-glutamate receptor에 의해 유도되는 oxidative stress로 2가지 경로가 존재한다[6,7]. Excitotoxicity는 ionotropic glutamate receptor와 같은 N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor를 통해 세포 내 Ca^{2+} 을 과도하게 유입시켜 신경세포를 사멸로 이끈다[8]. 또 다른 경로인 oxidative stress는 cystine/glutamate antiporter를 통한 세포 내 cystine의 유입을 억제하여, 세포 내 항산화제인 Glutathione의 합성을 감소시키고, 결과적으로 ROS가 축적되어 신경세포 사멸을 일으킨다[9]. 쥐 해마 세포인 HT22 세포는 NMDA receptor와 같은 ionotropic glutamate receptor가 결여되어 있어, glutamate toxicity로 인해 발생하는 oxidative stress를 연구하기에 적합한 cell line으로 알려져 있다[10].

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 세포 성장, 분화, 그리고 세포 사멸 등 세포 내의 다양한 과정을 조절하는 serine/threonine protein kinase family로, extracellular protein kinase (ERK) family, p38 family, 그리고 c-Jun-N-terminal kinase (JNK) family가 속한다. extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway는 cell proliferation, differentiation, survival 등에 관여하는 것으로 알려져 있지만 최근 연구들에 의하면 과도하게 인산화된 ERK는 Oxidative neuronal injury에 결정적인 역할을 한다고 보고되었다[11]. JNK와 p38 pathway는 cytokines, ultraviolet, irradiation, heat shock과 같은 stress 자극에 반응하여 cell differentiation과 apoptosis에 관여하는 것으로 알려져 있다[12]. 최근에 증가하는 증거에 의하면 세포 내 과도한 ROS의 축적은 MAPK signaling pathway를 활성화시켜 신경세포를 사멸로 이끄는 것으로 보고되고 있다[13,14].

신경퇴행성질환을 치료하기 위해 다양한 치료법이 제시되고 있지만, 대부분이 부작용을 나타내고 있어 현재까지 완벽한 치료제는 개발되지 못한 상황이다. 따라서 부작용이 적은 각종 천연물을 통해서 신경세포를 보호할 수 있는 자연 소재의 개발이 요구되고 있다. Salacca는 미얀마, 태국 및 베트남 등 동남아시아에 자생하는 약 20종의 야자속이다[15]. *Salacca wallichiana*는 salacca속에 속하는 종 중 하나이며, 아시아 열대 지방에 널리 분포하며 야자과에 속하는 식물로 가시가 덮여 있고 비늘 모양을 하고 있다[16]. 하지만 아직까지 *Salacca wallichiana*의 효능에 대한 연구는 거의 알려진 바가 없다.

따라서, 본 연구에서는 신경 퇴행성 질환의 예방과 치료에 효과적인 후보물질을 찾기 위하여 여러 아열대 천연물의 free

radical scavenging activity를 측정하였다. 또한 DPPH radical scavenging activity가 뛰어났던 *Salacca wallichiana* extract (SE)를 가지고 HT22 세포를 대상으로 하여 glutamate toxicity에 의해 발생하는 oxidative stress로부터 아열대 천연물의 신경 보호 효과 및 관련된 기전 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험 재료 준비

Subtropical plants extracts (*Acronychia pedunculata*, *Allamanda carhartica*, *Cananga odorata*, *Coccinia cordifolia*, *Dianella ensifolia*, *Dillenia indica*, *Gonocaryum lobbianum*, *Gynandropsis gynandra*, *Mussaenda macrophylla*, *Salacca wallichiana*, *Sauropus albicans* extracts)는 한국생명공학연구원(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KRIBB, Daejeon, Korea)을 통해 분양을 받아서 실험에 사용하였다. 분양 받은 추출물들은 Methyl alcohol 99.9% HPLC grade를 용매로 사용하여 45 °C에서 3일간(15분간 sonication 후 2시간 정치, 10회) 추출한 후 filter한 후, Rotary Evaporator (N=1000SWD, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축을 진행하였다. 농축된 건조기(Modulspin 40, Biotron Corporation, Calgary, Canada)를 이용하여 건조하였다. 모든 추출과정은 한국생명공학연구원 해외생물소재센터에서 수행하였고, 분양 받은 추출물은 저온실에 보관하여 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazine-1-yl (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)를 100% MeOH HPLC grade에 희석하여 사용하였으며, DPPH 시약 0.2 mM과 아열대 plant extracts 500 µg/mL을 30분 동안 상온에서 암반응 시킨 후 Microplate Reader를 이용하여 흡광도 525 nm에서 분석하였다. 각 Sample의 Radical scavenging activity는 다음과 같이 계산하였다.

DPPH radical scavenging activity (%)

$$= [1 - \text{Sample absorbance}/\text{Control absorbance} \times 100 (\%)]$$

세포배양

쥐 해마 HT22 세포는 한국생명공학연구원(KRIBB)에서 분양을 받아 실험에 사용되었다. HT22 세포는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에 10% FBS (Gibco BRL), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양되었다. HT22 세포는 2-3일 간격으로 계대 배양하였다.

Cell viability 측정

Glutamate toxicity에 대한 extract의 신경 보호 효과를 측정하기 위해 HT22 세포를 24 well plate에 1.5×10^4 cells/well의 농도로 seeding 후 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양시켰다. 추출물은 최종 20 µg/mL의 농도로 전처리 하였고 2시간 후 4 mM L-Glutamic acid potassium salt monohydrate (Sigma-

Aldrich)를 24시간 동안 처리했다. 24시간 반응 후 WST-1 assay (Dogen bio, Seoul, Korea)를 25분 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도로 측정하였다.

세포 사멸 측정

HT22 세포에서 glutamate로 인한 세포 사멸 유형을 확인하기 위해 Flow cytometry를 통해 분석을 진행했다. HT22 세포를 6 well plate에 10×10^4 cells/well의 농도로 seeding한 후 SE extract을 5, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 전처리하고 2시간 후에 glutamate 4 mM을 처리했다. 24시간 후에 medium 상층액과 HT22 세포를 회수하여 centrifuge를 통해 cell down된 것을 DPBS로 washing 하였다. 마지막으로 Annexin V-FITC와 PI를 이용하여 15분 간 37 °C에서 반응시키고 Flow cytometry를 이용하여 분석하였다.

세포 내 ROS 측정

Glutamate로 발생하는 세포 내 ROS를 측정하기 위해 HT22 세포를 6 well plate에 seeding 하였고, 24시간 후, SE를 2시간 전처리하고 나서 glutamate 4 mM에 12시간 노출시켰다. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, Sigma)를 이용하여 15분간 염색반응을 시킨 후에 cell을 회수하고 나서 PBS로 washing 후 flow cytometry를 통해 분석하였다.

Western blot에 의한 단백질 발현 측정

HT22 세포는 차가운 PBS로 2회 세척한 후 lysis buffer (Sodium vanadate, sodium fluoride sodium pyrophosphate, PMSF, protease inhibitor cocktail)를 이용하여 단백질을 회수하였다. 같은 양의 단백질을 SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리한 뒤 nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)으로 이동시킨 뒤 5% skim milk로 blocking하였다. 1차 항체로 phospho-ERK (Thr202/Tyr204), ERK, phospho-JNK (Thr183/Tyr185), JNK, phospho-p38 (Thr180/Tyr182), p38 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)는 1X TBST를 이용하여 1:1000으로 희석하였고, GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)는 1:4000으로 1X TBST로 희석한 뒤 4 °C에서 overnight으로 반응시켰다. 2차 항체인 Donkey anti-Mouse IgG Antibody, Donkey anti-Rabbit IgG Antibody (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)는 1:4000으로 1X TBST를 이용하여 희석한 뒤 상온에서 1시간 반응시켰다. 단백질은 ECL kit (Biosesang, Sungnam, Korea)을 이용하여 현상하였다.

통계처리

각 실험 데이터는 백분율과 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 나타냈으며 모든 측정값은 T-test를 통해 대조군과 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가되었다.

결과 및 고찰

아열대식물 추출물의 항산화 효능 분석

뇌는 신체에서 대사적으로 가장 활발한 기관으로, 총 산소의 약 20%를 사용한다. 그럼에도 불구하고 뇌는 산화 환원 활성 금속

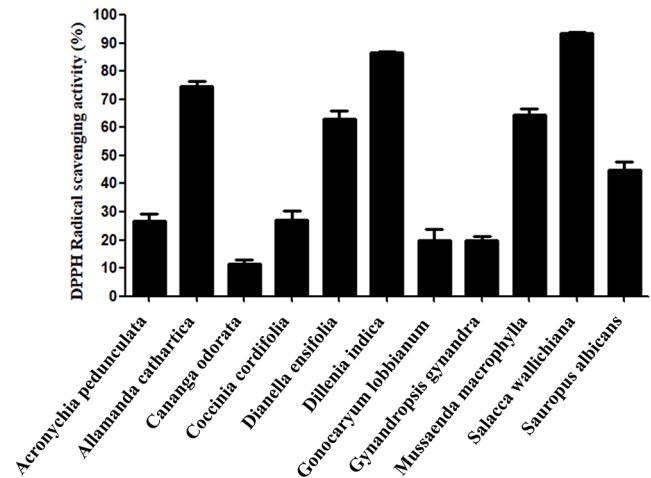


Fig. 1 DPPH radical scavenging activity of Sample screening subtropical extracts

이온의 존재 및 항산화 효소의 부족으로 인해 free radical 손상에 취약하다[19,20]. Free radical은 반응력이 높고 불안정한 비공유 전자쌍을 가지고 있어서 여러 생체물질과 쉽게 반응하게 되고, 끊임없이 체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 손상을 초래하거나 세포 항상성을 파괴하여 신경퇴행성질환 및 압 등의 원인이 된다[21,22]. 따라서 free radical로부터 세포를 보호할 수 있는 항산화 물질 및 천연 약재를 찾는 것이 중요하다. DPPH는 free radical을 가지고 있는 물질로 짙은 자색을 띠는데, 이것이 항산화제와 반응하여 free radical이 제거되면 열은 노란색으로 변하는 정도를 측정하는 방법이다[23,24]. 본 연구에서는 아열대에서 자생하고 있는 식물 11종의 추출물을 가지고 DPPH radical scavenging activity를 통해 sample screening 과정을 진행하였다. 그 결과 Subtropical plant extracts 중 *S. wallichiana*는 93.4%, *D. indica*는 85.5%, *A. cathartica*는 74.6%로 뒤를 이었고, *M. macrophylla* 64.6%, *D. ensifolia*는 63.0%의 free radical 소거능을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 1). 천연물에서 유래한 다양한 항산화 화합물은 free radical을 제거할 뿐만 아니라 세포 생존 촉진 또는 세포 사멸 신호 전달 경로의 조절자 역할을 함으로써, 신경보호 활성을 가지고 있다는 것이 보고되었다[25,26]. 이렇듯 천연물에 존재하는 항산화제는 신경세포를 보호하는 역할을 할 수 있으며 신경퇴행성 질환의 치료제가 될 수 있다[27]. 따라서 항산화 활성이 높게 나타난 5가지의 추출물을 가지고 신경보호효과 측정을 위해 HT22 세포에서 실험을 진행했다.

SE의 wst-1 assay를 통한 뇌신경세포보호 효과 활성 측정

중추신경계에 분포하는 신경전달물질인 glutamate는 기억, 인지, 학습 등에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[6]. 하지만 과도하게 분비된 glutamate는 신경세포에 독성을 유발하여 세포 사멸을 유도한다[7]. WST-1 assay는 세포 내의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 tetrazolium salts (WST-1)에서 formazan이라는 발색물질이 생성되는 것을 통해 확인하는 방법이며, 이는 살아있는 세포 수의 정비례한다. 본 연구에서는 glutamate toxicity로 인한 cell death에서 추출물들이 neuroprotective effect

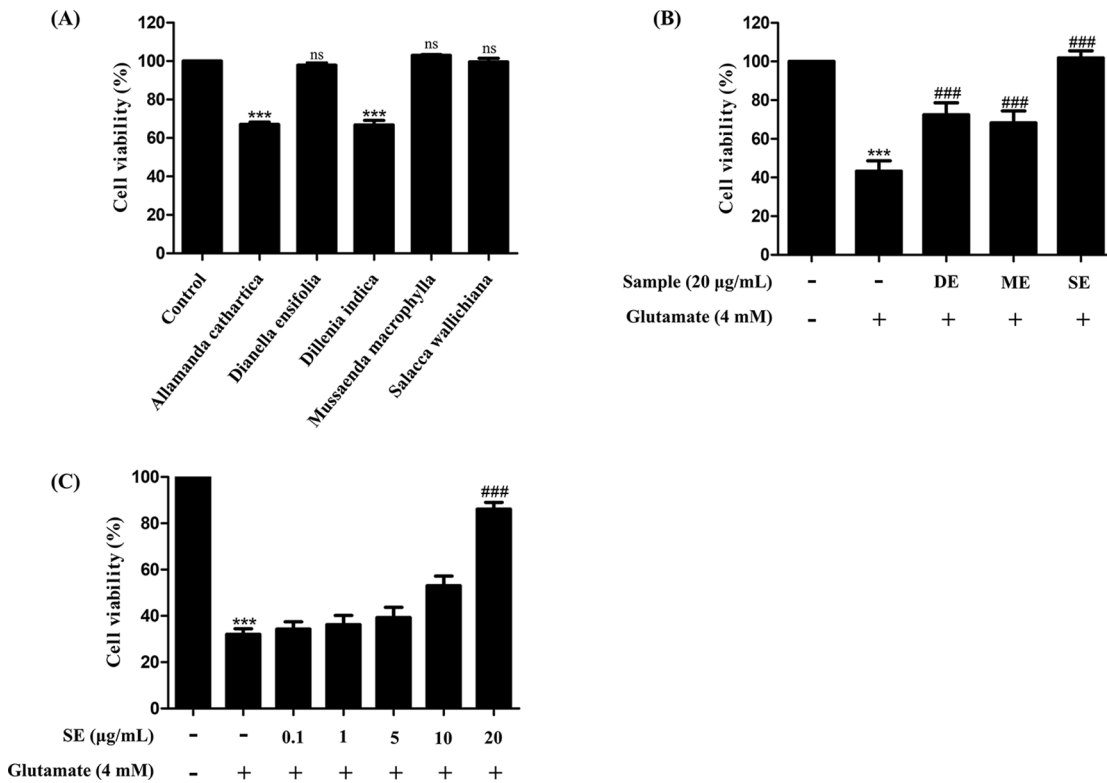


Fig. 2 The neuroprotective effects of SE on glutamate-induced toxicity in HT22 cells. Cell viability was determined WST-1 assay. HT22 cells were incubated 24 well plate in 1.5×10^4 cells/well. (A) Plant extracts in cytotoxicity measurement. (B) Pre-treated 20 µg/mL of non-cytotoxicity plant extracts for 2 h, next exposed to glutamate 4 mM for 24 h. (C) Pre-treated different concentration SE extracts for 2 h, next exposed to glutamate for 24 h. Data evaluate SDP-value *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ mean compared control group, #### $p < 0.001$, ### $p < 0.01$, # $p < 0.05$ mean compared only glutamate group

를 가지고 있는지 확인하기 위해 WST-1 assay를 사용하여 평가하였다. 먼저 HT22 세포에서 자체 독성을 가지고 있는지 확인하기 위해 추출물들만 단독으로 처리한 결과 선정된 5가지 추출물 중 *D. ensifolia*, *M. macrophylla*, *S. wallichiana* extracts에서 독성효과가 없는 것으로 나타났다(Fig. 2A). Glutamate로 인한 cell death로부터 신경 보호 효과를 가지고 있는지 확인한 결과, *S. wallichiana* extracts (SE)가 낮은 농도에서 높은 신경 보호 효과를 가지는 것으로 나타났다(Fig. 2B). 따라서 SE를 농도별로 전 처리하여 실험한 결과, glutamate만 처리한 구간에서는 control 대비 약 32.0%로 cell viability가 감소하였지만, SE를 농도별로 전처리한 결과 20 µg/mL에서 약 86.1%로 신경세포를 보호하는 효과를 보였다(Fig. 2C).

SE의 glutamate에 의한 apoptosis 억제 효과

Glutamate는 여러 세포 사멸 유형에서 신경세포를 apoptosis로 유도하는 것으로 보고되어 있다[28]. 따라서 SE가 glutamate toxicity로 일어나는 apoptosis로부터 HT22 세포를 보호하는지 확인하기 위해 Annexin V와 PI로 double staining을 시킨 후 Flow cytometry를 통해 분석하였다. Control군에 비해 glutamate만 처리한 구간에서는 apoptotic cell population이 약 80.8%로 유의성 있게 증가하여 apoptosis를 유도하는 것을 확인했다. 반면 SE를 전 처리했을 때 apoptotic cell population은 5 µg/mL

에서 약 32.2%, 20 µg/mL에서 약 6.6%로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 위 결과를 통해 SE는 glutamate toxicity로 유도되는 apoptotic cell death로부터 신경세포를 보호하는 것을 확인하였다. 이전에 보고된 SE에 대한 식물화학 연구에 따르면 SE에는 carbohydrates, glycosides, phenolic compounds, steroids 및 terpenoids 등이 존재한다고 알려져 있다[29]. 그 중에서 terpenoid, phenol compound은 항산화 효과 및 신경보호 효과가 있다고 알려져 있다[30-33]. 이러한 SE의 신경보호 효과는 SE 추출물 안에 들어있는 다양한 phytochemical 중에 terpenoid와 phenol compound의 함량이 높기 때문이라고 예상된다.

세포 내 활성 산소종 축적 억제 효과

ROS는 호흡을 하는 생물에서 생성되기도 하며 외부물질을 해독하는 과정, 세포 내 다양한 물질대사 과정에서도 발생된다[34]. ROS가 체내에 적정량이 존재할 때에는 생체방어 과정 및 세포 내의 second messenger로서 신호 전달에 중요한 역할을 한다[36,37]. 하지만 항산화제의 손실 및 특정 효소의 활성화 등에 의해 ROS가 과도하게 축적될 경우 산화적 스트레스가 발생하여 신경세포 사멸을 유도할 수 있다[3,21]. 체내에는 여러 antioxidant (Glutathione, Super oxide dismutase, catalase)가 존재하지만, 신경세포의 경우 다른 기관에 비해 항산화 효소의 발현 수준이 낮고, 세포 재생능력이 제한되어 있기 때문에

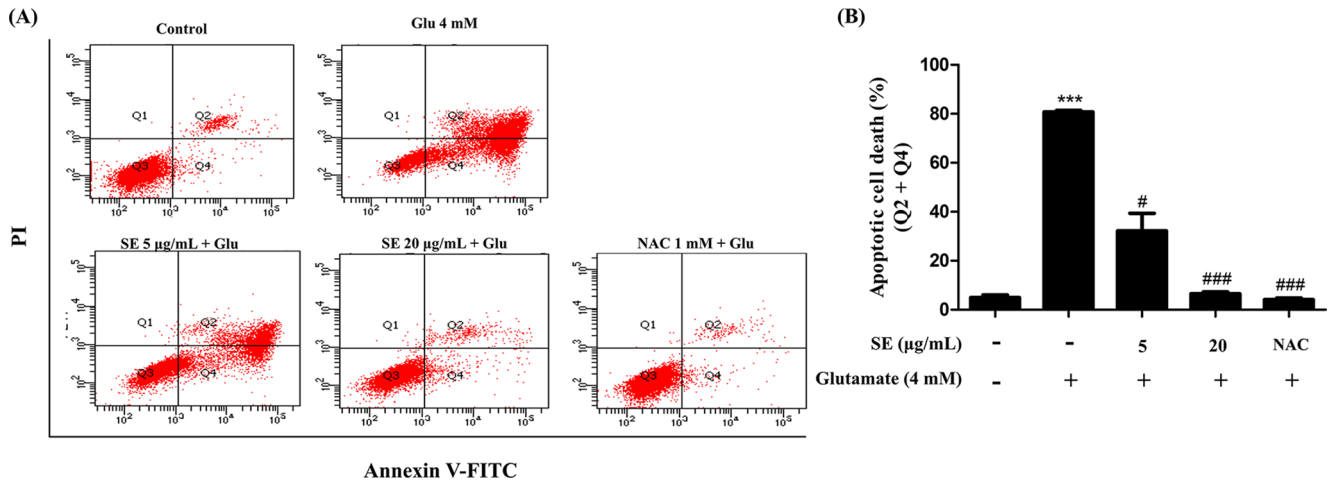


Fig. 3 SE protects against glutamate-induced apoptosis in HT22 cells. (A) Cells were incubated 24 h then pre-treated SE (5, 20 µg/mL) for 2 h, then exposure glutamate for 24 h. Cells were stained with Annexin V/PI. (B) Quantitative analysis of the histogram. Data evaluate SDP-value *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ mean compared control group, ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ mean compared only glutamate group

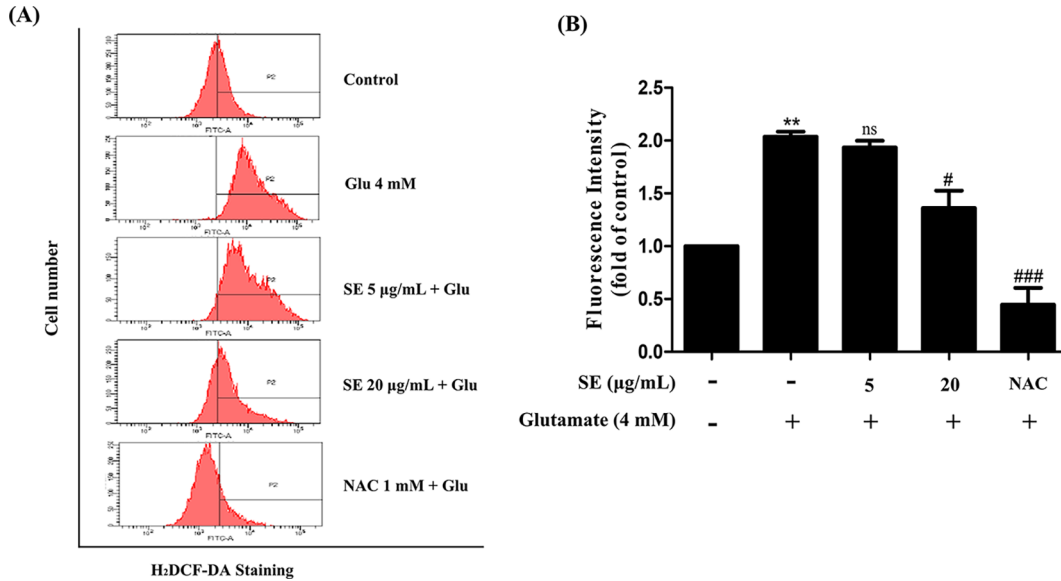


Fig. 4 Pre-treatment of SE inhibits intracellular ROS accumulation by glutamate in HT22 cells. (A) Cells were incubated 24 h then pre-treated SE (5, 20 µg/mL) for 2 h, then exposure glutamate for 24 h. Cells were stained with H₂DCFDA. (B) Quantitative analysis of the histogram. Data evaluate SDP-value *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ mean compared control group, ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ mean compared only glutamate group

oxidative stress로 인해 발생하는 신경 세포 사멸은 뇌에 매우 치명적이다[38-40]. 따라서 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호할 수 있는 천연 약재를 찾는 것이 중요하다. SE가 glutamate toxicity로 인해 발생하는 세포 내 과도한 ROS의 축적을 억제하는지 확인하기 위해 H₂DCFDA로 염색하여 flow cytometry를 통해 측정했다. 그 결과 control군에 비해 glutamate를 단독으로 처리한 구간에서 약 2.03배로 세포 내 ROS가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 SE를 농도별로 처리하였을 때 5 µg/mL에서 약 1.93배, 20 µg/mL에서 약 1.36배로 glutamate로 인해 발생하는 세포내 ROS 축적을 억제하는 것을 확인했다(Fig. 4). 앞서 free radical scavenging activity에서 SE

의 free radical 소거능이 뛰어났던 것과 연관되어 SE안에서 다양한 항산화 화합물들이 시너지 효과를 발휘함으로써 신경세포를 보호하는 것으로 추측된다[29-33,41]. 또한 산화적 스트레스로부터 일어나는 여러 질병들을 예방 및 치료하는데 효과적인 치료제가 될 것으로 예상된다.

SE의 MAPK signaling활성화에 미치는 효과

Mitogen-activated protein kinases (MAPK)는 serine/threonine protein kinases family에 속하며, cell growth, differentiation, cell death를 포함하는 여러 cellular processes에 관여하는 것으로 알려져 있다[13]. 하지만 oxidative stress로 인해 발생하는

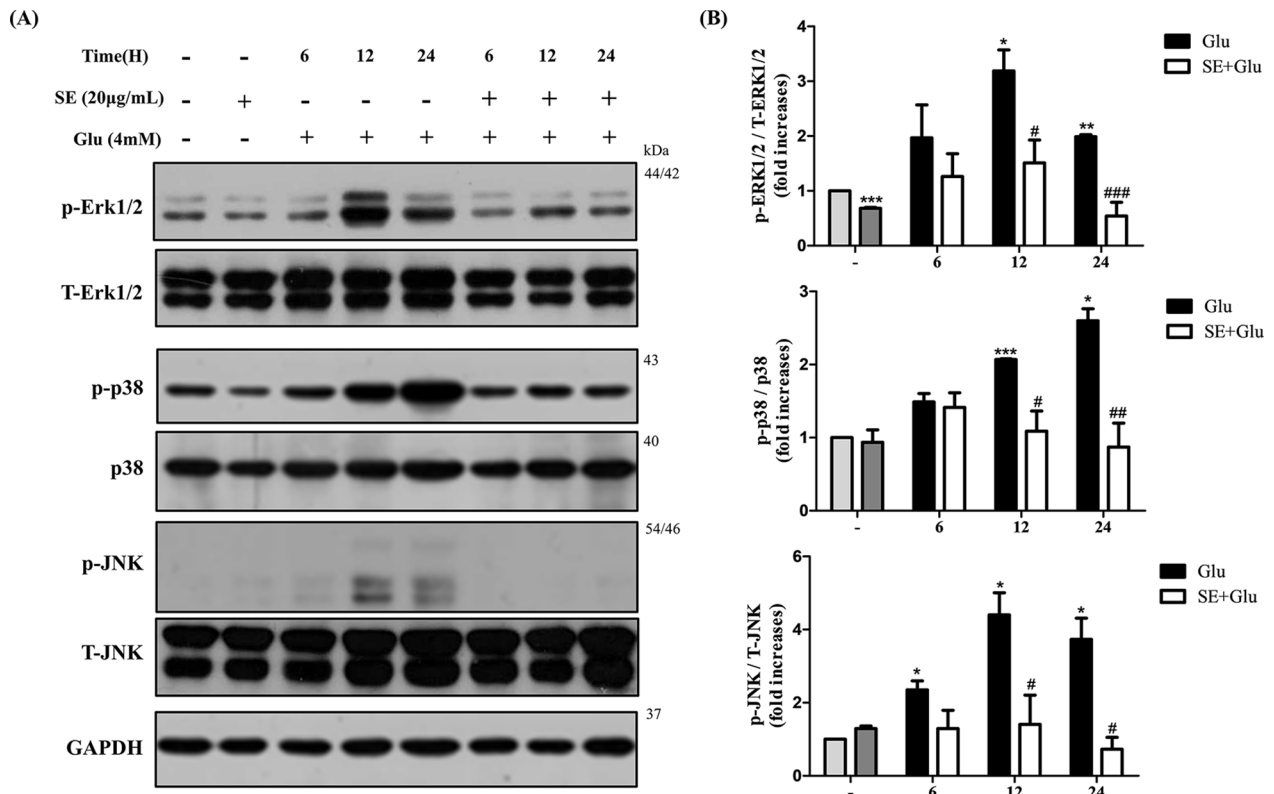


Fig. 5 SE suppresses the phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) by glutamate-induced oxidative stress in HT22 cells. Cells were treated with or without 20 µg/mL of SE for 2 h and then treated with 4 mM glutamate for the indicated time. Protein expression levels were measured by western blot using MAPKs antibodies. The relative intensity of band was used by Image J software. Data evaluate SDP-value ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05 mean compared control group, ####*p* < 0.001, ###*p* < 0.01, #*p* < 0.05 mean compared only glutamate group.

MAPK family의 과도한 인산화는 신경세포사멸을 유도한다는 증거가 늘어나고 있다[42,43]. 본 연구에서는 SE가 glutamate로 인해 일어나는 MAPK signaling pathway의 인산화를 억제하는 지 알아보기 위해 Western blot을 진행하였다. 그 결과 glutamate만 처리하였을 때, p-ERK의 인산화는 6시간에서 1.97배, 12시간에서 3.19배로 증가하였다가, 24시간에서는 1.99배로 감소하였고, p-p38의 인산화는 1.49, 2.07, 2.60배로 시간의존적으로 증가하는 모습을 보였다. p-JNK의 인산화는 6시간에서 2.35배, 12시간에서 4.40배로 증가하였다가 24시간에서는 3.73배로 약간 감소하는 경향을 보였다. 하지만 SE를 전 처리하였을 경우, glutamate로 발생하는 MAPK의 인산화를 유의하게 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 5). SE는 MAPK의 인산화를 차단함으로써 glutamate로 유도되는 apoptosis로부터 HT22 세포를 보호하는 것으로 보인다. 최근에 증가하는 연구에 따르면 ERK kinase inhibitor인 U-0126, P38 kinase inhibitor인 SB202190, JNK kinase inhibitor인 SP600125는 glutamate로 유도된 산화 스트레스로부터 신경세포를 보호한다고 보고되고 있다[28]. 또한, MAPK signaling pathway의 specific한 inhibitor들은 신경퇴행성 질환의 치료 전략이 될 수도 있다[44,45]. 따라서 SE는 MAPK signaling pathway의 specific한 inhibitor와 작용할 수 있으며, 신경퇴행성 질환의 예방 및 치료에 있어서 뛰어난 효능을 보일 수 있을 것이라 예상된다. 노인 인구가 증가함에 따라 노화와 관련된 신

경 퇴행성 질환 및 기억력 장애가 주요 문제가 되고 있다. 신경 퇴행성 질환의 치료 목적으로 사용되고 있는 약물은 장기적으로 사용할 경우 여러 부작용을 일으킬 가능성이 높다[48]. 그에 반해, 우수한 효능과 적은 부작용을 가진 천연물들이 신경 퇴행성 질환에 잠재적인 대안이 될 수 있다[49]. 우리의 연구에서 SE의 뛰어난 free radical scavenging activity를 확인하였고, SE가 glutamate로 유도 cell death로부터 HT22 세포를 보호하는 것을 입증하였다. 또한 고농도의 glutamate로 인해 발생하는 세포 내 ROS의 축적으로부터 세포를 보호하는 것을 확인하였다. 더 나아가 oxidative stress로 인해 발생하는 MAPKs의 인산화를 억제함으로써 신경세포를 보호하는 것을 확인했다. 따라서 SE는 신경세포의 oxidative stress를 표적으로 하여 신경퇴행성질환을 치료하기 위한 새로운 요법으로 제시될 수 있으며, 이러한 천연물은 효과적인 치료제로서 더 큰 잠재력을 이끌어낼 수 있을 것으로 예상된다.

초 록

Glutamate는 포유류의 중추신경계에 분포하는 흥분성 신경전달물질로, 기억, 인지, 그리고 학습 등에 있어서 중요한 역할을 한다. 하지만 고농도의 Glutamate는 신경세포에 독성을 유발하여

신경세포사멸을 유도함으로써 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중 등의 신경퇴행성질환을 일으키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 아열대 천연물의 항산화 활성과 신경보호 효과를 분석하였다. 11종의 아열대 추출물 중에서 *Salacca wallichiana* 추출물 (SE)의 라디칼 소거활성이 뛰어난 것으로 나타났다. 그리고 SE의 신경보호 효과를 조사한 결과 glutamate로 유도되는 cell death로부터 신경세포를 보호하였다. 또한 glutamate로 유도되는 apoptosis로부터 HT22 세포를 보호하는 효과는 Annexin V와 PI로 염색한 후 flow cytometry를 통해 분석되었다. 추가적으로 H₂DCFDA 염색을 이용하여 SE가 glutamate로 유도되는 세포 내 활성 산소 종 (ROS)을 억제한다는 것을 확인했다. SE의 신경보호 효과는 oxidative stress로 유발되는 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway를 억제함으로써 신경세포를 보호하는 것으로 나타났다. 결과적으로 SE가 신경퇴행성질환을 예방하기 위한 치료제 개발에 기여할 수 있음을 나타낸다.

Keywords 글루타메이트 · 신경보호 · 신경세포 · 아열대 추출물 · 활성 산소종

감사의 글 본 연구는 2016년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다(2016R1A6A1A03012862). HT22 세포를 배양해주신 이재란 연구원님께 감사의 말을 드립니다.

References

- Nations U (2019) Department of Economic and Social Affairs World population prospects. The Population Division of the UN Department of Economic and Social Affairs. World Population Prospects 2019, New York
- Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA (2019) Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology* 15: 565–581. doi: 10.1038/s41582-019-0244-7
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689–695. doi: 10.1126/science.7901908
- Gandhi S, Abramov AY (2012) Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012: 428010. doi: 10.1155/2012/428010
- Liu Z, Zhou T, Ziegler AC, Dimitrion P, Zuo L (2017) Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017: 2525967. doi: 10.1155/2017/2525967
- McEntee WJ, Crook TH (1993) Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology* 111: 391–401. doi: 10.1007/BF02253527
- Greene JG, Greenamyre JT (1996) Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Progress in neurobiology* 48: 613–634. doi: 10.1016/0301-0082(96)00006-8
- Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J neurobiol* 23: 1261–1276. doi: 10.1002/neu.480230915
- Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT (1989) Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2: 1547–1558. doi: 10.1016/0896-6273(89)90043-3
- Kritis AA, Stamoula EG, Paniskaki KA, Vavilis TD (2015) Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontiers in cellular neuroscience* 9: 91. doi: 10.3389/fncel.2015.00091
- Chu CT, Levinthal DJ, Kulich SM, Chalovich EM, DeFranco DB (2004) Oxidative neuronal injury: the dark side of ERK1/2. *Eur J Biochem* 271: 2060–2066. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04132.x
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37–40. doi: 10.1038/35065000
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B-e, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22: 153–183. doi: 10.1210/edrv.22.2.0428
- Runchel C, Matsuzawa A, Ichijo H (2011) Mitogen-activated protein kinases in mammalian oxidative stress responses. *Antioxidants & redox signaling* 15: 205–218. doi: 10.1089/ars.2010.3733
- Govaerts R, Dransfield J (2005) World checklist of palms. Royal Botanic Gardens, Kew. UK
- Salacca wallichiana - Palmpedia - Palm Grower's Guide. https://www.palmpedia.net/wiki/Salacca_wallichiana.
- Chung T-W, Lee JH, Choi H-J, Park M-J, Kim E-Y, Han JH, Jang SB, Lee S-O, Lee SW, Hang J (2017) Anemone rivularis inhibits pyruvate dehydrogenase kinase activity and tumor growth. *J Ethnopharmacol* 203: 47–54. doi: 10.1016/j.jep.2017.03.034
- Park J-W, Kwon O-K, Ryu HW, Paik J-H, Paryanto I, Yuniato P, Choi S, Oh S-R, Ahn K-S (2018) Anti-inflammatory effects of *Passiflora foetida* L. in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages. *International J Mol Med* 41: 3709–3716. doi: 10.3892/ijmm.2018.3559
- Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine* 23: 134–147. doi: 10.1016/S0891-5849(96)00629-6
- Watts ME, Pocock R, Claudianos C (2018) Brain energy and oxygen metabolism: emerging role in normal function and disease. *Frontiers in molecular neuroscience* 11: 216. doi: 10.3389/fnmol.2018.00216
- Halliwell B, Gutteridge JM (2015) Free radicals in biology and medicine. Oxford university press, USA
- Kalam S, Gul MZ, Singh R, Ankati S (2015) Free radicals: Implications in etiology of chronic diseases and their amelioration through nutraceuticals. *Pharmacologia* 6: 11–20. doi: 10.5567/pharmacologia.2015.11.20
- Sharma OP, Bhat TK (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry* 113: 1202–1205. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.08.008
- Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 26: 211–219
- Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA (2010) Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules* 15: 7792–7814. doi: 10.3390/molecules15117792
- Vaidya AD, Devasagayam TP (2007) Current status of herbal drugs in India: an overview. *J Clin Biochem Nutr* 41: 1–11. doi: 10.3164/jcbs.2007001
- Moosmann B, Behl C (2002) Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 11: 1407–1435. doi: 10.1517/13543784.11.10.1407
- Fukui M, Song J-H, Choi J, Choi HJ, Zhu BT (2009) Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Eur J Pharmacol* 617: 1–11. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.059
- Ragasa CY, Ting JU, Ramones MV, Tan M, Lerom RR, Linis VC, Shen C-C (2016) Chemical constituents of *Salacca wallichiana* mart. *Int J Curr Pharm Res* 7(4): 186–189
- Kwon J, Hwang H, Selvaraj B, Lee JH, Park W, Ryu SM, Lee D, Park J-S, Kim HS, Lee JW (2021) Phenolic constituents isolated from *Senna tora* sprouts and their neuroprotective effects against glutamate-induced oxidative stress in HT22 and R28 cells. *Bioorganic Chem* 114: 105112. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105112
- Li G, Min B-S, Zheng C, Lee J, Oh S-R, Ahn K-S, Lee H-K (2005) Neuroprotective and free radical scavenging activities of phenolic compounds from *Hovenia dulcis*. *Archives of Pharmacol Research* 28: 804–809. doi: 10.1007/BF02977346

32. GRAßMANN J (2005) Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamins & Hormones* 72: 505–535. doi: S0083-6729(05)72015-X
33. González-Cofrade L, de Las Heras B, Ticona LA, Palomino OM (2019) Molecular targets involved in the neuroprotection mediated by terpenoids. *Planta Medica* 85: 1304–1315. doi: 10.1055/a-0953-6738
34. Poli G, Albano E, Dianzani MU (1993) Free radicals: from basic science to medicine. Basel: Birkhauser
35. Kandaswami C, Middleton Jr E (1994) Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Free Radicals in Diagnostic Medicine: A Systems Approach to Laboratory Technology, Clinical Correlations, and Antioxidant Therapy*: 351–376. doi: 10.1007/978-1-4615-1833-4_25
36. Rhee SG, Chang T-S, Bae YS, Lee S-R, Kang SW (2003) Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol* 14: S211–S215. doi: 10.1097/01.ASN.0000077404.45564.7E
37. Wood GE, Young LT, Reagan LP, Chen B, McEwen BS (2004) Stress-induced structural remodeling in hippocampus: prevention by lithium treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 3973–3978. doi: 10.1073/pnas.0400208101
38. Cao X, Fang Y (2015) Transducing oxidative stress to death signals in neurons. *J Cell Biol* 211: 741. doi: 10.1083/jcb.201510105
39. Mattson MP, Magnus T (2006) Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 7: 278–294. doi: 10.1038/nrn1886
40. Park H-J, Kim H-N, Kim CY, Seo M-D, Baik S-H (2021) Synergistic protection by isoquercitrin and quercetin against glutamate-induced oxidative cell death in HT22 cells via activating Nrf2 and HO-1 signaling pathway: Neuroprotective principles and mechanisms of *Dendropanax morbifera* leaves. *Antioxidants* 10: 554. doi: 10.3390/antiox10040554
41. Song JH, Kang KS, Choi Y-K (2017) Protective effect of casuarinin against glutamate-induced apoptosis in HT22 cells through inhibition of oxidative stress-mediated MAPK phosphorylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27: 5109–5113. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.10.075
42. Yang E-J, Kim G-S, Jun M, Song K-S (2014) Kaempferol attenuates the glutamate-induced oxidative stress in mouse-derived hippocampal neuronal HT22 cells. *Food Funct* 5: 1395–1402. doi: 10.1039/C4FO00068D
43. Satoh T, Nakatsuka D, Watanabe Y, Nagata I, Kikuchi H, Namura S (2000) Neuroprotection by MAPK/ERK kinase inhibition with U0126 against oxidative stress in a mouse neuronal cell line and rat primary cultured cortical neurons. *Neuroscience letters* 288: 163–166. doi: 10.1016/S0304-3940(00)01229-5
44. Bendotti C, Tortarolo M, Borsello T (2006) Targeting stress activated protein kinases, JNK and p38, as new therapeutic approach for neurodegenerative diseases. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)* 6: 109–117. doi: 10.2174/187152406777441880
45. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM (2007) Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 9: 49–89. doi: 10.1089/ars.2007.9.49
46. Wang Y, Qin Z-h (2010) Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 15: 1382–1402. doi: 10.1007/s10495-010-0481-0
47. Xie J, Liang R, Wang Y, Huang J, Cao X, Niu B (2020) Progress in target drug molecules for Alzheimer’s disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 20: 4–36. doi: 10.2174/1568026619666191203113745
48. Moradi SZ, Momtaz S, Bayrami Z, Farzaei MH, Abdollahi M (2020) Nanoformulations of herbal extracts in treatment of neurodegenerative disorders. *Front Bioeng Biotechnol* 8: 238. doi: 10.3389/fbioe.2020.00238