

## Neuroprotective Effects of Methanolic Extracts from Peanut Sprouts

Hyun-Jung Kim, Jum-Soon Kang<sup>1</sup>, Hae-Ryong Park and Yong-Il Hwang\**Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea*<sup>1</sup>*Department of Horticultural Bioscience, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea*

Received December 28, 2009 / Accepted February 1, 2010

The neuroprotective effects of extracts from various parts of peanut sprouts on glutamate-induced neurotoxicity in N18-RE-105 cells were investigated. This study was performed to evaluate the neuroprotective activity of methanolic extracts from the whole (WME), heads (HME), and stems (SME) of peanut sprouts. The neuroprotective effects of these extracts were measured by MTT reduction assay, LDH release assay, phase-contrast microscopy, and flow cytometric analysis on the N18-RE-105 cells. Among these extracts, the HME showed the greatest neuroprotective effects, and was further fractionated with hexane, diethyl ether, ethyl acetate, and water, according to degree of polarity. Out of the fractionated extracts, the diethyl ether layer showed the highest activity on glutamate-induced cytotoxicity in N18-RE-105 cells. The sub-G1 DNA contents of the glutamate-induced severely apoptotic N18-RE-105s were measured by flow cytometric analysis to confirm the HME's anti-apoptotic activity. Interestingly, after incubation with 100 mg/ml of the HME, the proportion of sub-G1 cells of the glutamate-stressed N18-RE-105s had been greatly reduced, from 58.5% to 9.1%. These results imply that HME may have strong potential as a chemotherapeutic agent against neuronal diseases.

**Key words** : Neuroprotective, N18-RE-105 cells, peanut sprout, apoptosis

## 서 론

최근 들어 생활경제가 풍요로워지고 사회여건의 개선과 생활수준이 향상되고 이와 더불어 과학의 진보와 의료기술이 발전함에 따라 인간의 평균 수명이 증가일로에 있다. 우리나라는 2000년 기준 65세 이상 노령화인구가 총인구의 약 7.1%를 점하였으며 UN의 분류에 의하면 2022년(14% 이상)에는 고령사회로 진입이 예상된다. 이는 고령화에 따른 만성질환의 예방대책이 절실히 요구되며 특히 노화 및 이와 관련된 각종 퇴행성 신경질환이 전체 사망원인의 압도적 우위를 차지함에 따라 사회적인 문제로의 관심이 증가하고 있다[3,11]. 퇴행성 신경질환은 정상적인 노화의 과정과는 달리 비정상적인 신경세포의 사멸에 의하여 뇌나 척수에 이상이 생겨 인지능력, 보행능력, 운동능력이 감소하게 되는 질환이다. 이런 퇴행성 질환의 주된 원인이 활성산소(free radical, oxygen radical)에 기인[23,27]한다는 것이 인정됨에 따라 활성산소를 조절할 수 있는 항산화제의 개발과 연구에 더 많은 관심이 집중되고 있다[9]. 활성산소는 미토콘드리아내의 전자전달계 및 백혈구 세포의 활성화 등 정상적인 세포기능을 유지하는데 중요한 역할을 담당하는 세포내 신호전달 물질로 작용한다. 그러나 활성산소들은 불안정하고 산화력이 높아 생체물질과 쉽게 반응하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화적 스트레스

(oxidative stress) [10,22]를 유발하게 되며 이러한 산화적 스트레스는 지질과산화물 유도와 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 세포의 노화와 변형을 유도함으로써 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병 등 다양한 퇴행성 신경질환을 유발하게 된다[6,28].

Superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 등 항산화 효소와 glutathione (GSH), uric acid 등의 여러 가지 비효소적 항산화 물질이 있어 활성산소의 축적이나 해로운 산화작용을 막아주게 된다. 그 중 glutathione peroxidase는 GSH를 생산하여 우리 몸의 균형을 이루어주게 되는데[20] GSH는 glycine, glutamate, cysteine 세 가지 아미노산이 결합된 펩티드로 간과 세포에서 free radical과 각종 독성물질을 제거하여 세포손상을 방지하고 면역력을 높이는 역할을 한다[19,24]. 이런 GSH를 이루고 있는 아미노산 중에서 glutamate [5,25]는 중추신경계 시냅스의 15~20%를 차지하는 중심적인 흥분성 신경전달물질로 작용하지만 뇌 속의 과도한 축적은 체내의 항산화 시스템의 기능을 저하시킴으로 인해 산화계와 항산화계의 불균형을 초래하여[13] 신경을 과도하게 흥분시킴으로 흥분독성(excitotoxicity)을 야기하게 된다[4,21]. 이 흥분독성은 세포의 사멸을 일으키게 되어 알츠하이머병, 파킨슨병과 같은 여러 퇴행성 신경질환[2,16]을 유발하게 된다. 이러한 퇴행성 신경질환을 치료하기 위해서 항산화물 처리, 세포 이식, 외과적 수술 등 다양한 치료법이 제시되고 있지만 대부분이 위험요소와 부작용을 가지고 있어 각종 천연자원으로부터 보다 안전하고 신경세포 보호 효과가 뛰어난 치료제의 개발이 요구된다.

## \*Corresponding author

Tel : +82-55-249-2685, Fax : +82-55-249-2995

E-mail : yihwang@kyungnam.ac.kr

예로부터 우리 조상들은 비교적 손쉽게 재배 가능한 두채류 콩나물과 숙주나물을 식용하였으며, 두채류는 가격의 변동이 적고 계절적 공급 제한이 거의 없어 오늘날까지 꾸준히 애용되고 있다. 땅콩(낙화생)은 풍부한 영양소와 비타민 등 유용한 무기물질을 다량 함유되어 있어, 우리 건강에 유익한 보양식물이며, 중국에서는 예로부터 장수과로 알려져 있다. 땅콩은 종자(0.15 mg/mg)보다는 새싹채소인 땅콩나물로 성장하게 되면 레스베라트롤(resveratrol)성분이 90배 이상(14.2 mg/mg) 증가하고 이는 레스베라트롤 함량이 가장 많다고 알려진 포도주(평균 0.6 mg/mg)보다 무려 23~34배 이상 높은 함량을 가지는 것으로 농촌진흥청의 배 등에 의하여 지상으로 보고되어 있다. 이러한 땅콩나물은 콩나물에 비해 기능성 영양성분이 풍부하고, 수분함량이 높을 뿐만 아니라 식미가 우수하며, 식품소재로서의 이용범위가 넓은 장점을 지니고 있다.

본 연구에서는 항산화 활성과 신경세포 보호 효과를 가지는 물질을 탐색하기로 하고 여러 식물자원 중에서 땅콩나물을 선정하였다. 유기용매처리에 의하여 얻어진 부위별 추출물을 신경세포주 N18-RE-105에 처리하여 땅콩나물이 가지는 신경세포 보호 효과를 확인할 수 있었다. 땅콩나물은 땅콩을 콩나물처럼 싹을 틔운 것으로 항산화 효과가 있는 레스베라트롤과 숙취해소에 좋다는 asparagine이 많이 함유되어 있다. 또한 콩나물에 비해 비타민함량이 높고 양질의 불포화 지방산이 많아 심혈관 질환과 심근경색에 좋은 것으로 보고되어 있다. 그러나 땅콩나물에 대한 약리학적 연구는 아직 초보적인 단계에 불과하며, 특히 신경세포 보호 효과와 관련된 연구는 수행된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 퇴행성 신경질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 물질을 탐색하기 위한 목적으로 땅콩나물을 이용하여 glutamate에 의해 유도되는 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하는 효과를 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 실험 재료

본 실험에서 사용된 땅콩나물은 부산대학교 원예생명과학과로부터 제공받아 추출, 분획하여 실험에 사용하였다. 신경세포주 배양을 위해 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), horse serum (HS) 및 HAT supplement 등은 Gibco-BRL (Grand Island, NT, USA)에서 구입하였다. 신경세포 보호효과 실험에 사용된 시약으로 L-glutamic acid (Monosodium salt hydrate), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, LDH (Lactate dehydrogenase) release assay kit는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)으로부터 구입하였

다. 그 외 실험에 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

### 시료의 추출 및 분획물 제조

시료의 부위별 추출물을 조제하기 위하여 땅콩나물을 전체 (whole), 머리(head) 및 줄기(stem)부분으로 나누어 실험에 사용하였다. 불순물 제거를 위하여 증류수로 세정 후에 부위별로 분리하여 준비된 시료 5 g에 methanol 100 ml을 가하여 상온에서 3일 동안 정치시켜 추출을 실시하였다. 충분히 추출단계를 거친 후에 여과지 (Advantee, Tokyo, Japan)로 여과를 실시하였다. 여과된 추출액은 회전감압농축기(EYELA N-1000, Tokyo, Japan)를 이용하여 40°C에서 감압 농축하여 추출물을 얻었다. 땅콩나물 전체 추출물을 WME, 머리 부분 추출물을 HME, 줄기부분 추출물을 SME라고 명명하였다.

머리 부분 추출물인 HME에서 보다 세분화된 분획을 위하여 단계별 분획물을 얻기 위하여 용매의 극성을 달리하여 순차적으로 용매분획을 얻었다. 먼저, hexane과 물을 동량의 비율로 분획 추출하여 hexane 층을 분리하였고, 동일한 방법으로 diethyl ether, ethyl acetate 및 water 층으로 분획하여 얻어진 각각의 용매 분획물을 감압 농축시켜 분획물을 얻었다(Fig. 3). 각 추출물 및 분획물은 10 mg/ml로 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹여 적당한 농도로 희석하였고, 1% DMSO가 되도록 처리하였다.

### 세포 배양

땅콩나물의 신경세포 보호 효과를 시험하기 위해 한국생명공학연구원으로부터 세포주 hybridoma N18-RE-105 세포주를 분양받아 본 실험에 사용하였다. 세포배양을 위해 DMEM medium에 10% FBS, 5% HS 및 1× HAT supplement를 첨가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (MCO-18AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

### MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) reduction assay

땅콩나물의 각 부위별 추출물의 신경세포 보호 효과를 측정하기 위해 MTT reduction assay를 실시하였다. 세포주를 96-well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 100 ml씩 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 땅콩나물 추출물을 각각 10, 50, 100 mg/ml의 농도로 제조하여 N18-RE-105 세포주에 처리하였다. 30분 동안 배양한 후, 20 mM glutamate를 처리하여 24시간 배양하고 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT (5 mg/ml) 용액을 10 ml씩 첨가하여 1시간 동안 다시 반응시켰다. Formazan 형성을 확인한 후, 배지를 완전히 제거하고, well 바닥에 형성된 formazan을 녹이기 위해 100 ml의 DMSO를 첨가한 후, ELISA reader (Model 680, BioRad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 땅콩나물 부위별 추출물을 처리하지 않고 배양시킨

대조군 세포를 100% 하였을 때의 상대적인 세포성장 억제율로 나타냈다.

#### LDH (lactate dehydrogenase) release assay

땅콩나물 추출물 중에서 HME의 신경세포 보호 효과를 측정하기 위한 방법으로 LDH release assay kit를 이용하여 실험을 실시하였다. 각 세포주를  $1 \times 10^5$  cells/ml로 맞춘 후, 100 ml씩 96-well plate에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 HME를 각각 10, 50, 100 mg/ml의 농도로 세포주에 처리하여 30분 배양하고, 다시 20 mM glutamate를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 새로운 96-well plate에 50 ml 분주하고 LDH reagent를 50 ml 첨가하여 반응 시킨 후, 반응이 완료되면 1 N HCl을 100 ml 첨가하여 반응을 중지시켰다. 또한 살아남은 세포의 LDH 측정을 위해 배양액을 제거하고, 0.5% Triton X-100 용액을 50 ml 첨가하여 40 rpm으로 10분 동안 진탕하여 같은 방법으로 LDH reagent를 첨가하여 반응시켰다. 반응이 끝나면 반응 정지액을 넣은 뒤, 각각을 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH에 의한 세포독성의 백분율은 배양액과 살아있는 세포에서 유리된 총 LDH에 대한 배양액으로부터 유리된 LDH의 값으로 계산하여 무처리 대조군과 비교한 값을 나타내었다.

#### 세포의 형태학적 변화 관찰

땅콩나물 각 부위별 추출물에 대한 N18-RE-105 세포주의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 6-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/ml로 2 ml씩 첨가하여 24시간 동안 배양하고 50, 100 mg/ml의 농도로 추출물을 처리한 후, 20 mM의 glutamate에 24시간 노출시켜 phase-contrast microscope (Nikon, Japan)를 이용하여 변화된 N18-RE-105 세포주의 형태학적 특징을 촬영하였다.

#### Flow cytometric analysis

Apoptotic cell을 측정하기 위하여 flow cytometer로 세포

주기를 측정하였다. N18-RE-105 세포주를 6 cm dish에  $5 \times 10^4$  cell/dish로 세포를 분주하여 24시간 배양한 후, HME를 50, 100 mg/ml의 농도로 처리하였다. 세포를 24시간 배양시키고, 부유 세포 및 trypsin 처리한 세포들을 모아서 4°C, 2,000 rpm으로 5분간 원심분리를 한 후, ethanol 1 ml을 넣고 4°C에서 세포를 고정시켰다. 4°C에서 2,000 rpm으로 2분간 원심분리하고 PBS 용액으로 수세한 후, propidium iodide/RNase staining buffer (BD pharmingen™)을 500 mg/ml 첨가하고, 암소에서 30분간 staining 한 후, flow cytometry caliber (Beckman coulter epics XL)를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

#### 통계처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준편차(SD)를 구하고 각 추출물의 세포독성 정도를 비교하기 위해 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고 Scheff's test를 이용하여 대조군과 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

## 결과 및 고찰

#### 땅콩나물 부위별 추출물의 신경세포 보호 효과

땅콩나물 성분 중에서 glutamate로 유도된 세포독성으로부터의 신경세포 보호 효과를 확인하기 위하여 methanol을 이용하여 땅콩나물 전체(WME), 머리(HME), 줄기부분(SME) 추출물을 조제하고 이를 각각 10, 50, 100 mg/ml의 농도로 뇌신경계 세포주 hybridoma N18-RE-105에 처리하고 MTT reduction assay 방법을 통하여 미처리 정상군과 glutamate를 처리한 대조군을 비교하였다. Fig. 1에서의 결과로부터, glutamate 대조군의 세포 생존율은 29.8%로 나타났으나, 이 때 땅콩나물 부위별 추출물을 10, 50, 100 mg/ml의 농도로 각 세포주에

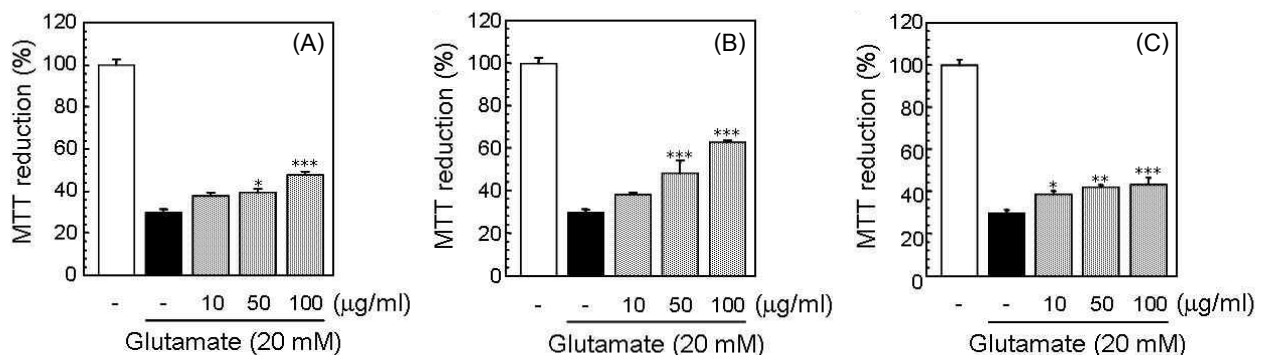


Fig. 1. Methanolic extracts of whole (WME), head (HME), stem (SME) from peanut sprout protected N18-RE-105 cells against glutamate-induced cytotoxicity (A; WME, B; HME, C; SME). The cells pretreated for 6 hr with various concentrations (10, 50, 100 mg/ml) of WME, HME, and SME, respectively. The cells were then treated with 20 mM of glutamate for 24 hr. After MTT assay, the MTT reduction rate (mean±SD of triplicate determination) were calculated by each setting of control survival rate. Significant vs. glutamate-treated control group (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

처리했을 때 N18-RE-105 세포주의 생존율은 WME에서 37.2, 39.3, 47.7%였고, HME에서 38.3, 48.1, 62.9%였으며, SME에서 38.9, 42.2, 43.2%로 HME에서 가장 높은 신경세포 보호 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

다음으로 신경세포 보호 효과가 가장 높은 HME 활성 기전 연구를 위하여 세포막 손상 정도에 따른 배양액 속의 LDH의 방출 양을 측정된 결과는 Fig. 2A와 같다. 정상군에 비해 20 mM glutamate를 처리한 N18-RE-105 세포주는 69.1% 정도의 LDH 방출을 확인할 수 있는데 반해 20 mM glutamate와 HME 10, 50, 100 mg/ml를 처리한 결과 첨가량에 따라 순차적으로 51.0, 48.1, 47.3%로 세포사가 감소함을 보였다. 따라서 glutamate의 독성에 의한 세포막 손상으로 방출되는 LDH 양을 측정된 결과 농도 의존적으로 방출되는 LDH양이 감소하고 있음을 확인함을 통해 땅콩나물 head 추출물이 신경세포 손상을 강력하게 억제하여 방출되는 LDH 양을 효율적으로 감소시킴을 확인할 수 있었다. 다음으로 HME가 신경세포의 형태학적 변화에 미치는 영향을 광학현미경을 이용하여 관찰하였다(Fig. 2B). 세포주의 정상군에서는 건강하게 뿔은 신경돌기의 모습을 관찰할 수 있었지만 glutamate가 처리된 대조군은 산화적 스트레스로 인하여 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보임으로써 신경세포가 형태학적으로 큰 변화가 유도된 것을 확인할 수 있었다. 그렇지만 HME를 각각 50, 100 mg/ml를 처리했을 때 농도 의존적으로 신경세포 손상정도가 회복되어 있음을 확인할 수 있었으며 이러한 결과로부터 땅콩나물의 HME에

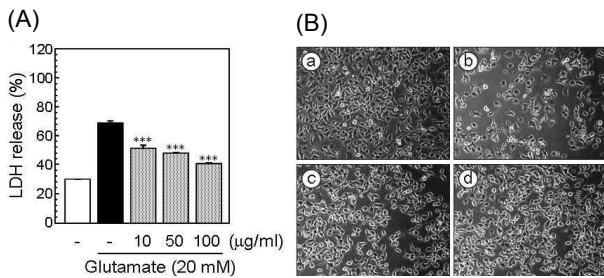


Fig. 2. Protective effect of HME on glutamate-stressed N18-RE-105 cells. (A) Cell viability was measured using LDH release assay in cells those were exposed to HME under glutamate-stressed conditions. After pretreating of N18-RE-105 cells for 30 min with various concentrations of HME, the cells were then treated with 20 mM of glutamate for 24 hr. Data were normalized to the activity of LDH release from vehicle-treated cell (100%). (B) Morphological changes in glutamate-stressed N18-RE-105 cells. The cells were exposed to 50 and 100 mg/ml of HME and then morphological changes were monitored for 24 hr (a: control, b: 20 mM glutamate, c: 20 mM glutamate/50 mg/ml HME, d: 20 mM glutamate/100 mg/ml HME). Photographs were taken with a phase-contrast microscope at 100× magnification. \*\*\*significant vs. glutamate-treated control group ( $p < 0.001$ ).

는 glutamate에 의한 신경세포 손상을 억제하거나 혹은 신경세포를 보호하는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

그리고 HME의 신경세포 보호 효과를 나타내는 물질의 특성을 확인하기 위하여 극성도에 따라 Fig. 3와 같이 hexane, diethyl ether, ethyl acetate 및 water 순으로 용매 분획하여 그 분획물을 얻었다. 단계 별로 회수된 각 분획물의 신경세포 보호 효과에 대한 결과는 Fig. 4와 같다. N18-RE-105 세포주에 각 분획물을 각각 10, 50, 100 mg/ml를 처리하였을 때, 여러

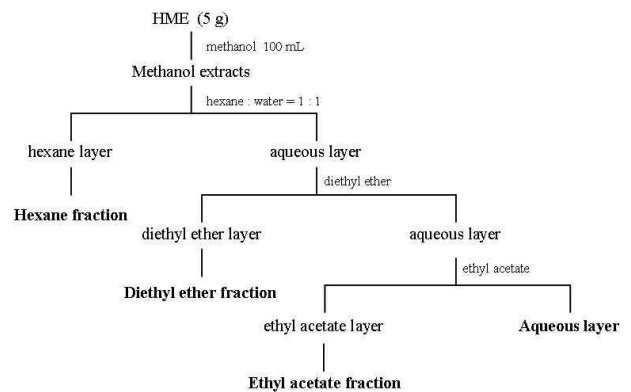


Fig. 3. Fractionation procedure of HME. The extracts were fractionated in sequence with hexane, diethyl ether, and ethyl acetate according to degree of polarity.

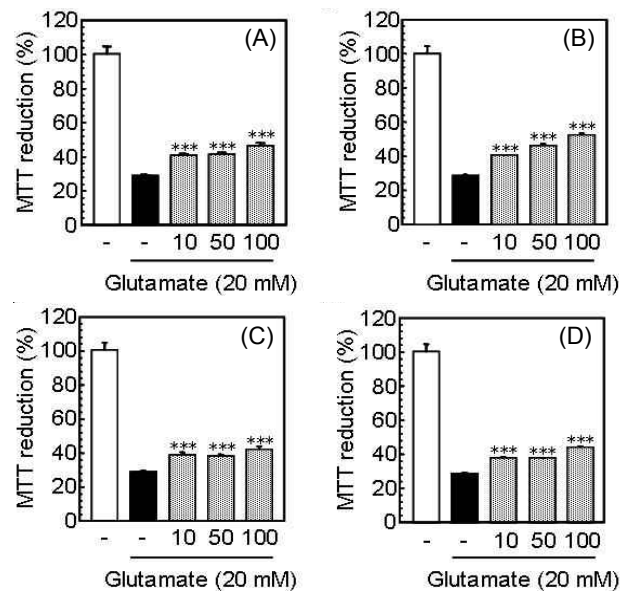


Fig. 4. Protective effect of each fraction on glutamate-stressed N18-RE-105 cells (A; hexane, B; diethyl ether, C; ethyl acetate, D; water). After pretreating of N18-RE-105 cells for 30 min with 10, 50, and 100 mg/ml of fractions from HME, the cells were then treated with 20 mM of glutamate for 24 hr. From the results of MTT assay, the MTT reduction rate (means±SD of triplicate determination) were calculated by each setting of control survival rate. \*\*\*significant vs. glutamate-treated control group ( $p < 0.001$ ).

용매 분획물 중에서 diethyl ether 분획물에서 가장 높은 활성이 보였다. 즉, diethyl ether 분획물 10, 50, 100 mg/ml을 처리하였을 때 40.6, 46.5, 52.5%로 높은 활성을 나타냈으며, hexane, ethyl acetate, water 층에서도 활성을 보이긴 했으나 diethyl ether 분획물과 비교하였을 때 활성이 약한 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 극성도가 높은 ethyl acetate, water 층보다 비극성도가 높은 diethyl ether에서 활성이 확인됨에 따라 땅콩나물에 함유되어 있는 신경세포를 보호하는 물질의 특성은 대체로 비극성의 성질을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

#### HME의 apoptosis 억제 효과

중추신경세포의 손상기전은 일반적으로 급격한 외부자극에 의한 손상을 입었을 경우에는 세포괴사의 형태로 나타나지만 노인성 치매, 파킨슨병 등의 퇴행성 신경계 질환에서는 생체내의 다양한 생화학적 인자들이 작용하여 apoptosis를 유발하게 된다. 이 때 apoptosis는 다세포생물에서의 programmed cell death를 일컫는 용어로 세포사와 관련되어 능동적으로 일어나는 세포의 사멸 과정 중 하나로[12,14,26] 특히 신경계에서 가장 흔한 흥분성 신경전달물질로 기능하는 glutamate에 의한 apoptosis는 시냅스 간극(synaptic cleft)에 과량 축적됨으로 인해서 glutamate 수용체들이 과도하게 활성화될 뿐 아니라 미토콘드리아의 흡수, 저장능력에 이상이 생김으로 인해서  $Ca^{2+}$ 이 세포 안으로 유입되어 nNOS (neuronal nitric oxide)가 활성화됨으로 인해서 과량의 NO를 생성하여 superoxide와 결합함으로 인해 강력한 산화제인 peroxynitrite가 생성된다. 이렇게 생성된 peroxynitrite는 세포내 손상, DNA 손상, PARP-1 활성화를 초래하게 되고 특히, PARP-1의 활성화는 NAD를 기질로 하여 poly (ADP-ribose)ylation을 촉매하여 세포내 NAD와 APT의 고갈과 AIF 활성화로 인한 핵으로의 이동을 유도함으로써 DNA 절단, nuclear condensation을 유도하여 apoptosis를 일으키게 된다[8,17]. Glutamate에 의해 유도된 apoptosis를 알아보기 위해 sub-G1기의 세포수를 측정할 수 있는 flow cytometric 분석을 실시하였다. 여러 추출물 중에서 가장 높은 신경세포 보호 효과를 나타내는 HME를 N18-RE-105 세포주에 처리하여 glutamate가 유도하는 세포독성으로부터 apoptosis 억제 효과를 확인하였다. Fig. 5의 결과로부터 glutamate 단독 처리 시 58.5%의 sub-G1기 세포가 확인된 반면에 glutamate와 HME 50, 100 mg/ml에서의 sub-G1 세포는 각각 23.1, 9.1%로 감소하였다. Glutamate에 의한 신경세포 손상에 따른 apoptosis는 AIF 활성화를 저해시킴으로 인해서 신경세포 손상을 막을 수 있다고 보고되어져 있다. 따라서 HME 처리에 의한 apoptosis의 중요한 특징 중의 하나인 sub-G1 세포수가 감소했다는 것은 HME의 다양한 성분들 중 AIF 활성화를 억제시킴으로 인해서 glutamate가 유도하는 산화적 스트레스로부터 N18-RE-105 세포주의 apoptosis를 억제

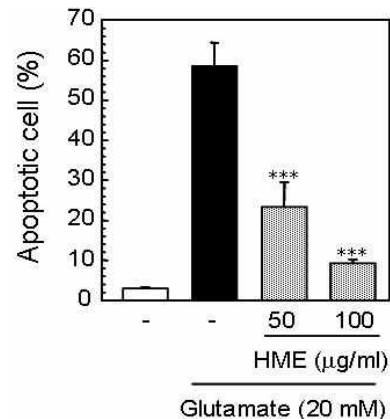


Fig. 5. Affect of HME for apoptotic repression on glutamate-treated N18-RE-105 cells. Flow cytometric analysis of glutamate-induced apoptotic N18-RE-105s at the indicated concentration (50 and 100 mg/ml) of HME, and the cells were incubated for 24 hr. These data (mean  $\pm$  SD of triplicate determinations) are representative of at least three independent experiments. \*\*\*significant vs. glutamate-treated control group ( $p < 0.001$ ).

했다고 사료된다.

지금까지 콩나물, 숙주나물 등과 같은 두채류에서는 신경세포 보호 효과가 보고된바가 아직까지는 없는 것으로 조사되었으며 두채류인 땅콩나물에서 신경세포 보호 효과를 확인한 것은 그 연구가치가 높다고 생각되어진다. 그리고 땅콩나물의 유효성분 중 가장 많은 비중을 차지하는 레스베라트롤[1]이 세포 내 독성을 유발하는 amyloid- $\beta$ 펩티드의 분해를 촉진시켜 알츠하이머병을 억제시키는 것으로 보고[18]되어 있으나 HME의 diethyl ether 분획물에서 레스베라트롤의 활성이 검출되지 않았으며(결과 미제시), 본 연구의 glutamate에 의한 apoptosis 유도기작과는 직접적으로 연관은 없는 것으로 사료된다. 또 다른 땅콩나물 성분인 asparagine은 아미노산의 하나로써 글루타민과 함께 식물, 미생물, 동물세포 속에 널리 존재하는 것으로 알코올 침출시 생성되는 독성물질인 아세트산알데히드를 분해함으로써 과음에 따른 해독작용을 도와주게 되며 말초혈관을 확장시키고, 심장의 수축을 증가하고 심장 맥박수를 고르게 하는 작용을 한다는 것은 밝혀져 있으나[29] 신경세포 보호 효과에 대해서는 보고가 되어있지 않다. 따라서 땅콩나물의 또 다른 성분 중 알려져 있지 않은 미지의 성분들에 의해 glutamate가 유도하는 산화적 스트레스에 의한 apoptosis를 억제하는 것으로 생각되어진다. 한편, 황 등[7]에 의하면 glutamate의 처리는 신경세포 내  $Ca^{2+}$  농도를 증가시켜 칼슘의존성 효소들을 활성화시켜 미토콘드리아에 기능적 손상을 주어 점진적으로 그 구성 성분들의 본성을 변화시킴으로 인해 세포의 생존율 감소와 손상을 증가시키는 것으로 보고하고 있다[15]. 그리고 세포내의  $Ca^{2+}$  농도와 직접적인 상관관계를 규명하기 위해서 현재 HME추출물로부터 생리활성물질을

분리, 정제하고 있으며 분자단계에서의 작용을 명확히 하고자 하고 있다.

이상의 결과로부터 glutamate의 처리는 N18-RE-105 세포주에 세포독성과 apoptosis를 유도하고 있으며, 땅콩나물의 head 추출물은 glutamate의 산화적 스트레스를 감소시켜 신경세포를 보호하고 있는 것으로 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

### References

1. Cho, C. H., S. K. Kim, G. Yoo, M. H. Son, K. Park, B. L. Lim, D. C. Kim, and H. J. Chae. 2008. Resveratrol extraction from grape fruit stem and its antioxidant activity. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem* **51**, 11-16.
2. Choi, B. H., E. M. Hur, J. H. Lee, D. J. Jun, and K. T. Kim. 2005. Protein kinase Cd-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death. *J. Cell. Sci.* **119**, 1329-1340.
3. Emerit, J., M. Edeas, and F. Bricaire. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Bioned Pharmacother.* **58**, 39-46.
4. Federico, H., M. Vanesa, G. S. Guillermo, R. B. Jezabel, A. Isaac, and R. Carmen. 2007. Melatonin prevents glutamate-induced oxytosis in the HT22 mouse hippocampal cell line through an antioxidant effect specifically targeting mitochondria. *J. Neurochem.* **100**, 736-746.
5. Ha, J. S., C. S. Lee, J. S. Maeng, K. S. Kwon, and S. S. Park. 2009. Chronic glutamate toxicity in mouse cortical neuron culture. *Brain Res.* **1273**, 138-143.
6. Ha, J. S. and S. S. Park. 2006. Glutamate-induced oxidative stress, but not cell death, is largely dependent upon extracellular calcium in mouse neuronal HT22 cells. *Neurosci. Lett.* **393**, 165-169.
7. Hwang, Y. I., I. C. Shin, Y. S. Song, M. J. Seung, H. J. Park, Y. M. Lee, C. B. Park, M. K. Lee, K. W. Oh, Y. Y. Shim, and J. T. Hong. 2002. Intracellular calcium concentration in the glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cell. *J. Toxicol. Pub. Health* **18**, 355-362.
8. Jeon, H. J., S. W. Park, I. Lee, and B. S. Mun. 2004. Effects of *Gwibitang* on glutamate-induced death in rat neonatal astrocytes. *J. Korean Oriental Med* **25**, 184-193.
9. Jeong, G. S., D. S. Lee, T. O. Kwon, H. S. Lee, R. B. An, and Y. C. Kim. 2009. Cytoprotective constituents of the heartwood of *Caesalpinia sappan* on glutamate-induced oxidative damage in HT22 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 945-949.
10. Jeong, E. J., S. H. Sung, J. Kim, S. H. Kim, and Y. C. Kim. 2008. Rhus verniciflua stokes attenuates glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical cells. *Nat. Prod. Sci.* **14**, 156-160.
11. Kadomura, K., S. Maruse, S. Sugihara, K. Yamaguchi, and T. Oda. 2007. Production of reactive oxygen species (ROS) by various marine fish species during the larval stage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2029-2033.
12. Kim, B. M., Y. J. Choi, Y. Han, Y. S. Yun, and S. H. Hong. 2009. N,N-dimethyl phytosphingosine induced caspase-8-dependent cytochrome c release and apoptosis through ROS generation in human leukemia cells. *Toxicol. Appl. Pharm.* **239**, 87-97.
13. Kim, M. H., S. Uehara, A. Muroyama, B. Hille, Y. Moriyama, and D. S. Koh. 2008. Glutamate transporter-mediated glutamate secretion in the mammalian pineal gland. *J. Neurosci.* **28**, 10852-10863.
14. Kim, S. H., D. K. Shin, J. Y. Choe, J. Lee, E. J. Suh, and H. S. Suh. 1999. Quantitation of the Early apoptotic cells using flow cytometry. *Korean J. Clin. Pathol.* **19**, 108-113.
15. Kim, W. J., J. Y. Park, Y. K. Park, H. S. Chung, K. C. Lee, and H. K. Lee. 1997. Effects of calcium, Mugesium, and calcium chelating agent on recovery from hypoxia in hippocampal tissue slices. *J. Korean Neurosurg. Soc.* **26**, 491-498.
16. Lim, C. S., D. Q. Jin, J. Y. Sung, J. H. Lee, H. G. Choi, I. Ha, and J. S. Han. 2006. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the methanolic extract of *Neorhodomela aculeate* in hippocampal and microglial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 1212-1216.
17. Nikolova, S., Y. S. Lee, Y. S. Lee, and J. A. Kim. 2005. Racl-NADPH oxidase-regulated generation of reactive oxygen species mediates glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Free Radical Res.* **39**, 1295-1304.
18. Marambaud, P., H. Zhao, and P. Davies. 2005. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptides. *J. Biol. Chem.* **280**, 37377-37382.
19. Milatovic, D., S. Zaja-Milatovic, R. C. Gupta, Y. Yu, and M. Aschmer. 2009. Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharm.* **240**, 219-225.
20. Murphy, T. H., M. Miyamoto, A. Sastre, R. L. Schnaar, and T. Coyle. 1989. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* **2**, 1547-1558.
21. Penugonda, S., S. Mare, P. Lutz, W. A. Banks, and N. Ercal. 2006. Potentiation of lead-induced cell death in PC12 cells by glutamate: Protection by N-acetylcysteine amide (NACA), a novel thiol antioxidant. *Toxicol. Appl. Pharm.* **216**, 197-205.
22. Parfenova, H., S. Basuroy, S. Bhattacharya, D. Tcheranova, Y. Qu, R. F. Regan, and C. W. Leffler. 2006. Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **290**, 1399-1410.
23. Sagara, Y., R. Dargusch, D. Chambers, J. Davis, D. Schubert, and P. Mater. 1998. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 1375-1389.
24. Shin, A. Y., H. Erb, X. Sun, S. Toda, P. W. Kalivas, and T. H. Murphy. 2006. Cystine/glutamate exchange modulated glutathione supply for neuroprotection from oxidative

- stress and cell proliferation. *J. Neurosci.* **26**, 10514-10523.
25. Tan, S., Y. Sagara, Y. Liu, P. Maher, and D. Schubert. 1998. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J. Cell Biol.* **141**, 1423-1432.
26. Wang, F., F. Gao, M. Lan, H. Yuan, Y. Huang, and J. Liu. 2009. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicol. In Vitro* **22**, 808-815.
27. Yoon, M. Y., J. Y. Kim, J. H. Hwang, M. R. Cha, K. J. Jo, and H. R. Park. 2007. Protective effect of methanolic extracts from *Dendrobium nobile* Lindl. on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J. Korean Soc. Appl. Chem.* **50**, 63-67.
28. Yoon, M. Y., H. J. Lee, B. B. Lee, S. M. Lee, J. Y. Kim, Y. Kim, E. Park, and H. R. Park. 2007. Protective effect of *schizonepeta tenuifolia* briquet extracts on oxidative DNA damage in human leucocytes and on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Food Sci. Biotechnol.* **16**, 858-862.
29. Yoshimune, K., Y. Shirakihara, M. Wakayama, and I. Yumoto. 2009. Crystal structure of salt-tolerant glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3 in the presence and absence of its product L-glutamate and its activator tris. *FEBS J.* **277**, 738-748.

#### 초록 : 땅콩나물 추출물의 신경세포 보호 효과

김현정 · 강점순<sup>1</sup> · 박해룡 · 황용일\*

(경남대학교 식품생명학과, <sup>1</sup>부산대학교 원예생명과학과)

본 연구는 땅콩나물 추출물이 glutamate가 유도하는 세포독성으로부터 신경세포를 보호하는 효과를 확인하였다. 땅콩나물을 부위별로 전체, 머리, 줄기 부분으로 나누어 methanol로 처리하여 얻어진 각각의 추출물 WME, HME 그리고 SME를 이용하여 glutamate에 의하여 유도된 세포독성에 대한 신경세포보호효과를 관찰하였다. 기지의 신경세포 N18-RE-105 세포주를 이용하여 MTT reduction assay, LDH release assay, 형태학적인 변화 및 apoptosis를 관찰한 결과로부터 HME에서 효율적인 신경세포보호효과를 보였다. 다음으로 HME를 이용하여 hexane, diethyl ether, ethyl acetate, water 층으로 분획하여 신경세포 보호 효과를 확인한 결과, diethyl ether 층에서 가장 높은 활성을 확인할 수 있었다. 그리고 HME의 apoptosis 억제 효과를 확인하기 위하여 flow cytometric analysis를 실시한 결과에서 glutamate 만을 처리하였을 경우 sub-G1기 세포가 58.5%의 확인되었으나 HME를 100 mg/ml 동시 처리하였을 때에는 sub-G1 세포가 9.1%로 감소하여 높은 apoptosis 억제 효과를 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 땅콩나물 머리 부분 methanol 추출물에는 glutamate에 의한 세포독성으로부터 신경세포를 보호하는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.