

백선피 70% 에탄올 추출물의 비수용성 분획물의 뇌세포 보호 효과

최현규[#] · 이동성[#] · 리 빈 · 전기용 · 정길생^{1*} · 김윤철^{*}

원광대학교 약학대학, ¹계명대학교 약학대학

Neuroprotective Effect of the Water-insoluble fraction of Root Barks of *Dictamnus dasycarpus* 70% Ethanolic Extract on Glutamate-Induced Oxidative Damage in Mouse Hippocampal HT22 Cells

Hyun-Gyu Choi[#], Dong-Sung Lee[#], Bin Li, Ki-Yong Jun, Gil-Saeng Jeong^{1*} and Youn-Chul Kim^{*}

Standardized Material Bank for New Botanical Drugs, College of Pharmacy,
Wonkwang University, Iksan 570-749, Republic of Korea

¹College of Pharmacy, Keimyung University, Dae-gu 704-701, Republic of Korea

Abstract – Oxidative stress or accumulation of reactive oxygen species (ROS) leads neuronal cellular death and dysfunction, and it contributes to neuronal degenerative disease such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and stroke. Glutamate is one of the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS). Glutamate contributes to fast synaptic transmission, neuronal plasticity, outgrowth and survival, behavior, learning and memory. In spite of these physiological functions, high concentration of glutamate causes neuronal cell damage, acute insults and chronic neuronal neurodegenerative diseases. Heme oxygenase-1 (HO-1) enzyme plays an important role of cellular antioxidant system against oxidant injury. NNMB020, the water-insoluble fraction of the 70% EtOH extract of root barks of *Dictamnus dasycarpus*, showed dominant neuroprotective effects on glutamate-induced neurotoxicity in mouse hippocampal HT22 cells by induced the expression of HO-1 and increased HO activity. In mouse hippocampal HT22 cells, NNMB020 makes the nuclear accumulation of Nrf2 and stimulates extra-cellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. The ERK MAPK pathway inhibitor significantly reduced NNMB020-induced HO-1 expression, whereas the JNK and p38 inhibitors did not. In conclusion, the water-insoluble fraction of the 70% EtOH extract of root barks of *D. dasycarpus* (NNMB020) significantly protect glutamate-induced oxidative damage by induction of HO-1 via Nrf2 and ERK pathway in mouse hippocampal HT22 cells.

Key words – *Dictamnus dasycarpus*, Heme oxygenase-1, HT22, Glutamate, Neuroprotective effect

백선 (*Dictamnus dasycarpus* Turcz.)은 운향과 (Rutaceae)에 속하며 한국 및 시베리아 원산으로 우리나라에서 관상용으로 재배 또는 자생하는 다년생 초본으로 잎은 호생하며 기수우상복엽으로 소엽이 9~13매로 구성되고, 여름에 가지 끝에 길이 20 cm 정도의 총상화서를 내어 백색 또는 담자색의 꽃을 피운다. 줄기는 약 1 m내외로 전체에 강렬한 향기가 있으며 기부는 목질화 되어 있고 뿌리는 육질로서 담황색이다. 뿌리 껍질을 건조한 것인 백선피는 바깥면은 황백색~옅은 갈색이고 매끄러우며 안쪽면은 옅은 황색으로 질은 부드럽고 쉽게 부러진다.^{1,2)} 백선피는 한국 및 중국을

포함한 아시아 지역에서 오래 전부터 민간에서 피부가려움증이나 두드러기, 황달, 기침을 동반한 감기 등에 널리 이용되어왔다.^{3,4)} 백선피는 flavonoid, limonoid, furoquinoline alkaloid, sesquiterpene, sesquiterpene glycoside, coumarin 계열의 화합물을 많이 함유하고 있으며⁵⁻⁸⁾, 그 가운데 alkaloid와 limonoid 계열이 주요한 활성을 갖는 것으로 알려져 있다.^{3,9-11)} 특히 limonoid 화합물은 항균작용³⁾과 뇌세포 보호작용⁹⁾ 등이 보고 되었고, limonoid에 속한 fraxinellone은 항염증 효과¹⁰⁾, 백선피의 70% 에탄올 추출물은 항알러지 효과가 있는 것으로 보고되었다.¹¹⁾

인간을 포함한 호기성 호흡을 하는 생명체 특히 포유류에서 산소분자 (O₂)를 이용한 산화환원의 결과, 또는 항원에 대한 면역세포의 반응, 외부에서의 방사선이나 화학물질 등

[#]These authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): yckim@wku.ac.kr, gsjeong@kmu.ac.kr

(Tel): +82-63-850-6823, +82-53-580-6649

의 노출에 의해 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 체내 ROS의 축적과 강한 산화반응성은 항산화 시스템의 기능 저하 시 산화적 스트레스(oxidative stress)를 야기시킨다.¹²⁾ 지금까지의 많은 연구들에 따르면 산화적 스트레스 및 ROS는 신경 세포의 파괴와 기능 이상을 초래하여 알츠하이머, 파킨슨병, 뇌졸중 등의 신경 퇴행성 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다.¹³⁻¹⁵⁾ 글루타메이트는 central nervous system (CNS)의 대표적인 흥분성 신경전달 물질로 시냅스에서의 신경전달, 뉴런의 형성과 성장 및 생존, 행동이나 학습 및 기억력 등에 중요한 역할을 한다.¹⁶⁾ 이러한 생리학적 기능에도 불구하고 글루타메이트의 독성이 신경 세포에 손상을 주거나 급·만성의 퇴행성 신경질환을 유발한다고 알려져 있다.^{17,18)} 글루타메이트가 유도하는 신경 세포 손상은 크게 두 가지 요인이 있는데, 글루타메이트 수용체의 과다 흥분에 의한 독성과 수용체의 매개 없이 산화적 스트레스를 유발해 손상을 주는 것이다.^{19,20)} 본 실험에서는 글루타메이트 수용체가 결여되어 글루타메이트를 처리했을 때 수용체 과다 흥분에 의한 독성이 아닌 산화적 스트레스로 인한 세포의 손상을 확인할 수 있는 쥐의 해마유래인 HT22 세포주를 사용하였다.²¹⁾

Heme oxygenase (HO)는 세포의 항산화시스템에서 중요한 구성 요소로서 HO 유도체중 하나인 HO-1은 세포내의 heme을 분해하여 일산화탄소, 철, biliverdin을 만든다.²²⁾ HO-1은 부산물들과 함께 세포손상 및 사멸 억제, 항염증 및 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근에는 HO-1 발현이 세포보호와 항산화 작용을 통하여 산화적 스트레스로부터의 뇌세포 손상을 억제한다는 연구가 보고되어 있다.²³⁾ 본 연구에서는 백선피의 70% 에탄올 추출물의 비수용성 분획물인 NNMBS020의 HO-1 발현을 통한 뇌세포 보호효과 및 기전을 밝혔다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 백선피는 2008년 5월 익산시 신용동 소재 대한한약국에서 구입하였으며, 형태학적 평가를 통하여 동정하였고 표본시료 (NNMBS019)는 천연물신약표준화소재은행에 보관하였다. 백선피 70% 에탄올 추출물(NNMBS019)과 각 분획물(NNMBS020, NNMB021)은 천연물신약표준화소재 은행에 보관하고 있다.

시약 및 기기 - DMEM 배지와 trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Gibco Laboratories사에서 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone Laboratories사에서 구입하였다. L-glutamate, Trolox와 3'-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma사에서 구입하였다. 96-Well tissue culture plates와 기타 tissue culture dishes는 Nunc사 제품을 이용하였다. 흡광도는

BioRad사의 Microplate Reader를 이용하여 측정하였다. TLC plate는 MERCK사의 Silica gel 60 F₂₅₄ plate를 이용하였다.

시료 제조 - 백선피 50 g을 70% 에탄올 수용액 300 ml로 2시간 동안 가열 환류추출하고 여과한 다음 여액을 감압 농축하여 백선피의 70% 에탄올추출물 (NNMBS019) 6.86 g을 얻었다. 얻어진 백선피 70% 에탄올 추출물에 증류수 100 ml를 넣고 교반하여 현탁시킨 후 24시간 동안 실온에서 방치하고, 3000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 침전물을 취함으로써 백선피 70% 에탄올추출물의 비수용성 분획물 (NNMBS020) 720 mg과 수용성 분획 (NNMBS021) 350 mg을 제조하였다. 각 시료는 실험에 사용한 배지에 녹여서 사용하였다. 제조된 각 시료 (NNMBS019~021)는 박층크로마토그래프(TLC)법으로 함유 성분 패턴 분석을 하였다. 각 시료를 2.5 mg/ml의 농도로 메탄올에 용해시켜 검액을 만들고, 10 µl 씩 TLC판에 점적하여 CHCl₃ : MeOH (20 : 1)의 용매 조건으로 전개시키고 이를 10% 황산에 발색하였다. NNMBS019와 NNMBS020에서는 R_f값이 각각 0.19, 0.4, 0.87 인 세 개의 반점이 확인 되었으나 NNMBS021에서는 뚜렷한 반점이 나타나지 않았다. 또한, 나타난 세 개의 반점은 NNMBS020이 NNMBS019 보다 더욱 뚜렷하게 나타났다.

HT22 세포배양 및 뇌 세포 보호활성 측정 - 생쥐 해마 유래 HT22 세포주는 목인희 교수 (서울대학교)로부터 분양하여 사용하였으며, 글루타메이트로 독성을 유발한 세포주에 대한 보호활성 측정은 정 등의 방법²⁴⁾에 따라 실시하였다. HT22 세포 (2×10⁵ cells/well)를 10% heat-inactivated FBS, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 µg/ml)을 함유한 DMEM배지에 분주하고 5% CO₂ 배양기 내에서 37°C에서 24시간 배양한 다음, 각각의 시료 용액 (25, 50, 100, 200 µg/ml)과 5 mM 글루타메이트를 처리한 후 12시간 동안 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였으며, 세포생존율은 MTT법을 활용하여 측정하였으며, 양성대조약물로는 Trolox 50 µM를 사용하였다. 또한, 모든 실험치는 대조군에 대한 세포보호율을 mean±S.D로 표시하였으며, 각각 3회 반복 실험치를 이용하여 계산하였다.

ROS 측정 - 배양된 세포를 PBS로 세척한 후, 10 µM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, 35845)를 포함하는 Hank's balanced salt 용액에서 30분 동안 암실에서 반응시킨 후 세포의 형광광도 (Spectramax Gemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 측정하였다 (excitation wave length: 490 nm; emission wave length : 525 nm).

Western Blot Analysis - HT22 세포를 60 mm dish에 3×10⁵ cells/well 밀도로 24시간 배양한 후 각각의 시료를 농도별 또는 시간 별로 처리 하였다. HT22 세포에 RIPA buffer를 첨가한 다음, 4°C, 14,000×g 에서 25분간 원심분리하고 상등액을 튜브에 옮겼다. 단백질 정량은 BSA 단백질 실

험 키트를 이용하였고 각각의 시료를 12% SDS-polyacrylamide gel에서 영동하고 nitrocellulose membrane (NC membrane)으로 전사하였다. 전사된 NC membrane을 5% 무지방유가 포함된 신선한 blocking buffer (0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline)에서 blocking한 후 HO-1 antibody를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 2차 antibody (Anti-mouse IgG)를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응한 다음, ECL 용액을 1:1로 잘 섞어서 NC membrane 위에 가하여 발광시키고 암실에서 X선 필름에 감광한 후 현상하였다. 같은 방법으로 actin antibody를 이용하여 actin을 측정하였다.

Heme Oxygenase Activity - HO 효소 활성을 Tenhunen 등의 방법²⁵⁾에 의해 다음과 같이 측정하였다. 세포로부터 얻어진 microsome에 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)와 랫의 간 cytosol에서 얻어진 biliverdin reductase를 포함하는 반응용액인 100 mM PBS, 2 mM MgCl₂, 3 mg의 랫의 간 cytosol, 0.8 mM NADPH, 2 mM glucose-6-phosphate, 0.2 U의 glucose-6-phosphate dehydrogenase 등을 첨가하고 기질로서 hemin을 20 μM 처리한 후 37°C에서 1시간 동안 암실에서 반응한 뒤 1 ml의 chloroform으로 반응을 종결하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

핵과 세포질 분획의 분리 - HT22 세포에 protease inhibitor cocktail I과 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 첨가한 PER-mammalian protein extraction buffer를 첨가하여 균질화하고 4°C에서 15,000×g로 원심분리 하였다. 10 분간 원심분리 후 상등액을 세포질 분획으로 사용하기 위하여 -80°C에서 저장하였다. 나머지 침전물은 PBS로 세척한 후 RIPA buffer [150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM glycerophosphate, 20 mM NaF, 20 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM Na₃VO₄, protease inhibitors]를 첨가하고 4°C에서 15분간 혼합한 후 4°C, 16,000×g에서 15분간 원심분리 하였다. 이후의 과정은 앞에서 설명한 western blotting 방법을 이용하였다.

결과 및 고찰

산화적 스트레스에 의한 세포 손상은 알츠하이머 증후군, 파킨슨 증후군, 헌팅턴 증후군과 같은 중추 신경계의 퇴행성 뇌질환의 중요한 요인으로 알려져 있으며, 그 중 글루타메이트에 의한 산화적 스트레스로 유발되는 뇌세포 손상은 퇴행성 뇌질환의 주요한 요인으로 보고되고 있다.^{26,27)} 본 연구에서는 백선피의 70% 에탄올 추출물(NNMBS019)과 70% 에탄올 추출물의 비수용성 분획물(NNMBS020), 수용성 분획물(NNMBS021)이 갖는 뇌세포 보호효과와 항산화 효과

를 측정하고자 글루타메이트로 산화적 손상을 유발시킨 생쥐 해마 유래 HT22 세포를 이용하여 세포 생존율과 그 보호 기전을 연구하였다.

각각의 시료를 농도 별로 처리한 후 12시간 동안 글루타메이트와 함께 처리한 결과, 백선피 70% 에탄올 추출물의 비수용성 분획물(NNMBS020)이 세포독성을 나타내지 않은 농도(25~200 μg/ml)에서 다른 두 시료에서는 보이지 않은 유의한 세포보호 활성을 나타내었으며 (Fig. 1A), 동시에 강력한 활성산소종(reactive oxygen species :ROS) 소거 효과를 나타내었다 (Fig. 1B). NNMBS020의 처리 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 증가하였으며, ROS 소거 활성 역시 NNMBS020의 농도에 비례하여 감소하였다 (Fig. 1). 세포 생존율과 ROS 소거 활성 실험에는 항산화물질로 알려진 trolox 50 μM을 양성 대조약물로 사용하였다. 또한, 산화적 스트레스로부터의 뇌세포 보호 기전에 관여하는 중요한 단백질인 heme oxygenase (HO)-1의 발현 정도를 알아보기 위하여 각 시료를 12 시간 동안 HT22 세포에 처리한 결과, 백선피의 70% 에탄올 추출물(NNMBS019)과 수용성 분획물(NNMBS021)을 처리하였을 때는 HO-1의 발현이 거의 일어나지 않았으며 HO activity 역시 변화가 없

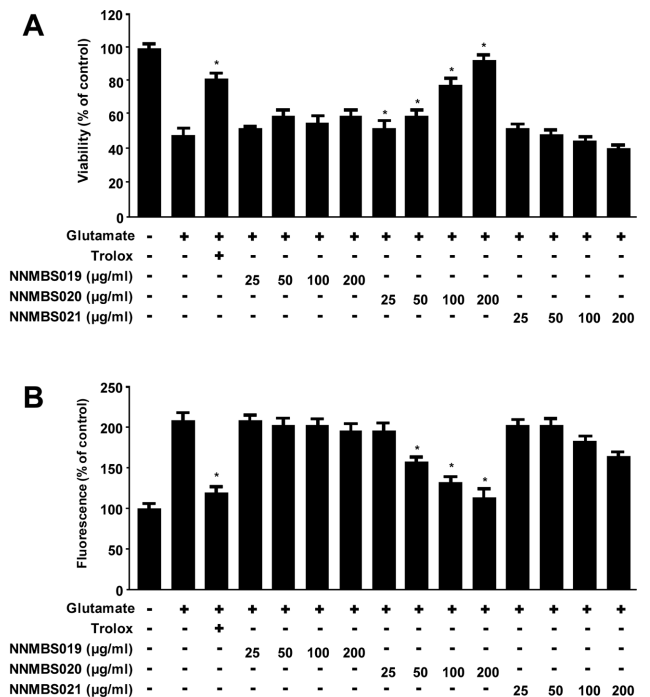


Fig. 1. Cytoprotective effect of NNMBS019~021 against glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells. (A) Cytotoxicity was assessed after 12 h incubation period with 5 mM of glutamate. (B) ROS production was assessed after 12 h incubation period with 5 mM of glutamate. Each value represents the mean ± S.D. of three experiments. Significantly different from the control; *p<0.05. Trolox (50 μM) was used as a positive control.

었다 (Fig. 2). 이에 반하여, 비수용성 분획물(NNMS020)을 처리 하였을 때는 HO-1의 발현이 농도 의존적으로 뚜렷하게 증가 하였고, HO activity 역시 증가함을 나타냈다

(Fig. 2). HO-1의 발현과 HO activity 측정 실험에는 HO-1의 유도물질로 알려진 CoPP 20 μ M을 양성 대조약물로 사용하였다. NNMS020의 뇌세포 보호 효과와 ROS 소거 작

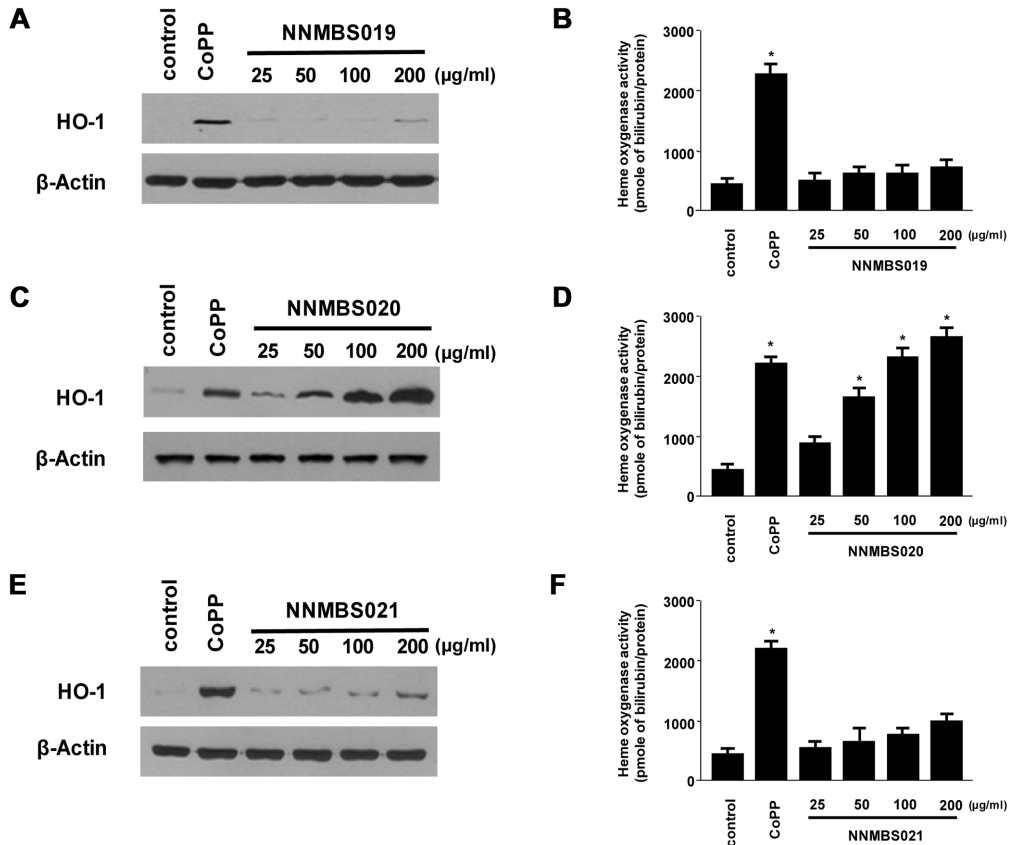


Fig. 2. Effects of NNMS019 ~ 021 on HO-1 expression in HT22 cells (A, C, E). Cells were incubated with NNMS019 ~ 021 for 12 h. HO activity was determined via bilirubin formation at 12 h after treatment with various concentration of NNMS019 ~ 021 (B, D, F). Expression of HO-1 was determined by Western blot analysis. Each value represents the mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from the control; * p <0.05.

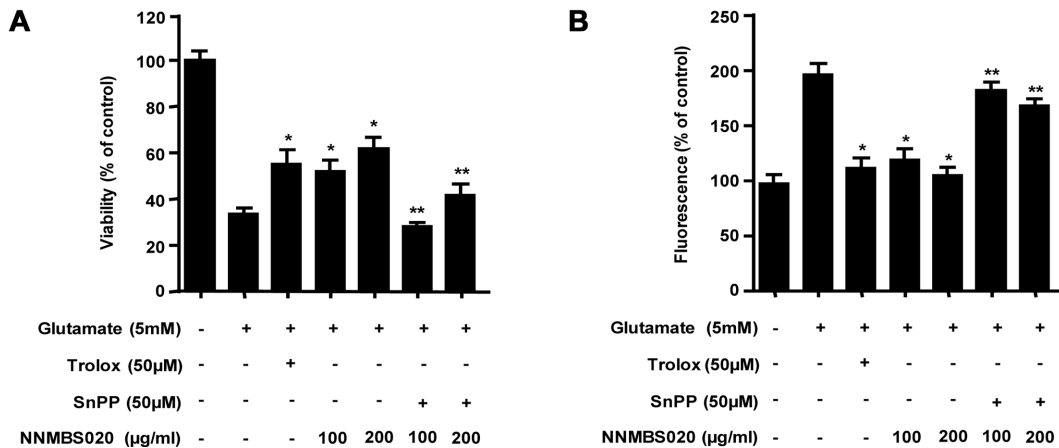


Fig. 3. Effects of HO-1 induction by NNMS020 on glutamate-induced oxidative neurotoxicity. (A) Cells were treated with 100 and 200 μ g/ml of NNMS020 or 50 μ M SnPP and then exposed to 5 mM glutamate for 12 h. (B) ROS production was assessed after 12 h incubation period with 100 and 200 μ g/ml of NNMS020 or 50 μ M SnPP and then exposed to 5 mM glutamate. Each bar represents the mean \pm S.D. of three experiments. * p <0.05 vs. glutamate (5 mM), ** p <0.05 vs. same treatment plus SnPP.

용과 HO-1의 발현간의 직접적인 관계를 알아보기 위하여, HO-1 발현 억제제인 SnPP를 이용한 세포생존을 실험을 하였다. HO-1 발현 억제제인 SnPP를 NNMBS020 (100 µg/ml, 200 µg/ml)과 함께 12시간 동안 처리한 실험에서 뇌세포 보호 효과가 억제되며, ROS 소거능 또한 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 이와 같은 결과를 통해 산화적 스트레스로부터 나타나는 NNMBS020의 세포생존을 증가와 ROS 생성억제능이 HO-1 단백질 발현과 관련 있음을 확인 하였다.

HO-1 단백질 발현에 관여하는 메커니즘 중 nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)의 핵 내로의 전사가 매우 중요한 인자로 작용한다고 알려져 있다. 전사 인자로서의 Nrf2는

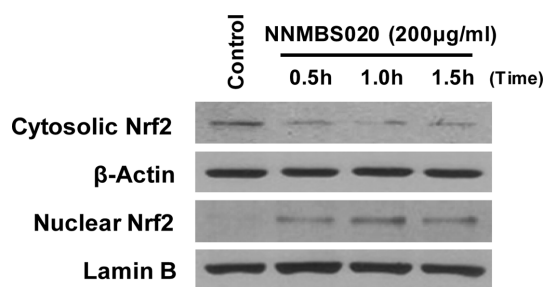


Fig. 4. Effects of NNMBS020 on nuclear translocation of Nrf2. Cells were treated with 200 µg/ml of NNMBS020 for 0.5, 1.0 and 1.5 h. The nuclei were fractionated from the cytosol using PER-Mammalian Protein Extraction buffer as described in Experimental part. Nrf2 protein was detected by Western blot analysis, and representative blots of three independent experiments are shown.

HO-1과 같은 항산화 단백질 유전자에 존재하는 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 이들 유전자의 발현과 단백질 생성을 항진시킴으로써 산화적 스트레스에 대한 생체방어기전의 핵심적 역할을 담당한다.^{28,29)} NNMBS020에 의한 Nrf2의 전사 여부를 알아보기 위하여 200 µg/ml 농도의 NNMBS020을 시간별로 처리하고 Western blot을 이용하여 분석하였다. 시간이 경과함에 따라 세포질의 Nrf2는 점점 감소하는 반면, 핵 내부의 Nrf2는 증가하는 양상을 보이는 것으로 보아 Nrf2의 핵 내로의 전사가 이루어졌음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

산화적 스트레스를 포함한 다른 여러 스트레스 요인들은 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 전달계를 자극하는데, MAPK 전달계는 세포 외부로부터의 자극을 세포 내로 전달하여 세포 내 반응을 유도하는데 중요한 역할을 하며 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK) 의 세가지 family로 구성된다.^{30,31)} 현재까지의 여러 연구들에 의하면 MAPK 역시 HO-1 발현에 직접적인 관여를 하는 것으로 밝혀져 있다.^{32,33)} NNMBS020의 HO-1 발현에 MAPK가 미치는 영향을 알아보기 위해 NNMBS020을 200 µg/ml 농도로 처리하고 여기에 각각의 MAPK의 선택적 억제제를 함께 처리하였다. p38의 억제제인 SB203580과 JNK의 억제제인 SP600125를 함께 처리했을 시에는 HO-1의 발현과 세포보호 효과에 큰 영향을 미치지 못했지만, ERK의 억제제인 PD98059를 처리했을 시에는 HO-1의 발현이 줄어들고 세포보호효과 또한 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 5). 따라서 본 연구를 통해 백

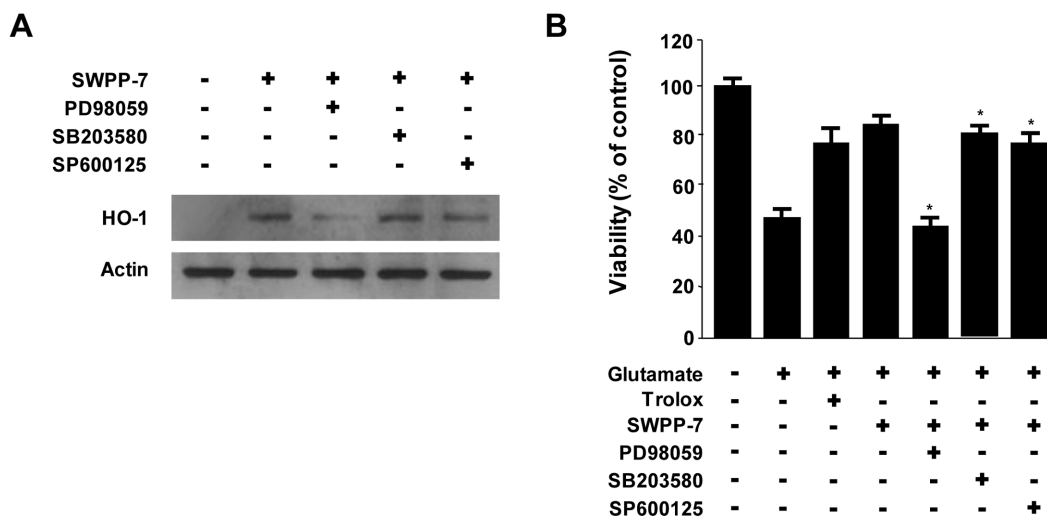


Fig. 5. Effects of NNMBS020-induced ERK pathway activation on HO-1 expression and glutamate-induced neurotoxicity. (A) Cells were incubated with 200 µg/ml of NNMBS020 for 12h in the presence or absence of PD98059 (40 µM), SB203580 (20 µM) and SP600125 (25 µM). Western blotting was then performed with HO-1 antibody. (B) Cells untreated or treated with NNMBS020 (200 µg/ml) in the presence or absence of each specific inhibitor for 12 h were exposed to 5 mM glutamate for 8 h. Trolox (50 µM) was used as positive control. Each bar represents the mean ± S.D. of three experiments. **p*<0.05 vs. glutamate (5 mM), ***p*<0.05 vs. same treatment plus SnPP.

선피 추출물의 비수용성 분획물인 NNMBS020은 HT22 세포에서 ERK pathway를 경유하여 Nrf2를 핵내로 전사하고 이를 통하여 HO-1 단백질 발현을 함으로써 글루타메이트에 의한 산화적 독성으로부터 보호활성을 나타낸다는 사실을 확인하였으며, 이와 같은 결과를 바탕으로 향후 NNMBS020의 추가적인 뇌세포 보호기전 연구와 활성물질 분리 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 백선피 추출물 및 분획물의 뇌세포 보호 효과와 그 보호 기전을 탐색하였으며, 그 결과 백선피의 70% 에탄올 추출물의 비수용성 분획물인 NNMBS020가 글루타메이트로 유발한 생쥐 해마 유래 HT22 세포주의 독성에 대하여 유의한 세포보호 활성을 나타내었다. 이는 ERK 인산화와 Nrf2의 핵 내 전사 유도를 통하여 HO-1 단백질을 발현에 의한 것으로 생각된다.

사 사

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다. (No. 20100024029)

인용문헌

1. 생약학교재편찬위원회 (2007) 생약학, 218-220. 동명사, 서울.
2. 한국 약용식물학 연구회 (2001) 종합약용식물학, 219. 학창사, 서울.
3. Zhao, W., Wolfender, J. L., Hostettmann, K., Xu, R. and Qin, G. (1998) Antifungal alkaloids and limonoid derivatives from *Dictamnus dasycarpus*. *Phytochemistry* **47**: 7-11.
4. Lei, J., Yu, J., Yu, H. and Liao, Z. (2008) Composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of essential oil from *Dictamnus dasycarpus*. *Food Chem.* **107**: 1205-1209.
5. Zhao, W. M., Wolfender, J. L., Hostettmann, K., Li, H. Y., Steockli-Evans, H., Xu, R. S. and Qin, G. W. (1998) Sesquiterpene glycosides from *Dictamnus dasycarpus*. *Phytochemistry* **47**: 63-68.
6. Reisch, J., Szendrei, K., Minker, E. and Novak, I. (1967) Note on the presence of auranthen in *Dictamnus albus*. *Planta Med.* **15**: 320-322.
7. Yu, S. M., Ko, F. N., Su, M. J., Wu, T. S., Wang, M. L., Huang, T. F. and Teng, C. M. (1992) Vasorelaxing effect in rat thoracic aorta caused by fraxinellone and dictamine isolated from the Chinese herb *Dictamnus dasycarpus* Turcz: Comparison with cromakalim and Ca²⁺ channel blockers. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **345**: 349-355.
8. Jung, H. J., Sok, D. E., Kim, Y. H., Min, B. S., Lee, J. P. and Bae, K. H. (2000) Potentiating effect of obacunone from *Dictamnus dasycarpus* on cytotoxicity of microtubule inhibitors, vincristine, vinblastine and taxol. *Planta Med.* **66**: 74-76.
9. Yoon, J. S., Yang, H., Kim, S. H., Sung, S. H. and Kim, Y. C. (2010) Limonoids from *Dictamnus dasycarpus* protect against glutamate-induced toxicity in primary cultured rat cortical cells. *J. Mol. Neurosci.* **42**: 9-16.
10. Kim, J. H., Park, Y. M., Shin, J. S., Park, S. J., Choi, J. H., Jung, H. J., Park, H. J. and Lee, K. T. (2009) Fraxinellone inhibits lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by negatively regulating nuclear factor-kappa B in RAW 264.7 macrophages cells. *Biol. Pharm. Bull.* **32**:1062-1068.
11. Jiang, S., Nakano, Y., Rahman, M. A., Yatsuzuka, R. and Kamei, C. (2008) Effects of a *Dictamnus dasycarpus* T. extract on allergic models in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 660-665.
12. Coyle, J. T. and Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* **262**: 689-695.
13. Satoh, T., Enokido, Y., Kubo, K., Yamada, M. and Hatanaka, H. (1999) Oxygen toxicity induces apoptosis in neuronal cells. *Cell Mol. Neurobiol.* **18**: 649-666.
14. Satoh, T., Okamoto, S., Cui, J., Watanabe, Y., Furuta, K., Suzuki, M., Tohyama, K. and Lipton, S. A. (2006) Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophilic] phase II inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 768-773.
15. Satoh, T. and Lipton, S. A. (2007) Redox regulation of neuronal survival mediated by electrophilic compounds. *Trends Neurosci.* **30**: 37-45.
16. Alibright, T. D., Jessel, T. M., Kandel, E. R. and Poster, M. I. (2000) Neural science: a century of progress and the mysteries that remain. *Cell* **18**: 209-216.
17. Siesjö, B. K. (1981) Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1**: 155-185.
18. Greenamyre, J. T., Penney, J. B., Young, A. B., D'Amato, C. J. and Hicks, S. P. (1985) Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's disease. *Science* **4693**: 1496-1499.
19. Choi, D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron* **1**: 623-634.
20. Lipton, S. A. (2007) Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**: 803-808.
21. Rössler, O. G., Bauer, I., Chung, H. Y. and Thiel, G. (2004) Glutamate-induced cell death of immortalized murine hippocampal neurons: neuroprotective activity of heme oxygenase-1, heat shock protein 70, and sodium selenite. *Neurosci. Lett.* **362**: 253-257.
22. Lee, M. S., Lee, J., Kwon, D. Y. and Kim, M. S. (2006)

- Ondamtangamibang protects neurons from oxidative stress with induction of heme oxygenase-1. *J. Ethnopharmacol.* **108**: 294-298.
23. Choi, B. M., Kim, H. J., Oh, G. S., Pae, H. O., Oh, H. C., Jeong, S. J., Kwon, T. O., Kim, Y. M. and Chung, H. T. (2002) 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose protects rat neuronal cells (Neuro 2A) from hydrogen peroxide-mediated cell death via the induction of heme oxygenase-1. *Neurosci. Lett.* **328**: 185-189.
24. Jeong, G. S., Li, B., Lee, D. S., Byun, E., Kang, D. K., Lee, H. S. and Kim, Y. C. (2007) Cytoprotective constituents of *Alipinia katsumadai* seeds against glutamate-induced oxidative injury in HT22 cells. *Nat. Prod. Sci.* **13**: 268-272.
25. Tenhunen, R., Marver, H. S. and Schmid, R. (1970) The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J. Lab. Clin. Med.* **75**: 410-421.
26. Tan, S., Schubert, D. and Maher, P. (2001) Oxytosis: a novel form of programmed cell death. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**: 497-506.
27. Rössler, O. G., Bauer, I., Chung, H. Y. and Thiel, G. (2004) Glutamate-induced cell death of immortalized murine hippocampal neurons: neuroprotective activity of heme oxygenase-1, heat shock protein 70, and sodium selenite. *Neurosci. Lett.* **362**: 253-257.
28. Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C. J., Foresti, R., Alam, J. and Motterlini, R. (2003) Curcumin activates the heme oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem. J.* **371**: 887-895.
29. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 313-322.
30. Choi, B. H., Hur, E. M., Lee, J. H., Jun, D. J. and Kim, K. T. (2005) Protein kinase C delta-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death. *J. Cell Sci.* **119**: 1329-1340.
31. Oh, H. L., Seok, J. Y., Kwon, C. H., Kang, S. K. and Kim, Y. K. (2006) Role of MAPK in ceramide-induced cell death in primary cultured astrocytes from mouse embryonic brain. *Neurotoxicology* **27**: 31-38.
32. Elbirt, K. K., Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. and Bonkovsky, H. L. (1998) Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **273**: 8922-8931.
33. Kietzmann, T., Samoylenko, A. and Immenschuh, S. (2003) Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by MAP kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **278**: 17927-17936.
- (2011. 4. 14 접수; 2011. 5. 11 심사; 2011. 5. 23 게재확정)