

글루타메이트로 유도된 쥐 해마 HT22 세포의 산화적 손상에 대한 서양민들레 지상부의 뇌신경세포 보호활성

리빈[†] · 이동성[†] · 최현규 · 김경수 · 지혜영 · 노정미 · 김기모 · 김윤철[#]

원광대학교 약학대학

(Received August 8, 2011; Revised August 9, 2011; Accepted August 11, 2011)

Neuroprotective Effect of the Aerial Parts of *Taraxacum officinale* on Glutamate-induced Oxidative Injury in Mouse Hippocampal HT22 Cells

Bin Li[†], Dong-Sung Lee[†], Hyun-Gyu Choi, Kyung-Su Kim, S, Hye-Young Ji,
Jung-Mi Rho, Ki-Mo Kim and Youn-Chul Kim[#]

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract — Glutamate-induced oxidative injury contributes to neuronal degeneration in many central nervous system (CNS) diseases, such as epilepsy and ischemia. Inducible heme oxygenase (HO)-1 acts against oxidants that are thought to play a role in the pathogenesis of these diseases. In the present study, we investigated the neuroprotective effects of the standard extracts of *Taraxacum officinale* Weber, one of the original plants of Taraxaci Herba, on glutamate-induced oxidative injury in mouse hippocampal HT22 cells. The standard EtOH extract of the aerial parts of *T. officinale* (NNMBS270) showed significant cytoprotective effects on glutamate-induced neurotoxicity and induced the expression of heme oxygenase (HO)-1 in the mouse hippocampal HT22 cells, while the roots' extract (NNMBS271) did not show neuroprotective effect. These results suggest that the extract of the aerial parts of *T. officinale* could be an effective candidate for the treatment of ROS-related neurological diseases.

Keywords □ glutamate-induced toxicity, Taraxaci Herba, *Taraxacum officinale*, HT22, heme oxygenase-1, neuroprotective effect

포공영(Taraxaci Herba)은 국화과(Compositae)에 속하는 민들레의 생약명이며 한방에서는 예로부터 해열, 발한, 건위, 강장해독, 임파선염, 급성 기관지염, 위염, 간염, 담낭염, 부인병 등의 치료에 사용 되어 왔다.¹⁻³⁾ 포공영은 taraxasterol, taraxerol, arnidiol, lutein, flavoxanthine, lutein, violaxanthin, plastoquinone 등 성분을 함유하고 있으며 특히 guainolide sesquiterpene인 desacetylmatricarin(austricin)은 항 알레르기 작용이 있는 것으로 알려져 있다.⁴⁻⁶⁾ 포공영은 인체에 유해한 각종 미생물의 발육 저해 항균성 물질을 함유하고 있으며, 뿐만 아니라 항산화, 항암 효과 역시 우수한 것으로 보고되고 있다.^{7,8)} 포공영(Taraxaci Herba) 기원 식물인 민들레는 *Taraxacum officinale*, *T. coreanum*, *T. mongolicum*, *T. ohwianum* 등 다양한 종류를 포함하고 있지

만 이들의 약리 활성에 관한 연구는 많이 알려져 있지 않다.

미토콘드리아 내의 산화환원 효소계, 외부 항원에 노출된 면역세포에 의해 그리고 외부적으로는 방사선 또는 여러 화합물 등에 의해 생체 내에는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 활성 산소종이 너무 많이 생성되거나 항산화 시스템의 기능이 저하되어 활성 산소종의 생성과 제거 사이의 균형이 파괴되면 생체는 활성 산소종에 의해 산화적 스트레스(oxidative stress)를 받게 된다.⁹⁾ 산화적 스트레스는 심장병, 암, 당뇨 등 다양한 질병의 발생과 진행을 촉진하며 특히 알츠하이머 증후군을 비롯한 퇴행성 뇌질환을 일으키는 중요한 요인으로 알려져 있다.¹⁰⁻¹²⁾

중추 신경계(central nervous system, CNS)의 대표적인 흥분성 신경전달 물질인 글루타메이트는 시냅스에서 신경전달, 뉴런의 형성과 성장, 행동이나 학습 및 기억력 등에 매우 중요한 역할을 한다.¹³⁾ 하지만 이러한 생리화학적 기능에도 불구하고 글루타메이트의 독성은 신경세포에 손상을 미치거나 급성 또는 만

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-850-6823 (팩스) 063-852-8837
(E-mail) yckim@wku.ac.kr

[†]These authors contributed equally to this work.

성의 퇴행성 뇌질환을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다.^{14,15)} 글루타메이트가 유발하는 신경세포 손상은 크게 두 가지 요인으로 구분할 수 있는데, 글루타메이트 수용체의 과다흥분에 의한 독성과 글루타메이트 수용체의 매개 없이 산화적 스트레스를 유발하여 세포에 손상을 미치는 것이다.^{16,17)} 본 실험에서는 글루타메이트의 수용체가 결여되어있는 쥐의 해마유래인 HT22 세포주를 사용하여 글루타메이트 처리시 수용체 과다 흥분에 의한 독성이 아닌 산화적 스트레스로 인한 세포의 손상을 확인할 수 있도록 하였다.¹⁸⁾

Heme oxygenase(HO)는 세포의 항산화 시스템에서 중요한 역할을 담당하는 단백질로서, HO 유도체 중 유도 가능한 형태인 HO-1은 세포내의 heme를 분해하여 일산화탄소, 철, biliverdin을 만든다.¹⁹⁾ 이렇게 분해된 세 가지 형태의 생성물들과 HO-1 그 자체는 세포손상 및 사멸의 억제, 항염증 및 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근에는 뇌 보호 기전 중, Heme oxygenase-1과 그 부산물들의 항산화작용을 비롯한 다양한 생리활성으로 인하여 뇌 세포 보호에 관여하게 되는 것으로 현재 많은 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 뇌 세포 보호 활성을 나타내는 새로운 물질을 찾기 위하여 포공영 기원 식물인 *T. officinale*의 지상부와 뿌리의 EtOH 추출물을 이용한 *in vitro* 뇌 보호 활성을 검색하였다. 그 결과 *T. officinale*의 지상부 EtOH 추출물(NNMBS270)이 Heme oxygenase-1의 발현을 통하여 뇌 세포 보호 효과를 가지는 것을 확인하였고, 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료

본 실험에 사용한 *Taraxacum officinale* 지상부의 EtOH 추출물(NNMBS270)과 뿌리의 EtOH 추출물(NNMBS271)은 천연물 신약 표준화 소재은행에서 분양 받아 사용하였다.

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.

HT22 세포배양 및 뇌 세포 보호활성 측정

생쥐 해마유래 HT22 세포주는 목인희 교수(서울대학교)로부터

분양하여 사용하였으며, 글루타메이트로 독성을 유발한 세포주에 대한 보호활성 측정은 정²³⁾ 등의 방법에 따라 실시하였다. HT22 세포(2×10^5 cells/well)를 10% heat-inactivated FBS, penicillin G(100 IU/ml)와 streptomycin(100 µg/ml)을 함유한 DMEM 배지에 분주하고 5% CO₂ 배양기 내에서 37°C에서 24시간 배양한 다음, 각각의 시료 용액(50, 100, 200, 400 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 세포 보호율을 mean±S.D.로 표시하였으며, 각각 3회 반복 실험치를 이용하여 계산하였다.

Western blot analysis

HT22 세포를 60 mm dish에 3×10^5 cells/well 밀도로 24시간 배양한 후 각각의 시료를 농도별로 처리하였다. HT22 세포에 RIPA buffer를 첨가한 다음, 4°C, 14,000×g에서 25분간 원심분리하고 상등액을 튜브에 옮겼다. 단백질 정량은 BSA 단백질 실험 키트를 이용하였고 각각의 시료를 12% SDS-polyacrylamide gel에서 영동하고 nitrocellulose membrane(NC membrane)으로 전사하였다. 전사된 NC membrane을 5% 무지방우유가 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 측정한다.

통계처리

본 실험의 통계처리는 GraphPad Prism, version 3.03(GraphPad Software Inc., San Diego, CA)을 사용하였다. 각 실험군의 결과는 평균치와 표준오차로 나타내었으며, 각 실험군 간의 결과는 ANOVA test를 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다. 실험군 간의 차이는 95% 수준($p < 0.05$)에서 유의성 있는 것으로 하였다.

실험결과 및 고찰

퇴행성 뇌 질환에 관한 연구는 지난 10여 년간 진행되어 왔으며, 그 주요한 기전은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았지만 체내의 산화와 항산화의 부조화로 인하여 생기는 산화적 스트레스가 퇴행성 뇌 질환에서 뇌 세포 손상을 일으키는 주요한 인자 중의 하나로 알려져 있다. 글루타메이트는 체내에서 cystine/glutamate transport system Xc-을 통하여 cystine 섭취를 억제

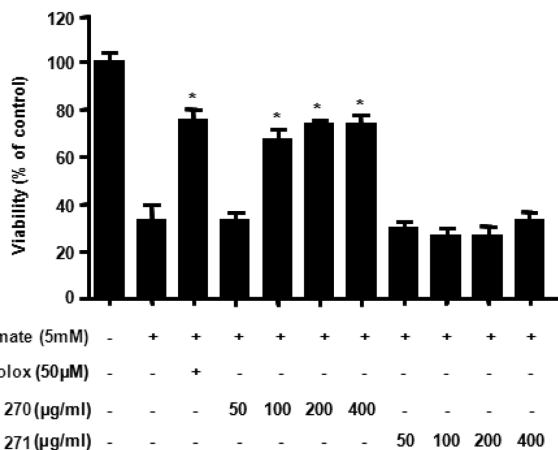


Fig. 1 – Protective effects of NNMBS270 and NNMBS271 on glutamate-induced oxidative neurotoxicity in HT22 cells. Cells were treated with various concentrations of samples and then incubated for 12 h with glutamate (5 mM). Each bar represents the mean±S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$, vs. control. Trolox was used as the positive control.

함으로서 glutathione level을 저하시키고 최종적으로 세포는 산화적 스트레스로 인한 손상을 받게 되며, 글루타메이트에 의한 산화적 스트레스가 뇌 세포 손상을 일으키는 기전은 퇴행성 뇌 질환의 주요한 요인이기도 하다.¹⁸⁾

본 연구에서는 포공영 기원식물인 *T. officinale*의 뇌세포 보호 효과와 항산화 효과를 측정하고자 생쥐의 해마 유래 HT22 세포에서 글루타메이트 세포독성으로부터의 뇌 세포 보호 효과를 검색하였다. 각 시료를 농도별로 12 시간 처리한 결과 *T. officinale* 지상부의 EtOH 추출물(NNMBS270)이 세포 독성이 나타나지 않은 농도(100~400 µg/ml)에서 글루타메이트로 인한 독성으로부터 유의한 뇌 세포보호 활성을 보였다(Fig. 1). *T. officinale* 지상부의 EtOH 추출물(NNMBS270)의 처리 농도가 증가함에 비례하여 세포 생존율이 농도 의존적으로 점차 증가하였으며, 세포 생존율 실험의 유의성 확인을 위한 양성 대조약물로는 항산화 물질로 알려진 trolox 50 µM을 사용하였다.

Heme oxygenase(HO)는 세포의 항산화시스템에서 중요한 구성 요소로서 HO 유도체 중 하나인 HO-1은 세포사멸 억제, 항염증 및 항산화 작용을 갖는 것으로 알려져 다양한 질병의 타겟으로 큰 주목을 받고 있다. 특히 최근에는 HO-1의 발현이 세포 보호와 항산화 작용을 통하여 산화적 스트레스로 인한 뇌세포 손상을 억제한다는 연구 결과가 보고되었다.²⁰⁻²³⁾

T. officinale 지상부의 EtOH 추출물(NNMBS270)의 세포보호 효과가 산화적 스트레스로부터의 뇌세포 보호 기전에 관여하는 중요한 단백질인 HO-1의 발현에 기인하는 것이 아닌지 알아보기 위하여 *T. officinale* 지상부의 EtOH 추출물(NNMBS270)을 농도별(50~400 µg/ml)로 12시간 동안 HT22 세포에 처리하여

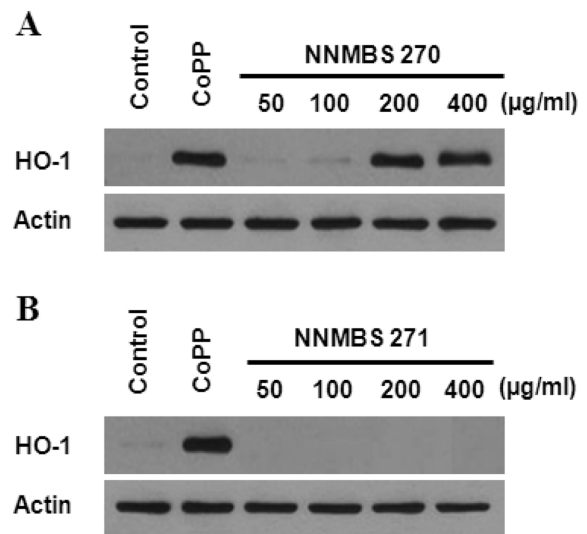


Fig. 2 – Effects of NNMBS270 and NNMBS271 on HO-1 expression in HT22 cells. Cells were incubated with various concentrations of samples and the HO-1 inducer CoPP (20 µM) for 12 h. Expression of HO-1 was determined by Western blot analysis, and representative blots of three independent experiments are shown. CoPP was used as the positive control.

그 발현 양상을 Western Blot 분석법으로 확인하였다. *T. officinale* 뿌리의 EtOH 추출물(NNMBS271)은 아무런 작용이 없는 반면, *T. officinale* 지상부의 EtOH 추출물(NNMBS270)은 200 µg/ml에서 발현을 보이기 시작하면서 농도가 증가함에 따라 HO-1의 발현이 농도 의존적으로 현저하게 증가하였다(Fig. 2), HO-1의 발현 측정 실험에서 양성 대조약물로 HO-1 발현 유도 물질인 CoPP 20 µM을 사용하였다.

T. officinale 지상부의 EtOH 추출물(NNMBS270)의 뇌세포 보호 효과가 HO-1의 발현유도와 직접적인 관련이 있는지를 확인하기 위하여, HO-1 활성 억제제인 SnPP를 사용하여 세포생존율 측정 실험을 진행하였다. 세포생존율 측정 실험에서 가장 훌륭한 세포보호 효과를 보여준 농도 400 µg/ml로 *T. officinale* 지상부의 EtOH 추출물(NNMBS270)을 처리하고 SnPP를 함께 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 실험을 진행하였다. SnPP를 처리하지 않은 군은 *T. officinale* 지상부의 EtOH 추출물(NNMBS270)에 의하여 세포생존율이 증가하였으나, SnPP를 함께 처리한 군에서는 세포생존율이 현저하게 감소하였다(Fig. 3). 함께 처리한 SnPP 50 µM 자체는 세포생존에 큰 영향을 미치지 않았다. *T. officinale* 지상부의 EtOH 추출물(NNMBS270)에 의해 증가 했던 세포 보호활성이 HO-1의 억제제인 SnPP로 인해 감소되는 것을 통하여 *T. officinale* 지상부의 EtOH 추출물(NNMBS270)은 HO-1을 발현함으로써 뇌세포 보호활성을 나타내는 것을 확인 하였다. 한편, *T. officinale* 뿌리의 EtOH 추출물(NNMBS271)을 SnPP와 함께 처리한 군은 세포생존율에 영향을

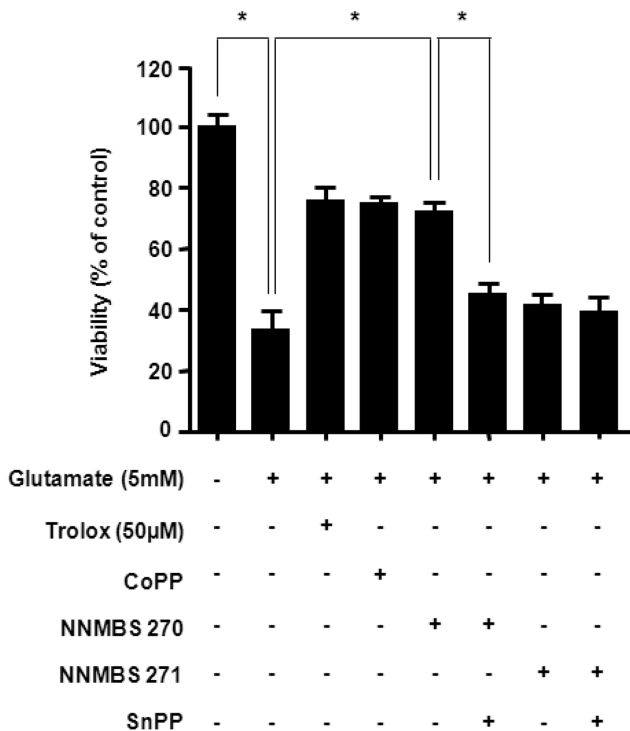


Fig. 3 - Effects of extracts-induced HO-1 on glutamate-induced oxidative neurotoxicity. Cells were treated with 400 µg/ml of samples or 20 µM CoPP in the presence or absence of 50 µM SnPP, an inhibitor of HO activity, and then exposed to glutamate (5 mM) for 12 h. Each bar represents the mean±S.D. of three independent experiments, *p<0.05. Trolox and CoPP were used as the positive control.

미치지 않았다.

결론

본 연구는 포공영 기원 식물의 뇌 세포 보호활성과 그 메커니즘을 탐색하였으며 그 결과 *T. officinale* 지상부의 EtOH 추출물 (NNMBS270)이 글루타메이트로 유발한 HT22 세포주에 대해 훌륭한 보호 활성을 나타냈으며, 항산화 및 세포보호 효소인 HO-1 단백질을 발현함으로써 뇌 세포보호활성을 나타내는 메커니즘을 규명하였다.

감사의 말씀

본 연구는 한국학술진흥재단 중점연구소 지원 연구비(J03203)에 의해 이루어 졌으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1) Bae, K. H. : The medicinal plants of Korea. Kyohak Pub. Co.,

Seoul (2000).
 2) Lee, E. B., Kim, J. K. and Kim, O. K. : The antigastric effect of Taraxaci Herba. *Kor. J. Pharmacogn.* **24**, 313 (1993).
 3) Kang, M. J. and Kim, K. S. : Current trends of research and biological activities of dandelion. *Food Ind. Nutr.* **6**, 60 (2001).
 4) Ahmad, V. U., Yasmeen, S., Ali, Z., Khan, M. A., Choudhary, M. I., Akhtar, F., Miana, G. A. and Zahid, M. : Taraxacin, a new guaianolide from *Taraxacum wallichii*. *J. Nat. Prod.* **63**, 1010 (2000).
 5) Kim, T. J. : Korean resources plants. Seoul National University Pub. Co., Seoul, (1996).
 6) Cheong, H., Choi, E. J., Yoo, G. S., Kim, K. M. and Ryu, S. Y. : Desacetylmaticarin, an anti-allergic component from *Taraxacum platycarpum*. *Planta Med.* **64**, 577 (1998).
 7) Kisiel, W. and Barszez, B. : Further sesquiterpenoids and phenolics from *Taraxacum officinale*. *Fitoterapia* **71**, 269 (2000).
 8) Takasaki, M., Konoshima, T., Tokuda, H., Arai, Y., Shiojima, K. and Ageta, H. : Anti-carcinogenic activity of *Taraxacum* plant. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 602 (1999).
 9) Coyle, J. T. and Puttfarcken, P. : Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689 (1993).
 10) Satoh, T., Enokido, Y., Kubo, K., Yamada, M. and Hatanaka, H. : Oxygen toxicity induces apoptosis in neuronal cells. *Cell Mol. Neurobiol.* **18**, 649 (1999).
 11) Satoh, T., Okamoto, S., Cui, J., Watanabe, Y., Furuta, K., Suzuki, M., Tohyama, K. and Lipton, S. A. : Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophilic] phase II inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 768 (2006).
 12) Satoh, T. and Lipton, S. A. : Redox regulation of neuronal survival mediated by electrophilic compounds. *Trends Neurosci.* **30**, 37 (2007).
 13) Alibright, T. D., Jessel, T. M., Kandel, E. R. and Poster, M. I. : Neural science: a century of progress and the mysteries that remain. *Cell* **18**, 209 (2000).
 14) Siesjö, B. K. : Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1**, 155 (1981).
 15) Greenamyre, J. T., Penney, J. B., Young, A. B., D'Amato, C. J. and Hicks, S. P. : Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's disease. *Science* **4693**, 1496 (1985).
 16) Choi, D. W. : Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron.* **1**, 623 (1988).
 17) Lipton, S. A. : Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 803 (2007).
 18) Rössler, O. G., Bauer, I., Chung, H. Y. and Thiel, G. : 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 (2004).
- 19) Lee, M. S., Lee, J., Kwon, D. Y. and Kim, M. S. : Ondamtanggamibang protects neurons from oxidative stress with induction of heme oxygenase-1. *J. Ethnopharmacol.* **108**, 294 (2006).
- 20) Morse, D. and Choi, A. M. : Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**, 8 (2002).
- 21) Lee, B. S., Heo, J. H., Kim, Y. M., Shim, S. M., Pae, H. O., Kim, Y. M. and Chung, H. T. : Carbon monoxide mediates heme oxygenase 1 induction via Nrf2 activation in hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 965 (2006).
- 22) Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C. J., Foresti, R., Alam, J. and Motterlini, R. : Curcumin activates the heme oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem. J.* **371**, 887 (2003).
- 23) Jeong, G. S., An, R. B., Pae, H. O., Chung, H. T., Yoon, K. H., Kang, D. G., Lee, H. S. and Kim, Y. C. : Cudraticusxanthone A protects mouse hippocampal cells against glutamate-induced neurotoxicity via the induction of heme oxygenase-1. *Planta Med.* **74**, 1368 (2008).