

희림 추출물의 Heme Oxygenase-1 발현을 통한 생쥐 해마 유래 HT22 세포 보호효과

임남경^{1#} · 이동성^{2#} · 여선정³ · 김윤철⁴ · 정길생^{1,3*}
¹계명대학교 신약개발연구소, ²원광대학교 한방체액조절연구센터,
³계명대학교 약학대학, ⁴원광대학교 약학대학

Involvement of Heme Oxygenase-1 Induction in the Neuroprotective Activity of Extract of Siegesbeckia Herba in Murine Hippocampal HT22 Cells

Nam Kyung Im^{1#}, Dong Sung Lee^{2#}, Sun Jung Yeo³, Youn-Chul Kim², and Gil-Saeng Jeong^{1,3*}

¹New Drug Development Institute, Keimyung University, Dae-gu 704-701, Korea
²Hanbang Body-Fluid Research Center, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea
³College of Pharmacy, Keimyung University, Dae-gu 704-701, Korea
⁴College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract – Siegesbeckia Herba is known to have anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-allergic and anti-tumor. The objective of this study is to explore the neuroprotective effect of Siegesbeckia Herba against glutamate-induced oxidative stress in mouse hippocampal HT22 cells. Siegesbeckia Herba 70% ethanol extract and solvent fractions have the potent neuroprotective effects on glutamate-induced neurotoxicity by induced the expression of heme oxygenase (HO)-1 in the mouse hippocampal HT22 cells. Especially, ethyl acetate fraction showed higher protective effect. In HT22 cell, Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction makes the nuclear accumulation of Nrf2. Further, we found that treatment with c-JUN N-terminal kinase (JNK) inhibitor (SP600125) reduced Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction induced HO-1 expression and Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction also increased JNK phosphorylation. In conclusion, the ethyl acetate fraction of 70% ethanol extract of Siegesbeckia Herba significantly protect glutamate-induced oxidative damage by induction of HO-1 via Nrf2 and JNK pathway in mouse hippocampal HT22. Taken together these finding suggest that Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction good source for taking active compounds and may be a potential therapeutic for brain disorder by targeting the oxidative stress of neuronal cell.

Key words – Siegesbeckia Herba, ROS, Heme oxygenase-1, HT22, Glutamate, Neuroprotective effect

희림(*Siegesbeckia Herba*)은 국화과(Compositae)에 속하며, 진득찰(*Siegesbeckia glabrescens* Makino) 또는 털진득찰(*Siegesbeckia pubescens* Makino) 1년생의 전초를 약용으로 사용한다. 높이는 40~100 cm로 자라며 야산이나 들에서 흔히 볼 수 있으며, 전체에 짧은 털이 뽁뽁하게 나며, 끝이 뽁뽁하고 가장자리에 톱니가 있는 잎이 줄기에 마주난다. 꽃은 8~9월에 가지나 줄기 끝에 노란 꽃이 산방 꽃차례로 달리며, 열매를 둘러싸는 5개의 주걱모양의 총포조각의 겉에 나 있는 털에는 끈적거리는 액체가 묻어있어 다른 물체에 잘 달라붙는다. 예로부터 민간에서 제풍습(除風濕), 리근골

(利筋骨), 강혈압(降血壓)의 효능이 있어 요슬산연(腰膝酸軟), 사지마비(四肢麻痺), 고혈압(高血壓), 류마티스 등의 치료에 널리 사용되어 왔다.^{1,2)} 희림에서 분리된 주요성분으로는 sesquiterpene 계열 성분과 diterpene 계열 성분 등이 보고되어 있으며,³⁻⁵⁾ 생리활성으로는 항알러지작용, 면역억제작용, 항고혈압작용, 항암작용, 항산화작용등이 알려져 있다.⁶⁻⁸⁾

산소에 의하여 유래되는 superoxide, hydroxy peroxy, alkoxy, hydroperoxy radical, nitric oxide등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 호흡 과정이나 세포 대사과정에서 자연스럽게 생성되며 여러 가지 세포 반응을 조절하는 역할을 한다.⁹⁻¹⁰⁾ 하지만, 과도한 스트레스, 흡연, 음주 등 여러 가지 원인으로 인하여 과도하게 생성된 활성산소들은 노화를 유발하고 알츠하이머, 파킨슨 증후군, 헌

#These authors contributed equally to this work
*교신저자(E-mail): gsjeong@kmu.ac.kr
(Tel): +82-53-580-6649

팅턴 증후군과 같은 중추신경계 퇴행성 뇌질환을 일으키는 원인중 하나로 알려져 있다.¹¹⁻¹³⁾ 글루타메이트의 과다 분비는 수용체들의 과도한 자극으로 뇌 신경세포에 산화적 스트레스를 유발하고 세포사멸을 유도하여 뇌손상을 일으킨다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 본 실험에 사용한 생쥐의 해마유래 세포주인 HT22 세포는 글루타메이트 수용체가 없는 세포주로서 글루타메이트와 함께 처리할 때 신경흥분독성이 아닌 산화적 스트레스로 인하여 세포가 손상을 받으며, 산화적 스트레스로 인한 뇌 세포 보호 물질을 찾는 실험모델로 유용하게 이용되고 있다.¹⁷⁾

Heme oxygenase (HO)는 세포의 항산화 시스템에서 중요한 구성요소로서 HO 유도체중 하나인 HO-1은 세포내의 heme을 분해하여 일산화탄소, 철, biliverdin을 만든다.¹⁸⁾ 분해된 생성물인 일산화탄소, 철, biliverdin과 HO-1 그 자체는 세포손상 및 사멸의 억제, 항염증 및 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 다양한 질병의 타겟으로 주목을 받고 있다. 특히 최근에는 HO-1과 그 부산물들이 항산화 작용을 통하여 산화적 스트레스에 의한 뇌 세포 손상을 억제한다는 많은 연구가 보고 된다.¹⁹⁾ 따라서, 본 연구에서는 희림 에탄올 추출물과 그 분획물의 HT22 생쥐유래 해마세포에서 글루타메이트로 유발한 산화적 손상에 대한 뇌세포 보호 효과를 살펴보고자 하며, 그 작용 기전을 탐색하였다.

재료 및 방법

실험 재료 - 본 실험에 사용된 희림(*Siegesbeckia Herba*)은 2011년 9월 대구광역시 약령 시장에서 건조된 것을 구입하여 사용하였다. 형태학적 평가를 통하여 동정하였고 표본시료(KMP-2012-02)는 계명대학교 약학대학에 보관하였다.

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.

추출 및 분획 - 건조된 희림 2 kg을 10배(W/V)의 70% 에탄올을 넣어 3회 추출, 여과하고 rotary vacuum evaporator로 농축한 후 에탄올을 추출물(183.7 g)로 사용하였다. 이 추출물을 증류수로 현탁 시킨 후 n-hexane, CHCl₃, EtOAc로 순차적으로 3회 반복 추출한 후 각 분획들을 감압 농축하여 용매를 휘발 시킨 뒤 hexane (16.8 g), CHCl₃ (1.9 g), EtOAc (3.8 g), 분획과 남은 H₂O 분획층 (55.2 g)을 얻었다. 각 시료들은 -70°C에서 보관하며 사용하였다.

세포배양 - 마우스 해마유래의 HT22 세포주는 목인희 교

수(서울대학교)로부터 분양받아 사용하였으며, D-MEM 배지에 10% FBS와 1% antibiotics를 첨가하여 37°C의 5% CO₂ incubator에서 1-2일 마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

글루타메이트 유도 뇌세포 보호효과 측정 - 글루타메이트로 유도한 뇌세포 독성에 대한 보호 효과는 정등의 방법²⁰⁾에 따라 실시하였다. HT22세포를 96 well microplate에 2×10⁵ cells/well이 되게 분주한 후, 37°C의 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음, 5 mM의 글루타메이트와 각 추출물과 분획물(50, 100, 200 µg/ml)을 농도별로 처리하였다. 시료 처리 12시간 후 세포 생존률을 MTT 방법으로 측정하였으며, Trolox 50 µM을 양성대조군으로 하여 비교하였다. 모든 실험은 대조군에 대한 세포 보호율을 mean±S.D.로 표시하였으며, 각각 3회 반복 실험치를 이용하여 계산하였다.

ROS (reactive oxygen species) 측정 - 세포내에서 활성 산소가 발생되면 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)가 esterase또는 산화적 가수분해에 DCFH로 탈아세틸화되고 비형광성인 DCFH는 활성 산소에 의해 산화되어 2',7'-dichloro-fluorescein (DCF)로 전환되고 이는 강한형광물질을 가진다. 이러한 원리를 이용하여 ROS생성정도를 측정하였다. 배양된 세포를 PBS로 세척한 후, 10 µM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, 35845)를 포함하는 Hank' balanced salt 용액에서 30분 동안 암실에서 반응시킨 후 세포의 형광광도 (excitation wave length: 490 nm; emission wave length: 525 nm)를 microplate reader (Spectramax Gemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 측정하였다.

Western Blot Analysis - HT22세포를 60 mm dish에 seeding 3×10⁵ cells/well이 되도록 배양한 후 시료를 농도별 시간별로 처리한 후 상등액을 제거하고 PBS로 세척하였다. RIPA buffer를 첨가하여 세포를 용해시키고 원심 분리하여 얻은 단백질은 Bradford assay로 정량하여 12% SDS-PAGE를 이용하여 전기 영동한 후 PVDF membrane에 옮긴 다음 5% skim milk로 30 분간 blocking한 후 1차 항체 (HO-1)를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응한 다음, 다시 2차 항체를 반응시키고, ECL 용액을 1:1로 잘 섞어서 membrane 위에 가하여 발광시키고 암실에서 X선 필름에 감광한 후 현상하였다. 같은 방법으로 actin antibody를 이용하여 actin을 측정하였다.

핵과 세포질 분획 - 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.

통계처리 - 본 실험의 통계처리는 GraphPad Prism, version 3.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)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.

결과 및 고찰

ROS (reactive oxygen species)는 반응성이 높아 세포 구성성분인 단백질, 지질, 당 DNA등을 비가역적, 비 선택적으로 공격하여 파괴하고, 이는 노화는 물론 암을 비롯하여 여러 가지 질병을 야기하며, ROS에 의한 뇌세포의 손상은 알츠하이머, 파킨슨증후군, 헌팅턴 증후군 같은 퇴행성 뇌질환의 주요 원인으로 알려져 있다.^{21,22)} 글루타민 분해물인 글루타메이트는 신경전달 물질로 알려져 있으며, 퇴행성 뇌질환을 일으키는 원인으로 보고 되고 있다. 본 연구에서는 글루타메이트로 산화적 손상을 유발한 생쥐해마 유래 HT22 세포주에서 희렴 70% 에탄올 추출물과 분획물의 항산화 효과와 뇌세포 효과와 기전을 연구 하였다. HT22세포를 배양한 후 5 mM의 글루타메이트를 12시간 처리하였을 때 아무

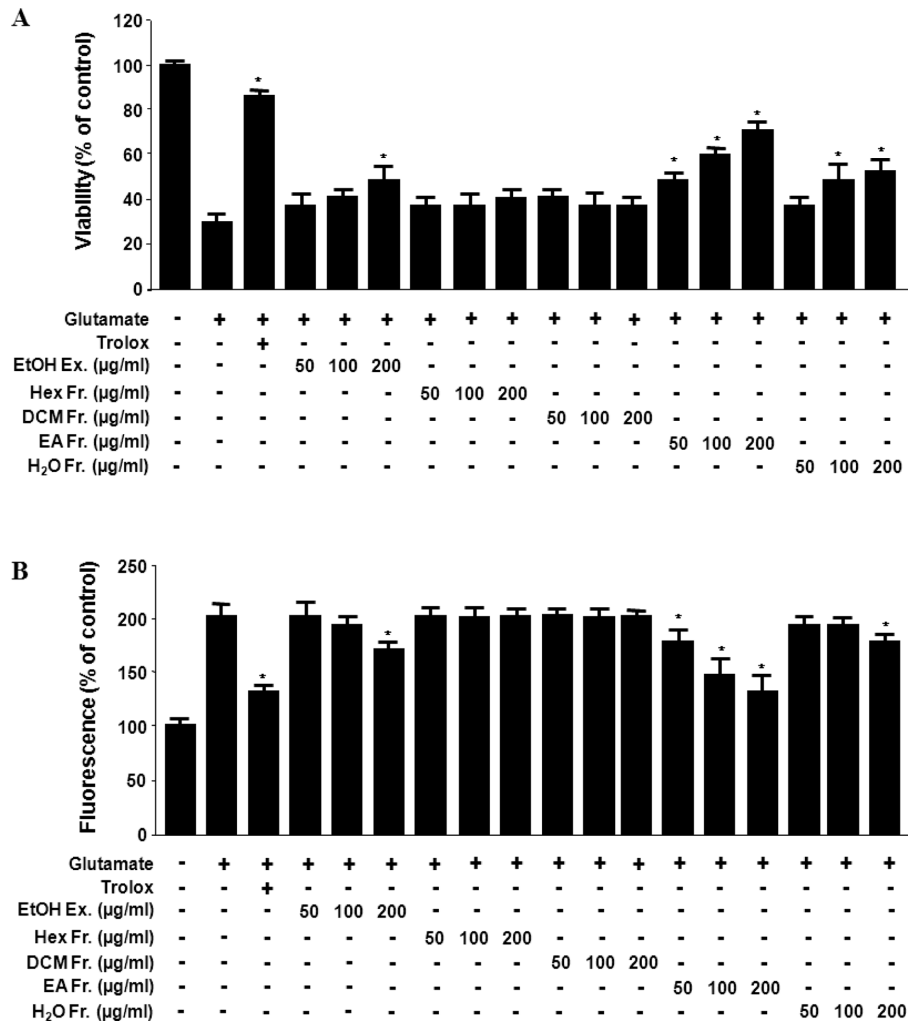


Fig. 1. Effects of Siegesbeckia Herba 70% ethanol extracts and its fractions on glutamate-induced oxidative neurotoxicity and inhibition of reactive oxygen species generation. (A) Cells were treated with samples and then incubated for 12 h with glutamate (5 mM). (B) Exposure of HT22 cells to 5 mM glutamate for 12 h increased reactive oxygen species production. Each bar represents the mean±S.D. of three independent experiments, * $p < 0.05$. Trolox (50 µM) was used as the positive control.

것도 처리하지 않은 군에 비해 세포 생존률이 $37.2 \pm 1.21\%$ 로 감소하는 세포 손상을 유도하였으며, 이에 희림 추출물과 분획물을 농도별로 처리한 결과, 그 중 희림 에탄올 추출 $200 \mu\text{g/ml}$ 에서 $45 \pm 3.21\%$ 로 세포 생존률이 조금 증가하였다. 그러나 희림 에틸아세테이트 분획물에서는 $50, 100, 200 \mu\text{g/ml}$ 에서 각각 $44 \pm 1.33\%, 61 \pm 2.3\%, 72 \pm 3.2\%$ 로 증가하는 세포 생존률을 보였다. 물 분획물에서는 $100, 200 \mu\text{g/ml}$ 에서 각각 $44 \pm 3.1\%, 50 \pm 1.1\%$ 로 조금 증가하는 세포 생존률을 보였다. 여러 다양한 분획 가운데 희림 ethyl acetate 분획물이 가장 우수한 보호활성을 나타내었다(Fig. 1A). ROS 소거 효과도 세포 보호 효과와 같이 에틸아세테이트 분획물 $50, 100, 200 \mu\text{g/ml}$ 에서 각각 $180 \pm 2.3\%, 152 \pm 1.23\%, 132 \pm 2.2\%$ 의 우수한 ROS 감소 효과를 나타내었으며, H_2O 분획에서는 $200 \mu\text{g/ml}$ 에서 $180 \pm 2.1\%$ 로 ROS 감소 효과를 나타내었다(Fig. 1B). 글루타메이트 유도 세포 손상에 대한 보호효과와 ROS소거 활성 정도는 잘 알려진 항산화 물질인 trolox $50 \mu\text{M}$ 과 비교하여 측정하였다. 또한 뇌세포의 보호 기전에 관여하는 중요한 단백질인 heme oxygenase (HO)-1의 발현 정도를 알아보기 위하여 HT22세포에 에틸아세테이트 분획과 물 분획물을 12 시간 처리한 결과, 희림 물 분획층에서는 HO-1발현이 나타나지 않았다(Fig 2A). 그러나, 에틸아세테이트 층에서는 HO-1발현은 처리 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 2B). HO-1 발현의 양성 대조군으로 HO-1 유도 약물로 알려진 cobalt protoporphyrin (CoPP) $20 \mu\text{M}$ 을 사용하였다. 또한, HO-1의 발현과 뇌 세포 보호 효과 및 ROS 생성 억제에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, HO-1 inhibitor로 알려진 Tin protoporphyrin (SnPP)를 처리하여 실험을 진행하였다. 실험 결과 Snpp를 전 처리 한 후

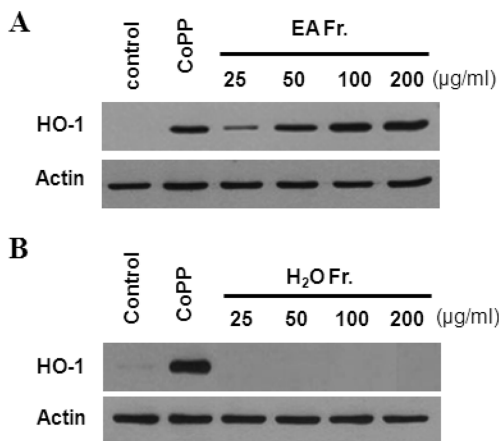


Fig. 2. Effects of Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction and H_2O fraction on HO-1 expression in HT22 cells. Cells were incubated for 12 h with ethyl acetate fraction (A) and H_2O fraction (B). Expression of HO-1 was determined by western blot analysis, and representative blots of three independent experiments are shown. CoPP ($20 \mu\text{M}$)

희림 에틸아세테이트를 처리 하였을 때 $100, 200 \text{ g/ml}$ 에서 각각 $65 \pm 1.2\%, 75 \pm 2.3\%$ 증가하던 세포 생존율이 $48 \pm 2.3\%, 53 \pm 1.2\%$ 으로 감소 하였으며(Fig. 3A), ROS생성억제능에서 희림 에틸아세테이트를 처리 하였을 때 $100, 200 \mu\text{g/ml}$ 에서 각각 $172 \pm 1.3\%, 161 \pm 3.3\%$ 감소하던 ROS 생성이, $100, 200 \mu\text{g/ml}$ 에서 $211 \pm 1.3\%, 203 \pm 1.2\%$ 으로 증가하였다(Fig 3B). 이로써 희림 에틸아세테이트에 의한 HO-1 단백질 발현 증가가 뇌 세포 보호효과 및 ROS생성 억제에 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

HO-1은 항산화시스템에 주요한 역할을 하고, HO-1발현에 관여하는 경로중 Nrf2의 핵 내로의 이동은 매우 중요한

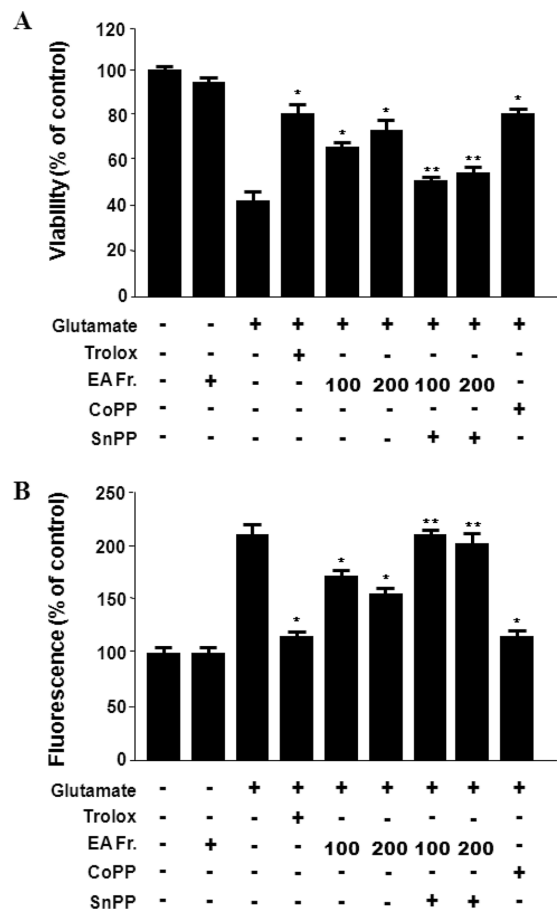


Fig. 3. Effects of Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction-induced HO-1 on glutamate induced oxidative neurotoxicity and reactive oxygen species generation. (A) Cells were treated with 100 and $200 \mu\text{g/ml}$ of Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction in the presence or absence of $50 \mu\text{M}$ SnPP, $20 \mu\text{M}$ CoPP and then exposed to glutamate (5 mM) for 12 h. (B) Exposure of HT22 cells to 5 mM glutamate for 12 h increased reactive oxygen species production. Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction induced HO-1 effectively inhibited reactive oxygen species production. Each bar represents the mean \pm S.D. of three independent experiments, $*p < 0.05$ vs. control. $**p < 0.05$ vs. group treated with *S. glabrescens* ethyl acetate fraction.

인자로 알려져 있다. Nrf2는 전사인자로 알려져 있으며 단백질 유전자에 존재하는 ARE에 결합하여 HO-1과 같은 항산화 단백질 발현을 촉진시켜 외부 침입이나 산화적 스트레스 방어기전의 주요한 역할을 담당하고 있다.^{23,24)} 앞에서 확인한 HO-1발현을 증가 시킨 희렴 에틸아세테이트 분획물의 Nrf2 핵 내 이동에 미치는 영향을 확인하기 위해, 희렴 에틸아세테이트 분획물을 시간별로 처리하고 Nrf2 핵 내 전사 정도를 확인해 본 결과, 0.5, 1, 1.5 시간이 증가함에 따라 세포질의 Nrf2가 감소하였으며, 대조적으로 핵 내의 전사정도가 증가하였다(Fig. 4). Mitogen activated protein kinase (MAPK) 경로 역시 HO-1의 발현에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²⁵⁻²⁸⁾ MAPKs는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK) 의 세 가지 계열의 family로 세포 외부의 자극을 전달하여 세포내 반응을 일으키는데 역할을 한다. 이에 따라 희렴 에틸아세테이트 분획물의 HO-1발현에 MAPK가 미치는 영향을 알아보기 위해 200 µg/ml의 희렴 에틸아세테이트 분획물을 처리 하였을 때, 시간이 지남에 따라 ERK와 p38 인산화에는 영향을 주지 못하였으나(Fig. 5A와 5C), JNK 인산화는 증가 시켰다(Fig. 5B). 이러한 결과를 바탕으로 희렴 ethyl acetate 분획물의 HO-1발현이 JNK 인산화를 통하여 나타나는지 살펴 보기 위하여, ERK, p38, JNK 각각의 억제제를 전 처리한 후 희렴 에틸아세테이트 분획물을 처리하여 HO-1발현과 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, ERK의 억제제인 PD98059와 p38의 억제제인 SB203580를 전 처리했을 시에는 HO-1의 발현과 세포보호 효과에 큰 영향을 미치지 못했지만, JNK의 억제제인 SP600125 처리했을 시에는 증가하던 HO-1의 발현이 줄어들고, 세포 보호

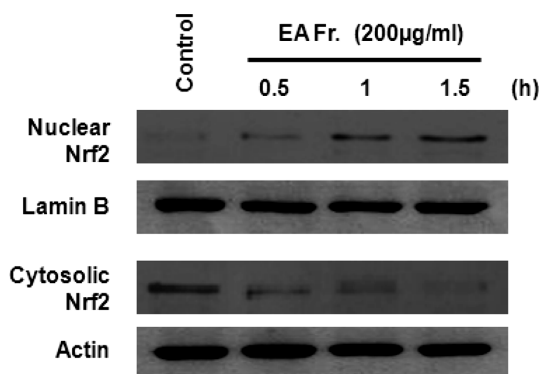


Fig. 4. Effects of Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction on Nrf-2 nuclear translocation in HT22 cells. Cells were treated with 200 µg/ml of Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction for 0.5, 1, and 1.5 h. The nuclei were fractionated from the cytosol using PER-Mammalian Protein Extraction buffer as described in materials and methods. Nrf-2 protein was detected by western blot analysis, and representative blots of three independent experiments are shown.

효과 역시 희렴 에틸아세테이트를 처리 하였을 때 $82 \pm 1.1\%$ 으로 증가하던 세포 생존율이 $57 \pm 2.1\%$ 으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 6). 이러한 결과를 통해 희렴 에틸아세테이트 분획물의 HO-1 발현은 MAPK기전 중 JNK 인산화를 통해 나타나며, 이를 통해 세포보호 효과 효과가 나타남을 확인할 수 있었다.

따라서, 본 연구에서 희렴 추출물의 에틸아세테이트 분획물은 생쥐유래 해마 세포HT22에서 글루타메이트로 유발한 세포독성에 강한 보호 효과를 나타내었으며, MAPKs중 JNK pathway 인산화와 Nrf2 핵내로 전사를 통하여 항산화 및 HO-1 단백질 발현을 증가시키며, HO-1 단백질 발현은 글루타메이트에 의한 산화적 스트레스로부터 보호활성을 나타내는데 중요한 역할을 함을 확인 하였다. 추후 연구를 통하여 희렴 에틸아세테이트분획물의 추가적인 뇌세포 보호 기전 연구와 활성 물질 분리에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

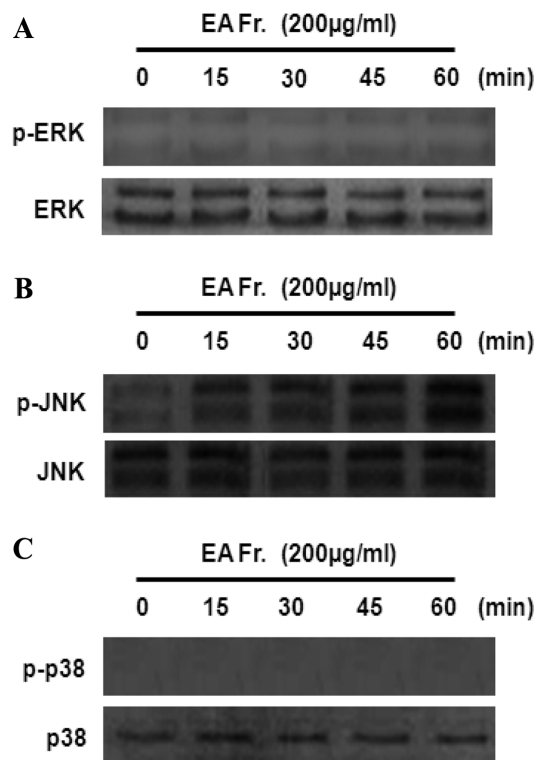


Fig. 5. Effects of Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction-induced MAPK activation in HT22 cells. (A) Cells were treated with 200 µg/ml of Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction for the indicated times. Cell extracts were analyzed by western blot with antibodies specific for phosphorylated ERK1/2 (p-ERK)(A), phosphorylated JNK (p-JNK)(B), or phosphorylated p38 (p-p38)(C). Membranes were stripped and re-probed for total form of each MAPK antibody as a control, and the representative blots of three independent experiments are shown.

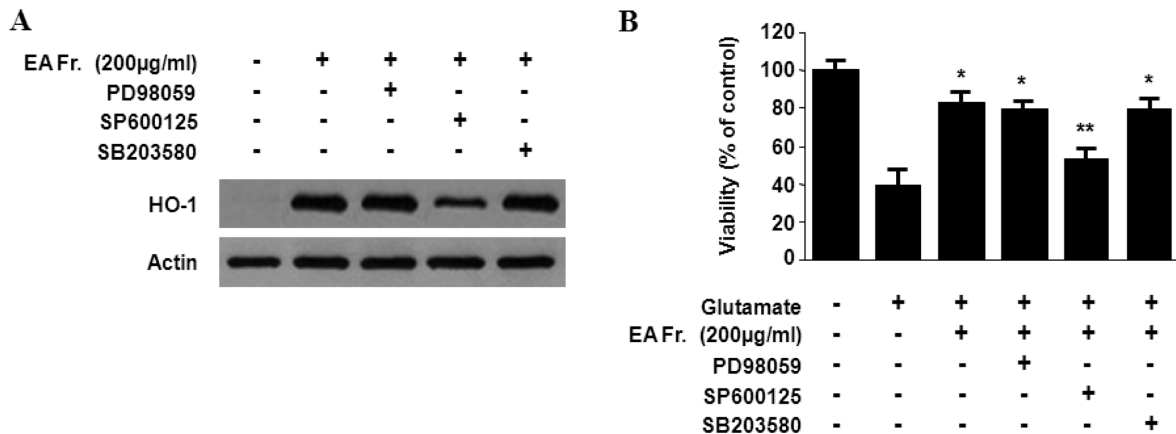


Fig. 6. Effects of Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction-induced JNK pathway activation on HO-1 expression and glutamate-induced neurotoxicity. (A) Cells were incubated with 200 µg/ml of Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction for 12 h in the presence or absence of PD98059 (40 µM), SB203580 (20 µM) and SP600125 (25 µM). Western blotting was then performed with HO-1 antibody. (B) Cells untreated or treated with Siegesbeckia Herba ethyl acetate fraction (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.

결론

본 연구는 희림 70% 에탄올 추출물과 각각의 분획물의 뇌세포 보호 효과와 그 메커니즘에 관하여 연구하였으며, 그 결과 희림 에틸아세테이트 분획층에서 글루타메이트로 유도한 HT22세포의 독성에 대하여 우수한 보호 효과를 나타내었다. 이는 JNK인산화와 Nrf2의 핵 내 전사 유도를 통하여 HO-1 단백질 발현이 주요하게 작용하는 것으로 생각된다.

사사

이 연구는 계명대학교 신약개발연구소 약학대학 특성화 연구기금으로 이루어졌음.

인용문헌

1. 생약학교재편찬위원회 (2007) 생약학, 218-220. 동명사, 서울.
2. 한국 약용식물학 연구회 (2001) 종합약용식물학, 219. 학창사, 서울.
3. Baruan, R. N., Sharma, R. P., Madhusudanan, K. P., Thyagarajan, G., Herz, W. and Govindan, S. V. (1980) New melampolides and darutigenol from *Siegesbeckia orientalis*. *Phytochemistry* **19**: 323-325.
4. Zdero, C., Bohlmann, F., King, R. M. and Robinson, H. (1991) Sesquiterpene lactones and other constituents from *Siegesbeckia orientalis* and *Guizotia scabra*. *Phytochemistry* **30**: 1579-1584.

5. Han, K. D., Kim, J. H. and Oh, S. J. (1975) Chemistry and pharmacology of diterpenoids of *Siegesbeckia pubescens*. *Yakhak Hoeji* **19**: 129-165.
6. Kim, J. Y., Lim, H. J. and Ryu, J. H. (2008) In vitro anti-inflammatory activity of 3-O-methyl-flavones isolated from *Siegesbeckia glabrescens*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**: 1511-1514.
7. Sun, H. X. and Wang, H. (2006) Immunosuppressive Activity of the Ethanol Extract of *Siegesbeckia orientalis* on the Immune Responses to Ovalbumin in Mice. *Chemi. Biodivers.* **3**: 754-761.
8. Huh, J. E., Baek, Y. H., Lee, J. D., Choi, D. Y. and Park, D. S. (2008) Therapeutic effect of *Siegesbeckia pubescens* on cartilage protection in a rabbit collagenase-induced model of osteoarthritis *Yakhak Hoeji* **107**: 317-328.
9. Packer, L. (1994) In methods in enzymology: Oxygen radicals in biological systems. Part C, Academic press, San Diego. **233**: 15-35.
10. Kandaswami, C. and Middleton, E. (1994) Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. In free radicals in diagnostic medicine. Armstrong D, de. 351-376. Plenum press, New York and London.
11. 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.
12. 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.
13. Satoh, T. and Lipton, S. A. (2007) Redox regulation of neuronal survival mediated by electrophilic compounds. *Trends*

- Neurosci.* **30**: 37-45.
14. 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.
 15. Siesjo, B. K. (1981) Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1**: 155-185.
 16. 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.
 17. Rossler, 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.
 18. Jeong, G. S., Li, B., Lee, D. S., Choi, H. G. and Kim, Y. C. (2010) Neuroprotective effects of the extract of *Zingiberis Rhizoma*. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 190-195.
 19. Choi, H. G., Lee, D. S., Li, B., Jun, K. Y., Jeong, G. S. and Kim, Y. C. (2011) Neuroprotective effect of the water-insoluble fraction of root barks of *Dictamnus dasycarpus* 70% ethanol extract on glutamate-induced oxidative damage in mouse hippocampal HT22 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**: 175-181.
 20. 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.
 21. Tan, S., Schubert, D. and Maher, P. (2001) Oxytosis: a novel form of programmed cell death. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**: 497-506.
 22. Rossler, 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
- (2012. 12. 10 접수; 2012. 12. 14 심사; 2012. 12. 20 게재확정)