

SK-N-SH 신경세포내 항산화 효과와 p38 인산화 억제에 의한 곤드레, 누룩치 그리고 산마늘의 신경 보호 효과

정미자¹ · 박용일² · 권기한¹

¹광주대학교 식품영양학과

²가톨릭대학교 생명공학과

Neuroprotective Effects of *Cirsium setidens*, *Pleurospermum kamtschaticum*, and *Allium victorials* Based on Antioxidant and p38 Phosphorylation Inhibitory Activities in SK-N-SH Neuronal Cells

Mi Ja Chung¹, Yong Il Park², and Ki Han Kwon¹

¹Department of Food Science and Nutrition, Gwangju University

²Department of Biotechnology, The Catholic University of Korea

ABSTRACT Oxidative stress is one of the key mechanisms involved in neuronal damage. Neuroprotective effects and underlying mechanisms of action of several wild vegetables, *Cirsium setidens* (CS), *Pleurospermum kamtschaticum* (PK), and *Allium victorials* (AV), against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in SK-N-SH cells were investigated. CS and AV up to 400 µg/mL showed no detectable effects on cell viability of human SK-N-SH neuroblastoma cells compared with control. Incubation of SK-N-SH cells with hydrogen peroxide resulted in significant induction of cell death and reaction oxygen species (ROS) production, whereas treatment of cells with CS and AV significantly reduced cell death and ROS production, respectively. Among the wild vegetables tested, CS and PK showed more effective DPPH radical scavenging activity than AV, whereas PK showed strong cytotoxicity in SK-N-SH cells compared with the control. CS showed much higher inhibitory effects on cell death and ROS generation against oxidative stress than AV. Thus, CS was selected for subsequent experiments. Ethyl acetate (EA), hexane, butanol, aqueous, and chloroform extracts from CS significantly inhibited cell death and ROS generation in SK-N-SH cells induced by oxidative stress. EA extract from CS (CS-EA) showed the highest DPPH radical-scavenging activity, intracellular ROS-scavenging activity, and neuroprotective effects. CS-EA attenuated apoptosis signal-regulating p38 activation by inhibiting phosphorylation. The findings suggest that CS-EA protects neuronal cells through antioxidant activity and inhibition of phosphorylation of p38 in brain neural cells.

Key words: antioxidant actions, brain, neuroprotective effects, oxidative stress, wild vegetables

서 론

현대인의 평균수명이 길어지면서 노화에 의해 증가되는 퇴행성 신경질환인 알츠하이머형 치매(Alzheimer's disease)가 심각한 사회적인 문제가 되고 있다. 뇌는 세포막에 불포화 지방산과 반응성 산소 유리기 반응의 촉매인 금속(철분, 구리, 아연, 알루미늄)이 풍부하고 순환하는 산소가 집중되어 있기 때문에 산화되기 쉬우므로 퇴행성 신경질환과 관련이 크다. 신경계 질환은 산화적 스트레스에 의한 신경세포 손상에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다. 따라서 뇌조직은 일단 손상이 되면 기능회복이 어렵기 때문에 퇴행성 신경질

환에 있어서 산화적 스트레스를 유발하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 신경세포 손상으로 부터 신경세포를 보호할 수 있는 물질인 항산화제 개발 연구 뿐만 아니라 섭취 시 안전하고 합성 약물이 갖는 부작용을 감소시키는 기능을 가지고 있는 천연 항산화제에 대해 관심이 집중되고 있다(1-3).

곤드레(*Cirsium setidens*)는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 전국 각지에 분포하는 우리나라 특산식물이며, 우리나라에서는 고려영경귀로 더 많이 불린다(3). 곤드레는 강원도 지역 특산물로서 매년 5월에 채취하여 맛이 담백하고 부드러운 향이 독특하여 식용으로 사용되고 있다. 곤드레 어린 순은 다양한 요리에 이용되고 있고, 한방에서는 지혈, 소염, 이뇨작용, 해열, 고혈압 등의 치료에 이용되어 왔으며(4), 영양학적으로 우수한 식품이고(5) 유전독성 억제 효과(6), 지방대사 개선 및 항산화 효과(7), 고지혈증 개선 효과

Received 25 November 2014; Accepted 19 January 2015

Corresponding author: Ki Han Kwon, Department of Food Science and Nutrition, College of Health, Welfare and Education, Gwangju University, Gwangju 503-703, Korea
E-mail: khkwon@gwangju.ac.kr, Phone: +82-62-670-2708

(8) 등 인체에 유익한 약리 효능을 지니고 있고, 곤드레 주정 추출물을 함유한 모닝빵은 뇌신경 질환 예방 및 개선 효과가 있는 것으로 알려져 있으나(3) 곤드레 에탄올 추출물로부터 다양한 분획물의 뇌질환 개선 효과 및 그 기전에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다.

누룩치(*Pleurospermum kamtschaticum*)는 봄에 연한 잎줄기를 채취하여 날것으로 양념장에 찍어 먹거나 데쳐서 무침으로 먹기도 하고, 비타민 A, 회분, 인 등이 많은 것으로 알려져 있다(9). 누룩치는 소화촉진 효과, 항암 및 항당뇨(10) 효과가 보고된 바 있다.

산마늘(*Allium victorialis* Linne)은 백합과의 다년생 초본식물로서 식물 전체에서 강한 마늘냄새가 나며 맛은 맵고 성질은 약간 따뜻하며 독이 없다. 산마늘은 지질강하, 항비만, 항산화, 항당뇨, 간보호, 항암, 지질개선 등 다양한 생리활성 효과가 알려져 있다(11-17).

여러 연구 결과들은 곤드레, 누룩치 및 산마늘이 다양한 생체기능에 영향을 줄 가능성을 시사하고 있으나 뇌질환 개선 관련 연구들에 대한 보고는 전무하여 본 연구에서는 곤드레, 누룩치 그리고 산마늘의 뇌질환 개선을 위한 기능성 식·의약 소재로 개발 가능함에 대한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

추출물 및 분획물의 제조

강원도 양양에서 재배된 곤드레, 누룩치 그리고 산마늘을 구입하여 건조 후 분쇄하였다. 분말 시료 중량의 10배인 70% 에탄올을 첨가하여 실온에서 8시간 동안 3회 추출하였다. 여과하여 얻은 액상은 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 후 진공 동결건조기를 이용하여 동결 건조하였다. 동결 건조된 분말 형태의 곤드레 추출물(CS), 누룩치 추출물(PK) 그리고 산마늘 추출물(AV)은 -20°C 의 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다. 상기와 동일하게 곤드레 분말 시료 중량의 10배인 70% 에탄올을 첨가하여 실온에서 8시간 동안 3회 추출한 후 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 다음 얻은 70% 에탄올 농축물을 용매의 극성 차이에 따라 분리를 행하여 헥산(hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol) 및 물(aqueous) 분획물 순서로 다섯 가지 분획물(CS-HE, CS-CH, CS-EA, CS-BU, CS-AQ)을 제조하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH 라디칼 소거능은 일정 농도의 시료(1.8 mL)와 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)(1.5×10^{-4} M, 1.2 mL) 용액을 잘 혼합한 다음 37°C 에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 대조구에 대한 시료 첨가구의 흡광도를 비교하여 $[1 - (\text{시료의 흡광도}/\text{대조구의 흡광도})] \times 100$ 에 의하여 %로 나

타내었다.

세포 배양 및 처리

사람의 신경모세포종 SK-N-SH를 10% 비활성화 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)과 1% 페니실린-스트렙토마이신 용액(penicillin/streptomycin)을 넣은 Eagle's Minimum Essential Medium(EMEM; ATCC, Manassas, VA, USA) 배양액으로 5% CO_2 가 공급되는 배양기에서 37°C 조건으로 배양하였다.

충분한 세포를 얻기 위해 배양용 플라스크($T75 \text{ cm}^2$)에서 세포를 배양하고, 2~3일에 한 번씩 배지를 80% 교체하여 충분히 자랐을 때 trypsin-EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid) 용액(1×)을 사용하여 부착된 세포를 떼어 낸 후 성장배지에 세포수를 1×10^4 cells/well과 2×10^4 cells/well로 조정하여 96-well plates에 세포를 깔아주고 24시간 동안 배양하여 MTT assay와 세포 내 ROS를 검출하기 위하여 사용하였다. 12시간 기아상태를 유지시킨 후 시료인 CS, PK, AV, CS-HE, CS-CH, CS-EA, CS-BU 또는 CS-AQ를 우태아 혈청을 첨가하지 않은 성장배지로 희석한 후 24시간 단독 처리하여 시료의 세포독성을 알아보았다. 산화적 스트레스에 대항하는 시료의 뇌신경세포 보호 효과를 알아보기 위해 시료를 $500 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 와 30분 또는 1시간 SK-N-SH 세포에 동시에 처리하거나 시료를 $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 와 24시간 처리하였다. ROS 생성 억제능을 알아보기 위해서는 시료와 $500 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 를 동시에 30분간 SK-N-SH 세포에 처리하였다. 무처리군과 H_2O_2 처리군은 대조군 및 양성 대조군으로 사용하였다. 그리고 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 분석을 위해서는 세포수를 1×10^6 cells/well로 하여 6-well plates에 배양하고 시료와 $500 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 를 동시에 30분간 SK-N-SH 세포에 처리하였다.

세포내 활성산소종(ROS) 측정

SK-N-SH 세포내에서 산화적 스트레스(oxidative stress)의 유무 및 시료가 뇌신경세포내 ROS를 소거할 수 있는지를 확인하기 위해서 2,7-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)를 probe로 이용한 SK-N-SH 세포내 생성된 ROS 양을 측정하였다. 10 mM DCF-DA를 만들어 $10 \mu\text{M}$ 농도가 되도록 PBS로 희석시켰다. 세포에 배지를 제거한 후 $10 \mu\text{M}$ DCF-DA 용액을 세포에 더한 후 37°C 에서 45분간 배양하였다. DCF-DA 용액을 제거한 후 PBS로 남아 있는 DCF-DA를 완전히 제거한 후 PBS를 더하여 5분간 배양시켰다. 세포내 형광 광도의 변화를 형광광도계(Bio Tek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 488 nm(excitation)와 525 nm(emission)에서 측정하였다(3).

세포독성 평가

배양이 끝난 SK-N-SH 세포의 생존율은 Kwon 등(3)이 사용한 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphe-

nylterazolium bromide] 환원 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 각 well MTT 용액(5 mg/mL)을 성장배지의 10분의 1을 가해 주고 다시 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazon이 배지에 따라 나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. 남아 있는 배지를 완전히 제거하기 위해 실온에서 30분간 방치한 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 이용하여 용해시킨 시료를 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정 시 공시료는 DMSO로 하였고, 세포의 생존율은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료 처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

세포내 p38 MAPK 인산화 측정

SK-N-SH 세포내 phospho-p38(p-p38) MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 활성화를 알아보기 위해 시료를 처리한 세포에서 단백질을 분리하여 p38 MAPK의 인산화 정도를 MAPK(Thr180/Tyr182) Sandwich ELISA Kit(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)을 사용하여 ELISA를 제조사의 방법에 따라 수행하였다.

통계처리

본 실험 결과들은 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였고 실험군 간 평균의 차이는 one-way ANOVA로 유의성을 확인한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후 검정하였으며 P<0.05 수준에서 유의성의 여부를 검증하였다. 모든 통계 분석은 SPSS(statistical package for the social science) version 12.0 프로그램(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

곤드레, 누룩치 및 산마늘 추출물들의 DPPH 라디칼 소거 활성

DPPH는 비교적 안전한 free radical로 실제 항산화 활성도와 연관성이 높고 식물 추출물의 항산화 활성을 간단하게

측정할 수 있어 보편적으로 이용되는 항산화 측정 방법이다 (18). 곤드레 추출물(CS), 누룩치 추출물(PK) 그리고 산마늘 추출물(AV) 처리에 의한 라디칼 소거 활성 측정 결과는 Fig. 1에 나타내었다. CS, PK 그리고 AV를 각각 0, 8, 15, 30, 60, 125, 250, 500, 1,000 및 3,000 µg/mL의 농도로 처리한 DPPH 라디칼 소거 활성은 모두 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었고, CS는 125 µg/mL 농도부터, PK는 60 µg/mL 농도부터 그리고 AV는 500 µg/mL 농도부터 90% 이상의 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 보여 주었고 DPPH 라디칼 소거 활성이 높은 순서는 PK>CS>AV였다.

Doh 등(19)은 산마늘이 오가피, 산수유 및 더덕보다 더 강한 DPPH radical 소거 작용을 나타내었고 이는 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid보다 약간 낮았다고 보고하였으며, Kim 등(20)은 누룩치 80% 에탄올 추출물이 DPPH 라디칼 소거 작용을 가지고 있지만 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid보다는 현저하게 낮은 활성이라 보고하여 본 연구 결과와 다른 경향을 보고하였으나, 양성 대조군인 ascorbic acid의 결과를 비교 분석하는 것보다 산마늘과 누룩치의 항산화력은 같은 조건에서 동시에 비교 평가하는 것이 더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것이라 판단된다. Kwon 등(3)의 보고에서는 곤드레 70% 주정 추출물을 함유한 모닝빵이 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거 작용을 나타내었다. 따라서 곤드레, 누룩치 및 산마늘 70% 에탄올 추출물은 DPPH 라디칼 소거 작용에 대한 일부 보고가 있으나 이들 세 추출물의 항산화력을 비교한 연구는 전무하다. 따라서 본 연구에서는 이들 세 추출물의 항산화력을 비교함으로써 다양한 종류의 산채 증식·의약 소재로 선택을 할 때 도움을 줄 수 있는 기초자료를 제공하고 있다.

곤드레, 누룩치 및 산마늘 추출물들의 세포독성능 평가

CS, PK 그리고 AV의 농도별(0, 50, 100, 200, 400 µg/mL) 세포독성을 알아본 결과는 Fig. 2와 같다. CS 또는 AV를 SK-N-SH 세포에 처리하였을 때 400 µg/mL까지 세포독성을 나타내지 않았으나 PK는 농도 의존적으로 세포독성이 나타났으며, 50 µg/mL에서는 70.2% 세포생존율을 나타

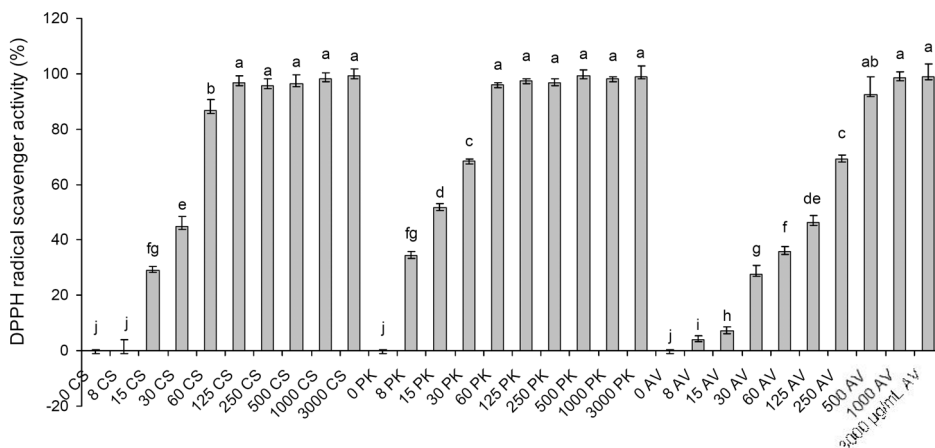


Fig. 1. DPPH radical scavenger activity of extracts from *Cirsium setidens* (CS), *Pleurospermum kamtschaticum* (PK), and *Allium victorialis* (AV). Values are mean±standard deviation (n=6). Means with different letters (a-j) above the bars are significantly different (P<0.05) according to Duncan's multiple range test.

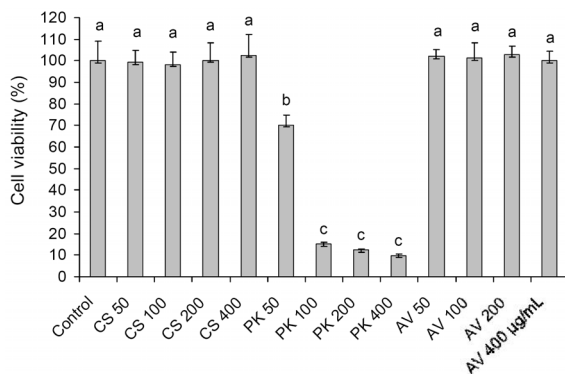


Fig. 2. Effect of cell viability of extracts from *Cirsium setidens* (CS), *Pleurospermum kamschaticum* (PK), and *Allium victorials* (AV). Values are mean±standard deviation (n=8). Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test.

내었고 100 µg/mL에서는 대부분의 세포가 사멸하였다. 따라서 CS와 AV는 400 µg/mL까지 세포독성 없는 안전한 농도라는 것을 확인하였고 PK는 세 가지 산채 추출물들 중 가장 강한 항산화 효과를 나타내었으나 저농도에서 강한 세포 독성을 나타내어 계속되는 실험에서는 PK를 제외하였고, CS와 AV는 세포독성을 나타내지 않는 농도인 50, 100 그리고 200 µg/mL를 세포 처리 농도로 선택하였다.

Kim 등(20)은 누룩치의 추출물 및 분획물이 강한 항산화 효과 및 tyrosinase 저해 활성에 의한 미백 효과를 가지고 있어 식품 첨가물 및 화장품 원료 등 기능성 소재로 사용할 수 있을 것이라 하였는데, 본 연구 결과 누룩치 70% 에탄올 추출물은 저농도에서도 뇌신경세포를 사멸시키는 강한 세포독성을 가지고 있었으므로 기능성 소재로 활용하기 위해서는 안전성에 대한 과학적 근거를 반드시 확보하여야 할 것이다.

곤드레 및 산마늘 추출물들의 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호 효과

인간의 신경세포주인 SK-N-SH 세포에 대표적인 활성 산소종인 H_2O_2 를 처리하여 유발시킨 산화적 스트레스에 대한 CS와 AV 처리에 의한 신경세포 보호 효과를 측정된 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 세포생존율은 200 µM H_2O_2 를 24 시간 동안 처리하였을 때 무처리구인 대조구와 비교하여 71.4%의 세포생존율을 나타내었으며, 50, 100 그리고 200 µg/mL CS 또는 AV를 200 µM H_2O_2 와 동시에 처리하였을 경우 CS와 AV 모두 농도 의존적으로 세포생존율을 증가시켰다. H_2O_2 와 함께 CS를 100과 200 µg/mL 처리하였을 때 103.2%와 106.0%의 생존율을 나타내었고, AV를 100과 200 µg/mL 처리하였을 때 100.7%와 103.4%의 세포생존율을 보여 주었다(Fig. 3). 200 µM H_2O_2 와 동시에 200 µg/mL CS 처리한 결과 H_2O_2 만 처리했을 때와 비교하여 신경세포가 34.6% 더 살아 있었다($P<0.05$).

CS는 고농도에서도 세포 독성을 나타내지 않았고 강한

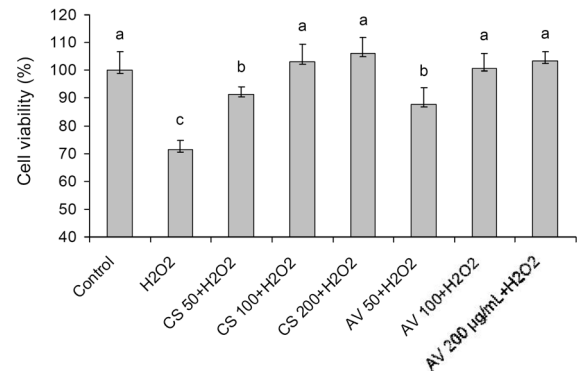


Fig. 3. The protective effect on cell viability of extracts from *Cirsium setidens* (CS) and *Allium victorials* (AV). Values are mean±standard deviation (n=8). Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test. Cells were exposed to extract (0, 50, 100, and 200 µg/mL) and 200 µM H_2O_2 simultaneously for 24 h.

항산화 효과 및 약한 산화적 스트레스에 대항하여 신경세포 보호 효과가 뛰어났으므로 강한 산화적 스트레스 조건 하에서도 CS가 신경세포 보호 효과가 있는지 알아본 결과는 Fig. 4와 같다. Fig. 4A는 농도별 CS(0, 50, 100 그리고 200 µg/mL)와 500 µM H_2O_2 를 30분간 SK-N-SH 세포에 동시에 처리한 후 CS의 신경세포 보호 효과를 나타낸 것이고, Fig. 4B는 CS와 500 µM H_2O_2 를 1시간 동안 SK-N-SH 세포에 동시에 처리한 후 CS의 신경세포 보호 효과를 나타낸 것이다.

SK-N-SH 세포에 500 µM H_2O_2 를 30분간 또는 1시간 처리했을 때 무처리구인 대조구에 비해 55.1%와 19.9% 생존율을 나타내었으며, 200 µg/mL CS와 500 µM H_2O_2 를 동시에 30분 처리했을 때 75.4%와 1시간 처리했을 때는 39.2% 세포생존율을 나타내어 H_2O_2 만 처리한 군과 비교하면 20.3%와 17.3%의 신경세포 보호 효과를 나타내었다. 따라서 CS는 산화적 스트레스에 의해 뇌신경세포가 많이 사멸했을 경우보다 뇌신경세포가 적게 사멸했을 때 더 효과적이라는 것을 알 수 있었고, 이는 CS가 초기 퇴행성 신경질환인 알츠하이머형 치매 등과 같은 뇌질환 환자들을 위해 식·의약 소재로 활용되어 다양한 제품 개발이 가능할 수 있다는 기초 자료를 제시하고 있다.

본 연구 결과 곤드레 추출물은 산마늘 추출물보다 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 가지고 있었고(Fig. 1), H_2O_2 와 두 추출물들을 각각 처리했을 때 유사한 세포 사멸 억제 효과가 있었으므로(Fig. 3) 계속되는 실험에는 곤드레 추출물만 사용하였다.

곤드레 추출물들의 산화적 스트레스에 의한 ROS 생성 억제 효과

신경세포 사멸의 원인이 될 수 있는 산화적 유도자들 중에서도 특히 ROS의 주성분인 H_2O_2 는 뇌신경세포 모델에서 산화적 스트레스 유도자로 널리 사용되고 있다(3). 신경퇴행

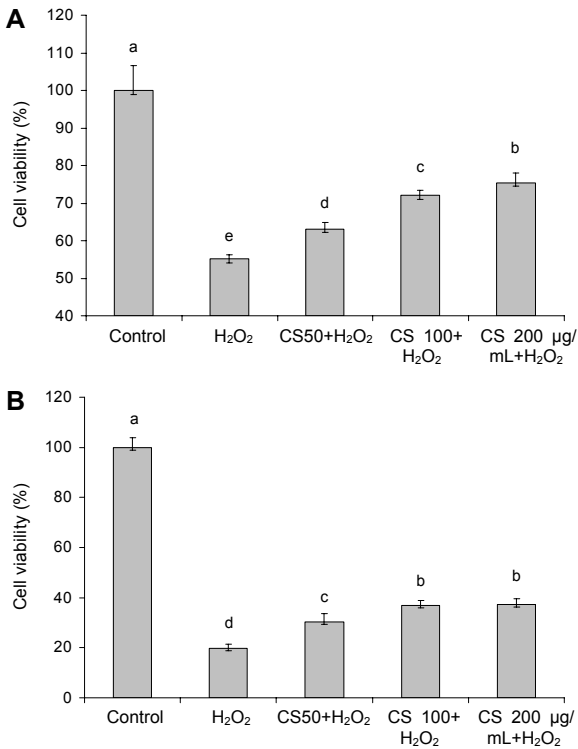


Fig. 4. The protective effect on cell viability of extract from *Cirsium setidens* (CS). Values are mean±standard deviation (n=8). Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test. (A) Cells were exposed to CS (0, 50, 100, and 200 μg/mL) and 500 μM H₂O₂ simultaneously for 30 min. (B) Cells were exposed to CS and 500 μM H₂O₂ simultaneously for 1 h.

성 장애와 같은 질환의 원인이 활성산소에 기인된 것으로 보고됨에 따라 신경세포 내 생성되는 ROS를 소거할 수 있는 항산화 물질은 뇌신경세포 보호에 중요한 역할을 할 것으로 생각되어 CS의 ROS 생성 억제 효과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5는 다양한 농도의 CS(0, 50, 100 그리고 200 μg/mL)와 500 μM H₂O₂를 동시에 30분간 SK-N-SH 세포에 처리한 후 CS의 세포내 ROS 생성 억제 효과를 나타낸 것이다. 500 μM H₂O₂ 처리 30분 후 세포내 ROS는 무처리구인 대조군과 비교하여 2.8배 증가하였으나 CS 처리에 의해 농도 의존적으로 세포내 ROS 생성량이 감소하였고, CS 100 μg/mL 처리에 의해 무처리구인 대조군 수준으로 ROS 생성량이 감소하였다(Fig. 5).

Kim 등(21)은 검정콩 껍질에서 분리된 안토시아닌이 SK-N-SH 세포에 H₂O₂를 처리하여 생성된 ROS를 소거함으로써 산화적 스트레스에 의한 뇌신경 세포 SK-N-SH 사멸을 억제한다고 보고하였고, Kwon 등(3)은 곤드레 주정 추출물이 함유된 모닝빵 섭취가 뇌질환 개선 효과가 있을 것이라 추정하였는데, 이는 곤드레 빵 추출물이 세포내 생성되는 ROS를 소거함으로써 산화적 스트레스로부터 뇌신경 세포 사멸을 억제하여 주기 때문이라 하였다. 따라서 ROS 생성 억제 효과를 가진 곤드레 추출물은 산화적 스트레스에

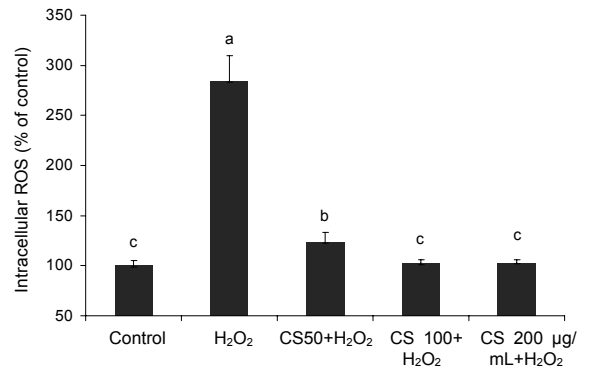


Fig. 5. The protective effect of extract from *Cirsium setidens* (CS) on H₂O₂-induced intracellular ROS formation. Values are mean±standard deviation (n=8). Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test. Cells were exposed to CS (0, 50, 100, and 200 μg/mL) and 500 μM H₂O₂ simultaneously for 30 min.

대항하여 뇌신경세포 사멸을 억제함으로써 뇌질환 개선 효과가 있을 것이라 생각된다.

곤드레 분획물들의 DPPH 라디칼 소거 활성

곤드레 70% 에탄올 추출물의 순차적 용매 분획물들에 대한 DPPH 소거 활성을 측정한 결과 Fig. 6과 같다. 다양한 농도(0, 4, 8, 15, 30, 60, 125, 250 그리고 500 μg/mL)의 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물(CS-HE, CS-HE, CS-CH, CS-EA, CS-BU, CS-AQ)은 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었으며, CS-EA는 60 μg/mL부터, CS-HE와 CS-CH는 125 μg/mL부터 그리고 CS-BU는 250 μg/mL부터 95% 이상의 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었고 5개의 분획물들 중에 에틸아세테이트 분획물(CS-EA)이 가장 높은 활성을 나타내었다. 물 분획물은 500 μg/mL 처리군에서도 DPPH 라디칼 소거 작용이 67.3%로 5개의 분획물들 중 가장 낮은 DPPH 라디칼 소거 작용을 나타내었다.

본 연구에서 곤드레의 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타낸 것은 누룩치 추출물, 산초 및 씬바귀의 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 보였다는 연구 결과와 일치하였다(20,22,23). DPPH 라디칼 소거 활성은 시료 농도에 따른 항산화 활성 변화 곡선으로부터 산화를 50% 억제시키는 농도인 IC₅₀으로 나타내었을 때 곤드레 에틸아세테이트 분획물에서 IC₅₀ 값은 15 μg/mL였고, 이는 누룩치의 에틸아세테이트 분획물의 IC₅₀ 값 40 μg/mL(20)와 제주도 자생 노루참 나물 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 IC₅₀ 값 97 μg/mL(24)와 비교하여 높은 활성을 나타내었다.

곤드레 분획물들의 세포독성 평가 및 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호 효과

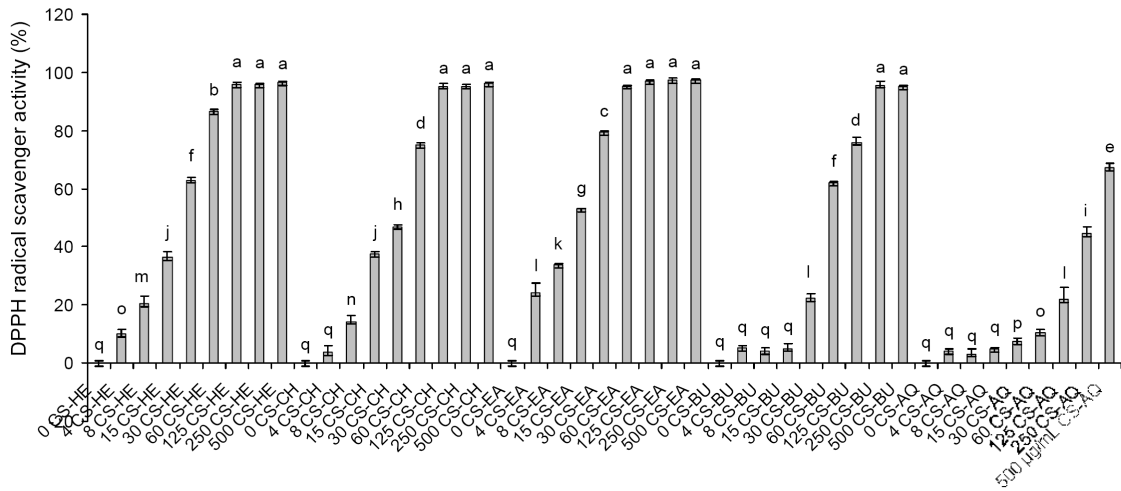


Fig. 6. DPPH radical scavenger activity of hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, and aqueous fractions (CS-HE, CS-CH, CS-EA, CS-BU, and CS-AQ) from *Cirsium setidens* extract. Values are mean±standard deviation (n=6). Means with different letters (a-q) above the bars are significantly different (P<0.05) according to Duncan's multiple range test.

인간의 신경세포주인 SK-N-SH 세포에 CS-HE, CS-CH, CS-EA, CS-BU 그리고 CS-AQ를 각각 농도별(0, 25, 50, 100 µg/mL)로 24시간 처리하였을 때 모든 농도에서 세포 독성이 관찰되지 않았다(Fig. 7). 따라서 계속되는 연구에서는 0, 25 그리고 50 µg/mL 농도를 사용하였다.

Fig. 8A는 곤드레 분획물들과 500 µM H₂O₂를 동시에 30분 동안 처리하였을 때 세포생존율 결과이고, Fig. 8B는 곤드레 분획물들과 500 µM H₂O₂를 동시에 1시간 동안 처리하였을 때 세포생존율 결과이다. 곤드레 분획물들과 500 µM H₂O₂를 동시에 30분간 처리하였을 때 500 µM H₂O₂ 단독 처리에 의한 SK-N-SH 세포의 생존율은 56.4%였으나 모든 분획물들 처리는 유의적으로 세포생존율을 증가시켰으며, 특히 CS-CH 그리고 CS-EA 50 µg/mL 처리에 의해 세포생존율이 75.1% 그리고 74.4%로 증가하였고 H₂O₂만 처리한 처리군보다 18.7% 그리고 18%의 신경세포생존율을 증가시켰다(Fig. 8A). 곤드레 분획물들과 500 µM H₂O₂를 동시에 1시간 처리하였을 때 500 µM H₂O₂의 1시간 동안

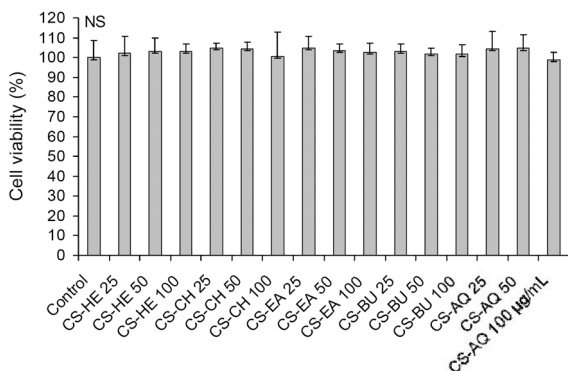


Fig. 7. Effect of cell viability of hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, and aqueous fractions (CS-HE, CS-CH, CS-EA, CS-BU, and CS-AQ) from *Cirsium setidens* extract. Values are mean±standard deviation (n=8). NS: not significant.

단독 처리에 의한 SK-N-SH 세포의 생존율은 24.9%였으나 CS-HE, CS-CH, CS-EA, CS-BU 또는 CS-AQ 처리에 의해 세포생존율을 증가시켰으며, 특히 CS-CH 및 CS-EA

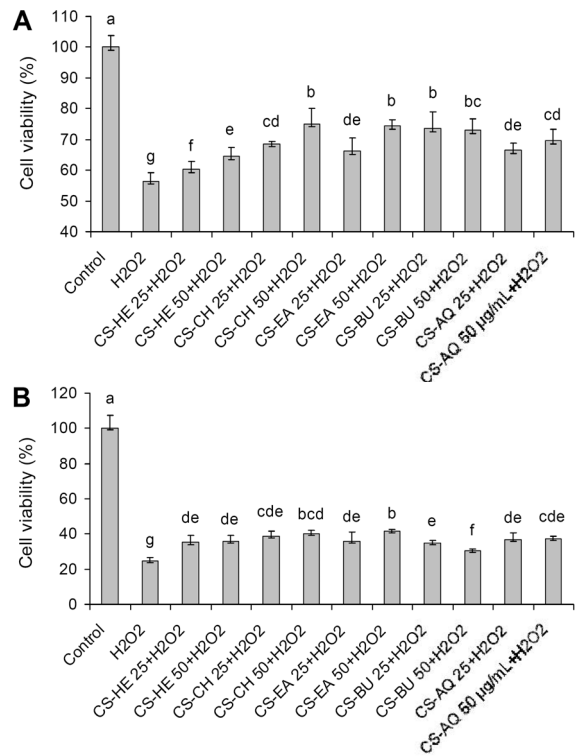


Fig. 8. The protective effect on cell viability of hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, and aqueous fractions (CS-HE, CS-CH, CS-EA, CS-BU, and CS-AQ) from *Cirsium setidens* extract. Values are mean±standard deviation (n=8). Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different (P<0.05) according to Duncan's multiple range test. (A) Cells were exposed to fractions (0, 25, and 50 µg/mL) and 500 µM H₂O₂ simultaneously for 30 min. (B) Cells were exposed to fractions and 500 µM H₂O₂ simultaneously for 1 h.

50 µg/mL 처리에 의해 세포생존율이 40.2% 그리고 41.5%로 증가하였고 H₂O₂만 처리한 세포생존율과 비교하여 15.3% 그리고 16.6% 세포생존율이 증가하였다(Fig. 8B).

본 연구 결과는 곤드레 에틸아세테이트 분획물(CS-EA)과 클로로포름(CS-CH)은 다른 분획물들과 비교하여 비슷하거나 더 효과적으로 산화적 스트레스로부터 뇌신경세포를 보호함으로써 뇌신경 사멸을 억제시켰고, 강한 산화적 스트레스에 오래 노출되어 뇌신경세포 사멸이 심하게 진행된 경우보다 뇌세포 사멸이 초기 단계에 있을 때 이들 분획물의 뇌신경세포 보호 효과가 더 뛰어났다. 따라서 초기 뇌질환 환자들을 위해 CS-EA와 CS-CH는 뇌질환 개선을 위한 식·의약 소재로 활용 가능할 것으로 생각된다.

곤드레 분획물들의 산화적 스트레스에 의한 ROS 생성 억제 효과

SK-N-SH 세포에 500 µM H₂O₂를 30분 동안 처리하였을 때 생성된 ROS는 대조군(control: 100%)과 비교하여 약 322% 증가하였고, CS-BU를 제외한 곤드레 분획물 50 µg/mL 처리에 의해 유의적으로 세포내 ROS 생성량이 감소하였다($P < 0.05$). 50 µg/mL 처리에 의해 CS-HE, CS-CH, CS-EA, CS-BU 그리고 CS-AQ는 각각 266.2%, 273.0%, 255.9%, 294.6% 그리고 277.6%였고 CS-EA가 가장 효과적으로 세포내 ROS를 감소시켰는데(Fig. 9), 이는 CS-EA의 강한 항산화 효과에 기인된 것으로 생각된다. 따라서 곤드레 에틸아세테이트 분획물은 강한 항산화 효과에 의해 세포내에 생성되는 ROS를 소거함으로써 산화적 스트레스에 대항하여 뇌신경세포를 보호할 것이라고 추정된다.

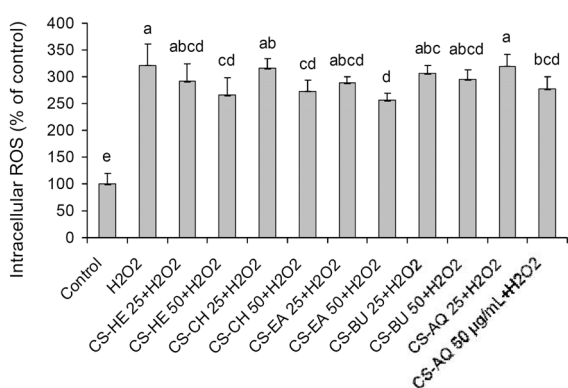


Fig. 9. The protective effect of hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, and aqueous fractions (CS-HE, CS-CH, CS-EA, CS-BU, and CS-AQ) from *Cirsium setidens* extract on H₂O₂-induced intracellular ROS formation. Values are mean±standard deviation (n=8). Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple range test. Cells were exposed to fractions (0, 25, and 50 µg/mL) and 500 µM H₂O₂ simultaneously for 30 min.

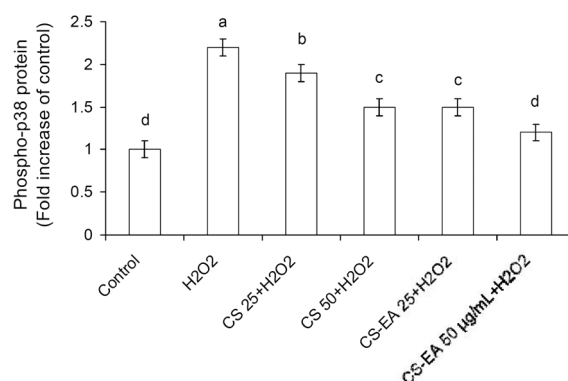


Fig. 10. The protective effect of extract from *Cirsium setidens* (CS) and ethyl acetate fraction (CS-EA) from CS on H₂O₂-induced phosphorylation of p38 MAPK protein in SK-N-SH cells. Values are mean±standard deviation (n=3). Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple range test. Cells were exposed to CS or CS-EA (0, 25, and 50 µg/mL) and 500 µM H₂O₂ simultaneously for 30 min.

뇌신경세포내 H₂O₂에 의해 유도된 p38 단백질 인산화에 대한 곤드레 분획물의 영향

곤드레 추출물 및 분획물의 뇌신경세포 보호 효과에 대한 분자생물학적 기전 연구를 위하여 산화적 스트레스 조건 하에 뇌신경세포 사멸과 관련하여 활성화되는 것으로 알려져 있는 p38의 인산화를 측정하였다(25).

SK-N-SH 세포에 500 µM H₂O₂ 처리에 의해 인산화 된 p-p38 단백질 수준이 현저하게 증가하였고, 25 그리고 50 µg/mL CS 및 CS-EA에 의해 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 10). H₂O₂ 처리에 의해 인산화 된 p-p38 단백질 함량은 대조군과 비교하여 2.2배 증가하였고 같은 농도에서 CS-EA는 CS보다 더 효과적으로 H₂O₂ 처리에 의해 증가된 p-p38 단백질 생성량을 감소시켰으며, 50 µg/mL CS-EA를 처리했을 때 대조군과 비교하여 1.2배였으므로 H₂O₂ 처리군보다 유의적으로 낮은 함량이었고 대조군과 유사한 수준이었다($P < 0.05$).

포유동물 세포에서 다양한 스트레스에 의해 활성화되는 MAPK 신호전달 경로에는 p38, c-Jin N-terminal kinase (JNK) 그리고 apoptosis signal-regulating kinase(ASK1)가 포함되어 있고, 산화적인 스트레스에 의해 세포 내부에서 MAPK 신호전달 경로가 활성화되면 결국 뇌신경세포 사멸을 유도하고 이는 뇌질환 유발의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(21,25-27). p38 인산화에 의해 활성화되는 것을 막을 수 있다면 뇌신경세포 사멸을 억제할 수 있을 것이다. 따라서 이들 MAPK 신호전달 경로를 억제시키는 천연 소재 개발 연구가 활발하게 진행되고 있는데(3,21), 본 연구에서 곤드레 70% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물이 산화적 스트레스에 의해 증가된 p38 인산화를 억제함으로써 뇌신경세포를 보호하여 뇌질환 예방 효과를 나타낼 것이라 추정할 수 있었다.

요 약

신경계 질환은 산화적 스트레스에 의한 신경세포 손상에 의해 발생하는 것이 하나의 기전으로 알려져 있다. 본 연구는 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대항하여 곤드레 (*Cirsium setidens*, CS), 누룩치(*Pleurospermum kamschaticum*, PK) 그리고 산마늘(*Allium victorialis*, AV)의 뇌신경 보호 효과 및 그 기전에 대한 것이다. CS와 AV 처리는 대조군과 비교하여 400 µg/mL까지 인간의 신경세포주인 SK-N-SH 세포에 대해 세포독성이 없었다. 산화적 유도자인 H₂O₂를 SK-N-SH 세포에 처리하였을 때 세포사멸 및 활성산소종(ROS) 생산이 현저하게 증가하였으나 CS 또는 AV 처리에 의해 산화적 스트레스에 의해 증가된 세포사멸과 ROS 생산이 현저하게 감소하였다. 실험한 산채 중에 CS와 PK가 AV보다 더 강한 DPPH 라디칼 소거 작용이 있었으나 PK는 대조군과 비교하여 SK-N-SH 세포를 사멸시키는 강한 세포독성을 가지고 있었다. CS는 AV보다 산화적 스트레스에 대항하여 세포사멸 및 ROS 생성에 더 높은 저해적 영향력을 보여주었다. 따라서 계속되는 실험에는 CS를 사용하였다. CS의 순차적 용매 분획물들인 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물들(CS-HE, CS-CH, CS-EA, CS-BU, CS-AQ)은 산화적 스트레스에 대항하여 SK-N-SH 세포사멸 및 세포내 ROS 생성을 억제하였다. CS-EA는 5개의 분획물들 중 가장 강한 DPPH 라디칼 소거 작용 및 세포내 ROS 소거 활성을 가지고 있었고, 가장 강한 뇌신경세포 보호 효과를 가지고 있었다. CS-EA는 산화적 스트레스에 의해 증가된 세포사멸사(apoptosis)의 신호전달 경로에 관여하는 p38의 인산화를 저해함으로써 활성화되는 것을 약화시켰다. 이 결과들은 CS-EA가 뇌신경세포에서 항산화 효과 및 p38 인산화 억제에 의한 뇌신경 보호 효과를 나타낼 것이라 제안하였다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. NRF-2013R1A1A4A01013550)이다.

REFERENCES

1. Heo HJ, Lee CY. 2005. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J Agric Food Chem* 53: 1984-1989.
2. Kim DW, Chae HS, Kim NY, Jang A. 2013. Anti-oxidative activity and the protective effect of donkey's bone and skin extracts on SK-N-SH cells. *J Life Sci* 23: 1019-1024.
3. Kwon KH, Lim HY, Chung MJ. 2014. Neuroprotective effects of bread containing *Cirsium setidens* or *Aster scaber*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 829-835.
4. Kim TJ. 1996. *Korea resources plants. IV*. Seoul National University Press, Seoul, Korea. p 230.
5. Lee SH, Jin YS, Heo SI, Shim TH, Sa SH, Choi DS, Wang MH. 2006. Composition analysis and antioxidative activity from different organs of *Cirsium setidens* Nakai. *Korean J Food Sci Technol* 38: 571-576.
6. Ham SS, Hwangbo HJ, Cui CB, Lee EY, Cho MA, Lee DS. 2001. Suppressive effects of ethanol extract of *Aster scaber* root on genotoxicity. *J East Asian Soc Dietary Life* 11: 446-471.
7. Kim JH, Kim MK. 1999. Effect of dried leaf powders and ethanol extracts of *Perilla frutescens*, *Artemisia princeps* var. *orientalis* and *Aster scaber* on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean J Nutr* 32: 540-551.
8. Lim SS, Lee JH. 1997. Effect of *Aster scaber* and *Ixeris dentata* on contractility and vasodilation of cardiovascular and endothelial cell in hyperlipidemic rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 300-307.
9. Chung MS, Lee MS. 1998. Analysis of volatile flavor components of *Pleurospermum kamschaticum*. *Korean J Soc Food Sci* 14: 541-546.
10. Lim SJ, Kyoung HH, Hee KJ. 2003. Effect of edible and medicinal plants intake on blood glucose, glycogen and protein levels in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 36: 981-989.
11. Kim TG, Kim SH, Kang SY, Jung KK, Choi DH, Park YB, Ryu JH, Han HM. 2000. Antiatherogenic effect of the extract of *Allium victorialis* on the experimental atherosclerosis in the rabbit and transgenic mouse. *Korean J Pharmacogn* 31: 149-156.
12. Lee KT, Choi JH, Kim DH, Son KH, Kim WB, Kwon SH, Park HJ. 2001. Constituents and the antitumor principle of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. *Arch Pharm Res* 24: 44-50.
13. Shirataki Y, Motohashi N, Tani S, Sunaga K, Sakami H, Satoh K, Nakashima H, Kanamoto T, Wolfard K, Molnar J. 2001. Antioxidative activity of *Allium victorialis* L. extract. *Anticancer Res* 21: 3331-3339.
14. Ham SS, Cui CB, Choi HT, Lee DS. 2004. Antimutagenic and cytotoxic effects of *Allium victorialis* extracts. *Korean J Food Preserv* 11: 221-226.
15. Lee SS, Mun SH, Lee HJ, Choe DH, Jo MH. 2004. Cholesterol inhibitory activities of kaempferol and quercetin isolated from *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. *J Korean Wood Sci Technol* 32: 17-27.
16. Choi JW, Lee KT, Kim WB, Park KK, Chung WY, Lee JH, Lim SC, Jung HJ, Park HJ. 2005. Effect of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* leaves on triton WR-1339-induced and poloxamer-407-induced hyperlipidemic rats and on diet-induced obesity rats. *Korean J Pharmacogn* 36: 109-115.
17. Lee E. 2013. Effects of *Allium victorialis* extract on lowering lipid, anti-oxidation and concentration of inflammatory mediators in rats fed high oxidized fat. *Korean J Plant Res* 26: 227-233.
18. Ahn HY, Heo SJ, Kang MJ, Lee JH, Cha JY, Cho YS. 2011. Antioxidative activity and chemical characteristics of leaf and fruit extracts from *Thuja orientalis*. *J Life Sci* 21: 746-752.
19. Doh ES, Chang JP, Kil KJ, Choi MS, Yang JK, Yun CW, Jeong SM, Jung YH, Lee GH. 2011. Antioxidative activity and cytotoxicity of fermented *Allium victorialis* L. extract. *Korean J Plant Res* 24: 30-39.
20. Kim MS, Kim KH, Yook HS. 2012. Antioxidative and physiological activities of fractions from *Pleurospermum kamschaticum* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1338-1345.

21. Kim SM, Chung MJ, Ha TJ, Choi HN, Jang SJ, Kim SO, Chun MH, Do SI, Choo YK, Park YI. 2012. Neuroprotective effects of black soybean anthocyanins via inactivation of ASK1-JNK/p38 pathways and mobilization of cellular sialic acids. *Life Sci* 90: 874-882.
22. Jang MJ, Woo MH, Kim YH, Jun DY, Rhee SJ. 2005. Effects of antioxidative, DPPH radical scavenging activity and antithrombogenic by the extract of sancho (*Zanthoxylum schinifolium*). *Korean J Nutr* 38: 386-394.
23. Kim MJ, Kim JS, Cho MA, Kang WH, Jeong DM, Ham SS. 2002. Biological activity of *Ixeris dentata* Nakai juice extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 924-930.
24. Kang MC, Lee JY, Lee JA, Han JH, Kim BS, Kim GO. 2008. Antioxidant effects and melanin inhibitory effect of natural *Pimpinella komarovii* extracts in Jeju Island. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 77-82.
25. Matsukawa J, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. 2004. The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *J Biochem* 136: 261-265.
26. Rincon M, Flavell RA, Davis RA. 2000. The JNK and p38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses. *Free Radic Biol Med* 28: 1328-1337.
27. Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 410: 137-140.