

Caffeic Acid의 항산화 활성 및 Amyloid beta와 LPS에 의한 C6 Glial 세포의 산화적 스트레스 보호 효과

김지현¹ · 왕 천¹ · 이상현^{2*} · 조은주^{1*}

¹부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소, ²중앙대학교 식물시스템과학과

Antioxidant Activity and Protective Effect of Caffeic Acid against Oxidative Stress Induced by Amyloid Beta and LPS in C6 Glial Cells

Ji Hyun Kim¹, Qian Wang¹, Sanghyun Lee^{2*} and Eun Ju Cho^{1*}

¹Department of Food Science and Nutrition & Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

Abstract – This study was investigated the radical scavenging effect and the protective activity of caffeic acid (CA) against oxidative stress. CA showed strong 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) and hydroxyl radical (\cdot OH) scavenging activity, showing 42.00% and 87.22% at 5 μ M concentration of DPPH and \cdot OH scavenging activity, respectively. Furthermore, we studied protective activity of CA from amyloid beta (A β ₂₅₋₃₅) and lipopolysaccharide (LPS) induced neuronal cell damage and neuronal inflammation using C6 glial cells. The treatment of A β ₂₅₋₃₅ to C6 glial cell showed declines in cell viability and high generation levels of reactive oxygen species (ROS). However, the treatment of CA increased cell viability. The treatment of 5 μ M CA led to the elevation of cell viability from 59.28% to 81.22%. In addition, the production of ROS decreased cellular levels of ROS by the treatment of CA. The treatment of LPS to C6 glial cells increased significant elevation of nitric oxide (NO) production, while CA decreased NO production significantly. The production of NO increased by the treatment of LPS to 131.08%, while CA at the concentration of 1 μ M declined the NO production to 104.86%. The present study indicated that CA attenuated A β ₂₅₋₃₅-induced neuronal oxidative stress and inflammation by LPS, suggesting as a promising agent for the neurodegenerative diseases.

Key words – Caffeic acid, Anti-oxidant activity, ROS, NO

체내에서 과량의 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)의 축적은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발시키며, Alzheimer's disease(AD), Parkinson's disease와 같이 노화와 관련된 신경퇴행성 질환의 중요한 원인으로써 알려져 있다.¹⁾ 이는 신경세포막의 지질과산화, 단백질 변성, DNA와 RNA의 손상 및 세포사멸 등과 같은 결과를 초래한다.^{2,3)} Amyloid beta peptide(A β)는 free radical을 매개하여 산화적 스트레스를 유발시키는 원인물질이며, 이는 superoxide(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂), hydroxyl radical(OH) 등의 ROS를 형성한다. 뇌 내 A β 의 과도한 축적은 기억능력과 인지능력이 상실되는 특징을 나타내는 대표적인 신경퇴행성 질환인 AD의 진행과 발달의 대표적인 원인으로써 알려지고

있다.⁴⁾ A β 는 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein; APP)로부터 β -secretase, γ -secretase에 의해 분리된 39-43개의 아미노산 peptide이며, 정확한 메커니즘은 알 수 없지만 A β 로 인한 독성은 신경세포를 퇴화 및 사멸시킨다고 알려져 있다.^{5,6)} 뿐만 아니라, A β 의 독성은 염증성 자극을 일으켜 NO, PGE₂, ROS 등의 염증성 인자를 방출하고, TNF- α , IL-1 β 와 같은 cytokines를 분비한다.⁷⁾ 염증성 인자와 cytokine의 증가는 신경퇴행성 과정에서 흔히 발견할 수 있고, 신경세포의 생존율을 조절하는데 중요한 인자로써 작용한다. 이외에도 LPS, IFN- γ 와 같은 여러 염증성 자극으로 인해 AD의 증상은 더욱 악화된다.^{8,9)}

WHO¹⁰⁾에 따르면, 전 세계 치매 환자의 70%가 AD 환자이며, 2030년에는 2배, 2050년에는 약 3배 증가할 것이라고 예측하고 있어 심각한 위험을 나타내고 있다. 따라서, AD의 예방 및 치료에 관련한 연구들이 활발히 이루어지고 있

*교신저자(E-mail): slee@cau.ac.kr, ejcho@pusan.ac.kr
(Tel): +82-31-670-4688, +82-51-2837

으며, 대표적인 원인인 산화적 손상으로부터 신경세포 보호 효과에 대한 관련한 연구가 많이 보고되어 있다. 특히 polyphenol, flavonoid와 같이 체내에서 산화적 스트레스에 대한 방어 작용을 하는 천연물질에 대한 접근이 활발히 이루어지고 있다.^{11,12)}

Caffeic acid(CA)는 차, 커피, 야채, 과일 등의 자연식품에 풍부하게 들어있는 polyphenol이다. 이전의 연구 결과에 의하면 항산화,^{13,14)} 항염증,¹⁵⁾ 항암,¹⁶⁾ 항바이러스 등의 다양한 약리 작용을 지닌 것으로 보고되었다. 또한, aluminium, acrolein에 대한 신경세포 보호효과에 대한 연구가 밝혀진 바 있다.^{17,18)} 그러나, AD의 원인물질인 A β , LPS로 인한 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과에 관한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 신경세포의 일종인 C6 glial 세포에 A β_{25-35} 와 LPS로 인한 산화적 스트레스를 유도하여 ROS, NO 측정을 통해 CA의 신경세포 보호 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

세포 종류 및 시약 – 본 실험에 사용한 CA는 Sigma(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)사에서 구입하여 사용하였다. C6 glial 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, South Korea)에서 분양 받았으며 배양을 위해 100 units/mL의 penicillin streptomycin, 10% fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's modified eagle medium(DMEM) 배지, trypsin EDTA-용액은 Welgene(Welgene, Daegu, South Korea)에서 구입하여 사용하였다. 산화적 스트레스를 유발하기 위한 A β_{25-35} 와 lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma사의 제품을 구입하여 사용하였다. 세포생존율과 ROS 측정을 하기 위해 사용한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 BIO BASIC Inc.(Toronto, Canada)에서, dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Bio Pure(Ontario, Canada)에서, dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2-deoxy-ribose, naphthyl ethylene diamine dihydrochloride, sulfanilamide는 Sigma사 제품을 사용하였다. FeSO₄·7H₂O는 Daejung Chemicals & Metals Co. Ltd.(Gyeonggi-do, South Korea)에서, EDTA disodium salt dehydrate와 phosphoric acid는 Samchun Pure Chemical Co. Ltd.(Gyeonggi-do, South Korea)에서, thiobarbituric acid(TBA)는 Acros Organics(New Jersey, USA)에서, trichloroacetic acid(TCA)는 Kanto Chemical Co. Inc.(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

DPPH 소거능 측정 – Ethanol에 농도 별로 희석한 시료와 60 μ M DPPH 용액을 각각 100 μ l씩 동량으로 96 well plate에 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과

비교하여 free radical 소거 효과를 백분율(%)로 나타내었다. Positive control으로 L-ascorbic acid를 농도별로 조제하여 사용하였다.¹⁹⁾

·OH Radical 소거능 측정 – PBS에 농도 별로 희석한 시료와 10 mM FeSO₄·7H₂O-EDTA, 10 mM 2-deoxy-ribose solution를 혼합하였다. 그 뒤, 10 mM H₂O₂를 혼합하여 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 그 후, 1% TBA solution과 2.8% TCA solution을 혼합하여 20분간 100°C에서 반응시킨 다음, 냉각시켜 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 hydroxyl radical(-OH) 소거 효과를 백분율(%)로 나타내었다. Positive control으로 L-ascorbic acid를 농도별로 조제하여 사용하였다.²⁰⁾

세포 배양 – C6 glial 세포는 100 units/ml의 penicillin streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 1~2일에 한번씩 세포 분화가 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)로 세척 후, 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액으로 부착된 세포를 분리하여 원심분리를 통해 세포를 집적시켰다. 집적된 세포를 배지에 넣고 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

Cell Viability 측정 – C6 glial 세포를 96 well plate에 well당 5×10⁴ cells/ml로 seeding하여 37°C에서 2시간 배양 후, 세포가 잘 부착되면 25 μ M A β_{25-35} 를 주입하여 24시간 배양하였다. 배양 후, 1, 2.5, 5 μ M의 농도별로 CA를 처리하여 24시간 배양하였다. LPS를 처리한 경우, well당 1×10⁶ cells/ml로 seeding하여 세포가 잘 부착되면 1, 2.5, 5 μ M의 농도별로 CA를 처리하여 3시간동안 배양 후, 8 μ g/ml의 LPS를 처리하여 36시간 배양하였다. 그 뒤, 5 mg/ml의 MTT solution을 각 well에 주입하였다. 37°C에서 4시간 배양한 후 생성된 보라색의 formazan 결정을 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.²¹⁾

ROS 생성률 측정 – C6 glial 세포를 96 well plate에 well 당 5×10⁴ cells/ml로 seeding하여 37°C에서 2시간 배양 후, 세포가 잘 부착되면 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 25 μ M A β_{25-35} 를 주입하여 24시간 배양하였다. 산화적 스트레스가 유발된 후 CA를 1, 2.5, 5 μ M의 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 뒤 80 μ M DCF-DA용액을 각 well에 주입하여 37°C에서 30분간 배양 후, FLUOstar OPTIMA (BMG labtech., Ortenberg, Germany)로 excitation-480 nm, emission-535 nm에서 측정하였다.²²⁾

NO 생성률 측정 – C6 glial 세포가 포화상태가 되었을 때, 96 well plate에 well당 1×10⁶ cells/ml로 seeding하여 37°C에서 2시간 배양 후, CA를 1, 2.5, 5 μ M의 농도 별로 처리하여 3시간 동안 배양하였다. 산화적 스트레스를 유발하기 위해 8 μ g/ml의 LPS를 처리하여 36시간 배양 후, 상층액과

griess reagent를 각각 100 μ l씩 동량으로 반응시킨 후 빛을 차단하여 실온에서 30분간 반응 시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계 분석 – 실험 결과들은 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 통계 프로그램인 SAS 4.2를 이용하여 각 실험 결과들로부터 ANOVA(analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple test($P<0.05$)를 이용하여 각 군의 평균 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

ROS의 과다한 축적으로 인한 산화적 스트레스의 독성은 신경세포 사멸과 신경퇴행성 질환의 원인이 되며, 항산화제는 AD, Parkinson's disease, ischemia와 같이 노화와 관련된 여러 신경 퇴행성 질환에 대한 보호효과가 있다.²³⁾ DPPH 소거 활성은 분자 내 free radical을 가지고 있는 DPPH와 항산화제가 반응하면 불가역적으로 DPPH를 DPPHH의 형태로 환원시키고, 이 과정 중에 보라색에서 무색으로 탈색 되게 되는데, 이러한 원리를 이용하여 흡광도의 변화를 측정한 방법으로 가장 널리 사용되는 항산화 측정법이다.²⁴⁾ Table I에서 살펴보면, CA의 DPPH 소거능은 농도 의존적으로 증가하였으며, 또한 그 수치가 positive control로 사용한 천연 항산화제인 L-ascorbic acid와 유사한 수치를 나타내어 우수한 DPPH radical 소거능을 나타냈다.

$\cdot\text{OH}$ radical은 ROS 중 가장 반응성이 큰 free radical로써, 이는 단백질, 지질, 당, DNA 등의 생체 분자와 반응하여 세포에 산화적 손상을 일으켜 체내에서 심각한 질병을 초래하는 물질로써 알려지고 있다.²⁵⁾ $\cdot\text{OH}$ radical 소거능 측정은 $\cdot\text{OH}$ radical이 금속이온의 존재 하에 H_2O_2 와 O_2^- 로부터 형성되는 원리를 이용한 Fenton 반응에 의해 측정하였다.²⁶⁾ CA의 $\cdot\text{OH}$ radical 소거능을 살펴보면(Table II), 농도 의존적으로 소거 효과가 증가함을 확인하였다. 모든 농도에서 80% 이상의 높은 소거 효과를 확인하였고, 특히 1 μM 의 낮은 농도에서 80.16%의 소거효과를 나타내는데, 이는 L-ascorbic acid의 77.03% 보다 높은 수치로써 우수한 $\cdot\text{OH}$ radical 소거효과를 확인할 수 있었다.

Table I. DPPH radical scavenging activity of CA and L-ascorbic acid

Treatment (μM)	Scavenging activity (%)	
	CA	L-ascorbic acid
1	3.44 \pm 2.73*	5.77 \pm 1.80
2.5	17.43 \pm 1.63*	21.07 \pm 1.86
5	42.00 \pm 1.62*	48.17 \pm 2.00

Values are the mean \pm SD.

* $P<0.05$ significant difference compared with L-ascorbic acid. L-ascorbic acid is used as a positive control.

Table II. Hydroxyl radical scavenging activity of CA and L-ascorbic acid

Treatment (μM)	Scavenging activity (%)	
	CA	L-ascorbic acid
1	80.16 \pm 0.08*	77.03 \pm 0.07
2.5	84.67 \pm 0.08	84.64 \pm 0.13
5	87.22 \pm 0.06*	87.64 \pm 0.28

Values are the mean \pm SD.

* $P<0.05$ significant difference compared with L-ascorbic acid. L-ascorbic acid is used as a positive control.

이상에서 CA가 DPPH, $\cdot\text{OH}$ radical에 대한 소거효과를 확인하여 산화적 스트레스 보호효과가 우수함을 살펴보았다.

신경퇴행성 질환이 증가함에 따라 신경계와 관련된 glial 세포와 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 중추신경계의 신경세포의 하나인 glial 세포는 뇌 내 항상성을 조절하며, 산화적 스트레스로부터 뉴런을 보호하는 역할을 한다.²⁷⁾ 또한, glial 세포는 염증성 cytokine에 의해 활성화 되며, 이는 AD와 같은 신경퇴행성 질환에서 흔히 발견 된다.²⁸⁾

$\text{A}\beta$ 는 39-43개 peptide로 이루어져있으며, 과다하게 축적 시 senile plaque를 형성하여 산화적 스트레스로 인한 인지 능력과 기억능력이 손상되는 AD의 원인으로 알려지고 있다. $\text{A}\beta_{25-35}$ fragment는 AD환자의 뇌에서 관찰되며, 응집성과 신경독성의 특징을 나타내어 산화적 스트레스, apoptosis, necrosis, 조직 손상 등의 결과를 초래한다.²⁹⁻³¹⁾

MTT assay는 세포 생존율 측정에 널리 사용되는 방법으로, 탈수소효소 작용에 의해 미토콘드리아의 능력을 이용하는 측정법이다.³²⁾ Fig. 1은 C6 glial 세포에 $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 처리하여, 산화적 스트레스를 유발시킨 후 MTT assay를 이용하

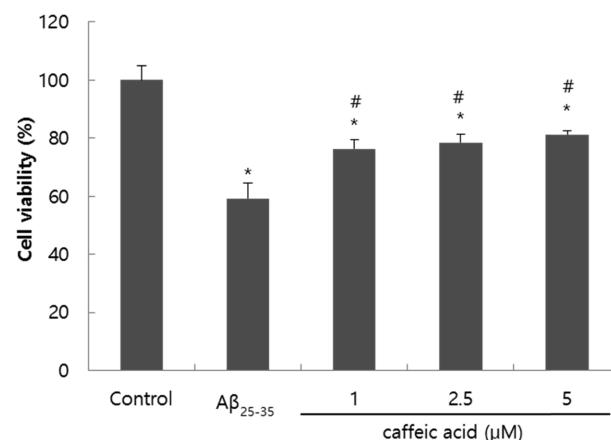


Fig. 1. Effect of CA on viability of C6 glial cells treated with $\text{A}\beta_{25-35}$. Values are the mean \pm SD. * $P<0.05$ significant difference compared with control, # $P<0.05$ significant difference compared with $\text{A}\beta_{25-35}$ -treated cells.

여 세포 생존율에 미치는 효과를 측정한 결과이다. $A\beta_{25-35}$ 만을 처리한 control군의 경우에는 59.10%의 낮은 세포 생존율을 나타내어 산화적 스트레스로 인한 세포 손상을 확인하였고, $A\beta_{25-35}$ 와 caffeic acid를 동시에 처리한 군의 경우 control군보다 높은 세포 생존율을 나타내었으며 특히, 5 μM 의 농도에서는 80% 이상의 높은 세포 생존율을 나타내어 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과를 확인하였다. 위 결과는 이전에 보고된 연구인 CA가 PC12 신경세포에서 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 신경독성에 대한 보호효과와 일치하는 바이다.³³⁾ 뿐만 아니라, CA는 신경아교세포에서 카드뮴의 결합에 의한 해독효과로 인해 신경세포 보호효과가 밝혀진 바 있으며, HT22 해마세포에서 acrolein에 의해 유도된 신경세포 사멸에 대한 AD 보호효과를 확인하였고, *in vivo* 상에서 $AlCl_3$ 로 유도된 치매에 대한 보호효과도 밝혀진 바 있다.^{17,18,34)} 그러므로 CA의 신경퇴행성 질환에 대한 개선효과가 우수할 것으로 사료된다.

세포 내 ROS 농도의 측정은 DCF-DA의 산화에 의한 형광도의 변화로써 측정하였다. DCF-DA는 세포막을 통과하여, 세포 내 ROS를 측정하는 대표적인 물질이며, 세포막을 자유롭게 통과하여 세포 내 esterase에 의해 비형광성 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 H_2O_2 , NO, peroxide, peroxynitrite와 같은 여러 ROS에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 DCF가 되는 원리를 이용하여 측정하였다.³⁵⁾

Fig. 2는 $A\beta_{25-35}$ 를 처리하였을 때 발생되는 세포 내 ROS 생성율을 알아본 결과이다. 시간이 지남에 따라 모든 군에서 ROS 생성량이 증가하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 산화적 스트레스가 유발되었음을 확인할 수 있었다. 60분 기준으로 ROS 생성량을 측정한 결과 $A\beta_{25-35}$ 만을 처리한 control군의 ROS 생성량을 100%로 하였을 때, 나머지 군에서는 모두 control 군보다 낮은 ROS 생성량을 확인하였다. 특히, CA를 처리한 군의 경우 normal군보다 낮은 NO 생성량을 확인하여, 산화적 스트레스 개선 효과가 우수한 것으로 생각된다. 이전에 보고된 연구에서 CA는 ROS의 일종인 singlet molecular oxygen 소거효과가 우수 하였으며, 지질 과산화의 지표인 LDL(low-density lipoprotein) 산화 저해 효과에 우수한 효과가 있다는 것이 보고되어 있다.^{13,14)}

ROS 뿐만 아니라 reactive nitrogen species(RNS)도 체내 산화적 스트레스에 중요한 영향을 미친다. RNS의 일종인 nitric oxide(NO)는 면역계, 심혈관계, 신경계와 관련한 인자로써, 다양한 생리학적 과다를 조절하는 세포 신호 전달 경로를 매개하는 역할을 한다.³⁶⁾ 특히, 정상적인 상태에서 신경계에서는 neuro-modulation, neuro-transmission, synaptic plasticity와 같은 중요한 역할을 하지만, 뇌 내 과다한 NO 가 축적될 시에는 신경세포 사멸에 영향을 미치며 IL-1 β , TNF- α 와 같은 염증성 cytokine의 합성을 촉진하여 염증반응으로 인한 신경퇴행성 질환의 원인이 된다.^{29,37)} 특히, AD

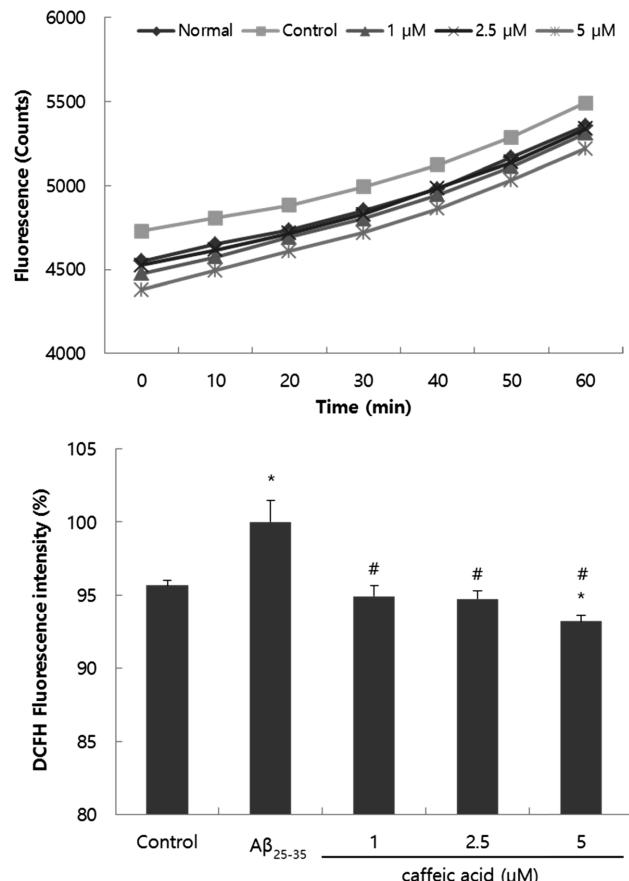


Fig. 2. Effect of CA on level of reactive oxygen species in C6 glial cell treated with $A\beta_{25-35}$. Values are the mean \pm SD. * $P<0.05$ significant difference compared with control, # $P<0.05$ significant difference compared with $A\beta_{25-35}$ -treated cells.

환자의 뇌에서 높은 농도의 $A\beta$ 는 O_2^- 와 NO생성을 증가시켰고, 이들의 상호작용으로 인해 peroxynitrite(ONOO $^-$)를 형성하여 AD 환자의 뇌에서 손상을 일으킨다.³⁸⁾ 그러므로, NO농도의 측정은 nitritative stress와 신경세포 손상의 직접적인 원인으로써 이용되는 지표이다. LPS는 뇌에서 glial 세포를 자극하는 내독소로써, IL-1 β , TNF- α , IL-6과 같은 염증성 cytokine을 방출시켜 세포에 손상을 주는 것으로 알려져 있다.³⁹⁾ C6 glial 세포에 LPS를 처리했을 경우 염증반응에 의해 유전자 전사단계에서 유도되는 인자인 inducible nitric oxide synthase(iNOS)를 분비하고, iNOS에 의해 생성된 NO는 세포 사멸을 일으킨다는 연구가 되어진 바 있다.⁴⁰⁾ 따라서 본 연구에서 LPS를 처리하여 염증 반응을 유도한 C6 glial 세포에 CA를 처리하여 LPS로 인한 산화적 손상에 대한 신경세포 보호 효과를 확인하였다. Table III은 LPS로 자극한 C6 glial 세포의 생존율을 알아본 결과이다. LPS가 내독소로 작용하여 세포의 생존율에는 영향을 미치지 않은 것을 확인하였다. 반면에 Fig. 3은 LPS 처리로 유발된 NO

Table III. Effect of CA on viability of C6 glial cells treated with LPS

Treatment (μM)	Cell viability (%)
1	100.70±0.77
2.5	100.62±0.58
5	100.68±0.92
Control	97.68±0.59
Normal	100.00±1.00

Values are the mean±SD.

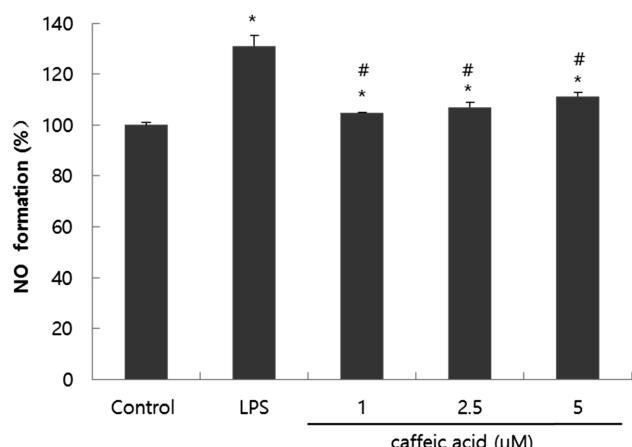


Fig. 3. Effect of CA on NO formation of C6 glial cells treated with LPS. Values are the mean±SD. * $P<0.05$ significant difference compared with control, # $P<0.05$ significant difference compared with LPS-treated cells.

생성량에 대한 CA의 효과를 살펴본 결과이다. LPS를 처리하지 않은 normal군의 NO 생성량을 100%라고 하였을 때, LPS를 처리 한 control군은 131.08%의 NO 생성량을 나타내어 세포에 손상을 준 것을 확인하였다. 그러나, CA를 함께 처리한 군의 경우, 모든 농도에서 NO 생성량이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 이전의 연구에서 CA가 Raw 264.7 세포에서 NO 생성을 억제하여 세포 내 비가역적 손상을 일으키는 ONOO-의 생성을 억제하여 세포의 손상을 방지한 것으로 보고되어 있으며, *in vivo*만성 염증 모델에서 CA를 투여한 결과 TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 cytokine의 분비를 감소시켜 항염증 효과가 보고되어 있다.^{15,41)}

결 론

본 연구에서는 CA의 항산화 활성과 신경세포의 일종인 C6 glial 세포에 $\text{A}\beta_{25-35}$ 와 LPS로 인한 산화적 스트레스에 대한 보호 효과를 확인하였다. 그 결과, CA는 천연 항산화제인 L-ascorbic acid와 유사한 수준으로 DPPH 라디칼 소거능, ·OH radical 소거능을 나타내어 우수한 항산화 효과

가 있음을 확인하였다. 또한, CA의 $\text{A}\beta_{25-35}$ 로부터 유발된 산화적 스트레스에 대한 보호효과를 확인 해 본 결과, 신경 세포 생존율을 증가 시켰으며 ROS 생성을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 게다가, LPS에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 NO 생성 억제를 통한 보호 효과를 살펴볼 수 있었다. 그러므로, CA는 라디칼 소거능 및 신경세포 보호 효과가 우수한 것으로 생각된다.

사 사

이 논문은 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원(2013R1A1A2011228)을 받아 수행된 것임.

인용문헌

1. Butterfield, D. A. (1997) Amyloid-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Chem. Res. Toxicol.* **10**: 495-506.
2. Behl, C., Moosmann, B. and Heck, S. (1999) Reactive oxygen species in Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* **9**: 141-142.
3. Markesberry, W. R. and Carney, J. M. (1999) Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **9**: 133-146.
4. Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A. and Nabeshima, T. (2007) A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta(25-35). *Behav. Brain Res.* **180**: 139-145.
5. Ivins, K. J., Ivins, J. K., Sharp, J. P. and Cotman, C. W. (1999) Multiple pathways of apoptosis in PC12 cells. Crma inhibits apoptosis induced by beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* **274**: 2107-2112.
6. Dominic, M. W. and Dennis, J. (2007) A beta oligomers – a decade of discovery. *J. Neurochem.* **101**: 1172-1184.
7. Nakajima, K. and Kohsaka, S. (1993) Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci. Res.* **17**: 187-203.
8. Skaper, S. D., Giusti, P. and Facci, L. (2012) Microglial and mast cells: two tracks on the road to neuroinflammation. *FASEB J.* **26**: 3103-3117.
9. Block, M. L., Zecca, L. and Hong, J. S. (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**: 57-69.
10. WHO (2012). *World Alzheimer Report 2012: Overcoming the Stigma of Dementia*.
11. Lee, M. N., You, H. J., Cho, S. H., Woo, C. H., Yoo, M. H., Joe, E. H. and Kim, J. H. (2002) Implication of the small GTPase Rac1 in the generation of reactive oxygen species in response to β -amyloid in C6 astrogloma cells. *Biochem. J.* **366**: 937-943.
12. Jayasena, T., Poljak, A., Smythe, G., Braidy, N., Münch, G.

- and Sachdev, P. (2013) The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* **12**: 867-883.
13. Meyer, A. S., Heinonen, M. and Frankel, E. N. (1998) Anti-oxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chem.* **61**: 71-75.
 14. Foley, S., Navaratnam, S., McGarvey, D. J., Land, E. J., Truscott, T. G. and Rice-Evans, C. A. (1999) Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 1202-1208.
 15. Zhang, M., Juan, Z., Li, W., Li, B., Guo, J., Guan, X., Han, Q. and Zhang, H. (2014) Caffeic acid reduces cutaneous tumor necrosis factor alpha (TNF-a), IL-6 and IL-1b levels and ameliorates skin edema in acute and chronic model of cutaneous inflammation in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **37**: 347-354.
 16. Chand, H. T., Chen, I. L., Chou, C. T., Liang, W. Z., Kuo, D. H., Shieh, P. and Jan, C. R. (2013) Effect of caffeic acid on Ca²⁺ homeostasis and apoptoxix in SCMI human gastric cancer cells. *Arch. Toxicol.* **87**: 2141-2150.
 17. Khan, K. A., Kumar, N., Nayak, P. G., Madhavan, N., Shenoy, R. R., Nandakumar, K., Rao, C. M. and Jayesh, M. (2013) Impact of caffeic acid on aluminium chloride-induced dementia in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **66**: 1745-1752.
 18. Huang, Y., Jin, M., Pi, R., Zhang, J., Chen, M., Ouyang, Y., Liu, A., Chao, X., Liu, P., Liu, J., Ramassamy, C. and Qin, J. (2013) Protective effects of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester against acrolein-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Neurosci. Lett.* **535**: 146-151.
 19. Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara T., Yoshica T. and Okuda T. (1989) Effects of the interation of tannins with co-existing substances, VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 2016-2021.
 20. Ewing, J. F. and Janero, D. R. (1995) Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal. Biochem.* **232**: 243-248.
 21. Mosmann, T. (1983) Rapid colormetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**: 55-63.
 22. Byun, Y. J., Kim, S. K., Kim, Y. M., Chae, G. T., Jeong, S. W. and Lee, S. B. (2009) Hydrogen peroxide induces autophagic cell death in C6 glioma cells via BNIP3-mediated suppression of the mTOR pathway. *Neuro. Lett.* **461**: 131-135.
 23. Perluigi, M., Joshi, G., Sultana, R., Calabrese, V., De Marco, C., Coccia, R. and Butterfield, D. A. (2006) *In vivo* protection by the xanthate tricyclodecan-9-yl-xanthogenate against amyloid β -peptide (1-42)-induced oxidative stress. *Neurosci.* **138**: 1161-1170.
 24. Wang, L. F. and Zhang, H. Y. (2003) A theoretical investigation on DPPH radical-scavenging mechanism of edaravone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**: 3789-3792.
 25. Ashok, B. and Ali, R. (1994) The aging paradox: free radical theory of aging. *Experim. Gerontol.* **34**: 293-303.
 26. Aoyagi, S., Yamazaki, M., Miyasaka, T. and Sakai, K. (2001) Clarification of enhanced hydroxyl radical production in fenton reaction with ATP/ADP based on luminol chemiluminescence. *J. Chem. Eng. Jpn.* **34**: 956-959.
 27. Choi, M. S., Shin, C. Y., Ryu, J.R., Lee, W. J., Cheong, J. H., Choi, C. R., Kim, W. K. and Ko, K. H. (2004) Lead increases nitric oxide production in immunostimulated glial cells. *J. Appl. Pharmacol.* **12**: 209-214.
 28. Shrikant, P., Lee, S. J., Kalvakolanu, I., Ransohoff, R. M. and Benveniste, E. N. (1996) Stimulus-specific inhibition of intracellular adhesion molecule-1 gene expression by TGF-beta. *J. Immunol.* **157**: 892-900.
 29. Diaz, A., Limon, D., Chávez, R., Zenteno, E. and Guevara, J. (2012) A β 25-35 injection into the temporal cortex induces chronic inflammation that contributes to neurodegeneration and spatial memory impairment in rats. *J. Alzheimers Dis.* **30**: 505-522.
 30. Trubetskaya, V. V., Stepanichev, M. Y., Onufriev, M. V., Lazareva, N. A., Markevich, V. A. and Gulyaeva, N. V. (2003) Administration of aggregated beta-amyloid peptide (25-35) induces changes in long-term potentiation in the hippocampus *in vivo*. *Neurosci. Behav. Physiol.* **33**: 95-98.
 31. Kubo, T., Nishimura, S., Kumagae, Y. and Kaneko, I. (2002) *In vivo* conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26] Abeta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]Abeta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J. Neurosci. Res.* **70**: 474-483.
 32. Heo, H. J. and Lee, C. Y. (2006) Phenolic phytochemicals in cabbage inhibit amyloid β protein-induced neurotoxicity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **39**: 330-336.
 33. Sul, D., Kim, H. S., Lee, D., Joo, S. S., Hwang, K. W. and Park, S. Y. (2009) Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation. *Life Sci.* **84**: 257-262.
 34. Baek, S. H., Lee, H., Pae, H. O., Kim, Y. O., Kwak, J. S. and Han, D. S. (1995) Development of antitoxic agents from Korean medicinal plants. Part 5. *Korean J. Toxicol.* **11**: 241-246.
 35. Rastogi, R. P., Singh, S. P., Häder, D. P. and Sinha, R. P. (2010) Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **397**: 603-607.
 36. Murad, F. (1994) The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent Prog. Horm. Res.* **49**: 239-248.
 37. Calabrese, V., Voyd-Kimball, D., Scapagnini, G. and But-

- terfield, D. A. (2004) Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. *In Vivo* **18**: 245-267.
38. Smith, M. A., Richey Harris, P. L., Sayre, L. M., Beckman, J. S. and Perry, G. (1997) Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **17**: 2653-2657.
39. Willeaume, V., Kruys, V., Mijatovic, T. and Huez, G. (1994) Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *J. Inflamm.* **46**: 1-12.
40. Lee, H. J., Kim, N. Y., Jang, M. K., Son, H. J., Kim, K. M., Sohn, D. H., Lee, S. H. and Ryu, J. H. (1999) A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF- α in LPS-activated macrophages. *Planta Med.* **65**: 104-108.
41. Choi, B. C. (2008) Effect of caffeic acid on the production of reactive oxygen species in Raw 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* **52**: 441-445.

(2015. 3. 5 접수; 2015. 4. 3 심사; 2015. 4. 20 개재확정)