

High Glucose로 유도된 산화 스트레스에 대한 황칠나무 잎 추출물의 뇌신경세포 보호 효과

김종민¹ · 박선경¹ · 귀텐자오¹ · 강진용¹ · 하정수¹ · 이두상¹ · 권오준² · 이 욱³ · 허호진¹

¹경상대학교 응용생명과학부(BK21 Plus), 농업생명과학연구원

²경북지역산업평가단

³국립산림과학원 특용자원연구과

Neuronal Cell Protective Effect of *Dendropanax morbifera* Extract against High Glucose-Induced Oxidative Stress

Jong Min Kim¹, Seon Kyeong Park¹, Tian Jiao Guo¹, Jin Yong Kang¹, Jeong Su Ha¹,
Du Sang Lee¹, O-Jun Kwon², Uk Lee³, and Ho Jin Heo¹

¹Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University

²Gyeongbuk Institute for Regional Program Evaluation

³Division of Special Purpose Trees, National Institute of Forest Science

ABSTRACT Antioxidant activities and neuroprotective effects of ethyl acetate fraction from *Dendropanax morbifera* (EFDM) against high glucose-induced oxidative stress and neurotoxicity were investigated to confirm their physiological activities. An 80% ethanolic extract of *D. morbifera* showed the highest contents of total phenolic compounds as well as 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activities. The extract was fractionated using several solvents, and the ethyl acetate fraction showed the highest activities in ferric reducing/antioxidant power and malondialdehyde inhibitory assays. To evaluate the neuroprotective effect based on antioxidant activities, cell viability was assessed using PC12 and MC-IXC cells in H₂O₂- and high glucose-induced cytotoxic assays, respectively. EFDM evidently showed neuroprotective effects in all cells (neuron-like PC12 cells and human brain-originated neuroblastoma MC-IXC cells). Inhibitory effect of the extract on acetylcholinesterase (AChE) as an acetylcholine-hydrolyzing enzyme was performed to examine the effect on cognitive function. EFDM presented an AChE inhibitory effect. Finally, high-performance liquid chromatography analysis showed that the major phenolic compound of EFDM is probably a rutin.

Key words: *Dendropanax morbifera*, antioxidant, oxidative stress, high glucose, neuroprotective effect

서 론

당뇨는 여러 다른 종류들로 이뤄진 인슐린의 결핍(type 1)이나 인슐린 저항성(type 2)에 의한 만성 고혈당증과 관련된 대사질환이다(1). 혈중 포도당의 농도가 높아지면 뇌, 혈관 등의 신체 조직에 산화적 스트레스가 증가하여 다양한 대사질환을 유발하며(2), 특히 당뇨병으로 인한 고혈당은 뇌 조직에서 산화적 스트레스를 유발하여 지질과산화, 자가면역 질환, 비효소적 당화반응을 일으킨다(3). 더불어 당뇨병성 신경병증은 당뇨병환자의 약 50% 이상에서 나타나는 증상 중 하나로 이러한 신경병증은 말초신경 돌기의 퇴화를 유발하

며 구조와 기능의 변화 또한 나타나는 것으로 보고되고 있다(4).

고혈당증은 많은 포도당 대사 과정을 활성화하여 뇌신경을 포함한 신경세포의 손상을 촉진하기도 한다. 이로 인해 신경 내부에 sorbitol과 fructose의 축적이 일어나며, NAD(P) 산화 환원 시스템의 불균형, protein kinase C(PKC)의 활성화, superoxide의 과도한 생성 및 항산화 효소의 감소가 유발된다(5). 이러한 결과는 세포 내 산화적 스트레스를 증가시켜 신경병증을 유도할 뿐만 아니라 자유라디칼을 활성화하며 미토콘드리아에서 포도당의 산화적 대사를 손상하기도 한다(4). 체내에서는 이와 같은 산화적 손상으로부터 세포를 보호하려는 작용을 하고 있으며, superoxide dismutase, glutathione, catalase 등과 같은 항산화 시스템이 존재하여 조직을 보호하려는 작용을 한다(6). 그러나 지속해서 고혈당에 노출될 경우 이들 시스템이 급격히 저하될 뿐만 아니라(7) 활성산소종(reactive oxygen species)의 생성을

Received 14 March 2016; Accepted 26 April 2016

Corresponding author: Ho Jin Heo, Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea
E-mail: hjher@gnu.ac.kr, Phone: +82-55-772-1907

급격하게 증가하며, 항산화 시스템의 능력을 떨어뜨려 산화적 스트레스에 대해 취약해진다. 이러한 산화적 스트레스를 감소시키기 위해 이용되는 천연식품 소재 유래의 항산화제는 세포의 생존율을 높일 뿐만 아니라 2차적인 질병의 유발을 완화해 당뇨병증에 도움이 되는 것으로 알려져 있다(8).

천연식품 중 하나인 황칠나무(*Dendropanax morbifera*)는 한국에서 자생하는 식물 중 하나로, 식품의약품안전처 식품원재료 데이터베이스에서 잎과 뿌리, 줄기 부위가 식용 가능한 소재로 등록되어 있으며(9), (+)-catechin, chlorogenic acid, ferulic acid 등의 폴리페놀성 생리활성 물질을 함유한 것으로 보고되고 있다(10). 이러한 생리활성 물질을 기반으로 황칠나무 잎은 항산화, 항암 활성(11)을 가지고 있을 뿐만 아니라 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 유발되는 nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현을 억제하는 항염증 활성도 가지는 것으로 보고된다(10). 하지만 고혈당증에 의한 신경세포 보호 효과에 관한 연구는 현재까지 매우 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 황칠나무 잎 에탄올 추출물의 ethyl acetate 분획물을 이용하여 *in vitro* 항산화 활성과 고농도의 포도당 등으로 유도된 산화적 스트레스에 대한 신경세포 및 뇌신경세포 보호 효과를 확인하였다. 더불어 cholinergic system에서 뇌신경 전달물질인 acetylcholine을 분해하는 효소로서의 acetylcholinesterase(AChE) 활성 억제제를 확인함으로써 고혈당으로 인해 발생할 수 있는 인지 기능 저하에 대한 황칠나무 잎 추출물의 개선 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

황칠나무 잎 추출물의 제조

본 연구에 사용된 황칠나무 잎은 경상남도 하동군 화개면에 위치한 화개제다(주)로부터 2015년 6월 제공받아 사용하였으며, 샘플을 동결건조기(Operon, Gimpo, Korea)를 이용하여 건조한 후 분쇄하여 -20°C에서 냉장 보관하여 사용하였다. 건조한 샘플 40 g을 50배의 0, 20, 40, 60, 80 및 95% 에탄올 용매를 이용하여 40°C에서 환류 냉각하여 2시간 동안 추출한 후, 이 추출액을 No. 2 여과지(Whatman PLC, Kent, UK)로 여과하여 진공농축기(N-N series, Eylea Co., Tokyo, Japan)로 농축하였다. 가장 활성이 높은 80% 에탄올 용매를 통해 전과 같은 방법으로 추출한 후, 3차 증류수 300 mL에 다시 녹인 농축물을 동량의 *n*-hexane을 이용하여 극성 차이로 분획하였고, 남은 3차 증류수 층을 *n*-hexane과 같은 방법으로 chloroform, ethyl acetate 용매를 각각 사용하여 분획하였다(Fig. 1). 각각 분획물을 동결건조기(Operon)를 이용하여 동결건조 하였고, distilled water(distilled water fraction from *Dendropanax morbifera*, DFDM), *n*-hexane(*n*-hexane fraction from *Dendropanax morbifera*, HFDM), chloroform(chloro-

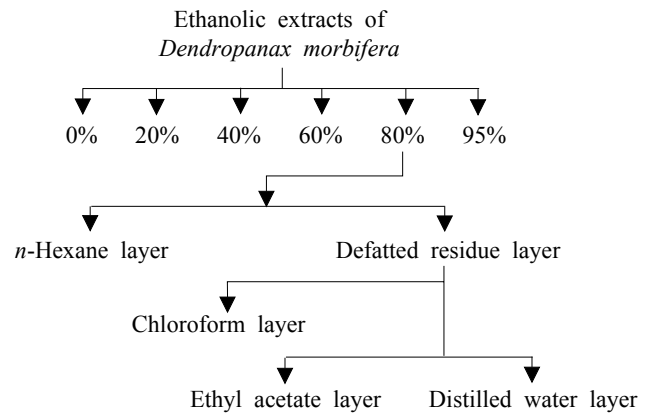


Fig. 1. Solvent fractionations of *Dendropanax morbifera* extract.

form fraction from *Dendropanax morbifera*, CFDM), ethyl acetate(ethyl acetate fraction from *Dendropanax morbifera*, EFDM) 분획물은 각각 6.81 g(17.02%), 3.70 g(9.24%), 0.2963 g(0.74%), 0.2564 g(0.64%)을 얻은 후 이를 -70°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

시약

본 연구에 사용된 시약 Folin & Ciocalteu's phenol reagent, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, trichloroacetic acid, thiobarbituric acid, acetylcholine iodide, acetylthiocholine, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) assay kit은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였다. HEPES, sodium bicarbonate, fetal bovine serum, MEM medium, RPMI 1640 medium과 fetal bovine serum은 Gibco BRL Co.(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, penicillin과 streptomycin 및 나머지 시약은 Sigma-Aldrich Co. 제품을 구입하여 사용하였다. 그 외 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

총폴리페놀 함량 측정

황칠나무 잎 추출물의 총폴리페놀 함량 분석은 Folin-Ciocalteu's reagent가 추출물에 함유된 폴리페놀 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다(12). 시료 용액 1 mL를 3차 증류수 9 mL에 첨가한 후 Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1 mL를 넣고 혼합하여 실온에서 5분간 반응시켰다. 7% Na₂CO₃ 용액 10 mL를 반응용액에 넣고, 이를 다시 혼합한 후 3차 증류수로 4 mL를 첨가하였다. 이 혼합용액을 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 시료와 같은 방법으로 작성된 검량선으로 총 페놀성 화합물 함량을 계산하였고, 이를 gallic acid equivalents(mg GAE/g extract)로 나타내었다.

ABTS/DPPH 라디칼을 이용한 소거 활성 측정

2.5 mM ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]와 1.0 mM AAPH[2,2'-azobis-(2-amidinopropane)HCl]는 150 mM NaCl이 포함된 100 mM phosphate buffer(pH 7.4)에 혼합한 후 70°C water bath에서 30분 동안 반응하여 실온에서 10분 동안 냉각하였다. 이를 syringe filter를 이용하여 여과시켜 24시간 동안 4°C에서 냉장보관 후 사용하였다. ABTS 라디칼 용액은 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 가 나오도록 3차 증류수로 희석해 사용하였다. 시료용액 20 μ L에 흡광도 값이 조정된 ABTS 라디칼 용액 980 μ L를 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시키고, 반응용액을 734 nm에서 흡광도를 측정하였다(13).

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거 활성은 80% 메탄올에 용해한 0.1 mM DPPH를 517 nm에서 흡광도 값이 1.00 ± 0.02 가 나오도록 80% 메탄올에 희석해 사용하였다. 시료용액 0.05 mL에 흡광도 값을 맞춘 DPPH 용액 1.45 mL를 첨가하여 실온에서 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(14).

Ferric reducing/antioxidant power(FRAP)를 이용한 총 항산화력 측정

TPTZ 용액[300 mM sodium acetate buffer(pH 3.6), 10 mM 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine(TPTZ) in 40 mM HCl 및 20 mM FeCl₃]을 제조하여 FRAP 실험에 사용하였다. Sodium acetate buffer, TPTZ 용액 및 FeCl₃을 혼합하여 37°C에서 15분간 반응시킨 FRAP 반응액을 준비하였다. FRAP 반응액 1.5 mL에 추출물 50 μ L를 반응시켜 실온에서 30분간 방치한 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다(15).

지질과산화물(MDA) 생성 억제 효과 측정

뇌 조직을 이용한 지질과산화물의 생성 억제 활성은 Chang 등(16)의 방법을 변형하여 실험하였다. ICR-mouse(8주령, male)는 실험동물 공급업체(Samtako, Osan, Korea)로부터 구입하여 7일간의 환경적응기간을 유지했다. 1주간 사육한 mouse의 뇌를 적출하여 조직 무게의 10 volumes에 해당하는 ice cold 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)에 균질화시켜 4°C에서 12,000 \times g로 15분간 원심분리한 후 상등액을 실험에 사용하였다. 시료용액 0.2 mL와 뇌 조직 상등액 0.1 mL, 10 μ M FeSO₄ 0.1 mL 및 0.1 mM ascorbic acid 0.1 mL를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 반응액을 30% trichloroacetic acid 0.1 mL와 1% thiobarbituric acid 0.3 mL를 첨가하여 water bath(80°C)에서 20분간 가열한 다음, 600 \times g에서 10분간 원심분리 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 동물실험은 경상대학교 동물윤리심의위원회 승인을 거쳐 진행하였다(경상대학교 동물실험인가번호 GNU-120831-M0067).

신경/뇌신경세포 배양 및 세포 생존율 측정

PC12 세포(KCLB 21721, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)는 신경세포의 특성을 나타내는 세포로 rat의 pheochromocytoma에서 유도된 것을 사용하였고, MC-IX C 세포(CRL-2270, ATCC, Manassas, VA, USA)는 뇌신경세포의 특성을 나타내는 세포로 인간의 뇌 조직에서 유도된 것을 사용하였다. PC12 세포는 25 mM HEPES, 25 mM sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, 50 units/mL penicillin 및 100 μ g/mL streptomycin이 포함된 RPMI 1640 배지에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고, MC-IXC 세포는 10% fetal bovine serum, 50 units/mL penicillin 및 100 μ g/mL streptomycin이 포함된 DMEM 배지에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

PC12와 MC-IXC 세포에 대한 보호 효과는 MTT assay kit(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하였다. MTT reduction assay는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 노란색의 수용성 기질을 청자색으로 전환되는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아 활성을 이용한 방법이다(17). H₂O₂에 의한 신경세포 보호 효과를 측정하기 위해 시료 30 μ L를 세포에 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 200 μ M H₂O₂를 3시간 동안 처리하였다. 또한, high glucose에 의한 신경세포 보호 효과를 확인하기 위해 시료 30 μ L를 세포에 24시간 동안 배양한 후, 50 mM glucose를 24시간 동안 처리하였다. 이 상태의 PC12와 MC-IXC 세포에 각각 MTT stock solution(10 μ L/well)을 처리하여 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 이 배양액에 DMSO 100 μ L를 첨가하여 반응을 종결시켰고, 최종 흡광도는 microplate reader(model 680, Bio-Rad, Tokyo, Japan)에서 570 nm(determination)와 690 nm(reference)에서 측정하였다. 세포 생존율은 control 군에 대한 % unit으로 나타났다.

AChE 저해 활성 측정

AChE 저해 활성 측정은 acetylcholine iodide를 기질로 이용하여 측정하였다(18). AChE는 PC12 세포배양액을 220 \times g에서 6분간 원심분리 하여 상등액을 제거하고 pellet을 얻었다. 남은 pellet을 균질화 buffer[1M NaCl, 50 mM MgCl₂, 1% Triton X-100(pH 7.2)] 2 mL를 첨가하여 균질화하였으며, 이 세포배양액을 원심분리(14,000 \times g, 30분, 4°C) 하여 효소실험에 사용하였다. 추출한 효소액의 단백질 함량을 측정하기 위하여 Quant-iT™ Protein Assay kit(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 효소액 10 μ L와 시료용액 10 μ L를 혼합하여 37°C에서 15분간 배양한 후 50 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0)에 용해한 Ellman's reaction mixture[0.5 mM acetylthiocholine, 1 mM 5,5' dithiobis(2-nitrobenzoic acid)] 70 μ L를 혼합한 후 405 nm에서 10분 동안 1분 간격으로 흡광도를 측정하였다.

HPLC를 이용한 황칠나무 잎 분획물의 생리활성 물질 분석

생리활성 물질을 동정하기 위해 High-Performance liquid chromatography(HPLC, Ultra mate 3000 series, Dionex, CA, USA) 분석을 시행하였다. 시료는 메탄올에 용해한 후 0.45 µm filter를 이용하여 여과하였다. C₁₈ column (250×4.6 mm, 5.0 µm, Prontosil, BISCHOFF Chromatography, Leonberg, Germany)을 사용하였고, 이동용매는 0.1% formic acid(A)와 메탄올(B)을 사용하였으며, B의 조성비를 20~60%(0~33 min), 60~90%(33~50 min), 90~20%(50~51 min), 20%(50~60 min)로 총 60분간 분석하였다. 시료의 주입량은 10 µL, 이동상 유속은 1.0 mL/min이며, UV 검출장치의 파장은 Diode Array Detector(DAD)로 254 nm에서 분석하였다. 검출된 생리활성 물질의 정량 분석을 위하여 시료와 같은 방법으로 작성된 표준물질의 검량선을 통해 폴리페놀 화합물의 정량분석을 실행하였다.

통계분석

모든 실험은 3회 반복 시행하여 mean±SD로 나타냈으며, 각 평균값에 대한 유의성 검증은 SAS software(version 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석 (analysis of variance, ANOVA)을 실시하고, Duncan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)으로 각 시료 간의 유의적인 차이를 P<0.05 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

총폴리페놀 함량 측정

대다수의 고등식물에 함유된 항산화 물질은 폴리페놀 화합물이 가장 많은 비율을 차지하고 있다. 이러한 폴리페놀 화합물은 산화적 스트레스나 독성이 강한 물질의 독성을 저하해 항산화 활성 및 라디칼 소거 활성을 가지는 것으로 알려져 있다(19).

황칠나무 잎 추출물의 에탄올 농도별 총폴리페놀 함량을 알아보기 위해 각각 0, 20, 40, 60, 80, 95%의 에탄올을 이용하여 실험을 실시하였다(Fig. 2A). 각각 추출물의 총폴리페놀 함량은 56.67±0.29 mg GAE/g, 67.25±0.14 mg GAE/g, 59.25±0.43 mg GAE/g, 68.5±0.25 mg GAE/g, 73.98±4.48 mg GAE/g, 72.58±4.00 mg GAE/g으로 80%의 에탄올 추출물에서 유의적으로 가장 우수한 함량 분포를 나타냈다. Jeong 등(20)의 연구에 따르면 천연물에 다량으로 존재하는 폴리페놀성 화합물은 강력한 항산화 능력을 갖고 있어 ABTS와 DPPH 라디칼 소거 활성 등의 중요한 역할을 하는 원인 물질로 보고되고 있다. 이에 따라 총폴리페놀 함량이 가장 높게 나타난 80% 에탄올 추출물을 이용하여 *in vitro* 항산화 실험을 하였다.

ABTS/DPPH 라디칼을 이용한 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거 활성은 시료에 함유된 다양한 항산화

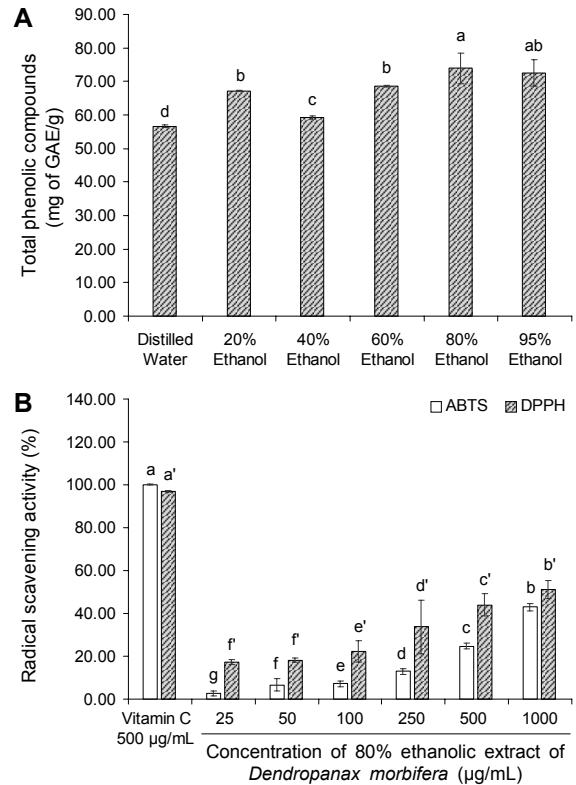


Fig. 2. Total phenolics of various ethanolic extracts of *Dendropanax moribifera* (A), ABTS and DPPH radical scavenging activities of 80% ethanolic extract of *Dendropanax moribifera* (B). Results shown are mean±SD (n=3). Data were statistically considered at P<0.05, and different small letters represent statistical differences (^{a-g} for ABTS, ^{a'-f'} for DPPH).

물질에 의해 제거되어 ABTS 라디칼 특유의 청록색이 탈색되어 나타나는 색 변화를 이용한 측정법이며(13), 수용성 및 지용성 화합물의 항산화력을 측정하는 데 효과적으로 적용할 수 있어 널리 사용되는 방법이다(21). 황칠나무 잎의 80% 에탄올 추출물의 라디칼 소거 활성 능력은 Fig. 2B에 나타내었다. 80% 에탄올 추출물의 1,000 µg/mL 농도에서 ABTS 라디칼 소거 활성은 43.03±1.75%로 나타났으며 양성 대조군인 비타민 C(100.05%)와 비교하였을 때는 유의적으로 낮은 소거 활성을 나타내었지만, 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거 활성이 증가하는 농도 의존적 경향을 나타냈다.

DPPH 라디칼은 비교적 안정한 자유 라디칼로서 이를 이용한 라디칼 소거 활성 실험은 여러 가지 천연물로부터 폴리페놀 및 항산화 물질의 확인하는 데 사용되고 있다(14). 이를 이용하여 황칠나무 잎의 80% 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였다(Fig. 2B). 80% 에탄올 추출물은 1,000 µg/mL 농도에서 51.20±4.26%로 나타났으며 양성 대조군인 비타민 C(96.91%)와 비교하였을 때는 유의적으로 낮은 소거 활성을 나타내었지만, ABTS 라디칼 소거 활성과 마찬가지로 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거 활성이 증가하는 농도 의존적 경향을 역시 나타냈다.

여러 연구에서 폴리페놀성 화합물은 라디칼 등을 효과적

으로 소거할 수 있는 것으로 나타났는데(19), 황칠나무 잎의 에탄올 추출물 역시 많은 폴리페놀성 화합물을 함유하고 있어(10) 이상과 같은 연구 결과가 나타난 것으로 판단된다. 이러한 *in vitro* 항산화 실험을 통해 유의적으로 우수한 항산화 활성을 보인 80% 에탄올 추출물을 극성 정도에 따라 분획하였고, 이를 이용하여 다음의 항산화 활성 실험을 진행하였다.

FRAP를 이용한 총 항산화력 측정

FRAP assay는 낮은 pH에서 환원제나 항산화제 등에 의해 ferric tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ) 화합물이 ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+} -TPTZ)으로 전환되는 것을 이용한 방법으로 천연물에 존재하는 많은 항산화 화합물이 환원력을 가지는 것을 이용한 방법이다(15). 황칠나무 잎의 4가지 분획물을 이용하여 항산화력을 측정하였다(Fig. 3A). 1,000 μ g/mL 농도의 DFDM, HFDM, CFDM 그리고 EFDM 분획물의 항산화력은 각각 1.80, 0.717, 1.26, 2.83으로 EFDM 분획물에서 유의적으로 높은 항산화력을 나타낸 것으로 나타났다. 모든 분획물은 농도가 증가함에 따라 높은 항산화력을 가지는 것으로 나타났다.

지질과산화물 생성 억제 효과 측정

활성산소종과 같은 산화적 스트레스에 대한 황칠나무 잎

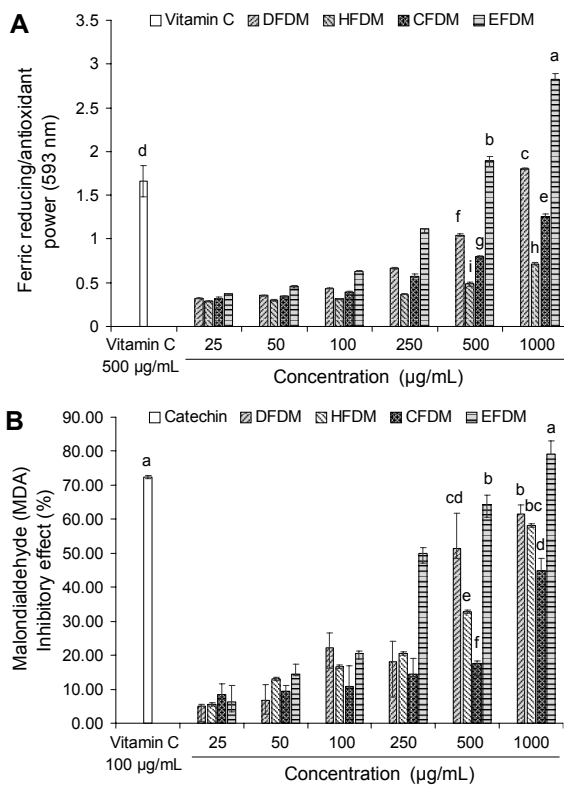


Fig. 3. Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) (A) and inhibitory effect on malondialdehyde (MDA) production (B) of 4 fractions from *Dendropanax moribifera*. Results shown are mean \pm SD (n=3). Data were statistically considered at $P < 0.05$, and different small letters represent statistical differences.

분획물의 지질과산화물(malondialdehyde, MDA) 생성 억제 효과를 ICR mouse로부터 적출한 뇌 조직을 활용하여 분석 확인하였다. 뇌 조직에서의 지질성분은 주로 신경세포막에서 산화적 스트레스에 취약한 상태로 존재하고 있으며, 외부 스트레스에 의한 세포막 손상 및 여러 가지 단백질의 산화에도 관련이 있는 것으로 알려져 있다(22). 따라서 본 연구에서는 마우스 뇌 조직에서 세포막의 지질과산화 중간생성물인 MDA 생성 억제 효과를 살펴보았다(Fig. 3B). 1,000 μ g/mL 농도의 DFDM, HFDM, CFDM 그리고 EFDM 분획물의 MDA 생성 억제 효과는 각각 61.41%, 58.18%, 44.94%, 79.20%로 EFDM 분획물에서 유의적으로 높은 지질과산화 억제 효과를 나타냈다. 또한, DFDM을 제외한 모든 분획물에서 농도가 증가함에 따라 높은 MDA 생성 억제 효과를 가지는 것으로 나타나 FRAP assay(Fig. 3A)의 결과와 유사한 특성을 보였다.

Chang 등(16)에 의하면 폴리페놀성 화합물을 다량 함유하는 추출물은 지방산화 억제 효과가 높은 것으로 보고하였으며, Tan과 Ryu(23)의 연구에 의하면 황칠나무 잎 추출물과 고지방, 고콜레스테롤 식이를 급여한 마우스 간에서의 MDA 함량을 측정된 결과 MDA 생성이 일정 수준에서 저해되는 것을 확인하였다. 이들 보고와 유사하게 뇌 조직을 이용한 본 실험에서도 지질과산화물로서의 MDA 생성을 억제할 수 있는 것으로 보인다. 이에 따라 총 지질과산화물 억제 활성이 가장 높게 나타난 EFDM 분획물을 이용하여 신경세포(PC12 cell) 및 뇌신경세포(MC-IXC cell)의 산화적 손상에 대한 세포 보호 효과를 측정하였다.

신경세포 및 뇌신경세포 생존율 측정

인체에서의 산화적 스트레스는 뇌 조직 등으로 이동된 많은 양의 산소가 불균형 대사되어 상대적으로 많은 활성산소종 등이 잔존하는 것으로부터 일어나게 되는데, 뇌 조직은 신경세포로서 신호전달이라는 기능적 특성상 상대적으로 많은 양의 불포화 지방산을 함유하고 있을 뿐만 아니라 낮은 수준의 항산화 효소를 가지고 있어 산화적 스트레스에 의한 세포 손상에 매우 민감한 것으로 보고되고 있다(24). 알츠하이머성 치매와 같은 뇌신경 퇴행성 질환은 여러 가지 산화적 스트레스에 의해 뇌신경세포의 손상 및 사멸이 진행되며, 천연 항산화 물질인 flavonoid 등과 같은 폴리페놀성 화합물은 이러한 산화적 스트레스로부터 신경세포의 보호 효과가 우수하다고 알려져 있다(25).

H_2O_2 로 유도된 산화적 스트레스 상태에서 EFDM 분획물의 PC12 신경세포의 생존율을 MTT assay로 측정한 결과는 Fig. 4A와 같다. H_2O_2 를 처리한 처리구에서는 control group 대비 75.83%의 cell viability를 나타냈고, H_2O_2 와 비타민 C를 동시에 처리한 group에서는 95.19%의 신경세포 생존율을 보였다. EFDM 분획물을 처리한 group에서는 100 μ g/mL 농도에서 94.43%의 생존율을 나타내었다. H_2O_2 로 유도된 산화적 스트레스 상태에서 EFDM 분획물의 MC-

IXC 신경세포의 생존율을 MTT assay로 측정한 결과는 Fig. 4B와 같다. H₂O₂를 처리한 처리구에서는 control group 대비 56.06%의 세포 생존율을 나타냈고, H₂O₂와 비타민 C를 동시에 처리한 group에서는 95.19%의 신경세포 생존율을 보였다. EFDM 분획물을 처리한 group에서는 100 µg/mL 농도에서 92.10%의 생존율을 나타내었으며, 특히 저농도(20 µg/mL)에서도 세포 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Park 등(26)의 연구에 의하면 미토콘드리아 복합체 I을 저해하고 지질과 단백질의 산화와 H₂O₂ 생성 등과 같은 산화적 스트레스를 유도하여 신경세포에서 만성 신경질환을 일으킨다고 보고되는 rotenone(27)을 신경세포에 황칠나무 잎에서 추출한 폴리페놀성 물질과 함께 투여하였을 때 rotenone 단독 처리군과 비교하여 신경세포 생존율이 34.59% 증가한 것으로 보고되었다. 이들 결과를 고려할 때 인체에서 유발되는 활성산소종과 H₂O₂와 같은 산화적 스트레스 또한 황칠나무 잎의 폴리페놀성 물질로부터 소거될 수 있고 이는 신경세포 및 뇌신경세포를 보호할 수 있는 중요한 배경이 될 것으로 생각한다.

High glucose로 유도된 산화적 스트레스 상태에서 EFDM 분획물의 PC12 신경세포의 생존율을 MTT assay로 측정

한 결과는 Fig. 5A와 같다. High glucose를 처리한 처리구에서는 control group 대비 56.29%의 세포 생존율을 나타냈고, high glucose와 acarbose를 동시에 처리한 group에서는 85.90%의 신경세포 생존율을 보였다. EFDM 분획물을 처리한 group에서는 100 µg/mL 농도에서 82.24%의 생존율을 나타내었으며, 농도가 증가함에 따라 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. High glucose로 유도된 산화적 스트레스 상태에서 EFDM 분획물의 MC-IXC 신경세포의 생존율을 MTT assay로 측정한 결과는 Fig. 5B와 같다. High glucose를 처리한 처리구에서는 control group 대비 66.99%의 세포 생존율을 나타냈고, high glucose와 acarbose를 동시에 처리한 group에서는 79.37%의 신경세포 생존율을 보였다. EFDM 분획물을 처리한 group에서는 100 µg/mL 농도에서 85.54%의 생존율을 나타내었으며, 농도가 증가함에 따라 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

Ceolotto 등(2)의 연구 결과에 의하면 고농도의 포도당은 활성산소종의 생성을 증가시키며, 이를 제거하기 위한 항산화 시스템의 균형이 무너지게 되면서 이들 스트레스를 소거하는 능력이 부족해지고 추가적인 산화적 스트레스가 유발

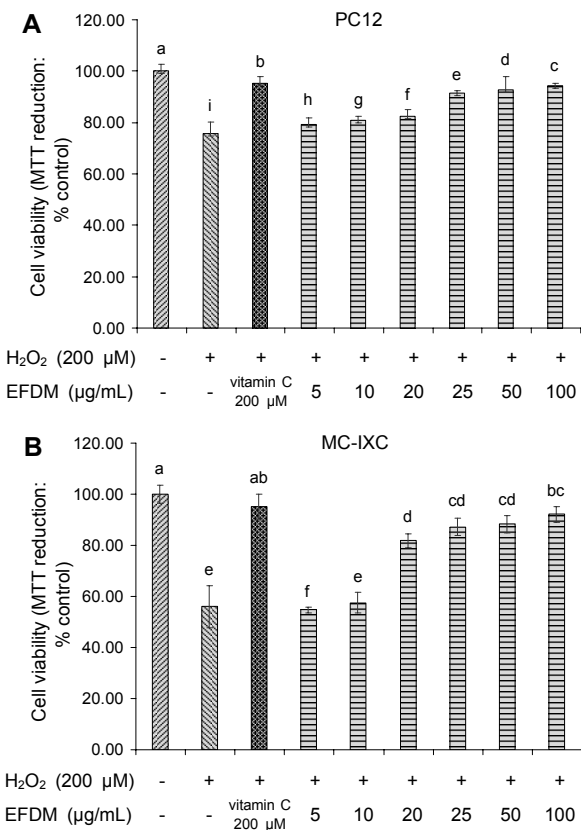


Fig. 4. Neuronal cell viability of ethyl acetate fraction from *Dendropanax morbifera* (EFDM) on H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cell (A) and MC-IXC cell (B). Results shown are mean±SD (n=3). Data were statistically considered at P<0.05, and different small letters represent statistical differences.

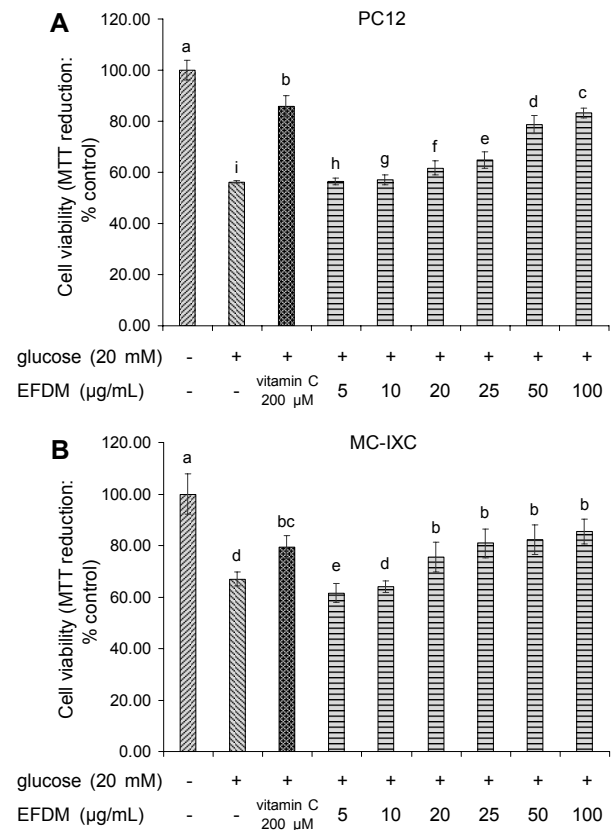


Fig. 5. Neuronal cell viability of ethyl acetate fraction from *Dendropanax morbifera* (EFDM) on high glucose-induced cytotoxicity in PC12 cell (A) and MC-IXC cell (B). Results shown are mean±SD (n=3). Data were statistically considered at P<0.05, and different small letters represent statistical differences.

되어 세포의 손상 및 생존율을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 세포의 손상은 활성산소종을 제거하거나 항산화 효소계의 활성을 증진하는 것 등으로 보호받을 수 있는데(28) 황칠나무 잎 분획물은 고농도의 포도당으로 인한 산화적 스트레스를 효과적으로 경감시켜주는 것으로 나타났다. 양성 대조군으로 사용된 acarbose는 α -glucosidase와 α -amylase에 대한 저해제의 하나로 당뇨 환자들에게서 혈당을 낮춰줄 수 있는 효과를 위한 치료제로 사용되며, 신체질량지수(body mass index, BMI)를 낮추어 당뇨의 개선을 도와주는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(29). 이러한 생리적 기능을 가진 acarbose와 비교하였을 때 황칠나무 잎의 EFDM 분획물은 H_2O_2 와 high glucose를 처리한 신경 세포에서 상당한 보호 효과를 가지는 것으로 생각하며, 이는 신경세포 및 뇌신경세포에 민감한 산화적 스트레스를 효과적으로 감소시켜 이들 세포를 보호하는 것으로 판단된다.

AChE 저해 활성 측정

인지기능을 조절할 수 있는 뇌 신경전달물질인 아세틸콜린(acetylcholine, ACh)은 산화적 스트레스를 비롯한 다양한 원인에 의하여 대뇌 피질과 해마 부위에서 급격히 감소하는 특징이 있다(30). 또한, ACh은 뇌신경 말단(cholinergic system)에서 AChE에 의해 분해되며 AChE의 활성이 지나치게 증가하게 될 경우 인지기능의 감소를 유발할 수 있는 것으로 보고되고 있다(31). 황칠나무 잎에서 얻은 EFDM 분획물은 상기의 결과에서 비교적 우수한 antioxidant activity를 바탕으로 신경세포(PC12 cell) 및 뇌신경세포(MC-IXC cell)를 효과적으로 보호할 수 있음이 확인되었다. 이와 더불어 뇌신경 말단에서 아세틸콜린 분해효소(AChE)를 저해할 수 있는 효과가 확인된다면 고혈당에 의한 인지능력 저하 현상을 개선할 수 있는 우수한 건강기능식품 소재로 활용할 수 있어 그 가능성을 살펴보았다(Fig. 6). EFDM 분획물은 최고농도(1,000 μ g/mL)에서 48.69%의 AChE 저해

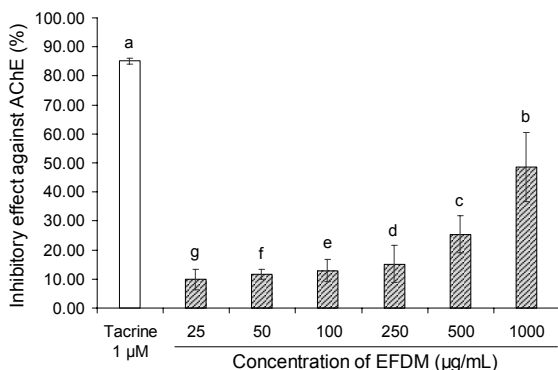


Fig. 6. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Dendropanax morbiifera* (EFDM) against acetylcholinesterase (AChE). The inhibition was expressed as a percentage of enzyme activity inhibited compared with the control value. The Result shown are means \pm SD (n=3). Data were statistically considered at $P < 0.05$, and different small letters represent statistical differences.

활성을 나타낸 것으로 나타났다. 이는 양성 대조군으로 활용된 tacrine에 의한 AChE 저해 효과의 약 55% 수준에 달하는 것으로 확인되었다. Tacrine은 donepezil, rivastigmine, 그리고 galantamine 등과 함께 알츠하이머성 치매를 치료해주는 AChE 저해제로 사용됐으며, 뇌 조직에서의 ACh의 함량을 증가시켜 시냅스의 신경전달 기능을 강화해주는 역할을 하였으나(32) 낮은 민감성과 간 독성 등과 같은 다양한 부작용으로 인해 인체 사용이 제한되어 왔고(33) 현재는 실험용 대조군 등으로 활용되고 있다. 결국 위 결과를 바탕으로 고려할 때 황칠나무 잎의 EFDM 분획물은 AChE 저해 효과를 통한 뇌 신경전달물질의 유지 및 항산화 효과에서 기인하는 뇌신경세포 보호 효과 등을 통해 인지기능 개선을 위한 천연 소재로 연구될 수 있을 것으로 판단된다.

HPLC를 이용한 황칠나무 잎 분획물의 생리활성 물질 분석

항산화 활성 및 신경/뇌신경세포 보호 효과를 나타내는 황칠나무 잎의 EFDM 분획물의 주요 생리활성 물질로서의 폴리페놀성 화합물의 HPLC 분석 결과는 Fig. 7과 같다. HPLC 분석 결과 254 nm의 UV-VIS 파장과 28.68 min에서 확인된 피크는 황칠나무 잎의 EFDM 분획물의 주요한 생리활성 물질임을 확인하였고, 이는 시료와 같은 방법으로 처리한 표준물질인 rutin의 머무름 시간과 UV-VIS spectrum을 비교하였을 때 일치하는 것으로 확인되었다. 이를 통해 확인된 생리활성 물질인 rutin의 정량분석 결과는 13.88 mg/g of dried EFDM weight로 나타났다. 황칠 추출물의 총폴리페놀 함량에서 나타내는 주요 폴리페놀 성분은 HPLC의 결과로 확인된 rutin에 의한 결과로 생각한다. Patil 등(34)의 연구 결과에 따르면 rutin은 뛰어난 ABTS 라디칼 소거 활성과 지질과산화 억제 효과를 가지는 것으로 보고하였으며, 이는 80% 에탄올 추출물의 ABTS 결과(Fig. 2B)와 EFDM 분획물에서 나타난 지질과산화 억제 효과(Fig. 3B) 역시 rutin에 의한 효과로 판단된다. Hyun 등(10)의 연구 결과에 의하면 황칠나무 잎의 주요 생리활성 물질은 rutin, quercetin, kaempferol 등으로 알려져 있다. 이러한 생리활성 물질들은 blood-brain barrier(BBB)를 통과할 수 있는 성질을 가지고 있으며, 이들의 신경세포 보호 효과 역시 상당한 수준을 보이는 것으로 보아(35) 이들 물질을 함유하는 황칠 역시 섭취 후 BBB를 통과하여 Fig. 4, 5와 같이 신경세포의 보호 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 황칠의 주요 생리활성 물질로 확인된 rutin은 항응고, 항고혈압, 항바이러스 등의 역할과 함께 ERK1/2 활성의 저해를 통해 면역질환 치료제로도 사용되고 있으며(36), 활성산소종의 생성을 저해하여 신경세포 보호 효과와 인지기능의 보호 효과를 가지는 것으로도 보고되고 있다(37). 본 연구 결과에서 황칠나무 잎 추출물의 항산화 활성 및 이를 통한 신경/뇌신경세포 보호 효과 그리고 AChE 저해 효과는 rutin을 포함한 황칠나무 유래의 폴리페놀성 화합물 등에 의한 것으로 추정된다.

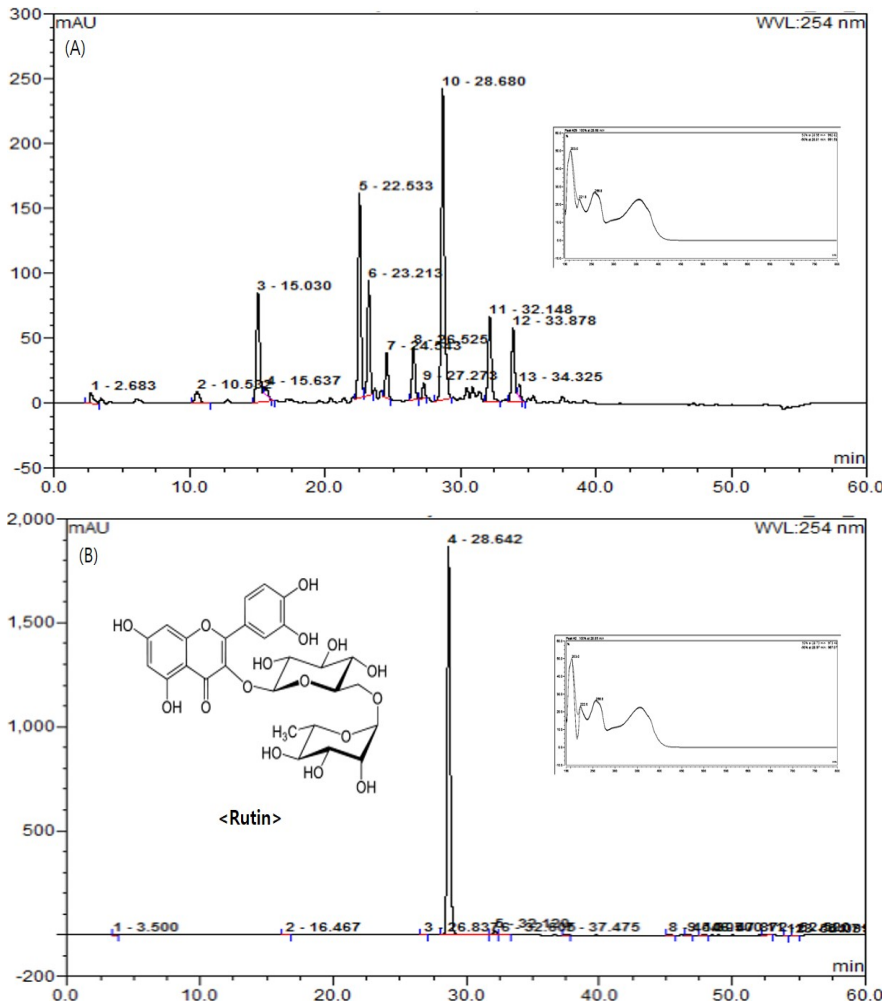


Fig. 7. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *Dendropanax moribifera* (EFDM) at 254 nm. Phenolics were identified by comparing their retention time (RT) values to UV spectra of known standards. All analyses were run in triplicate, and RT of rutin was 28.68 min.

요 약

본 연구는 한국 고유 식용 자원인 황칠나무의 잎을 이용한 항산화 효과 및 고혈당으로 인한 신경/뇌신경세포 보호 효과를 알아보기 위하여 실시하였다. 황칠나무 잎 추출물의 총폴리페놀 함량, ABTS와 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였으며 활성이 가장 높은 80% 에탄올 추출물을 이용하여 극성 정도에 따라 분획을 하였다. 이들 중 ethyl acetate 분획물이 총 항산화력(FRAP assay)과 지질과산화물(MDA) 생성 억제 활성이 다른 분획물에 비하여 유의적으로 높은 값을 나타냈다. 이를 이용하여 신경세포로서의 PC12 세포와 인간 뇌조직 유래 뇌신경세포로서의 MC-IXC 세포에서 H₂O₂와 고혈당에 의한 세포생존율을 측정하였고, ethyl acetate 분획물은 산화적 스트레스로부터의 효과적인 세포 보호 효과를 나타냈다. 또한, 뇌신경말단에서 신경전달물질(ACh)의 분해를 유발하는 효소(AChE)의 저해 효과를 측정하였고, ethyl acetate 분획물은 유의적인 AChE 저해 효과를 보였다. 마지막으로 황칠나무 잎 ethyl acetate 분획물의 생리활성 물질을 확인하고자 HPLC 분석을 하였으며, 주요 생리활성

물질은 rutin으로 추정되었다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 고려할 때 황칠나무 잎 추출물은 천연 항산화제의 역할을 가지고 있을 뿐만 아니라 이를 통해 산화적 스트레스로부터 뇌신경세포 등을 효과적으로 보호할 수 있으며 더불어 AChE 저해 활성을 통한 인지기능 개선 가능 소재로서 연구 될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2015R1D1A3A01015931)의 지원을 받아 수행된 결과로 이에 감사드립니다. 또한, 김종민, 박선경, 귀텐자요, 강진용, 하정수, 그리고 이두상 학생은 교육부 BK21 plus program(MEST)의 지원으로 본 연구에 참여하였습니다.

REFERENCES

1. Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-

- 787.
2. Ceolotto G, Gallo A, Papparella I, Franco L, Murphy E, Iori E, Pagnin E, Fadini GP, Albiero M, Semplicini A, Avogaro A. 2007. Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2627-2633.
 3. Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, Feldman EL. 2011. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat Rev Neurol* 7: 573-583.
 4. Tesfaye S, Selvarajah D. 2012. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev* 28: 8-14.
 5. Zaltzberg H, Kanter Y, Aviram M, Levy Y. 1999. Increased plasma oxidizability and decreased erythrocyte and plasma antioxidative capacity in patients with NIDDM. *Isr Med Assoc J* 1: 228-231.
 6. Peng J, Jones GL, Watson K. 2000. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radic Biol Med* 28: 1598-1606.
 7. Son SM, Kim IJ, Kim YK. 2000. Study on role of neutrophil in endothelial cell injury under high glucose condition. *J Korean Diabetes Assoc* 24: 652-665.
 8. Nandita S, Rajini PS. 2004. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chem* 85: 611-616.
 9. Ministry of Food and Drug Safety. 2010. Food Material Information. http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/safefood-life/foodMaterial/foodMaterialDB.do?menu_no=294&menu_grp=MENU_GRP01 (accessed Jan 2016).
 10. Hyun TK, Kim MO, Lee H, Kim Y, Kim E, Kim JS. 2013. Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax morbifera* Léveillé. *Food Chem* 141: 1947-1955.
 11. Moon HI. 2011. Antidiabetic effects of dendropanoxide from leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum Exp Toxicol* 30: 870-875.
 12. Hwang IG, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Yang MH, Jeong HS. 2006. Change of physicochemical characteristics of Korean pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) juice with heat treatment conditions. *Korean J Food Sci Technol* 38: 342-347.
 13. Kim DO, Jeong SW, Lee CY. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem* 81: 321-326.
 14. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 15. Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
 16. Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS, Shyur LF. 2001. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem* 49: 3420-3424.
 17. Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, Butterfield DA. 2002. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxyl radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. *J Nutr Biochem* 13: 273-281.
 18. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
 19. Lee HS, Park YW. 2005. Antioxidant activity and antibacterial activities from different parts of broccoli extracts under high temperature. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 759-764.
 20. Jeong CH, Choi SG, Heo HJ. 2008. Analysis of nutritional components and evaluation of functional activities of *Sasa borealis* leaf tea. *Korean J Food Sci Technol* 40: 586-592.
 21. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
 22. Singh M, Dang TN, Arseneault M, Ramassamy C. 2010. Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. *J Alzheimers Dis* 21: 741-756.
 23. Tan X, Ryu HK. 2015. Effects of *Dendropanax morbifera* leaf extracts on lipid profiles in mice fed a high-fat and high-cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 641-648.
 24. Tangsaengvit N, Kitphati W, Tadtong S, Bunyapraphatsara N, Nukoolkarn V. 2013. Neurite outgrowth and neuroprotective effects of quercetin from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. on cultured P19-derived neurons. *J Evidence-Based Complementary Altern Med* 2013: 838051.
 25. Zhao B. 2009. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurochem Res* 34: 630-638.
 26. Park SE, Sapkota K, Choi JH, Kim MK, Kim YH, Kim KM, Kim KJ, Oh HN, Kim SJ, Kim S. 2014. Rutin from *Dendropanax morbifera* Leveille protects human dopaminergic cells against rotenone induced cell injury through inhibiting JNK and p38 MAPK signaling. *Neurochem Res* 39: 707-718.
 27. Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT. 2003. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 23: 10756-10764.
 28. Hurst RD, Wells RW, Hurst SM, McGhie TK, Cooney JM, Jensen DJ. 2010. Blueberry fruit polyphenolics suppress oxidative stress-induced skeletal muscle cell damage *in vitro*. *Mol Nutr Food Res* 54: 353-363.
 29. Van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, Van de Lisdonk EH, Rutten GE, Van Weel C. 2005. Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* 18: CD003639.
 30. Phan CW, David P, Naidu M, Wong KH, Sabaratnam V. 2015. Therapeutic potential of culinary-medicinal mushrooms for the management of neurodegenerative diseases: diversity, metabolite, and mechanism. *Crit Rev Biotechnol* 35: 1-14.
 31. Khan MT, Orhan I, Senol FS, Kartal M, Sener B, Dvorská M, Smejkal K, Slapetová T. 2009. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem Biol Interact* 181: 383-389.
 32. Winkler J, Thal LJ, Gage FH, Fisher LJ. 1998. Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. *J Mol Med* 76: 555-567.
 33. Jung M, Tak J, Lee Y, Jung Y. 2007. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) of tacrine derivatives against acetylcholinesterase (AChE) activity using variable selections. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 1082-1090.
 34. Patil SL, Mallaiah SH, Patil RK. 2013. Antioxidative and radioprotective potential of rutin and quercetin in Swiss albino mice exposed to gamma radiation. *J Med Phys* 38: 87-92.
 35. Yang Y, Bai L, Li X, Xiong J, Xu P, Guo C, Xue M. 2014. Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: An evaluation using the blood-brain barrier cell and Caco-2 cell models. *Toxicol In Vitro* 28: 388-396.
 36. Yoo H, Ku SK, Baek YD, Bae JS. 2014. Anti-inflammatory

- effects of rutin on HMGB1-induced inflammatory responses in vitro and in vivo. *Inflamm Res* 63: 197-206.
37. Tongjaroenbuangam W, Ruksee N, Chantiratikul P, Pakdeenarong N, Kongbuntad W, Govitrapong P. 2011. Neuroprotective effects of quercetin, rutin and okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) in dexamethasone-treated mice. *Neurochem Int* 59: 677-685.