

## *Engelhardtia chrysolepis*의 라디칼 소거능 및 신경세포의 산화 스트레스 보호효과

김은정<sup>1</sup> · 이아영<sup>1</sup> · 최수연<sup>1</sup> · 서혜린<sup>1</sup> · 이영아<sup>2</sup> · 조은주<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 식품영양학과 & 노인생활환경연구소, <sup>2</sup>대구가톨릭대학교 식품영양학과

## Radical Scavenging Effect and Neuroprotective Activity from Oxidative Stress of *Engelhardtia chrysolepis* Leaf

Eun Jung Kim<sup>1</sup>, Ah Young Lee<sup>1</sup>, Soo Yeon Choi<sup>1</sup>, Hye Rin Seo<sup>1</sup>, Young A Lee<sup>2</sup> and Eun Ju Cho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition & Research Institute of Ecology for the Elderly,  
Pusan National University, Busan 46241, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 38430, Korea

**Abstract** – In this study, the radical scavenging activity and protective effect of ethanol extract from leaf of *Engelhardtia chrysolepis* HANCE (ECE) against oxidative stress were investigated under *in vitro* and cellular system. ECE showed strong radical scavenging activities in 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, hydroxyl( $\cdot$ OH) and nitric oxide(NO) radical as a concentration-dependent manner. Particularly, strong scavenging activity against the  $\cdot$ OH and NO radical were observed with the IC<sub>50</sub> value of 1.30  $\mu$ g/ml and 12.61  $\mu$ g/ml, respectively. Furthermore, the cellular oxidative stress was induced by amyloid beta(A $\beta_{25-35}$ ) in C6 glial cells. The treatment of A $\beta_{25-35}$  to C6 glial cells generated high levels of reactive oxygen species(ROS) and declined cell viability. However, production of ROS was decreased by the treatment of ECE. In addition, the cell viability was significantly increased at each concentration(10, 25, 50  $\mu$ g/ml) as dose-dependent manner. The Alzheimer's disease-related protein expressions in A $\beta_{25-35}$ -treated C6 glial cells were analyzed. The ECE treatment inhibited expression of amyloid precursor protein(APP), C-terminal fragment- $\beta$ (CTF- $\beta$ ),  $\beta$ -site APP cleaving enzyme(BACE), phosphorylated tau(p-tau) proteins in C6 glial cells induced by A $\beta_{25-35}$ . The present study indicated that ECE has strong radical scavenging activity and neuroprotective effect through attenuating oxidative stress.

**Key words** – *Engelhardtia chrysolepis*, C6 glial cell, Reactive oxygen species, Oxidative stress, Radical scavenging, Amyloid beta<sub>25-35</sub>

인체 내의 산화적 손상을 일으키는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에는 superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl radical( $\cdot$ OH), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)등으로,<sup>1,2)</sup> 인체 내에서 에너지를 생산하기 위한 산화과정으로 생성되며 체내에서 적절한 수준이 유지될 경우 세포 신호 전달, 세포 성장, 세포 분화 등에 이용된다.<sup>3,4)</sup> 생체 기관은 활성산소가 낮은 수준을 유지하도록 생성 및 제거 조절시스템을 가지고 있으나 이 시스템의 불균형으로 인해 활성산소 수준이 증가하게 되면 세포의 돌연변이, 암, 노화, Alzheimer's disease (AD) 등 만성질환의 주요 원인이 된다.<sup>5,6)</sup> ROS 뿐만 아니

라 nitric oxide(NO), nitrogen dioxide(NO<sub>2</sub>), peroxyxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) 등의 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)도 염증 반응 시 과생성되면 아미노산을 변형시키고, 에너지 대사이상, DNA 손상을 초래한다고 보고되었다.<sup>7,8)</sup> 특히, 뇌 신경세포에 있어서 ROS와 RNS에 의한 산화적 손상은 AD와 같은 노인성 신경 퇴행성 질환의 발생 기전과 밀접한 관련이 있는 것으로 제시되었다.<sup>9,10)</sup> 따라서 인체 내에 유발되는 산화적 스트레스에 대한 손상을 개선하는 것이 각종 질병 예방을 위한 방법으로 대두되고 있으며, 이와 관련된 연구도 다양하게 수행되고 있으나, 많은 연구들에 의해 합성 산화방지제의 부작용이 보고되어 유해성이 적고 산화방지 성분이 풍부하게 함유된 천연 항산화 식품에 대한 관심이 증가하고 있다.<sup>11-14)</sup>

\*교신저자(E-mail): ejcho@pusan.ac.kr  
(Tel): +82-51-510-2837

*Engelhardtia chrysolepis* HANCE는 가래나무과에 속하는 식물로 중국 남부와 동아시아 지역에 분포하고 있으며, 그 잎은 해열 및 진통 효과를 가진다고 보고되고 있다.<sup>15-17)</sup> 주로 차의 형태로 음용되어 지고 있는 *E. chrysolepis*의 잎에는 dihydroflavonol인 taxifolin과 그 배당체인 astilbin, 그리고 이성체인 isoastilbin, neoastilbin 등이 포함되어 있으며,<sup>18,19)</sup> 이러한 *E. chrysolepis*에 대한 항산화,<sup>17,20)</sup> 항암,<sup>21)</sup> 그리고 aldose reductase와 sorbitol 생성 억제효과<sup>22)</sup> 등이 보고되고 있으나, 신경세포의 산화적 스트레스에 대한 보호 효과와 작용기전에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 *E. chrysolepis*의 Ethanol(EtOH) 추출물의 free radical 소거능과 C6 glial cell을 이용하여 Amyloid beta ( $A\beta_{25-35}$ )로 유도된 산화적 스트레스에 대한 개선 효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료 추출** - 실험 재료로 사용한 *E. chrysolepis*잎은 Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.(Hirosima, Japan)의 Dr. Nobuaki Ohto와 Kr. Tatsuya Nakahara에 의해 감별 선정하고, 30% EtOH 추출물(이하ECE로 약함)을 제조한 것을 Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.에서 제공받아 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다.

**세포 종류 및 시약** - 실험에 사용한 C6 glial cell은 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 세포 배양을 위한 10%의 fetal bovine serum(FBS)과 100 units/ml penicillin streptomycin, Trypsin EDTA 용액이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM) 배지는 Welgene(Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였고, 산화적 스트레스를 유발하기 위해 사용한  $A\beta_{25-35}$ 와 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide(MTT), DMSO 및 dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)는 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Western blot analysis에 사용된 RIPA buffer, 30% acrylamide bis solution, pre-stained protein size marker, pico EPD western reagent kit는 Elpis Biotech.(Daejeon, Korea), protease inhibitor cocktail I은 Calbino chem.(Novabiochem, La Jolla CA), protein sample buffer는 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA), polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane은 Millipore(Billerica, MA, USA)에서 구매하였으며, primary antibody와 secondary antibody는 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA), Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)와 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

**1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거능 측정** - EtOH에 녹인 각 농도별 시료 100  $\mu$ l와 60  $\mu$ M DPPH 용액

100  $\mu$ l를 96-well plate에 주입하여 실온에 30분간 방치시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>23)</sup> 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 free radical 소거효과를 백분율과  $IC_{50}$ 로 나타내었다.

**Hydroxyl Radical( $\cdot$ OH) 소거능 측정** - Fenton 반응에 따라 10 mM  $FeSO_4 \cdot H_2O$ -EDTA에 10 mM의 2-deoxyribose solution과 농도 별 시료용액을 혼합한 다음, 10 mM의  $H_2O_2$ 를 첨가하여 37°C에서 4시간 배양하였다. 이 혼합액에 2.8% trichloroacetic acid와 1.0% thiobarbituric acid solution을 각각 첨가하여 20분간 boiling한 후 cooling하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>24)</sup>

**Nitric Oxide(NO) 소거능 측정** - 10 mM sodiumnitroprusside solution에 methanol에 녹인 각 농도의 시료를 넣은 후 실온에서 150분간 반응시켰다. 이 반응 혼합액은 griess reagent와 동량으로 96-well plate에 넣어 실온에서 30분간 배양한 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO의 저해활성을 확인하였다.<sup>25)</sup> 저해 활성은 sample의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

**세포 배양** - C6 glial cell은 100 units/ml penicillin-streptomycin과 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5%  $CO_2$  incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 1~2일에 한번씩 배양액을 바꾸어 주고 세포 분화가 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline(PBS)로 세포를 세척 한 후 Trypsin-EDTA 혼합액 2 ml로 부착된 세포를 분리하여 1,000 rpm, 3분간 원심분리로 세포를 모은 후 배지에 넣고 골고루 분산시켜 계대배양 후 사용하였다.

**Cell Viability** - 세포가 confluence 상태가 되면 96-well plate에  $5 \times 10^4$  cell/well로 seeding하여 37°C에서 4시간 동안 배양하여 세포가 부착되면 ECE를 각 농도(10, 25, 50  $\mu$ g/ml)로 처리하여 2시간 배양한 후  $A\beta_{25-35}$ (25  $\mu$ M)를 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후에, 각 well의 배지를 제거하고 5 mg/ml의 MTT를 200  $\mu$ l씩 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 재배양 하였다. 4시간 후 MTT를 제거하고 생성된 formazan 결정을 빛이 차단된 상태에서 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Reactive Oxygen Species(ROS) 측정** - 세포가 confluence 상태가 되면 96-well plate에  $5 \times 10^4$  cell/well로 seeding하여 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 세포가 부착되면 ECE를 각 농도(10, 25, 50  $\mu$ g/ml)로 처리하여 2시간 배양한 후  $A\beta_{25-35}$ (25  $\mu$ M)를 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 20  $\mu$ M의 DCF-DA용액을 각 well에 주입하여 37°C에서 30분간 재배양한 후 FLUOstar OPTIMA(BMG lavtech, Ortenberg, Germany)를 이용하여 excitation 480 nm, emission 535 nm로 측정하였다.<sup>26)</sup>

**Western Blot에 의한 단백질 발현 측정** - 시료를 10% 또는 13% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel

(SDS-PAGE)을 이용하여 80 V에서 전기영동(Power Pac 300, Bio-Rad, CA, USA) 하였다. 전기영동 후 SDS-PAGE는 PVDF membrane에 부착하여 2시간 동안 100 V에서 transfer하였다. 2시간 후 5% skim milk을 이용하여 1시간 blocking 작업 후, blocking된 PVDF membrane은 PBS-T로 3회 세척하였다. 세척한 membrane은 primary antibody를 희석한 용액에 넣고 4°C에서 overnight 반응시킨 후, 부착되지 않은 primary antibody를 PBS-T로 세척한 뒤, secondary antibody를 희석한 용액에 1시간 반응시켰다. 반응 후 PBS-T로 10분간 3회 세척하여 부착되지 않은 secondary antibody를 제거하고 enhanced chemiluminescence 용액을 가하여 발광시켜 Davinch-Chemi™(Davinch-K, Seoul, Korea)에서 단백질을 발현을 촬영하였다. 촬영된 Western blot band 이미지는 Image J software (NIH, Bethesda, MD)를 사용하여 normal군에 대한 상대적 density를 측정하였다.

**통계분석** - 대조군과 시료로부터 얻은 실험 결과들은 평균±표준편차로 나타내었고, 대조군과 실험군의 실험 결과는 ANOVA(analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의수준 0.05에서 유의성을 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**DPPH radical 소거 효과** - DPPH radical 소거능 측정은 분자 내 radical을 가지고 있는 보라색의 화합물이 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자로 환원되어짐에 따라 보라색에서 탈색되어 가는 원리를 이용한 것이다.<sup>27)</sup> 비교적 간단하면서도 대량으로 측정 가능하기 때문에 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 널리 이용되는 방법 중의 하나이다. ECE의 DPPH radical 소거능을 농도별로 살펴본 결과는 Table I과 같으며, 농도의존적으로 우수한 소거능을 보였고, 처리농도 25 µg/ml 이상에서는 80%

**Table I.** DPPH radical scavenging activity of ECE

Treatment (µg/ml)	Scavenging activity (%)	
	ECE	Ascorbic acid (positive control)
5	25.88±0.65 <sup>f</sup>	94.32±1.25 <sup>b</sup>
10	49.01±0.97 <sup>e</sup>	97.41±0.67 <sup>a</sup>
25	84.50±0.89 <sup>d</sup>	98.46±0.36 <sup>a</sup>
50	90.98±0.85 <sup>c</sup>	97.84±0.52 <sup>a</sup>
100	92.22±0.69 <sup>bc</sup>	97.66±0.22 <sup>a</sup>
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	11.30±0.10	5.59±0.05

Values are mean±SD. <sup>a-f</sup>Means with the different letters among same concentrations are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test. ECE; *Engelhardtia chrysolepis* leaf EtOH extract

이상의 높은 소거능을 확인하였다.

**·OH radical 소거 효과** - 생체 내에서 발생하는 ROS 중 에서 산화적 손상에 가장 독성이 강한 ·OH radical은 반응성이 매우 높아 지질 산화, DNA 손상 및 돌연변이를 유발하여 다양한 질환의 발병에 관여한다.<sup>28)</sup> ECE의 ·OH radical 소거능을 살펴본 결과(Table II), 농도 의존적으로 높은 소거능을 보였으며, 10 µg/ml의 낮은 농도에서도 70% 이상의 ·OH radical 소거능을 나타내었다. 25 µg/ml에서는 ascorbic acid보다 높은 활성을 보였으며, ·OH radical 소거 효과를 IC<sub>50</sub>로 살펴본 결과 1.30 µg/ml로 우수한 radical 소거능을 가진 것으로 확인되었다. Xin 등<sup>29)</sup>의 연구에 따르면 *E. chrysolepis*잎으로부터 분리한 flavanonol glycosides 성분을 이용하여 peroxy radical 및 ·OH radical 소거능을 측정 한 결과 우수한 항산화 활성을 가지고 있다고 제시하였으며, 본 연구에서 나타난 radical 소거농도 *E. chrysolepis*에 함유된 flavonoid 성분이 항산화 작용을 한 것으로 예상된다.

**NO 소거 효과** - NO는 O<sub>2</sub>와 반응하여 더 반응성이 크고 독성이 강한 산화제인 ONOO<sup>-</sup>를 생성하여 세포나 조직의 산화적 스트레스를 야기시킨다.<sup>30,31)</sup> ECE의 NO 소거능을

**Table II.** ·OH radical scavenging activity of ECE

Treatment (µg/ml)	Scavenging activity (%)	
	ECE	Ascorbic acid (positive control)
5	61.31±0.09 <sup>i</sup>	65.29±0.31 <sup>h</sup>
10	75.47±0.21 <sup>f</sup>	78.04±0.17 <sup>e</sup>
25	85.53±0.23 <sup>c</sup>	81.85±0.28 <sup>d</sup>
50	87.66±0.21 <sup>b</sup>	81.99±0.11 <sup>d</sup>
100	89.06±0.10 <sup>a</sup>	70.67±0.18 <sup>e</sup>
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	1.30±0.00	5.59±0.05

Values are mean±SD. <sup>a-i</sup>Means with the different letters are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test. ECE; *Engelhardtia chrysolepis* leaf EtOH extract

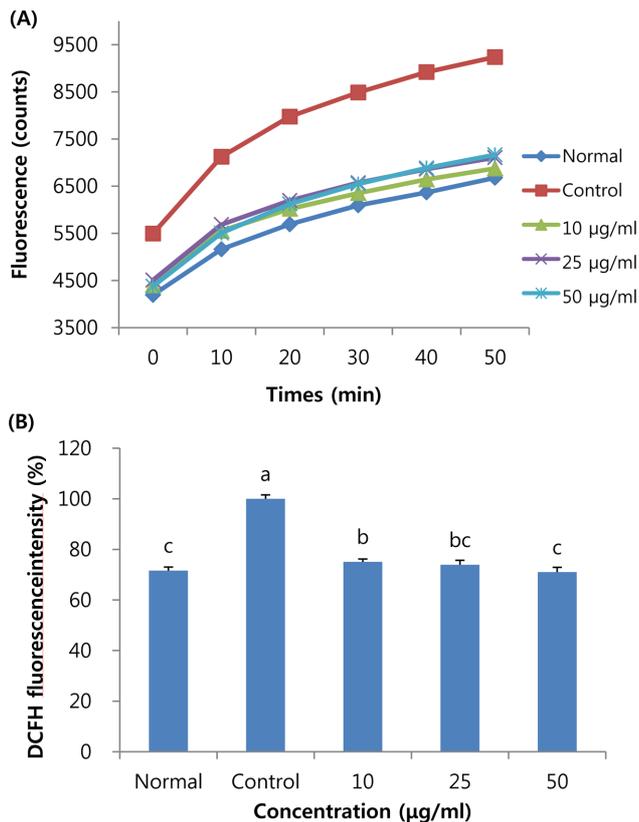
**Table III.** NO scavenging activity of ECE

Treatment (µg/ml)	Scavenging activity (%)	
	ECE	Ascorbic acid (positive control)
5	44.99±1.33 <sup>e</sup>	30.91±1.89 <sup>e</sup>
10	47.92±0.26 <sup>d</sup>	37.31±1.78 <sup>f</sup>
25	53.46±1.35 <sup>c</sup>	54.24±0.23 <sup>c</sup>
50	59.69±0.45 <sup>b</sup>	59.67±1.46 <sup>b</sup>
100	68.13±0.96 <sup>a</sup>	67.44±1.11 <sup>a</sup>
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	12.61±0.31	23.66±0.18

Values are mean±SD. <sup>a-e</sup>Means with the different letters among same concentrations are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test. ECE; *Engelhardtia chrysolepis* leaf EtOH extract

확인해 본 결과(Table III), 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였고, 5, 10 µg/ml의 낮은 농도에서도 ascorbic acid보다 높은 활성을 나타내었으며, 12.61 µg/ml의 IC<sub>50</sub>값을 보여 ECE는 우수한 NO radical 소거 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

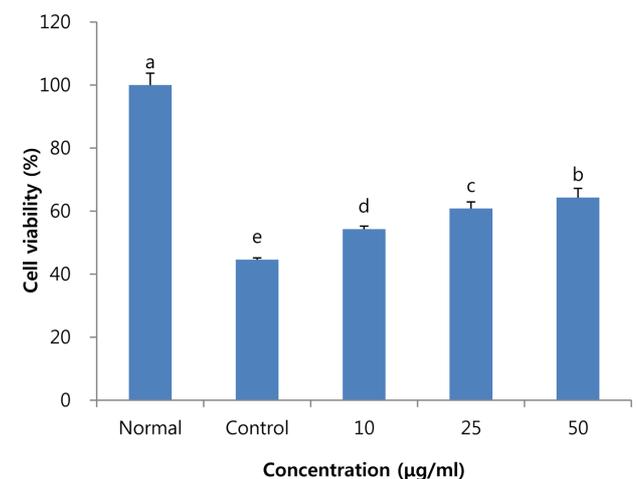
**ROS 생성 억제 효과** – DCF-DA는 세포막을 자유롭게 통과하여 세포 내의 esterase에 의해 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 ROS인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 DCF가 되는 방법<sup>32)</sup> 이용하여 ECE의 세포 내 ROS 생성 억제 효과를 알아보았다. 그 결과, C6 glial cell에서 Aβ<sub>25-35</sub>를 처리하였을 때 시간이 지남에 따라 모든 군에서 ROS 생성량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, ECE처리군에서는 control군에 비해 낮은 증가율을 나타냈다(Fig. 1A). 50분 기준으로 control군을 100%로 하였을 때, ECE를 10, 25, 50 µg/ml 농도로 처리한 군에서 각각 75.08%, 73.89%, 71.00%의 낮은 ROS 생성율을 나타낸 것으로 보아



**Fig. 1.** Effect of ECE on level of ROS in C6 glial cells treated with Aβ<sub>25-35</sub>. (A) Time course of change in intensity of ROS fluorescence with ECE. (B) The production of ROS treated with ECE. Values are mean±SD. <sup>a-c</sup>Means with the different letters among same concentrations are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test. ECE; *Engelhardtia chrysolepis* leaf EtOH extract.

*E. chrysolepis*이 Aβ<sub>25-35</sub>에 의한 ROS생성에 대해 억제 효과가 있는 것으로 사료된다(Fig. 1B).

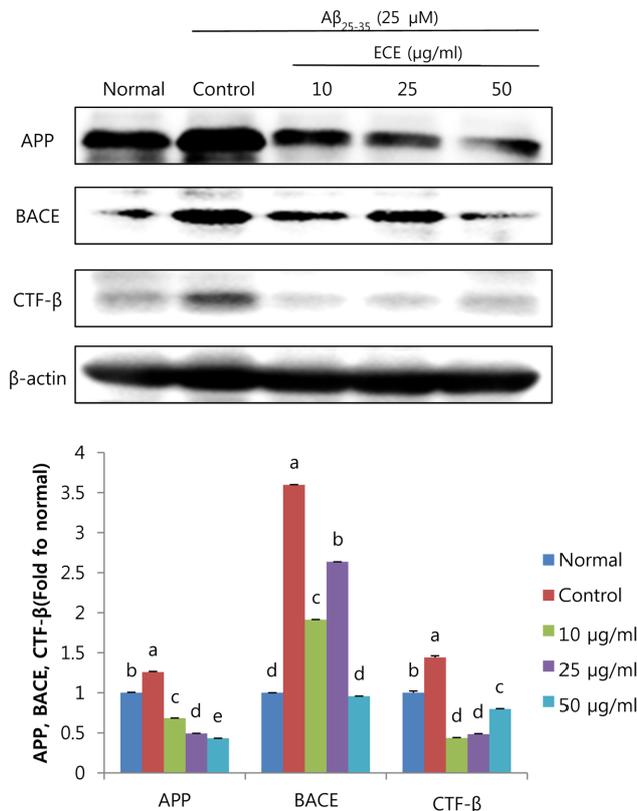
**Aβ<sub>25-35</sub> 처리로 유도된 산화적 스트레스 개선 효과** – Aβ는 제 1형 내재성 막 단백질인 amyloid precursor protein (APP)가 단백질 분해효소인 β-secretase와 γ-secretase로 인해 분해되면서 생성된다. Aβ의 과도한 생성은 독성을 가지고 ROS를 과생성함으로써 인체 내 산화적 손상을 유발하여 세포의 inflammation과 apoptosis를 일으키며, 이는 시냅스의 손상 및 뇌 신경세포 사멸을 유도하여 결국 인지능력의 손상을 가져오고 AD가 유발된다.<sup>33)</sup> Aβ<sub>25-35</sub>로 유도된 산화적 스트레스로부터 C6 glial cell을 보호하는 ECE의 효과를 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하여 측정하였다. Aβ<sub>25-35</sub>를 처리하여 신경세포의 산화적 손상을 유도한 후, ECE를 10, 25, 50 µg/ml 농도로 처리하여 신경세포 보호 효과를 측정한 결과(Fig. 2), normal군의 세포 생존율을 100%라고 했을 때 Aβ<sub>25-35</sub>를 처리한 control군의 경우 44.62%을 나타내어 Aβ<sub>25-35</sub>에 의해 신경세포가 사멸한 것을 알 수 있었다. 그러나 ECE를 처리하였을 때 세포 생존율이 농도의존적으로 증가하였으며, 50 µg/ml의 농도에서 64.30%의 세포생존율을 나타내어 ECE는 신경세포 손상에 대한 보호 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 이전 연구에서 뇌허혈 동물 모델에 *E. chrysolepis*의 total flavone을 투여하였을 때, 뇌 조직에서 superoxide dismutase활성을 증가시키고, malondialdehyde와 NO level을 감소시켜 신경 기능을 향상시킨다고 보고하였으며,<sup>34)</sup> 본 연구에서도 이러한 *E. chrysolepis*의 활성 성분이 뇌 신경 세포 보호에 도움을 주는 것으로 생각된다.



**Fig. 2.** Effect of ECE on viability of C6 glial cells treated with Aβ<sub>25-35</sub>. Values are mean±SD. <sup>a-e</sup>Means with the different letters among same concentrations are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test. ECE; *Engelhardtia chrysolepis* leaf EtOH extract.

**Western Blot에 의한 인지능력 관련 단백질 발현** - 기억능력과 인지능력에 손상을 주는 신경 퇴행성 뇌 질환인 AD의 주요 원인으로는 A $\beta$ 의 응집으로 인한 뇌 세포의 사멸이 나타나는 아밀로이드 증폭가설(Amyloid cascade hypothesis)과 타우 단백질(tau protein)이 과인산화 되면서 신경 섬유용축제(neurofibrillary tangle, NFT)를 생성하는 타우 농축제 가설(tau hypothesis)이 있다. 아밀로이드 증폭 가설은 A $\beta$ 의 전구 단백질인 APP가 amyloidogenic pathway와 non-amyloidogenic pathway 두 대사과정에 의해 조절이 되며 amyloidogenic pathway는 A $\beta$ 가 생성되는 대사과정으로 단백질 분해효소인  $\beta$ -site APP cleaving enzyme(BACE)과  $\gamma$ -secretase로 인하여 APP가 분해되는 것으로 알려져 있다. BACE에 의해 APP가 soluble amyloid precursor protein (sAPP $\beta$ )와 C-terminal fragment- $\beta$ (CTF- $\beta$ )로 분해되면 CTF- $\beta$ 는 다시  $\gamma$ -secretase에 의해 A $\beta$ 와 CTF- $\gamma$ 로 분해된다. 이렇게 생성된 A $\beta$ 는 신경세포 주위에 축적되어 독성을 일으키며 신경세포의 염증과 손상을 촉진시켜 신경세포의 apoptosis를 유도하게 되면서 결국 AD를 유발하게 된다.<sup>35)</sup>

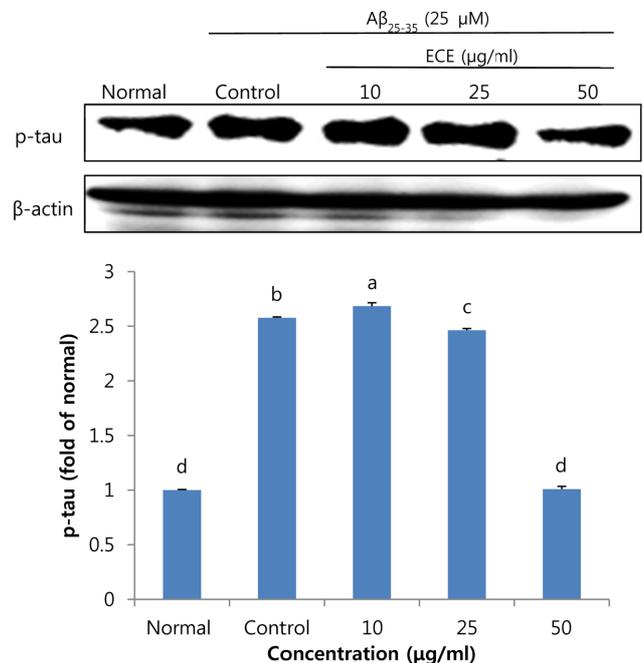
본 실험에서는 western blot을 통해 C6 glial cell에 A $\beta_{25-35}$



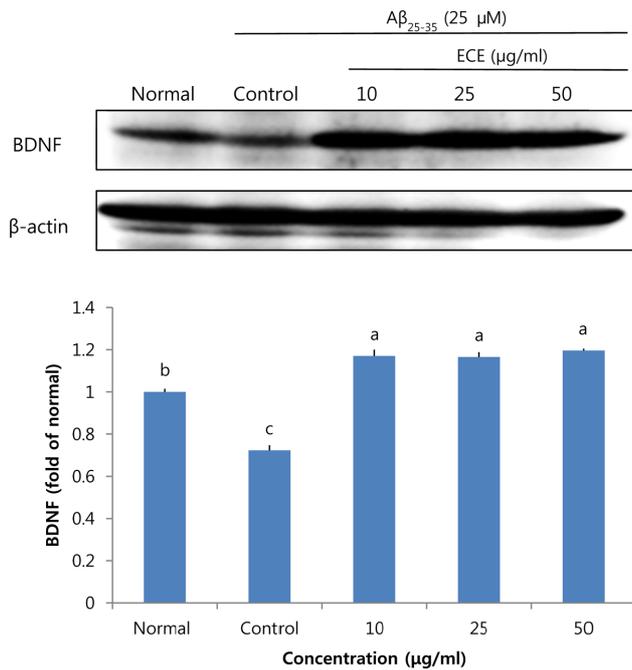
**Fig. 3.** Effect of ECE on APP, CTF- $\beta$  and BACE expression in C6 glial cells treated with A $\beta_{25-35}$ . Values are mean $\pm$ SD. <sup>a-c</sup>Means with the different letters among same concentrations are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. ECE; *Engelhardtia chrysolepis* leaf EtOH extract

를 처리함으로써 APP, BACE, CTF- $\beta$ , brain derived neurotrophic factor(BDNF), p-Tau와 같은 인지능력과 관련된 단백질 인자 발현에 ECE가 미치는 영향을 알아보았다(Fig. 3). 아무것도 처리하지 않은 normal군에 비해 A $\beta_{25-35}$ 만을 처리한 control군에서 APP, BACE, CTF- $\beta$ 와 같은 단백질 인자 발현이 증가된 것을 확인하였다. APP는 ECE를 처리한 25, 50  $\mu$ g/ml 농도에서 control군 보다 발현이 억제된 것을 알 수 있었으며 ECE를 처리한 모든 농도에서 control군과 비교하여 BACE, CTF- $\beta$ 의 발현이 낮게 나타났다. p-tau의 경우 control군에서 많은 양이 과인산화된 것을 확인할 수 있었으나, 10  $\mu$ g/ml를 제외하고 25, 50  $\mu$ g/ml 농도에서는 control군과 비교하여 낮은 발현을 보였다(Fig. 4).

또 다른 AD 관련 인자인 BDNF는 신경독성 인자로부터 신경세포를 보호하고 신경발달, 중추 신경세포의 유지에 핵심적 요소이다.<sup>36)</sup> BDNF가 감소된 형질전환 mouse에서 시냅스 손상, 장기기억력 약화 및 학습 능력 손상이 나타났으며, AD 환자의 경우 BDNF의 전구체 미성숙형 단백질의 발현이 낮게 나타나 기억 손상과 BDNF 발현은 서로 관계가 있는 것으로 나타났다.<sup>37)</sup> Fig. 5에서 BDNF와 단백질 발현을 살펴본 결과, BDNF는 control군에서 가장 낮은 단백질 발현 정도를 나타냈으며, 10, 25, 50  $\mu$ g/ml 농도에서 control군보다 높은 발현양상을 관찰할 수 있었다. 따라서, ECE는 A $\beta$  생성 관련 단백질 발현을 조절함으로써 A $\beta_{25-35}$



**Fig. 4.** Effect of ECE on p-tau expression in C6 glial cells treated with A $\beta_{25-35}$ . Values are mean $\pm$ SD. <sup>a-d</sup>Means with the different letters among same concentrations are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. ECE; *Engelhardtia chrysolepis* leaf EtOH extract.



**Fig. 5.** Effect of ECE on BDNF expression in C6 glial cells treated with  $A\beta_{25-35}$ . Values are mean $\pm$ SD. <sup>a-c</sup>Means with the different letters among same concentrations are significantly different ( $P<0.05$ ) by Duncan's multiple range test. ECE; *Engelhardtia chrysolepis* leaf EtOH extract.

로 유도된 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과를 나타냄을 확인하였다.

## 결론

본 연구에서는 *in vitro*에서 ECE의 radical 소거능과 C6 glial cell을 이용한  $A\beta_{25-35}$ 로 유도된 산화적 스트레스 개선 효과를 살펴보았다. ECE의 DPPH,  $\cdot OH$ , NO radical 소거능을 측정된 결과 농도의존적으로 우수한 소거 활성을 보였으며, 특히  $\cdot OH$ 와 NO radical 소거능 측정 결과에서,  $IC_{50}$  값이 각각 1.30, 12.61  $\mu g/ml$ 을 나타내어 radical 소거활성이 우수함을 확인하였다. 또한,  $A\beta_{25-35}$ 에 의해 산화적 스트레스가 유도된 C6 glial cell에 ECE를 처리하였을 때 ROS 생성은 감소하고 세포 생존율은 증가시킨 것을 알 수 있었다. ECE를 이용한 단백질 발현 분석 결과, AD유발에 관여하는 APP, p-Tau, BACE, CTF- $\beta$  단백질의 발현은 저해시키고, 신경 영양 인자인 BDNF의 발현은 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과에서 *E. chrysolepis*는 radical 소거능과  $A\beta_{25-35}$ 로 유도된 신경세포의 산화적 스트레스에 대한 보호 효과에 뛰어난 것을 확인함으로써, AD와 같은 퇴행성 뇌질환 예방에 도움을 줄 소재로서의 이용 가능성이 있을 것으로 판단된다.

## 사사

본 연구는 Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.의 Dr. Nobuaki Ohto, Dr. Tatsuya Nakahara와 Kyoto University의 Dr. Yukiori Goto로부터 ECE를 제공받아 사용되었으므로 감사를 드립니다. 이 논문은 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. NRF-2014R1A1A3052796).

## 인용문헌

- Lim, D. G. (2004) Oxidative stress; reactive oxygen species and nitric oxide. *Korean J. Crit. Care Med.* **19**: 81-85.
- Bokov, A., Chaundhuri, A. and Richardson, A. (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.* **125**: 811-826.
- Kim, N. S., Shon, M. S. and Hwang, Y. I. (2014) Anti-obese and antioxidant activities of Spica Prunellae extract in 3T3-L1 and HepG2 cells. *Food Eng. Prog.* **18**: 413-418.
- Ricci, J. E., Waterhouse, N. and Green, D. R. (2003) Mitochondrial functions during cell death, a complex (IV) dilemma. *Cell Death Differ.* **10**: 488-492.
- Melov, S. (2000) Mitochondrial oxidative stress: Physiologic consequences and potential for a role in aging. *Ann. NY Acad. Sci.* **908**: 219-225.
- Lushchak, V. I. (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* **224**: 164-175.
- Darley-Usmar, V., Wiseman, H. and Halliwell, B. (1995) Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* **369**: 131-135.
- Patel, R. P., McAndrew J., Sellak, H., White, C. R., Jo, H., Freeman, B. A. and Darley-Usmar, V. M. (1999) Biological aspects of reactive nitrogen species. *BBA-Bioenergetics* **1411**: 385-400.
- Harman, D. (1995) Free radical theory of aging: Alzheimer's disease pathogenesis. *Age* **18**: 97-119.
- Barnham, K. J., Masters, C. L. and Bush, A. I. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**: 205-214.
- Albanes, D., Heinonen, O. P., Taylor, P. R., Virtamo, J., Edwards, B. K., Rautalahti, M., Hartman, A. M., Palmgren, J., Freedman, L. S., Haapakoski, J., Barrett, M. J., Pietinen, P., Malila, N., Tala, E., Liippo, K., Salomaa, E. R., Tangrea, J. A., Teppo, L., Askin, F. B., Taskinen, E., Erozan, Y., Grenwald, P. and Huttunen, J. K. (1996) Alpha-tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: Effects of base-line characteristics and study compliance. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**: 1560-1570.
- Kuhn, M. (2003) Oxygen free radicals and antioxidants. *Am.*

- J. Nutr.* **103**: 58-62.
13. Kim, J. H., Jeong, C. H., Choi, G. N., Kwak, J. H., Choi, S. G. and Heo, H. J. (2009) Antioxidant and neuronal cell protective effects of methanol extract from *Schizandra chinensis* using an *in vitro* system. *Korean J. Food Sci. Technol.* **41**: 712-716.
  14. Kim, H. Y., Hwang, B. R., Wu, T. T. and Cho, E. J. (2012) The protective effect of *Perilla frutescens* from ONOO<sup>-</sup>-induced oxidative stress and antiaging effect under cellular system. *CNU J. Agric. Sci.* **39**: 467-471
  15. Xiao, P. G. (ed) (1993) A pictorial encyclopaedia of Chinese medical herbs (in Japanese). Chuokoron-Sha, Tokyo, **9**: 41.
  16. Kasai, R. (1989) Studies on sweet dihydroflavonol glycosides from leaves of huang-qi (in Japanese). *Tech. J. Food Chem. Chemicals* (Japan) **1**: 69-71.
  17. Haraguchi, H., Mochida, Y., Sakai, S., Masuda, H., Tamura, Y., Mizutani, K., Tanaka, O. and Chou, W. H. (1996) Protection against oxidative damage by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 945-948.
  18. Kasai, R., Hirono, S., Chou, W. H., Tanaka, O. and Chen, F. H. (1988) Sweet dihydroflavonol rhamnoside from leaves of *Engelhardtia chrysolepis*, a Chinese folk medicine, Hung-qi. *Chem. Pharm. Bull.* **36**: 4167-4170.
  19. Kasai, R., Hirono, S., Chou, W. H., Tanaka, O. and Chen F. H. (1991) An additional sweet dihydroflavonol glycoside from leaves of *Engelhardtia chrysolepis*, a Chinese folk medicine, Huang-qi. *Chem. Pharm. Bull.* **39**: 1871-1872.
  20. Igarashi, K., Uchida, Y., Murakami, N., Mizutani, K. and Masuda, H. (1996) Effect of astilbin in tea processed from leaves of *Engelhardtia chrysolepis*, on the serum and liver lipid concentrations and on the erythrocyte and liver anti-oxidative enzyme activities of rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 513-515.
  21. Mizutani, K., Kambara, T., Masuda, H., Tamura, Y., Tanaka, O., Tokuda, H., Nishino, H. and Kozuka, M. (1997) Anti-tumor-promoting activities of dihydroflavonols from Kohki tea, the leaves of *Engelhardtia chrysolepis*. In Ohigashi, H., Osawa, T., Terao, J., Watanabe, S. and Yoshikawa, T. (Ed.), Food factors for cancer prevention. 607-612. Springer Japan. Tokyo.
  22. Haraguchi, H., Ohmi, I., Fukuda, A., Tamura, Y., Mizutani, K., Tanaka, O. and Chou, W. H. (1997) Inhibition of aldose reductase and sorbitol accumulation by astilbin and taxifolin dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 651-654.
  23. Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. and Okuda T. (1989) Effects of the interaction 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.
  24. Chung, S. K., Osawa, T. and Kawakishi, S. (1997) Hydroxy-radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 118-123.
  25. Marcocci, L., Maguire, J. J., Droxylofaix, M. T. and Packer, L. (1994) The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb761. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**: 748-755.
  26. Ma, W. W., Hou, C. C., Zhou, X., Yu, H. L., Xi, Y. D., Ding, J., Zhao, X. and Xiao, R. Genistein alleviates the mitochondria-targeted DNA damage induced by  $\beta$ -amyloid peptides 25-35 in C6 glioma cells. *Neurochem. Res.* **38**: 1315-1323.
  27. 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.
  28. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1991) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**: 501-504.
  29. Xin, W., Huang, H., Yu, L., Shi, H., Sheng, Y., Wang, T. T. Y. and Yu, L. (2012) Three new flavanonol glycosides from leaves of *Engelhardtia roxburghiana*, and their anti-inflammation, antiproliferative and antioxidant properties. *Food Chem.* **132**: 788-798.
  30. Wang, Q., Lee, A. Y., Choi, J. M., Lee, D. G., Kim, H. Y., Lee, S. and Cho, E. J. (2014) *In vitro* radical scavenging effect and neuroprotective activity from oxidative stress of *Petasites japonicas*. *Korean J. Pharmacogn.* **45**: 147-153.
  31. Horakova, K., Sovcikova, A., Seemannova, Z., Syrova, D., Busanyova, K., Drobna, Z. and Ferencik, M. (2001) Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **30**: 650-664.
  32. Cathcart, R., Schwieters, E. and Ames, B. N. (1983) Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal. Biochem.* **134**: 111-116.
  33. Jang, J. and Kim, K. (2006) Model mice in Alzheimer's disease. *Food Sci. Ind.* **39**: 50-55.
  34. Zhao-bin, P. A. N., Fei-chao, L. I., Yue-e, L. I. A. O. and Xiao-song, L. I. N. (2011) Protective effect of total flavone of *Engelhardtia roxburghiana* Folium on experimental cerebral ischemia in rats. *Chin. J. Exp. Tradit. Med. Form.* **17**: 223-226.
  35. Hennigan, A., O'Callaghan, R. M. and Kelly, A. M. (2007) Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochem. Soc. Trans.* **35**: 424-427.
  36. Yamada, K., Mizuno, M. and Nabeshima, T. (2002) Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci.* **70**: 735-744.
  37. Peng, S., Wu, J., Mufson, E. J. and Fahnstock, M. (2005) Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **93**: 1412-1421.
- (2016. 5. 24 접수; 2016. 6. 14 심사; 2016. 7. 11 게재확정)