



Protective effect of *Acer okamotoanum* from oxidative stress in C6 glial cells

Soo Yeon Choi¹ · Ji Hyun Kim¹ · Jaemin Lee² · Sanghyun Lee² · Eun Ju Cho¹

우산고로쇠의 항산화 및 신경세포에서의 산화적 스트레스 개선 효과

최수연¹ · 김지현¹ · 이재민² · 이상현² · 조은주¹

Received: 27 February 2017 / Accepted: 15 May 2017 / Published Online: 30 June 2017
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

Abstract Radical scavenging effect and protective activity against oxidative stress of *Acer okamotoanum* were investigated. *A. okamotoanum* was extracted with methanol (MeOH) and then fractionated with *n*-BuOH, ethyl acetate (EtOAc), methylene chloride and *n*-hexane fractions. The MeOH extract and fractions showed strong 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and superoxide radical scavenging activity. Among the MeOH extract and fractions, the EtOAc fraction showed the strongest radical scavenging activity. In addition, total phenolic and flavonoid contents of EtOAc fraction was higher than other extract and fractions. Furthermore, we investigated the neuroprotective effect of the MeOH extract and fractions from *A. okamotoanum* against oxidative stress under cellular system using C6 glial cell. The C6 glial cells showed a decrease in cell viability and high production of reactive oxygen species (ROS) by the treatment of amyloid beta₂₅₋₃₅ (Aβ₂₅₋₃₅). However, with the treatment of the MeOH extract and fractions, it significantly increased the cell viability and inhibited the overproduction of ROS by Aβ₂₅₋₃₅. In particular, the EtOAc

fraction led to significantly increase the cell viability and decrease the generation of ROS against oxidative stress by Aβ₂₅₋₃₅. The current study indicated that *A. okamotoanum* demonstrated antioxidative and neuroprotective effects. In particular, the EtOAc fraction which attributed a strong protective activity against oxidative stress.

Keywords *Acer okamotoanum* · Amyloid beta · C6 glial cell · Oxidative stress · Reactive oxygen species

서론

생명체는 체내 호흡과정을 통해 생명유지에 필요한 에너지를 얻으며 산소의 일부는 활성산소라는 유독 물질로 전환되어 체내 세포의 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다(Balaban 등, 2005). 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)의 종류로는 일중항산소(¹O₂), superoxide (O₂⁻), hydroxyl radical (·OH)과 과산화수소(H₂O₂) 등이 있으며, 이들은 체내에서 물리적 또는 환경적 요소에 의해 끊임없이 생성되지만 대부분 체내 항산화 방어계에 의해 제거된다(Halliwell과 Gutteridge 1999; Valko 등, 2007). 하지만 ROS는 매우 불안정하고 반응성이 높아 과생성시 산화적 스트레스를 유발하여 체내 여러 물질과 반응하며 세포들을 공격하고 세포와 조직에 비가역적인 손상을 유도하거나 돌연변이, 세포 독성 및 발암 등을 초래하면서 당뇨병, 뇌 질환, 암, 심혈관계 질환 등의 원인 되는 것으로 알려져 있다(Fridovich 1989). 특히 뇌 신경세포는 다른 장기들에 비해 대사를 위한 산소 이용률이 높으나 활성산소에 대한 항산화 효소가 소량 존재하여 신경세포는 ROS에 의한 손상을 쉽게 받으면서 Alzheimer's disease (AD)와 같은 신경퇴행성질환을 유발하는 것으로 알려져 있다(Reynolds 등, 2007; Knott 등, 2008). 따라서, 활성산소에

Sanghyun Lee (✉)
E-mail: slee@cau.ac.kr

Eun Ju Cho (✉)
E-mail: ejcho@pusan.ac.kr

¹Department of Food Science and Nutrition & Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 46241, Republic of Korea

²Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University, Anseong 17546, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

의한 산화적 스트레스가 위험인자로 작용하는 많은 만성퇴행성 질환의 예방 및 치료를 위해, 독성과 부작용이 적은 천연물에서 ROS 제거를 위한 항산화 물질을 찾고자 하는 연구가 많이 이루어지고 있다(Choi 등, 2003; Muthaiyah 등, 2011).

고로쇠나무(*Acer mono*)는 표고 100-1,800 m에 자생하는 단풍 나무과에 속하는 낙엽교목으로 한국, 일본, 중국, 만주 등의 지역에 분포하고 있으며, 고로쇠나무 수액은 이뇨, 변비, 위장병, 통풍, 류마티스 관절염 등에 효험이 있다고 하여 오래 전부터 건강음료 및 민간약으로도 널리 사용되고 있다(Hashi와 Takeshita 1973). 고로쇠나무는 우리나라에서 총 9종의 품종과 변종이 생육하고 있으며, 그 중 우산고로쇠(*Acer okamotoanum*)는 울릉도에서만 자생하고 있는 고유수종으로 2002년 채취가 허용되면서 수액을 이용한 항산화, 항암, 면역 및 고혈압 개선 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Jeong 등, 2009; Yang 등, 2012; An 등, 2013).

본 실험에서 사용된 우산고로쇠는 quercetin, kaempferol, tannin, gallic acid, β -amyrin, cleomiscosin A, cleomiscosin C 등의 활성물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며(Kim 등, 1998; Jin 등, 2007), 지질과산화 저해(Jin 등, 2008), 항암 효과(Qadir 등, 2007), 면역증진(Kim 등, 1998), 피부 미백 효과(Jeong 등, 2010) 및 LDL 산화 억제 효과(Jin 등, 2007) 등의 생리활성을 가지는 것으로 보고되어있다. 하지만 free radical에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 항산화 효과 및 신경세포 보호 효과에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 따라서 본 실험에서는 우산고로쇠의 methanol (MeOH) 추출물과 4가지 유기용매 추출 분획물을 이용하여 항산화 효과를 *in vitro* 라디칼 소거능과 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 통해 알아보았으며, 신경세포인 C6 glial cell을 이용하여 amyloid beta₂₅₋₃₅ (A β ₂₅₋₃₅)에 의해 유도된 산화적 스트레스에서 우산고로쇠의 신경세포 보호 효과를 연구함으로써 우산고로쇠의 우수성과 천연 기능성 물질로서의 가능성에 대해 검토해 보았다.

재료 및 방법

실험 재료 추출 및 분획

실험 재료로 사용한 우산고로쇠(*A. okamotoanum*)는 국립수목원에서 제공받아 사용하였다. 우산고로쇠를 음건하고 분쇄한 후 환류 냉각 장치가 부착된 추출 장치를 이용하여 MeOH로 3회 추출하여 MeOH 추출물을 조제하였다. 추출 후 얻은 우산고로쇠 MeOH 추출물은 물에 현탁하여 극성별 유기용매인 *n*-BuOH (BuOH), ethyl acetate (EtOAc), methylene chloride (MC) 및 *n*-hexane (Hx)으로 다시 표준 분획물을 조제하였다.

시약

In vitro 라디칼 소거능 측정에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)사에서, nitrotriazolium blue chloride (NBT), nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), phenazine methosulfate (PMS)는 Bio Basic (Toronto, Canada)사의 제품을 구입하여 사용하였다. 총 페놀 및 플라보노이드 함량 측정에 사용한 phenol reagent, tannic acid, quercetin, sodium carbonate (Na₂CO₃), sodium nitrite (NaNO₂), sodium

hydroxide (NaOH)는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)사에서 aluminium chloride (AlCl₃)는 Tokyo Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 측정

최종 농도가 5, 25, 50, 100 μ g/mL가 되도록 ethanol에 녹인 각 농도 별 추출물과 4가지 유기용매 추출 분획물 100 μ L와 60 μ M DPPH 용액 100 μ L를 96-well plate에 혼합하여 실온에 30분간 방치시킨 후 540 nm에서 흡광도 측정하였으며, 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료를 첨가한 군을 비교하여 free radical 소거 효과를 백분율(%)과 EC₅₀ (DPPH radical을 50% 소거하는데 필요한 시료의 농도)로 나타내었다(Hatano 등, 1989).

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

(A₀: 대조군의 흡광도 값, A₁: 시료 처리군의 흡광도 값)

Superoxide (O₂⁻) 소거능 측정

O₂⁻ 소거능 실험은 Nishikimi 등의 방법(Nishikimi 등, 1972)으로 진행하였다. 최종 농도가 5, 25, 50, 100 μ g/mL가 되도록 농도 별로 희석한 0.3 mL의 시료와 0.75 mL의 300 μ M NBT, 936 μ M NADH를 혼합한 후, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 첨가하였다. 다음으로 120 μ M PMS를 0.75 mL 첨가하여 5분간 NBT의 소거를 유도한 후 흡광도 560 nm에서 소거능을 측정하였다. O₂⁻ 소거능은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료를 첨가한 군을 비교하여 free radical 소거 효과를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{O}_2^- \text{ radical scavenging activity (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

(A₀: 대조군의 흡광도 값, A₁: 시료 처리군의 흡광도 값)

총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법(Marinova 등, 2005)을 응용하여 측정하였다. 증류수로 희석한 2 mL 시료에 phenol reagent 200 μ L를 가하여 실온에서 5분간 반응시켰다. 이 혼합액에 7% Na₂CO₃ 용액 2 mL을 혼합하여 실온에서 90분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였고, 페놀 함량은 표준물질 tannic acid를 이용하여 검량선을 작성한 뒤 정량하여 tannic acid equivalent 페놀 함량으로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Gorinstein 등의 방법(Gorinstein 등, 2007)을 응용하여 실험하였다. 400 μ L의 증류수에 희석한 시료 용액에 5%의 NaNO₂ 30 μ L를 가하여 6분간 반응시킨 후 10% AlCl₃를 가하여 6분간 실온에서 반응시켰다. 이 혼합용액에 1 M NaOH 400 μ L를 첨가하여 15분간 방치 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 표준물질 quercetin을 이용하여 검량선을 작성한 후 정량하여 quercetin equivalent 플라보노이드 함량으로 나타내었다.

세포 종류 및 시약

본 실험에 사용된 C6 glial cell은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였으며 배양을 위한 Dulbecco's modified

eagle medium (DMEM)배지, fetalbovine serum (FBS)과 100 units/mL penicillin streptomycin, trypsin EDTA 용액은 Welgene (Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 세포 생존율과 ROS 생성을 측정을 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO)와 2'7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였다. 산화적 스트레스를 유도시키기 위해 사용한 Aβ₂₅₋₃₅는 Sigma사에서 구입하였으며, 3차 멸균수를 이용하여 1 mM의 농도로 stock solution을 제조하여 37 °C incubator에서 72시간 배양 후, 실험에 사용하였다.

세포 배양

C6 glial cell은 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포가 T75-flask에서 80% 이상 세포 증식이 진행된 상태에서 phosphate buffered saline (pH 7.4)로 세척을 진행한 후 trypsin-EDTA 혼합액 2 mL를 이용하여 부착된 세포를 분리한 후 1,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 세포를 모아 배지에 넣고 골고루 분산되도록 혼합한 후 계대배양하여 사용하였다.

Cell viability 측정

세포가 flask에서 confluence 상태가 되면 96-well plate에 5×10⁴ cells/well로 seeding하여 세포를 부착시키기 위해 37 °C에서 4시간 배양한 후, MeOH 추출물과 Hx 분획물은 최종농도가 0.05, 0.25, 0.5, 1 µg/mL가 되도록 처리하였고, BuOH, EtOAc, MC 분획물은 최종농도가 5, 25, 50, 100 µg/mL가 되도록 처리하여 2시간 배양하였다. 실험에 사용된 각 시료의 처리농도는 사전 연구를 통해 독성이 없는 농도 범위로 정하였다. Aβ₂₅₋₃₅ (25 µM)를 처리하여 24시간 배양 후, 각 well에 5 mg/

mL의 MTT 200 µL씩을 주입하여 37 °C에서 4시간 재배양하였다. 4시간 후 MTT를 제거하고 DMSO 200 µL을 각 well에 주입하여 생성된 formazan 결정을 30분간 빛이 차단된 상태에서 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Mosmann 1983).

Reactive oxygen species (ROS) 측정

세포가 flask에서 confluence 상태가 되면 5×10⁴ cell/mL로 96-well black plate에 seeding하여 37 °C에서 4시간 배양하였다. 배양 후 세포가 부착되면 시료를 각 농도 별로 2시간 처리한 후 산화적 스트레스 유발을 위한 Aβ₂₅₋₃₅ (25 µM)를 첨가하여 24시간 배양하였다. 20 µM의 DCF-DA용액 200 µL를 각 well에 주입하여 30분간 배양 후 FLUO star OPTIMA (BMG labtech, Ortenberg, Germany) excitation-480 nm, emission-535 nm를 이용하여 ROS 생성량을 측정하였다(Ma 등, 2013).

통계 분석

대조군과 각 시료의 실험 결과들은 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 각 실험 결과로부터 ANOVA (analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple test (p < 0.05)를 이용하여 각 군의 평균 값들에 대한 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

우산고로쇠 MeOH 추출물과 4가지 유기용매 추출 분획물을 이용하여 산화적 스트레스에 대한 항산화 및 신경세포 보호 효과를 측정해 보았다. DPPH는 비교적 안전한 radical을 가지는 물질로 항산화능이 있는 물질에게 전자를 내어주면서 고유의 자색이 탈색되는 원리로, 이 실험 방법은 비교적 안정적이고 간편하며 신뢰성이 높은 장점을 가지고 있어 항산화능 측정에 널

Table 1 DPPH scavenging activity of the extract and fractions from *A. okamotoanum*

Treatment (µg/mL)	Scavenging activity (%)				
	MeOH ext.	BuOH fr.	EtOAc fr.	MC fr.	Hx fr.
5	46.59 ± 0.27 ^b	30.18 ± 0.50 ^c	82.32 ± 0.26 ^a	25.13 ± 0.56 ^d	1.63 ± 0.57 ^e
25	83.56 ± 0.29 ^a	80.69 ± 0.36 ^b	85.32 ± 0.25 ^a	74.15 ± 0.67 ^c	22.31 ± 0.57 ^d
50	86.34 ± 0.49 ^b	87.07 ± 0.36 ^b	89.04 ± 0.06 ^a	82.90 ± 0.37 ^c	41.14 ± 0.26 ^d
100	88.73 ± 0.29 ^b	89.66 ± 0.33 ^b	92.29 ± 0.25 ^a	86.90 ± 0.37 ^c	70.85 ± 0.61 ^d
EC ₅₀ ¹⁾ (µg/mL)	5.73 ± 0.04	10.90 ± 0.07	4.47 ± 0.03	13.43 ± 0.12	54.83 ± 0.40

Values are mean ± SD (n=4). ^{a-e}Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test. MeOH ext.: methanol extract, BuOH fr.: n-BuOH fraction, EtOAc fr.: ethyl acetate fraction, MC fr.: methylene chloride fraction, Hx fr.: n-hexane fraction. ¹⁾EC₅₀ is the concentration of sample required for scavenging radical by 50%

Table 2 Superoxide anion scavenging activity of the extract and fractions from *A. okamotoanum*

Treatment (µg/mL)	Scavenging activity (%)				
	MeOH ext.	BuOH fr.	EtOAc fr.	MC fr.	Hx fr.
5	31.85 ± 1.55 ^b	25.35 ± 0.80 ^c	39.65 ± 0.64 ^a	20.23 ± 0.73 ^d	20.23 ± 0.73 ^d
25	34.41 ± 0.85 ^d	28.63 ± 1.68 ^c	43.35 ± 1.24 ^c	45.35 ± 1.58 ^b	48.14 ± 0.56 ^a
50	40.41 ± 0.70 ^d	34.62 ± 1.12 ^c	65.87 ± 0.74 ^a	48.14 ± 0.47 ^c	53.25 ± 1.56 ^b
100	55.34 ± 0.59 ^c	50.56 ± 1.30 ^d	84.60 ± 0.62 ^a	54.52 ± 1.67 ^c	60.13 ± 0.93 ^b

Values are mean ± SD (n=4). ^{a-e}Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test. MeOH ext.: methanol extract, BuOH fr.: n-BuOH fraction, EtOAc fr.: ethyl acetate fraction, MC fr.: methylene chloride fraction, Hx fr.: n-hexane fraction

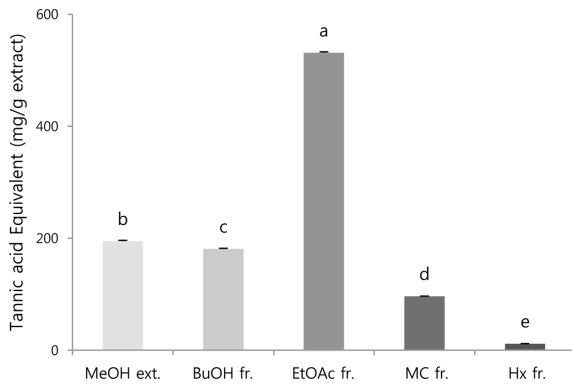


Fig. 1 Total phenolic contents of the extract and fractions from *A. okamotoanum*. Values are mean \pm SD ($n=4$). ^{a-e}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. MeOH ext.: methanol extract, BuOH fr.: *n*-BuOH fraction, EtOAc fr.: ethyl acetate fraction, MC fr.: methylene chloride fraction, Hx fr.: *n*-hexane fraction

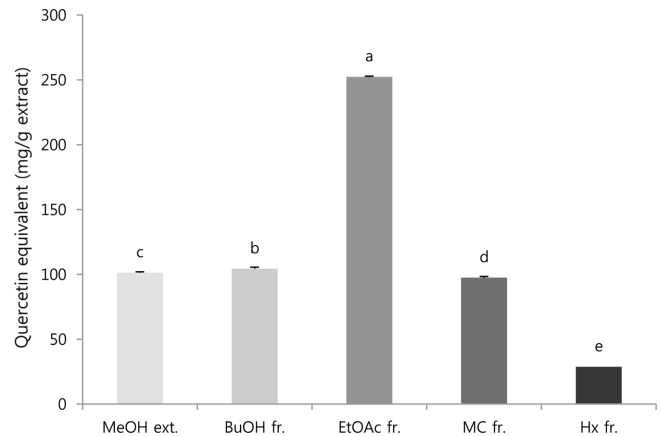


Fig. 2 Total flavonoid contents of the extract and fractions from *A. okamotoanum*. Values are mean \pm SD ($n=4$). ^{a-e}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. MeOH ext.: methanol extract, BuOH fr.: *n*-BuOH fraction, EtOAc fr.: ethyl acetate fraction, MC fr.: methylene chloride fraction, Hx fr.: *n*-hexane fraction

리 이용되고 있다(Choi 등, 2003). 우산고로쇠 MeOH 추출물 및 4가지 유기용매 추출 분획물의 각 농도 별 DPPH 소거능을 살펴본 결과, MeOH 추출물 및 4가지 유기용매 추출 분획물은 우수한 DPPH 소거능을 나타내었으며 Hx 분획물을 제외한 나머지 MeOH 추출물과 분획물은 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 80% 이상의 DPPH radical 소거 효과를 보여 우산고로쇠의 DPPH 소거능이 매우 우수한 것을 확인 할 수 있었다(Table 1). 특히 EtOAc 분획물은 5 $\mu\text{g/mL}$ 에서도 80% 이상의 높은 소거능을 보였으며 4.47 $\mu\text{g/mL}$ 의 EC_{50} 값을 나타내어 가장 우수한 DPPH 소거능을 가지는 것으로 나타났다.

항산화 효소인 peroxidase와 catalase에 의해 분해되는 O_2^- 는 무해한 물 분자와 산소 분자로 전환된다. 그러나 외부의 자극에 의해 체내 항산화 방어체계의 균형이 깨지게 되면 O_2^- 는 과도하게 생성되면서 생체 내 세포에 유해한 작용을 할 뿐만 아니라 조직의 산화 및 노화를 촉진시키게 된다(Chung과 Jeon 2011). 본 실험에서 O_2^- 의 소거능을 측정된 결과, 모든 MeOH 추출물과 4가지 유기용매 추출 분획물에서 O_2^- 소거능을 보였으며, 특히 EtOAc 분획물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 80% 이상의 소거능을 나타내어 우산고로쇠 MeOH 추출물과 4가지 유기용매 추출 분획물 중 가장 높은 O_2^- 소거 효과를 가지는 것으로 확인하였다(Table 2).

자연계에 널리 분포하고 있는 대표적인 항산화 성분인 페놀은 phenolic hydroxyl기를 가지는 2차 대사산물로 다양한 구조 및 분자량을 가지고 있으며 항암, 항염증 및 항알레르기 작용 뿐 아니라 항산화 효과도 뛰어나 free radical에 의해 유발되는 다양한 질병의 예방 및 치료에 효과를 가지며 특히 식물에 함유된 페놀은 항산화 활성이 뛰어난 것으로 알려져 있다(Duthie and Crozier 2000; Kim 등, 2005; Ferreres 등, 2009). 본 연구에서 총 페놀 함량을 tannic acid를 표준물질로 하여 실험을 진행하였다. Tannic acid equivalent 페놀 함량을 살펴본 결과, MeOH 추출물은 192.10 mg/g extract, BuOH 분획물은 182.12 mg/g extract, EtOAc 분획물은 532.63 mg/g extract, MC 분획물은 96.22 mg/g extract, Hx 분획물은 11.68 mg/g extract으로 나타나 우산고로쇠 MeOH 추출물과 분획물 중 EtOAc 분획물

이 가장 높은 페놀 함량을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 1).

폴리페놀 성분인 플라보노이드는 대부분 자연계에 분포하고 있으며 채소류, 식물류, 곡물류와 과일류 등에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Hetog 등, 1993). 플라보노이드는 ROS를 효과적으로 제거 할 뿐만 아니라 ROS의 전구체를 제거함으로써 ROS 생성을 막아 뛰어난 항산화 효과를 가지는 것으로 알려져 있다. 또한 항염증, 항바이러스 및 항암 효과도 뛰어난 것으로 보고되고 있다(Kim 등, 2012). 따라서 플라보노이드 함량 측정은 항산화 효능을 알아보는 데 밀접한 관련이 있어 항산화 기능성을 미리 예측해 볼 수 있다. 본 실험에서 우산고로쇠 MeOH 추출물과 4가지 유기용매 추출 분획물의 플라보노이드 함량 측정은 quercetin을 기준물질로 하여 측정하였다. MeOH 추출물은 101.29 mg/g extract, BuOH 분획물은 104.29 mg/g extract, EtOAc 분획물은 252.33 mg/g extract, MC 분획물은 96.20 mg/g extract 과 Hx 분획물은 8.75 mg/g extract 이 함유된 것으로 나타나 EtOAc 분획물이 플라보노이드의 함량이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과로부터 EtOAc 분획물이 *in vitro*에서 라디칼 소거능이 가장 우수한 것은 높은 페놀 및 플라보노이드 함량에 의한 것으로 사료된다.

AD의 대표적인 원인은 42개의 아미노산으로 이루어져 있는 $\text{A}\beta$ 의 생성으로, 생성된 $\text{A}\beta$ 는 신경세포 주위에 축적되면서 노인반(senile plaque)을 형성하는 것으로 알려져 있다(Yankner 1996). 노인반의 주요성분인 $\text{A}\beta_{25-35}$ 는 강한 독성을 가지고 있으며 ROS의 과생성을 유도함으로써 산화적 스트레스를 일으켜 신경세포의 염증과 사멸을 통해 AD를 유발하게 되는 것으로 알려져 있다(Selkoe 1996; Behl 1999; Jang 등, 2011). 이전의 연구결과에서 *in vitro*에서 배양된 신경세포에 $\text{A}\beta$ 를 처리하였을 때 독성을 일으키며 신경세포 사멸이 일어나는 기전이 AD 환자의 뇌에서도 유사하게 일어나는 것으로 보고되었다(Mattson 등, 1988; Rike 등, 1997). 따라서, $\text{A}\beta$ 에 의해 유발된 신경세포의 산화적 스트레스에 대한 보호 효과를 가진 천연물에 대한 연구가 많은 관심을 끌고 있다. 본 연구에서는 신경교세포인 C6

Table 3 Effect of the extract and fractions from *A. okamotoanum* on viability of C6 glial cells treated with Aβ₂₅₋₃₅

Treatment (µg/mL)	Cell viability (%)				
	MeOH ext.*	BuOH fr.	EtOAc fr.	MC fr.	Hx fr.*
5	67.42 ± 1.50 ^c	66.86 ± 1.72 ^c	89.91 ± 0.36 ^a	71.78 ± 1.27 ^b	70.31 ± 1.97 ^b
25	70.78 ± 1.90 ^c	70.30 ± 1.63 ^c	98.51 ± 1.51 ^a	78.71 ± 1.30 ^b	69.83 ± 1.85 ^c
50	69.53 ± 1.90 ^d	82.64 ± 0.76 ^b	80.00 ± 1.59 ^c	86.48 ± 1.43 ^a	69.35 ± 1.86 ^d
100	69.21 ± 1.71 ^d	100.12 ± 0.95 ^a	75.46 ± 1.35 ^c	94.35 ± 1.87 ^b	65.13 ± 0.99 ^e
Control	51.11 ± 1.17				
Normal	100.00 ± 1.74				

Values are mean ± SD (n=4). ^{a-e}Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test. *MeOH ext. and Hx fr. were tested at 100 times lower concentrations than other fractions. MeOH ext.: methanol extract, BuOH fr.: n-BuOH fraction, EtOAc fr.: ethyl acetate fraction, MC fr.: methylene chloride fraction, Hx fr.: n-hexane fraction

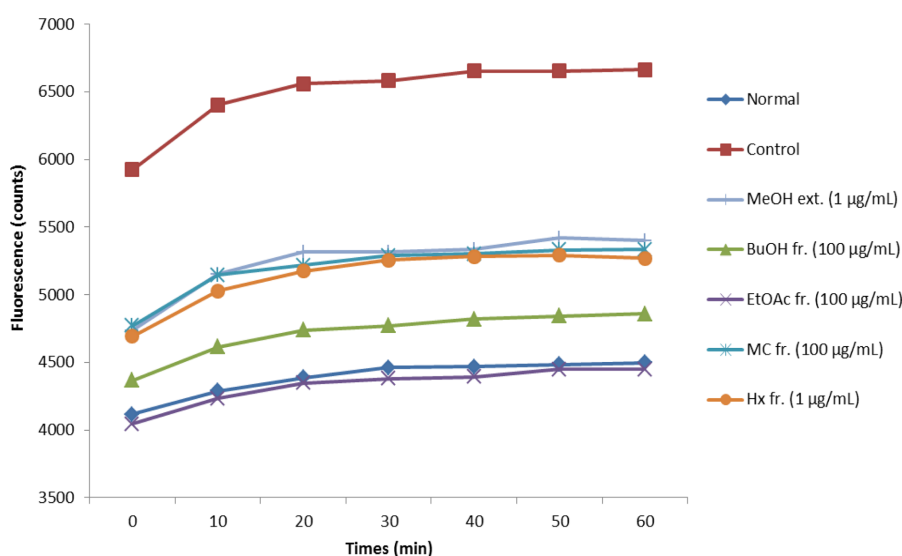


Fig. 3 Effect of the extract and fractions from *A. okamotoanum* on level of ROS in C6 glial cells treated with Aβ₂₅₋₃₅ during 60 min. Values are mean ± SD (n=4). MeOH ext.: methanol extract, BuOH fr.: n-BuOH fraction, EtOAc fr.: ethyl acetate fraction, MC fr.: methylene chloride fraction, Hx fr.: n-hexane fraction

glial cell에 Aβ₂₅₋₃₅를 처리하여 유도된 산화적 스트레스에 대한 우산고로쇠의 신경세포 보호 효과를 알아보았다. 본 실험에서 C6 glial cell에 Aβ₂₅₋₃₅를 처리하여 산화적 스트레스를 통한 세포사멸을 유도한 결과, 정상군의 생존율을 100%로 보았을 때, Aβ₂₅₋₃₅만을 처리한 control군은 51.11%로 산화적 스트레스에 의해 세포 생존율이 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 우산고로쇠 MeOH 추출물 및 4가지 유기용매 추출 분획물을 농도 별로 처리한 군에서는 control군에 비해 높은 세포 생존율을 나타내었다. 특히 100 µg/mL의 MC와 BuOH 분획물 처리군에서 94.34와 100.11%의 세포 생존율을 나타내어 정상군과 유사한 생존율을 보였으며, EtOAc 분획물 처리군에서는 25 µg/mL 농도에서 98.51%의 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 따라서 Aβ₂₅₋₃₅로 인한 독성과 산화적 스트레스에 대해 우산고로쇠가 우수한 보호 효과가 있는 것으로 나타났다(Table 3).

ROS는 체내 정상세포 내 대사과정이나 외부 요소에 의해 생성되는 산소의 환원 대사물로 대부분 불안정한 상태로 전자를 잃거나 얻으며 안정된 상태가 되려는 특성을 가지고 있다. 이러한 특성은 생체 내 DNA와 세포막에서 산화적 스트레스를 일

으켜 손상을 유발하며 각종 질병과 염증과 노화의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(Aniya과 Naito 1993; Beckman과 Ames 1998). DCF-DA는 세포 내에서 ROS를 측정하는 대표적인 물질로 세포막을 자유롭게 통과할 수 있으며 esterase에 의해 acetate group이 제거되면 비형광성 DCFH로 탈아세틸화된다. 탈아세틸화된 DCFH는 H₂O₂와 같은 ROS에 의해 산화되면서 강한 형광성을 가지는 DCF가 되는 원리를 이용하여 우산고로쇠 MeOH 추출물과 4가지 유기용매 추출 분획물의 세포 내 ROS 억제 효과를 C6 glial cell을 이용하여 알아보았다. C6 glial cell에 Aβ₂₅₋₃₅를 처리하였을 때 모든 군에서 시간이 지남에 따라 ROS 생성율이 증가하는 것으로 나타나 산화적 스트레스가 유발된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 60분을 기준으로 control군을 100%로 하였을 때 우산고로쇠 MeOH 추출물과 4가지 유기용매 추출 분획물을 각 농도 별로 처리한 결과, 모든 군에서 control군에 비해 낮은 ROS 생성을 나타내었다. 특히 EtOAc 분획물 처리군의 100 µg/mL 농도에서는 66.75%로 normal군의 67.48%보다 낮은 생성율을 보임으로써 가장 높은 ROS 생성 저해능을 가지는 것을 확인할 수 있었다(Table 4).

Table 4 Effect of the extract and fractions from *A. okamotoanum* on level of ROS in C6 glial cells treated with A β_{25-35} for 60 min

Treatment ($\mu\text{g/mL}$)	ROS production (%)				
	MeOH ext.*	BuOH fr.	EtOAc fr.	MC fr.	Hx fr.*
5	77.82 \pm 4.79 ^b	76.47 \pm 1.55 ^c	78.63 \pm 1.04 ^{bc}	88.22 \pm 0.59 ^a	80.14 \pm 3.48 ^{bc}
25	81.78 \pm 0.98 ^a	76.95 \pm 3.61 ^c	76.89 \pm 0.42 ^c	81.01 \pm 1.33 ^b	82.11 \pm 4.96 ^a
50	80.12 \pm 3.36 ^a	74.30 \pm 2.39 ^b	73.87 \pm 3.28 ^b	80.69 \pm 1.03 ^a	81.20 \pm 3.13 ^a
100	81.04 \pm 3.23 ^a	73.06 \pm 1.96 ^d	66.75 \pm 2.29 ^e	78.91 \pm 2.14 ^c	79.09 \pm 3.16 ^b
Control			100.00 \pm 2.76		
Normal			67.48 \pm 1.89		

Values are mean \pm SD ($n=4$). ^{a-e}Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test. *MeOH ext. and Hx fr. were tested at 100 times lower concentrations than other fractions. MeOH ext.: methanol extract, BuOH fr.: *n*-BuOH fraction, EtOAc fr.: ethyl acetate fraction, MC fr.: methylene chloride fraction, Hx fr.: *n*-hexane fraction

따라서 우산고로쇠의 MeOH 추출물과 4가지 유기용매 추출 분획물은 A β_{25-35} 에 의해 유도된 ROS 생성을 억제시킴으로써 신경세포 보호 효과가 있는 것으로 나타났다.

초 록

본 연구에서는 우산고로쇠(*Acer okamotoanum*) methanol (MeOH) 추출물과 *n*-BuOH, ethyl acetate (EtOAc), methylene chloride 및 *n*-hexane의 4종 분획물을 이용하여 free radical 소거능과 총 페놀, 플라보노이드 함량을 통한 항산화 효과를 측정하였으며, 신경교세포인 C6 glial cell을 이용하여 amyloid beta₂₅₋₃₅ (A β_{25-35})에 의해 유도된 산화적 스트레스에서 신경세포 보호 효과에 대해 알아보았다. 그 결과 우산고로쇠 MeOH 추출물과 4가지 유기용매 추출 분획물은 우수한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 소거능을 나타내었으며, 특히 EtOAc 분획물은 4.47 $\mu\text{g/mL}$ 의 EC₅₀ 값을 나타내 가장 우수한 소거능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. Superoxide radical 소거능에서도 MeOH 추출물과 분획물은 높은 소거능을 보였으며, EtOAc 분획물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 84.60%로 가장 높은 소거능을 나타내었다. 총 페놀과 플라보노이드 함량에서도 EtOAc 분획물은 다른 추출물과 분획물에 비해 월등히 높은 함량을 가지는 것으로 확인되었다. 또한 A β_{25-35} 에 의해 유발된 산화적 스트레스에서 우산고로쇠 MeOH 추출물과 4가지 유기용매 추출 분획물은 세포 생존율을 증가시켰으며, reactive oxygen species 생성을 감소시키는 것으로 확인되었고 EtOAc 분획물이 가장 뛰어난 효과를 나타내었다. 본 연구 결과를 통해 우산고로쇠 MeOH 추출물과 4가지 유기용매 추출 분획물, 특히 EtOAc 분획물은 우수한 항산화 효과와 산화적 스트레스의 개선 효과를 가져 신경세포 보호에 효과가 있는 것으로 확인되었다.

Keywords 산화적 스트레스 · 우산고로쇠 · 활성산소종 · Amyloid beta · C6 glial cell

감사의 글 이 논문은 2015년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임(2015R1D1A1A101058868).

References

- An BS, Kang JH, Yang H, Yang MP, Jeung EB (2013) Effects of *Acer okamotoanum* sap on the function of polymorphonuclear neutrophilic leukocytes *in vitro* and *in vivo*. *Mol Med Rep* 7: 654–658
- Aniya Y, Naito A (1993) Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochem Pharmacol* 45: 37–42
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120: 483–495
- Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78: 547–581
- Behl C (1999) Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog Neurobiol* 57: 301–323
- Choi CH, Song ES, Kim JS, Kang MH (2003) Antioxidative activities of *Castanea crenata* Flos. methanol extracts. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1216–1220
- Chung JH, Jeon IS (2011) Antioxidative activities of methanol extracts from different parts of *Chrysanthemum zawadskii*. *J Food Pre* 18: 739–745
- Duthie G, Crozier A (2000) Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3: 447–451
- Ferrerres F, Gomes D, Valentao P, Goncalves R, Pio R, Chagas EA, Seabra RM, Andrade PB (2009) Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: variation of phenolics and antioxidative potential. *Food Chem* 114: 1019–1027
- Fridovich I (1989) Superoxide dismutase an adaption to paramagnetic gas. *J Biol Chem* 264: 7761–7762
- Gorinstein S, Medina Vargas OJ, Jaramillo NO, Salas LA, Ayala ALM, Arancibia-Avila P (2007) The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *Eur Food Res Technol* 225: 321–328
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, New York
- Hashi M, Takeshita T (1973) Hypocholesterolemic effect of wood hemicelluloses on cholesterol-fed rats. *Jap Wood Res Soc J* 19: 101–103
- Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T (1989) Effects of the interaction of tannins with co-existing substances: Effects of tannins and VI related poly phenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull* 37: 2016–2021
- Hetog MGL, Hollman PCH, Van de Putte B (1993) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juice. *J Agr Food Chem* 41: 1242–1246
- Jang CH, Jung MW, Jung IM (2001) Enzymes for beta amyloid generation

- and their therapeutic applications for Alzheimer's disease. *KBRI* 1: 45–52
- Jeong MH, Kim SS, Ha JH, Jin L, Lee HJ, Kang HY, Park SJ, Lee HY (2009) Enhancement of anticancer activity of *Acer mono* by high pressure extraction process. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1243–1252
- Jeong MH, Kim SS, Kim JS, Lee HJ, Chio GP, Lee HY (2010) Skim whitening and skin immune activities of different parts of *Acer mono* and *Acer okamotoanum*. *J Korean For Soc* 99: 470–478
- Jin L, Han JG, Ha JH, Jeong HS, Kwon MC, Jeong MH, Lee HJ, Kang HY, Choi DH, Lee HY (2008) Comparison of antioxidant and glutathione *S*-transferase activities of extracts from *Acer mono* and *A. okamotoanum*. *Korean J Medicinal Crop Sci* 16:427–433
- Jin WY, Thuong PT, Su ND, Min BS, Son KH, Sok DE, Bae KH (2007) Antioxidant activity of cleomiscosins A and C isolated from *Acer okamotoanum*. *Arch Pharm Res* 30: 275–281
- Kim EJ, Choi JY, Yu M, Kim MY, Lee S, Lee BH (2012) Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 44: 337–342
- Kim HJ, Woo ER, Shin CG, Park H (1998) A New Flavonol glycoside gallate ester from *Acer okamotoanum* and its inhibitory activity against human immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) Integrase. *J Nat Prod* 61: 145–148
- Kim NM, Lee JW, Do JH, Park CK, Yang JW (2005) Effects of the fermentation periods on the qualities and functionality of the vegetable fermented broth. *Korean J Med Crop Sci* 13: 293–299
- Knott AB, Perkins G, Schwarzendacher R, Bossy-Wetzell E (2008) Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 9: 505–518
- Ma WW, Hou CC, Zhou X, Yu HL, Xi YD, Ding J, Zhao X, Xiao R (2013) Genistein alleviates the mitochondria-targeted DNA damage induced by β -amyloid peptides₂₅₋₃₅ in C6 glioma cells. *Neurochem Res* 38: 1315–1323
- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M (2005) Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *UCTM* 40: 255–260
- Mattson MP, Partin J, Begley JG (1988) Amyloid beta peptide induces apoptosis-related events in synapses and dendrites. *Brain Res* 807: 167–176
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65: 55–63
- Muthaiyah B, Essa MM, Chauhan V, Chauhan A (2011) Protective effects of walnut extract against amyloid beta peptide-induced cell death and oxidative stress in PC12 cells. *Neurochem Res* 36: 2096–2103
- Nishikimi M, Rao NA, Yagi K (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 46: 849–854
- Qadir SA, Kim CH, Kwon MC, Lee HJ, Kang HY, Choi DH, Lee HY (2007) Comparison of Anticancer and immuno-modulatory activities in the different parts of the *Acer mono* Max. and *Acer okamotoanum*. *Korean J Medicinal Crop Sci* 15: 405–410
- Reynolds A, Lauriea C, Mosleya LR, Gendelmana EH (2007) Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol* 82: 297–325
- Rike CJ, Ramezan-Arab N, Cotman CW (1997) β -Amyloid neurotoxicity in vitro: evidence of oxidative stress but not protection by antioxidants. *J Neurochem* 69: 1601–1611
- Selkoe DJ (1996) Amyloid β protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271: 18295–18298
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell B* 39: 44–84
- Yang H, Hwang I, Koo TH, Ahn HJ, Kim S, Park MJ, Choi WS, Kang HY, Choi IG, Choi KC, Jeung EB (2012) Beneficial effects of *Acer okamotoanum* sap on L-NAME-induced hypertension-like symptoms in a rat model. *Mol Med Rep* 5: 427–431
- Yankner BA (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16: 921–932