

The Protective Effect of *Lonicerae flos* Extract on Cultured C6 Glioma Cells Damaged by Aluminum of Dementia Inducer

Jai-Yun Jung¹, In-Ju Jung², Seung-Joo Jekal³

¹Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Sanbon Hospital, Wonkwang University College of Medicine, Gunpo, Korea

²Department of Cosmetology, Dongshin University, Naju, Korea

³Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan, Korea

치매유발제인 알루미늄으로 손상된 배양 C6 Glioma 세포에 대한 금은화 추출물의 보호 효과

정재윤¹, 정인주², 제갈승주³

¹원광대학교 의과대학 산본병원 마취통증의학과, ²동신대학교 뷰티미용학과, ³원광보건대학교 임상병리학과

This study was performed to evaluate the cytotoxicity of aluminum chloride (AlCl₃), and the protective effect of *Lonicerae flos* (LF) extract on AlCl₃-induced cytotoxicity in the cultured C6 glioma cells. Here, the cell viability and antioxidative effects, such as DPPH-radical scavenging activity, superoxide anion scavenging activity, and lipid peroxidation (LP), were assessed. AlCl₃ significantly decreased the cell viability in a dose-dependent manner; the XTT₅₀ value was measured at 128.8 μM of AlCl₃. The cytotoxicity of AlCl₃ was determined as highly toxic the y Borenfreund and Puerner's toxic criteria. The butylated hydroxytoluene (BHT) and antioxidant both significantly increased the cell viability, which was damaged by AlCl₃-induced cytotoxicity in these cultures. In the protective effect of LF extract on AlCl₃-induced cytotoxicity, the LF extract significantly increased the superoxide anion scavenging activity and inhibitory activity of LP, as well as the DPPH-radical scavenging activity. From these results, it is suggested that the oxidative stress may have been involved in the cytotoxicity of AlCl₃, and LP extract effectively protected AlCl₃-induced cytotoxicity through the antioxidative effects. Conclusively, the natural resources, like LP extract, may be a putative therapeutic agent for the treatment of dementia induced by allergen like aluminum correlated with the oxidative stress.

Key words: Aluminum, Dementia, Cytotoxicity, Antioxidative effect

Corresponding author: Seung-Joo Jekal
Department of Clinical Laboratory Science,
Wonkwang Health Science University, 514
Iksan-daero, Iksan 54538, Korea
Tel: 82-63-840-1215
Fax: 82-63-840-1219
E-mail: sjjei@wu.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2017 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: July 31, 2017
Revised 1st: August 13, 2017
Revised 2nd: August 23, 2017
Revised 3rd: August 28, 2017
Accepted: August 28, 2017

서론

치매(dementia)는 혈관손상에 의한 혈관성 치매(vascular dementia, VD)와 연령증가에 따른 노인성 치매인 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD)으로 구분된다[1]. 최근 대부분 선

진국에서는 급속한 노인인구의 증가로 인하여 고령화 시대로 접어들면서 AD가 사회적 문제로 관심의 대상이 되었다. AD의 발병에는 많은 요인들이 관여하고 있는데 예를 들면, 염색체에 의한 유전적 요인을 비롯하여 신경전달물질, 신경영양인자 및 유해중금속류 등 다양한 인자들이 작용하고 있다[2]. 처음으로

발견된 알츠하이머병에서 관련유전자는 21번 염색체에 존재하는 β -amyloid precursor protein (β APP)으로 밝혀졌으며[3], 이 밖에도 apoprotein E (APOE)나 presenilin (PS) 역시 AD의 발병 가능성을 높여 준다고 알려져 있다[4]. 특히, PS의 돌연변이와 β -amyloid protein (β A)의 침적에 의한 노인반(senile plaque) 형성과 신경원섬유의 변화(neurofibrillary tangle, NFT)에 따른 신경세포의 파괴가 AD 발병을 유발한다고 알려져 있다[5]. 또 하나의 원인으로 뇌조직의 가교역할을 하는 미세아교세포(microglia)나 별아교세포(astrocyte)가 염증전구물질인 interleukin (IL)- 1β 나 tumor necrosis factor (TNF)- α 와 같은 사이토카인을 과도히 생성한 결과라고 제시된 바 있다[6]. 현재 AD의 치료에 주로 아세틸콜린 보충요법이 많은 효과를 나타내고 있으나 그 밖에도 카테콜아민이나 감마아미노부틸산과 같은 여러 신경전달물질이 증가할 수 있는 약제 개발도 우선적으로 요구되고 있다[1].

최근, AD의 요인의 하나로 자유라디칼설(free radical theory)이 제시된 바 있다. 인체 내의 생체반응 과정에서 세포 내 사립체(mitochondria)의 전자전달계에 의해서 약간의 슈퍼옥사이드(superoxide)나 히드록실라디칼(hydroxylradical)과 같은 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 생성되지만 이들은 항산화계에 속하는 superoxide dismutase (SOD)나 catalase와 같은 항산화 효소에 의하여 분해되어 소실되어지는데 만약 그렇지 않고 뇌에 과량이 축적될 경우 뇌조직에 손상을 초래하여 AD 발병을 유발한다고 한다[7]. 따라서, AD를 비롯한 파킨슨병 및 근위축성 측삭경화증(ALS)과 같은 난치성 뇌질환의 병인의 하나로 산화적 손상(oxidative stress)이 제시되고 있으며, 이를 근거로 항산화 측면에서 뇌질환에 대한 치료적 방법을 찾기 위한 노력이 시도되고 있다[8].

AD 유발물질로 알려진 알루미늄은 중금속의 일종으로 대기나 토양오염에 의한 먼지나 음용수를 통하여 인체내에 들어오게 되는데, 특히 이는 혈관-뇌장벽(blood-brain barrier, BBB)을 쉽게 통과함으로써 뇌조직에 축적되어 AD와 같은 뇌병변을 유발한다고 알려져 있다[9]. 최근 알루미늄을 비롯한 카드뮴이나 수은과 같은 몇몇 중금속들은 이들의 붕괴 시 자유라디칼을 생성한다고 알려짐으로써 이들의 독성이 산화적 손상과 관련성이 있음이 제시되었다. 따라서, 이들의 독성에 대한 방어를 항산화 측면에서 접근하려는 연구가 이루어지고 있다[10].

한약재를 비롯한 많은 식물에는 항산화제를 비롯한 항염, 항독 및 항균에 유효한 각종 생리활성물질이 다량 함유되어 있다고 밝혀지고 있다. 예를 들면, 카로티노이드를 비롯한 페놀화합물 및 이소플라빈과 같은 다양한 성분들이 각종 식물의 잎이나 줄

기, 뿌리 및 꽃과 같은 부위에 많이 들어 있다고 알려져 있다 [11].

식물 중 금은화(*Lonicerae flos*, LF)는 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 반상록수의 활엽수인 인동덩굴(*Lonicera japonica*)의 건조 꽃봉오리로서 꽃은 6~7월경에 개화하는데 이 때 꽃봉오리를 채취하여 그늘이나 햇빛에 말려 건조 후 약제로 사용한다[4]. 인동덩굴은 우리나라 전국에 분포하고 있는데 주로 산비탈의 덩굴속에 서식하고 있으며, 맛은 달고 성은 냉하여 오래전부터 관절염을 비롯한 중독, 임파선염 및 인후염의 치료에 사용하여 왔었다[12]. 금은화의 성분으로는 saponin을 비롯하여 luteolin, tannin, triterpenoid glycoside, loniceran과 같은 다양한 물질들이 함유되어 있으며, 페놀화합물 또는 플라보노이드 계통인 luteolin이나 tannin 성분이나 saponin 같은 성분들은 항산화제를 비롯한 항염이나 항균작용이 강하다고 알려져 있다[11]. 금은화의 효능은 시험관 내에서는 물론 생체에서도 동물을 대상으로 피부염과 같은 질환에 대해 일부 이루어지고 있으나[4], 치매에 대한 연구는 매우 드물다. 그러나 시험관 내에서의 연구와 함께 동물을 대상으로 한 실험에서도 금은화가 기억력과 학습회복에 효과가 있다는 것이 제시되고 있다[13]. 근래에 세포배양기법이 빠르게 발전되면서 독성물질의 독성정도를 비롯하여 신약제의 효능분석 및 안전성 검정과 같은 다양한 분석도구로 활용되고 있다[14]. 본 연구는 치매유발제인 염화알루미늄($AlCl_3$)의 세포독성을 산화적 손상 측면에서 조사하였으며, 동시에, $AlCl_3$ 에 대한 금은화 추출물의 영향을 항산화 측면에서 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포주

본 실험에 사용한 대뇌신경세포인 C6 glioma 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양 받아 사용하였다.

2. 약제 제조

본 실험에 사용한 시약으로 aluminum chloride ($AlCl_3$)를 비롯한 trypsin, phosphate buffer (pH 7.5), xanthine, butylated hydroxytoluene (BHT), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), dimethylsulfoxide (DMSO), linoleic acid, ammonium thiocyanate, ferrous chloride, methanol, hydrogen peroxide (H_2O_2) 및 XTT는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. $AlCl_3$ 의 제조는 fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)이

없는 minimum essential medium (MEM, Gibco, USA)을 사용하여 각각 10 μM, 50 μM, 150 μM 및 300 μM의 저장액을 만들어 사용하였다. XTT (2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide, disodium salt)는 phosphate buffered saline (PBS)을 이용하여 50 ug/mL의 저장액을 만든 후 냉암소에 보관한 다음 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3. 금은화(LF) 추출

전북 익산시 야산에서 5~6월경 인동덩굴로부터 금은화를 채취한 후 시에 위치하고 있는 원광대학교 부설 생명자원과학연구소에서 동정 확인하였다. 추출은 Han 등[15]의 방법에 따라 채취하여 보관중인 건조 꽃봉오리 39.6 g을 잘게 파쇄한 다음 시료의 3배 정도의 물과 함께 1,000 mL의 환저플라스크에 넣고 3시간 동안 가열하였다. 위의 과정을 4회 반복 추출하여 여과한 다음 3,000 rpm에서 30분 동안 원침시켰다. 원침 후 진공 농축기에서 농축감압시킨 다음 2.1 g의 시료를 얻었으며, 이 때 수율은 5.3%로 나타났다. 금은화의 화학적 성분 분석은 Accela high-speed LC system (Thermo Scientific, MA, USA)에 의한 표준물질(macranthoidins A, B, dipsacoside, B, sweroside, luteolin-7-O-D-glucoside)의 UHPLC-QQQ-MS 분석방법 결과는 Table 1과 같다[16].

4. 세포 배양

C6 glioma 세포의 배양은 Park 등[17]의 방법에 따라 배양용기에 부착된 세포를 0.025% trypsin을 사용하여 분리하였다. 분리된 세포들은 원침 후 10% FBS가 함유된 MEM 배양액에 넣고 1×10⁵ cells/well이 되도록 조절한 후 96-well 배양용기에 분배하였다. 분배된 세포들은 36°C, 5%CO₂로 조절된 항온기 내에서 72시간 동안 배양하였다.

Table 1. Chemical constituents of *Lonicerae flos*

Components	Content (mg)
Iridoids	
Sweroside	0.245
Flavonoids	
Luteolin-7-O-D-glucoside	0.173
Triterpenoids (Saponin)	
Macranthoidin B	1.06
Macranthoidin A	3.78
Dipsacoside B	40.96

5. 치매유발제(AlCl₃) 처리

배양중인 C6 glioma 세포에 AlCl₃가 120~160 μM 농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 48시간 동안 배양한 후 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다.

6. BHT의 항산화능 측정

BHT의 항산화능을 조사하기 위하여 활성산소의 일종인 H₂O₂ 15 μM를 배양 세포를 처리하기 2시간 전에 BHT가 10~50 μM 농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 처리한 다음 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다.

7. AlCl₃에 대한 BHT의 영향

XTT₅₀ 농도의 AlCl₃를 배양세포에 처리하기 2시간 전에 BHT가 30 μM과 50 μM로 각각포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

8. 금은화(LF) 추출물 처리

AlCl₃에 대한 LF 추출물의 영향을 조사하기 위하여 배양 C6 glioma 세포에 AlCl₃ XTT₅₀ 농도를 처리하기 2시간 전에 80 μg/mL와 100 μg/mL의 LF 추출물이 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 이의 영향을 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

9. 세포생존율 분석

세포생존율의 분석은 Mosmann [18]의 방법에 따라 행하였다. 즉, 배양 세포에 약제나 시료추출물을 농도별로 처리한 다음 실험 당일 제조한 XTT (50 μg/mL)를 well당 20 μL씩 넣고 36°C로 조절된 항온기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 dimethylsulfoxide (DMSO)를 넣어 실온에서 정치한 다음 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. XTT₅₀값의 산출은 회귀직선식에 의하여 산정하였다.

10. DPPH-라디칼 소거능 측정

DPPH-라디칼 소거능(DPPH-radical scavenging activity)의 측정은 Blois [19]의 방법에 따라, 메탄올시료에 0.3 mM DPPH 메탄올용액 100 μL를 첨가하여 실온에서 30분간 처리하였다. 처리 완료 후 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거능은 시료첨가군과 시료무첨가군간의 차이를

시료무침가군에 의한 백분율로 나타냈다. 또한 BHT의 활성을 양성대조군으로 사용하였다.

11. Superoxide anion-radical (SAR) 제거능 측정

SAR 제거능 측정은 nitroblue tetrazolium (NBT)의 환원방법에 따라, 시료용액 0.1 mL와 0.4 mL potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 0.4 mM xanthine과 NBT를 가하여 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시켜 생성된 SAR 양을 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 제거능의 측정은 시료침가군과 무침가군의 차이에 의한 백분율로 표시하였다. 또한 BHT의 활성을 양성대조군으로 사용하였다.

12. 지질과산화(lipid peroxidation, LP) 측정

LP 측정은 Kikuzaki와 Nakatani [20]의 방법에 따라, 2.52% linoleic acid와 0.05 M PBS (pH7.0) 용액 12.1 mL에 에탄올과 시료 3.9 mL 혼합액을 첨가한 후 24시간 동안 40°C에서 배양하였다. 배양 완료 후 에탄올과 30% ammonium thiocyanate와 0.02 M ferrous chloride를 0.1 mL를 넣은 후 실온에서 3분 동안 반응시켰다. 반응 후 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 BHT의 활성을 양성대조군으로 사용하였다.

13. 통계 처리

실험결과는 SPSS/WIN 18.0을 이용하여 군간의 차이를 비교하기 위하여 ANOVA를 시행하였고 사후 분석은 Tukey's post-hoc test에 의하였으며, 모든 통계의 유의수준은 $p < .05$ 에서 채택하였다.

Table 2. The cytotoxicity of aluminum chloride (AlCl₃) on cultured C6 glioma cells by XTT assay

Incubation	XTT assay (450 nm)	
	Mean±S.D.	(% of control)
Concentration of AlCl ₃ (μM)		
Control	0.412±0.028	100
120	0.232±0.021	56.3***
140	0.173±0.022	42.0***
160	0.135±0.021	32.8***

Cultured C6 glioma cells were treated with 120, 140 and 160 μM of AlCl₃ for 48 hours. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. *** $p < 0.001$.

결 과

1. 염화알루미늄(AlCl₃)의 독성 측정

AlCl₃의 독성을 조사하기 위하여 배양 C6 glioma 세포에 AlCl₃ 120~160 μM 농도 각각을 48시간 동안 처리한 결과, 처리 농도에 비례하여 AlCl₃는 세포생존율을 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰으므로 독성을 나타냈다($p < 0.001$). 이 과정에서 XTT₅₀ 값은 128.8 μM의 처리에서 나타났다(Table 2).

2. BHT의 항산화능 측정

BHT의 항산화능을 조사하기 위하여 자유라디칼인 15 μM의 H₂O₂를 배양 세포에 처리하기 전에 BHT가 각각 10~50 μM로 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리 하였다. 그 결과, 10 μM의 H₂O₂만을 처리한 경우 대조군에 비하여 세포생존율이 41.1% (0.097±0.021)로 나타난 반면, 10 μM과 30 μM의 BHT의 처리에서는 각각 53.4% (0.126±0.016)와 75.4% (0.178±0.013)로 나타났다. 또한, 50 μM 농도의 BHT의 처리에서는 83.0% (0.198±0.030)나 이는 모두 H₂O₂의 처리에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다($p < 0.001$) (Table 3).

3. AlCl₃에 대한 BHT의 영향

AlCl₃의 세포독성에 대한 항산화제인 BHT의 영향을 알아보기 위하여 AlCl₃, XTT₅₀ 농도를 배양 세포에 처리하기 전에 BHT가 각각 30 μM과 50 μM로 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리 하였다. 그 결과, XTT₅₀ 농도의 AlCl₃만의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 42.9% (0.079±0.015)로 나타난 것에 비하여 30 μM과 50 μM의 BHT의 처리에서는 각각 63.6% (0.117±0.022)와 79.3% (0.146±0.012)로 나타나 이는 AlCl₃의 처리에 비하여 모두 유의한 세포생존율을 나타냈다($p < 0.001$) (Table 4).

Table 3. The antioxidative effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the hydrogen peroxide (H₂O₂) in cultured C6 glioma cells

Incubation	XTT assay (450 nm)	
	Mean±S.D.	(% of control)
Concentration of BHT (μM)		
Control	0.236±0.018	100
15 H ₂ O ₂	0.097±0.021	41.1
10	0.126±0.016	53.4***
30	0.178±0.013	75.4***
50	0.198±0.030	83.0***

Cultured C6 glioma cells were pretreated with 10, 30 and 50 μM of BHT for 2 hours. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from H₂O₂-treated group. *** $p < 0.001$.

4. AlCl₃의 세포독성에 대한 금은화(LF) 추출물의 영향

LF 추출물이 AlCl₃의 세포독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양 세포에 XTT₅₀농도의 AlCl₃를 처리하기 전에 80 µg/mL와 100 µg/mL의 LF 추출물을 각각 처리한 결과, AlCl₃만의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 36.2% (0.059±0.014)로 나타났는데 비하여 80 µg/mL 추출물 처리에서는 78.5% (0.128±0.018)로 나타났으며, 또한 100 µg/mL 추출물 처리에서는 88.3% (0.144±0.018)로 나타나 이는 모두 AlCl₃만의 처리에 비하여 유의한 증가를 보였다(*p*<0.001) (Table 5).

5. DPPH-라디칼 소거능 측정

DPPH-라디칼 소거능을 측정하기 위하여 80 µg/mL와 100 µg/mL 농도의 LF 추출물 시료를 분석한 결과 80 µg/mL 농도 처리에서는 소거능이 32.6%로 나타났으며, 100 µg/mL의 처리에서는 47.5%로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 소거능의 증가를 나타냈다(*p*<0.001). 특히, 100 µg/mL LF 추출물의 소거능은 양성대조군으로 사용한 50 µM BHT 소거능인

Table 4. The effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the cytotoxicity induced by aluminum chloride (AlCl₃) in cultured C6 glioma cells

Incubation Concentration of BHT (µM)	XTT assay (450 nm)	
	Mean±S.D.	(% of control)
Control	0.184±0.024	100
AlCl ₃ (XTT ₅₀)	0.079±0.015	42.9
30	0.117±0.022	63.6***
50	0.146±0.012	79.3***

Cultured C6 glioma cells were pretreated with 30 and 50 µM of BHT for 2 hours. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from AlCl₃-treated group. ****p*<0.001.

Table 5. The protective effect of *Lonicerae flos* (LF) extract on aluminum chloride (AlCl₃)-induced cytotoxicity in cultured C6 glioma cells

Incubation Concentration of LF (µg/mL)	XTT assay (450 nm)	
	Mean±S.D.	(% of control)
Control	0.163±0.013	100
AlCl ₃ (XTT ₅₀)	0.059±0.014	36.2
80	0.128±0.018	78.5***
100	0.144±0.018	88.3***

Cultured C6 glioma cells were pretreated with 80 and 100 µg/mL of LF extract for 2 hours. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the AlCl₃-treated group. ****p*<0.001.

79.8%값의 60%에 근접한 것으로 나타났다(Table 6).

6. Superoxide anion-radica (SAR) 제거능 측정

LF 추출물에 대한 SAR-소거능 측정을 위하여 80 µg/mL와 100 µg/mL의 농도의 추출물 시료를 각각 분석한 결과 80 µg/mL 추출물의 처리에서는 제거능이 21.2%로 나타났으며, 100 µg/mL의 처리에서는 35.8%로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 제거능의 증가를 나타냈다(*p*<0.001). 특히, 100 µg/mL의 LF 추출물의 제거능은 양성대조군으로 사용한 50 µM BHT 활성인 75.2%값의 40% 이상인 것으로 나타났다 (Table 7).

7. 지질과산화(LP) 측정

AlCl₃에 대한 LF 추출물이 LP에 미치는 영향을 조사하기 위하여 AlCl₃ XTT₅₀농도를 배양 세포에 처리하기 전에 80 µg/mL와 100 µg/mL의 LF 추출물을 처리한 결과, LF 추출물 80 µg/mL의 처리에서는 LP가 81.4%로 나타났다. 또한, 100 µg/mL의 처리에서는 62.7%로 나타났다. 따라서 LF 추출물의 LP 억제능은 추출물 80 µg/mL와 100 µg/mL의 처리에서 각각

Table 6. The DPPH-radical scavenging activity of *Lonicerae flos* (LF) extract determined at a wavelength of 517 nm

Concentration of LF extract (µg/mL)	DPPH-radical scavenging activity (517 nm)
	% of control
50 µM BHT	79.8****
80	32.6***
100	47.5***

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. BHT was used as positive control. ****p*<0.001.

Table 7. The superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity of *Lonicerae flos* (LF) extract determined at a wavelength of 560 nm

Concentration of LF extract (µg/mL)	SAR scavenging activity (560 nm)
	% of control
50 µM BHT	75.2****
80	21.2***
100	35.8***

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. BHT was used as positive control. ****p*<0.001.

Table 8. The lipid peroxidation (LP) of *Lonicerae flos* (LF) extract determined at wavelength 500 nm

Concentration of LF extract ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Lipid peroxidation (500 nm)
	% of control
Control	100
50M BHT	73.3***
80	18.6***
100	37.3***

The data indicate the mean \pm SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. BHT was used as positive control.

*** $p < 0.001$.

18.6%와 37.3%로 나타남으로서 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 LP 억제능을 보였다($p < 0.001$). 특히 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LF 추출물 처리에서는 양성대조군인 BHT의 LP 억제능값인 73.3%의 50% 이상의 억제능을 보였다(Table 8).

고찰

치매는 기억력 감퇴와 인지기능의 상실로 인한 학습 및 정상적인 생활적 영위가 어려운 뇌질환으로서 이의 원인물질중의 하나로 알루미늄이 알려져 있으며 이는 또한 산화적 손상과도 밀접한 관련이 있다고 제시된 바 있다[2]. 본 연구에서는 치매유발제인 염화알루미늄(AlCl_3)의 세포독성을 조사하기 위하여 대뇌신경교세포의 일종인 C6 glioma 세포에 120~160 μM 의 AlCl_3 농도를 각각 처리한 결과 농도 의존적으로 세포생존율이 유의하게 감소되었으며 이 때 XTT_{50} 값이 128.8 μM 에서 나타났다. 따라서, AlCl_3 는 배양 C6 glioma 세포에 세포독성을 나타냈으며 이는 Borenfreund와 Puerner [21]의 독성판정기준에 따라 중간독성(mid-toxic)인 것으로 나타났다. 이들은 약제의 독성을 XTT_{50} 값이 100 μM 이하인 경우는 고독성으로, 100~1,000 μM 이면 중간독성(mid-toxic)으로 각각 판정하였다. 본 연구 결과는 Verstraeten 등[22]이 알루미늄의 뇌독성을 보고한 연구 결과나, 또한 Kim 등[2]이 배양 신경교종세포에 대한 AlCl_3 의 신경독성에 대한 연구보고와 일치하였다. 이같이 AlCl_3 가 배양 C6 glioma 세포에 독성을 보인 것은 AlCl_3 가 신경전달물질에 손상을 주어 신경연접간 원활한 자극전달을 방해함으로써 세포 손상을 초래하였거나[23], 또는 세포내 신경원섬유의 타우단백질의 인산화를 초래하여 세포손상에 영향을 주었을 가능성이 도제할 수는 없지만[24], 그 보다는 AlCl_3 가 자유라디칼의 생성을 유발함으로써 산화적 손상으로 인한 세포독성을 나타냈을 가능성이 클 것으로 생각된다[2]. 따라서 본 연구에서는

AlCl_3 의 세포독성과 산화적 손상간의 상호 관련성을 조사하였다. 이를 위하여 먼저 항산화제의 일종인 BHT의 라디칼 제거능을 조사하기 위하여 자유라디칼의 일종인 20 μM H_2O_2 를 배양 세포에 처리하기 전에 10~50 μM BHT 각각의 농도를 배양 세포에 전처리한 결과 H_2O_2 의 처리에 비하여 모두 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다. 본 실험의 결과에서 BHT의 처리가 H_2O_2 의 처리에 비하여 세포생존율이 유의하게 증가된 것은 BHT가 자유라디칼을 제거할 수 있는 항산화능을 가지고 있음을 증명하고 있다. 본 연구 결과는 Kim과 Jekal [14]이 자유라디칼에 대한 BHT의 소거능을 보고한 연구 결과와도 일치함을 알 수 있었다. 한편, AlCl_3 와 산화적 손상간의 관련성을 알아보기 위하여 XTT_{50} 농도의 AlCl_3 를 배양 세포에 처리하기 전에 30과 50 μM 의 BHT를 각각 전처리한 결과 모두 AlCl_3 의 처리에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 보였다. 본 실험 결과는 BHT가 AlCl_3 의 세포독성을 방어한 것을 말해주고 있으며 이는 다시 말해 AlCl_3 의 세포독성에 산화적 손상이 관여하고 있음을 제시하고 있다. 또한, 본 실험 결과는 Kim 등[2]이 AlCl_3 에 대한 항산화제인 vitamin E의 독성방어 효과에 대한 연구 보고와 서로 상통함을 알 수 있었다.

AlCl_3 에 대한 금은화(LF) 추출물의 영향 조사에 있어서, XTT_{50} 농도의 AlCl_3 를 배양 세포에 처리하기 전에 80과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 추출물을 각각 전처리한 결과 AlCl_3 의 처리에 비하여 모두 유의한 세포생존율의 증가를 보였다. 본 연구결과는 LF 추출물이 AlCl_3 의 독성을 방어한 것으로서 Kim 등[25]이 LF 추출물이 AlCl_3 와 같은 중금속류인 크롬의 독성을 방어하였다는 연구 보고와 일치하였다. 이 같은 결과는 LF 추출물속에 함유된 tannin이나 luteolin, saponin과 같은 성분들이 AlCl_3 의 산화적 손상을 방어한 결과라고 생각되며, 그 이유의 하나로 플라보노이드 계통인 luteolin이나 페놀화합물의 일종인 tannin 및 saponin 등의 성분들은 강력한 항산화 성분들로 알려져 있기 때문이다[26]. 따라서 본 연구에서는 LF 추출물 시료에 대한 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH-라디칼 소거능을 비롯하여 superoxide anion-radical (SAR) 제거능 및 지질과산화(LP) 억제능을 조사하였다.

DPPH-라디칼 소거능 조사에서, 80과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 추출물에서 대조군에 비하여 각각 32.6%와 47.5%로 나타나 모두 유의한 라디칼 소거능을 보였다. 본 실험 결과는 LF 추출물이 자유라디칼 소거능이 있음을 말해 주고 있으며, 이 같은 항산화 효과는 LF 추출물 성분 중 항산화능이 강한 플라보노이드 또는 페놀화합물의 성분들에 의한 것으로 생각된다[4]. 페놀화합물은 수산기(-OH)를 분자구조에 하나 또는 그 이상을 가지고 있어 타 물

질과의 결합력이 매우 뛰어나기 때문에 항산화물 비롯한 항염, 항독과 같은 유효한 생리활성을 나타낸다고 알려져 있다[27]. 한편, SAR 제거능 조사에 있어서는 80과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 추출물 처리에 있어서 각각 21.2%와 35.8%로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 SAR 제거능을 보였다. 본 실험결과는 LF 추출물이 자유라디칼의 일종인 SAR을 제거할 수 있는 항산화능이 있음을 말해 주고 있다. 이같은 항산화능은 LF 추출물 성분인 saponin이나 secoiridoid glycoside 및 페놀화합물 성분들 때문인 것으로 생각된다[28]. 한편, 본 연구의 LP 억제능에 있어서 80과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 추출물 처리에서 대조군에 비하여 각각 18.6%와 37.3%로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 LP 억제능을 보였다. 본 연구 결과는 Kim 등[25]이 LF 추출물에 대한 LP 억제능과 lactate dehydrogenase (LDH) 활성 저해를 보고한 연구 결과와 일치하였다. 지질과산화는 LDH 활성과 함께 산화적 손상에 의한 지질과산화의 막손상 정도를 측정하는 정량적 분석방법의 하나로 알려져 있다[29]. 이상의 결과로부터 LF 추출물과 같은 천연성분은 치매와 같이 산화적 손상과 관련된 병변에 대한 치료적 약물개발을 위해 활용 가치가 클 것으로 생각된다. 그러나 천연성분에 대한 산화적 손상에 대한 생리활성 분석은 생화학이나 약리 및 분자적 측면에서 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

치매유발제인 염화알루미늄(aluminum chloride, AlCl_3)의 세포독성을 대뇌교종세포인 C6 glioma 세포를 대상으로 산화적 손상측면에서 조사하였으며, 또한 AlCl_3 의 세포독성에 대한 금은화(*Lonicerae flos*, LF) 추출물의 영향을 세포생존율을 비롯한 DPPH-라디칼 소거능, superoxide anion-radical (SAR) 제거능 및 지질과산화(lipid peroxidation, LP) 억제능과 같은 항산화 측면에서 분석하였다. 본 실험에서 배양 C6 glioma 세포에 120~160 μM 의 AlCl_3 가 각각 포함된 배양액에서 처리한 결과 처리 농도에 비례하여 세포생존율이 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였으며, 이 때 XTT_{50} 값은 128.8 μM 에서 나타나 중간독성(mid-toxic)인 것으로 나타났다. 또한, 항산화제인 BHT는 AlCl_3 의 세포독성을 유효하게 방어하였다. 한편, AlCl_3 의 세포독성에 대한 금은화(LF) 추출물의 영향에 대한 조사에 있어서, LF 추출물은 AlCl_3 에 의하여 감소된 세포생존율을 유의하게 증가시킴으로써 세포독성을 방어하였다. 이와 동시에, LF 추출물은 DPPH-라디칼 소거능을 비롯하여 SAR 제거능 및 LP 억제능을 보임으로서 항산화 효과를 나타냈다. 위의 결과로부터

AlCl_3 의 세포독성에 산화적 손상이 관여하고 있으며, 또한 LF 추출물은 AlCl_3 의 독성을 항산화능에 의하여 효과적으로 방어하였다. 따라서, LF 추출물과 같은 천연성분은 알루미늄과 같이 산화적 손상과 관련된 치매유발제의 독성을 방어함으로써 차후 치매와 같은 산화적 손상 관련 질환 치료를 위한 항산화 물질로서의 개발적 가치가 있다고 사료된다.

Acknowledgements: None

Funding: None

Conflict of interest: None

REFERENCES

1. Ellis JM. Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. J Am Osteopath Assoc. 2005;105(13):145-158.
2. Kim SJ, Yu YW, Lee JK. Cytotoxicity and protective effect of *Portulaca oleracea* L. extract on cultured neuroglioma cells damaged by aluminum of dementia-induced agent. J Kor Soc Plants Environ. 2013;16(5):251-256.
3. Kourie JI. Mechanisms of amyloid beta protein-induced modification in ion transport systems; implications for neurodegenerative disease. Cell Mol Neurobiol. 2001;21(3):173-213.
4. Kim SC, Lee JR, Choi KI, Park ST, Kwon YK, Byun SH. Effect of *Lonicerae flos* on contact hypersensitivity induced by repeat elicitation of DNCB. Kor J Herbol. 2006;21(1):9-15.
5. Bryan-Sisneros AA, Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB. Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ gradients. Neuroreport. 2000;11(15):3357-3360.
6. Stephen LY, Loyd HB, June KA, Joyce MA, Michael DD, Paula BE, et al. Amyloid β and amylin fibrils induce increase in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. J Neurochem. 2000;74(3):1017-1025.
7. Kontush A. Amyloid-beta ; an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. Free Radic Bio Med. 2001;31(19):1120-1131.
8. Kim YJ. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. J Kor Neurol Assoc. 2004;22(5):421-432.
9. Roger DG, Olivier F, Clank P, Courtosis M, Piriou A. Aluminum transfer as complex through blood-brain barrier. Biological Trace Element Res. 1990;25(5):39-45.
10. Son YW, Choi YS. Protective of *Chenopodium album* var. extract by oxidative effect in cultured human skin fibroblasts damaged by cadmium. J Kor Soc People plants Environ. 2012;15(3):155-161.
11. Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Hung YP, et al. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines. J Ethnopharmacol. 2007;113(1):115-124.
12. Choi CW, Jung HA, Kang SS, Choi JS. Antioxidant constituents and a new triterpenoid glycoside from *Lonicerae flos*. Arch

- Pharm Res. 2007;30(1):1-7.
13. Kwon SH, Kim HC, Lee SY, Jang CG. Loganin improves learning and memory impairments induced by scopolamine in mice. *Eur J Pharmacol.* 2009;619(1):44-49.
 14. Kim TY, Jekal SJ. Antioxidative effect of *Chelidonium majus* extract on cultured NIH3T3 fibroblasts injured by cadmium chloride of toxicant. *Kor J Clin Lab Sci.* 2016;48(1):1-7.
 15. Han DS, Baeck KH, Kim YO, Choi KE, Kwag JS, Baeck SH. Development of anticancer agents from Korean medicinal plants. Part 6. Cytotoxic activity of the ethyl acetate soluble fraction of *Lonicerae flos* against human oral epithelioid carcinoma cells. *Kor J Pharmacogn.* 1998;29(1):22-27.
 16. Zhang X, Guo Q, Yu B. Rapid quantitative analysis of adulterant *Lonicera* species in preparations of *Lonicerae Japonicae flos*. *J Sep Sci.* 2015;38(23):4014-4020.
 17. Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by anti-oxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol.* 1996; 17(1):37-46.
 18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.* 1983;65(1-2):55-63.
 19. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;181(4617):1199-1200.
 20. Kikuzaki H, Nakatani N. antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci.* 1993;58(6):1407-1410.
 21. Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth.* 1984;9(1):7-9.
 22. Verstraeten SV, Amio L, Oteiza PI. Aluminum and lead molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch Toxicol.* 2008;82(11): 789-802.
 23. Deloncle R, Guillard O. Mechanism of Alzheimer's disease: arguments for a neurotransmitter-aluminum complex implication. *Neurochem Research.* 1990;15(12):1239-1245.
 24. Waltz JA, Knowlton BJ, Holyoak KJ, Boone KB, Back-Madruga C, McPherson S, et al. Relational integration and executive function in Alzheimer's disease. *Neuropsychology.* 2004;18(2): 296-302.
 25. Kim SE, Yang BS, Choi YS. Cytotoxicity and effect of *Lonicerae flos* extract against chromium, contact dermatitis-induced agent in cultured human skin fibroblasts. *J Kor Soc People Plants Environ.* 2012;15(6):407-412.
 26. Kwak WJ, Han CK, Chang HW, Kim HP, Kang SS, Son KH. Loniceroside C, an antiinflammatory saponin from *Lonicerae japonica*. *Chem Pharm Bull.* 2003;51(3):333-335.
 27. Ma J, Luo XD, Protiva P, Tang H, Ma C, Basile MJ, et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manikara zapota* (Sapodilla). *J Nat Prod.* 2003;66(7):983-986.
 28. Rim BM, Rim CW, Choi YJ, Chung YS, Jeong HG. Effects of *Lonicerae japonica* extract as a biological response modifier. *Environ Mut Car.* 1992;12(1):45-54.
 29. Oh YL, Choi YR, Chang BS, Jung IJ. Antioxidative effect of *Portulaca oleracea* L. extract on allergic contact dermatitis agent, copper in cultured human skin fibroblasts. *J Invest Cosm.* 2012;8(4):243-249.