



Protective effects of kaempferol, quercetin, and its glycosides on amyloid beta-induced neurotoxicity in C6 glial cell

Ji Hyun Kim¹ · Hyun Young Kim² · Eun Ju Cho¹

Kaempferol, quercetin 및 그 배당체의 amyloid beta 유도 신경독성에 대한 C6 신경교세포 보호 효과

김지현¹ · 김현영² · 조은주¹

Received: 23 September 2019 / Accepted: 30 September 2019 / Published Online: 31 December 2019
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2019

Abstract Alzheimer's disease (AD) is a common neurodegenerative disease. Oxidative stress by amyloid beta peptide (A β) of neuronal cell is the most cause of AD. In the present study, protective effects of several flavonoids such as kaempferol (K), kaempferol-3-O-glucoside (KG), quercetin (Q) and quercetin-3- β -D-glucoside (QG) from A β_{25-35} were investigated using C6 glial cell. Treatment of A β_{25-35} to C6 glial cell showed decrease of cell viability, while treatment of flavonoids such as Q and QG increased cell viability. In addition, treatment of flavonoids declined reactive oxygen species (ROS) production compared with A β_{25-35} -induced control. The ROS production was increased by treatment of A β_{25-35} to 133.39%, while KG and QG at concentration of 1 μ M decreased ROS production to 107.44 and 113.10%, respectively. To study mechanisms of protective effect of these flavonoids against A β_{25-35} , the protein expression related to inflammation

under A β_{25-35} -induced C6 glial cell was investigated. The results showed that C6 glial cell under A β_{25-35} -induced oxidative stress up-regulated inflammation-related protein expressions. However, treatment of flavonoids led to reduction of protein expression such as inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and interleukin-1 β . Especially, treatment of KG and QG decreased more effectively inflammation-related protein expression than its aglycones, K and Q. Therefore, the present results indicated that K, Q and its glycosides attenuated A β_{25-35} -induced neuronal oxidative stress and inflammation.

Keywords Kaempferol-3-O-glucoside · Kaempferol · Neurotoxicity · Quercetin · Quercetin-3- β -D-glucoside

Hyun Young Kim (✉)
E-mail: hykim@gntech.ac.kr

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

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

²Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, 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.

서론

전세계적으로 인구의 고령화가 진행됨에 따라, 알츠하이머 질환 (Alzheimer's disease; AD)은 사회적, 경제적으로 심각한 문제를 초래한다[1]. AD의 주요 병리학적 특징인 뇌 내 amyloid beta (A β) plaque의 축적은 대표적인 AD의 원인으로 알려져 있다 [2,3]. A β 는 아밀로이드 전구 단백질로부터 β -, γ -secretase에 의해 순차적으로 분리되어 생성된 38-43개의 아미노산이다[3]. A β 가 과도하게 생성될 시, 뇌 내에서 응집 및 축적되어 senile plaque를 형성하며, 이는 시냅스 기능 손상, mitochondria dysfunction, 산화적 스트레스, 염증 반응 등을 유도하여 신경독성을 일으킨다[4,5]. A β 에 의해 유도된 신경독성은 뇌 신경세포 또는 신경교세포 사멸을 일으켜 인지능력 및 기억능력 손상 등의 임상적

증상을 나타낸다[4,6].

산화적 스트레스는 체내 reactive oxygen species (ROS)가 과다하게 생성됨에 따라 산화/항산화 체계 불균형에 의해 발생하며, AD 발병과 밀접하게 관련되어있다[7]. AD의 대표적인 원인으로 알려진 뇌 내 A β 의 축적은 ROS를 증가시켜 산화적 스트레스를 유도하고, 이는 세포 구조, 지질, 단백질, DNA, RNA 등의 다양한 생체 분자를 손상시킨다[7]. 또한, A β 로 인한 신경독성은 산화적 스트레스 뿐만 아니라 염증반응을 유도하는 것으로 보고되었다. 이는 염증매개인자인 inducible and nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 증가시키고, 이는 interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 염증성 cytokine 분비를 증가시켜 AD의 증상을 악화시킨다[8,9]. 따라서, 많은 연구들은 A β 유도 신경독성으로 인한 산화적 스트레스 및 염증 반응의 조절을 통해 AD를 예방 및 치료하고자 한다[10].

Flavonoid는 C6-C3-C6를 기본골격으로 하며, 채소류, 식물류, 곡물, 과일류 등에 풍부하게 함유되어 식이로 섭취할 수 있는 대표적인 polyphenol 계열의 일종이다[11]. 국내외의 많은 연구에서 flavonoid의 항산화, 항염증, 항비만, 항암 등의 다양한 생리활성이 규명됨에 따라, 질병의 예방 및 치료에 있어서 flavonoids의 활용이 주목을 받고 있다[11,12]. 특히, 뇌에서 flavonoid는 항산화 활성이 우수할 뿐만 아니라, 신경세포 및 신경교세포의 주요 신호전달에 직접적으로 관여하여 뇌에서의 생리활성이 우수한 것으로 보고되었다[13]. 천연식물에서 flavonoid는 대부분 배당체인 glycoside 형태로 존재하고 있으며[13,14], flavonoid의 aglycone과 배당체의 생리활성 비교에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[15,16]. 이전 연구에 의하면 quercetin과 그 배당체인 rutin (quercetin-3-O-rutinoside)은 lipopolysaccharides (LPS)로 염증반응이 유도된 C6 신경교세포에서 염증성 cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 발현을 유의적으로 감소시켜 항염증 효능을 통한 신경교세포 보호 효과가 보고된 바 있다[17]. 그러나 대표적인 flavonoid의 일종인 kaempferol, quercetin 및 그 배당체인 kaempferol-3-O-glucoside, quercetin-3- β -D-glucoside의 AD의 병리학적 원인으로 알려진 A β 유도 신경독성에 대한 산

화적 스트레스 및 염증반응 조절을 통한 신경교세포 보호 비교에 관한 연구는 부족한 실정이다.

본 연구에서는 대표적인 flavonoid의 일종인 kaempferol, quercetin과 그 배당체인 kaempferol-3-O-glucoside, quercetin-3- β -D-glucoside의 신경교세포 보호 효과를 확인하고자 하였다. 따라서, 4가지 flavonoid의 A β ₂₅₋₃₅ 유도 신경독성에 대한 신경교세포 보호 효과와 산화적 스트레스 및 염증반응 관련 인자 측정을 통해 신경교세포 보호 작용 메커니즘을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 kaempferol (순도 $\geq 90\%$), quercetin (순도 $\geq 95\%$), quercetin-3- β -D-glucoside (순도 $\geq 90\%$)는 Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)에서 구매하였으며, kaempferol-3-O-glucoside (순도 $\geq 99\%$)는 Extrasynthese (Genay, France)사에서 구매하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 flavonoid의 구조는 Fig. 1에 나타내었다.

시약

세포 배양에 사용된 Dulbecco's modified eagle medium, fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin streptomycin, trypsin EDTA 시약은 Welgene (Daegu, Korea)에서 구입하였다. 신경독성 유도를 위한 A β ₂₅₋₃₅는 Sigma (St Louis, MO, USA)사에서 구매하였으며, 세포 생존을 측정에 사용한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Bio Basic (Toronto, Canada)에서, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Bio Pure (Ontario, Canada)사에서 구입하였으며, ROS 소거능 측정에 사용한 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Sigma사에서 구입하였다. Western blotting에 사용한 RIPA buffer는 Elpis Biotech. (Daejeon, Korea)에서, polyvinylidene fluoride membrane은 Millipore (Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. 1차항체인 iNOS, COX-2, I κ B- α 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz,

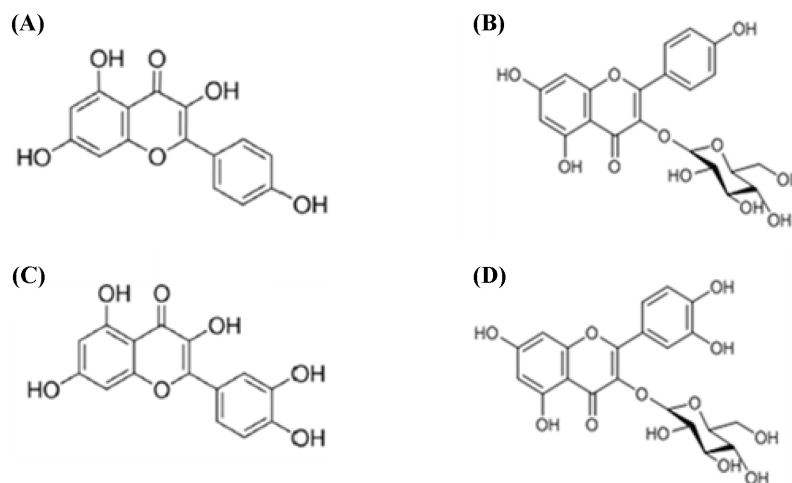


Fig. 1 The structures of kaempferol (A), kaempferol-3-O-glucoside (B), quercetin (C), and quercetin-3- β -D-glucoside (D)

MA, USA)사에서, IL-1β와 2차항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서, enhanced chemiluminescence (ECL)는 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)사에서 구입하여 실험에 사용하였다.

세포 배양

본 실험에 사용한 쥐의 신경교세포종인 C6 glial 세포는 한국 세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 100 units/mL의 penicillin streptomycin과 10% fetal bovine serum가 함유된 Dulbecco's modified eagle medium 배지와 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포 분화가 최대에 도달하였을 때 멸균된 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세포를 세척 후 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액으로 부착된 세포를 분리하여 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

세포 생존율과 ROS 측정

C6 glial 세포의 분화가 최대에 도달하였을 때, 96 well plate에 well 당 5×10⁴ cells/well로 세포를 seeding하여 37°C incubator에서 24시간 배양시켰다. 세포가 잘 부착되면, 각 flavonoids 시료를 처리하여 4시간 배양시킨 후, 신경독성을 유도하기 위해 25 μM Aβ₂₅₋₃₅를 처리하여 24시간 배양시켰다. 세포 생존율 측정을 위해, 5 mg/mL MTT solution을 각 well에 주입하여 4시간 배양한 뒤, 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[18]. ROS는 10 μM DCF-DA reagent를 각 well에 주입하여 30분간 배양한 뒤, FLUOstar OPTIMA (BMG lavtech., Ortenberg, Germany) excitation-480 nm, emission-535 nm로 측정하였다[19].

Western blot

C6 glial 세포는 100 mm cell culture dish에 1×10⁶ cells/well로 세포를 seeding하여 24시간 배양시켜 세포를 잘 부착시켰다. 각 flavonoid 시료를 처리하여 4시간 배양한 뒤, 25 μM Aβ₂₅₋₃₅를 처리하여 24시간 배양시켰다. 배양한 세포는 RIPA buffer를 첨가하여 4°C, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 상층액을 얻었다. 단백질의 농도는 bovine serum albumin을 표준물질로 Bradford 법을 이용한 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 정량하였다[20]. 동일한 양의 시료(15 μg)를 10% SDS-PAGE에서 전기영동하여 membrane에 transfer하였다. 상온에서 5% skim milk를 이용하여 blocking 시킨 뒤, 1차 항체를 1:1000 또는 1:200 등의 농도로 PBS-T에 각각 희석하여 4°C에서 overnight 반응시킨 후, 1:500으로 희석한 2차 항체와 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 PBS-T로 2번 세척 후 ECL solution과 반응시킨 후 Chemiluminescence image system (Davinchi-Chemi™)을 이용하여 염증 관련 인자인 iNOS, COX-2, IκB-α 및 IL-1β 단백질 발현을 확인하였다.

통계분석

실험 결과는 평균 ± 표준편차(n=3)로 나타내었고, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 프로그램을 이용하여 각 결과로부터 analysis of variance (ANOVA)를 구한 후 Duncan's multiple test (p < 0.05)를 이용하여 각 군간 유의성을 검정하였다.

Table 1 Effect of kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside on cell viability of C6 glial cells treated with Aβ₂₅₋₃₅

Treatment (μM)	Cell viability (%)	
Normal	100.00±0.62 ^a	
Aβ ₂₅₋₃₅ -treated control	35.81±1.76 ^b	
Kaempferol	0.25	37.11±1.53 ^b
	0.5	37.95±1.70 ^b
	1.0	35.06±2.90 ^b
Kaempferol-3-O-glucoside	0.25	36.45±1.70 ^b
	0.5	36.76±2.61 ^b
	1.0	38.40±2.71 ^b

Values are means ± SD (n = 3). ^{a-b}Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test

Table 2 Effect of quercetin and quercetin-3-β-D-glucoside on cell viability of C6 glial cells treated with Aβ₂₅₋₃₅

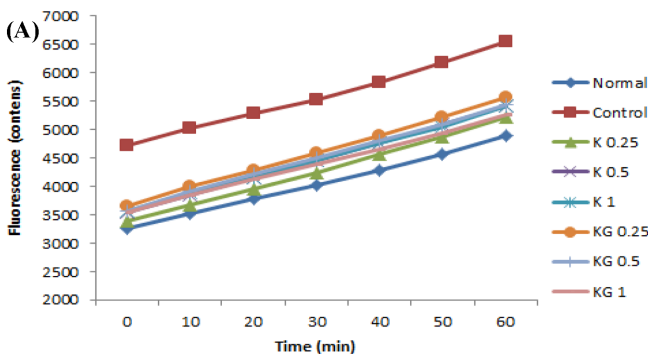
Treatment (μM)	Cell viability (%)	
Normal	100.00±0.62 ^a	
Aβ ₂₅₋₃₅ -treated control	35.81±1.76 ^c	
Quercetin	0.25	39.67±2.67 ^{bcd}
	0.5	38.38±1.27 ^{de}
	1.0	36.73±1.64 ^{de}
Quercetin-3-β-D-glucoside	0.25	38.56±1.34 ^{de}
	0.5	40.32±0.68 ^{bc}
	1.0	41.97±3.85 ^b

Values are means ± SD (n = 3). ^{a-c}Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test

결과 및 고찰

AD의 주요한 원인은 뇌 내 Aβ의 응집으로, 이는 산화적 스트레스, 염증반응, 뇌 신경세포 사멸 등을 유도한다[4,5]. 신경교 세포는 정상적인 상태에서 뇌 내 항상성 조절 또는 산화적 손상으로부터 신경세포를 보호 하는 다양한 역할을 수행하지만, 신경교세포 손상 시 염증 반응, Aβ 분해 억제 등을 통해 AD를 악화시킨다[21]. 이전 연구에 의하면, C6 glial 세포에 Aβ를 처리하였을 때, ROS 생성 증가로 인한 산화적 스트레스가 유발되고, 염증성 인자 발현을 통해 염증반응이 유도되었음을 확인하였다[22,23]. 이는 Bax, X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) 등의 apoptosis 관련 단백질 발현을 증가시켜 신경교세포 사멸을 유도하였다[20,21]. 본 연구에서는 쥐의 신경교세포종인 C6 glial 세포를 이용하여 flavonoids의 신경교세포 보호 효과를 확인하였다.

본 연구에서는 3일 동안 배양시켜 응집한 Aβ₂₅₋₃₅ plaque를 C6 glial 세포에 처리하여 신경교세포의 신경독성을 유도한 후, 4가지 flavonoid를 각각 0.25, 0.5, 1 μM의 농도로 처리하여 flavonoid의 신경교세포 보호 효과를 확인하였다. 사전연구를 통해 세포의 독성을 나타내지 않는 시료의 농도를 결정하였다. 각 시료는 0.25, 0.5, 1 μM의 농도에서 세포생존율이 유의적인 변화를 나타내지 않아 본 농도를 실험에 사용하였다(data not



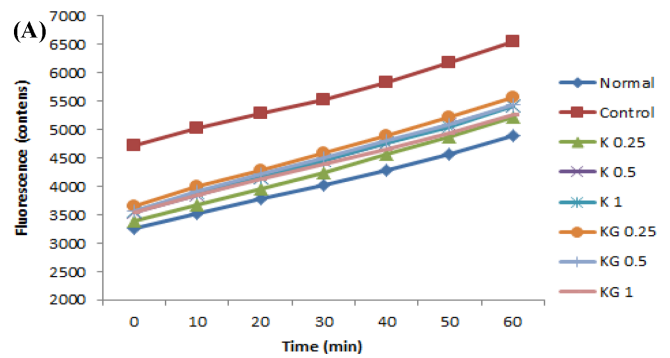
(B)

Treatment (μM)	DCFH fluorescence intensity (%)	
Normal	100.00 \pm 1.27 ^c	
$\text{A}\beta_{25-35}$ -treated control	133.39 \pm 1.09 ^a	
Kaempferol	0.25	106.66 \pm 1.35 ^d
	0.5	110.62 \pm 0.60 ^c
	1.0	110.31 \pm 2.38 ^c
Kaempferol-3-O-glucoside	0.25	113.60 \pm 0.80 ^b
	0.5	110.86 \pm 1.63 ^c
	1.0	107.44 \pm 2.05 ^d

Fig. 2 Effect of kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside on level of reactive oxygen species of C6 glial cells treated with $\text{A}\beta_{25-35}$. Time course of change in intensity of ROS fluorescence during 60 min (A) and production of ROS at 60 min (B). Values are means \pm SD ($n=3$). ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. K, kaempferol; KG, kaempferol-3-O-glucoside

shown). Normal군의 세포 생존율을 100%라고 했을 때 $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 처리한 control군의 경우 35.81%의 낮은 세포 생존율을 나타내어 $\text{A}\beta_{25-35}$ 의 처리로 인한 신경교세포 손상을 확인하였다. 반면, kaempferol 및 kaempferol-3-O-glucoside를 처리하였을 경우(Table 1), 세포 생존율의 증가를 확인하였으나 control군과 비교하였을 때 유의한 차이는 없었다. 또한, quercetin과 quercetin-3- β -D-glucoside를 처리하였을 경우(Table 2), $\text{A}\beta_{25-35}$ 의 처리로 손상을 받은 control군 보다 높은 세포 생존율 수치를 나타내어 $\text{A}\beta_{25-35}$ 유도 신경독성에 대한 C6 glial 세포 보호 효과를 확인하였다. 특히 quercetin-3- β -D-glucoside를 처리하였을 경우, 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하였다.

뇌는 다른 조직에 비해 산소의 소비가 많을 뿐만 아니라, polyunsaturated fatty acids를 다량 함유하여 산화적 스트레스에 더욱 취약하다[24]. AD의 대표적인 병리학적 증상인 $\text{A}\beta_{25-35}$ 는 뇌에서 과도하게 ROS 생성을 유도하며 이는 신경세포 및 신경교세포의 사멸을 일으킨다[4,5]. 이전 연구에서 C6 glial 세포에 $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 처리하였을 때 ROS 생성이 증가하여 신경세포에 손상을 일으킴을 확인하였다[25,26]. 본 연구에서 $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 처리하여 신경교세포에 산화적 손상을 유도 후 60분 동안 발생한 ROS 생성량을 측정할 결과, 시간이 지남에 따라 ROS의 생성이 증가하는 것을 확인하여 $\text{A}\beta_{25-35}$ 의 처리로 산화적 손상이 유도되었음을 알 수 있었다(Fig. 2A, Fig. 3A). 또한, 60분 뒤 ROS 생성량을 측정할 결과, 아무것도 처리하지 않은 normal군



(B)

Treatment (μM)	DCFH fluorescence intensity (%)	
Normal	100.00 \pm 1.27 ^c	
$\text{A}\beta_{25-35}$ -treated control	133.39 \pm 1.09 ^a	
Quercetin	0.25	109.56 \pm 3.72 ^b
	0.5	111.80 \pm 1.30 ^b
	1.0	110.79 \pm 1.45 ^b
Quercetin-3- β -D-glucoside	0.25	112.03 \pm 2.08 ^b
	0.5	111.87 \pm 3.88 ^b
	1.0	113.10 \pm 2.89 ^b

Fig. 3 Effect of quercetin and quercetin-3- β -D-glucoside on level of reactive oxygen species of C6 glial cells treated with $\text{A}\beta_{25-35}$. Time course of change in intensity of ROS fluorescence during 60 min (A) and production of ROS at 60 min (B). Values are means \pm SD ($n=3$). ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Q, quercetin; QG, quercetin-3- β -D-glucoside

의 ROS 생성량을 100%라고 했을 때, $\text{A}\beta_{25-35}$ 만을 처리한 control군의 경우 133.39%의 높은 수치를 나타내어 ROS 생성이 증가하였음을 확인하였다. Kaempferol 및 kaempferol-3-O-glucoside를 각각 처리하였을 경우(Fig. 2B), 모든 농도에서 control군에 비해 유의적으로 낮은 ROS 생성량을 나타내었으며, kaempferol-3-O-glucoside을 처리했을 경우 농도 의존적으로 ROS의 생성을 억제하였다. Quercetin과 quercetin-3- β -D-glucoside를 처리하였을 경우에도(Fig. 3B), 모든 농도에서 control군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다. 따라서, 4가지 flavonoid는 $\text{A}\beta_{25-35}$ 로 신경독성이 유도된 C6 glial 세포에서 ROS의 생성 억제를 통해 산화적 손상에 대한 보호 효과를 나타냄을 확인하였다. 특히 kaempferol과 kaempferol-3-O-glucoside의 처리는 세포 생존율 개선에는 유의한 세포 보호 효과를 나타내지는 않았지만, ROS 저해작용을 통한 산화적 스트레스 개선을 통한 신경교세포 보호 효능이 있는 것으로 사료된다. Park 등(2011)의 연구에 의하면 LPS로 염증반응을 유도한 BV2 microglial 세포에서 kaempferol의 처리 시 ROS 저해작용을 나타내어 kaempferol은 산화적 스트레스 개선을 통한 신경교세포 보호 효과를 나타내었다[27].

뇌에서 $\text{A}\beta$ 로 인한 신경독성은 nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells (NF- κ B)의 핵 내 전사로 인해, 염증매개인자 및 염증성 cytokine의 발현을 증가시킨다[28]. C6 glial 세포에 $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 처리하였을 때, NF- κ B가 활성화

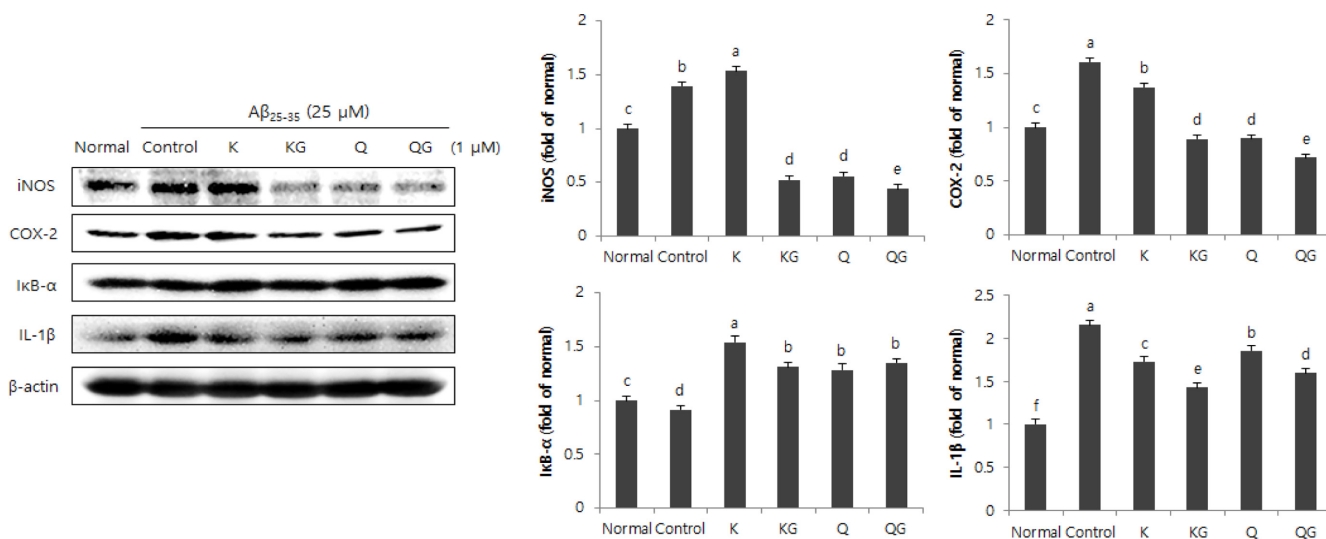


Fig. 4 Effect of flavonoids on inflammation-related protein expressions of C6 glial cells treated with Aβ₂₅₋₃₅. Values are means ± SD (n=3). ^{a-f}Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan’s multiple range test. β-Actin was used as a loading control. K, kaempferol; KG, kaempferol-3-O-glucoside; Q, quercetin; QG; quercetin-3-β-D-glucoside

화되어, iNOS, COX-2와 같은 염증매개인자 발현의 증가와 IL-1β, IL-6와 같은 염증성 cytokines의 발현이 증가함이 보고되었다[25,26]. 본 연구에서 Aβ₂₅₋₃₅에 의해 손상된 C6 glial 세포에서 flavonoid 처리에 의해 발현되는 염증성 인자를 확인해보았다. 아무것도 처리하지 않은 normal군에 비해, Aβ₂₅₋₃₅만을 처리한 control군에서 iNOS, COX-2, IL-1β와 같은 염증매개인자 및 염증성 cytokine의 발현이 증가하였다(Fig. 4). 또한, NF-κB의 핵 내 전사 시, IκB-α와 분리되어 핵 속으로 이동하는데[29], Aβ₂₅₋₃₅만을 처리한 control군에서 normal군에 비해 IκB-α 단백질 발현 감소를 확인하여 Aβ₂₅₋₃₅의 처리로 NF-κB 핵 내 전사를 통한 염증반응이 유도됨을 확인하였다(Fig. 4). 반면 kaempferol, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin, quercetin-3-β-D-glucoside를 1 μM의 농도로 처리하였을 경우, 염증 관련 인자인 iNOS, COX-2, IκB-α, IL-1β 등의 염증 관련 단백질 발현 개선을 확인하였다. 특히 aglycone 형태인 kaempferol, quercetin에 비해 배당체 형태인 kaempferol-3-O-glucoside, quercetin-3-β-D-glucoside를 처리하였을 경우 iNOS, COX-2, IL-1β와 같은 염증 인자 발현이 더 낮음을 확인하여, 배당체 형태는 신경교세포에서 Aβ₂₅₋₃₅ 유도 신경독성에 대한 염증반응을 효과적으로 개선시킴을 확인하였다. 이전 연구에 의하면, kaempferol은 염증성 자극으로 손상이 유도된 BV2 microglial 세포에서 NF-κB 활성화 억제를 통해 염증성 factor인 nitric oxide, prostaglandin E2, IL-1β 등의 발현을 감소시켰다[27]. Quercetin과 그 배당체인 rutin은 염증반응이 유도된 C6 신경교 세포에서 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 염증성 cytokine 발현을 유의적으로 감소시켰다[17]. 또한, quercetin은 mitogen-activated protein kinase (MAPK)와 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway 조절을 통한 항산화 및 항염증 효능을 통해 신경교세포를 보호하는 것으로 보고되었다[30]. 이와 같이 kaempferol, quercetin, 및 그 배당체의 신경교세포 보호 효능이 일부 보고되어있으나, 이들의 Aβ에 대한 신경교세포 보호 효과를 비교 검토한 연구는 전무한 실정이다. 본 연구에서는

kaempferol, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin, quercetin-3-β-D-glucoside 4가지 flavonoid의 Aβ 유도 신경독성에 대한 신경교세포 보호 효능을 비교하여 알 수 있었다.

따라서, 천연식물에 풍부하게 존재하는 kaempferol, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin, quercetin-3-β-D-glucoside 등의 flavonoid는 ROS 생성 감소를 통한 산화적 스트레스 및 염증매개인자 조절을 통한 염증반응 개선을 통해 Aβ₂₅₋₃₅ 유도 신경독성에 대한 신경교세포를 보호하는 것으로 생각되며, 이들은 AD 예방 및 치료 소재로서의 가능성이 있을 것으로 사료된다.

초 록

알츠하이머 질환(Alzheimer’s disease)은 대표적인 신경퇴행성 질환이며, 뇌 내 amyloid beta (Aβ) 축적에 의한 산화적 스트레스 및 염증반응은 대표적인 AD의 원인으로 알려져 있다. 본 연구에서는 kaempferol (K), kaempferol-3-O-glucoside (KG), quercetin (Q) 및 quercetin-3-β-D-glucoside (QG)와 같은 4가지 flavonoids의 C6 신경교세포에서 Aβ로 인한 신경독성으로부터의 보호 효능을 살펴보고자 하였다. C6 신경교세포에 Aβ를 처리하였을 때 세포 생존율이 감소한 반면, 4가지 flavonoids 중에서 Q와 QG의 처리 시 세포 생존을 증가를 통해 신경교세포 보호 효과를 확인하였다. 또한, Aβ를 처리한 control군의 경우 reactive oxygen species (ROS) 생성을 유도한 반면, flavonoids의 처리 시 ROS 생성이 감소하였다. 특히 Aβ를 처리한 control군은 133.39%의 ROS 생성을 나타내었으며, 1 μM의 KG와 QG를 각각 처리시 107.44, 113.10%의 수치를 나타내어 ROS 생성 감소를 확인하였다. Flavonoids의 Aβ에 대한 신경교세포 보호 기전을 확인하기 위해 염증 관련 단백질 발현을 측정하였다. Aβ로 신경독성이 유도된 control군은 염증 관련 단백질 발현이 증가하였다. 그러나, flavonoids를 처리한 군의 경우 염증 매개 인자인 inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and interleukin-1β의

발현 감소를 확인하였다. 특히, KG와 QG를 처리한 군은 aglycone 형태인 K와 Q를 처리한 군에 비해 효과적으로 염증 매개 인자 발현을 감소시켰다. 본 연구는 flavonoids의 일종인 K, Q와 그 배당체인 KG, QG의 A β 로 신경독성이 유도된 신경 교세포에서 산화적 스트레스 및 염증반응 조절을 통한 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었으며, 이들 생리활성성분은 AD 예방 및 치료 소재로써의 가능성이 있을 것으로 사료된다.

Keywords 신경독성 · Keampferol · Kaempferol-3-O-glucoside · Neurotoxicity · Quercetin · Quercetin-3- β -D-glucoside

감사의 글 이 논문은 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2013R1A1A2011228).

References

- Lane CA, Hardy J, Schott JM (2018) Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 25: 59–70
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256: 184–185
- O'Brien RJ, Wong PC (2011) Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 34: 185–204
- Tönnies E, Trushina E (2017) Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 57: 1105–1121
- Islam MT (2017) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* 39: 73–82
- Harkany T, Abraham I, Kónya C, Nyakas C, Zarándi M, Penke B, Luiten PG (2000) Mechanisms of beta-amyloid neurotoxicity: perspectives of pharmacotherapy. *Rev Neurosci* 11: 329–382
- Cai Z, Zhao B, Ratka A (2011) Oxidative stress and β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 13: 223–250
- Cai Z, Hussain MD, Yan LJ (2014) Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* 124: 307–321
- Sawikr Y, Yarla NS, Peluso I, Kamal MA, Aliev G, Bishayee A (2017) Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: The preventive and therapeutic potential of polyphenolic nutraceuticals. *Adv Protein Chem Struct Biol* 108: 33–57
- Esposito E, Cuzzocrea S (2010) New therapeutic strategy for Parkinson's and Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* 17: 2764–2774
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727–747
- Jaeger BN, Parylak SL, Gage FH (2018) Mechanisms of dietary flavonoid action in neuronal function and neuroinflammation. *Mol Aspects Med* 61: 50–62
- Xiao J (2017) Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Crit Rev Food Sci Nutr* 57: 1874–1905
- Xiao J, Capanoglu E, Jassbi AR, Miron A (2016) Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits. *Crit Rev Food Sci Nutr* 56: 29–45
- Kren V, Martínková L (2001) Glycosides in medicine: “The role of glycosidic residue in biological activity”. *Curr Med Chem* 8: 1303–1328
- Habtemariam S, Belai A (2018) Natural therapies of the inflammatory bowel disease: The case of rutin and its aglycone, quercetin. *Mini Rev Med Chem* 18: 234–243
- da Silva AB, Cerqueira Coelho PL, das Neves Oliveira M, Oliveira JL, Oliveira Amparo JA, da Silva KC, Soares JRP, Pitanga BPS, Dos Santos Souza C, de Faria Lopes GP, da Silva VDA, de Fátima Dias Costa M, Junier MP, Chneiweiss H, Moura-Neto V, Costa SL (2019) The flavonoid rutin and its aglycone quercetin modulate the microglia inflammatory profile improving antiangiogenesis activity. *Brain Behav Immun* S0889-1591: 30042-X (*in press*)
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55–63
- Wang H, Joseph JA (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27: 612–616
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254
- Garcia-Alloza M, Ferrara BJ, Dodwell SA, Hickey GA, Hyman BT, Bacskai BJ (2007) A limited role for microglia in antibody mediated plaque clearance in APP mice. *Neurobiol Dis* 28: 286–292
- Zhao X, Yuan L, Yu H, Xi Y, Ma W, Zhou X, Ding J, Xiao R (2014) Genistein inhibited amyloid- β induced inflammatory damage in C6 glial cells. *Arch Med Res* 45: 152–157
- Bing L, Wu J, Zhang J, Chen Y, Hong Z, Zu H (2015) DHT inhibits the A β ₂₅₋₃₅-induced apoptosis by regulation of seladin-1, survivin, XIAP, bax, and bcl-xl expression through a rapid PI3-K/Akt signaling in C6 glial cell lines. *Neurochem Res* 40: 41–48
- Maruyama W, Shaomoto-Nagai M, Kato Y, Hisaka S, Osawa T, Naoi M (2014) Role of lipid peroxide in the neurodegenerative disorders. *Subcell Biochem* 77: 127–136
- Markesbery WR, Carney JM (1999) Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 9: 133–146
- Ayasolla K, Khan M, Singh AK, Singh I (2004) Inflammatory mediator and beta-amyloid (25-35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E. *Free Radic Biol Med* 37: 325–338
- Park SE, Sapkota K, Kim S, Kim H, Kim SJ (2011) Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells. *Br J Pharmacol* 164: 1008–1025
- Kheiri G, Dolatshahi M, Rahmani F, Rezaei N (2018) Role of p38/MAPKs in Alzheimer's disease: implications for amyloid beta toxicity targeted therapy. *Rev Neurosci* 30: 9–30
- Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18: 2195–2224
- Sun GY, Chen Z, Jasmer KJ, Chuang DY, Gu Z, Hannink M, Simonyi A (2015) Quercetin attenuates inflammatory responses in BV-2 microglial cells: role of MAPKs on the Nrf2 pathway and induction of heme oxygenase-1. *PLoS One* 10: e0141509