

FOOD & CHEMISTRY

Protective effects of *Cirsium japonicum* var. *maackii* against amyloid beta-induced neurotoxicity in C6 glial cells

Ji Hyun Kim¹, Min Jeong Kim¹, Ji Myung Choi¹, Sanghyun Lee², Eun Ju Cho^{1*}

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

²Department of Plant Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

*Corresponding author: ejcho@pusan.ac.kr

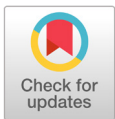
Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease associated with age, and amyloid beta (A β) is known to cause Alzheimer's disease. In the present study, we investigated the protective effects of *Cirsium japonicum* var. *maackii* extract and its fractions against A β -induced neurotoxicity in C6 glial cells. The cells treated with A β ₂₅₋₃₅ showed a decrease in cell viability and an increase in reactive oxygen species (ROS) production compared with the non-treated cells. However, the cells treated with the *C. japonicum* var. *maackii* extract and its fractions increased the cell viability and inhibited the A β -induced ROS production. These results demonstrate the neuroprotective effects of *C. japonicum* var. *maackii* against A β . To further examine the protective mechanism, we measured inflammation and apoptosis related protein expressions. The cells treated with extract and fractions from *C. japonicum* var. *maackii* down-regulated inflammatory related proteins such as cyclooxygenase-2, interleukin (IL)-1 β , and IL-6, and attenuated apoptosis related proteins including B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) associated X protein/Bcl-2 ratio. In particular, the ethanol and ethylacetate fraction exhibited higher inhibitory effect against ROS production and apoptosis-related protein expressions among the extract and the other fractions. Therefore, this study demonstrated the protective effects of *C. japonicum* var. *maackii* extract and its fractions against A β -induced neurotoxicity in C6 glial cells through the regulation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis, suggesting that it might have potential as a therapeutic for AD.

Keywords: amyloid beta, apoptosis, *Cirsium japonicum* var. *maackii*, inflammation, oxidative stress

Introduction

알츠하이머 질환(Alzheimer's disease)은 노화에 따른 대표적인 신경퇴행성질환으로 기억력 및 인 지능 손상을 일으킨다(Price and Morris, 1999). 알츠하이머 질환의 발병 원인은 명확하게 규명되지는 않았지만, 뇌 내 amyloid beta (A β) 단백질의 과발현이 주요 원인으로 보고되었다(Canevari et al.,



OPEN ACCESS

Citation: Kim JH, Kim MJ, Choi JM, Lee S, Cho EJ. 2019. Protective effects of *Cirsium japonicum* var. *maackii* against amyloid beta-induced neurotoxicity in C6 glial cells. Korean Journal of Agricultural Science. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20190025>

DOI: <https://doi.org/10.7744/kjoas.20190025>

Received: May 5, 2019

Revised: May 23, 2019

Accepted: May 28, 2019

Copyright: © 2019 Korean Journal of Agricultural Science



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.

2004). A β 는 39 - 43개의 아미노산으로 이루어진 물질로, 아밀로이드 전구 단백질인 APP (amyloid precursor protein)로부터 β -, γ -secretase와 같은 protease에 의해 분해되어 생성되어진다(Butterfield et al., 2013). 국내·외 여러 연구에 의하면, 알츠하이머 질환 환자의 뇌에서 과발현된 A β 는 응집되어 뇌 내 plaque를 형성하게 되는데, 이는 알츠하이머 질환의 대표적인 주요 병인으로 알려져 있으며, 학습·기억력 손상과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다(Canevari et al., 2004; Butterfield et al., 2013).

A β 의 과발현은 뇌를 구성하는 신경세포 및 신경교세포에서 산화적 스트레스, 염증반응 및 세포사멸의 원인이 된다(Butterfield et al., 2013). 뇌에서 A β 는 활성산소종(ROS; reactive oxygen species)을 증가시켜 생체를 구성하는 단백질, DNA 및 RNA의 산화와 지질과산화 등을 일으킨다(Cheignon et al., 2018). 특히, 이러한 산화적 스트레스는 염증반응을 유도하는데, cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxygen synthase (iNOS)와 같은 염증 매개 인자를 활성화시키고, interleukin (IL)-1 β , IL-6와 같은 염증성 cytokines을 방출시킨다(Sawikr et al., 2017). 이와 같이 A β 에 의해 유도된 산화적 스트레스 및 염증반응은 뇌 내 세포사멸을 유도한다. 세포사멸 과정에서, Bcl-2-associated X protein (Bax) 단백질은 pro-apoptosis 인자로서 세포 사멸을 유도하는 역할을 하는 반면 B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) 단백질은 anti-apoptosis 인자로 작용하여 세포사멸을 보호하는 역할을 하는데, 알츠하이머 질환에서 Bcl-2 단백질에 비해 Bax 단백질 발현이 과발현되어 세포사멸이 유도되는 것으로 알려져 있다(Obulesu and Lakshmi, 2014). 또한, A β 가 과발현 된 알츠하이머 질환 동물 모델의 뇌에서 산화적 스트레스, 염증반응, 세포사멸 관련 단백질 발현의 증가가 보고되어 있어(Ali et al., 2017; Ma et al., 2018), A β 로 인한 이들 작용 메커니즘을 조절하는 것은 알츠하이머 질환의 예방 및 치료에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

영경귀(*Cirsium japonicum* var. *maackii*)는 국화과(asteraceae)의 다년생 초본으로, 한국, 중국, 일본 등에 자생하고 있으며, 항균, 항염, 해독, 이뇨작용 등으로 민간 및 한방에서 약용식물로서 널리 이용되는 식물이다. 이전 연구에 의하면, 영경귀는 항산화, 항염증, 항당뇨, 간 손상 보호 등 다양한 생리활성이 보고되었다(Liao et al., 2010; Mok et al., 2011; Wan et al., 2014). 또한, 영경귀는 항산화 등의 생리활성이 우수한 cirsimaritin, acacetins, luteolin, linarin, chlorogenic acid 등의 활성성분을 다량 함유하는 것으로 알려져 있다(Kim and Kim, 2003; Liao et al., 2010; Shin et al., 2017). 특히 영경귀에서 분리한 luteolin은 당뇨로 인지가 손상된 동물모델에서 항산화, 항염증 및 신경보호 활성을 통해 인지기능 개선 효능이 보고되었으며(Liu et al., 2013), 영경귀로부터 분리한 kainic acid는 신경세포에서 ROS 소거와 항산화 효소 활성 증가를 통한 신경 세포 보호 효과가 보고되었다(Han et al., 2012). 선행연구로서 영경귀 추출물 및 분획물의 H₂O₂ 유도 산화적 손상에 대한 신경교세포 보호 효과를 확인하였으나(Lee et al., 2018), 알츠하이머 질환의 주요 원인으로 알려진 A β 로 유도된 신경독성에 대한 신경교세포 보호 효과 및 작용 메커니즘 분석에 관한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 C6 신경교세포를 이용하여 A β 로 유도된 신경독성에 대해 영경귀 추출물 및 분획물의 신경교세포 보호 효능과 산화적 스트레스, 염증반응, 세포사멸 관련 인자 측정을 통해 관련 신경교세포 보호 작용기전을 규명하고자 한다.

Materials and Methods

영경귀의 추출물 및 분획물 조제

실험에 사용된 영경귀(*Cirsium japonicum* var. *maackii*) 봄 지상부는 임실생약(Imsil, Korea)에서 제공받아 실험재료로 사용하였다. 세척 및 건조된 영경귀 봄 지상부 5.71 kg을 ethanol (EtOH)로 환류냉각장치를 이용하여 추출하였고, 추출물 667.2 g (수율 11.68%)을 얻었다. EtOH 추출물은 유기용매를 이용하여 각각 분획하였고, 분획물로 n-hexane (213.6 g, 수율 3.74%), CHCl₃ (39.0 g, 수율 0.68%), ethyl acetate (EtOAc, 67.6 g, 수율 1.18%), n-butanol (n-BuOH, 47.0 g, 수율 0.82%) 등 총 4개의 분획물을 조제하여 실험재료로 사용하였다.

세포 종류 및 시약

C6 신경교세포는 한국세포주은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양을 위한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 100 units/mL의 penicillin streptomycin 용액은 Welgene (Gyeongsan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 신경독성 유도를 위한 $A\beta_{25-35}$ 는 Sigma (St. Louis, USA)사의 제품을 구매하여 사용하였다. 세포 생존을 측정을 위한 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)에서 구매하였으며, ROS 측정을 위한 dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Sigma (St. Louis, USA)사 제품을 구매하여 사용하였다. Western blot analysis를 위한 RIPA cell lysis buffer는 Elpis Biotech (Daejeon, Korea)에서, Laemmli sample buffer는 Bio-Rad (Hercules, USA)에서 구입하였다. 1차 항체로 사용한 IL-1 β 는 Bioss Biotechnology (Woburn, Massachusetts, USA)에서, IL-6, Bax, Bcl-2는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)에서, β -actin, COX-2, 2차 항체로 사용한 anti-rabbit IgG HRP-linked antibody는 Cell Signaling Technology (Danvers, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

세포 배양

C6 신경교세포는 10%의 FBS와 1%의 penicillin, streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 2 - 3일 마다 한번 배양액을 바꾸어 주면서 배양하여 세포 분화가 최대에 도달했을 때, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세포를 세척 후, 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액으로 부착된 세포를 분리한 뒤, 원심분리를 통해 집적시켰다. 집적된 세포는 골고루 분산되도록 세포와 배지를 잘 혼합하여 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

세포 생존율 측정

세포가 confluence 상태가 되면 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 seeding하여 4시간 37°C에서 배양시켜 세포를 부착시킨 뒤, 엉겅퀴 추출물 및 분획물 시료를 희석하여 농도별로 각 well에 처리하였다. 4시간 뒤, 세포 손상을 유도하기 위해 $A\beta_{25-35}$ (25 μ M)을 처리하여 incubator내에서 배양하였다. 24시간 뒤, 5 mg/mL MTT solution을 각 well에 주입하여 37°C에서 4시간 동안 배양하였고, 생성된 보라색의 formazan 결정을 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다(Mosmann, 1983).

Reactive oxygen species (ROS) 소거능 측정

세포가 confluence 상태가 되면 96 well black plate에 5×10^4 cells/well로 seeding하여 4시간 37°C에서 배양하여 세포가 잘 부착되면 엉겅퀴 추출물 및 분획물 시료를 농도별로 희석하여 각 well에 처리하여 4시간 배양한 뒤, $A\beta_{25-35}$ (25 μ M)을 처리하여 배양하였다. 24시간 뒤, 80 μ M DCF-DA solution을 각 well에 주입하여 37°C에서 30분 동안 재배양하였고, FLUOstar OPTIMA (BMG labtech., Ortenberg, Germany) excitation-480 nm, emission-535 nm를 이용하여 형광도를 측정하여 ROS 소거능을 계산하였다(Wang and Joseph, 1999).

Western blot analysis

세포에 RIPA buffer를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액의 단백질을 분리하였다. 단백질 정량 시약인 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Richmond, USA)를 이용하여 정량하고, sample buffer와 혼합하여 sample을 제작하였다. 동량의 sample을 10% 또는 13%의 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이

용하여 전기영동으로 분리한 후, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 transfer한 뒤, 5% skim milk에서 1시간 동안 blocking 하였다. 이 후, 1차항체와 4°C에서 overnight 반응 시킨 뒤 2차 항체와 실온에서 1시간 반응시켰다. PBS-T로 세척 후 enhanced chemiluminescence (ECL) solution과 반응시킨 후 Chemiluminescence image system (Davinchi-Chemi™, Davinchi-K, Seoul, Korea)를 이용하여 특정 단백질 발현을 확인하였다.

통계 분석

실험 결과는 평균 \pm 표준편차 ($n=3$)로 나타내었고, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 프로그램(version 20.0, Chicago, USA)을 이용하여 각 실험결과들로부터 analysis of variance (ANOVA)를 구한 뒤, Duncan's multiple Range test 및 Student's t-test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 각 군의 평균간의 유의성을 검정하였다.

Results and Discussion

알츠하이머 질환의 주요 병리학적 원인으로 알려진 A β 는 뇌 내 신경독성을 일으켜 산화적 스트레스, 염증반응, 세포사멸을 유도하며, 이는 결국 기억력 및 인지능 손상을 나타낸다(Canevari et al., 2004; Butterfield et al., 2013). A β 는 뇌의 신경세포 뿐만 아니라 신경전달물질 분비와 신호전달에 관여하는 신경교세포의 손상을 유도하여 알츠하이머 질환에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Block and Hong, 2005). 뇌에서 신경교세포는 시냅스 가소성, 성장인자 분비 등의 조절을 통해 신경세포를 보호하는 역할을 한다(Travis, 1994; Farfara et al., 2008). 그러나, A β 로 손상이 유도된 신경교세포는 $\cdot\text{OH}$, O_2^- 등의 ROS 생성으로 인한 산화적 스트레스를 일으킨다(Tanaka et al., 1999). 이는 염증매개인자, 염증성 cytokine 분비 등을 통해 염증반응을 유도 할 뿐만 아니라, 신경교세포 사멸을 통해 신경교세포 기능의 손상을 일으켜 AD를 악화시킨다(Farfara et al., 2008). A β_{25-35} 는 full length A β 의 절단된 형태로서, 보다 작은 크기로 인해 세포막을 통과하기 쉬울 뿐만 아니라 full length A β 와 유사한 독성을 나타내어 국내외 *in vivo* 및 *in vitro* 연구에 널리 사용되고 있다(Mattson et al., 1997; Lau et al., 2007). 또한, A β_{25-35} 를 동물의 뇌 내 주입 시, 뇌 내 산화적 스트레스, 염증반응, 세포사멸이 유도되었으며, 이로 인해 기억력 및 인지능 손상의 임상적 특징을 나타냄을 확인하였다(Fang and Liu, 2006; Lu et al., 2009; Kim et al., 2015). 따라서, 본 연구에서 A β_{25-35} 를 이용하여 신경교세포 손상을 유도한 모델에서 엉겅퀴 추출물 및 분획물의 신경교세포 보호 효과를 확인하고자 하였다.

엉겅퀴 추출물 및 분획물의 A β_{25-35} 로 유도된 신경독성으로부터 C6 신경교세포 보호 효과를 MTT assay를 통해 확인하였다. MTT assay는 세포 생존율 측정에 주로 사용되는 assay로, 탈수소 효소 작용에 의한 mitochondria 활성을 이용하는 측정법이다(Mosmann, 1983). C6 신경교세포에 아무것도 처리하지 않은 normal군의 세포생존율을 100% 라고 했을 때, A β_{25-35} 를 25 μM 의 농도로 처리한 경우 40.56%로 유의적으로 세포 생존율 감소를 나타내어, A β_{25-35} 로 인한 C6 신경교세포 손상을 확인하였다(Fig. 1). 반면, 엉겅퀴 추출물 및 분획물을 처리한 군에서 A β_{25-35} 만을 처리한 control군에 비해 유의적으로 세포 생존율 증가를 나타내었다. 특히, EtOH 및 EtOAc 분획물을 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리 시, 각각 48.37, 47.84%의 수치를 나타내어 다른 추출물 및 분획물에 비해 우수한 신경교세포 보호 효과를 확인하였다.

A β_{25-35} 로 신경독성을 유도한 C6 신경교세포에서 엉겅퀴 추출물 및 분획물의 산화적 스트레스 개선 효과를 확인하기 위해 DCF-DA assay를 이용하여 ROS 생성량을 측정하였다. DCF-DA assay는 DCFH가 ROS에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 DCF로 전환되는 원리를 이용한 측정법으로, 세포 내 ROS 생성 측정에 널리 이용되는 방법이다(Rastogi et al., 2010). ROS 생성을 측정한 결과, 시간이 지남에 따라 모든 군에서 fluorescence 수치 증가를 나타내어 ROS 생성량이 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 A β_{25-35} 를 처리한 control군은 normal군에 비해 ROS 생성량이 더욱 많이 증가하여 A β_{25-35} 로 인한 산화적 스트레스가 유도되었음을 알 수 있었다(Fig. 2A). 60분 기준으로 ROS 생성량을 측정한 결과, normal군 100% 대비 control

군은 108.36%로 ROS 생성이 증가함을 확인하였다. 반면, 엉겅퀴 추출물 및 분획물을 1, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리했을 때, 모든 군에서 control군에 비해 낮은 수치를 나타내었다(Fig. 2B). 특히 엉겅퀴 추출물 및 분획물을 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리 시 EtOH 및 EtOAc 분획물에서 각각 102.42, 102.53%의 낮은 수치를 나타내어, EtOH 및 EtOAc 분획물이 다른 추출물 및 분획물에 비해 유의적으로 우수한 ROS 소거능을 나타냄을 확인하였다. 또한, 이전 연구에서 엉겅퀴 EtOAc 분획물은 EtOH, n-BuOH, CHCl_3 , n-hexane과 같은 다른 추출물 및 분획물에 비해 *in vitro*에서 DPPH, $\cdot\text{OH}$, O_2^- 라디칼 소거능이 우수하였으며, aldose reductase 억제 활성이 가장 우수한 것으로 보고되었다(Lee et al., 2017; Lee et al., 2018).

뇌에서 A β 로 인한 신경독성은 ROS 생성량 증가를 통한 산화적 스트레스 뿐만 아니라 nuclear factor- κB (NF- κB) pathway 활성화를 통한 염증반응을 유도한다(Kempuraj et al., 2016). NF- κB 는 알츠하이머 질환에 관여하는 염증반응 작용 기전으로, 세포의 손상 시 활성화되어 COX-2, iNOS와 같은 염증 매개 인자를 발현시킨다(Kempuraj et al., 2016). 이와 같이 발현된 염증 매개 인자는 IL-6, IL-1 β , tumor necrosis factor- α 와 같은 염증성 cytokines를 과발현시켜 세포 손상을 유도한다(Apelt and Schliebs, 2001). 또한, A β 가 과발현된 뇌 조직에서 염증 매개 인자 및 염증성 cytokines이 과발현되어 염증반응이 유도됨이 보고되었다(Halliday et al., 2000). 본 연구에서 A β_{25-35} 로 인한 신경교세포에서의 염증반응에 대해 엉겅퀴 추출물 및 분획물의 염증반응 개선 작용 기전을 규명하기 위해 COX-2, IL-1 β , IL-6와 같은 염증반응 관련 단백질 발현을 측정하였다(Fig. 3). A β_{25-35} 만을 처리한 control군의 경우 아무것도 처리하지 않은 normal군에 비해 유의적으로 COX-2, IL-1 β , IL-6 단백질 발현이 증가하여 염증반응이 유도되었음을 확인하였다. 반면 엉겅퀴 추출물 및 분획물을 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, control군에 비해 유의적으로 모든 군에서 이들 단백질 발현이 감소함을 확인하였다. 따라서 엉겅퀴 추출물 및 분획물은 A β_{25-35} 로 유도된 신경교세포의 염증반응 개선 효과가 있는 것으로 생각된다.

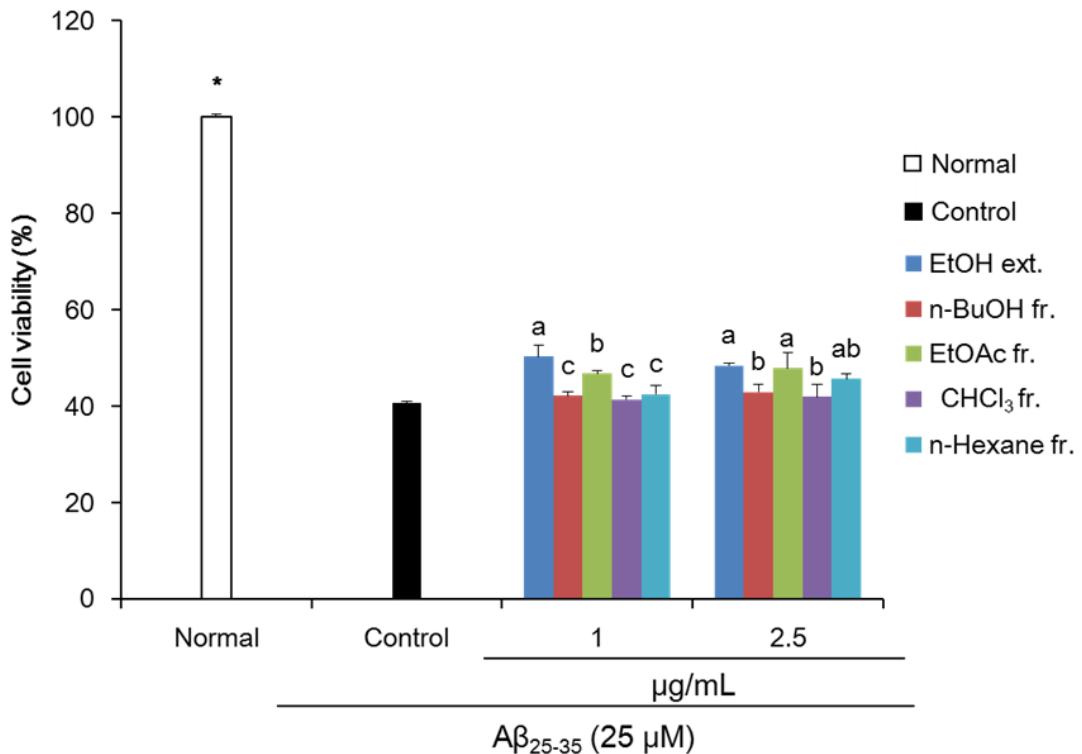


Fig. 1. Effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* extract (ext.) and fractions (fr.) on cell viability in A β_{25-35} -treated C6 glial cells. Values are means \pm SD (n = 3). a - c: Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test among extract- and fractions-treated groups. *p < 0.05 compared with the control group by Student's t-test.

A β 로 인한 신경독성은 산화적 스트레스와 염증반응을 유도하여, 결국 뇌 내 신경세포 및 신경교세포의 사멸을 유도한다(Yang et al., 2004; Han et al., 2017). Bcl family는 세포사멸에 관여하는 중요한 작용 기전으로, 뇌에서 Bcl family 발현 조절은 기억력 및 인지기능 손상을 유도하여 알츠하이머 질환의 원인이 되는 것으로 보고되었다(Kitamura et al., 1998). Bax 단백질

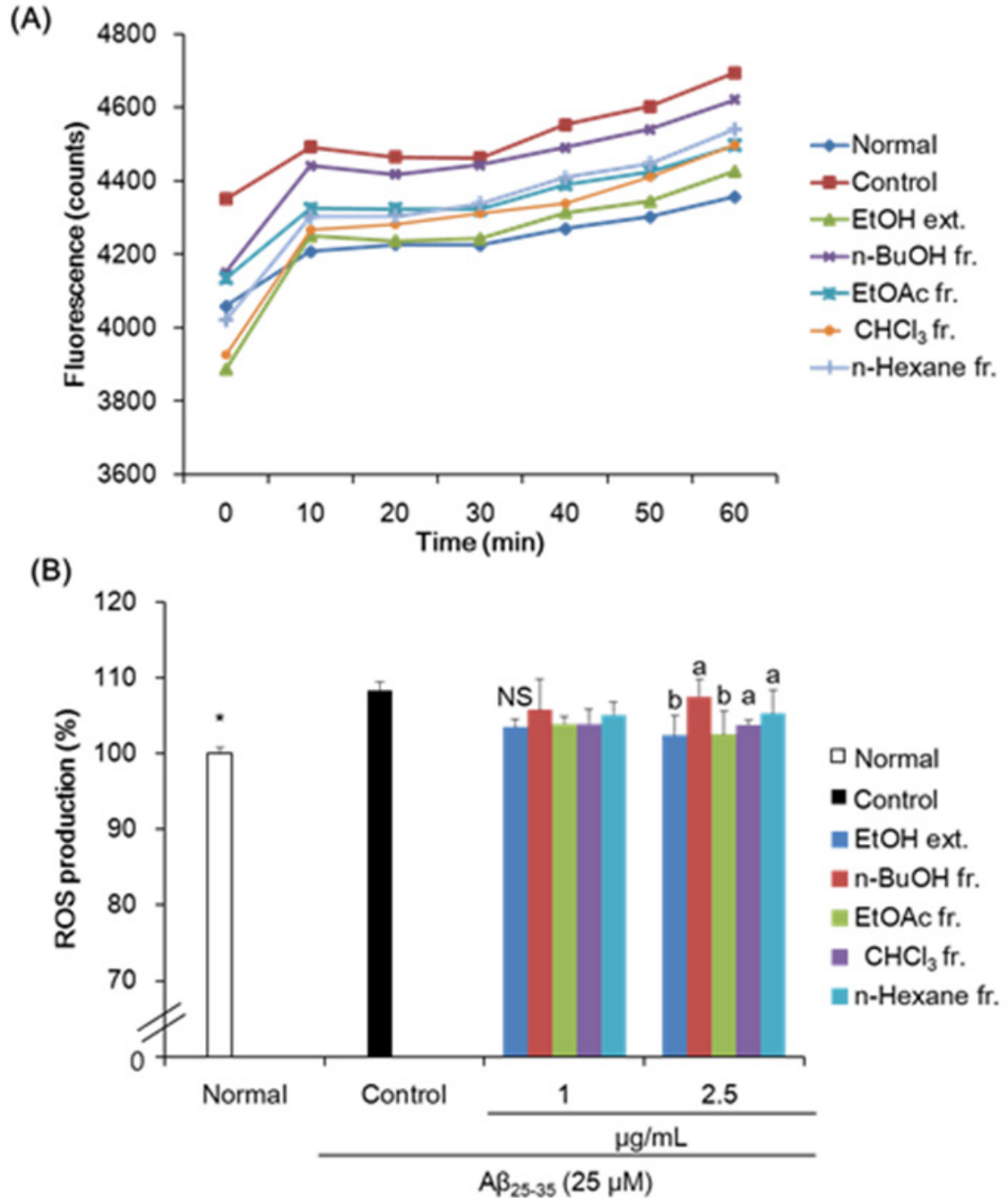


Fig. 2. Effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* extract (ext.) and fractions (fr.) on reactive oxygen species (ROS) production in A β ₂₅₋₃₅-treated C6 glial cells. Time course of change in intensity of ROS fluorescence during 1 h (A) and production of ROS at 1 h (B). Values are means \pm SD (n = 3). NS, non-significance. a, b: Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test among extract- and fractions-treated groups. *p < 0.05 compared with the control group by Student's t-test.

질은 세포사멸을 촉진하는 pro-apoptosis 인자로서 $A\beta$ 와 같은 신경독성으로 인한 세포 손상 시 과발현되며, 이는 cytochrome C 및 caspase를 활성화 시켜 세포사멸을 유도한다(Kitamura et al., 1998; Obulesu and Lakshmi, 2014). 반면, Bcl-2 단백질은 세포사멸을 보호하는 역할을 하는 anti-apoptosis 인자로서 작용한다(Ferreiro et al., 2007). $A\beta_{25-35}$ 로 세포사멸을 유도한 신경교세포에서 엉겅퀴 추출물 및 분획물의 세포사멸 보호 작용 기전을 확인하기 위해 세포사멸과 관련된 인자인 Bax와 Bcl-2 단백질 발현을 확인하였다(Fig. 4). $A\beta_{25-35}$ 만을 처리한 control군의 경우 아무것도 처리하지 않은 normal군에 비해 유의적으로 Bax/Bcl-2 단백질 발현 비율이 증가하여 $A\beta_{25-35}$ 로 인한 세포사멸이 유도되었음을 알 수 있었다. 반면 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 엉겅퀴 MeOH 추출물 및 EtOAc, CHCl_3 , Hx 분획물을 각각 처리 시, control군에 비해 Bax/Bcl-2 단백질 발현 비율이 개선되었으며, 특히 EtOAc 분획물의 경우 다른 추출물 및 분획물에 비해 가장 낮은 Bax/Bcl-2 수치를 나타내어 세포사멸 보호 효과가 우수한 것으로 사료된다. 엉겅퀴 EtOAc 분획물에는 radical 소거능이 우수한 항산화 물질로 cirsimaritin, hispidulin, cirsimarin, luteolin 등과 같은 flavonoid 계열의 활성성분을 함유하는 것으로 보고되었다(Jung et al., 2009; Lee et al., 2017). 뿐만 아니라, hispidulin은 인지능 손상 동물 모델에서 $A\beta$ 축적 억제, 염증 반응 및 apoptosis 억제를 통한 신경 보호 효과가 보고되었다(Huang et al., 2018). 또한, luteolin은 $A\beta$ 유도 인지능 손상 동물 모델에서 항산화 및 cholinergic function 조절을 통한 인지능 개선 효과와 mitogen-activated protein kinases signaling 조절을 통한 신경보호 효과 등이 보고되었다(Cheng et al., 2010; Yu et al., 2015). 따라서, 본 연구에서 우수한 신경교세포 보호 효능을 보인 엉겅퀴 EtOAc 분획물은 이러한 활성성분의 작용으로 다른 추출물 및 분획물에 비해 우수한 신경교세포 보호 효능을 나타낸 것으로 사료된다.

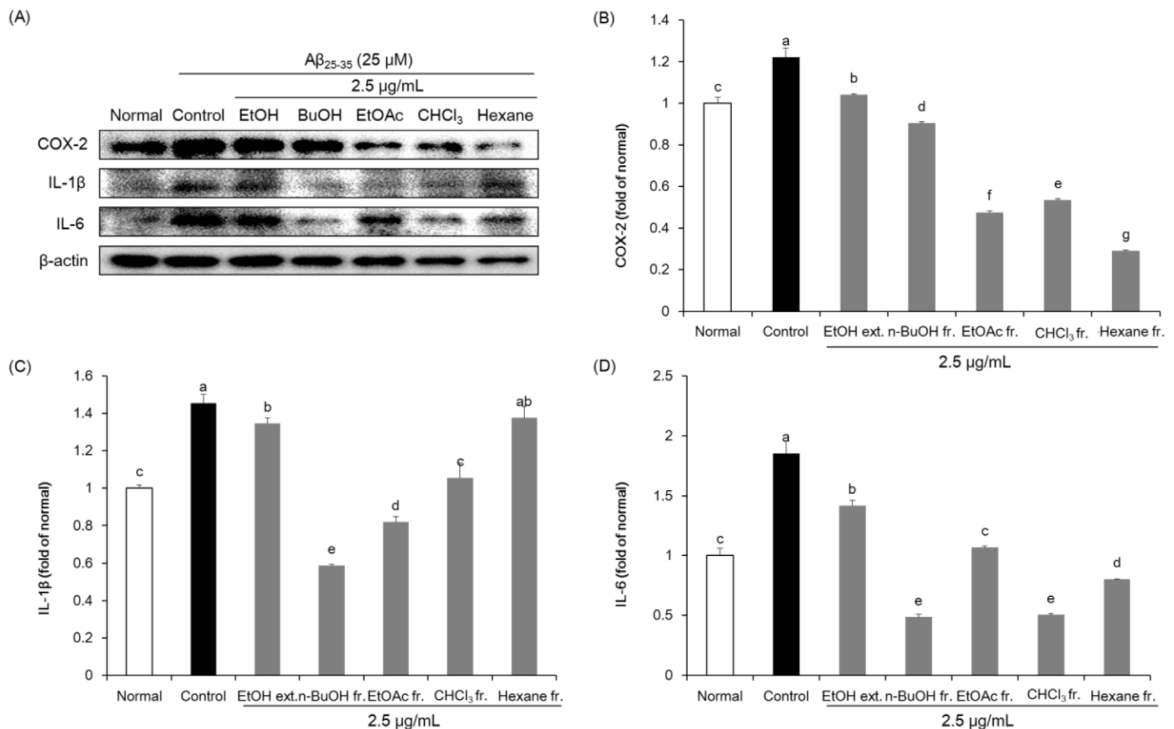


Fig. 3. Effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* extract (ext.) and fractions (fr.) on inflammation-related protein expressions in $A\beta_{25-35}$ -treated C6 glial cells. Protein bands intensity of COX-2, IL-1 β , and IL-6 (A) and quantitative analysis of COX-2 (B), IL-1 β (C), and IL-6 (D). Values are means \pm SD ($n = 3$). a - g: Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

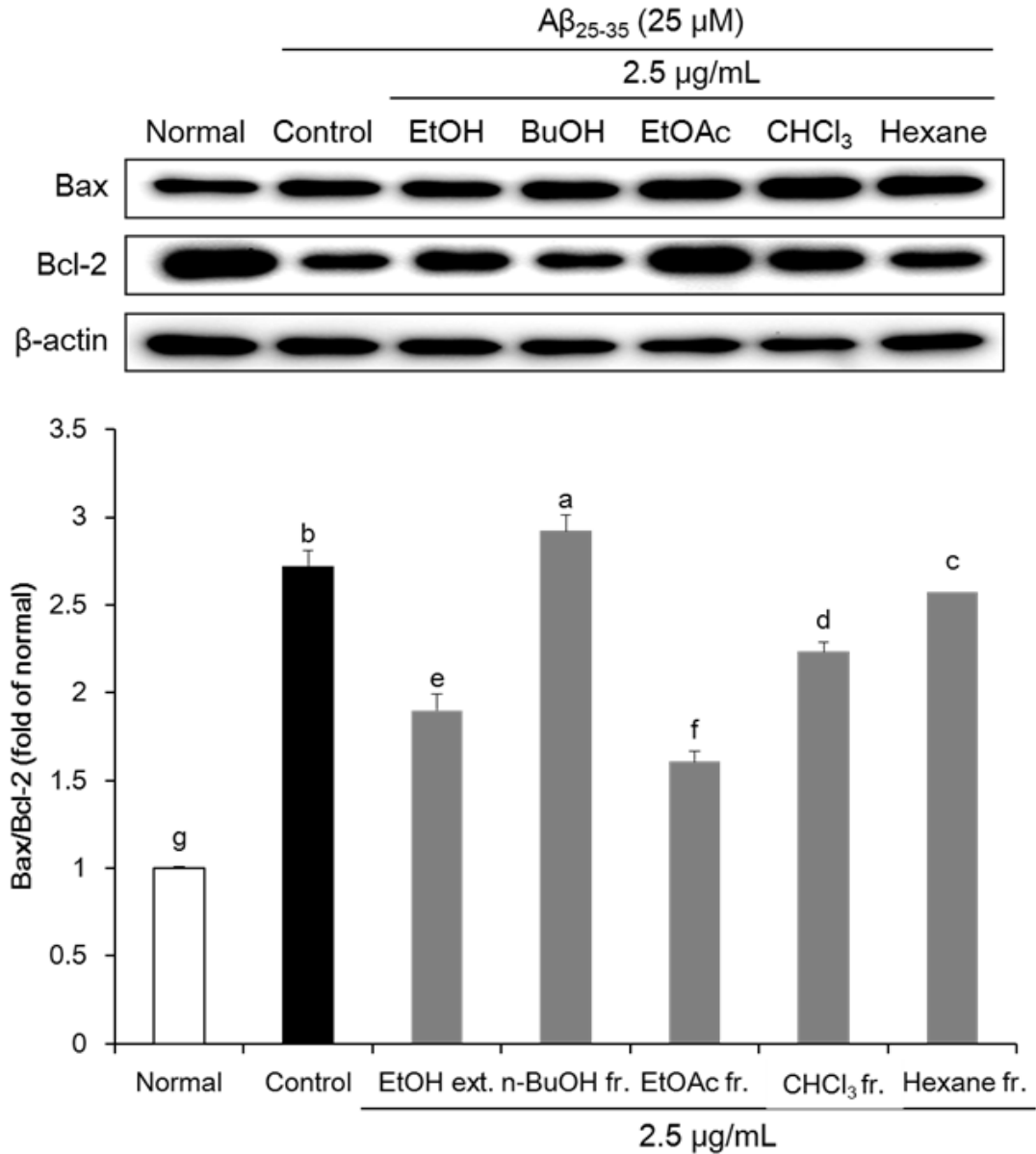


Fig. 4. Effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* extract (ext.) and fractions (fr.) on apoptosis-related protein expressions in $A\beta_{25-35}$ -treated C6 glial cells. Values are means \pm SD (n = 3). a - g: Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Conclusion

본 연구에서는 엉겅퀴 추출물 및 분획물의 $A\beta$ 유도 신경독성에 대한 신경교세포 보호 효과와 그 작용기전에 관하여 연구하였다. 엉겅퀴 추출물 및 분획물은 $A\beta_{25-35}$ 로 손상이 유도된 C6 신경교세포에서 세포 생존율 증가와 ROS 생성을 감소시켜 신경교세포 보호 효과를 나타내었다. 신경교세포 보호 작용기전 확인을 위해 염증과 세포사멸 관련 단백질 발현을

확인하였을 때, 영경귀 추출물 및 분획물은 COX-2, IL-1 β , IL-6와 같은 염증 관련 인자의 억제와 Bax, Bcl-2와 같이 세포사멸에 관여하는 인자 조절을 통해 항염증 및 항세포사멸 효과를 나타내었다. 특히, 여러 추출물 및 분획물 중 EtOAc 분획물에서 가장 우수하게 ROS 소거능과 세포사멸 관련 단백질 발현 조절을 나타냄을 확인하여, EtOAc 분획물이 A β ₂₅₋₃₅로 인한 신경교세포의 손상에 대한 보호 효과가 우수한 것으로 생각된다. 이상의 결과에서 영경귀는 A β ₂₅₋₃₅로 인한 신경독성에 대해 산화적 스트레스, 염증반응, 세포사멸 조절을 통해 신경교세포 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

Acknowledgements

이 논문은 2018년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2018RID1A1B07043784).

Authors Information

Ji Hyun Kim, <https://orcid.org/0000-0001-6617-2129>

Min Jeong Kim, <https://orcid.org/0000-0001-7276-0672>

Ji Myung Choi, <https://orcid.org/0000-0002-8869-9367>

Sanghyun Lee, <https://orcid.org/0000-0002-0395-207X>

Eun Ju Cho, <https://orcid.org/0000-0003-4282-3219>

References

- Ali T, Kim MJ, Rehman SU, Ahmad A, Kim MO. 2017. Anthocyanin-loaded PEG-gold nanoparticles enhanced the neuroprotection of anthocyanins in an A β 1-42 mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology* 54:6490-6506.
- Apelt J, Schliebs R. 2001. Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Research* 894:21-30.
- Block ML, Hong JS. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Progress Neurobiology* 76:77-98.
- Butterfield DA, Swomley AM, Sultana R. 2013. Amyloid β -peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: Importance in disease pathogenesis and progression. *Antioxidants & Redox Signaling* 19:823-835.
- Canevari L, Abramov AY, Duchon MR. 2004. Toxicity of amyloid beta peptide: Tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress. *Neurochemical Research* 29:637-650.
- Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. 2018. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology* 14:450-464.
- Cheng HY, Hsieh MT, Tsai FS, Wu CR, Chiu CS, Lee MM, Xu HX, Zhao ZZ, Peng WH. 2010. Neuroprotective effect of luteolin on amyloid beta protein (25-35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons. *Phytotherapy Research* 24:102-108.
- Fang F, Liu GT. 2006. Protective effects of compound FLZ on beta-amyloid peptide-(25-35)-induced mouse hippocampal injury and learning and memory impairment. *Acta Pharmacologica Sinica* 27:651-658.
- Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D. 2008. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of

- Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12:762-780.
- Ferreiro E, Eufrásio A, Pereira C, Oliveira CR, Rego AC. 2007. Bcl-2 overexpression protects against amyloid-beta and prion toxicity in GT1-7 neural cells. *Journal of Alzheimer's Disease* 12:223-228.
- Halliday G, Robinson SR, Shepherd C, Kril J. 2000. Alzheimer's disease and inflammation: A review of cellular and therapeutic mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 27:1-8.
- Han JY, Ahn SY, Kim CS, Yoo SK, Kim SK, Kim HC, Hong JT, Oh KW. 2012. Protection of apigenin against kainate-induced excitotoxicity by anti-oxidative effects. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 35:1440-1446.
- Han XJ, Hu YY, Yang ZJ, Jiang LP, Shi SL, Li YR, Guo MY, Wu HL, Wan YY. 2017. Amyloid β -42 induces neuronal apoptosis by targeting mitochondria. *Molecular Medicine Reports* 16:4521-4528.
- Huang L, Huang K, Ning H. 2018. Hispidulin prevents sevoflurane- Induced memory dysfunction in aged rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 97:412-422.
- Jung HA, Kim YS, Choi JS. 2009. Quantitative HPLC analysis of two key flavonoids and inhibitory activities against aldose reductase from different parts of the Korean thistle, *Cirsium maackii*. *Food Chemical Toxicology* 47:2790-2797.
- Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, Zaheer S, Iyer SS, Zaheer A. 2016. Neuroinflammation induces neurodegeneration. *Journal of Neurology Neurosurgery and Spine* 1:1003.
- Kim SJ, Kim GH. 2003. Identification for flavones in different parts of *Cirsium japonicum*. *Journal of Food Science and Nutrition* 8:330-353.
- Kim JH, Wang Q, Choi JM, Lee S, Cho EJ. 2015. Protective role of caffeic acid in an A β 25-35-induced Alzheimer's disease model. *Nutrition Research and Practice* 9:480-488.
- Kitamura Y, Shimohama S, Kamoshima W, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y, Smith MA, Perry G, Whitehouse PJ, Taniguchi T. 1998. Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease. *Brain Research* 780:260-269.
- Lau TL, Gehman JD, Wade JD, Perez K, Masters CL, Barnham KJ, Separovic F. 2007. Membrane interactions and the effect of metal ions of the amyloidogenic fragment Abeta (25-35) in comparison to Abeta (1-42). *Biochimica et Biophysica Acta* 1768:2400-2408.
- Lee AY, Kim MJ, Lee S, Cho EJ. 2018. Protective effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii* against oxidative stress in C6 glial cells. *Korean Journal of Agricultural Science* 45:509-519. [in Korean]
- Lee J, Rodriguez JP, Lee KH, Park JY, Kang KS, Hahm DH, Huh CK, Lee SC, Lee S. 2017. Determination of flavonoids from *Cirsium japonicum* var. *maackii* and their inhibitory activities against aldose reductase. *Applied Biological Chemistry* 60:487-496.
- Liao Z, Chen X, Wu M. 2010. Antidiabetic effect of flavones from *Cirsium japonicum* DC in diabetic rats. *Archives Pharmacol Research* 33:353-362.
- Liu Y, Tian X, Gou L, Sun L, Ling X, Yin X. 2013. Luteolin attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Brain Research Bulletin* 94:23-29.
- Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Niwa M, Hiramatsu M, Zou LB, Nagai T, Ikejima T, Nabeshima T. 2009. Silibinin attenuates amyloid beta (25-35) peptide-induced memory impairments: Implication of inducible nitric-oxide

- synthase and tumor necrosis factor- α in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 331:319-326.
- Ma Y, Ma B, Shang Y, Yin Q, Hong Y, Xu S, Shen C, Hou X, Liu X. 2018. Flavonoid-rich ethanol extract from the leaves of *Diospyros kaki* attenuates cognitive deficits, amyloid- β production, oxidative stress, and neuroinflammation in APP/PS1 transgenic mice. *Brain Research* 1678:85-93.
- Mattson MP, Begley JG, Mark RJ, Furukawa K. 1997. A β 25-35 induces rapid lysis of red blood cells: Contrast with A β 1-42 and examination of underlying mechanisms. *Brain Research* 771:147-153.
- Mok JY, Kang HJ, Cho JK, Jeon IH, Kim HS, Park JM, Jeong SI, Shim JS, Jang SI. 2011. Antioxidative and anti-inflammatory effects of extracts from different organs of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*. *The Korea Journal of Herbology* 26:39-47. [in Korean]
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63.
- Obulesu M, Lakshmi MJ. 2014. Apoptosis in Alzheimer's disease: An understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues. *Neurochemical Research* 39:2301-2312.
- Price JL, Morris JC. 1999. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 45:358-368.
- Rastogi RP, Singh SP, Häder DP, Sinha RP. 2010. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochemical Biophysical Research Communications* 397:603-607.
- 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. *Advances Protein Chemistry Structural Biology* 108:33-57.
- Shin MS, Park JY, Lee J, Yoo HH, Hahm DH, Lee SC, Lee S, Hwang GS, Jung K, Kang KS. 2017. Anti-inflammatory effects and corresponding mechanisms of cirsimaritin extracted from *Cirsium japonicum* var. *maackii* Maxim. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27:3076-3080.
- Tanaka J, Toku K, Zhang B, Ishihara K, Sakanaka M, Maeda N. 1999. Astrocytes prevent neuronal death induced by reactive oxygen and nitrogen species. *Glia* 28:85-96.
- Travis J. 1994. Glia: The brain's other cells. *Science* 266:970-972.
- Wan Y, Liu LY, Hong ZF, Peng J. 2014. Ethanol extract of *Cirsium japonicum* attenuates hepatic lipid accumulation via AMPK activation in human HepG2 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* 8:79-84.
- Wang H, Joseph JA. 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology & Medicine* 27:612-616.
- Yang DI, Yeh CH, Chen S, Xu J, Hsu CY. 2004. Neutral sphingomyelinase activation in endothelial and glial cell death induced by amyloid β -peptide. *Neurobiology of Disease* 17:99-107.
- Yu TX, Zhang P, Guan Y, Wang M, Zhen MQ. 2015. Protective effects of luteolin against cognitive impairment induced by infusion of A β peptide in rats. *International Journal of Clinical Experimental Pathology* 8:6740-6747.