



## ORIGINAL ARTICLE

# Antioxidative Effect of *Aster yomena* (Kitm.) Extract on C<sub>6</sub> Glioma Cell Line Damaged by AlCl<sub>3</sub>, Dementia Inducer

Young-Mi Seo

Department of Nursing, Wonkwang Health Science University, Iksan, Korea

## 치매유발물질인 염화알루미늄으로 손상된 C<sub>6</sub> 신경교종 세포주에서의 항산화 효과

서영미

원광보건대학교 간호학과

## ARTICLE INFO

Received November 12, 2020  
Revised November 30, 2020  
Accepted December 4, 2020

## Key words

AlCl<sub>3</sub> metallic compound  
Antioxidative effect  
Neurotoxicity

## ABSTRACT

This study examined the neuronal cytotoxicity of aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>), a dementia inducer, and the protective effects of *Aster yomena* (Kitam.)(AY) extract on AlCl<sub>3</sub>-induced cytotoxicity in cultured C<sub>6</sub> glioma cells. The antioxidative effects, such as the inhibitory ability of xanthine oxidase (XO) and superoxide anion-radical (SAR) scavenging ability, on cell viability were examined. AlCl<sub>3</sub> decreased the cell viability significantly in a dose-dependent manner, and the XTT<sub>50</sub> value was 130.0 μM in these cultures. The cytotoxicity of AlCl<sub>3</sub> was determined to be mid-toxic according to the Borenfreund and Puerner' toxic criteria. Quercetin (QU), an antioxidant, increased the cell viability reduced by AlCl<sub>3</sub>-induced cytotoxicity. The protective effect of the AY extract on AlCl<sub>3</sub>-induced cytotoxicity was analyzed. The AY extract increased the cell viability remarkably compared to the AlCl<sub>3</sub>-treated group and showed the inhibitory ability of XO and SAR-scavenging ability. The cytotoxicity of AlCl<sub>3</sub> was correlated with oxidative stress, and the AY extract effectively prevented AlCl<sub>3</sub>-induced cytotoxicity through its antioxidative effects. In conclusion, natural resources, such as the AY extract, may be a putative agent for improving the cytotoxicity of heavy metallic compounds correlated with oxidative stress, such as AlCl<sub>3</sub>, a morbid agent.

Copyright © 2020 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

## 서론

치매(dementia)를 비롯한 파킨슨병(Parkinsonism)이나 헌팅톤병(Huntington's disease)은 모두 뇌세포의 손상이나 퇴화에 기인한 뇌질환으로서, 이들 질환에 이완될 경우 정상적인 삶의 영위가 어렵게 된다[1]. 최근, 많은 선진국들이 고령사

회로 접어들면서 노인인구의 급증으로 말미암아 치매를 비롯한 고혈압, 골다공증, 당뇨와 같은 만성퇴행성질환이 사회적 관심의 대상이 되었다[2]. 특히, 치매는 뇌조직의 노화나 뇌출혈을 비롯한 외상이나 화학약제, 중금속과 같은 외부요인 등에 의한 뇌세포의 퇴행성 변화로 신경세포간의 연결이상이나 전달물질 분비이상 또는 세포내 아밀로이드 단백질 침착, 세포내 구성성분의 구조적 변화 등과 같은 여러 요인에 의하여 입력된 외부의 정보가 정상적으로 전달되지 못하는데 그 원인이 있다[3].

치매는 인류를 위협하는 가장 위험한 질환의 하나로서 아직 까지 이에 대한 뚜렷한 예방이나 치료방법 및 치료약제의 개발

Corresponding author: Young-Mi Seo

Department of Nursing, Wonkwang Health Science University, 514 Iksan-daero, Iksan 54538, Korea

E-mail: dudn0408@wu.ac.kr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2836-647X>

이 매우 미흡한 수준에 있다. 현재 치료로는 콜린에스테라아제(cholinesterase) 저해제 투여로 치료하고 있는 실정이다[1]. 치매의 유발요인의 하나로 중금속의 일종인 알루미늄이 제시된 바, 염화알루미늄( $AlCl_3$ )과 같은 알루미늄화합물들은 페인트제조를 비롯한 석유정제나 윤활유합성, 매염제, 탈취제와 같은 여러 공정에 사용되지만, 특히 도시락용기를 비롯한 음료수 캔과 같은 식생활수단으로 사용됨으로써 인체의 건강과 매우 밀접하게 연관되어 있다[4]. 따라서, 알루미늄의 독성이 사회적 관심으로 떠오르게 되면서 이에 대한 독성기전규명이나 치료를 위한 대체약물의 개발이 시급한 과제가 되었다[5].

치매와 같은 뇌병변에 이완될 경우, 가장 먼저 활성화되어 반응하는 세포는 신경세포(neuron)를 지지해 주는 신경아교세포(neuroglial cell)이다. 신경아교세포는 손상된 뇌세포의 회복을 위하여 신경세포에 대하여 영양공급을 비롯한 혈액 뇌 장벽(blood brain barrier, BBB)형성, 죽은 세포의 처리 및 신경돌기재생과 같은 다양한 보호기능을 수행한다. 신경아교세포의 활성화는 질환의 치료적 예후와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려지면서 이를 활용한 병변의 치료적 접근이 시도되었다[6]. 근래, 수은이나 철, 구리, 카드뮴과 같은 중금속화합물들이 인체내에서 붕괴되는 과정에서 자유라디칼(free radicals)을 생성한다고 제시되면서 독성과 산화적 손상에 대한 연구가 이루어지고 있다. 항산화제인 비타민 E가 메틸 수은의 독성을 방어했다고 보고한 연구가 이를 뒷받침하고 있다[7].

근래, 각종 식물에는 여러 질환에 유효한 생리활성물질이 들어 있다고 제시되면서 이들 성분의 효능에 대한 연구가 이루어지고 있다[8]. 예를 들면, 식물에 항암이나 항균, 항염 등에 유용한 페놀성 화합물이나 이소프레노이드 또는 단백질이나 아미노산과 같은 배당체 물질들이 다량 함유되어 있다고 밝혀지면서 이를 이용한 치료와 관련된 연구가 시도되고 있다[9]. 식물 중 속부쟁이[*Aster yomena* (Kitam.), AY]는 국화과(Compositae)로 여러해살이풀이며, 우리나라를 비롯한 일본, 중국, 시베리아 등 많은 나라에서 서식하고 있다[10]. AY는 캠퍼롤(kaempferol)을 비롯한 퀘르세틴(quercetin), 퀘르시트린람노시드(quercetinramnoside), 이소퀘르시트린(isoquercitrin), 캠퍼롤-3-글루코람노시드(kaempferol-3-glucorhamnoside), 퀘르세틴 당질(quercetin glucoside)을 함유하고 있어, 오래전부터 당뇨를 비롯한 혈압강하, 위장장애는 물론, 고지혈증이나 심정지, 뇌졸중과 같은 심혈관질환 등에 사용되어 왔다[11]. 특히, 퀘르세틴이나 캠퍼롤, 이소퀘르시트린과 같은 플라보노이드류나 아스코르브산(ascorbic acid)은 항산화 작용, 뇌나 심장의 혈관질환에 탁월한 약리작용을 나타낸다고 알려져 있다[12,13].

AY를 활용한 연구로는 쥐를 대상으로 항천식[14], 항응고[15], 항신경전달물질[16] 등에 관한 것이 있으며, 세포를 대상으로 지방전구세포의 비만저해효과[17], HaCaT세포에서의 피부 보호효과[18], RAW 264.7세포에서 항염효과[19], 칸디다균에서의 항균효과[20] 등이 있다. 한편, 항산화 측면에서는 백혈구세포에서 산화적 손상에 대한 보호효과[21], 지방세포인 3T3-L1세포에서 DPPH와 ABTS+에 대한 항산화 효과[11], 칸디다균에서 자유라디칼에 대한 이소퀘르시트린의 항산화 효과[10]등이 되어 있다. 이에 비하여 신경세포에 대한 영향에 대한 연구는 거의 찾아보기가 어렵다.

근래 세포배양기법이 발달되면서 배양 세포를 이용한 병변의 기전규명이나 대체물질의 효능검정 및 약제의 안전성 검사와 같은 시험관내 정량적 분석도구로 자리잡고 있다. 특히, 신경아교세포주인 C<sub>6</sub> glioma세포는 백서의 신경아교세포에서 유래한 세포주로서 별아교세포(astrocyte)의 형태와 생화학적으로 유사한 특징을 가지고 있다[22]. 본 연구는 치매유발물질인 알루미늄화합물의 일종인  $AlCl_3$ 에 대한 신경독성을 신경아교세포주인 배양 C<sub>6</sub> glioma세포를 가지고 산화적 손상 측면에서 분석하였으며, 이와 동시에,  $AlCl_3$ 의 독성에 대한 AY 추출물의 영향을 항산화 측면에서 조사하여 산화적 손상과 관련된 치매유발 중금속화합물의 독성에 대한 치료적 대체물질로 천연소재의 가능성을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 약제 제조

본 실험에 사용한 시약으로  $AlCl_3$ , rutin, 10% aluminum nitrate, potassium phosphate buffer (pH 7.5), xanthine, trypsin, nitroblue tetrazolium, 1 N HCl, tannic acid, dimethyl sulfoxide (DMSO), kaempferol, phosphate buffered saline (PBS), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) 및 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, disodium salt (XTT)는 Sigma사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다.  $AlCl_3$ 의 제조는 PBS로 50, 100, 150, 200  $\mu M$ 의 각 저장액을 만들어 사용하였다. XTT (50  $\mu g/ml$ ) 저장액은 실험 당일 필요한 농도로 PBS에 희석 사용하였다.

### 2. AY 채취 및 추출

전북 야산에서 3~10월 사이에 AY 전초를 채취한 후 깨끗이 잘 씻어 통풍이 잘되고 양지바른 곳에서 말린 다음 시료로 보관

하여 사용하였다. 추출을 위해 시료 74.4 g과 약 260 mL의 증류수를 1,000 mL 환저플라스크에 넣고 3시간 동안 가열하는 과정을 4회 반복하여 얻은 액을 모아 여과한 후 574 × g에서 30분 동안 원심분리한 다음 감압농축시켜 수율이 3.2%인 2.4 g의 시료를 얻었다.

### 3. 세포 배양 및 세포생존율(cell viability) 분석

C<sub>6</sub> glioma세포주(ATCC, CCL 107)는 trypsin에 의한 해리술을 사용하여 배양용기로부터 세포를 분리하였다. 분리된 세포들은 10% 혈청, 10 units/mL penicillin과 10 µg/mL streptomycin 함유된 배양액에 분주 후  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 96-well 배양용기에 넣어 72시간 동안 36°C, 5% CO<sub>2</sub>의 항온기에서 배양하였다. 세포생존율은 배양 세포에 각 well 당 10 µL의 XTT (50 µg/mL)를 넣은 다음 항온기에서 4시간 동안 배양하였다[23]. 배양 후 DMSO로 처리한 다음, ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3회 반복 실험하였다. XTT<sub>50</sub>값은 회귀직선식으로 구하였다.

### 4. AlCl<sub>3</sub>의 처리

배양 C<sub>6</sub> glioma세포에 AlCl<sub>3</sub>가 110~150 µM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 48시간 동안 처리하고 난 후 세포생존율에 의한 XTT<sub>50</sub>값을 측정하는 다음 이를 본 실험분석에 사용하였다. 본 실험은 3회 반복 실험하였다.

### 5. 퀘르세틴(quercetin, QU)의 항산화능 측정 및 AlCl<sub>3</sub>에 대한 영향

썩부쟁이 추출물 속에 함유된 여러 성분 중 항산화능이 강한 QU 성분에 대한 항산화능을 비교하기 위하여 15 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 배양 세포에 처리전에 먼저 QU, 40 µM과 60 µM의 각각 농도를 2시간 동안 처리한 후 이것의 영향을 세포생존율에 의하여 조사하였다. 또한, AlCl<sub>3</sub>에 대한 QU의 영향은 XTT<sub>50</sub> 농도의 AlCl<sub>3</sub> 처리전에 40 µM과 60 µM QU를 2시간 동안 처리 후 각각의 세포생존율을 조사하였다. 본 실험은 3회 반복 실험하였다.

### 6. AY 추출물의 세포독성 측정 및 AlCl<sub>3</sub>에 대한 추출물 처리

AY 추출물에 대한 독성 조사를 위하여 30~90 µg/mL 추출물 각각의 농도를 배양 세포에 48시간 동안 처리하고 난 후 세포생존율을 조사하였다. 이 과정에서 추출물의 최대허용한계농도를 측정하고 한계농도 이하 농도 두개를 분석에 사용하였다. 또한, AlCl<sub>3</sub>에 대한 AY 추출물의 영향조사는, XTT<sub>50</sub> 농도의

AlCl<sub>3</sub>를 배양 세포에 처리하기에 앞서 50 µg/mL와 70 µg/mL의 추출물을 2시간 동안 처리하고 난 후 세포생존율에 의한 각각의 영향을 조사하였다. 본 실험은 3회 반복 실험하였다.

### 7. AY 추출물의 성분함량 분석

AOAC [24] 방법에 따라, 폴리페놀 분석은 시료추출 0.2 mL와 phenol reagent 0.2 mM을 혼합하여 3분간 반응시키고 나서 0.4 mL sodium carbonate에서 1시간 동안 처리한 다음 ELISA reader를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 탄닌산(tannic acid)을 표준시약으로 검량곡선을 작성하였다. Nieva Moreno 등[25]의 방법에 따라, 플라보노이드 분석은 25°C에서 시료용액 0.1 mL와 10% aluminum nitrate, 1 M potassium acetate 혼합물 0.2 mL에, 에탄올 4.7 mL를 첨가하여 40분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였고, 루틴(rutin)을 표준시약으로 검량곡선을 작성하였다. 본 실험은 3회 반복 실험하였다.

### 8. 크산틴산화효소(xanthine oxidase, XO) 저해 활성 측정

Stirpe and Corte [26]의 방법에 의해 XO 저해 활성 측정은 희석추출물 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 xanthine 기질액과 0.1 mL를 가하여 25°C에서 15분 동안 반응시켰다. 반응시킨 후 1 N HCl을 넣어 반응을 정지시킨 다음 ELISA reader로 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해 활성은 시료무첨가군에 대한 시료첨가군의 백분율로 나타냈으며, XO 저해능=100 - [(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도) × 100]으로 하였으며, QU를 양성대조군으로 사용하였다. 본 실험은 3회 반복 실험하였다.

### 9. 초과산화물음이온(superoxide anion-radical, SAR) 소거 활성 측정

SAR-소거 활성 측정은 nitroblue tetrazolium (NBT)의 환원방법에 의해 시료용액 0.1 mL와 0.4 M potassium phosphate buffer, 0.4 xanthine, NBT를 가하여 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응 후 1 N HCl을 넣어 정지시킨 다음 ELISA reader로 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거 활성은 시료무첨가군에 대한 시료첨가군의 백분율로 나타냈으며, SAR 소거능=100 - [(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도) × 100]으로 하였으며, QU를 양성대조군으로 사용하였다. 본 실험은 3회 반복 실험하였다.

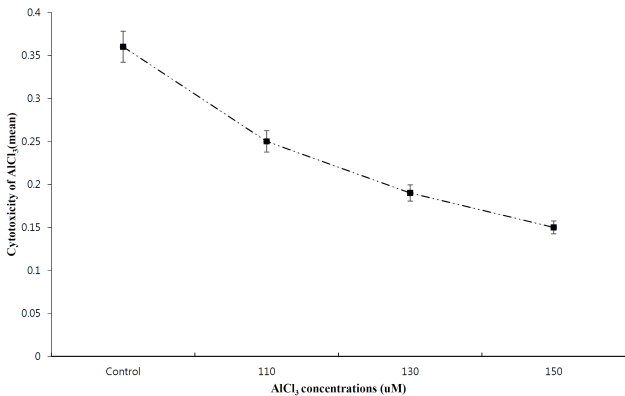
10. 통계 처리

모든 실험값의 자료는 SPSS/WIN (18.0)을 이용하여 Mean±SD로 나타냈으며, 각 군간의 비교를 위해 one way ANOVA를 시행한 후 Tukey HSD로 사후 분석을 하였다. 유의성 수준은 P<0.05에서 채택하였다.

**결 과**

1. AlCl<sub>3</sub>의 세포독성

AlCl<sub>3</sub>의 독성을 알아보기 위하여 배양 C<sub>6</sub> glioma세포에 110~150 µM 각각 농도의 AlCl<sub>3</sub>를 48시간 동안 배양한 결과, 세포 생존율이 AlCl<sub>3</sub>의 처리농도에 의존적으로 유의한 감소를 보여 독성을 나타냈다(P<0.001). AlCl<sub>3</sub>, 110 µM, 130 µM, 150 µM에서 대조군(0.36±0.01)에 비하여 각각 69.4% (0.25±0.02), 52.8% (0.19±0.02), 41.7% (0.15±0.02)의 세포생존율을 보여 XTT<sub>50</sub> 값은 130.0 µM의 처리에서 나타났다(Figure



**Figure 1.** The cytotoxicity of aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) by XTT assay. Cultured cells were incubated with at AlCl<sub>3</sub> concentrations of 110, 130 and 150 µM. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. Abbreviation: AlCl<sub>3</sub>, Aluminum chloride.

1). AlCl<sub>3</sub> 세포독성에 대한 사후분석 결과 150 µM, 130 µM, 110 µM, 대조군의 순으로 세포독성이 높게 나타났다.

2. QU의 항산화능

QU의 항산화능 조사를 위해 배양 세포에 15 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하기 전에 QU, 40 µM과 60 µM을 2시간 동안 각각 처리하였다. 그 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만의 처리에서는 대조군에 비하여 세포생존율이 39.6% (0.19±0.03)로 나타난 반면, 40 µM과 60 µM의 QU의 처리에서는 각각 64.6% (0.31±0.02)와 89.6% (0.43±0.05)로 나타나, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만을 처리에 비하여 모두 유의하게 세포생존율이 증가하였다(P<0.001) (Table 1). QU의 항산화능의 사후분석 결과 세포생존율이 대조군, 60 µM QU, 40 µM QU, 15 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 순으로 높게 나타났다.

3. AlCl<sub>3</sub>의 독성에 대한 QU의 영향

항산화제인 QU의 AlCl<sub>3</sub>의 세포독성에 대한 영향을 알아보기 위하여 XTT<sub>50</sub> 농도의 AlCl<sub>3</sub>를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 QU, 40 µM과 60 µM 각각 농도를 처리하였다. 그 결과, AlCl<sub>3</sub>만의 처리에서 세포생존율이 대조군에 비하여 37.0% (0.17±0.01)로 나타났고, 40 µM과 60 µM QU의 처리에서는 각각 60.9% (0.28±0.04)와 76.1% (0.35±0.01)로 나타났다(P<0.001) (Table 2). AlCl<sub>3</sub>의 세포독성에 대한 QU 영향의 사후분석결과 대조군, 60 µM QU, 40 µM QU, AlCl<sub>3</sub> (XTT<sub>50</sub>) 순으로 세포생존율이 높은 것을 알 수 있었다.

4. AY 추출물의 세포독성

AY 추출물의 독성분석을 위하여 추출물이 각각 30~90 µg/mL 농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 처리한 결과 30 µg/mL와 50 µg/mL 농도에서 세포생존율이 대조군에 비하여 98.0% (0.50±0.03)와 96.1% (0.49±0.02)로 각각 나타났다. 또한, 70 µg/mL와 90 µg/mL 농도에서 세포생존율은 각각 92.2% (0.47±0.02)와 86.3% (0.44±0.02)로 나타났다(P<0.001)

**Table 1.** The antioxidative ability of quercetin (QU) on the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in cultured C<sub>6</sub> glioma cells

Concentrations of QU (µM)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean	±SD			
Control <sup>a</sup>	0.48	±0.05	92.73	<0.001	a>d>c>b
15 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>b</sup>	0.19	±0.03			
40 <sup>c</sup>	0.31	±0.02			
60 <sup>d</sup>	0.43	±0.05			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: QU, quercetin; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide.



**Table 2.** The effect of quercetin (QU) on the cytotoxicity induced by aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) in cultured C<sub>6</sub> glioma cells

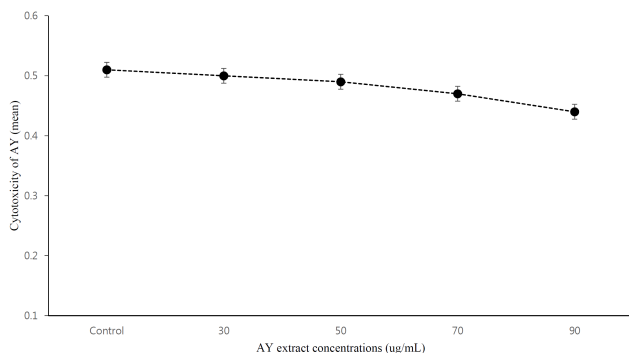
Concentrations of QU (μM)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean ± SD				
Control <sup>a</sup>	0.46 ± 0.03		205.61	<0.001	a>d>c>b
AlCl <sub>3</sub> (XTT <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	0.17 ± 0.01				
40 <sup>c</sup>	0.28 ± 0.04				
60 <sup>d</sup>	0.35 ± 0.01				

The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments.  
Abbreviations: QU, quercetin; AlCl<sub>3</sub>, aluminum chloride.

**Table 3.** The protective effect of *Aster yomena* (Kitam.) (AY) extract on the cytotoxicity induced by aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) in cultured C<sub>6</sub> glioma cells

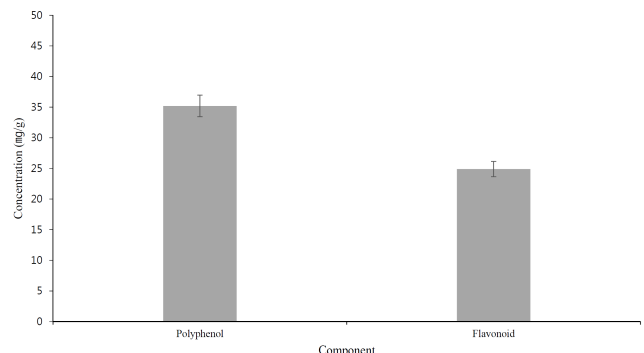
Concentrations of AY extract (μg/mL)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean ± SD				
Control <sup>a</sup>	0.38 ± 0.03		91.33	<0.001	a>d>c>b
AlCl <sub>3</sub> (XTT <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	0.15 ± 0.03				
50 <sup>c</sup>	0.20 ± 0.04				
70 <sup>d</sup>	0.24 ± 0.02				

The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments.  
Abbreviations: AY, *Aster yomena* (Kitam.); AlCl<sub>3</sub>, aluminum chloride.



**Figure 2.** The cytotoxicity of *Aster yomena* (Kitam.) (AY) extract on cultured C<sub>6</sub> glioma cells. Cultured cells were incubated with AY extract at concentrations of 30, 50, 70 and 90 μg/mL. The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from the control.

(Figure 2). AY 추출물의 독성에 대한 사후분석결과 30 μg/mL, 50 μg/mL, 70 μg/mL 간에는 통계적으로 차이가 나타나지 않았으나, 30 μg/mL, 50 μg/mL, 70 μg/mL 순으로 세포생존율이 높았다. 또한 70 μg/mL는 대조군과 통계적인 차이가 없었고, 70 μg/mL와 90 μg/mL와도 통계적인 차이가 없었다. 그러나 대조군과 90 μg/mL의 세포생존율이 통계적으로 차이가 나타나, 대조군에 대한 유의한 세포생존율의 감소상을 보이는 최대 허용한계 농도는 90 μg/mL 이상에서 나타났다. 따라서 본 실험에서는 AY 추출물을 90 μg/mL 이하의 농도로 사용하였다.



**Figure 3.** The component of *Aster yomena* (Kitam.) extract. Data are mean ± SD. The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments.

## 5. AY 추출물의 성분함량

AY 추출물성분 중 폴리페놀의 함량은 35.2 mg/g으로, 플라보노이드 함량은 24.9 mg/g으로 각각 나타났다(Figure 3).

## 6. AlCl<sub>3</sub>의 세포독성에 대한 AY 추출물의 영향

AlCl<sub>3</sub>의 세포독성에 대한 AY 추출물의 영향에 있어서, XTT<sub>50</sub>농도의 AlCl<sub>3</sub>를 배양 세포에 처리하기 전에 50 μg/mL와 70 μg/mL의 추출물을 각각 처리한 결과, AlCl<sub>3</sub>의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 39.5% (0.15 ± 0.03)로 나타났는데 비하여 50 μg/mL 추출물 처리에서는 52.6% (0.20 ± 0.04)로 나타났다. 또한 70 μg/mL 추출물 처리에서는 63.2%

(0.24±0.02)로 나타나 AlCl<sub>3</sub>만의 처리에 비하여 유의한 증가를 나타냈다( $P<0.001$ ) (Table 3). AlCl<sub>3</sub>의 세포독성에 대한 AY 추출물 영향의 사후분석결과 대조군, 70 µg/mL AY 추출물, 50 µg/mL AY 추출물, AlCl<sub>3</sub> 순으로 세포생존율이 높게 나타났다.

7. XO 저해 활성

XO 저해 활성 측정을 위하여 AY 추출물 50 µg/mL와 70 µg/mL의 시료를 각각 분석한 결과 50 µg/mL 추출물의 처리에서는 XO 활성이 78.3%(0.47±0.04)로 나타났으며, 70 µg/mL의 처리에서는 73.3% (0.44±0.02)로 나타났다(Table 4). 따라서, XO 저해능은 50 µg/mL와 70 µg/mL에서 각각 21.7%와

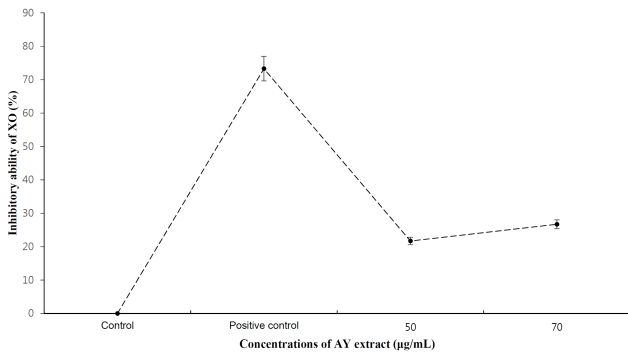


Figure 4. The inhibitory ability of xanthine oxidase (XO) of *Aster yomena* (Kitam.) extract determined at a wavelength of 292 nm. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.

Table 4. The inhibitory activity of xanthine oxidase (XO) of *Aster yomena* (Kitam.) (AY) extract at a wavelength of 292 nm

Concentrations of AY extract (µg/mL)	XO-inhibitory activity (292 nm)	F	P	Tukey HSD
	Mean±SD			
Control <sup>a</sup>	0.60±0.04	236.43	<0.001	a>c, d>b
60 µM QU <sup>b</sup>	0.16±0.02			
50 <sup>c</sup>	0.47±0.04			
70 <sup>d</sup>	0.44±0.02			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: AY, *Aster yomena* (Kitam.); QU, quercetin; XO, xanthine oxidase.

Table 5. Superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity of *Aster yomena* (Kitam.) (AY) extract determined at a wavelength of 560 nm

Concentrations of AY extract (µg/mL)	SAR-scavenging activity (560 nm)	F	P	Tukey HSD
	Mean±SD			
Control <sup>a</sup>	0.43±0.02	286.91	<0.001	a>c, d>b
60 µM QU <sup>b</sup>	0.13±0.01			
50 <sup>c</sup>	0.35±0.02			
70 <sup>d</sup>	0.33±0.03			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: AY, *Aster yomena* (Kitam.); QU, quercetin; SAR, superoxide anion radical.

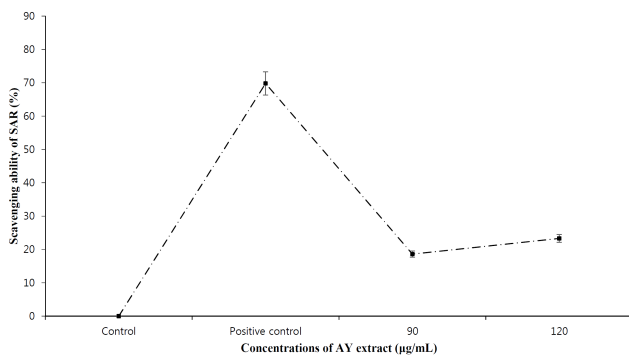
26.7%로 대조군에 비하여 유의한 저해능을 나타냈고( $P<0.001$ ), 특히 추출물 70 µg/mL의 농도에서는 양성대조군인 QU 저해능인 73.3% ( $P<0.001$ )의 35% 이상으로 나타났다 (Figure 4). AY 추출물에 대한 XO 저해능의 사후분석결과와 저해능은 60 µM QU, 70 µg/mL AY 추출물과 50 µg/mL AY 추출물, 대조군 순으로 높았다.

8. SAR-소거 활성

SAR-소거 활성 측정을 위한 AY 추출물 50 µg/mL와 70 µg/mL의 시료를 각각 분석한 결과 50 µg/mL 추출물의 처리에서는 SAR 활성이 81.4% (0.35±0.02)로 나타났으며, 70 µg/mL의 처리에서는 76.7% (0.33±0.03)로 나타났다(Table 5). 따라서, SAR-소거능은 50 µg/mL와 70 µg/mL에서 각각 18.6%와 23.3%로 이는 대조군에 비하여 유의한 소거능을 나타냈고 ( $P<0.001$ ), 특히 추출물 70 µg/mL의 농도에서는 양성대조군인 QU의 SAR-소거능인 69.8% ( $P<0.001$ )의 30% 이상인 것으로 나타났다(Figure 5). AY 추출물에 대한 SAR-소거능의 사후분석결과와 소거능은 60 µM QU, 70 µg/mL AY 추출물과 50 µg/mL AY 추출물, 대조군 순으로 높았다.

고찰

염화알루미늄(AlCl<sub>3</sub>)은 수렴제를 비롯하여 화장품, 의약품,



**Figure 5.** The superoxide anion-radical (SAR) scavenging ability of *Aster yomena* (Kitam.) extract determined at a wavelength of 560 nm. The data indicate the mean $\pm$ SD for triplicate experiments.

섭유염색과 같은 산업용품제조에 있어 사용용도가 다양하지만, 이보다는 음식물의 포장지를 비롯한 방부제나 음식이나 음료용기 등에 사용됨으로써 우리의 식생활과도 직접적으로 연관되어 있다[8]. 따라서,  $AlCl_3$  독성이 중요시되면서 독성에 대한 예방이나 치료에 대한 관심이 높아지게 되었으며,  $AlCl_3$ 와 같은 알루미늄화합물들은 치매유발물질로 알려져 있는 만큼 이의 취급이나 관리에 많은 주의가 요구되고 있다[5]. 따라서, 본 연구에서는  $AlCl_3$ 에 대한 신경독성을 조사하기 위하여, 배양중인 C6 glioma세포에  $AlCl_3$ 가 각각 110~150  $\mu$ M로 포함된 배양액에서 48시간 동안 처리한 결과 처리농도에 비례하여 세포생존율이 유의하게 감소함으로써 신경독성을 나타냈으며, 이 과정에서  $XTT_{50}$ 값이 130.0  $\mu$ M에서 나타나 Borenfreund와 Puerner [27]의 독성판정기준으로 중간독성(mid-cytotoxic)으로 나타났다. 본 연구 결과는 뇌세포에서 알루미늄의 신경독성[28]을 보고한 결과와 알루미늄의 뇌독성[5]을 보고한 결과와 일치하였다. 본 연구와 같이  $AlCl_3$ 의 독성현상은  $AlCl_3$ 가 신경세포의 전달물질분비방해[29]나 신경세포내 신경원섬유의 변화를 초래하여 세포를 퇴화시켰을 가능성도 배제할 수는 없지만[30], 그보다  $AlCl_3$ 의 산화적 손상에 의한 가능성이 클 것으로 생각된다. 이 같은 이유의 하나로  $AlCl_3$ 의 독성이 항산화제인 비타민 E에 의하여 방어되었다는 보고가 이를 제시하고 있다[8]. 따라서, 본 연구에서는  $AlCl_3$ 의 독성과 산화적 손상의 관련성을 알아보기 위하여 항산화제의 일종인 QU를  $AlCl_3$   $XTT_{50}$  농도를 배양세포에 처리하기 전 40  $\mu$ M과 60  $\mu$ M 농도를 각각 처리한 결과  $AlCl_3$ 만의 처리에서는 세포생존율이 37.0%로 나타났는데 비하여 QU의 처리에서는 각각 60.9%와 76.1%로 나타나 모두  $AlCl_3$ 만의 처리보다 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다. 이 같은 결과는  $AlCl_3$ 의 독성에 의한 산화적 손상을 항산화제인 QU가 방어한 것으로  $AlCl_3$ 의 독성에 자유라디칼이 관여하고 있음을 증

명하고 있다. 이는  $AlCl_3$ 의 독성을 항산화제인 비타민 E [8]와, BHT [28]가 방어하였다는 연구 결과와 일치함을 알 수 있었다. 한편,  $AlCl_3$ 의 독성에 대한 AY 추출물의 영향을 항산화 측면에서 알아보기 위하여 먼저 AY 추출물에 대한 항산화 성분에 대한 함량분석을 시행하였다. 이를 위해 추출물속에 함유되어 있는 캄페롤을 비롯한 QU나 quercetinrhamnoside, kaempferol-3-glucorhamnoside. 이소퀘르시트린과 같은 페놀성 플라보노이드계통에 대한 총 폴리페놀과 총 폴리페놀노이드 함량을 조사한 결과 각각 35.2 mg/g과 24.9 mg/g으로 나타났다. 본 결과는 Lee 등[11]이 AY 추출물에서 측정된 32.7 mg/g과 21.1 mg/g보다는 다소 높으나 거의 유사한 함량인 것으로 나타났다. 추출물속의 페놀성 성분함량이 많을수록 더 높은 항산화능을 나타내게 됨은 이미 잘 알려진 사실이다. 따라서, 본 연구에서는 AY 추출물의 항산화능에 대한 분석을 위하여 XO 저해능과 SAR-소거능과 같은 항산화 분석을 행하였다. XO 저해능의 측정법은 세포의 대사 중에 XO는 산소를 전자수용체로 이동시켜서 XO나 하이포크산틴(hypoxanthine)으로부터 요산이 생성되게 하는데 이 대사과정 중에 자유라디칼이 형성되므로 XO의 활성 저해는 결국 자유라디칼의 생성을 저해하는 것이 된다[26]. SAR-소거능 분석은 자유라디칼의 일종인 초과산화물음이온( $O_2^-$ )을 제거하는 능력을 측정하는 정량적 분석법이다[31]. 먼저, XO 저해능 조사에 있어서, 추출물 50  $\mu$ g/mL와 70  $\mu$ g/mL에서 각각 21.7%와 26.7%로 나타나 대조군에 비하여 모두 높은 저해능을 나타냈다. 이 같은 결과는 한련초(*Eclipta prostrata* L.) 추출물의 28.6% (110  $\mu$ g/mL)에 비하면[32] 다소 낮으나 거의 비슷한 저해능을 보여주었다. SAR-소거능 조사에서, AY 추출물 50  $\mu$ g/mL와 70  $\mu$ g/mL에서 각각 18.6%와 23.3%로 나타나 대조군에 비하여 모두 높은 소거능을 보였다. 이는 Jung 등[28]이 금은화(*Lonicerae flos*) 추출물에서 보고한 35.8% (100  $\mu$ g/mL)에 비하면 다소 낮으나 모두 높은 소거능을 보여주었다. 이 같은 다소의 차이는 추출물에 따른 식물종이나 또는 처리농도의 차이 등에 기인한 것으로 생각된다. 이와 같이 AY 추출물의 높은 XO 저해능과 SAR-소거능은 추출물속에 함유된 캄페롤, QU, 이소퀘르시트린 등과 같은 항산화 성분들의 항산화 작용에 기인한 것으로 생각된다. 차후 AY 추출물과 같은 천연성분들에 대한 항산화와 같은 생리활성을 약리를 비롯한 생리나 생화학적 측면에서 종합적인 연구가 이루어져야 할 필요가 있다고 생각된다.

## 요약

본 연구는 치매유발물질의 하나인 염화알루미늄( $AlCl_3$ )의 신경독성을  $C_6$  glioma세포를 배양하여 조사하였으며,  $AlCl_3$ 의 독성에 대한 쑥부쟁이 [*Aster yomena* (Kim.), AY] 추출물의 보호효과를 조사하였다. 또한, 세포생존율을 비롯하여 항산화능 분석인 XO 저해능과 SAR-소거능을 조사하였다. 그 결과  $AlCl_3$ 는 배양 세포에 처리한 농도에 비례적으로 세포생존율을 유의하게 감소시켰다. 이 과정에서  $XTT_{50}$ 값이  $130.0 \mu M$ 로 나타나 Borenfreund와 Puerner의 독성판정기준에 의하여 중간독성 (mid-cytotoxic)으로 나타났다. 한편, 항산화제인 QU는  $AlCl_3$ 의 독성으로 손상된 세포생존율을 유의하게 증가시켰다. 또한,  $AlCl_3$ 의 독성에 대한 AY 추출물의 방어효과에 있어서, AY 추출물은  $AlCl_3$ 만의 처리에 비하여 세포생존율을 유의하게 증가시켰으며, 이와 동시에 XO 저해능과 SAR-소거능과 같은 항산화 효과를 나타냈다. 이상의 결과로부터  $AlCl_3$ 의 독성에 산화적 손상이 관여하고 있으며, AY 추출물은 항산화 효과에 의하여  $AlCl_3$ 의 독성을 효과적으로 방어하였다. 따라서, AY 추출물과 같은 천연물질은 질환유발제인  $AlCl_3$ 와 같이 산화적 손상과 관련이 있는 중금속화합물의 독성 완화나 질환의 치료적 개선을 위한 대체물질개발에 있어 유용한 소재인 것으로 생각된다.

**Acknowledgements:** This paper was supported by Wonkwang Health Science University in 2020.

**Conflict of interest:** None

**Author's information (Position):** Seo YM, Professor.

## REFERENCES

- Ellis JM. Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *JAOA*. 2005;105:145-158.
- Kourie JI. Mechanisms of amyloid  $\beta$  protein-induced modification in ion transport systems: implications for neurodegenerative disease. *Cell Mol Neurobiol*. 2001;21:173-213. <https://doi.org/10.1023/a:1010932603406>.
- Bryan-Sisneros AA, Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB. Toxic effect of the  $\beta$ -amyloid precursor protein C-terminus fragment and  $Na^+/Ca^{2+}$  gradients. *Neuroreport*. 2000;11:3357-3360. <https://doi.org/10.1097/00001756-200010200-00019>.
- Anon. Water poisoning in cornwall. *Lancet*. 1988;ii:465.
- Verstraeten SV, Amio L, Oteiza PI. Aluminum and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch Toxicol*. 2008;82:789-802. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0345-3>
- Endoh M, Maiese K, Wagner J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res*. 1994;651:92-100. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90683-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90683-1)
- Oh YH, Park ST. Protective effect of *Prunella vulgaris* L. var *lilacina* Nakai extract on cultured NIH3T3 fibroblasts damaged by mutagenic mercury-induced toxicity. *J People Plants Environ*. 2015;18:41-46. <https://doi.org/10.11628/ksppe.2015.18.1.041>
- 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;16:251-256.
- Ma J, Luo XD, Protiva P, Yang H, Ma C, Basile MJ, et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). *J Nat Prod*. 2003;66:983-986. <https://doi.org/10.1021/np020576x>
- Yun J, Woo ER, Lee DG. Isoquercitrin, isolated from *Aster yomena* triggers ROS-mediated apoptosis in *Candida albicans*. *J Funct Foods*. 2016;22:347-357. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.041>
- Lee JY, Park JY, Kim HD, Lee SE, Lee JH, Lee YJ, et al. Anti-oxidant and anti-adipocyte differentiation of *Aster glehni* and *Aster yomena*. *J Nutr Health*. 2019;52:250-257. <https://doi.org/10.4163/jnh.2019.52.3.250>
- Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta*. 2001;212:323-331. <https://www.jstor.org/stable/23386118>
- Meydani M. Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(6 Suppl):1665-1668. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1665S>
- Sim JH, Lee HS, Lee SY, Park DE, Oh KH, Hwang KA, et al. Anti-asthmatic activities of an ethanol extract of *Aster yomena* in an ovalbumin-induced murine asthma model. *J Med Food*. 2013;17:606-611. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.2939>
- Choi JH, Kim DW, Park SE, Choi BS, Sapkota K, Kim S, et al. Novel thrombolytic protease from edible and medicinal plant *Aster yomena* (Kitam.) Honda with anticoagulant activity: purification and partial characterization. *J Biosci Bioeng*. 2014;118:372-377. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.03.004>
- Bae JS, Kim TH. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Aster yomena* extract. *Kor J Herbol*. 2009;24:121-126.
- Han MH, Jeong JS, Jeong JW, Choi SH, Kim SO, Hong SH, et al. Ethanol extracts of *Aster yomena* (Kitam.) Honda inhibit adipogenesis through the activation of the AMPK signaling pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Drug Discov Ther*. 2017;11:281-287. <https://doi.org/10.5582/ddt.2017.01046>
- Lee YJ, Jang YN, Han YM, Kim HM, Jeong JM, Son MJ, et al. Skin barrier protective effects of *Aster glehni* extract in human keratinocytes HaCaT cells treated with sodium dodecyl sulfate (SDS detergent) and 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB, dermatitis inducer, sensitizer). Seoul: KFN International Symposium and Annual Meeting; 2016. p408-409.
- Hwang KA, Hwang YJ, Song J. *Aster yomena* extract ameliorates pro-inflammatory immune response by suppressing NF- $\kappa$ B activation in RAW 264.7 cells. *J Chin Med Assoc*. 2018;81:102-110. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.06.017>
- Lee WJ, Woo ER, Lee DG. Effect of apigenin isolated from *Aster yomena* against *Candida albicans*: apigenin-triggered apoptotic pathway regulated by mitochondrial calcium signaling. *J Ethno-*



- pharmacol. 2019;231:19-28. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.005>
21. Kim SO, Jeong JS, Choi YH. Antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Aster yomena* in RAW 264.7 macrophages. *J Life Sci.* 2019;29:977-985. <https://doi.org/10.5352/JLS.2019.29.9.977>
  22. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7:41-53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
  23. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.* 1983;65:55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
  24. AOAC. Official methods of analysis. 18th ed. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists; 2005. Vol 45, p21-22.
  25. Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol.* 2000;71:109-114. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00189-0)
  26. Stirpe F, Corte ED. The regulation of rat liver xanthine oxidase conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem.* 1969;244:3855-3861.
  27. Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth.* 1985;9:7-9.
  28. Jung JY, Jung IJ, Jekal SJ. The protective effect of *Lonicerae flos* extract on cultured C6 glioma cells damaged by aluminum of dementia. *Korean J Clin Lab Sci.* 2017;49:271-278. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2017.49.3.271>
  29. Deloncle R, Guillard. Mechanisms of Alzheimer's disease: arguments for a neurotransmitter-aluminium complex implication. *Neurochem Res.* 1990;15:1239-1245. <https://doi.org/10.1007/BF01208586>
  30. Wisniewski HM, Struman JA, Shek JW. Aluminum chloride induced neurofibrillary changes in the developing rabbit: a chronic animal model. *Ann Neurol.* 1980;8:479-490. <https://doi.org/10.1002/ana.410080505>
  31. Chung JH, Rim TS, Seo YM. Protective effect of *Albizia julibrissin* leaf extract on the cytotoxicity induced by cupric acetate metallic mordant. *J Environ Health Sci.* 2019;45:520-528. <https://doi.org/10.5668/JEHS.2019.45.5.520>
  32. Lee SH, Jung IJ, Jang HS. The antioxidative effect of *Eclipta prostrata* L. extract on cultured NIH3T3 fibroblasts injured by manganese-induced cytotoxicity. *Biomed Sci Lett.* 2018;24:357-364. <https://doi.org/10.15616/BSL.2018.24.4.357>