

금은화에서 분리한 Caffeic Acid의 신경세포보호 활성

손예림¹ · 마충제^{1,2*}

¹강원대학교 의생명과학대학 생물의소재공학과, ²강원대학교 의생명과학연구소

Neuroprotective Activity of Caffeic Acid Isolated from *Lonicera japonica*

Yerim Son¹ and Choong Je Ma^{1,2*}

¹Department of Medical Biomaterials Engineering, College of Biomedical Science,
Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

²Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Abstract – We previously reported that caffeic acid isolated from *Lonicera japonica* showed potent neuroprotective activities against glutamate injured neuronal cell death in primary cortical cells. In this study, we tried to confirm the neuroprotective activity in glutamate injured HT22 cells and elucidate mechanisms of neuroprotective action of caffeic acid. We used glutamate induced HT22 cell death as a bioassay system. The compound decreased reactive oxygen species increased by high concentration of glutamate treatment in HT22 cells. Also, Ca²⁺ concentration was decreased by this compound. This compound made mitochondrial membrane potential maintain to normal condition. This also affected anti-oxidative enzymes and glutathione contents. Treatment of this compound increased not only glutathione reductase and peroxidase to the control level and also amount of glutathione, an endogeneous antioxidant. These experimental results showed that caffeic acid isolated from *L. japonica* exerted potent neuroprotective activity through the anti-oxidative pathway.

Keywords – *Lonicera japonica*, Caffeic acid, Neuroprotection, Antioxidant, Alzheimer's disease

최근 의료 및 과학기술의 발달은 인간의 수명을 비약적으로 연장시켜 주었다. 이로 인해 알츠하이머 병과 같이 노화와 매우 밀접한 관련이 있는 질병의 발병률이 급속히 증가하고 있으나 이에 대한 본질적인 치료는 이루어지지 못하고 있는 실정이다.¹⁾ 알츠하이머 병은 다양한 치매의 형태 중 가장 흔하게 발견되는 퇴행성 뇌신경계 질환으로 다양한 원인에 의하여 발병하는 것으로 알려져 있으나 정확한 발병 기전과 원인은 알려져 있지 않다.²⁾ 가장 대표적으로 알려진 알츠하이머 병의 원인으로는 베타 아밀로이드라는 단백질의 침착으로 인하여 뇌세포가 사멸되어 신경계가 작동을 하지 못하는 것이 중요한 원인중의 하나로 알려져 있다.³⁾ 그 외에도 뇌 세포에 존재하는 타우 단백질이 과인산화되어 알츠하이머를 유발 할 수도 있는 것으로 알려져 있고, 산화적 스트레스나 염증반응에 의하여 뇌신경세포의 사멸이 발생하여 알츠하이머 병이 발병한다는 보고도 있다.^{4,6)}

본 연구진은 산화 스트레스에 의한 신경세포의 사멸을 막

는 천연물을 발굴하기 위하여 수 종의 천연물 추출물을 대상으로 glutamate로 산화스트레스를 유발한 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포주를 검색계로 하여 활성 검색을 수행하였다. 그 결과 금은화(*Lonicera japonica*)의 총 메탄올 추출물이 유의성 있는 강력한 신경세포 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었고,⁷⁾ 추출물의 신경세포 보호 활성을 대표할 수 있는 활성물질을 활성지향적 분리기법을 적용하여 분리 정제하여 5 종의 신경세포 보호 활성 화합물을 동정하였다.⁸⁾ 실험에 독성물질로 사용된 glutamate는 정상상태에서는 체내에 매우 필요한 신경전달물질로서 뇌신경세포에서 기억과 관련된 중요한 역할을 하게 되지만, 고농도에서는 신경세포에 독성을 나타내어 결국에는 세포를 죽게 한다.^{9,10)} 이 때 고농도의 glutamate의 영향으로 뇌신경세포에서는 활성산소종의 생성이 증가하고, 세포 내 칼슘이온의 농도나 산화질소의 농도가 증가하게 된다.^{11,12)} 또한, 고농도의 glutamate는 산화스트레스로 인한 세포의 사멸을 막기 위하여 체내에서 생산되는 글루타치온 퍼옥시다제(glutathione peroxidase)와 글루타치온 리덕타제(glutathione reductase)의 활성을 낮추고, 체내에서 생성되는 항산화제인

*교신저자(E-mail): cjma@kangwon.ac.kr
(Tel): +82-33-250-6565

글루타치온의 양을 낮추어 신경세포가 제 기능을 하지 못하고 죽거나 손상되게 된다.¹³⁾

본 연구에서는 이미 HT22 세포주에서 신경세포 보호 활성이 보고된 금은화 추출물로부터 분리 정제한 caffeic acid가 신경세포 보호 활성을 나타내는 작용기전을 밝히고자 하였다. glutamate로 산화 스트레스 독성을 준 HT22 세포주에서 세포의 사멸과 관련된 바이오 마커의 변화를 측정하여 각 화합물의 약리작용기전을 확인하는 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료 - Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum(FBS)은 Gibco(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였고, Glutamic acid, MTT solution, Trolox, NADPH, DTNB, GSSG-R(Glutathione disulfide reductase), GSSG oxidase, GSH(L-glutathione reduced), 2,7-dichlorofluorecin diacetate(DCF-DA), Fura-2AM, Rhodamin 123, Triton X-100, penicillin과 streptomycin은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO)는 대정화금TM에서 구입하여 사용하였다.

Caffeic Acid의 분리 및 구조 동정 - 금은화 시료는 경동 시장에서 구입하여 대전대학교 서영배 교수의 검증을 받고 사용하였다. 8 kg의 금은화를 80% 메탄올로 초음파 추출하여 총 메탄올 추출물 861 g을 얻었다. 이를 물에 현탁시킨 후 CHCl₃로 분획하여 CHCl₃분획물 97 g을 얻었고 silica gel을 고정상으로 한 open column chromatography를 수행하여 hexane-EtOAc의 용매조건(80:1, 40:1, 20:1, 5:1, 2:1, 1:1, EtOAc, MeOH)에서 10개의 소분획(F01-F10)으로 나눌 수 있었다. F03 분획층을 sephadex LH-20을 고정상으로 하고 MeOH를 이동상으로 한 open column chromatography를 실시하여 caffeic acid 7.2 mg을 얻을 수 있었다. Caffeic acid의 구조는 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR의 spectroscopic data를 통하여 동정할 수 있었다.

HT22 세포 배양 - glutamate에 의한 세포 독성에 대한 연구를 수행하기 위해 마우스 해마 유래 세포주인 HT22 cell을 사용하였다. 세포 배양은 기존에 발표했던 원의 방법을 수정하여 수행하였다.¹⁴⁾ 요약하면, 세포 배양액은 10%의 FBS 과 1%의 penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM 배지를 사용하여 HT22 cell을 배양하였다. 세포 배양은 37°C의 온도로 CO₂ incubator에서 진행이 되었으며 5%의 CO₂를 공급하여 주었다. 시료나 독성물질을 처리하기 전까지 세포가 최적의 조건으로 배양될 수 있도록 2-3일 마다 한번 씩 계대 배양해 주었다.

뇌신경세포 보호 활성 측정 - 뇌신경세포 보호 활성은 기존의 방법을 수정하여 진행하였다.¹⁴⁾ 세포 생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 배양된 HT22 cell을 48 well

plate에 1.7×10⁵ cells/well의 농도로 seeding 하고 37°C, 5%의 CO₂의 조건으로 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 후 control, negative control well에는 배지를, positive control well에는 50 μM trolox를, 나머지 well에는 각각의 농도가 다른 caffeic acid 시료를 처리하여 주었다. 약 한 시간 정도 배양 후 control을 제외한 모든 well에 glutamate(3 mM)을 투여하였다. 이 때 모든 처리량은 30 μl/well로 하였다. 처리 후 24 시간 incubation 하고, 모든 well에 150 μl/well의 MTT solution(1 mg/ml in PBS)을 가하였다. 3 시간 incubation 후 각 well의 배지를 suction하여 모두 제거하고 DMSO solution을 300 μl/well로 처리하고 빛을 차단한 상태에서 30 분간 두어 formazan crystal을 충분히 녹여주었다. 다 녹인 solution을 96 well plate에 200 μl/well로 옮기고 ELISA reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 같은 조건에서 3 회 반복하였고, 얻어진 결과값을 통계 처리 하였다.

세포 내 ROS 측정 - HT22 cell에 glutamate와 trolox, 및 시료를 처리하고 37°C에서, 5%의 CO₂의 조건으로 배양하였다. 8 시간 후 100 μM의 DCF-DA를 40 μl 첨가하고 1 시간 동안 배양하였다. 이 후 배지를 제거하고 1.0%의 triton X-100 30 0 μl로 37°C에서 15 분간 녹여 내었다. 형광도는 excitation wavelength - 490 nm / emission wavelength - 525 nm로 두 번 측정하여 비교하였다. 실험은 같은 조건에서 3 회 반복하였고, 얻어진 결과 값을 통계처리 하였다.

세포 내 Ca²⁺ 농도 측정 - 배양된 HT22 cell에 trolox와 sample을 처리하고 모든 well에 20 μM의 Fura-2AM 10 μl를 넣고 1 시간 배양 후 glutamate를 처리하고 37°C에서 2 시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 1.0%의 Triton X-100 150 μl로 37°C에서 15 분간 녹여낸다. 형광도는 calcium complex - 340 nm / calcium free - 510 nm로 두 번 측정하여 비교하였다. 실험 결과는 세 번 반복하여 측정 한 값을 통계처리 하였다.

미토콘드리아 막전위 손상 억제 효과 측정 - 배양된 HT22 cell에 trolox와 각각의 농도의 sample을 처리하고 1 시간 후 2 mM의 glutamate를 처리해 세포 사멸을 유도하였다. 10 μl의 rhodamine 123을 첨가하고 37°C에서 30 분간 배양 후 PBS로 3 회 세척하였다. 형광도는 excitation wavelength - 480 nm / emission wavelength - 525 nm에서 두 번 측정하여 비교하였다. 실험 결과는 세 번 반복 실험 후 측정 한 값을 통계처리 하였다.

글루타치온 총 함량 및 항산화 효소 활성 측정 - HT22 cell을 6 well plate에 3.4×10⁴ cells/well로 1 ml씩 seeding 하고 24 시간 동안 배양한 뒤, 각각 다른 농도의 화합물, trolox를 각각 처리하고 1 시간 후 2 mM의 glutamate를 첨가하였다. 24 시간 배양 후 PBS로 2 회 세척하고 10,000 g, 4°C 조건으로 30 분간 원심분리를 하여 배지를 제거하고

170 μ l의 상층액을 수집하여 항산화 효소와 글루타치온의 양을 측정하였다. 글루타치온 총 함량은 312 nm에서 흡광도를 측정, 항산화 효소 활성 측정은 340 nm에서 각각 흡광도를 측정하였다. 실험 결과는 세 번 반복 실험 이후 측정된 값을 통계처리 하였다.

결과 및 고찰

MTT Assay를 통한 뇌신경세포 보호 활성 측정 - Caffeic acid가 glutamate에 의하여 사멸한 신경세포를 보호해 주는 지 확인하기 위하여 마우스 유래 해마 세포주인 HT22 세포에서 glutamate에 의하여 흥분성 신경독성을 유발한 후 이에 대한 caffeic acid의 영향을 실험하였다. glutamate는 정상 농도에서는 신경전달물질로서 중요한 역할을 수행하지만, 고농도의 glutamate는 흥분성 신경독성을 유발하여 세포 내 활성산소종을 증가시켜 산화적인 스트레스에 의해 신경세포의 사멸을 유도한다고 알려져 있다.⁴⁾ 먼저, glutamate의 적절한 독성 농도를 결정하기 위하여 glutamate의 농도에 따른 신경세포의 사멸 정도를 평가하였다. 그 결과 3 mM의 glutamate를 처리하였을 때 신경세포가 60% 정도 생존하여 3 mM의 농도로 결정하였다. Caffeic acid의 신경세포 보호 활성을 평가하기 위하여 3 mM의 glutamate를 처리하여 HT22 세포의 사멸을 유발시킨 후 24 시간 후에 세포 생존율을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. Caffeic acid의 농도를 1.0 μ M, 10.0 μ M, 100.0 μ M로 하여 glutamate를 처리하기 1 시간 전에 투여하고 glutamate를 투여한 후 24 시간 뒤에 세포의 생존율을 평가한 결과 농도의존적으로 유의성있는 신경세포 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 1). Glutamate로 유도된 HT22 세포에 대한 caffeic acid의 보호 활성이 어떤 기전을 통해 이루어 지는지 확인하기 위하여 세포 내 ROS, Ca^{2+} 농도, 미토콘드리아 막전위의 손상 억제 및 글루타치온 총 함량과 항산화 효소를 측정하는 실험을 진행하였다.

Caffeic Acid가 ROS의 생성에 미치는 영향 - Glutamate의 신경 독성은 ROS의 생성과 산화 스트레스에 의한 신경세포의 손상으로 인하여 매개된다는 점은 비교적 많이 알려져 있다.¹⁵⁾ Caffeic acid의 신경세포 보호 활성이 산화적인 스트레스를 억제하고 항산화 작용을 나타낸 결과인지 확인하기 위하여 세포 내 ROS의 양을 정량할 수 있는 형광시약 DCF-DA를 사용하였다. 실험 결과를 통하여 caffeic acid를 투여한 실험군에서 ROS 생성량이 감소함을 확인할 수 있었다. 저농도인 1 μ M의 caffeic acid의 경우 glutamate 단독처리 한 음성대조군에 비해 약 15%의 감소를 보였으며 농도가 증가할수록 감소량은 크게 증가하여 100 μ M의 caffeic acid를 투여한 실험군에서는 거의 정상상태 수준으로 ROS의 생성량을 감소시켜 주었다(Fig. 1). 이 결과를 통

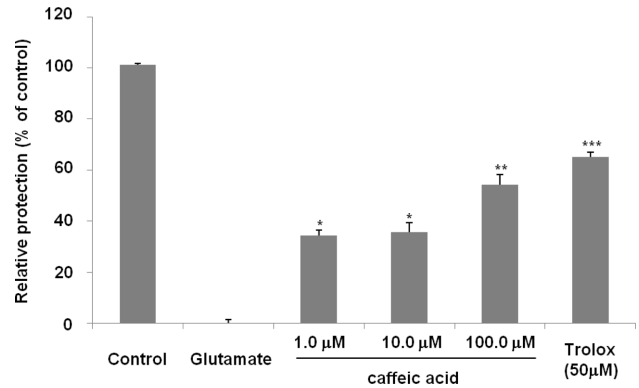


Fig. 1. Effect of caffeic acid (1.0, 10.0 and 100.0 mM) on glutamate-induced death of HT22 cells. Data are means \pm S.D. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 versus the glutamate-treated group

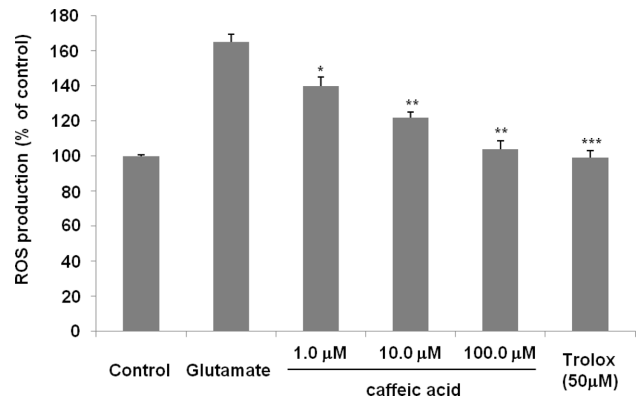


Fig. 2. Effect of caffeic acid (1.0, 10.0 and 100.0 mM) on reactive oxygen species production in glutamate injured HT22 cells. Data are means \pm S.D. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 versus the glutamate-treated group

해 caffeic acid는 투여 농도에 비례하는 강력한 ROS 생성 억제능을 가지며 ROS로 인한 세포 사멸을 막아준다는 것을 확인할 수 있었다.

Caffeic Acid가 세포 내 Ca^{2+} 농도에 미치는 영향 - HT22 세포에서 glutamate의 신경 독성은 고농도의 glutamate에 의하여 세포 내 Ca^{2+} 의 농도가 크게 증가하여 세포의 사멸을 일으킨다고 알려져 있다.¹⁶⁾ caffeic acid가 glutamate로 처리한 HT22 세포에서 Ca^{2+} 의 생성량에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Ca^{2+} 에 특이적으로 형광을 나타내는 Fura-2AM을 사용하여 세포 내 유입된 Ca^{2+} 의 양을 측정하였다(Fig. 3). Caffeic acid를 투여한 실험군에서 투여량이 많아짐에 따라 농도의존적으로 점점 낮은 양의 Ca^{2+} 방출됨을 확인하였고, 100 mM의 caffeic acid를 처리한 실험군에서는 양성대조군인 Trolox와 동등한 수준을 보였다.

Caffeic Acid의 미토콘드리아 막전위 손상 억제 효과 - 최근 연구에 의하면, 미토콘드리아의 항상성이 산화적인 스

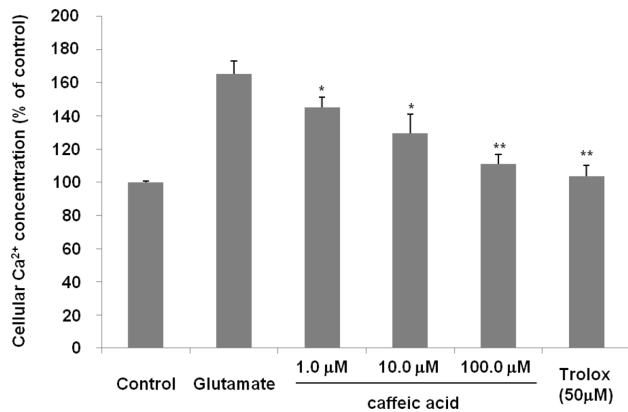


Fig. 3. Effect of caffeic acid (1.0, 10.0 and 100.0 mM) on calcium ion influx in glutamate injured HT22 cells. Data are means ± S.D. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 versus the glutamate-treated group

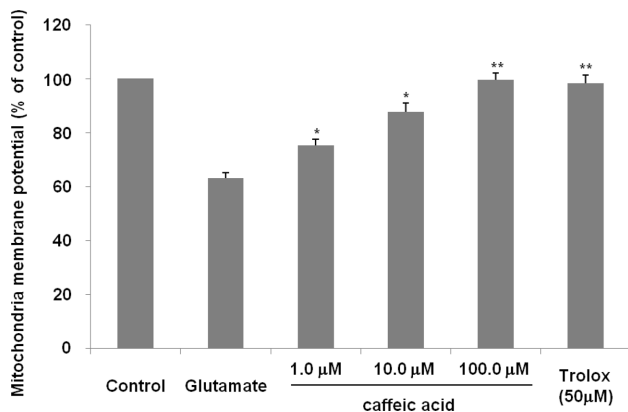


Fig. 4. Effect of caffeic acid (1.0, 10.0 and 100.0 mM) on glutamate-induced disruption of mitochondrial membrane potential in HT22 cells. Data are means ± S.D. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 versus the glutamate-treated group

트레스와 관련된 뇌신경세포의 손상에 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있다.¹⁷⁾ Caffeic acid가 glutamate의 흥분성 신경독성에 의하여 손상된 막전위에 미치는 영향을 확인하기 위하여 미토콘드리아의 막전압을 측정하였고, 이 실험은 glutamate를 처리한 HT22 세포에 형광 염료인 Rhodamine 123을 처리한 후 형광값을 측정하여 수행하였다. 실험 결과, caffeic acid를 처리한 실험군은 Glutamate에 대한 독성을 완화시켜 정상 세포와 비슷한 수준의 막전압을 유지시켰다(Fig. 4). 이러한 결과를 통하여 caffeic acid가 세포 내 ROS의 생성을 억제하여 미토콘드리아의 막전위의 손상을 정상상태로 회복시켜주어 이에 따른 Ca²⁺의 세포 내 유입을 차단하여 신경세포의 사멸을 막아주는 역할을 하는 것으로 생각할 수 있겠다.

Caffeic Acid가 글루타치온 총 함량 및 항산화 효소 활성에 미치는 영향 - 글루타치온은 주요한 항산화제로서 활

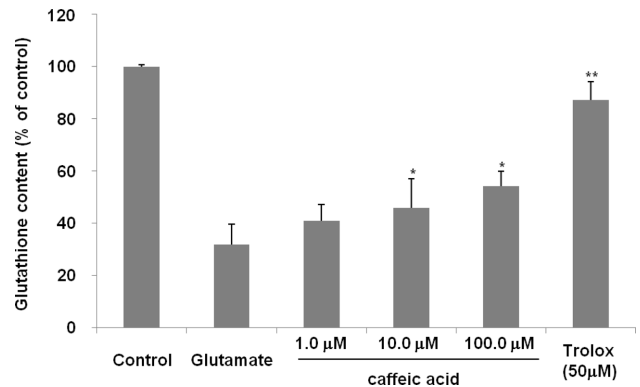


Fig. 5. Effect of caffeic acid (1.0, 10.0 and 100.0 mM) on glutathione level in glutamate injured HT22 cells. Data are means ± S.D. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 versus the glutamate-treated group

성산소종 및 자유라디칼의 제거에 중요한 역할을 하여 신경세포를 독성물질로부터 보호하는 중요한 물질이다. 이러한 글루타치온을 환원형으로 유지하게 하여 항산화 활성을 계속하여 나타내게 하는데 중요한 역할을 하는 글루타치온 리덕타제의 활성 또한 glutamate에 의한 신경세포의 독성을 막는데에 필수적인 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 글루타치온 퍼옥시다아제는 H₂O₂를 물과 산소로 환원시키고, peroxide 라디칼을 알코올과 산소로 환원시키는 항산화 효소로 작용한다. 세포 내 글루타치온의 상실은 알츠하이머병, 파킨슨병과 같은 신경퇴행성 질환에서 감소된 신경통 글루타치온 수치를 발견할 수 있기 때문에 뇌 노화 및 신경퇴행에 대해 기여하는 것으로 생각된다.¹⁸⁾ Caffeic acid가 세포 내 글루타치온 함량 및 항산화 효소의 활성에 어떠한 영향을 주는지 평가하였다. Caffeic acid를 투여한 실험군에서 glutamate에 의하여 감소한 글루타치온의 양을 증가시킴을 확인할 수 있었다. Caffeic acid는 농도의존적으로 글루타치온의 양을 증가시켜 주었으며 100 μM의 농도에서 glutamate만 투여한 군에 비하여 69.7% 함량이 증가함을 보였다(Fig. 5). 또한, caffeic acid는 글루타치온 리덕타제와 글루타치온 퍼옥시다아제에 대해서도 100 μM 농도에서 각각 glutamate 처리군에 비하여 65.3%, 47.8%의 활성 증가를 보였다(Fig. 6A, 6B). 이러한 실험결과를 통하여, caffeic acid는 glutamate로 신경세포 독성을 유발하여 세포의 손상이나 사멸을 일으킨 HT22 세포에서 총 글루타치온의 양을 증가시켜 항산화 작용을 나타내고, 항산화와 관련된 효소인 글루타치온 리덕타제와 글루타치온 퍼옥시다아제의 활성도 유의성있게 증가시키는 것은 caffeic acid의 신경세포 보호 활성은 이 화합물의 항산화 활성에 의하여 이루어지는 것으로 제시할 수 있다. Caffeic acid는 이미 여러 논문에서 신경세포 보호 활성이 보고된 바 있으며 항산화 관련 인자들에 미치는 영향도 실험되어 보고되었다.^{19,20)} Caffeic acid는 glutamate에 의

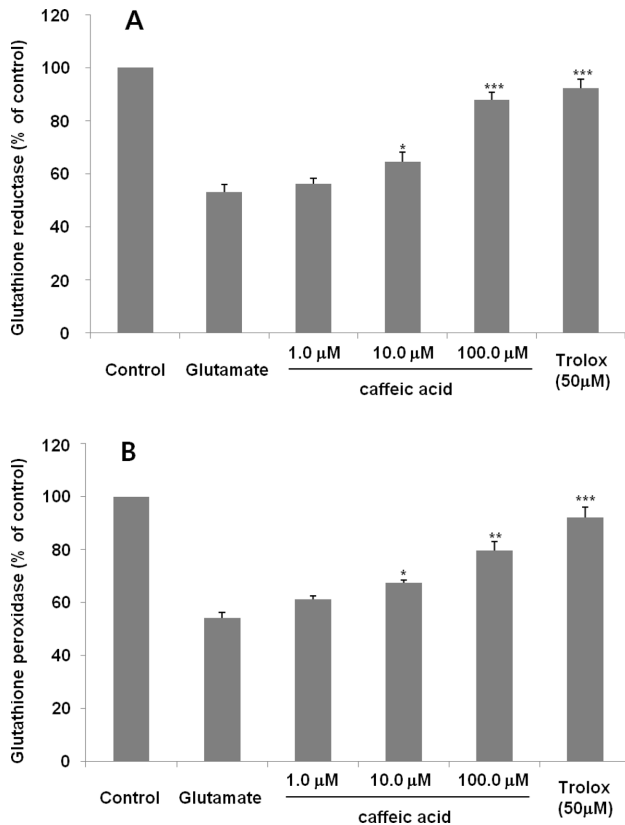


Fig. 6. Effect of caffeic acid (1.0, 10.0 and 100.0 mM) on glutathione reductase (A) and glutathione peroxidase (B) in glutamate injured HT22 cells. Data are means \pm S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group

하여 나타난 신경세포의 사멸을 막아주었고 이와 관련하여 ROS의 생성을 낮추어 주고, 글루타치온의 생성을 증가시켜 주었다. 본 논문에서는 이와 더불어 미토콘드리아의 막전위 변화에 미치는 영향을 평가한 결과 caffeic acid가 glutamate에 의하여 정상 작동하지 못한 미토콘드리아의 막전위를 정상화 시켜주었으며 글루타치온의 생성과 관련된 글루타치온 리덕타제와 글루타치온 퍼옥시다제의 활성을 평가한 결과 두 효소의 활성을 증가시켜줌을 확인함으로써 caffeic acid의 활성기전을 보다 더 명확히 할 수 있었다. 기존의 연구결과와 본 연구결과를 종합하면 caffeic acid는 구조가 비교적 간단한 phenolic compound로 천연물로부터 쉽게 얻을 수 있고 화학적으로 합성이 용이한 화합물로서 알츠하이머 병과 같은 퇴행성 뇌신경계 질환의 치료제 및 예방약으로 개발할 수 있는 가능성이 있을 것으로 생각된다.

결 론

본 실험 결과를 종합하여 보면, 금은화 추출물로부터 분리한 caffeic acid가 glutamate에 의하여 나타나는 신경세포

의 사멸을 막아준다는 점을 확인할 수 있었다. 또한, caffeic acid의 신경세포 보호는 ROS의 생성을 감소시키고, 세포 내 Ca^{2+} 의 농도를 낮추었으며, 미토콘드리아 막전위를 정상 수준으로 회복시켜 주었고, 글루타치온의 양을 증가시키고 항산화효소의 활성을 증가시키는 등의 실험결과를 통하여 항산화 활성을 통하여 나타냄을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 caffeic acid가 glutamate와 관련된 알츠하이머 병과 같은 퇴행성 뇌신경계질환의 치료제로 개발될 수 있는 가능성이 있음을 시사한다. 향후 동물실험을 통하여 기억력 개선활성이나 인지는 개선활성을 평가해 볼 만한 가치가 있을 것으로 생각된다.

사 사

이 논문은 2016년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2016R1A2B1011384). 또한 이 논문은 2018년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2018R1A6A1A03025582).

인용문헌

- Bradley, M. A., Markesbery, W. R. and Lovell, M. A. (2010) Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein in the brain in preclinical Alzheimer disease. *Free Rad. Biol. Med.* **48**: 1570-1576.
- Mattson, M. P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**: 631-639.
- Seidler, N. W. and Squire, T. J. (2005) A beta-polyacrolein aggregates: novel mechanism of plastic formation in senile plaques. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **335**: 501-504.
- Kuhla, B., Haase, C., Flach, K., Luth, H. J., Arendt, T. and Munch, G. (2007) Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation. *J. Biol. Chem.* **282**: 6984-6991.
- Srivastava, S., Sithu, S. D., Vladykovskaya, E., Haberzettl, P., Hoetker, D. J., Siddiqui, M. A., Conklin, D. J., D'Souza, S. E. and Bhatnagar, A. (2011) Oral exposure to acrolein exacerbates atherosclerosis in apoE-null mice. *Atherosclerosis* **215**: 301-308.
- Sultana, R. and Butterfield, D. A. (2010) Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **19**: 341-353.
- Weon, J. B., Yang, H. J., Lee, B., Yun, B.-R., Ahn, J. H., Lee, H. Y. and Ma, C. J. (2011) Neuroprotective activity of the methanolic extract of *Lonicera japonica* in glutamate-injured primary rat cortical cells. *Pharmacog. Mag.* **7**: 284-288.
- Weon, J. B., Yang, H. J., Lee, B., Yun, B.-R. and Ma, C. J.

- (2011) Neuroprotective compounds isolated from the methanolic extract of *Lonicera japonica*. *Nat. Prod. Sci.* **17**: 221-224.
9. Lin, M. T. and Beal, M. F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**: 787-795.
 10. Kim, M. S., Seo, J. Y., Oh, J., Jang, Y. K., Lee, C. H. and Kim, J. S. (2017) Neuroprotective effect of halophyte *Salicornia herbacea* L. is mediated by activation of heme oxygenase-1 in mouse hippocampal HT22 cells. *J. Med. Food* **20**: 140-151.
 11. Yan, M. H., Wang, X. L. and Zhu, X. W. (2013) Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer's disease and Parkinson disease. *Free Rad. Biol. Med.* **62**: 90-101.
 12. Carrano, A., Hoozemans, J. J. M., van der Vies, S. M., Rozemuller, A. J. M., van Horssen, J. and de Vries, H. E. (2011) Amyloid beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Antioxid. Redox. Signal* **15**: 1167-1178.
 13. Helmut, S. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 916-921.
 14. Jung, Y. S., Weon, J. B., Yang, W. S., Ryu, G. and Ma, C. J. (2018) Neuroprotective effects of Magnoliae Flos extract in mouse hippocampal neuronal cells. *Sci. Rep.* **8**: 9693.
 15. Lee, Y., Shin, D. H., Kim, J. H., Hong, S., Choi, D., Kim, Y. J., Kwak, M. K. and Jung, Y. (2010) Caffeic acid phenethyl ester-mediated Nrf2 activation and IkappaB kinase inhibition are involved in NFkappaB inhibitory effect: structural analysis for NFkappaB inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* **643**: 21-28.
 16. Lee, J. S., Kim, W. Y., Jeon, Y. J., Lee, S. K. and Son, C. G. (2018) *Aquilariae Lignum* extract attenuates glutamate-induced neuroexcitotoxicity in HT22 hippocampal cells. *Biomed. Pharmacol.* **106**: 1031-1038.
 17. Wang, D. D., Jin, M. F., Zhao, D. J. and Ni, H. (2019) Reduction of mitophagy-related oxidative stress and preservation of mitochondria function using melatonin therapy in an HT22 hippocampal neuronal cell model of glutamate-induced excitotoxicity. *Front. Endocrinol.* **10**: Article550.
 18. Kushairi, N., Phan, C. W., Sabaratnam, V., David, P. and Naidu, M. (2019) Lion's mane mushroom, *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) pers. suppresses H₂O₂-induced oxidative damage and LPS-induced inflammation in HT22 hippocampal neurons and BV2 microglia. *Antioxidants* **8**: 261.
 19. Huang, Y., Jin, M., Pi, R., Zhang, J., Chen, M., Ouyang, Y., Liu, A., Chao, X., Liu, P., Liu, J., Ramassamy, C. and Qin, J. (2013) Protective effects of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester against acrolein-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Neurosci. Lett.* **535**: 146-151.
 20. Kling, B., Bucherl, D., Palatzky, P., Matysik, F.-M., Decker, M., Wegener, J. and Heilmann, J. (2014) Flavonoids, flavonoid metabolites, and phenolic acids inhibit oxidative stress in the neuronal cell line HT-22 monitored by ECIS and MTT assay: A comparative study. *J. Nat. Prod.* **77**: 446-454.

(2019. 12. 13 접수; 2020. 1. 6 심사;
2020. 2. 10 게재확정)