



ORIGINAL ARTICLE

Protective Effect of *Celastrus orbiculatus* Thunb Extract on Cultured Neuroglial Cells Damaged by Manganese Dioxide, a Parkinsonism Inducer

Young-Mi Seo

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

파킨슨유발제인 이산화망간으로 손상된 배양 대뇌 신경아교세포에 대한 노박덩굴 추출물의 보호

서영미

원광보건대학교 간호학과

ARTICLE INFO

Received April 29, 2020
Revised May 18, 2020
Accepted May 21, 2020

Key words

Antioxidative effect
Cytotoxicity
Manganese dioxide
Parkinsonism

ABSTRACT

The protective effects of a *Celastrus orbiculatus* Thunb (CO) extract against manganese dioxide (MnO₂)-induced cytotoxicity in cultured C6 glioma cells were examined. This study assessed the antioxidative effects, including the suppressive ability of lipid peroxidation (LP), the inhibitory ability of xanthine oxidase (XO), and the cell viability. MnO₂ decreased the cell viability remarkably in a dose-dependent manner. The XTT₅₀ value was determined to be 146.7 μM in these cultures. The cytotoxicity of MnO₂ was calculated to be mid-toxic using Borenfreund and Puerner's toxic criteria. Kaempferol (KAE) increased the cell viability damaged by MnO₂-induced cytotoxicity significantly. Regarding the protective effects of the CO extract on MnO₂-induced cytotoxicity, the CO extract increased cell viability significantly compared to the MnO₂-treated group. The CO extract also had inhibitory abilities against lipid peroxidation (LP) and xanthine oxidase (XO). From these findings, oxidative stress is involved in the cytotoxicity of MnO₂. The CO extract effectively blocked the cytotoxicity induced by MnO₂ via its antioxidative effects. Conclusively, natural resources, such as the CO extract, might be a useful agent for the diminution or improvement of the heavy metal cytotoxicity correlated with disease through oxidative stress, such as MnO₂, a Parkinsonism inducer.

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

서론

치매나 파킨슨병, 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)과 같은 질환은 모두 뇌병변으로서 뇌세포의 손상에 기인하는 병리적 현상의 하나이다. 이같은 병변은 대부분 뇌세포의 자연적인 노쇠나 또는 뇌조직 자체의 대사이상에서 기인

하는데[1], 이 외에도 알루미늄이나 망간과 같은 중금속이나 MPP와 같은 화학약제 등은 외부적 요인에 의한 세포손상의 원인으로 알려져 있다[2]. 치매는 신경세포내 베타-아밀로이드라는 단백질의 세포침착에 의하여 유발되지만, 파킨슨병은 중간 뇌에 위치하고 있는 도파민계통의 신경세포의 사멸이 주 원인으로 알려져 있다[3]. 그러나 이들 뇌병변이 발생될 경우 인체에서는 곧바로 회복을 위하여 먼저 신경아교세포(neuroglial cell)의 활동이 활발해지는데, 이같은 세포활성에 따라 병변의 예후에 많은 영향을 미치기 때문에 그 역할이 매우 중요하다[4]. 중금속 중 망간은 건전지나 도자기제조, 타일이나 전기용접과 같은

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>

산업부문의 원료로 다양하게 사용되고 있다[5]. 그러나 이의 공정과정 중 흠(fume)이나 분진과 같은 미세면지가 인체의 호흡기를 통해 허파나 간, 심장과 같은 장기는 물론, 피부접촉 시에는 피부염을 비롯한 홍반이나 색소침착과 같은 증상을 초래하게 된다. 그 밖에 망간의 중독현상으로 근무력증을 비롯한 보행장애, 발성이상, 체중감소와 같은 현상을 나타내며, 더 진행되면 점차 뇌에 영향을 미쳐 파킨슨병의 증후를 보이게 된다[6]. 이에 대해 현재 근긴장이나 언어장애 및 근강직과 같은 증상에 대해 L-dopa를 활용한 치료를 하고 있을 뿐, 온전한 치료법은 없는 상태이다. 그럼에도 불구하고 아직도 파킨슨병에 대한 자세한 병리적 기전은 물론, 효과적인 치료법이나 치료약제가 매우 미흡한 실정이다. 또한 파킨슨병의 환경적 요인인 망간에 대한 독성연구는 다수 되어 있으나 세포를 이용한 산화적 손상에 관한 연구는 매우 드물다[7]. 수은이나 철, 납과 같은 중금속류는 이들의 붕괴 시 자유라디칼(free radicals)을 생성하여 산화적 손상을 유발한다고 제시된다[8].

최근, 각종 식물속에 함유된 성분 중에는 항산화제를 비롯한 항염이나 항독, 항균에 유용한 활성물질이 함유되어 있다고 알려져지면서, 이들을 이용한 질환의 치료적 연구가 시도되고 있다. 이들 성분에는 항산화에 유용한 퀘르세틴(quercetin), 캄페롤(kaempferol)과 탄닌(tannin), 항염에 효과적인 커큐민(curcumin)과 사포닌(saponin), 항암에 좋은 엘리지산(ellagic acid)과 루테인(lutein) 등 다양한 성분들을 함유하고 있다. 특히, quercetin이나 kaempferol과 같은 플라보노이드류(flavonoids)나 tannin과 같은 폴리페놀류(polyphenols)는 탁월한 항산화능이 있음이 잘 알려져 있다[9]. 식물 중 노박덩굴(*Celastrus orbiculatus* Thunb, CO)은 노박덩굴과(Celastraceae)에 속하는 낙엽덩굴성 식물로 우리나라에서 자생하고 있다. 꽃은 황록색으로 5~6월에 개화하며 봄과 가을에 걸쳐 잎과 뿌리를 채취한다. 성질은 따뜻하고 조금 매운 맛을 가지고 있어 종기나 해독, 이질, 복통, 근골격계 통증과 같은 여러 질환에 사용되어 왔다. CO는 세라판올(celaphanol)을 비롯하여 세라스트롤(celastrol), flavonoid 배당체, quercetin, kaempferol 및 종자유와 같은 다양한 성분들이 함유되어 있다[10]. 세포배양기술이 발전되면서 여러 종류의 세포주가 개발되었는데 그 중 C6 glioma 세포는 흰쥐의 아교세포종(glioma)으로부터 확립된 세포주로서 별아교세포(astrocyte)와 유사한 특징을 가지고 있다. 별아교세포는 뇌-혈관장벽(brain-blood barrier, BBB)을 형성하여 뇌조직을 보호하는 동시에 신경세포(neuron)에 충분한 영양분을 공급하여 세포생존력을 높여주고 있을 뿐만 아니라, 특히 외부 요인에 의한 뇌손상으로 유발되는

파킨슨병과 같은 질환이 발생된 경우에는 위의 기능과 함께 신진대사를 강화하면서 뇌회복을 돕는 중요한 역할을 한다[11]. 따라서, 본 연구는 내적이나 외적 요인으로 뇌질환에 이환될 경우, 가장 빨리 활성화되어 활발히 반응하는 신경아교세포 일종인 C6 glioma 세포주를 이용하여 파킨슨병 유발제인 MnO₂의 신경독성을 산화적 손상 측면에서 조사하였다. 또한, MnO₂의 독성에 대한 노박덩굴(CO) 추출물의 영향을 지질과산화(LP) 억제제 및 잔틴옥시다제(XO) 저해능과 같은 항산화 측면에서 분석함으로써 파킨슨병의 환경적 요인 중 하나인 망간과 같이 산화적 손상과 관련된 중금속화합물의 독성에 대한 완화 및 치료적 대체물질을 천연물 소재로부터 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약 제조

Manganese dioxide (MnO₂), kaempferol (KAE), trypsin, ethyl alcohol, hydroxyl chloride, ferrous chloride, phosphate buffered saline (PBS), isopropanol, hydrogen peroxide (H₂O₂), potassium phosphate, xanthine, linoleic acid 및 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, disodium salt (XTT), ammonium thiocyanate는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 또한, MnO₂의 제조는 무혈청의 minimum essential medium (MEM, Gibco, USA)을 사용하여 50, 100, 150, 200 μM의 각 저장액을 만들어 사용하였으며, XTT (50 μg/mL) 저장액은 필요한 농도로 희석 사용하였다.

2. CO 채취 및 추출

봄과 가을 사이에 전북 아산에서 전초를 채취한 후 잘 씻어 햇볕에서 말린 다음 시료로 보관 사용하였다. 추출은 배양 세포에 용매적 세포독성이 없는 열수추출[12]을 하기 위하여 보관시료 83.6 g을 약 300 mL의 증류수와 함께 환자플라스크에 넣어 3 시간 동안 3회 반복 가열하여 얻은 액을 여과한 다음 3,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 후 감압농축 후 수율이 4.2%인 3.5 g의 시료를 얻었다.

3. 배양 및 세포생존율(cell viability) 분석

C6 glioma 세포주(ATCC, CCL 107) 배양은 3~4회 계대배양한 세포를 trypsin 효소로 배양용기로부터 분리하여 무혈청 배양액에 부유시킨 다음 1×10⁵ cells/well의 밀도로 배양 용기에 넣고 72시간 동안 36°C, 5% CO₂로 조절된 항온기에서 배양

하였다. 세포생존율 측정은 Mosmann [13]의 방법에 따라 약제를 처리했거나 처리하지 않은 세포에 각 well당 10 μ L의 XTT (50 μ g/mL)를 넣고 항온기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 isopropanol로 처리하여 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA), 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 또한, XTT₅₀값의 산출은 회귀직선식에 의해 구하였다.

4. MnO₂의 처리

배양 C6 glioma 세포에 MnO₂가 120~160 μ M의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 48시간 동안 처리한 후 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다.

5. Kaempferol (KAE)의 항산화능 및 MnO₂에 대한 영향

KAE에 대한 항산화능 조사를 위해 35 μ M H₂O₂를 배양 세포에 처리 전에 KAE, 50 μ M과 70 μ M 농도 각각을 2시간 동안 전 처리한 후 이의 영향을 세포생존율로 조사하였다. 또한, MnO₂에 대한 KAE의 영향 조사는, XTT₅₀ 농도의 MnO₂를 세포에 처리 전 50 μ M과 70 μ M KAE 농도 각각을 2시간 동안 전 처리 후 세포생존율을 조사하였다.

6. CO 추출물의 세포독성 및 MnO₂에 대한 추출물의 영향

CO 추출물의 독성조사는 추출물, 60~150 μ g/mL 농도 각각을 배양 세포에 48시간 동안 처리 후 세포생존율로 최대허용한계농도를 측정하였고 이를 근거로 한계농도 바로 이하인 두 농도를 분석에 사용하였다. 또한, MnO₂에 대한 CO 추출물의 영향조사를 위하여, XTT₅₀ 농도의 MnO₂ 처리전에 90 μ g/mL와 120 μ g/mL 농도의 추출물을 각각 2시간 동안 처리 후 세포생존율로서 이의 영향을 조사하였다.

7. CO 추출물에 대한 함량 분석

폴리페놀분석(polyphenol)은 AOAC [14] 방법에 의하여, 시료 0.2 mL와 phenol reagent 0.2 mM을 3분간 반응시킨 후 0.4 mL sodium carbonate로 1시간 동안 처리하여 ELISA reader, 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tannic acid를 표준시약으로 하여 검량곡선을 작성하였다. 플라보노이드(flavonoid) 분석은 Nieva Moreno 등[15]의 방법으로, 25°C에서 시료용액 0.1 mL와 10% aluminum nitrate, 1 M potassium acetate 혼합물 및 에탄올을 40분 동안 반응시킨 다음 ELISA reader, 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며 rutin을 표준시약으로 하여 검량곡선을 작성하였다.

8. 지질과산화(LP) 활성 측정

LP 활성은 Kikuzaki와 Nakatani [16]의 방법으로, 시료 3.9 mL, 에탄올에 녹인 linoleic acid, 0.05 M phosphate buffer를 혼합하여 40°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 0.1 mL 반응액, 3% ammonium thiocyanate, 0.02 M ferrous chloride 0.1 mL를 넣어 실온에서 3분간 정치 후 ELISA reader, 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. LP 활성은 대조군에 대한 백분율로, LP 억제능은 KAE를 양성대조군으로 하여, LP 억제능(%)=100-[시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도]×100]으로 각각 나타냈다.

9. XO 저해 활성 측정

XO 저해 활성 측정은 Stirpe와 Corte [17]의 방법으로, 시료 추출물 0.1 mL, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5), xanthine 기질액, xanthine 0.1 mL를 가하여 25°C에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 후 1 N HCl을 가한 다음 ELISA reader, 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. XO 저해 활성은 대조군에 대한 백분율로, XO 저해능은 KAE를 양성대조군으로 하여, XO 저해능(%)=100-[시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도]×100]으로 각각 나타냈다.

10. 통계 처리

실험자료는 SPSS/WIN (18.0)을 이용하여 Mean±SD로 표시하였으며, 군간의 비교는 one way ANOVA를 시행 후 Tukey HSD로 사후 분석을 하였다. 유의수준은 P<0.05에서 채택하였다.

결 과

1. MnO₂의 세포독성 측정

MnO₂의 독성조사 결과, MnO₂의 처리농도에 따라 세포생존율이 유의한 감소를 보임으로서 독성을 나타냈다(P<0.001). MnO₂, 120 μ M, 140 μ M, 160 μ M에서 대조군에 비해 각각 65.0%, 55.0%, 40.0%의 세포생존율을 보였으며, XTT₅₀ 값은 146.7 μ M 처리에서 나타났다(Table 1). MnO₂의 세포독성에 대한 사후분석 결과 160 μ M, 140 μ M과 120 μ M, 대조군의 순으로 세포독성이 높은 것으로 나타났다.

2. KAE의 항산화능 측정

KAE의 항산화능 조사 결과, H₂O₂의 처리에서는 세포생존율

Table 1. The cytotoxicity of Manganese dioxide (MnO₂) by XTT assay

Concentrations of MnO ₂ (μM)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD				
Control ^a	0.60±0.08		88.35	<0.001	a>b, c>d
120 ^b	0.39±0.03				
140 ^c	0.33±0.03				
160 ^d	0.24±0.02				

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.
Abbreviation: MnO₂, Manganese dioxide.

Table 2. The antioxidative ability of kaempferol (KAE) on the hydrogen peroxide (H₂O₂) in cultured C6 glioma cells

Concentrations of KAE (μM)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD				
Control ^a	0.63±0.03		506.32	<0.001	a>d>c>b
35 μM H ₂ O ₂ ^b	0.23±0.01				
50 ^c	0.34±0.02				
70 ^d	0.45±0.02				

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.
Abbreviations: KAE, Kaempferol; H₂O₂, Hydrogen peroxide.

Table 3. The effect of kaempferol (KAE) on the cytotoxicity induced by manganese dioxide (MnO₂) in cultured C6 glioma cells

Concentrations of KAE (μM)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD				
Control ^a	0.54±0.04		116.60	<0.001	a>d, c>b
MnO ₂ (XTT ₅₀) ^b	0.26±0.01				
50 ^c	0.34±0.01				
70 ^d	0.43±0.04				

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.
Abbreviations: KAE, Kaempferol; MnO₂, Manganese dioxide.

Table 4. The cytotoxicity of *Celastrus orbiculatus* Thunb (CO) extract on cultured C6 glioma cells by XTT assay

Concentrations of CO extract (μg/mL)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD				
Control ^a	0.45±0.02		4.86	0.003	a>e
60 ^b	0.44±0.03				
90 ^c	0.43±0.03				
120 ^d	0.41±0.02				
150 ^e	0.39±0.02				

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.
Abbreviation: CO, *Celastrus orbiculatus* Thunb.

이 대조군에 비하여 36.5% (0.23±0.01)로 나타난 반면, 50 μM 과 70 μM의 KAE의 처리에서는 각각 54.0% (0.34±0.02)와 71.4% (0.45±0.02)로 나타나 H₂O₂만을 처리한 것보다 모두 유의한 세포생존을 증가를 나타냈다 ($P<0.001$) (Table 2). KAE의 항산화능의 사후분석 결과 세포생존율이 대조군, 70 μM

KAE, 50 μM KAE, 35 μM H₂O₂ 순으로 높게 나타났다.

3. MnO₂의 독성에 대한 KAE의 영향

MnO₂의 세포독성에 대한 항산화제인 KAE의 영향조사 결과, MnO₂의 처리에서 세포생존율이 대조군에 비하여 48.2%

(0.26±0.01)로 나타난 것에 비하여 50 µM KAE과 70 µM KAE의 처리에서 각각 63.0% (0.34±0.01)와 79.6% (0.43±0.04)로 나타났다($P<0.001$) (Table 3). MnO₂의 세포독성에 대한 KAE 영향에 대한 사후분석결과 대조군, 70 µM KAE과 50 µM KAE, MnO₂ (XTT₅₀) 순으로 세포생존율이 높은 것을 알 수 있었다.

4. CO 추출물의 세포독성

CO 추출물에 대한 독성분석 결과 60 µg/mL와 90 µg/mL 농도에서 세포생존율이 대조군에 비하여 97.8% (0.44±0.03)와 95.6% (0.43±0.03)로 각각 나타났다. 또한, 120 µg/mL와 150 µg/mL 농도에서 세포생존율은 각각 91.1% (0.41±0.02)와 86.7% (0.39±0.02)로 나타났다($P=0.003$) (Table 4, Figure 1). CO 추출물 독성에 대한 사후분석결과 60 µg/mL, 90 µg/mL, 120 µg/mL 간에는 통계적으로 차이가 없었으나 60 µg/mL, 90 µg/mL, 120 µg/mL 순으로 세포생존율이 높았다. 또한 60 µg/mL는 대조군과 통계적인 차이가 없었으며, 120 µg/mL와 150 µg/mL도 통계적인 차이가 없었다. 그러나 대조군과 150

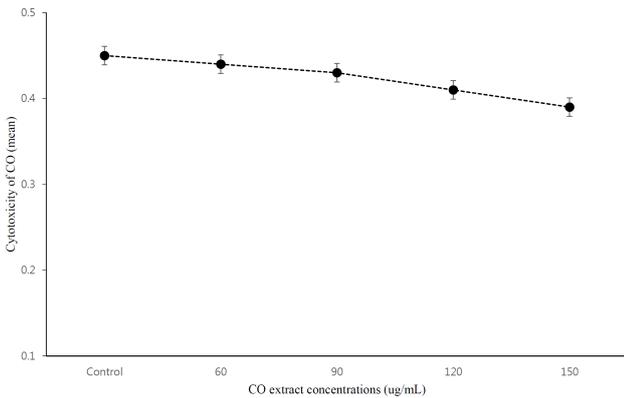


Figure 1. The cytotoxicity of *Celastrus orbiculatus* Thunb (CO) extract on cultured C6 glioma cells incubated with AT extract at concentrations of 60, 90, 120 and 150 µg/mL. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the control.

µg/mL의 세포생존율이 통계적으로 차이를 보여, 대조군에 비하여 유의한 세포생존율의 감소를 나타내는 최대 허용한계 농도는 150 µg/mL 이상에서 나타나는 것으로 확인됨에 따라 본 실험에서는 CO 추출물 150 µg/mL 이하의 농도를 사용하였다.

5. CO 추출물의 성분함량 분석

CO 추출물 성분 중 폴리페놀의 함량은 60.1 mg/g으로, 플라보노이드 함량은 30.8 mg/g으로 각각 나타났다(Figure 2).

6. MnO₂의 세포독성에 대한 CO 추출물의 영향

MnO₂의 세포독성에 대한 CO 추출물의 영향 검증결과, MnO₂의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 45.9% (0.28±0.03)로 나타난데 비하여 90 µg/mL CO 추출물 처리에서는 54.1% (0.33±0.02)로 나타났다. 또한 120 µg/mL CO 추출물 처리에서는 68.9% (0.42±0.02)로 나타나 MnO₂만의 처리에 비하여 유의한 증가를 보였다($P<0.001$) (Table 5). MnO₂의 세포독성에 대한 CO 추출물이 미치는 영향에 대한 사후분석결과 대조군, 120 µg/mL CO 추출물, 90 µg/mL CO 추출물, MnO₂ 순으로 세포생존율이 높게 나타났다.

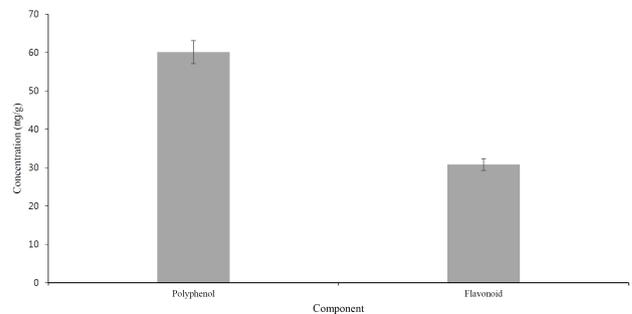


Figure 2. The component of *Celastrus orbiculatus* Thunb (CO) extract. Data are mean±SD. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.

Table 5. The protective effect of *Celastrus orbiculatus* Thunb (CO) extract on the cytotoxicity induced by Manganese dioxide (MnO₂) in cultured C6 glioma cells

Concentrations of CO extract (µg/mL)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean	±SD			
Control ^a	0.61	±0.02	398.72	<0.001	a>d>c>b
MnO ₂ (XTT ₅₀) ^b	0.28	±0.03			
90 ^c	0.33	±0.02			
120 ^d	0.42	±0.02			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: CO, *Celastrus orbiculatus* Thunb; MnO₂, Manganese dioxide.

7. 지질과산화(LP) 활성 측정

CO 추출물에 대한 LP 활성 측정을 위하여 CO 추출물 90 µg/mL와 CO 추출물 120 µg/mL 농도를 각각 처리하여 분석한 결과, CO 추출물 90 µg/mL 처리에서는 활성이 대조군에 비하여 74.4% (0.32±0.02)로 나타났으며, 120 µg/mL의 처리에서는 60.5% (0.26±0.01)로 나타났다(Table 6). 따라서, 90 µg/mL와 120 µg/mL 농도에서 LP 억제능은 각각 25.6%와 39.5%로 이는 모두 대조군보다 유의한 억제능을 보였다. 특히,

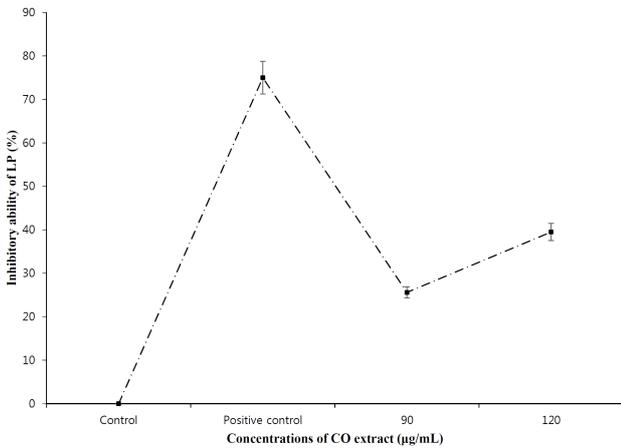


Figure 3. The suppressive ability of LP in *Celastrus orbiculatus* Thunb (CO) extract determined at a wavelength of 500 nm. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.

Table 6. The inhibitory activity of lipid peroxidation (LP) of *Celastrus orbiculatus* Thunb (CO) extract determined at a wavelength of 500 nm

Concentrations of CO extract (µg/mL)	Inhibitory activity of LP (500 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD				
Control ^a	0.43±0.03		339.25	<0.001	a>c, d>b
70 µM KAE ^b	0.12±0.01				
90 ^c	0.32±0.02				
120 ^d	0.26±0.01				

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: CO, *Celastrus orbiculatus* Thunb; KAE, Kaempferol; LP, Lipid peroxidation.

Table 7. The inhibitory activity of xanthine oxidase (XO) of *Celastrus orbiculatus* Thunb (CO) extract determined at a wavelength of 292 nm

Concentrations of CO extract (µg/mL)	Inhibitory activity of XO (292 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD				
Control ^a	0.62±0.03		617.95	<0.001	a>c>d>b
70 µM KAE ^b	0.15±0.01				
90 ^c	0.48±0.02				
120 ^d	0.44±0.02				

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: CO, *Celastrus orbiculatus* Thunb; KAE, Kaempferol; XO, Xanthine oxidase.

120 µg/mL 농도에서는 양성대조군인 KAE의 소거능인 72.1% (0.12±0.01) (P<0.001)의 50% 이상으로 나타났다(Figure 3). LP 억제능의 사후분석 결과 KAE, 120 µg/mL CO 추출물과 90 µg/mL CO 추출물, 대조군 순으로 억제능이 높은 것으로 나타났다.

8. XO 저해 활성 측정

CO 추출물에 대한 XO 저해 활성 측정 분석결과 CO 추출물 90 µg/mL 처리에서는 저해 활성이 77.4% (0.48±0.02)로 나타났으며, CO 추출물 120 µg/mL의 처리에서는 71.0% (0.44±0.02)로 나타났다(Table 7). 따라서, XO 저해능은 90 µg/mL와 120 µg/mL에서 각각 22.6%와 29.0%로 이는 대조군에 비하여 유의한 저해능을 나타냈으며(P<0.001), 특히 추출물 120 µg/mL의 농도에서는 양성대조군인 KAE 저해능인 75.8% (P<0.001)의 35% 이상인 것으로 나타났다. CO 추출물에 대한 XO 저해능의 사후분석결과 KAE, 120 µg/mL CO 추출물, 90 µg/mL CO 추출물, 대조군 순으로 저해능이 높았다.

고 찰

산업부문에 가장 많이 쓰이고 있는 이산화망간(MnO₂)은 사산화망간과 같이 산화형태로 존재하며, 이것의 중독은 크게 신경성과 호흡성 두 증상으로 나뉜다. 특히, 신경성의 증후는 언어 이상을 비롯한 행동장애와 보행장애와 같은 추체외로계

(extra-pyramidal tract)의 이상 징후를 나타내며, 근강직이나 근무력을 동반한 전형적인 파킨슨병을 유발하게 된다[18]. 따라서, 본 연구에서는 MnO_2 에 대한 신경독성을 알아보기 위하여 배양 C6 glioma 세포에 120~160 μM 의 MnO_2 를 각각 처리한 결과, MnO_2 의 처리 농도에 비례하여 유의하게 세포생존율이 감소되었다. 그 결과 XTT_{50} 값은 146.7 μM 로 Borenfreud와 Puerner [19]의 독성판정기준에 따라 중간독성(mid-cytotoxic)이다. 이들은 모든 화학약제의 XTT_{50} 이나 MTT_{50} 값이 100~1,000 μM 인 경우 중간독성으로 판정하였다. 본 결과는 Lee 등[7]이 MnO_2 가 배양 NIH3T3 섬유아세포에 독성을 나타냈다는 연구 보고와 일치함을 알 수 있었다. 이같이 MnO_2 가 배양 C6 glioma 세포에 독성을 나타낸 것은, 파킨슨병 환자에서 나타나는 혈중 칼슘농도의 증가를 볼 때, MnO_2 의 독성이 세포내 칼슘채널과 관련된 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체를 과활성시켜 세포내로 다량의 칼슘을 유입하게 하여 세포손상을 초래하였거나[4], 크롬처럼 세포내 DNA에 손상을 주어 세포퇴화를 유발했을 경우도 배제할 수는 없다[20]. 그러나 수은을 비롯한 구리, 납과 같은 몇몇 중금속류들은 자유라디칼에 의한 산화적 손상에 의하여 독성을 나타낸다는 것을 고려해 볼 때[21], MnO_2 의 독성도 산화적 손상에 의하여 세포퇴화를 초래하였을 가능성이 클 것으로 생각된다. 따라서, 본 연구에서는 MnO_2 의 독성이 산화적 손상과 관련이 있는가를 알아보기 위하여, 항산화제의 일종인 kaempferol (KAE)을 배양 세포에 XTT_{50} 농도의 MnO_2 를 처리하기 전에 50 μM 과 70 μM 의 KAE를 각각 처리한 결과, 세포생존율이 MnO_2 의 처리인 48.2%에 비하여 각각 63.0%와 79.6%로 나타나 모두 MnO_2 의 처리에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 보였다. 본 결과는 Lee 등[7]이 MnO_2 의 독성이 항산화 효소인 catalase에 의하여 방어되었다는 연구 보고와 일치함을 알 수 있었으며, MnO_2 의 독성에 산화적 손상이 관여하고 있음을 증명하고 있다. 한편, MnO_2 의 독성에 대한 노박덩굴(CO) 추출물의 영향조사에 있어서, 배양 세포에 MnO_2 를 처리하기 전에 CO 추출물 90 $\mu g/mL$ 와 120 $\mu g/mL$ 농도를 각각 세포에 처리한 결과 MnO_2 의 처리인 45.9%에 비하여 각각 54.1%, 68.9%로 세포생존율이 유의하게 증가하였다. 본 결과는 CO추출물이 MnO_2 독성에 의한 산화적 손상을 방어한 것으로서, 이 같은 현상은 CO 추출물속에 함유된 kaempferol이나 quercetin, flavonoid 배당체와 같은 항산화 성분들의 생리활성에 의한 결과라고 생각한다. 따라서, 본 연구에서는 추출물 속에 함유된 항산화물질인 총폴리페놀과 총플라보노이드의 함량을 조사하였다. 위에서 열거한 추출물의 각 성분들은 이미 항산화 효능이 입증되어 있기 때문에

개개의 성분분석보다는 총체적인 성분함량에 대한 정량적 분석을 행하였다[22]. 그 결과 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량은 각각 60.1 mg/g과 30.8 mg/g으로 나타났다. 이 같은 함량은 개미취(*Aster tataricus* L.) 추출물의 46.8 mg/g, 23.9 mg/g [23]이나 한련초(*Elipta prostrate* L.) 추출물의 51.4 mg/g, 25.9 mg/g와 거의 비슷한 수준으로 나타났다[7]. 이같이 노박덩굴을 포함한 이들 추출물들은 모두 브롬이나 망간과 같은 중금속화합물의 산화적 손상을 모두 항산화능에 의하여 효과적으로 방어하였다는 연구결과를 보여주고 있다. 따라서, 본 연구에서는 이 같은 CO 추출물의 항산화능에 대해 알아보기 위하여 지질과산화(LP) 억제능과 XO 저해능을 각각 조사하였다. LP 억제는 산화적 손상에 의하여 막을 구성하고 있는 인지질이 산화됨으로서 막손상으로 인하여 세포의 퇴화나 사멸을 초래하게 되는데, 이를 억제함으로써 세포를 손상으로부터 보호하게 된다 [16]. 또한, XO 활성의 저해는 세포내 대사과정에 있어서, XO는 산소를 전자수용체로 이동시켜 XO나 hypoxanthine (HX)으로부터 uric acid를 생성하게 하는데 이 과정 중에 자유라디칼이 형성되기 때문에 결국 XO의 활성저해는 자유라디칼의 생성을 저해하는 결과가 된다[17]. 한편, 본 연구에서 CO 추출물의 LP 억제능은 90 $\mu g/mL$ 와 120 $\mu g/mL$ 에서 각각 25.6%와 39.5%로 나타나 대조군에 비하여 모두 높은 억제능을 보였다. 이는 polyphenol과 flavonoid 함량이 비슷한 개미취 추출물의 37.3% (120 $\mu g/mL$)에 비하여[23], 약간 높거나 거의 비슷한 억제능을 보인 것으로 나타났다. 이 같은 현상은 추출물속에 함유된 항산화 성분들의 단독 또는 공동의 항산화 작용 결과인 것으로 생각된다. 또한, CO 추출물의 XO 저해능에 대한 조사의 경우, 추출물 90 $\mu g/mL$ 와 120 $\mu g/mL$ 에서 각각 22.6%와 29.0%로 나타나 대조군에 비하여 모두 높은 저해능을 보였다. 이 역시 성분함량이 비슷한 한련초(*Eclipta prostrate* L.) 추출물의 28.6% (110 $\mu g/mL$)에 비하여[7], 거의 비슷한 저해능을 보여준 것으로 나타났다. CO 추출물에서 나타난 높은 LP 억제능과 XO 저해능과 같은 항산화능은 개미취나 한련초와 같은 타 추출물처럼 추출물 속에 함유된 kaempferol이나 quercetin을 비롯한 tannin, saponin과 같은 항산화 성분들의 단독 또는 복합적인 생리활성 작용에 기인한 것으로 생각된다. 그러나 천연성분들에 대한 생리활성의 자세한 작용기전이나 현상을 밝히기 위해서는 차후 다양한 측면에서 지속적인 연구의 필요성이 요구된다.

요 약

본 연구는 이산화망간(MnO_2)의 신경독성과 이에 대한 노박

덩굴 추출물의 보호 효과를 C6 glioma 세포를 배양하여 조사하였다. 본 연구를 위하여 세포생존율을 비롯하여 지질산화(LP) 억제능 및 XO 저해능과 같은 항산화 분석을 시행하였다. 그 결과 MnO₂는 배양 세포에 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시켰으며, 이 과정에서 XTT₅₀값은 146.7 μM로 나타나 Borenfreund and Puerner의 독성판정기준에 따라 중간독성(mid-cytotoxic)인 것으로 나타났다. 또한, 항산화제의 일종인 kaempferol (KAE)은 MnO₂의 독성에 의해 손상받은 세포의 생존율을 유의하게 증가시켰으므로 MnO₂의 독성을 방어하였다. 한편, MnO₂ 독성에 대한 노박덩굴(CO) 추출물의 영향 조사에 있어서, CO 추출물은 배양 세포에 MnO₂만을 처리한 것에 비하여 세포생존율을 유의하게 증가시켰으므로 MnO₂의 독성을 효과적으로 방어하였다. 이와 동시에 높은 LP 억제능과 XO 저해능과 같은 항산화 효과를 보여주었다. 이상의 결과에서 MnO₂의 독성에 산화적 손상이 관여하고 있음을 알 수 있었으며, CO 추출물은 LP 억제능과 XO 저해능과 같은 항산화에 의하여 MnO₂의 독성을 효과적으로 방어한 것을 확인했다. 따라서, CO 추출물과 같은 천연소재는 파킨슨병 유발제인 MnO₂와 같이 산화적 손상과 관련된 질환적 중금속 독성을 경감 내지는 개선할 수 있는 유용한 물질이라 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

- Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, et al. Mutation in Cu/Zn superoxidodismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993;362:59-62.
- Ra JS, Lee JH, Kim KT. Application of toxicity identification evaluation procedures for toxic effluents from the aluminum rolling industry. *J Environ Health Sci*. 2015;41:305-313. <https://doi.org/10.5668/JEHS.2015.41.5.305>
- Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2003;348:1356-1364. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM2003ra020003>
- Jung IJ. The effect of NMDA/glycine receptor antagonist, 7-chlorokynurenic acid on cultured astrocytes damaged by ischemia-like condition. *J Exp Biomed Sci*. 2009;15:355-362.
- Cho KS. Occupational health. 2 ed. Seoul: Sumoonsa Publishing; 1991. p315-319.
- Choi JH, Jang BK, Lee JW, Hong EJ, Lee MJ, Ji DH. Cerebral activity by motor task in welders exposed to manganese through fMRI. *J Environ Health Sci*. 2011;37:102-112. <http://dx.doi.org/10.5668/JEHS.2011.37.2.102>
- 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>
- Lee SH, Seo YM. Alleviating effects of *Euphorbiae humifusae* L. extract on the neurotoxicity induced by lead. *Korean J Clin Lab Sci*. 2018;50:501-510. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2018.50.4.501>
- Ma J, Luo XD, Protiva P, Yang H, Ma C, Basile MJ, et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manikara zapota* (Sapodilla). *J Nat Prod*. 2003;66:983-986. <https://doi.org/10.1021/np020576x>
- Kwak JS, Seong HG. East medicinal thesaurus herb encyclopedia. Gyeonggi-do: Purnhaengbok Publishing; 2018. p303-306.
- Benarroch EE. Neuron-astrocyte interactions partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc*. 2005;80:1326-1338. <https://doi.org/10.4065/80.10.1326>
- Fang G, Li G, Pang C, Li W, Wang D, Liu C. Ultrasound-assisted extraction of pristimerin from *Celastrus orbiculatus* using response surface methodology. *Biol Pharmaceut Bull*. 2016;b15-00664.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 1983;65:55-63.
- AOAC. Official methods of analysis. 18th ed. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists; 2005. Vol 45, p21-22.
- 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)
- Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effect of some ginger constituents. *J Food Sci*. 1993;58:1407-1410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06194.x>
- 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.
- De-Lau LML, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lan Neurol*. 2006; 5:525-535.
- 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.
- Tsou TC, Lai HJ, Yang JL. Effects of mannitol or catalase on the generation of reactive oxygen species leading to DNA damaged by chromium (VI) reduction with ascorbate. *Chem Res Toxicol*. 1999;12:1002-1009. <https://doi.org/10.1021/tx9802264>
- Chung JH, Rim YS, 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>
- Graefe EU, Witting J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*. 2001;41:492-499. <https://doi.org/10.1177/00912700122010366>
- Chung JH, Lee GW, Seo YM. Protective effect of *Aster tataricus* L. extract on the dermal cytotoxicity induced by sodium bromate, oxidant of hair dye. *Biomed Sci Lett*. 2019;25:348-356. <https://doi.org/10.15616/BSL.2019.25.4.348>