

제주도 탈염 용암해수 재배로 제조한 브로콜리 추출물의 신경 세포 보호 효과

이진설^{1,*} · 장윤비¹ · 최지선¹ · 정재준¹ · 강승우^{1,†}

¹(주)아리바이오

(2020년 5월 26일 접수; 2020년 6월 16일 수정; 2020년 6월 22일 채택)

Neuroprotective effects of Extract of Broccoli, Cultivated in Desalinated Magma Seawater, on neuron-like SH-SY5Y cells

Jin Seol Rhee^{1,*} · Youn Bi Jang¹ · Ge Sun Choi¹ · Jai Jun Choung¹ · Seung Woo Kang^{1,†}

¹Central Research Institute, ARIBIO Co., Ltd.

(Received May 26, 2020; Revised June 16, 2020; Accepted June 22, 2020)

요약 : 식이 영양에 의한 충분한 영양분 섭취는 치매에 의한 뇌 인지 기능의 저하의 위험성을 줄일 수 있는 중요한 수단이다. 설포라판은 뇌 인지 기능 개선 효과가 있는 것으로 알려져 있는 영양 성분으로, 설포라판이 다량으로 포함된 브로콜리 추출물은 인지 기능 개선 효과가 좋을 것으로 기대된다. 본 연구에서는 제주도 탈염 용암해수 재배로 제조한 브로콜리 추출물이 뇌 인지 기능 개선 효과를 가지고 있는지 시험하였다. 제주도 용암해수는 유용 미네랄 (아연, 바나듐, 게르마늄)이 풍부해서, 용암 해수에서 재배한 작물은 유용미네랄 함량이 높은 것으로 알려져 있다. 제주도 탈염 용암 해수를 사용해서 재배한 브로콜리 추출물의 화학 조성 중 설포라판과 글루코라판 성분을 분석하기 위해 LC-Q-orbitrap 질량 분석기를 사용하였고, 설포라판의 정량 분석을 위해 HPLC 를 사용하였다. 브로콜리 추출물의 신경 세포 사멸 억제 효과와 항염증 효과를 시험하기 위해 SH-SY5Y 세포를 사용한 실험을 수행하였고, 시냅스 가소성 촉진 효과를 시험하기 위해 SH-SY5Y 세포에서 시냅스 가소성 관련 단백질의 발현 변화와 아세틸콜린 분해 효소의 활성 변화를 측정하였다. 이러한 실험들을 수행한 결과 탈염 염지하수로 재배한 브로콜리 추출물은 신경 세포 사멸 억제 효과와 항염증 효과가 있음을 확인 하였고, 시냅스 가소성 관련 단백질 발현을 증가 시키고 아세틸콜린 분해 효소의 활성을 억제해서 시냅스 가소성을 증가 시키는 효과가 있는 것을 확인 하였다. 이상의 결과들은 제주도 탈염 용암해수로 재배한 브로콜리 추출물이 치매에 의한 뇌 인지 기능 저하를 억제하는 좋은 식이 영양분으로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

주제어 : 브로콜리, 설포라판, 신경세포 사멸, 항염증, 시냅스 가소성,

[†]Corresponding author
(E-mail: swkang@aribio.com)

Abstract : Dietary nutrition is a critical lifestyle factor that can reduce the risk of future cognitive impairments caused by dementia. Accumulating evidence suggests that dietary supplementation with Sulforaphane may help the prevention of cognitive impairments and dementia. Thus, Sulforaphane-enriched broccoli extract would hold promise to improve cognitive impairments of dementia patients. Here, we have used broccoli extracts, prepared from broccoli cultivated in Magma Seawater, to test if the broccoli extracts can be dietary supplement to improve cognitive impairments. Magma Seawater originated from Jeju Island, Korea is unique in terms of containing high concentrations of usable minerals (Zinc, Vanadium and Germanium etc.). Broccoli, grown in Magma Seawater, would contain Sulforaphane and the extra amount of usable minerals. The chemical compositions of the broccoli extracts were analyzed using LC-Q-orbitrap to detect Sulforaphane and Glucoraphanin. Analysis method based on HPLC was developed for measurement of sulforaphane levels in the broccoli extracts. We have tested if the broccoli extracts have anti-apoptotic and anti-inflammatory effects on neuron-like SH-SY5Y cells. In addition, we examined if the broccoli extracts are able to upregulate expression of synaptic plasticity-associated proteins (BDNF and phospho-CREB) and to inhibit acetylcholine esterase (AChE) activity. We have shown that the broccoli extracts inhibited the apoptotic pathway and inflammatory responses. Finally, we present evidence showing that AChE activity was inhibited by the broccoli extracts, but expression of BDNF and phospho-CREB was upregulated. Taken together, these findings suggest that the broccoli extracts from Magma Seawater-grown broccoli would be a good source of dietary nutrition to improve cognitive impairments in the future.

Keywords : broccoli, sulphoraphane, apoptosis, neuroinflammation, synapse

1. 서론

전 세계적 인구 고령화는 치매 환자 수의 급증을 유발하고 있고, 치매 환자와 치매 환자의 가족 보호자가 입는 정신건강 측면에서 좋지 않은 삶의 질로 인한 치매관리 비용의 증가는 해결해야 하는 중요한 사회 경제적 문제로 부각되고 있다. 치매는 발생 이전 단계에서 관리하는 노력이 매우 중요하며, 뇌 건강을 지키기 위한 우수한 영양 섭취가 필수적인 것으로 알려져 있다 [1].

알츠하이머병 (Alzheimer's disease, AD)은 전체 치매 사례의 60-80%를 차지하는 것으로 추정되고, 뇌 조직에 아밀로이드 베타 (Amyloid- β , A β) 단백질과 인산화된 타우 (Tau) 단백질이 비정상적으로 축적되어 뇌조직 퇴행을 일으키면서 급격한 뇌인지 기능의 퇴화를 일으키는 것으로 알려져 있다 [2]. A β 단백질에 의해 유발되는 신경세포 사멸과 시냅스 가소성의 감소는 인지 기능 저하와 밀접한 관계가 있고, 노화에 의해 축적되는 산화스트레스가 일으키는 염증반

응은 인지 기능 저하를 가속화 시키기도 한다 [3].

브로콜리, 양배추, 콜리플라워 등의 십자화과 식물에 존재하는 Sulforaphane (1-isothiocyanato-4-[methylsulfinyl]-butane, SFN)은 AD 치매 동물 모델에서 A β 단백질의 축적을 억제하고 신경세포 사멸을 억제해서 인지 기능 개선 효과가 있음이 보고 되었다 [4-5]. 알츠하이머성 치매 환자의 기억력 약화는 A β 단백질의 과도한 축적에 의한 시냅스 가소성의 감소로 인해 발생하는데, SFN이 신경 세포에서 시냅스 가소성 유지에 중요한 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)의 발현을 증가시키는 효과가 있음이 알려져 있다 [6].

용암해수(Magma Seawater)는 제주 동부지역에 부존하는 염지해수로 현무암층에 의해 여과되어 화산 암반에서 유래한 유용 미네랄(아연, 바나듐, 게르마늄 등)을 다량 함유하고 있는 제주만이 보유한 독특한 수자원이다 [7]. 탈염 과정을 거쳐 만들어진 탈염 용암해수로 식물을 재배할 경우, 일반 농업용수 재배 시 보다 식물 내 미네랄 함량이 증가하는 것이 확인되었으며, 여러 기능성

2차 대사산물들을 증가되어 식물의 성장 속도를 향상시키는 것으로 보고되었다 [8].

본 연구에서는 탈염 용암해수를 이용한 브로콜리 재배로 유용 미네랄이 다량 함유된 브로콜리를 생산을 할 수 있는 장점이 있다는 것에 착안해서, 용암해수로 재배한 브로콜리의 추출물이 알츠하이머성 치매 환자들의 인지 기능 개선에 효과적인 천연 식의약소재로 활용할 수 있는 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시료 및 추출

탈염 용암해수(desalinated magma seawater) 수경재배 브로콜리 새싹(Broccoli Sprout)은 '(주) 비케이바이오(Jeju, Korea)'에서 제공받았다. 수경재배 조건은 육상생물 생산 시스템(Smart farm)에서 온도 22~25°C와 습도 40~60% 범위 내에 배양되었으며, 브로콜리 새싹은 새싹 재배기에서 2일(암조건)간 발아 후 5일간 재배하였다. 브로콜리 새싹 제조 공정 및 실험을 (주)비케이바이오(Jeju, Korea)에서 수행하였다. 브로콜리 새싹 원물을 pulsed electric field (PEF) (Elea, DIL, Quakenbrueck, Germany)로 0-10kJ에서 1~5초 동안 처리하였으며, PEF 처리 후 epithiospecifier protein (ESP) 불활성을 위해 정제수 첨가 후 80°C에서 10분간 가열 후 Myrosinase 활성을 위해 37°C로 냉각 후 2시간 동안 반응시켰다. 이후 에탄올 첨가하여 최종 70% 에탄올 용매에서 상온에서 3시간 추출을 진행하였다. MF 0.45um 필터(Model : CSP-1P1E-2N-0.45, 규격 : 68 x 500L, 형태 : Double Open, 재질 : PP)로 여과 후 얻어진 여과액은 45°C에서 추출액이 30~40 brix가 될 때까지 농축을 진행하였다. 농축이 완료된 후 동결건조기(ilShinBioBase Co. Ltd., Gyeonggi, Korea)를 이용하여 건조 시료(Sulforaphane 2700ppm)를 제조하였다.

2.2. 용암 해수 재배 브로콜리 추출물의 성분규명

UPLC/Q-Orbitrap(Ultimate 3000; Q Exactive plus; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용한 용암 해수 재배 브로콜리 추출물 시료 내 성분 규명(Identification)을 위한 분석을 진행하였다. 분석 결과의 다양성을 기하기 위해 질량분석기 조건은 Positive mode와 Negative

mode를 병행하여 분석하였으며, 각 분석 mode에 사용한 LC 용매로는 Positive mode는 0.1% formic acid(Daejung, Siheung, Republic of Korea)가 포함된 물 (용매 A)과 Acetonitrile (용매 B; Honeywell, Ulsan, Republic of Korea)을 사용했으며, Negative mode는 10 mM ammonium formate(Daejung, Siheung, Republic of Korea)와 0.1% formic acid(Daejung)가 포함된 물 (용매 A)과 Acetonitrile (용매 B; Honeywell)을 사용하여 분석하였다. 분석 시 사용한 컬럼은 Luna Omega PS C18(1.6 μ m, 2.1×150 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) 역상 컬럼이며, 분리 분석 조건은 다음과 같다. 초기 조건 0~4분까지 B 용매 5%를 유지하고, 4~28분 동안 linear gradient로 B 용매를 80% 비율까지 높인 후, 28~32.5분까지 B 용매 80%를 유지하고, 32.5~33.5분 동안 B 용매 5%까지 변경하여 35분까지 B 용매 5%를 유지한다. 유속은 0.2 mL/min, 컬럼 온도는 40°C, autosampler 온도 10°C, 시료 주입량 5 μ L로 분석하였다.

2.3. 용암 해수 재배 브로콜리 추출물 내 설폴라판의 기준 및 시험방법

HPLC (Agilent 1100 series; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 이용한 브로콜리 추출물 시료 내 Sulforaphane 기준 및 시험방법 확립을 위한 분석을 진행하였다. 시료를 50% 에탄올(Honeywell, Ulsan, Republic of Korea)에 용해한 후 Synergi Fusion C18(4 μ m, 4.6×250 mm; Phenomenex) 역상 컬럼으로 0.1% formic acid(Daejung)가 포함된 물 (용매 A)과 Acetonitrile (용매 B; Honeywell)을 사용하여 분석하였다. 분석 조건은 초기 0~25분까지 B 용매 17%를 유지하고, 26분까지 linear gradient로 B 용매를 50% 비율까지 높인 후, 30분까지 B 용매 50%를 유지하고, 31분까지 B 용매 17%로 변경하여 40분까지 B 용매 17%를 유지한다. 유속은 1.0 mL/min, 컬럼 온도는 25°C, 시료 주입량 20 μ L로 분석하였다.

2.4. 세포배양

SH-SY5Y human neuroblastoma cell line은 American Type Culture Collection(ATCC; Manassas, VA, USA)로부터 구매하였고 10% fetal bovine serum(FBS; Australian Organ,

HyClone™, Logan, UT, USA)과 1% penicillin/streptomycin(P/S; HyClone™)을 함유한 DMEM/F12 Complete Medium(HyClone™)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 CO₂ incubator(311-TIF, Thermo Fisher Scientific Forma®, MA, USA)에서 배양하였다.

2.5. 레티노익산 (Retinoic acid, RA)를

이용한 SH-SY5Y 세포의 신경 세포 분화

SH-SY5Y 세포를 10% FBS(HyClone™)와 1% P/S(HyClone™)을 함유한 DMEM/F12 Complete Medium(HyClone™)를 배양 후, neuron-like differentiation을 위해서 세포배양 배지를 1% FBS(HyClone™), 1% P/S(HyClone™), 10 μM all-trans-retinoic acid (RA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 포함하는 DMEM/F12 분화용 배지로 교체해 주었다. 분화 3일째에 배지를 새 DMEM/F12 분화용 배지로 교체해 주었고, 분화 6일째 다양한 실험 조건으로 새 DMEM/F12 분화용 배지 첨가하여 교체해 주고 신경세포 사멸, 신경세포 염증 반응, 시냅스 가소성 관련 실험을 진행하였다.

2.6. 아밀로이드 올리고머 단백질 형성 및 처리

Aβ₁₋₄₂ monomer를 1% FBS(HyClone™), 1% P/S(HyClone™)을 함유하는 DMEM/F12 Complete Medium(HyClone™)에 human Aβ₁₋₄₂(Abcam, Cambridge, MA, USA)를 1 μM 혹은 10 μM이 되도록 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 3시간 동안 저장해서 Aβ₁₋₄₂ oligomer가 형성 되도록 하였다. Aβ₁₋₄₂ oligomer를 분화한 SH-SY5Y 세포에 72시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 처리하였다.

2.7. 세포 생존률 측정

브로콜리 추출물을 증류수에 다른 농도 (0, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 그리고 1000 μg/mL)로 녹여서 준비하고, 분화한 SH-SY5Y 세포에 24시간, 48시간, 72시간 동안 처리한 후 Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Japan)를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다.

2.8. 과산화수소 (H₂O₂) 처리

분화한 SH-SY5Y 세포에서 기존 세포 배양액

을 제거하고 300 μM H₂O₂(Sigma-Aldrich)와 증류수에 녹인 다른 농도 (10, 50 그리고 100 μg/ml)의 브로콜리 추출물을 포함하는 DMEM/F12 Complete Medium(HyClone™)를 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 단독 혹은 병용 처리 하였다. 양성 대조군으로는 항산화제인 1mM N-Acetylcysteine (NAC, Sigma-Aldrich)를 사용하였다.

2.9. 아세틸콜린 에스테라제 효소 시험

분화한 SH-SY5Y 세포에 기존 세포 배양액을 제거하고 Aβ₁₋₄₂ oligomer를 72시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 처리한 후 증류수에 녹인 다른 농도 (10, 50 그리고 100 μg/ml)의 브로콜리 추출물을 포함하는 DMEM/F12 Complete Medium(HyClone™)를 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 단독 혹은 병용처리 하였다. 처리가 종료된 세포를 PBS buffer로 세척한 후, EzRIPA Lysis Buffer(Atto, Tokyo, Japan)를 15 분 동안 가하여 세포들을 회수하고 1500 rpm에서 5분간 원심분리를 진행해서 상층액을 준비하였다. 준비된 상층액을 Acetylcholinesterase Assay Kit (Abcam, MA, USA)에 포함된 Assay Buffer와 Acetylcholine-Reaction Mixture를 적정 비율로 혼합해서 빛이 차단된 장소에서 10-30분간 상온에 반응 시킨 후, 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.10. 뇌유래 신경 영양인자 (BDNF) 효소 면역 측정법 (ELISA)

Aβ₁₋₄₂ oligomer를 72시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 처리하고, 증류수에 녹인 다른 농도 (10, 50 그리고 100 μg/ml)의 브로콜리 추출물을 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 단독 혹은 병용 처리하였다. 세포 배양액을 Pierce Protein Concentrator PES, 3K MWCO (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 사용하여 4°C 에서 4000rpm에서 30분 동안 원심 분리를 하여 농축하였다. 농축된 세포 배양액을 Human BDNF ELISA Kit (Abcam, MA, USA)에 포함된 96 well microplate에 분주하여 상온에서 3시간 동안 반응시키고, Kit에 포함된 Wash Solution으로 4회 세척하고 Biotinylated Anti-Human BDNF Detector Antibody를 가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Wash Solution으로 4회 세척하고, HRP-Streptavidin

Solution과 상온에서 45분 동안 반응 시킨 후 Wash Solution으로 4회 세척하였다. TMB One-Step Substrate Reagent를 넣은 후 빛이 없는 상온에서 30분간 반응시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.11. 웨스턴 블랏

2.11.1. 전체 단백질 추출

EzRIPA Lysis Kit(Atto, Tokyo, Japan)에 적정 농도의 protease inhibitors (Aprotinin, PepstatinA, Leupeptin)와 phosphatase inhibitors (Sodium fluoride, Sodium orthovanadate(V), β -Sodium glycerophosphate)들을 넣어준 후, PBS buffer로 세척한 세포에 가하여 얼음 위에서 10분 동안 저장 후 세포를 회수하였다. 회수한 균질화된 세포를 Micro Centrifuge(Smart R17, Hanil Scientific, Gimpo, Gyeonggi, Korea)를 이용해 원심분리(14000 rpm, 10분, 4°C)하여 상층액을 얻었다. 분리된 상층액에 포함된 전체 세포 단백질의 양을 Pierce™ BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 정량하였다.

2.11.2. 핵 단백질과 세포질 단백질 추출

NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)을 사용하여 핵과 세포질 단백질을 분리 추출하였다. 회수한 세포에 cytoplasmic extraction reagent I을 넣어주고 15초간 교반 후 얼음에서 10분 동안 반응시켰다. 그런 다음 cytoplasmic extraction reagent II를 넣어 주고 5초간 교반 후 얼음에서 1분 동안 반응시켰다. 반응 시킨 세포와 reagent의 혼합물을 원심분리(~16000xg, 5분, 4°C)하여 상층액에 포함된 세포질 단백질을 분리하였다. 남은 pellet에서 핵 단백질을 분리하기 위해서 nuclear extraction reagent은 넣어 주고 15초 간격으로 교반하며 얼음에서 40분 동안 반응시키고 원심분리(~16000xg, 10분, 4°C)하여 상층액에 포함된 핵 단백질을 분리하였다. 분리된 핵과 세포질 단백질의 양을 Pierce™ BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 사용하여 정량하였다.

2.11.3. 소듐 도데실 설페이트 단백질 전기 영동 준비된 단백질과 4x Laemmli Buffer(Bio-Rad,

Hercules, CA, USA)을 3:1 비율로 혼합한 후에 95°C에서 10분간 끓여 단백질을 변성시킨 다음 얼음에서 식혀 western blot sample을 준비하였다. 적정한 SDS-PAGE gel을 Mini-Protein II Dual-Slab Apparatus(Bio-Rad)에 위치시킨 후 running buffer(tris/glycine/SDS buffer; Bio-Rad)를 채워주고 protein size marker(Bio-Rad)와 각 샘플들을 stacking gel의 각 well에 분주하여 전기영동해 분자량에 따라 단백질을 분리하였다.

2.11.4. 멤브레인 트랜스퍼

준비된 Immuno-Blot® Polyvinylidene Difluoride(PVDF) membrane(Bio-Rad)을 Methanol적서 활성화 시킨 후에 SDS-PAGE gel과 밀착시킨 후 Mini Trans-Bolt® Cell(Bio-Rad)과 Transfer buffer(Tris/Glycine Buffer(Bio-Rad), 20% methanol(Duksan Pure Chemical)를 사용하여 PVDF membrane(Bio-Rad)으로 단백질 증착을 수행한다. 단백질이 증착된 PVDF membrane을 5%(w/v) skim milk solution(Tris Buffered Saline(TBS) Buffer(Bio-Rad), 0.1% Tween 20(Bio-Rad), 5% Difco™ Skim Milk(BD Bioscience, San Jose, CA, USA))으로 60분 동안 blocking 하였다. 인산화된 단백질의 경우는 3%(w/v) BSA(bovine serum albumin) solution(TBS Buffer(Bio-Rad), 0.1% Tween 20(Bio-Rad), 3% BSA(Sigma-Aldrich)을 사용하였다.

2.11.5. 항체

Western blot analysis를 위해서 사용한 1차 항체는 다음과 같다. 세포 사멸 관련 1차항체는 caspase-3(Abcam, Cambridge, MA, USA), cleaved caspase-3(Abcam), PARP(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), cleaved PARP(Cell Signaling Technology), BAX(Cell Signaling Technology), Bcl-2(Cell Signaling Technology)를 사용하였다. 세포 염증 관련 1차항체는 NF- κ B p65(Cell Signaling Technology), Cox-2(Cell Signaling Technology), p44/42 MAPK(Erk1/2; Cell Signaling Technology), p-p44/42 MAPK(Erk1/2; Thr202/Tyr204; Cell Signaling Technology), SAPK/JNK(Cell Signaling Technology), p-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185; Cell Signaling Technology), p38 MAPK(Cell Signaling

Technology), p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182; Cell Signaling Technology)를 사용하였다. 시냅스 가소성 관련 일차 항체는 CREB(Cell Signaling Technology), p-CREB(Ser133) (Cell Signaling Technology)를 사용하였다. Western blot loading control에 대한 일차항체는 전체 세포 단백질은 GAPDH(Cell Signaling Technology), 핵 단백질은 lamin B1(Cell Signaling Technology)를 사용하였다.

2.11.6. 단백질 분석 방법

1차 항체들을 5%(w/v) skim milk solution에 각각 알맞게 희석시킨 후에 4°C에서 16시간 동안 blocking이 완료된 PVDF membrane과 흔들면서 반응시키고, TBS-T solution(TBS Buffer(Bio-Rad), 0.1% Tween 20(Bio-Rad))으로 3회 세척한 다음 2차 항체(Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP), Abcam; Goat Anti-Mouse IgG H&L(HRP), Abcam)를 5%(w/v) skim milk solution에 희석시켜 상온에서 60분 동안 흔들면서 처리해 주었다. TBS-T solution으로 3회 세척 후 SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate(Thermo Fisher Scientific)에 넣고 각각 알맞은 시간만큼 발색시킨 후 LuminoGraph I (WSE-6100, Atto) 장비를 사용하여 스캔 후 Image J Software(NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 단백질의 양을 산출하였다.

2.12. 통계분석

실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치±표준편차(mean±SD)로 나타내었고, 각 실험군과 유의성의 차이는 Student's T-Test로 분석해 P value 값이 0.05, 0.01 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 용암 해수 재배 브로콜리 추출물의 성분규명

UPLC(Ultimate 3000; Thermo Fisher Scientific)로 높은 압력에서 샘플 내 성분을 용출되게 한 후, Orbitrap을(Q Exactive plus; Thermo Fisher Scientific) 탑재한 고분해능 질량분석기

(High-resolution Accuracy mass spectrometer)를 이용해 검출된 화합물을 chromatogram에 표시하였다 (Fig. 1). 검출된 성분 중 현재 브로콜리 추출물의 지표성분으로 지정한 Sulforaphane, Glucoraphanin을 동시에 확인할 수 있었다. Sulforaphane은 분자량 177.29 으로 positive mode에서 retention time 13.49분에 [M+H]⁺ 형태로 m/z 178.0356 으로 관찰되었다. 분자량이 439.49인 glucoraphanin 은 negative mode에서 retention time 1.86분에 [M-H]⁻ 형태로 m/z 436.0411 이 관찰되었다. 그 외에 Apigenin, Apigenin-7-O-glucoside, Sulforaphane nitrile, 2-Feruloyl-1-sinapoylgentiobiose, 1,2,2'-Trisinnapoylgentiobioside, 1-O-Sinapoyl-beta-D-glucose 이 검출되었고 Table1에 나타내었다.

3.2. 용암 해수 재배 브로콜리 추출물의 성분규명

Sulforaphane을 정량하기 위한 HPLC 분석법을 검증하기 위해 5.5~165 ug/mL 농도 범위 내에서 분석하여 상관계수 0.99951을 얻었다, 직선성 결과에 의하여 계산된 검출한계 (LOD)는 3.572 ug/mL, 정량한계 (LOQ)는 10.826 ug/mL 으로 측정되었다. 분석법의 재현성을 검토하기 위해 3종의 농도 조건으로 분석한 결과 정확도는 96.6~98.9% 범위를 나타내었고, 정밀도는 5회 반복 분석 시 0.55~0.99% 범위로 측정되었다 (Table 2). 확립한 분석법으로 브로콜리 추출물을 분석한 결과 sulforaphane의 함량은 2700~3000 ppm을 나타내었다.

3.3. 용암 해수 재배 브로콜리 추출물에 의한 세포 독성 시험

브로콜리 추출물에 의한 세포 독성 평가를 위해, 신경 세포처럼 분화한 SH-SY5Y 세포에 각각 다른 농도의 브로콜리 추출물을 24시간, 48시간, 72시간 동안 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 최대 125 µg/ml의 농도에서 72시간 처리 조건에서도 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였다. (Fig. 2)

따라서, 100 µg/ml를 최대 농도 처리 조건으로 하여, 브로콜리 추출물에 의한 신경세포 사멸 억제와 염증반응 억제 그리고 시냅스 가소성 증가 실험을 수행하였다.

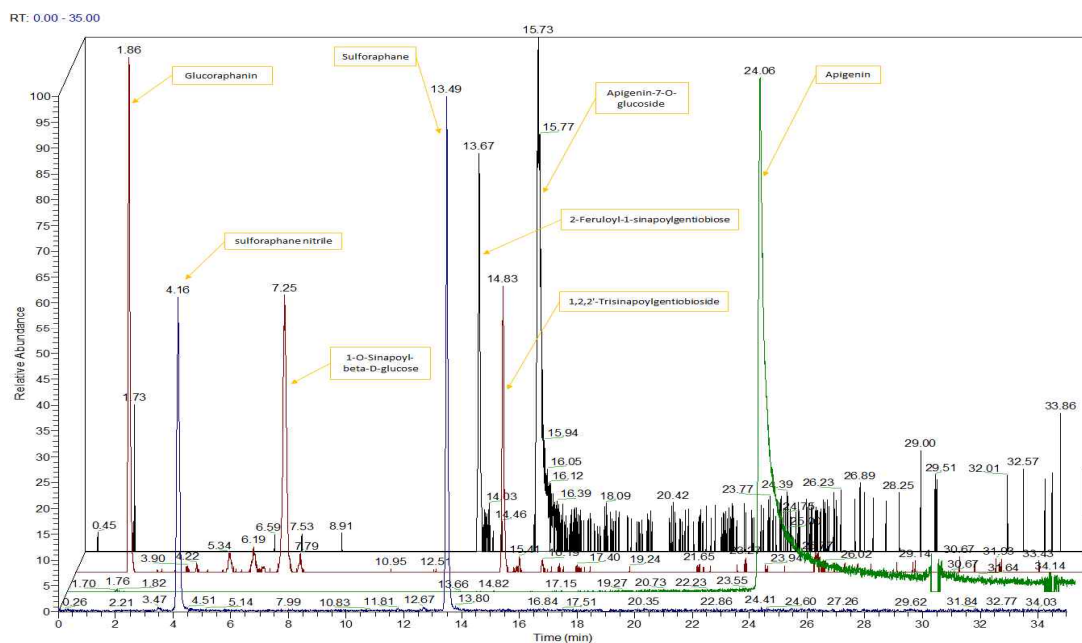


Fig. 1. Qualitative peak identification of Sulforaphane and Glucoraphanin in Magma Seawater broccoli extracts by High-resolution Accuracy Mass spectrometer (HRAM).

Table 1. Qualitative peak identification of Sulforaphane and Glucoraphanin in Magma Seawater broccoli extracts by High-resolution Accuracy Mass spectrometer (HRAM)

RT (min)	m/z	Formula ([M+H] ⁺ , [M-H] ⁻)	Δ ppm	Expected compound
1.86	436.0411	[C ₁₂ H ₂₂ NO ₁₀ S ₃] ⁻	0.02	Glucoraphanin
4.16	146.0636	[C ₆ H ₁₂ NOS] ⁺	1.02	Sulforaphane nitrile
7.25	385.114	[C ₁₇ H ₂₁ O ₁₀ S] ⁻	-0.03	1-O-Sinapoyl-beta-D-glucose
13.49	178.0356	[C ₆ H ₁₂ NOS ₂] ⁺	0.44	Sulforaphane
13.67	723.2136	[C ₃₃ H ₃₉ O ₁₈] ⁻	-0.85	2-Feruloyl-1-sinapoylgentiobiose
14.83	959.2823	[C ₄₅ H ₅₁ O ₂₃] ⁻	-0.33	1,2,2'-Trisinapoylgentiobioside
15.73	431.0981	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀] ⁻	-0.74	Apigenin-7-O-glucoside
24.06	269.045	[C ₁₅ H ₉ O ₅] ⁻	-1.99	Apigenin

Δ ppm value was used to show detection accuracy of chemical components analyzed by HRAM. If Δ ppm value of a chemical component is less than 5, its detection is considered as accurate. 8 components, having Δ ppm values less than 5, are shown in the table.

Table 2. Summary of Sulforaphane validation results by HPLC in Magma Seawater broccoli extracts

Method Validation Element	Acceptance Criteria	Result
Specificity	No interference factor on the main peak	No interference
	The retention times and spectrum patterns for the analytical maker are matched	Matched
Linearity	$R^2 > 0.990$ (10 ~ 300 %)	0.99951
Range	$R^2 > 0.990$ (50 ~ 150 %)	0.99887
Accuracy	Recovery (%) : 95.0 - 105.0 %	50 % : 96.6 % 100 % : 98.9 % 150 % : 98.0 %
Precision	Repeatability < 2.0 %	50 % : 0.55 % 100 % : 0.99 % 150 % : 0.61 % Average : 0.72 %
	Intermediate precision < 2.0 %	0.94 %
Limit of Detection (LOD)	Calculated by linearity results	3.572 ug/ml
Limit of Quantitation (LOQ)	Calculated by linearity results	10.826 ug/ml

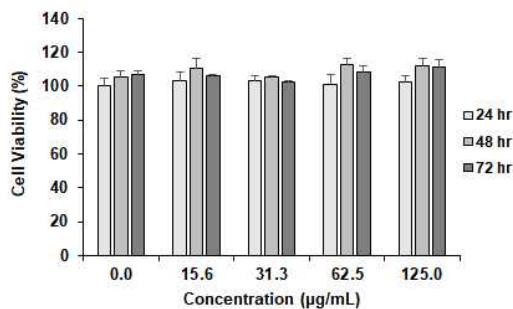


Fig. 2. Cytotoxicity test of broccoli extracts, prepared from broccolis cultivated in desalinated magma seawater of Jeju island(korea), in differentiated neuron-like SH-SY5Y cells. Experiments were performed in triplicate. The percentage of cell viability was normalized against the no treatment control at 24h.

3.4. 용암 해수 재배 브로콜리 추출물에 의한 신경세포 사멸 억제

알츠하이머성 치매 환자의 기억력 약화는 신경 세포 사멸로 인해 발생되며, 독성 단백질인 $A\beta$ 단백질의 축적에 의한 세포 사멸이 중요한 원인으로 알려져 있다 [2]. $A\beta$ 단백질에 의한 세포 사멸 신호로 인해 미토콘드리아 막에 존재하는 Cytochrom C가 세포질로 방출되면, Caspase-9, ATP, Apoptotic peptidase activating factor-1 (Apaf-1)과 결합하여 Apoptosome을 형성한 후, 단백질 분해 효소의 일종으로 세포사멸에 필수적인 역할을 하는 Caspase-3를 절단해서 Cleaved Caspase-3의 발현을 증가시켜서 세포 사멸을 유도한다 [9]. 핵에서 손상된 DNA를 수선하여 세포의 생존에 기여하는 PARP(Poly-ADP Ribose Polymerase)는 활성화된 Caspase-3에 의해 절단되어 비활성화됨으로써, 세포사멸을 진행시키는 역할을 담당한다 [10]. 따라서, cleaved/total caspase-3와 cleaved/total PARP의 비율이 높아

지게 되면 세포사멸이 증가한다. Bax(Bcl2-Associated X Protein)는 구조적인 변화를 거쳐 세포사멸을 유도하는데, 이로 인해 미토콘드리아에서 Cytochrome C가 분출된다. 반면, Bcl2는 Anti-Apoptotic Factor로 세포 생존을 촉진한다. 따라서 Bax/Bcl2 비율이 높아지게 되면 세포 사멸이 증가한다 [11].

신경 세포처럼 분화된 SH-SY5Y 세포에 높은 농도 ($10 \mu\text{M}$)의 $A\beta$ 단백질을 처리하면 세포 사멸이 유도되면서 cleaved PARP, cleaved Caspase-3, Bax의 발현이 증가하고 Bcl2의 발현이 감소한다. 그러나, $A\beta$ 단백질에 의해 유도된

세포 사멸은 브로콜리 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소하는 현상이 나타났다 (Fig. 3A). N-Acetylcysteine (NAC)는 강력한 항산화제로서 신경세포 사멸 억제 효과를 가지고 있기 때문에, 양성 대조군으로 사용하였다. 브로콜리 추출물에 의한 세포 사멸 억제는 cleaved PARP/Total PARP, cleaved Caspase-3/Total Caspase-3, Bax/Bcl2의 비율을 감소시키는 효과가 있다 (Fig. 3B, 3C, 3D). 이러한 실험 결과는 용암해수 브로콜리 추출물이 처리 농도 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 조건에서 유의미한 신경 세포 사멸 억제 효과가 있는 것을 나타낸다.

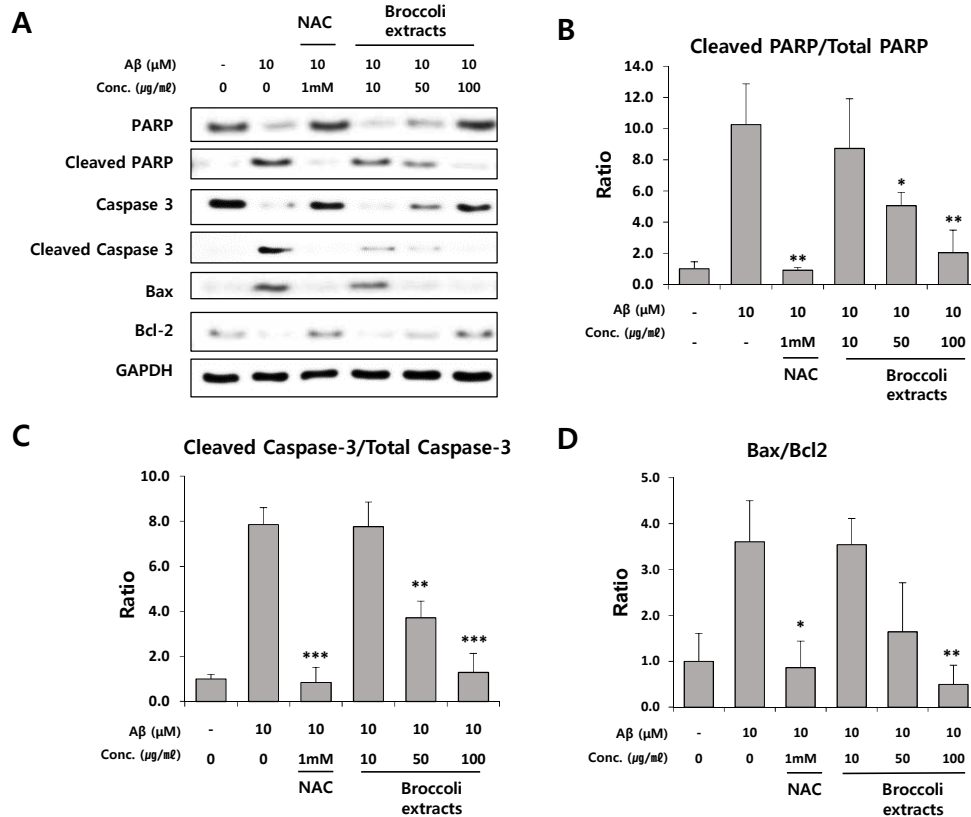


Fig. 3. Inhibitory effects of Magma Seawater broccoli extracts against $A\beta$ -induced apoptosis in differentiated neuron-like SH-SY5Y cells. (A) SH-SY5Y cells were incubated with $A\beta$ oligomers for 72 hours and subsequently treated with Magma Seawater broccoli extracts or NAC as a positive control. Cell lysates were analyzed by western blotting with the appropriate antibodies (B, C, D) Graphical representation of the ratios of cleaved/total caspase-3, cleaved/total PARP and Bax/Bcl-2 protein levels. Experiments were performed in triplicates. Error bars denote the standard deviation of the mean (SD), and the P-values were obtained using the Student's t-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3.5. 용암 해수 재배 브로콜리 추출물에 의한 신경 염증 반응 억제

노화가 진행됨에 따라 신체 대사 활동에 의해 활성 산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS)의 축적이 필수적으로 일어나고, 이러한 ROS는 퇴행성 뇌 질환을 유발하는 세포 사멸과 신경 염증 반응을 일으킨다 [12]. 신경 세포에서 ROS에 의해 활성화된 Nuclear Factor- κ B-p65 (NF- κ B p65) 전사 인자는 세포질 (Cytoplasm)에서 세포 핵 (Nucleus) 내로 이동해서, 표적 유전자의 NF- κ B binding site에 결합하여 염증 관련 인자 (Cytokines, Cox-2)들의 발현을 유도하는 역할을 한다 [13]. 이들 염증 관련 유전자들 중 Cyclooxygenase-2 (COX-2)는 염증 반응의 대표적인 바이오마커로서 PGE2(prostaglandin E2) 생성 과정을 촉매 하는 효소로 알려져 있다 [14]. 그 이외에 ROS 자극에 의해 세포 내 Extracellular signal-related kinases (ERKs), c-jun NH2-terminal kinases (JNKs) p38 MAPK (Mitogen-activated protein kinases)들의 인산화 증가에 의해 활성화되면서 염증 유발 인자들의 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다 [15]. 이러한 신경성 염증 (Neuroinflammation) 반응의 증가는 뇌 인지 능력 저하와 직접적인 관련성이 있다고 알려져 있다 [16].

신경 세포처럼 분화된 SH-SY5Y 세포에서 ROS의 일종인 H₂O₂에 의해 유도된 염증 반응은 NF- κ B-p65 전사 인자가 세포 핵 내로 이동하게 하는 현상으로 Western blot 실험을 통해 확인하였다. NF- κ B 전사 인자 활성화에 의해 발현이 증가하는 염증 유발 인자인 Cox-2의 발현도 역시 증가한다. 용암 해수 브로콜리 추출물은 이러한 신경 염증 반응을 농도 의존적으로 억제하는 효과가 있다 (Fig. 4A, 4C). NAC는 항염증 효과를 위한 양성 대조군으로 사용하였다. 용암해수 브로콜리 추출물이 처리 농도 50, 100 μ g/mL 조건에서 브로콜리 추출물의 NF- κ B-p65 전사 인자의 세포핵 내로의 이동 억제와 Cox-2의 발현 억제에 유의미한 효과가 있었다 (Fig. 4B, 4D). H₂O₂에 의해 유도된 염증 반응은 인산화된 p-ERK1/2(Thr202/Tyr204), p-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)/p-p38 MAPK(Thr180/Tyr182)의 발현도 증가시키는 것을 Western blot 실험으로 확인하였고, 용암해수 브로콜리 추출물에 의해 인산화가 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 5A). 용암해수 브로콜리 추출물에 의해 p-ERK1/2

(Thr202/Tyr204)/total ERK1/2, p-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)/total SAPK/JNK, p-p38 MAPK(Thr180/Tyr182)/total p38 MAPK 비율이 100 μ g/mL 처리 조건에서 감소하여, 유의미한 신경 염증 억제 효능이 있는 것을 확인하였다 (Fig. 5B, 5C, 5D).

3.6. 용암 해수 재배 브로콜리 추출물에 의한 신경전달물질 발현 증가와 시냅스 가소성 회복 효과

알츠하이머성 치매 환자의 기억력 약화는 뇌 조직에서 A β 단백질의 과도한 축적에 의한 시냅스 가소성의 감소로 인해 발생한다 [17]. 시냅스 가소성 조절에 중요한 신경 전달 물질인 Acetylcholine (ACh)은 시냅스에 존재하는 Cholinergic Receptor에 결합하여 신호 전달을 해서 뇌 인지 기능에 있어서 중요한 역할을 하는데, 알츠하이머성 치매 환자의 뇌조직에서 Acetylcholine을 합성하는 Choline Acetyltransferase (CAT)의 활성이 감소되어 있어서 Acetylcholine의 양이 정상인과 비교해서 상대적으로 적은 것으로 알려져 있다. Acetylcholine을 분해하는 효소인 Acetylcholinesterase (AChE) 억제제는 알츠하이머성 치매 환자의 시냅스에서 Acetylcholine의 양을 증가시키는 방법으로 사용되고 있다 [18]. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)는 시냅스에 존재하는 Tropomyosin Receptor Kinase B (TrkB)에 결합해서 시냅스 가소성을 촉진한다 [14]. BDNF의 발현이 알츠하이머성 치매 환자의 뇌조직에서 감소되어 있고 [19], BDNF의 발현을 조절하는 cAMP-response element-binding (CREB) 전사 인자의 활성이 알츠하이머성 치매 환자의 뇌조직에서 억제되어 있다 [20]. 인산화된 pCREB-Ser133 (pCREB)은 활성화된 CREB의 중요한 지표이다 [21].

신경세포처럼 분화된 SH-SY5Y 세포에 1 μ M A β oligomer 단백질을 처리하면 AChE의 효소 활성이 증가하는데, 용암 해수 브로콜리 추출물은 50, 100 μ g/mL 처리 조건에서 유의미한 AChE 활성 억제 효과가 있었다 (Fig. 6A). NAC는 시냅스 가소성 회복 효과를 위한 양성 대조군으로 사용하였다 [22]. SH-SY5Y 세포 외부로 배출되는 BDNF의 발현을 ELISA 실험 방법으로 측정했는데, A β 단백질에 의해 감소된 BDNF의 배출이 용암 해수 브로콜리 추출물 50, 100 μ g/mL 처리 조건에서 유의미하게 증가하였다 (Fig.

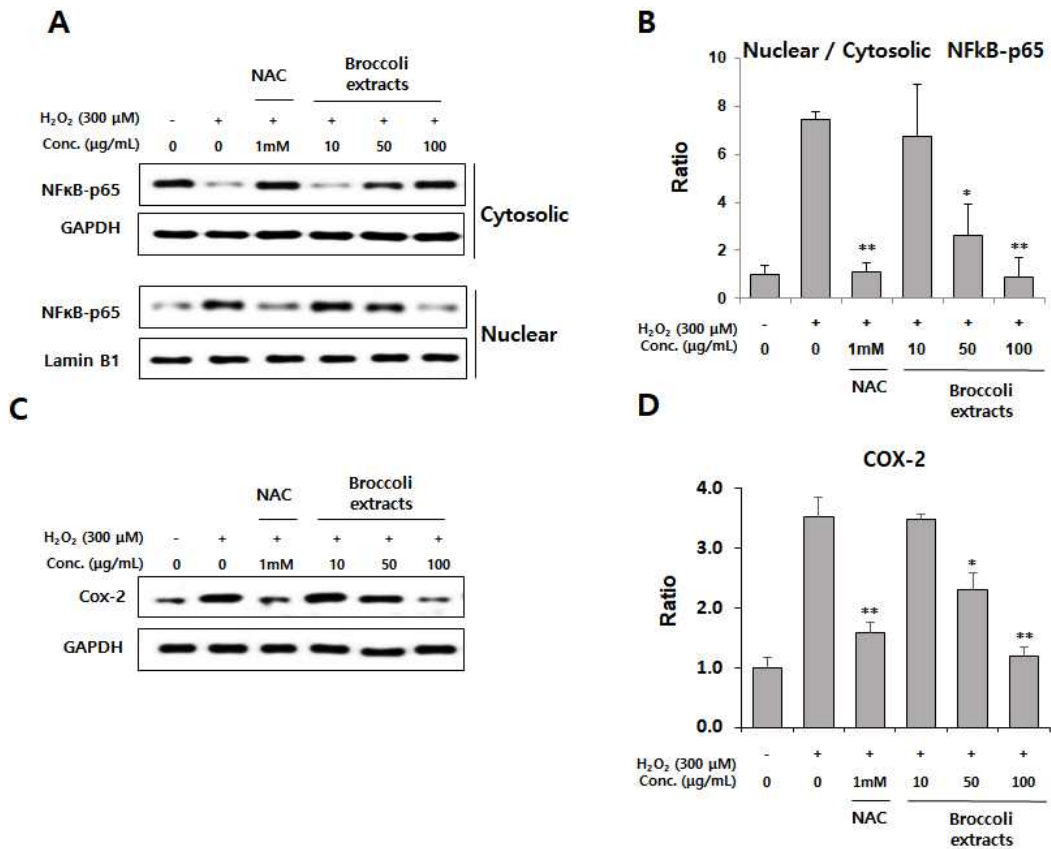


Fig. 4. Anti-inflammatory effects of Magma Seawater broccoli extracts against H₂O₂-induced activation of NF-κB transcriptional factor in differentiated neuron-like SH-SY5Y cells. (A) SH-SY5Y cells were co-treated with 300 μM H₂O₂ and Magma Seawater broccoli extracts for 24 hours. Cytosolic or nuclear lysates were analyzed by western blotting with the appropriate antibodies. (B) Graphical representation of the ratios of nuclear/cytosolic NF-κB protein levels (C) After co-treatment with 300 μM H₂O₂ and Magma Seawater broccoli extract, the whole cell lysates were analyzed by western blotting with the appropriate antibodies (D) Graphical representation of Cox-2 protein expression, normalized against GAPDH. Experiments were performed in triplicates. Error bars denote the standard deviation of the mean (SD), and the P-values were obtained using the Student's t-test. *p<0.05; **p<0.01

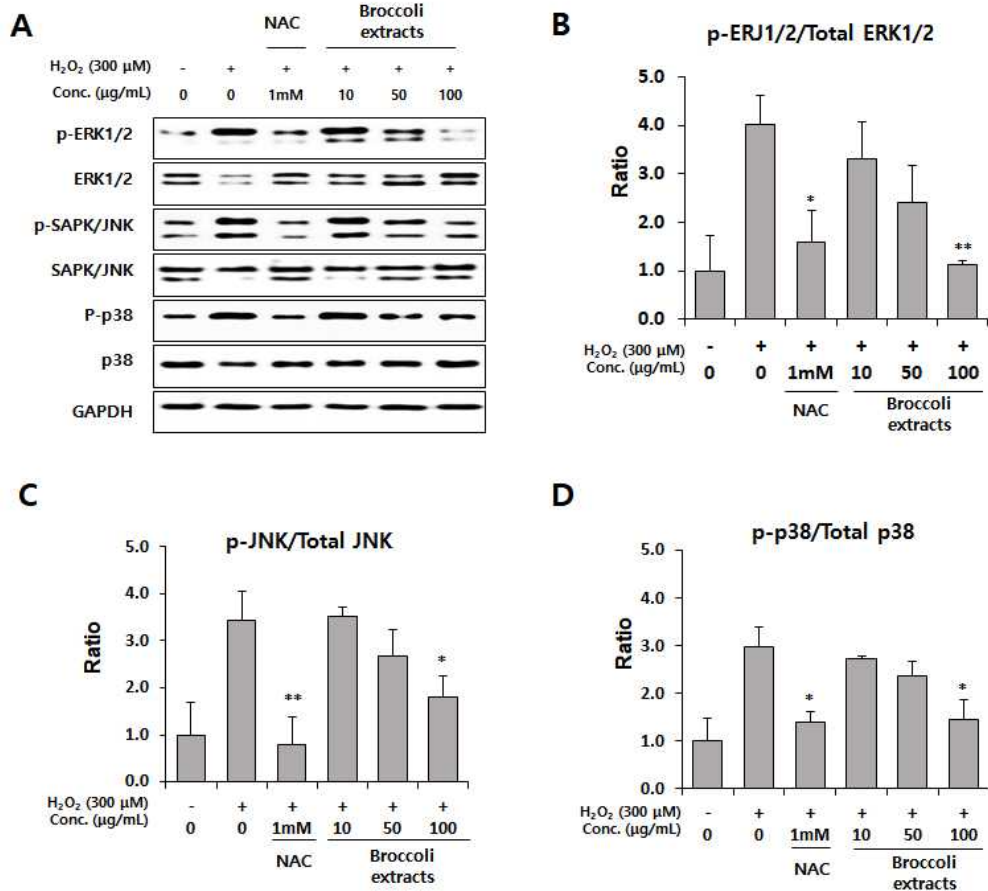


Fig. 5. Inhibitory effects of Magma Seawater broccoli extracts against H₂O₂-induced inflammatory responses in differentiated neuron-like SH-SY5Y cells.

(A) SH-SY5Y cells were co-treated with 300 μM H₂O₂ and Magma Seawater broccoli extracts for 24 hours, the whole cell lysates were analyzed by western blotting with the appropriate antibodies. (B, C, D) Graphical representation of the ratios of p-(Thr202/Tyr204)/total ERK1/2, p-(Thr183/Tyr185)/total SAPK/JNK, and p-(Thr180/Tyr182)/total p38 MAPK protein levels. Experiments were performed in triplicates. Error bars denote the standard deviation of the mean (SD), and the P-values were obtained using the Student's t-test. *p<0.05; **p<0.01

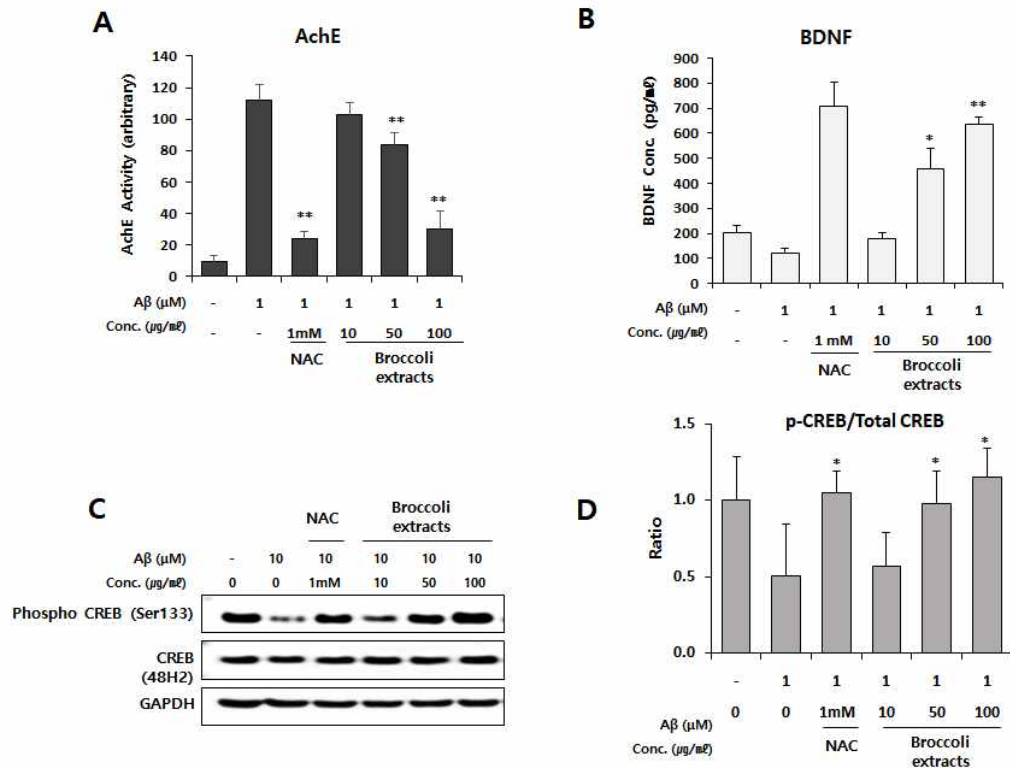


Fig. 6. Inhibition of Acetylcholinesterase (AChE) activity and enhancement of BDNF secretion by Magma Seawater broccoli extracts in differentiated neuron-like SH-SY5Y cells. (A) SH-SY5Y cells were incubated with Aβ₁₋₄₂ oligomers for 72 hours and subsequently treated with Magma Seawater broccoli extracts or NAC as a positive control. Cell lysates were used for AChE enzyme assay. Bar graph shows relative AChE activities. (B) After Aβ₁₋₄₂ and Magma Sea Water broccoli extract treatments, concentrated cell culture media was used for BDNF ELISA. Bar graph represents BDNF concentrations present in cell culture media. (C) Western blotting of the whole cell lysate with the appropriate antibodies (D) Graphical representation of the ratio of p-Ser133/Total CREB protein levels. Experiments were performed in triplicates. Error bars denote the standard deviation of the mean (SD), and the P-values were obtained using the Student's t-test. *p<0.05; **p<0.01

6B). 인산화된 pCREB-Ser133 발현이 Aβ 단백질에 의해 감소되지만, 용암 해수 브로콜리 추출물 50, 100 μg/mL 처리 조건에서 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 6C, 6D).

4. 결론

본 연구에서는 탈염 용암해수를 이용한 브로

콜리 재배로 유용 미네랄이 다량 함유된 브로콜리 추출물을 Q-Orbitrap Mass spectrometer로 성분을 규명하고, HPLC로 기준 및 시험방법을 설정하여 표준화하였고, 알츠하이머성 치매 발병에 중요한 Aβ 단백질에 의해 유도되는 신경 세포 사멸을 억제하는 실험 결과를 얻었다. 노화가 진행됨에 따라 필수적으로 축적되는 신경 염증 반응도 뇌 인지 기능 저하와 밀접한 관계가 있는데, 탈염 용암해수 브로콜리 추출물이 신경 염증

도 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. 그 이외에도 탈염 용암해수 브로콜리 추출물이 뇌 인지 기능 유지에 필수적인 시냅스 가소성 조절에 중요한 역할을 하는 신경 전달 물질인 ACh를 분해하는 효소인 AchE의 효소 활성을 억제하고, 신경 전달 물질 중 하나인 BDNF의 발현을 증가시키는 효과도 확인하였다. 탈염 용암해수 브로콜리 추출물에 의해 BDNF를 포함하는 신경 전달 물질의 발현을 증가시키는 CREB 전사 인자의 활성도 증가함을 확인하였다. 이러한 연구 결과들은 탈염 용암해수를 이용해 재배한 브로콜리 추출물이 알츠하이머성 치매 환자의 인지 기능 개선을 위한 효과적인 천연 식의약소재로 활용될 수 있음을 제안한다.

감사의 글

본 논문은 중소기업부의 지역기업 개방형 혁신 바우처(R&D) 사업(과제번호: P0010795) 추진 성과의 일부입니다.

References

1. N. Scarmeas, C. A. Anastasiou, M. Yannakouli, Nutrition and prevention of cognitive impairment. *Lancet Neurol.* Vol. 17, pp. 1006-1015, (2018).
2. M. G. Iadanza, M. P. Jackson, E. W. Hewitt, N. A. Ranson, S. E. Radford, A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Vol. 19, pp. 755-773, (2018).
3. X. Q. Chen, W. C. Mobley, Alzheimer Disease Pathogenesis: Insights From Molecular and Cellular. *Biology Studies of Oligomeric Ab and Tau Species.* *Front Neurosci.* Vol. 13, p. 659, (2019).
4. T. T. Hou, H. Y. Yang, W. Wang, Q. Q. Wu, Y. R. Tian, J. P. Jia. Sulforaphane Inhibits the Generation of Amyloid- β Oligomer and Promotes Spatial Learning and Memory in Alzheimer's Disease (PS1V97L) Transgenic Mice. *J Alzheimers Dis.* Vol. 62, No. 4, pp. 1803-1813, (2018).
5. J. Zhang, R. Zhang, Z. Zhan, X. Li, F. Zhou, A. Xing, C. Jiang, Y. Chen, Beneficial Effects of Sulforaphane Treatment in Alzheimer's Disease May Be Mediated through Reduced HDAC1/3 and Increased P75NTR Expression. *Front Aging Neurosci.* Vol. 9, p. 121, (2017).
6. J. Kim, S. Lee, B. R. Choi, H. Yang, Y. Hwang, J. H. Park, F. M. LaFerla, J. Han, K. W. Lee, J. Kim, Sulforaphane epigenetically enhances neuronal BDNF expression and TrkB 2 signaling pathways. *Mol Nutr Food Res.* Vol. 61, No. 2, p. 1600194, (2017).
7. H. Lee, E. Sim, A study on the industrialization of deep seawater in Japan and Korea, and its implications on the utilization of jeju magma seawater. *Jpn Cult Stud.* Vol. 45, pp. 451-469, (2013).
8. K. H. Bae, K. J. Kim, N. Y. Kim, J. M. Song. In vitro culture of rare plant *Bletilla striata* using Jeju magma seawater. *J Plant Biotechnol.* Vol. 39, pp. 281-287, (2012).
9. M. D'Amelio, V. Cavallucci, F. Cecconi, Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.* Vol. 17, pp. 1104-14, (2010).
10. P. Bai, Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Mol Cell.* Vol. 58, pp. 947-58, (2015).
11. J. Pawlowski, A. S. Kraft. Bax-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol. 97, pp. 529-31, (2000).
12. A. Chandrasekaran, M. Idelchik, J. A. Melendez, Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol.* Vol. 11, pp. 91-102, (2017).
13. F. Sivandzade, S. Prasad, A. Bhalerao, L. Cucullo, NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. *Redox Biol.* Vol. 21, p. 101059, (2019).
14. T. Manabe. Does BDNF have pre- or

- postsynaptic targets? *Science*. Vol. 295, pp. 1651–1653, (2002).
15. Y. Son, Y. K. Cheong, N. H. Kim, H. T. Chung, D. G. Kang, H. O. Pae, Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct*. Vol. 2011, p. 792639, (2011).
 16. M. L. Pfau, S. J. Russo, Neuroinflammation Regulates Cognitive Impairment in Socially Defeated Mice. *Trends Neurosci*. Vol. 39, pp. 353–355, (2016).
 17. S. Forner, D. Baglietto-Vargas, A. C. Martini, L. Trujillo-Estrada, F. M. LaFerla, Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci*. Vol. 40, pp. 347–357, (2017).
 18. S. Lombardo, U. Maskos, Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology*. Vol. 96, pp. 255–62, (2014).
 19. H. S. Phillips, J. M. Hains, M. Armanini, G. R. Laramée, S. A. Johnson, J. W. Winslow. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron*. Vol. 7, pp. 695–702, (1991).
 20. M. Yamamoto-Sasaki, H. Ozawa, T. Saito, M. Rosler, P. Riederer, Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type. *Brain Res*. Vol. 824, pp. 300–3, (1999).
 21. S. Naqvi, K. J. Martin, J. S. Arthur. CREB phosphorylation at Ser133 regulates transcription via distinct mechanisms downstream of cAMP and MAPK signalling. *Biochem J*. Vol. 458, pp. 469–79, (2014).
 22. M. da Costa, J. Bernardi, L. Costa, T. Fiuza, R. Brandao, M. F. Ribeiro, J. D. Amaral, C. M. P. Rodrigues, M. E. Pereira, N-acetylcysteine Treatment Attenuates the Cognitive Impairment and Synaptic Plasticity Loss Induced by Streptozotocin, *Chem Biol Interact*. Vol. 272, pp. 37–46 (2017).