

스피루리나 에탄올 추출물의 신경세포 보호활성

류가희¹ · 마충제^{1,2*}

¹강원대학교 의생명과학대학 생물소재공학과

²강원대학교 의생명과학연구소

Neuroprotective Activity of *Spirulina maxima* Hot Ethanol Extract

Gahee Ryu¹ and Choong Je Ma^{1,2*}

¹Department of Medical Biomaterials Engineering, College of Biomedical Science, Kangwon National University, 1, Gangwondaehak-gil, Chuncheon-si, Gangwon-do, 24341, Korea

²Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, 1, Gangwondaehak-gil, Chuncheon-si, Gangwon-do, 24341, Korea

Abstract – Excessive glutamate can cause oxidative stress in neuronal cells and this can be the reason for neurodegenerative disease. In this study, we investigated the protective effect of *Spirulina maxima* hot ethanol extract on mouse hippocampal HT22 cell of which glutamate receptor has no function. HT22 cells were pre-treated with *S. maxima* sample at a dose dependent manner (1, 10 and 100 µg/ml). After an hour, glutamate was treated. Cell viability, reactive oxygen species (ROS) accumulation, Ca²⁺ influx, decrease of mitochondrial membrane potential level and glutathione related assays were followed by then. *S. maxima* ethanol extract improved the cell viability by suppressing the ROS and Ca²⁺ formation, retaining the mitochondrial membrane potential level and protecting the activity of the antioxidant enzymes compared with group of vehicle-treated controls. These suggest that *S. maxima* may decelerate the neurodegeneration by attenuating neuronal damage and oxidative stress.

Keywords – *Spirulina maxima*, Glutamate toxicity, HT22 cell, Neuroprotection, Neurodegeneration, Antioxidant

과학기술과 의학기술의 발달은 인간의 수명을 연장시켰고 그에 따라 사회는 고령화 사회로 진입하였다. 이러한 고령화 사회에서 발생할 수 있는 심각한 의료 문제 중의 하나는 퇴행성 신경질환이다. 퇴행성 신경은 뇌나 척추에 많은 신경세포가 점진적으로 사멸하여 사라지거나, 그들의 기능을 잃거나 결과적으로 제 기능을 다하지 못하여 인지능력이나 감각능력, 운동능력이 소실되는 것을 말한다.¹⁾ 이러한 신경 손상은 알츠하이머 병(AD), 파킨슨병(PD), 헌팅턴병(HD)와 같은 신경계 관련 질병을 유발하게 된다. 퇴행성 신경질환의 발생은 점점 증가하고 있는 것에 비해 퇴행성 신경질환을 이해하기 위한 무수히 많은 연구가 진행되었음에도 불구하고, 증상과 원인을 설명하기 위한 명확한 메커니즘은 아직 제대로 알려져 있지 않은 형편이다. 그러나, 이러한 퇴행성 신경질환에 대한 많은 연구를 통하여 밝혀진 몇몇 공통적인 병인을 보면, 산화적인 스트레스, 흥분성 신

경독성, 미토콘드리아의 기능 장애, 신경 염증 등이 그 원인 중 하나로 제시되고 있다.²⁾ 글루타메이트는 정상적인 농도에서 신경전달물질로 작용하지만 과도한 농도의 글루타메이트는 흥분성 신경독성을 야기하여 세포 내에 산화적인 스트레스를 유발한다. 고농도의 글루타메이트는 시스틴/글루타메이트 역수송체를 억제하여 시스틴의 흡수를 방해하고, 그 결과 감소한 시스틴은 세포 내 항산화제인 글루타치온의 감소가 나타나게 한다. 그리고, 이러한 글루타치온의 감소는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 축적을 유발하여 세포내 산화적인 스트레스를 나타내어 결과적으로 신경세포가 사멸에 이르게 한다.³⁾ 활성산소종은 신경세포의 세포자연사(apoptosis)나 괴사(necrosis)를 유발하는 주요 인자 중 하나이며, 이는 다양한 종류의 퇴행성 신경질환이 계속되게 한다.^{4,5)} 과도한 양의 글루타메이트는 활성산소종의 생성 뿐만 아니라 칼슘이온의 항상성 유지에도 영향을 미친다.^{6,7)} 그 결과 세포 내 칼슘이온의 농도를 증가시키고, 이로 인하여 미토콘드리아의 기능 장애를 유발하고 최종적으로 세포의 사멸을 야기하는 결과를 나타낸다. 세포 사멸에 의

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

한 활성 산소종의 추가적인 생성이 이를 더욱 가속화시킨다.⁸⁾ 그리고, 미토콘드리아에서의 칼슘이온 농도의 증가와 세포 사멸은 미토콘드리아 세포막을 통하여 사이토크롬C의 유리를 증가시키고 미토콘드리아의 막전위를 붕괴시킨다.^{9,10)}

최근에, 글루타메이트의 산화적인 독성에 의한 영향을 평가하기 위하여 많은 다양한 실험에서 마우스의 해마로부터 유래한 신경세포인 HT-22세포를 이용하여 활성검색계로서 사용하였다. HT-22 세포는 이온이동성 글루타메이트 수용체가 정상적으로 작동하지 않아 글루타메이트의 흥분성 신경독성에 의한 신경세포의 사멸을 배제할 수 있는 활성 검색계이다.¹¹⁾ 이러한 이유로, HT-22 세포는 새로운 신경세포 보호 활성 물질을 찾는 유용한 도구로 사용할 수 있고, 실제로 몇몇 실험에서 뇌신경 관련 이상 질환의 새로운 약리학적 소재로 ROS 소거활성과 항산화 효소 활성을 갖는 천연물 유래 화합물이 HT-22세포에서 신경세포 보호 활성을 나타내는 결과를 보고한 논문이 있다.³⁾

이에 본 연구진은 glutamate로 인한 산화적인 스트레스에 의한 신경세포의 사멸을 막아주어 신경세포 보호 활성을 갖는 천연물을 찾기 위하여 수종의 천연물 추출물을 대상으로 glutamate로 신경 독성을 유발한 HT-22 세포를 검색계로 하여 활성 검색을 수행하였다. 그 결과 스피루리나(*Spirulina maxima*, Spirulinaceae)를 초음파 추출한 물 추출물이 유의성 있는 신경세포 보호 활성을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.¹²⁾ 스피루리나는 전통적으로 지중해 지역에서 식용으로 사용하여 온 해양 조류 식물이다.¹³⁾ 남조류로 아스텍 문명 이래로 매우 가치있는 식용 자원으로 사용되어왔다.¹⁴⁾ 스피루리나는 단백질이 매우 풍부하고 superoxide dismutase, 비타민 C/E, 베타카로틴, phycocyanin과 같은 다양한 종류의 항산화 물질을 포함하고 있다.^{15,16)} 또한, 클로로필 a, b, c, d와 같은 다양한 종류의 클로로필을 포함하고 있고 클로로필은 항콜레스테롤, 항암 및 조혈, 혈액신생 등과 같은 다양한 생리활성이 알려져 있다.

기존 연구에서 초음파 추출한 스피루리나의 물 추출물이 동물행동실험에서 강력한 인지능 개선활성을 나타내었고, 글루타메이트로 신경독성을 유발한 신경세포의 사멸을 막아주는 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.¹⁷⁾ 본 연구에서는 추출용매와 추출방법을 달리하여 얻은 스피루리나의 열탕 추출한 에탄올 추출물이 신경세포에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 이를 위하여 글루타메이트에 의한 신경독성에 대한 신경세포의 생존율과 산화적인 스트레스와 관련된 신경세포 보호 작용기전에 대한 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(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO)는 대정화금^(株)에서 구입하여 사용하였다.

식물 재료 - 건조 스피루리나 분말 시료는 한국 해양 과학기술원(KIOST)으로부터 제공받았다. 50 g의 스피루리나 분말 시료를 수직형 환류냉각기를 장착한 추출장치(TL-6 Point (K), Misung Scientific Co., Yangjoo, Korea)를 이용하여 500 ml의 70% 에탄올을 추출용매로 하여 6시간동안 80°C의 온도에서 추출하였다. 추출된 추출물은 회전식 감압 농축기(Rotary Vacuum Evaporator N-N series, EYELA, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하였고, 동결 건조하였다(PVTF 10AT, ILSIN, Suwon, Korea). 추출 수율은 21.11%로 기존 초음파로 추출한 물 추출물에 비하여 추출효율이 35% 증가하였다(Table 1).

HT22 세포 배양 - 마우스 해마 세포주인 HT-22 세포는 10%의 FBS와 1%의 penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM 배지를 세포 배양액으로 사용하여 배양하였다. 세포의 배양 조건은 37°C의 온도에서 5%의 CO₂를 공급하여 주며 CO₂ incubator에서 진행이 되었다. 시료나 독성물질을 처리하기 전까지 세포가 최적의 조건으로 배양될 수 있도록 2-3일 마다 한 번씩 계대 배양해 주었다.

뇌신경세포 보호 활성 측정 - 뇌신경세포 보호 활성은 기존의 방법을 수정하여 진행하였다.¹⁸⁾ 세포 생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 배양된 HT22 세포를 48 well plate에 1.9×10⁴/well의 농도로 seeding 하고 37°C, 5%의 CO₂의 조건으로 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 후 control, negative control 그룹에는 배지만 가하고, positive control 그룹에는 50 μM trolox를, 시료 그룹에는 1 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml 농도의 스피루리나 추출물 시료를 처리하여 주었다. 약 한 시간 정도 배양 후 control을 제외한 모든 well에 glutamate(3 mM)를 투여하여 산화적인 스트레스를 유발하였다. 이 때 모든 처리량은 30 μl/well로 하였다. 24 시간 배양 후 모든 well에 150 μl의 MTT solution(1 mg/ml in PBS)을 가하였다. 3 시간 배양 후 각 well의 배지를 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 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 같은 조건에서 3회 반복하였고, 얻어진 결과값을 통계처리 하였다.

세포 내 ROS 측정 - 배양한 세포에서 ROS의 상대적인 양을 비교하기 위하여 Goodman과 Mattson의 방법을 이용

하여 라디칼에 민감하게 반응하는 화합물인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(H₂-DCF-DA)를 사용하여 활성을 평가하였다.¹⁹⁾ 48 well plate에 배양한 HT22세포에 스피루리나 시료를 투여하고 한 시간 뒤 6 mM 글루타메이트를 처리하였다. 8시간 배양 후 10 μM의 DCF-DA를 처리하고 1시간 방치한 다음 phosphate-buffered saline(PBS)로 세포를 씻어주고 1% Triton X-100으로 추출하였다. 산화된 DCF 형광을 528 nm와 485 nm에서 측정하였다. 실험 결과는 세 번 반복 실험 후 측정된 값을 통계처리 하였다.

세포 내 Ca²⁺ 농도 측정 - 배양한 HT22세포에 Ca²⁺의 상대적인 양을 비교하기 위하여 형광물질인 Fura-2AM을 사용하였다. 48 well plate에 배양한 HT22세포에 스피루리나 시료를 투여하고 6 mM의 글루타메이트를 처리하였다. 6시간 배양 후 20 μM의 Fura-2AM을 투여하고 2시간 방치하였다. Fura-2AM 형광을 340 nm와 380 nm에서 측정하였다. 실험 결과는 세 번 반복 실험 후 측정된 값을 통계처리 하였다.

미토콘드리아 막전위 손상 억제 효과 측정 - 배양된 HT22 cell에 trolox와 스피루리나(1 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml)를 처리하고 1 시간 후 6 mM의 glutamate를 처리해 세포 사멸을 유도하였다. 24시간 배양 후 10 μM의 rhodamine 123(Rho 123)을 처리하고 37°C에서 30 분간 배양 후 PBS로 3회 세척하였다. 형광도는 excitation wavelength - 480 nm / emission wavelength - 525 nm에서 두 번 측정하여 비교하였다. 실험 결과는 세 번 반복 실험 후 측정된 값을 통계처리 하였다.

글루타치온 총 함량 및 항산화 효소 활성 측정 - HT22 cell을 6 well plate에 3.4 × 10⁴ cells/well 로 1 ml씩 seeding 하고 24 시간동안 배양한 뒤, 스피루리나(1 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml)와 양성 대조군으로 trolox를 각각 처리하고 1 시간 뒤 5 mM의 glutamate를 처리하였다. 24 시간 배양 후 PBS로 2 회 세척하고 3,000 g, 4°C 조건으로 30 분간 원심 분리를 하여 배지를 제거하고 170 μl의 상층액을 수집하여

항산화 효소와 글루타치온의 양을 측정하였다. 상등액에서 글루타치온의 총 함량은 효소적 사이클링 방법을 이용하여 측정하였다.²⁰⁾ 글루타치온 퍼옥시다아제(GPx)의 활성은 과산화수소(H₂O₂)를 기질로 하는 Flohe와 Gunzler의 방법을 이용하여 측정하였다.²¹⁾ 글루타치온 리덕타아제(GR)의 활성은 Carlberg와 Mannervik의 방법을 응용하여 측정하였다.²²⁾ 글루타치온의 총 함량은 상등액에 0.3 mM NADPH, 0.6 mM DTNB(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, Ellman's reagent)와 5 unit/mL의 glutathione disulfide reductase(GSSG-R)를 처리한 후 37°C에서 30초 동안 반응시킨 후 312 nm에서 흡광도를 측정하였다. 글루타치온 퍼옥시다아제의 활성은 상등액에 0.4 mM NADPH, 0.2 mM H₂O₂, 1 mM의 환원형 L-glutathione(GSH)과 1 unit/mL의 glutathione disulfide reductase(GSSG-R)를 처리한 후 1분 동안 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 글루타치온 리덕타아제의 활성은 상등액에 0.1 mM NADPH와 1 mM 산화형 glutathione(GSSG)을 가한 후 2분 동안 반응시키고 나서 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험 결과는 세 번 반복 실험 이후 측정된 값을 통계처리 하였다.

결과 및 고찰

MTT assay를 통한 뇌신경세포 보호 활성 측정 - 스피루리나 에탄올 추출물의 신경세포보호활성을 HT22 세포에서 MTT assay를 통하여 평가하였다. 기존 연구에서 스피루리나가 스크폴라민으로 처리하여 치매를 유발한 마우스를 이용한 실험에서 인지기능을 회복시켜주는 결과를 얻을 수 있었고, 스피루리나의 초음파 물 추출물에서 신경세포 보호활성이 있음을 확인하였다. 본 연구에서 수직형 환류냉각기를 이용하여 80°C로 가열하여 추출한 70% 에탄올 추출물의 신경세포보호 활성을 HT22 세포에서 평가하였다. 실험 결과, 스피루리나의 에탄올 추출물의 경우 신경세포 보호 활

Table I. Extraction ratio and relative protection of *S. maxima* against glutamate insultation in HT22 cells

	Relative Protection (%)	Extraction Yield (%)
Control	100 ± 3.17	
Glutamate	0 ± 5.43	
Positive control (trolox)	93.82 ± 3.74 ^{***}	
SME ¹	1 μg/ml	15.07 ± 0.58
	10 μg/ml	31.33 ± 7.41 [*]
	100 μg/ml	61.40 ± 4.23 ^{**}
SMW ²	1 μg/ml	0.1 ± 2.21 [*]
	10 μg/ml	21.42 ± 5.78 [*]
	100 μg/ml	98.41 ± 6.67 ^{**}

¹*Spirulina maxima* ethanol extract

²*S. maxima* water extract

성은 1 µg/ml의 농도에서 상대적인 신경세포 보호 활성이 15.07%, 10 µg/ml에서 31.34%, 100 µg/ml에서 61.40%였다. 이러한 실험결과는 에탄올 추출물이 물 추출물에 비하여 저농도에서는 활성이 조금 더 강하게 나타났고, 고농도에서는 물 추출물의 활성이 더 강하게 나타났다(Table I). 추출 방법에 따라 추출되는 화합물의 조성의 변화를 HPLC 크로마토그램을 통하여 비교하였다(Fig. 1). Fig. 1A는 c-phycocyanin의 크로마토그램, B는 에탄올 추출물, C는 물 추출물의 HPLC 크로마토그램이다. 에탄올 추출물에서 C-phycocyanin에 해당하는 피크의 면적이 넓게 나온 것으로 보아 스피루리나 에탄올 추출물에서 phycocyanin의 함량이 더 많은 것으로 판단할 수 있다. Phycocyanin은 스피루리나에 존재하는 색소 단백질로 항산화 활성 및 항염증 활성 등

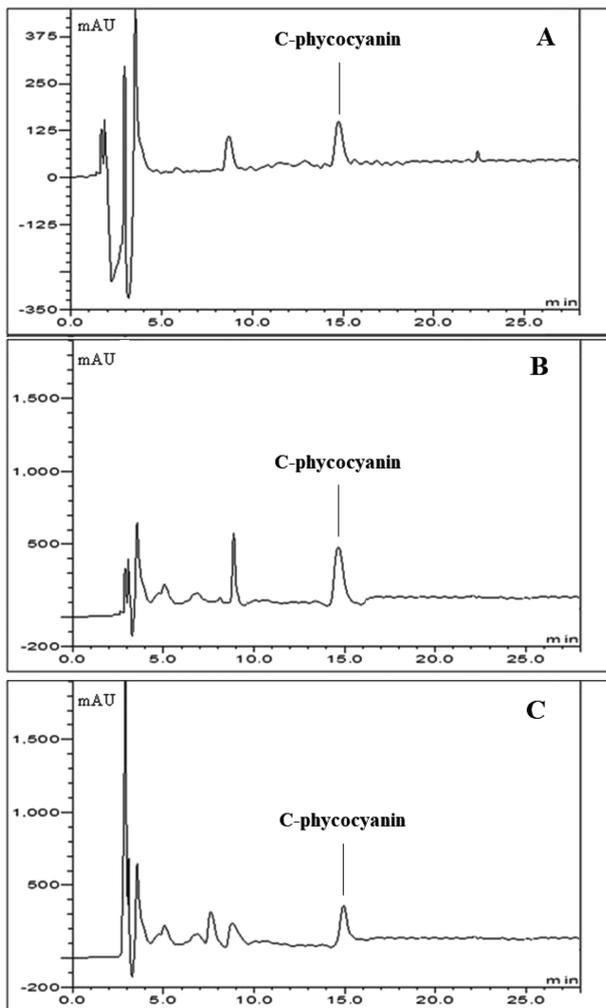


Fig. 1. High-performance liquid chromatography-DAD analysis ($\lambda = 580 \text{ nm}$) of phycocyanin (A), *Spirulina maxima* ethanol extract (B) and *S. maxima* water extract (C) using a C5-column with 20% (v/v) acetonitrile solution containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid as an eluent.

이 보고되어 있다.^{15,16} 추출 방법에 따른 성분의 변화가 추출물의 생리활성에 영향을 준 것으로 생각할 수 있으며 이러한 변화가 스피루리나의 신경세포 보호 활성에 영향을 주어 저농도에서의 활성의 증가에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다. 고농도에서의 활성의 저하는 스피루리나 에탄올 추출물에서 추출된 화합물들의 자체 독성에 의한 것이 아닐까 하는 판단을 할 수 있다. 이러한 실험결과를 통하여 스피루리나의 에탄올 추출물 또한 글루타메이트에 의하여 손상된 신경세포를 충분히 보호해 줄 수 있는 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 에탄올 추출물의 경우 가장 눈여겨 볼 만한 장점으로서는 추출 수율을 들 수 있겠다. 물 추출물에 비하여 약 35%의 수율 증가를 보여 추출 방법의 변화를 통하여 생산을 늘릴 수 있을 것으로 기대한다(Table I). 이러한 스피루리나 에탄올 추출물의 신경세포 보호 작용기전을 알아보기 위하여 세포내 활성산소의 생성량, Ca^{2+} 의 농도, 미토콘드리아 막전위의 차이, 글루타치온의 양 및 항산화 효소의 활성 등을 측정하였다.

스피루리나가 ROS의 생성에 미치는 영향 - 과도한 글루타메이트는 ROS의 생성을 증가시켜 산화적인 스트레스를 유발한다. 또한, 글루타메이트에 의해 증가한 ROS는 세포내로 Ca^{2+} 이 유입되는 기전을 촉발시킨다. 스피루리나의 신경세포 보호 활성이 글루타메이트에 의해 증가한 ROS의 생성을 감소시켜 나타나는 것인지 확인하고자 DCF-DA 형광염료를 이용하여 ROS생성량을 측정하였다. 실험 결과 스피루리나는 100 µg/ml의 농도에서 글루타메이트에 의하여 증가한 ROS의 생성을 현저하게 낮추어 주었다(Fig. 2). 글루타메이트 처리군에서는 대조군에 비하여 ROS 생성을 증가시켰고(128.41%), 스피루리나 에탄올 추출물은 증가한 ROS의 생성을 대조군 수준인 109.13%로 감소시켰다. 이러한 실

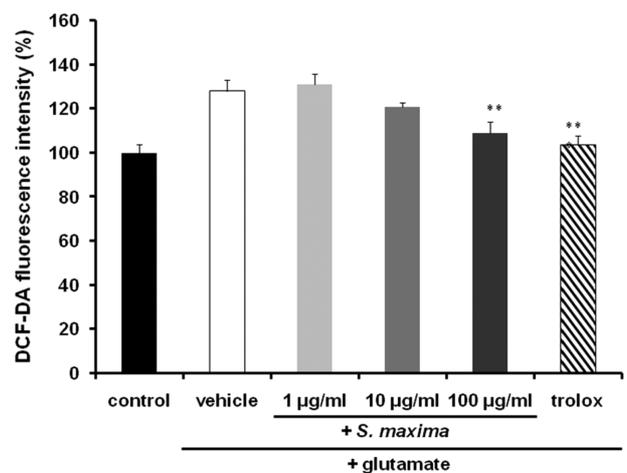


Fig. 2. Effect of *S. maxima* extract (1, 10 and 100 µg/ml) on ROS production in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as mean \pm the standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group.

험결과는 스피루리나가 효과적으로 항산화 활성을 나타내어 신경세포 보호 활성을 나타낼 수 있음을 시사한다.

스피루리나 에탄올 추출물이 세포 내 Ca²⁺ 농도와 미토콘드리아의 막전위에 미치는 영향 - 글루타메이트의 신경독성에 의하여 Ca²⁺의 농도가 증가하는 것으로 알려져 있고 이렇게 증가한 Ca²⁺의 농도에 의하여 미토콘드리아의 손상을 유발하게 한다는 연구 결과가 있다. 산화반응에 의하여 apoptosis의 초기 단계에 미토콘드리아가 손상을 입어 미토콘드리아의 막전위가 감소하게 된다. 스피루리나가 글루타메이트에 의하여 나타나는 신경세포의 사멸 과정 중 Ca²⁺ 이온의 농도에 어떠한 영향을 주는지 Ca²⁺의 양을 측정하는데 일반적으로 사용하는 Fura-2AM 형광 염료를 사용하였다. 또한 미토콘드리아의 막전위 변화에 미치는 영향을 평가하고자 Rho-123 형광 염료를 사용하였다. 스피루리나 에탄올 추출물을 처리한 실험군에서 글루타메이트에 의하여 대조군에 비하여 증가한 Ca²⁺의 농도(135.27%)가 통계적으로 유의성 있는 감소가 나타났다. 100 µg/ml의 스피루리나 에탄올 추출물이 글루타메이트에 의하여 증가한 Ca²⁺의 농도를 117.24%로 낮추어 주었다(Fig. 3). 또한, 스피루리나 에탄올 추출물은 글루타메이트에 의한 Ca²⁺의 증가에 따른 미토콘드리아의 막전위의 손상을 농도의존적으로 유의성 있게 대조군과 비슷한 정도로 회복시켜 주었다. 스피루리나 에탄올 추출물의 미토콘드리아 막전위 손상 회복 활성은 10 µg/ml의 농도에서 81.16%, 100 µg/ml의 농도에서 88.89%로 나타났으며 이는 양성대조군으로 사용된 Trolox와 비슷한 수준이었다(Fig. 4). 이러한 결과는 스피루리나의 에탄올 추출물의 항산화 활성으로 인하여 글루타메이트에 의하여 증가한 활성산소종의 생성을 억제하고 Ca²⁺의 농도를 정상

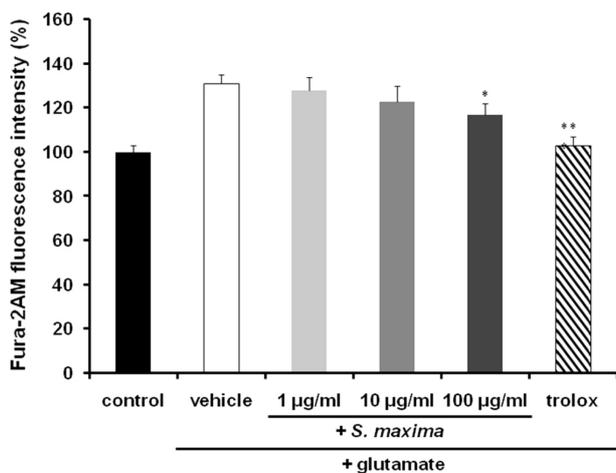


Fig. 3. Effect of *S. maxima* extract (1, 10 and 100 µg/ml) on Ca²⁺ influx in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as mean ± the standard error of the mean. *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 versus the glutamate-treated group.

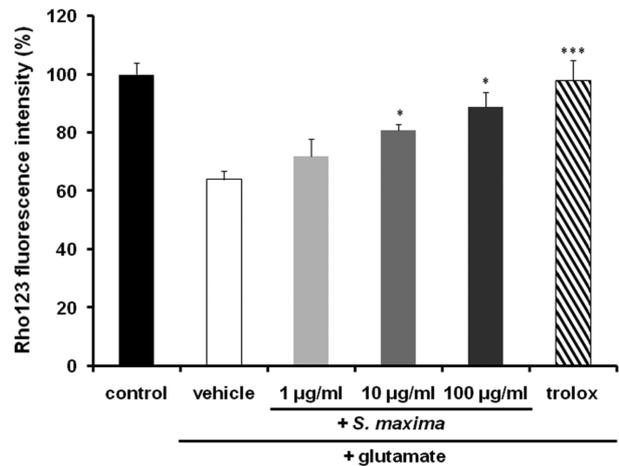


Fig. 4. Effect of *S. maxima* extract (1, 10 and 100 µg/ml) on MMP level in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as mean ± the standard error of the mean. *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 versus the glutamate-treated group.

적인 수준으로 낮추어 주고, 미토콘드리아의 손상을 막아 신경 세포의 사멸을 막는 보호 활성을 나타내는 것으로 작용기전을 설명할 수 있겠다.

스피루리나 에탄올 추출물이 글루타치온 함량과 항산화 효소 활성에 미치는 영향 - 스피루리나 에탄올 추출물의 항산화 활성을 보다 효과적으로 이해하기 위하여 생체 내 항산화제로 작용하는 글루타치온의 양과 글루타치온의 생합성과 연관이 있는 효소(glutathione reductase, glutathione peroxidase)의 활성을 평가하였다. 스피루리나 에탄올 추출물을 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml의 농도로 투여하였을 때, 글루타메이트에 의하여 감소한 글루타치온의 생성량을 회복시켜 주는지 확인하였다. 스피루리나 에탄올 추출물 100 µg/ml을 투여한 실험군에서 글루타메이트만 투여한 그룹에 비하여 67.45% 글루타치온의 생성량이 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 또한, 스피루리나 에탄올 추출물을 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml의 농도로 투여하였을 때, 글루타메이트에 의하여 발생한 HT22 신경세포의 사멸과 연관되어 감소한 glutathione peroxidase의 활성에 변화를 주는지 확인하였다. 스피루리나 에탄올 추출물은 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml의 농도에서 glutamate 처리군에 비하여 glutathione peroxidase의 활성을 각각 30.93%, 41.57%, 68.01% 씩 증가시켰다(Fig. 6). 마지막으로, 스피루리나 에탄올 추출물을 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml의 농도로 투여하였을 때, 글루타메이트에 의하여 손상된 HT22 신경세포에서 감소한 glutathione reductase의 활성을 증가시키는지 확인하였다. 스피루리나 에탄올 추출물은 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml의 농도에서 glutamate 처리군에 비하여 glutathione reductase의 활성을 각각 32.34%, 41.05%, 52.38% 씩 증가시켰다(Fig. 7). 이러한 실험결과를 종합하여, HT22세포에 glutamate를

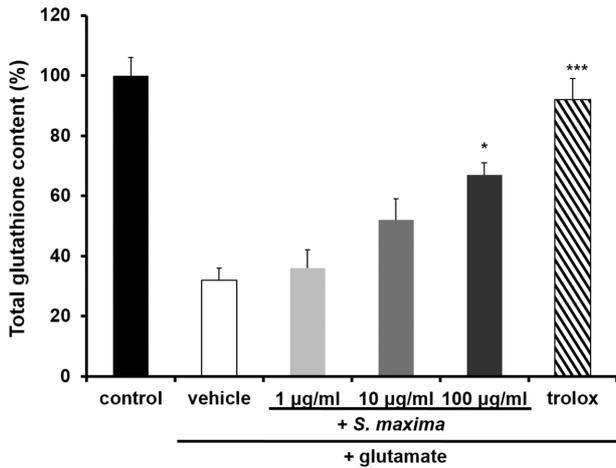


Fig. 5. Effect of *S. maxima* extract (1, 10 and 100 µg/ml) on total glutathione amount in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as mean ± the standard error of the mean. *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 versus the glutamate-treated group.

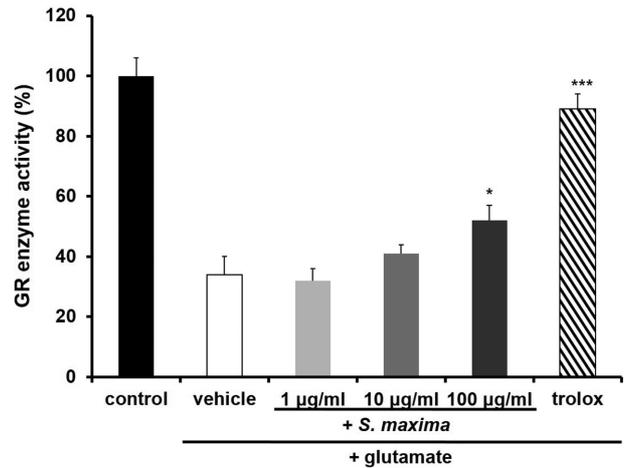


Fig. 7. Effect of *S. maxima* extract (1, 10 and 100 µg/ml) on GR enzyme activity in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as mean ± the standard error of the mean. *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 versus the glutamate-treated group.

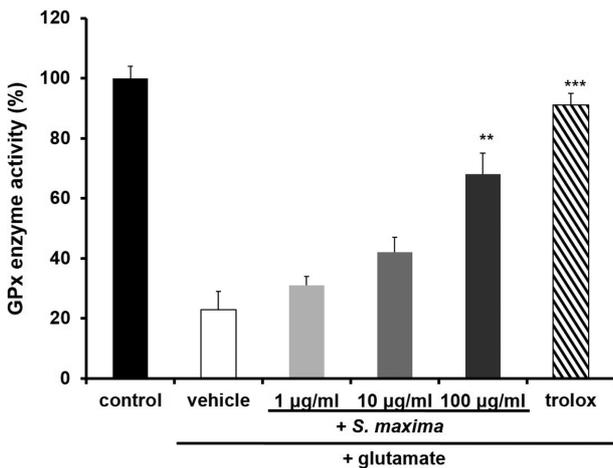


Fig. 6. Effect of *S. maxima* extract (1, 10 and 100 µg/ml) on GPx enzyme activity in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as mean ± the standard error of the mean. *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 versus the glutamate-treated group.

처리하여 신경세포의 사멸을 유도하였을 때에 스피루리나 에탄올 추출물이 항산화제로 작용할 수 있는 글루타치온의 양을 증가시키고, 이의 대사와 관련된 glutathione peroxidase 및 reductase의 활성을 증가시키는 결과로부터 스피루리나 에탄올 추출물의 신경세포 보호 활성은 항산화 활성에 근거한 것을 시사한다고 볼 수 있다.

스피루리나는 지중해 지역에 풍부한 해양 천연물로 식용으로 흔히 사용하는 조류 식물이다. 다양한 연구를 통하여 비만, 항염증, 면역 조절 등의 생리활성이 알려져 있으며, 신경관련 질환에도 효과가 있음이 보고되어 있다.^{23,24)} 스피루리나는 BDNF/CREB 신호전달 기전을 통하여 아밀로이

드 베타를 처리한 PC12세포에서 신경세포 보호활성이 있음이 보고되었고, 스피루리나를 위주로 한 식이실험을 통하여 α-synuclein을 이용한 파킨슨병 모델에서 신경세포 보호 활성이 나타남이 알려져 있다.^{25,26)} 본 연구진은 기존에 스피루리나 초음파 물 추출물이 글루타메이트로 처리한 HT22 세포에서 신경세포 보호 활성이 있음을 보고하였다.¹²⁾ 본 연구에서는 추출용매와 추출방법을 다르게 한 스피루리나의 추출물을 사용하여 신경세포 보호활성을 평가하여 기존 연구와 비교 분석하고자 하였다. 결과적으로 초음파 물 추출물과 수직형 환류냉각기를 이용하여 추출한 에탄올 추출물의 신경세포 보호활성은 저농도에서는 에탄올 추출물의 활성이 강하게 나타났고 고농도에서는 물 추출물의 활성이 강하게 나타났다. 추가적으로 스피루리나 에탄올 추출물의 약리활성 기전을 항산화와 관련하여 측정하였고, 실험결과를 종합하여 이러한 스피루리나 에탄올 추출물의 약리활성은 스피루리나가 가지고 있는 항산화 활성에 근거한 것으로 판단할 수 있었다. 데이터는 신지 않았지만 스피루리나는 DPPH 라디칼 소거활성 또한 가지고 있어 이에 대한 추가된 하나의 근거가 될 수 있다. 스피루리나 에탄올 추출물 또한 향후 동물 행동실험을 추가로 진행한다면 알츠하이머 병과 같은 퇴행성 신경질환의 치료제로 개발할 수 있는 가능성이 높을 것으로 기대된다.

결 론

본 실험을 통하여 스피루리나 에탄올 열탕 추출물은 HT22 세포에서 글루타메이트에 의한 산화적 스트레스로 인한 세포 독성을 유의적으로 보호하여 신경세포의 사멸을 막아주는

활성을 나타내었다. 이는 글루타메이트에 의하여 증가한 ROS의 생성을 감소시켜주고, 세포 내 Ca^{2+} 의 농도를 낮추어 주었으며 미토콘드리아의 막전위를 정상화하여 나타난 결과임을 확인할 수 있었다. 또한, 생체 내 항산화제인 glutathione의 생성을 증가시키고, glutathione peroxidase와 glutathione reductase의 활성을 증가시키는 등 항산화 활성을 정상 수준으로 회복시켜 주었다. 이러한 실험결과를 종합하면, 스피루리나 에탄올 추출물은 강력한 항산화 능력을 바탕으로 글루타메이트에 의한 신경세포의 사멸을 막아주는 활성을 발현하는 것으로 사료된다. 스피루리나의 활성 성분이 무엇인지 더욱 연구가 진행되어야 할 필요가 있을 것이고, 알츠하이머를 유발한 마우스를 이용한 행동실험을 진행하여 향후 알츠하이머 병과 같은 퇴행성 신경질환의 치료제로 개발을 진행할 가치가 있을 것으로 생각된다.

Acknowledgments

이 논문은 2018년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2018R1A6A1A03025582).

인용문헌

- Morais, L. C. S. L., Barbosa-Fihlo, J.M. and Almeida, R. N. (2003) Plants and bioactive compounds for the treatment of Parkinson's disease. *Arqui. Brasil. Fitomed. Cientí.* **1**: 127-131.
- Ahmad, M., Saleem, S., Ahmad, A. S., Yousuf, S., Ansari, M. A., Khan, M. B., Ishrat, T., Chaturvedi, R. K., Agrawal, A. K. and Islam, F. (2005) *Ginkgo biloba* affords dose-dependent protection against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: Neurobehavioural, neurochemical and immunohistochemical evidence. *J. Neurochem.* **93**: 94-104.
- Jeong, G. S., Byun, E., Li, B., Lee, D. S., An, R. B., and Kim, Y. C. (2010) Neuroprotective effects of constituents of the rood bark of *Dictamnus dasycarpus* in mouse hippocampal cells. *Arch. Pharm. Res.* **33**: 1269-1275.
- Jeong, G. S., Li, B., Lee, D. S., Kim, K. H., Lee, I. K., Lee, K. R. and Kim, Y. C. (2010) Cytoprotective and anti-inflammatory effects of spinasterol via the induction of heme oxygenase-1 in murine hippocampal and microglial cell lines. *Int. Immunopharmacol.* **10**: 1587-1594.
- Melo, A., Monteiro, L., Lima, R. M. F., De Oliveira, D. M., De Cerqueira, M. D. and El-Bacha, R. S. (2011) Oxidative stress in neurodegenerative diseases: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2011**: 467180.
- Ha, J. S. and Park, S. S. (2006) Glutamate-induced oxidative stress but not cell death, is largely dependent upon extracellular calcium in mouse neuronal HT22 cells. *Neurosci. Lett.* **393**: 165-169.
- Henke, N., Albrecht, P., Bouchachia, I., Ryazantseva, M., Knoll, K., Lewerenz, J., Kaznatcheyeva, E., Maher, P. and Methner, A. (2013) The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress. *Cell Death Dis.* **4**: e470.
- Kumar, S., Kain, V. and Sitasawad, S. L. (2012) High glucose-induced Ca^{2+} overload and oxidative stress contribute to apoptosis of cardiac cells through mitochondrial dependent and independent pathways. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects* **1820**: 907-920.
- Tobaben, S., Grohm, J., Seiler, A., Conrad, M., Plesnila, N. and Culmsee, C. (2011) Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. *Cell Death & Diff.* **18**: 282-292.
- Pan, P., Xiaoting, W. and Dawei, L. (2018) The potential mechanism of mitochondrial dysfunction in septic cardiomyopathy. *J. Int. Med. Res.* **46**: 2157-2169.
- Gliayzova, N. S., Huh, E. Y. and Ibeanu, G. C. (2013) A novel phenoxy thiophene sulphonamide molecule protects against glutamate evoked oxidative injury in a neuronal cell model. *BMC Neurosci.* **14**: 93.
- Lee, H. Y., Ryu, G. H., Choi, W. Y., Yang, W. S., Lee, H. W. and Ma, C. J. (2018) Protective effect of water extracted *Spirulina maxima* on glutamate-induced neuronal cell death in mouse hippocampal HT22 cell. *Pharmacogn. Mag.* **14**: 242-247.
- Deng, R. and Chow, T. J. (2010) Hypolipidemic, antioxidant, and anti-inflammatory activities of microalgae spirulina. *Cardiovas. Ther.* **28**: 33-45.
- Belay, A., Kato, T. and Ota, Y. (1996) *Spirulina (Arthrospira)*: potential application as an animal feed supplement. *J. App. Phycol.* **8**: 303-311.
- Simpore, J., Zongo, F., Kabore, F., Dansou, D., Bere, A., Nikiema, J. B., Pignatelli, S., Biondi, D. M., Ruberto, G. and Musumeci, S. (2005) Nutrition rehabilitation of HIV-infected and HIV-negative undernourished children utilizing spirulina. *Ann. Nutr. Met.* **49**: 373-380.
- Thaakur, S. and Sravanthi, R. (2010) Neuroprotective effect of Spirulina in cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Neu. Trans.* **117**: 1083-1091.
- Lee, H. Y. (2016) Cognitive enhancing activities of marine *Spirulina maximum* from ultrasonification extraction process. *Res. J. Biotech.* **11**: 67-74.
- 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.
- Goodman, Y. and Mattson, M. P. (1994) Secreted forms of β -amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid β -peptide-induced oxidative injury. *Exp. Neurol.* **128**: 1-12.
- Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determi-

- nation of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Ann. Biochem.* **17**: 502-522.
21. Flohe, L. and Gunzler, W. A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Met. Enzymol.* **105**: 114-120, 1984.
 22. Carlberg, I. and Mannervik, B. (1985) Glutathione reductase. *Met. Enzymol.* **113**: 484-490.
 23. Seo, I. J., Kim, K. J., Choi, J., Koh, E. J. and Lee, B. Y. (2018) *Spirulina maxima* extract reduces obesity through suppression of adipogenesis and activation of browning in 3T3-L1 cells and high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients* **10**: 712.
 24. Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klimova, B., Wan, D. and Kuca, K. (2016) The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Arch. Toxicol.* **90**: 1817-1840.
 25. Koh, E. J., Kim, K. J., Choi, J., Kang, D. H. and Lee, B. Y. (2018) *Spirulina maxima* extract prevents cell death through BDNF activation against amyloid beta 1-42 ($A\beta_{1-42}$) induced neurotoxicity in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **673**: 33-38.
 26. Pabon, M. M., Jernberg, J. N., Morganti, J., Contreras, J., Hudson, C. E., Klein, R. L. and Bickford, P. C. (2012) A spirulina-enhanced diet provides neuroprotection in an α -synuclein model of Parkinson's disease. *PLoS One* **7**: e45256.
- (2021. 7. 16 접수; 2021. 8. 3 심사; 2021. 9. 2 게재확정)