

글루타메이트에 의해 산화적 스트레스를 받은 HT22 세포에서 핑거루트의 신경세포 보호활성

김은서¹ · 마충제^{1,2*}

¹강원대학교 의생명과학대학 생물소재공학과

²강원대학교 의생명과학연구소

Neuroprotective Activity of *Boesenbergia rotunda* Against Glutamate Induced Oxidative Stress in HT22 Cells

Eun Seo Kim¹ 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 – Excessive glutamate causes oxidative stress in neuronal cells, which can cause degenerative neurological disorders. We tried to find medicinal plant showed neuroprotective activity by using glutamate-injured HT22 cell as a model system. In this study, we found that *Boesenbergia rotunda* methanol extract showed neuroprotective activity against glutamate induced neurotoxicity in mouse hippocampal HT22 cells. *B. rotunda* methanol extract suppressed the formation of reactive oxygen species and decreased intracellular Ca²⁺ concentration. Also, *B. rotunda* made mitochondrial membrane potential maintain to normal levels. In addition, *B. rotunda* increased total glutathione amount and activated antioxidative enzyme such as glutathione reductase and glutathione peroxidase compared to glutamate-treated groups. These results suggested that *B. rotunda* decreased neuronal cell death damaged by high concentrations of glutamate treatment, via antioxidative mechanism and might be one of candidate of development of new drug to treat neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease.

Keywords – *Boesenbergia rotunda*, Alzheimer's disease, Neuroprotection, Oxidative stress, HT22 cells

최근 과학기술과 의학기술의 발달은 인간의 수명을 증가시켰으며 이에 사회는 고령화 사회로 진입하였다. 이런 고령화 사회에서는 퇴행성 신경질환이 심각한 의료문제 중 하나로 나타났다. 퇴행성 신경질환 중 하나인 치매는 일상생활에 영향을 줄 정도로 심각한 인지능력 저하의 총칭이다. 치매 중 알츠하이머는 전체 사례의 약 4분의 3을 차지할 정도로 흔하다. 치매의 원인은 그 메커니즘이 명확하게 알려져 있지 않다. 그러나 이전에 많은 연구를 통해 밝혀진 공통적인 원인으로는 아밀로이드 베타의 축적, 타우 단백질의 과인산화, 아세틸콜린의 결핍, 흥분성 신경독성 등이 있다.¹⁾ 글루타메이트는 신경전달물질이지만 그 농도가 높으면 흥분성 신경독성을 일으켜 세포 내에서 산화 스트레스를 유발한다. 글루타메이트가 축적이 되면 시스테인/글루타메이트

수송 시스템을 통한 시스테인의 흡수를 억제하고 이는 산화적 손상을 유발해 세포 내 항산화제인 글루타치온의 고갈을 유발한다. 글루타치온의 고갈은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 축적을 유발해 세포 내 산화 스트레스를 나타내어 세포가 사멸에 이르게 한다.²⁾ 과도한 글루타메이트에 의한 활성산소의 증가와 신경세포의 사멸은 칼슘이온(Ca²⁺) 유입 증가에도 기여한다.³⁾ Ca²⁺가 증가하게 되면 미토콘드리아의 기능 장애를 일으키고 결과적으로 세포 사멸을 야기한다. 또한 세포 사멸에 의한 활성산소의 추가적인 생성이 이 과정을 더욱 가속시킨다.⁴⁾ 미토콘드리아에서 Ca²⁺의 증가와 세포 사멸은 미토콘드리아에서 세포질로 사이토크롬 C의 방출을 증가시키고 미토콘드리아의 막전위를 붕괴시킨다.^{5,6)} 마우스 해마 유래 세포인 HT22세포는 글루타메이트에 의하여 유도된 신경 세포의 독성 메커니즘을 연구하기 위한 중요한 모델로 사용된다. 고농도의 글루타메이트

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

이트에 의하여 발생하는 산화적인 스트레스에 의한 독성으로 작용하여 이로 인해 유발된 세포 사멸을 연구하기에 매우 적합한 실험모델이다. 따라서 본 연구에서는 글루타메이트에 의하여 산화적인 스트레스를 유발한 HT22세포를 활성 검색계로 사용하여 핑거루트의 신경세포 보호 활성을 평가하는 연구를 수행하였다.²⁾

핑거루트(*Boesenbergia rotunda*)는 말레이시아, 태국, 인도네시아, 중국과 같은 많은 아시아 국가에서 류마티스, 근육통, 발열, 통풍, 위장 장애, 헛배부름, 구풍, 복통, 소화불량 및 소화성 궤양에 사용한 전통 약재이다.⁷⁾ 핑거루트는 flavanones, flavones, chalcones, prenylated flavonoid류를 포함하고 있다. 핑거루트의 추출물과 flavonoid는 항산화, 항염, 항균, 항종양, 항노화, 피부미백, 항궤양 및 항비만 활성을 가지는 것으로 나타났다.⁸⁾

본 연구에서 80% 메탄올을 이용하여 추출한 핑거루트 메탄올 추출물이 신경세포에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여 HT22 세포에 글루타메이트에 의한 신경독성을 가한 후 세포의 생존율과 산화 스트레스 관련 신경세포 보호 작용에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료 – Glutamic acid, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) solution, Trolox, NADPH, DTNB, GSSG-R(Glutathione disulfide reductase), GSSG oxidase, GSH(L-glutathione reduced), 2,7-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA), Fura-2AM, Rhodamin 123, Triton X-100, penicillin/streptomycin은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified eagle medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS)는 Gibco(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO)는 대정화금[®]에서 구입하였다.

식물 재료 – 핑거루트는 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 100 g의 핑거루트를 초음파 추출장치(Bransonic Ultrasonic Bath, Branson ultrasonic Co., CT, USA)를 이용하여 500 ml의 80% 메탄올을 추출용매로 하여 2시간 동안 상온에서 3회 추출하였다. 추출된 추출물은 회전식 감압 농축기(Rotary Vacuum Evaporator N-N series, EYELA, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하였다. 추출 수율은 12.3%로 계산되었다.

HT22 세포 배양 – HT22 세포는 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM을 사용하여 배양하였다. 배양은 온도 37°C, 5% CO₂를 공급하는 CO₂ incubator에서 진행하였다. 시료와 독성물질을 처리하기 전까지 2-3일 마다 한 번씩 계대 배양을 진행하였다.

뇌신경세포 보호 활성 측정 – 뇌신경세포 보호 활성은

MTT assay를 이용하여 측정하였다. 배양한 HT22 세포를 48 well plate에 1.9×10^4 cells/well 농도로 seeding하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 배양 후 control 그룹과 negative control 그룹에는 배지만 더해주고, positive control 그룹에는 50 µM trolox, 시료 그룹에는 핑거루트 추출물을 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml의 농도로 처리하였다. 약 1시간 배양 후 control을 제외한 모든 그룹에 글루타메이트를 2.5 mM 농도로 투여해 산화 스트레스를 유발하였다. 모든 처리량은 30 µl/well로 진행하였다. 24시간 배양 후 모든 그룹에 MTT solution(1 mg/ml in PBS) 150 µl을 가하였다. 3시간 배양 후 각 그룹의 배지를 모두 제거하고 DMSO solution을 300 µl/well로 처리 후 빛을 차단한 상태에서 30분간 formazan crystal을 충분히 녹여주었다. 이 solution을 96 well plate에 200 µl/well로 옮겨 ELISA reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 같은 조건에서 3회 반복했으며, 얻은 결과값을 통계처리 하였다.

세포 내 ROS 측정 – 배양한 세포에서의 활성산소 양을 상대적으로 보기 위해 Goodman과 Mattson의 방법을 이용하였다.⁹⁾ 라디칼에 민감하게 반응하는 화합물인 2, 7-dichlorofluorescein diacetate(H₂-DCF-DA)를 이용하여 활성을 측정하였다. 48 well plate에서 배양한 HT22 세포에 핑거루트 메탄올 추출물 시료를 투여하고 1시간 뒤 6mM의 글루타메이트를 처리하였다. 8시간 배양한 후 10 µM의 DCF-DA처리하고 1시간 방치 후 phosphate-buffered saline(PBS)로 세포를 washing한 다음 1% Triton X-100으로 추출하였다. 산화된 DCF 형광은 485 nm와 528 nm에서 측정하였다. 실험 결과는 3회 반복 실험 후 얻은 결과값을 통계처리 하였다.

세포 내 Ca²⁺ 농도 측정 – HT22세포에서 Ca²⁺의 상대적인 양을 보기 위해 형광물질인 Fura-2AM을 사용하였다. 48 well plate에서 배양한 HT22세포에 핑거루트 메탄올 추출물 시료를 투여한 후 2.5 mM의 글루타메이트를 처리하였다. 6시간동안 배양한 다음 20 µM의 Fura-2AM을 투여하고 2시간 방치 후 형광을 측정하였다. 형광은 340 nm와 380 nm에서 측정하였다. 실험 결과는 3회 반복 실험 후 얻은 결과값을 통계처리 하였다.

미토콘드리아 막전위 손상 억제 효과 측정 – HT22세포에 trolox와 핑거루트(5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml)를 처리하고 1시간 후 2.5 mM의 글루타메이트를 처리하여 세포 사멸을 유도하였다. 그 후 24시간 배양한 다음 10 µM의 rhodamine 123(Rho 123)을 처리하였다. 37°C에서 30분 배양 후 PBS로 3회 세척한 다음 형광을 측정하였다. 형광은 excitation wavelength은 480 nm에서, emission wavelength는 525 nm에서 두 번 측정하여 비교하였고, 실험 결과는 3회 반복한 다음 통계처리 하였다.

글루타치온 총 함량 및 항산화 효소 활성 측정 – 6 well plate에 HT22 세포를 3.4×10^4 cells/well로 1 ml씩 seeding

후 24시간 배양하였다. 그 후 핑거루트(5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml)와 양성 대조군에는 trolox를 각각 처리하고 1시간 뒤 2.5 mM의 글루타메이트를 처리하였다. 24시간 배양 후 PBS로 2회 세척한 다음 3,000 g, 4°C 조건 하에 30분간 원심분리를 하였다. 그 후 배지를 제거하고 170 µl의 상층액을 이용하여 항산화 효소와 글루타치온의 양을 측정하였다. 글루타치온 총 함량은 Frank Tietze가 사용한 방법을 이용하여 측정하였다.¹⁰⁾ 상층액에 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 처리하고 37°C에서 30초간 반응시켰다. 흡광도는 312 nm에서 측정하였다. 글루타치온 퍼옥시디아제(GPx) 활성은 과산화수소(H₂O₂)를 기질로 하는 Flohe와 Gunzler의 방법을 이용하여 측정하였다.¹¹⁾ 상층액에 0.4 mM NADPH, 0.2 mM H₂O₂, 1 mM 환원형 L-glutathione(GSH), 1 unit/ml의 glutathione disulfide reductase(GSSG-R)를 처리하고 1분간 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 글루타치온 리덕타아제(GR)의 활성은 Carlberg와 Mannervik의 방법을 응용하여 측정하였다.¹²⁾ 상층액에 0.1 mM NADPH와 1 mM 산화형 glutathione(GSSG)을 처리한 후 2분간 반응시켰다. 흡광도는 340 nm에서 측정하였다. 실험결과는 3번 반복 실험 후 얻은 값을 가지고 통계처리 하였다.

결과 및 고찰

MTT assay를 통한 뇌신경세포 보호 활성 측정 - 다양한 천연물 추출물을 대상으로 글루타메이트를 처리한 HT22세포를 활성검색계로 하여 고농도로 처리한 글루타메이트에 의하여 발생하는 신경세포의 사멸에 대한 보호 정도를 평가한 결과, 핑거루트의 메탄올 추출물이 유의성 있는 신경

세포 보호 활성이 있음을 확인할 수 있었다. 핑거루트는 중국생강이라고도 불리며 주로 중국 및 아시아지역에서 흔히 볼 수 있는 약용 및 식용 식물이다. 수 년간의 연구를 통하여 다양한 종류의 생리활성물질이 분리 보고되었고, 분리 보고된 화합물에는 flavonoid 유도체, chalcone 유도체, ester, terpenoid 류 등이 포함되어 있다. 이들 화합물들은 다양한 약리활성을 나타내고 있고 이에 대한 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각한다. 핑거루트의 신경세포 보호 활성을 더욱 자세히 평가하기 위하여 농도를 세분화하여 핑거루트 메탄올 추출물의 신경세포 보호활성을 MTT assay를 진행하여 측정하였다. 실험결과, 5 µg/ml의 농도에서 상대적인 보호활성이 15.8%, 10 µg/ml에서는 82.6%, 20 µg/ml에서는 80.3%의 활성으로 글루타메이트에 의하여 손상된 신경세포를 보호하여 주었다(Fig. 1). 이런 실험결과를 통해 핑거루트 메탄올 추출물이 글루타메이트에 의한 신경세포의 손상에 대해 충분히 보호활성이 있다고 할 수 있다. 이러한 핑거루트 메탄올 추출물의 신경세포 보호 활성이 어떠한 작용 기전을 거쳐서 나타나는지 규명하기 위하여 세포 내 활성산소(ROS) 생산량, Ca²⁺ 농도, 미토콘드리아 막전위 차이, 글루타치온의 양과 항산화 효소 활성을 측정하였다.

핑거루트가 ROS 생성에 미치는 영향 - 신경세포에 고농도의 글루타메이트를 처리하면 세포 내에 활성산소의 생성을 증가시켜 산화적인 스트레스를 유발하게 된다. 이러한 활성산소는 세포 내로 다량의 Ca²⁺를 유입시켜 Ca²⁺에 의하여 신경세포의 사멸과 관련된 다양한 효소의 활성화를 촉진시켜 결과적으로 신경세포가 사멸하게 된다. 핑거루트 메탄올 추출물의 신경세포 보호 활성이 글루타메이트에 의해 생성된 활성산소를 감소시켜 나타나는 것인지 확인하기 위하여 ROS의 발생을 평가하는데 주로 사용되는 DCF-DA 형광 염료를 사용하여 활성산소 생성량을 측정하였다. 실험

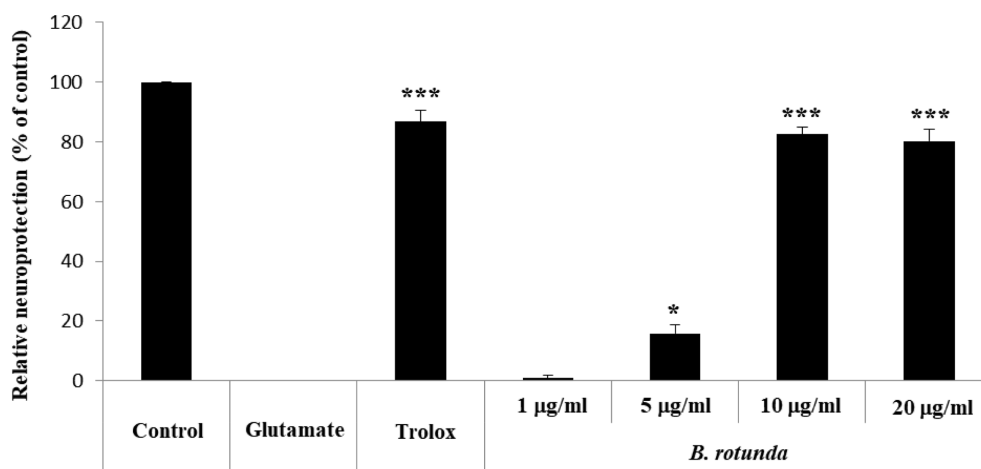


Fig. 1. Effect of *B. rotunda* methanol extract (1, 5, 10 and 20 µg/ml) on glutamate-induced death of HT22 cells. Data are means ± S.D. *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 versus the glutamate-treated group.

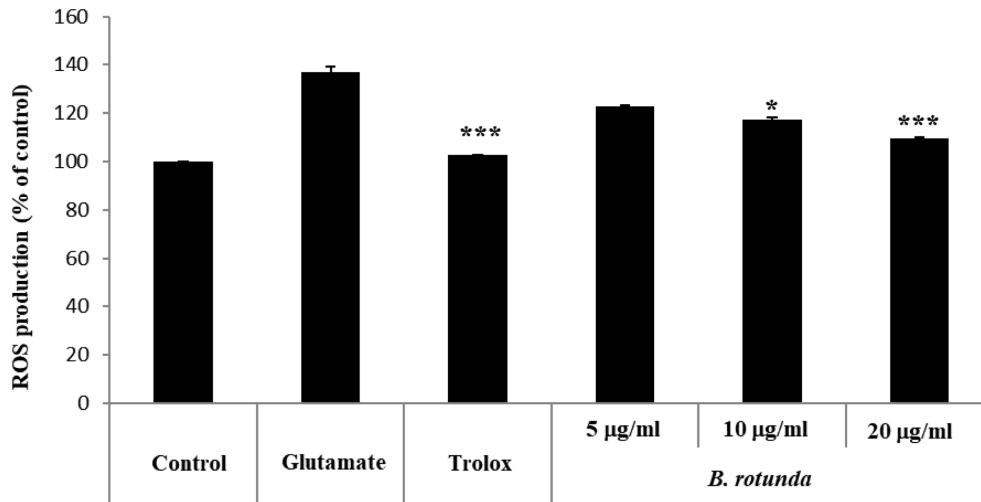


Fig. 2. Effect of *B. rotunda* methanol extract (5, 10 and 20 µg/ml) on reactive oxygen species (ROS) production against glutamate induced neurotoxicity in HT22 cell. Data are means ± S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group.

결과, 글루타메이트 처리군에서는 대조군보다 활성산소의 생성을 136.5%로 증가시켰고 핑거루트 메탄올 추출물을 농도에 따라 전처리 한 후 글루타메이트에 의하여 독성을 주었을 때, 각각 5 µg/ml의 농도에서 120.5%, 10 µg/ml에서 114.9%, 20 µg/ml에서 108.9%로 활성 산소종의 생성을 감소시켰다(Fig. 2). 이런 결과를 통하여 핑거루트 메탄올 추출물은 항산화 활성을 효과적으로 나타내어 신경세포 보호 활성을 나타낼 수 있음을 의미한다.

핑거루트가 세포 내 Ca^{2+} 농도와 미토콘드리아 막전위에 미치는 영향 – 글루타메이트를 과량으로 HT22세포에 투여하게 되면 산화적인 스트레스에 의하여 신경 독성이 나타

나게 되는데 이와 함께 세포 내 Ca^{2+} 농도가 현저히 증가하는 것으로 알려져 있다. 이러한 Ca^{2+} 의 농도의 증가로 인하여 미토콘드리아가 손상을 입게 되고 미토콘드리아의 정상적인 기능이 불가능하게 된다. 또한, 산화반응에 의한 apoptosis의 초기 단계에서도 미토콘드리아가 손상을 입어 막전위가 감소하게 된다. 핑거루트가 글루타메이트에 의해 손상된 신경세포에서 Ca^{2+} 의 농도에 어떠한 영향을 주는지 살펴보기 위해 Fura-2AM 형광염료를 사용하여 Ca^{2+} 농도를 측정하였다. 또한 미토콘드리아 막전위 변화에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위하여 Rho 123 형광염료를 사용하였다. 핑거루트 메탄올 추출물을 처리한 실험군에서 글루

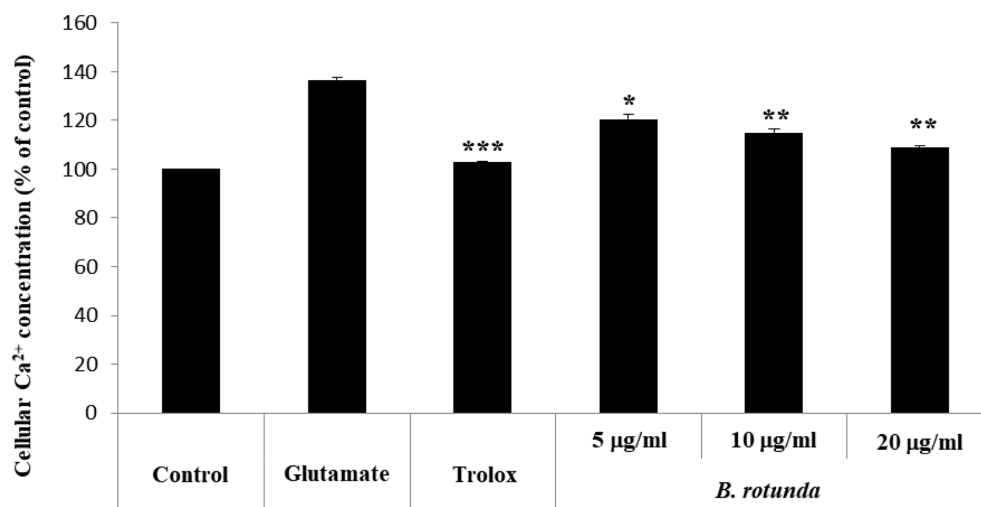


Fig. 3. Effect of *B. rotunda* methanol extract (5, 10 and 20 µg/ml) on intracellular Ca^{2+} concentration against glutamate induced neurotoxicity in HT22 cells. Data are means ± S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group.

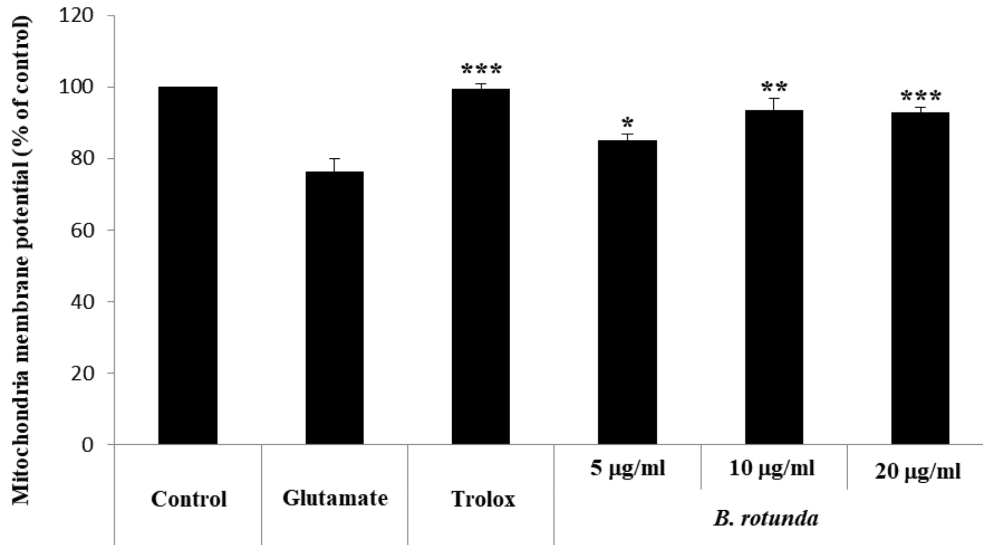


Fig. 4. Effect of *B. rotunda* methanol extract (5, 10 and 20 µg/ml) on mitochondria membrane potential in glutamate injured HT22 cells. Data are means ± S.D. *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 versus the glutamate-treated group.

타메이트에 의해 증가한 Ca²⁺의 농도(136.5%)가 감소한 것으로 나타났다. 핑거루트 메탄올 추출물 5 µg/ml에서는 120.5%, 10 µg/ml에서는 114.9%, 20 µg/ml에서는 108.9%로 낮춰 주었다(Fig. 3). 핑거루트 메탄올 추출물은 미토콘드리아 막전위 손상을 유의성 있게 정상 수준으로 회복시켜 주었다. 농도에 따른 생리활성은 각각 핑거루트 추출물 5 µg/ml의 농도에서 85.0%, 10 µg/ml에서 93.5%, 20 µg/ml에서 92.7%로 나타났다(Fig. 4). 이러한 실험 결과는 핑거루트 메탄올 추출물이 글루타메이트에 의해 증가한 Ca²⁺의 농도를 정상수준으로 낮추어 주었으며, 미토콘드리아의 막전위 손상을 막아 신경세포 보호 활성을 나타낸다는 것을

의미할 수 있겠다.

핑거루트가 글루타치온 함량과 항산화 효소의 활성에 미치는 영향 – 핑거루트 메탄올 추출물이 글루타메이트에 의하여 감소한 세포 내 항산화 물질인 글루타치온의 생성량과 글루타치온 생합성과 관련있는 효소(glutathione peroxidase, glutathione reductase)의 활성에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 핑거루트 메탄올 추출물을 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml로 투여했을 때 글루타메이트에 의해 감소한 글루타치온의 양이 얼마나 증가하는지 평가하였다. 핑거루트 메탄올 추출물 10 µg/ml과 20 µg/ml에서 글루타메이트에 의해 64.8%로 감소한 글루타치온의 생성량을 각각 83.0%, 85.6%까지 증가

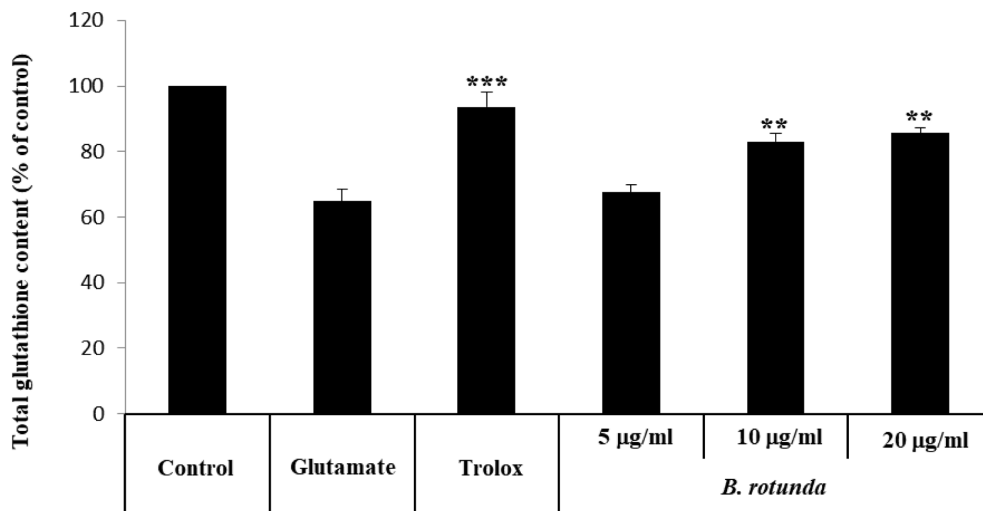


Fig. 5. Effect of *B. rotunda* methanol extract (5, 10 and 20 µg/ml) on total glutathione amount in glutamate injured HT22 cells. Data are means ± S.D. *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 versus the glutamate-treated group.

시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 5). Glutathione peroxidase는 과산화수소를 물과 산소로 또는 알코올과 산소로 환원시켜 주고 세포의 생물학적 손상으로부터 보호하여 주는 역할을 하는 중요한 효소이다. 신경세포에서 핑거루트 메탄올 추출물이 글루타메이트에 의하여 발생하는 신경세포의 손상을 보호하는 과정 중에 glutathione peroxidase의 활성화에 어떠한 영향을 주는 지 평가하고자 하였다. 핑거루트 추출물을 농도별로 투여한 후, 과량의 글루타메이트를 처리하고 glutathione peroxidase의 활성을 평가한 결과, 각각 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 농도가 강해질수록 glutathione peroxidase의 활성이 각각 55.6%, 71.0%, 75.0%로 증가함을 확

인할 수 있었다(Fig. 6). 마지막으로 glutathione reductase는 세포 내에서 글루타치온을 환원형으로 존재하게 하는 효소로 글루타치온의 항산화 활성화에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 핑거루트 메탄올 추출물을 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ 로 투여했을 때 글루타메이트에 의해 손상된 신경세포에서 감소된 glutathione reductase의 활성화에 어떠한 영향을 주는지 평가하였다. 핑거루트 추출물 처리군에서 글루타메이트에 의해 54.3%로 감소한 glutathione reductase의 활성이 각각 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 60.2%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 76.9%, 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 79.6%로 증가하였다(Fig. 7). 위의 실험 결과를 종합해보면, HT22세포에서 글루타메이트를 처리하여 세포

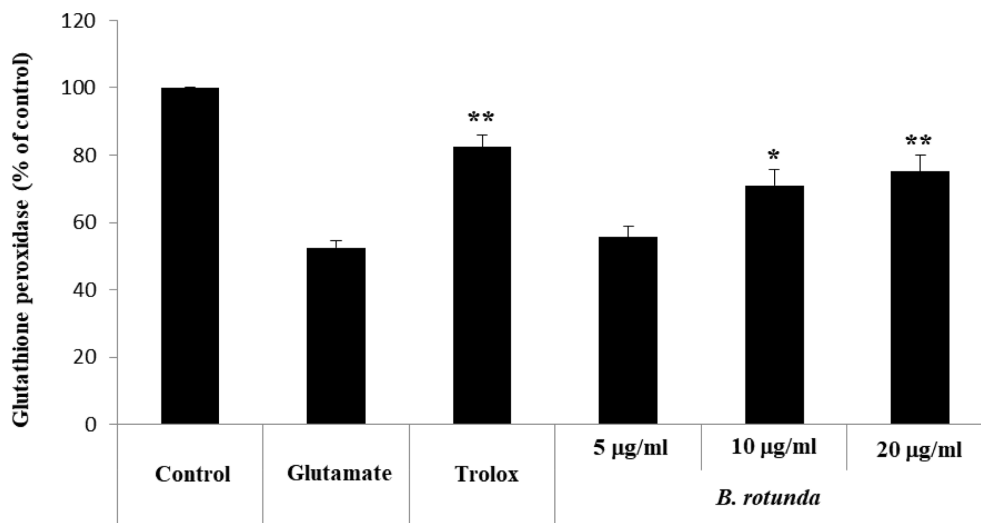


Fig. 6. Effect of *B. rotunda* methanol extract (5, 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$) on glutathione peroxidase activity in glutamate injured HT22 cells. Data are means \pm S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group.

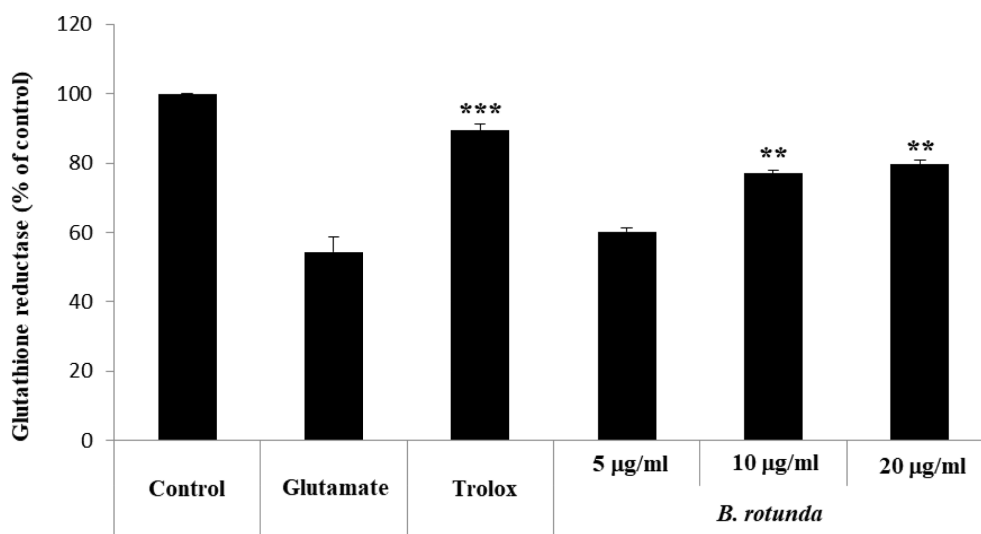


Fig. 7. Effect of *B. rotunda* methanol extract (5, 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$) on glutathione reductase activity in glutamate injured HT22 cells. Data are means \pm S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group.

사멸을 유도하였을 때 감소하였던 글루타치온의 생성량과 항산화와 관련된 효소인 glutathione peroxidase, glutathione reductase의 활성을 핑거루트 메탄올 추출물이 효과적으로 글루타치온의 생성량을 증가시키고, 글루타치온의 대사와 관련된 효소들의 활성을 증가시킴을 확인할 수 있었고, 이를 통하여 핑거루트 메탄올 추출물이 글루타메이트에 의하여 손상되고 사멸한 HT22 신경세포를 항산화 활성을 통하여 유효하게 보호한다는 사실을 제시할 수 있겠다.

핑거루트는 오래전부터 식용 및 약용으로 사용해 온 식물로 이의 약리활성에 대한 연구는 매우 활발하게 진행되어 오고 있다. 최근 연구결과에 따르면 핑거루트는 위염을 유발하는 헬리코박터균에 대하여 생리활성을 나타내어 위암이나 대장암 등의 치료에 유효할 것으로 보여지고 있다.¹³⁾ 구강 병균의 biofilm의 형성을 효과적으로 억제하여 구강 내 감염을 막을 수 있을 것으로 보고되어 있고, *Candida albicans*에 대한 항균작용이 보고된 바가 있다.^{14,15)} 또한 항궤양, 항비만, 항돌연변이, 항암, 항종양, 항염 및 상처 치유 효과 등이 연구되어 활성이 보고되어 있다.¹⁶⁻²²⁾ 또한 핑거루트는 진통 및 마취효과도 보고가 되었는데 이는 글루타메이트 수용체와 관계가 있다고 알려져 있으나 본 실험에 사용한 HT22 세포의 경우 글루타메이트 수용체가 작용하지 않는 세포주로서 이에 대한 효과는 평가할 수 없었다. 이처럼 다양한 활성이 연구되어 보고가 되어 있지만 치매나 알츠하이머병 치료에 대한 핑거루트의 효과를 연구한 논문은 발견할 수 없었다. 하지만, 핑거루트는 항산화 활성이 있는 것으로 알려져 있는데, 핑거루트의 항산화 활성에 의하여 본 연구에서 언급한 신경세포 보호 활성을 나타내는 실험결과를 얻을 수 있었다고 생각된다. 이러한 연구결과 및 기 보고된 연구 내용을 종합하여 향후 핑거루트의 신경세포 보호활성에 중요한 역할을 하는 약리활성 물질이 무엇인지에 대한 연구가 진행되어야 할 것이고, 또한 기억력 및 인지능 개선과 관련한 동물 행동실험을 통하여 핑거루트가 알츠하이머 병의 치료제 및 예방제로서의 가능성을 살펴보아야 할 것이다.

결 론

핑거루트 메탄올 추출물은 HT22 세포에서 과량의 글루타메이트 처리에 따른 산화적인 스트레스에 의한 신경 세포 독성을 유의적으로 보호하였다. 이는 고농도의 글루타메이트에 의하여 증가한 ROS의 생성을 억제시키고, 세포 내 Ca^{2+} 의 농도를 낮추었으며, 미토콘드리아의 막전위를 정상 수준으로 회복시켜 나타난 결과임을 확인할 수 있었다. 또한 세포 내 항산화제 역할을 하는 glutathione의 생성을 증가시켰으며, glutathione 생합성과 연관 있는 효소 glutathione peroxidase, glutathione reductase의 활성을 증가시켜 항산화

활성을 나타내었다. 이러한 결과를 종합하여, 핑거루트 메탄올 추출물은 항산화 기전을 바탕으로 글루타메이트에 의한 신경독성을 막아 세포 사멸을 막아주는 것으로 생각되며, 향후 핑거루트의 활성 성분에 대해 더 자세한 연구가 진행되어야 할 필요가 있고, 동물 행동 실험을 진행하여 알츠하이머 병과 같은 퇴행성 신경질환 치료제로 개발을 진행할 가치가 있을 것으로 생각된다.

인용문헌

1. Briggs, R., Kennelly, S. P. and O'Neill, D. (2016) Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin. Med.* **3**: 247-253.
2. Jeong, G. S., Byun, E., Li, B., Lee, D. S., An, R. B. and Kim, Y. C. (2010) Neuroprotective effects of constituents of the root bark of *Dictamnus dasycarpus* in mouse hippocampal cells. *Arch. Pharm. Res.* **33**: 1269-1275.
3. 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.
4. 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* **1820**: 907-920.
5. Tobaben, S., Grohm, J., Seiler, A., Conrad, M., Plesnia, 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.
6. Pan, P., Xiaoting, W. and Dawei, L. (2018) The potential mechanism of mitochondrial dysfunction in septic cardiomyopathy. *J. Int. Med. Res.* **45**: 2157-2169.
7. Tan, E. C., Lee, Y. K., Chee, C. F., Heh, C. H., Wong, S. M., Christina, T. L. P., Foo, G. T., Norzulaani, K., Noorsaadah, A. R., Karsani, S. A., Othman, S., Othman, R. and Yusof, R. (2012) *Boesenbergia rotunda*: From ethnomedicine to drug discovery. *Evid. Based Comp. Alt. Med.* **2012**: Article ID 473637.
8. Adhikari, D., Gong, D. S., Oh, S. H., Sung, E. H., Lee, S. O., Kim, E. W., Oak, M. H. and Kim, H. J. (2020) Vasorelaxant effect of *Boesenbergia rotunda* and its active ingredients on an isolated coronary artery. *Plants* **9**: 1688.
9. 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.
10. Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Ann. Biochem.* **17**: 502-522.

11. Flohe, L. and Gunzler, W. A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Met. Enzymol.* **105**: 114-120.
 12. Carlberg, I. and Mannervik, B. (1985) Glutathione reductase. *Met. Enzymol.* **113**: 484-490.
 13. Bhamarapavati, S., Juthapruth, S., Mahachai, W. and Mahady, G. (2006) Antibacterial activity of *Boesenbergia rotunda* (L.) mansf. and *myristica fragrans* houtt. against *helicobacter pylori*. *Songklanakar J. Sci. Tech.* **28**: 157-163.
 14. Limsuwan, S. and Voravuthikunchai, S. P. (2008) *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr., *Eleutherine americana* Merr. and *Rhodomlyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. As anti-biofilm producing and anti-quorum sensing in *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immuno. Med. Microbio.* **53**: 429-436.
 15. Taweechaisupapong, S., Singhara, S., Lertsatitthanakorn, P. and Khunkitti, W. (2010) Antimicrobial effects of *Boesenbergia pandurata* and *Piper sarmentosum* leaf extracts on planktonic cells and biofilm of oral pathogens. *Pakistan J. Pharmaceu. Sci.* **23**: 224-231.
 16. Abdelwahab, S. I., Mohan, S., Abdulla, M. A., Sukari, M. A., Bustamam, A., Taha, M. M. E., Syam, S., Ahmad, S. and Lee, K. H. (2011) The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property *in vivo*: possible involvement of indirect antioxidant action. *J. Ethnopharmacol.* **137**: 963-970.
 17. Kim, D., Lee, M. S., Jo, K., Lee, K. E. and Hwang, J. K. (2011) Therapeutic potential of panduratin A, LKB1-dependent AMP-activated protein kinase stimulator, with activation of PPAR α/δ for the treatment of obesity. *Diab. Obe. Metabol.* **13**: 584-593.
 18. Trakoontivakorn, G., Nakahara, K., Shinmoto, H., Takenaka, M., Onishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M., Nagata, T. and Tshshida, T. (2001) Structural analysis of a novel anti-mutagenic compound, 4-hydroxypanduratin A, and the anti-mutagenic activity of flavonoids in a Thai spice, fingerroot (*Boesenbergia pandurata* Schult.) against mutagenic heterocyclic amines. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 3046-3050.
 19. Kirana, C., Record, I. R., McIntosh, G. H. and Jones, G. P. (2003) Screening for antitumor activity of 11 species of Indonesian Zingiberaceae using human MCF-7 and HT-29 cancer cells. *Pharmaceu. Bio.* **41**: 271-276.
 20. Jing, L. J., Abu Bakar, M. F., Mohamed, M. and Rahmat, A. (2011) Effects of selected *Boesenbergia* species on the proliferation of several cancer cell lines. *J. Pharmacol. Toxicol.* **6**: 272-282.
 21. Boonjaraspinyo, S., Boonmars, T., Aromdee, C. and Kaewsamut, B. (2010) Effect of fingerroot on reducing inflammatory cells in hamster infected with *Opisthorchis viverrine* and N-nitrosodimethylamine administration. *Parasitol. Res.* **106**: 1485-1489.
 22. Mahmood, A. A., Mariod, A. A., Abdelwahab, S. I., Ismail, S. and Al-Bayaty, F. (2010) Potential activity of ethanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) rhizomes extract in accelerating wound healing in rats. *J. Med. Plants Res.* **4**: 1570-1576.
- (2022. 3. 16 접수; 2022. 3. 21 심사;
2022. 5. 3 게재확정)