



Original Article / 원저

PC12 cell에서 tert-butyl hydroperoxide로 유도된 산화적 손상에 대한 치자의 신경보호효과

이종록¹, 김상찬², 변성희², 박숙자^{1*}

¹대구한의대학교 제약공학과, ²대구한의대학교 한의과대학(방제학 교실)

Neuroprotective Effect of Gardeniae Fructus against Oxidative Damage Induced by tert-Butyl Hydroperoxide in PC12 Cells

Jong Rok Lee¹, Sang Chan Kim², Sung Hui Byun², Sook Jahr Park^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University

²College of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objective : Gardeniae Fructus (GF) is the ripe fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis with a bitter taste and cold properties. Ingredient compounds including geniposide are known to have anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotective effects. The purpose of this study was to investigate the neuroprotective effect of GF on tBHP-induced PC12 cells.

Methods : Cell viability was measured by the MTT assay, and apoptosis was determined by the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. The expression level of each protein was monitored by Western blot analysis, and reactive oxygen species (ROS) were analyzed using DCFH-DA.

Results : In PC12 cells, tBHP induced cell death through apoptosis with caspase activation and PARP inactivation. Cells treated with tBHP showed an increase in intracellular ROS and depletion of GSH. Pretreatment with GF prevented tBHP-induced apoptosis, reduced ROS, and increased GSH. GF also maintained increased Nrf2 expression in the presence of tBHP. Phosphorylation of JNK and p38 MAPK was increased by tBHP, whereas phosphorylation of ERK was decreased. GF restored changes in ERK and p38 phosphorylation, but not JNK phosphorylation.

Conclusion : These results indicate that GF has neuroprotective effects through anti-apoptotic and antioxidant effects mediated by regulation of Nrf2 expression and phosphorylation of ERK and p38. It also demonstrates the potential use of GF as a source of antioxidant and neuroprotective substances.

Key words : Gardeniae Fructus; neuroprotective; tert-butyl hydroperoxide; oxidative stress; apoptosis.

I. 서론

노화는 나이가 들어가면서 모든 신체 영역에서 서서히 진행되어 나타나는 변화를 의미한다¹⁾. 노화 과정에서 사회적으로 문제가 되고 있는 것은 알츠하이머병 및 파킨슨병과 같이 뇌신경계의 변화로 야기되는 퇴행성 질환들이다²⁾. 점점 고령화되어 가고 있는 사회에서 이러한 퇴행성 질환과 관련된 사회적 비용은 지속적으로 증가하고 있으며 가족에게도 정신적, 노동적으로 심각한 문제가 되고 있다. 신경 퇴행성 질환을 개선하기 위해 다양한 약물의 개발이 진행되고 있는 상황이며³⁾ 약리효능이 알려져 있는 천연물들은 질환 치료 및 예방을 위한 주요 후보물질이 될 수 있다.

치자는 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)의 잘 익은 열매로서 한의학에서 사화제변(瀉火除煩), 청열이습(淸熱利濕)의 효능이 알려져 있으며 황달, 염좌 등에 사용되어져 왔다⁴⁾. 쓰고 찬 성질의 치자는 비위가 약한 사람에게는 강즙(薑汁)에 담갔다가 볶는 강자(薑炙)의 형태로 처방되었다⁵⁾. 자(炙)는 한약재를 액체 보료(輔料)에 재웠다가 볶는 수치(修治) 방법으로 강자 외에도 주자(酒炙), 밀자(蜜炙), 초자(醋炙) 등이 있다⁶⁾. 본 연구에서는 강즙 치자와 주정을 사용한 주자 치자를 준비하여 사용하였다. 치자의 주성분 화합물로는 geniposide, genipin, gardoside와 같은 이리도이드 배당체(iridoid glycoside)와 chlorogenic acid, gardenin, crocetin과 그 배당체인 crocin 등이 있다⁷⁾. 치자의 대표 성분인 geniposide는 항염증, 항산화, 항종양, 면역조절 및 신경보호의 효능이 알려져 있으며⁸⁾ 마우스의 선조체(striatum)와 해마(hippocampus)에서는 세로토닌 수치를 증가시키고 항우울 작용을 나타내었다⁹⁾. 또한 crocetin의 신경보호 효과¹⁰⁾, genipin의 항우울 작용¹¹⁾, 알츠하이머¹²⁾와 파킨슨 병 모델¹³⁾에서 geniposide의 효

과도 보고되었다.

산화적 손상은 대부분의 신경 퇴행성 질환의 발병 기전의 주요 원인으로 널리 받아들여지고 있다^{14,15)}. 이전 연구들에서 높은 수준의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 비정상적인 산화환원 변화가 신경 세포 사멸을 유도하고 신경 퇴행성 질환의 병인을 강화할 수 있음을 보여주었다¹⁶⁾. 글루타티온(Glutathione, GSH)은 생체 내 항산화 시스템에서 비효소적으로 작용하는 항산화 물질이며¹⁷⁾ nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)는 glutathione S-transferase와 glutathione peroxidase 같은 GSH와 관련된 효소 유전자 및 heme oxygenase-1과 superoxide dismutase를 활성화할 수 있는 주요 조절자이다¹⁸⁾. 산화제에 대한 신경보호 효과가 Nrf2 신호 경로를 통해 나타난다는 강력한 증거가 보고되어 있다^{19,20)}.

유기 과산화물인 tert-butyl hydroperoxide (tBHP)는 세포와 조직에 대한 산화 스트레스의 영향을 조사하는데 널리 사용되고 있다²¹⁾. 사이토크롬 P450을 통해 글루타티온 경로뿐만 아니라 peroxy 및 alkoxy radical로 대사 되는 경로를 통해 산화 스트레스가 발생하며 이 과정에서 과도하게 생성된 ROS는 세포자멸사(apoptosis)를 촉진하여 세포 증식을 억제하게 된다²²⁾. 현재까지 tBHP로 산화 스트레스를 유도한 신경 세포 손상에 대한 치자의 세포 보호 효과는 보고되지 않았다. 본 연구에서는 치자와 치자에 강즙과 주정을 각각 보료로 처리하여 볶은 강자와 주자 치자를 사용하여 tBHP에 의해 유도된 PC12 신경세포의 세포자멸사와 산화적 손상에 대하여 어떤 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

*Corresponding author: Sook Jahr Park, Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, 1 Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel : +82-53-819-1298, Fax : +82-53-819-1406, E-mail : haany@dhu.ac.kr

•Received : February 8, 2023 / Revised : February 14, 2023 / Accepted : February 17, 2023

II. 재료 및 방법

1. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (DMEM/F12), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin는 Gibco (Rockville, MD, USA)제품을 사용하였다. 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 dimethyl sulfoxide (DMSO), tBHP, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. *In situ* cell death detection kit-POD는 Roche (Mannheim, Germany)에서 구입하였고 Western blot에 사용한 항체들은 Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다.

2. 치자 및 수치 치자 에탄올 추출물 준비

건조 치자는 전남생약농협협동조합(전남 화순)에서 구입하였고 수치 치자의 제조와 에탄올 추출물(Ethanol extracts of Gardeniae Fructus, GFE)은 이전 연구와 동일한 방법으로 준비하였다²³⁾. 우선 강자 및 주자 치자는 건조 치자 질량의 40%에 해당하는 강즙과 10%에 해당하는 주정에 24시간 동안 담갔다 150°C frying pan에서 5분 동안 볶은 후 실온에서 건조하여 준비하였다. 에탄올 추출물은 각 8 g에 40 ml의 에탄올을 첨가하여 실온에서 72시간 동안 정치하여 추출하였다. 치자(GFE), 강자 치자(GFE-Ginger, GFE-G), 주자 치자(GFE-Alcohol, GFE-A) 추출물의 최종 수율은 각각 $14.5 \pm 0.78\%$, $14.9 \pm 0.24\%$, $14.9 \pm 0.86\%$ 였다.

3. 세포배양

PC12 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 37°C와 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, 100 units/ml penicillin이 첨가된 DMEM/F12 배지에서 배양하였다. 세포는 100 mm의 배양접시에서 80~90% 정도의 confluence에 도달하도록 계대배양 하였고 15 passages를 넘기지 않은 세포만 실험에 이용하였다.

4. MTT assay

PC12 cell에 GF를 각각 50 µg/ml의 농도로 24시간 전처리하고 tBHP (500 µM)로 3시간 더 세포를 처리하였다. 배양배지는 걷어내고 PBS로 세척한 배양세포에

MTT (0.1 mg/ml)시약을 처리하여 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA reader (Model MCC/340, Huntsville, AL, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다.

5. TUNEL staining

TUNEL 염색은 *In situ* cell death detection kit-POD (Roche, Germany)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 실시하였으며, 발색기질로는 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)을 사용하였다.

6. Western blot

전처치가 끝난 세포는 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer로 4°C에서 30분 동안 lysis시켜 whole cell lysate를 준비하였고, 핵 분획물은 시판되는 nuclear extraction reagent (Pierce biotechnology, Rockford, IL, USA)를 이용하여 준비하였다. 단백질 정량은 BCA protein assay kit (Pierce biotechnology, Rockford, IL, USA)로 실시하였고 30 µg/lane의 단백질 양으로 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. Gel 상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이하고, 일차항체 및 이차항체를 반응시켜 준 다음 enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Pierce biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 확인하였다.

7. Reactive oxygen species (ROS) 분석

활성산소 및 과산화수소와 반응하여 dichlorofluorescein 형광을 생성하는 DCFH-DA를 이용하여 세포 내 ROS를 분석 하였다. 처치가 완료된 세포에 10 µM DCFH-DA를 30분 동안 염색시키고, 형광 마이크로플레이트 판독기(Biotek Synergy Htx, Winooski, VT, USA)를 사용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm 파장에서 형광강도를 측정하였다.

8. Glutathione (GSH) 분석

GSH 분석을 위해 처치가 완료된 세포에 5% metaphosphoric acid를 첨가하여 용해한 후, 원심분리 (3,000×g, 4°C, 10분)하여 상층액을 회수하였다. 상층액은 GSH determination kit (Oxis International Inc, Tampa, FL, USA)를 이용하여 405 nm 파장에서 흡광도

를 측정하였다.

9. 통계처리

모든 data는 평균±표준편차로 나타내었으며, student t-test 및 ANOVA test 후에 Tukey's post hoc test로 $p < 0.05$ 수준에서 시료 간의 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. tBHP로 산화적 손상이 유도된 신경세포에서 GF의 세포 보호 효과

본 실험에서는 세포독성을 유발하지 않는 농도(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 각 치자 추출물이 신경 세포 보호 효과를 나

타내는지 조사하였다. 산화제로 사용된 tBHP는 대조군 (CON)에 비하여 2배 이상 감소된 세포 생존율을 나타내었으나 GF는 유의한($p < 0.05$) 세포 보호 효과를 보였다(Fig. 1A). GFE와 GFE-G 및 GFE-A 사이에서 세포 보호 효과의 차이는 나타나지 않았다. 또한 TUNEL 염색 결과로 tBHP에 의한 신경세포 사멸이 세포자멸사 (apoptosis)에 기인함을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 대조군과 비교하여 선명하게 염색된 세포가 tBHP 단독 처리군에서 관찰되었으며 일반 치자와 수치 치자를 전 처리한 결과 tBHP에 비해 염색된 세포가 감소하였다. 이러한 결과로 GF가 항세포자멸사 효과를 나타내어 신경 세포를 보호하는 것을 알 수 있었다.

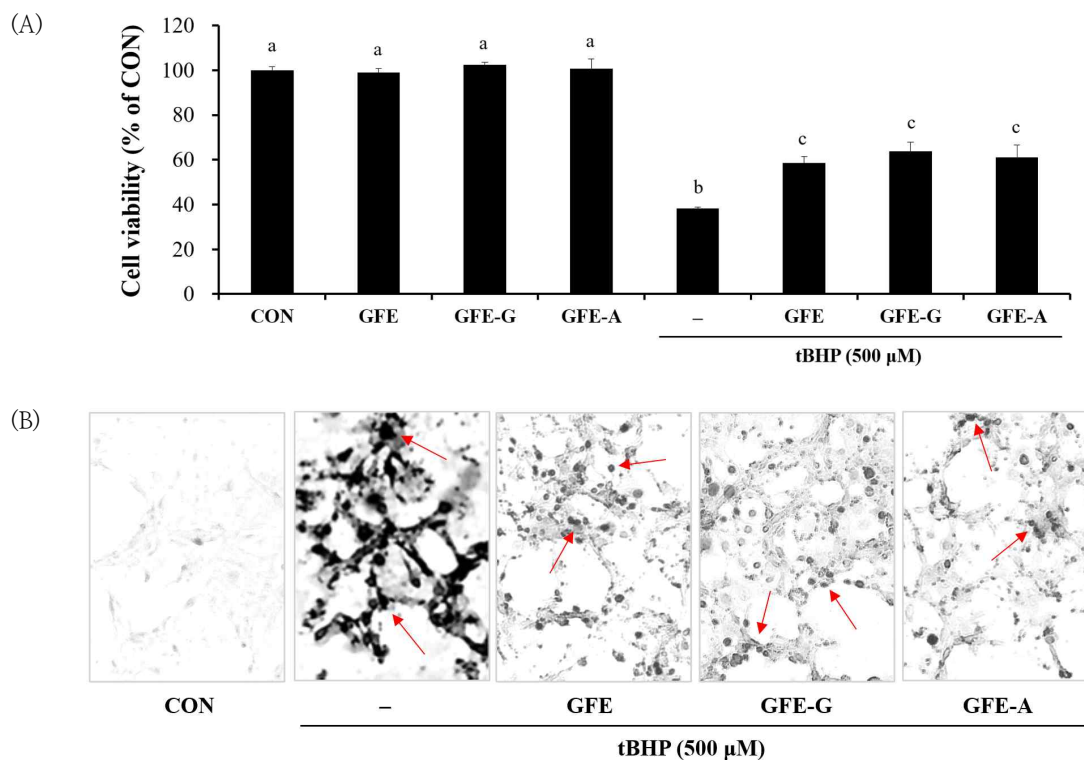


Fig. 1. Effect of GF on tBHP-induced cytotoxicity in PC12 cells. (A) PC12 cells were incubated with GF (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h, and then the cells were exposed to tBHP (500 μM) for 3 h. Cell viability was measured with MTT assay. Values are expressed as the mean \pm SD. The different letters (a-c) indicate significant differences ($p < 0.05$). (B) Apoptotic cells were confirmed by TUNEL staining. The images of TUNEL positive cells were captured by a inverted microscope (100 \times). Arrows indicate TUNEL positive cells.

2. GF가 tBHP로 유도된 세포자멸사 관련 단백질의 발현 변화에 미치는 영향

Western blot을 실시하여 세포자멸사에 기여하는 단백질들의 발현이 GF에 의해 어떤 영향을 받는지 조사하였다. 세포자멸사의 주요 단백질인 procaspase-3, procaspase-9, PARP 및 AIF의 단백질 발현을 측정한다. 결과, tBHP에 의해 감소된 procaspases와 PARP의 발

현이 GF에 의해 증가하였다(Fig. 2A). 특히 tBHP에 의한 procaspase-3의 발현 감소는 GF에 의해 대조군 수준으로 유의하게($p < 0.05$) 회복됨을 확인하였다(Fig. 2B). 이러한 결과들은 GF가 tBHP에 의한 세포자멸사 관련인자들의 단백질 발현 변화를 효과적으로 조절하고 세포자멸사를 억제함으로써 신경세포 보호 효과를 가짐을 의미한다.

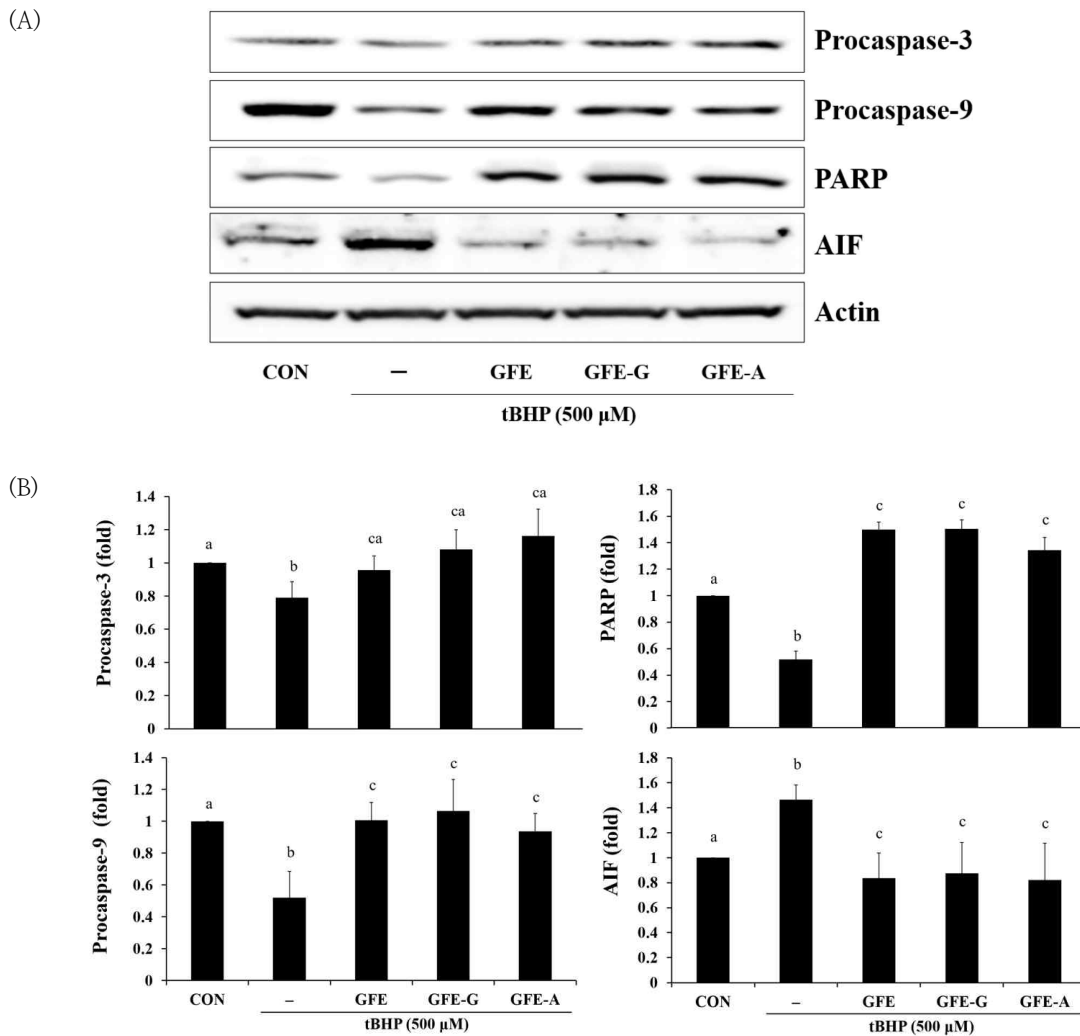


Fig. 2. Effect of GF on the expression of apoptosis-related proteins in tBHP-induced PC12 cells. (A) The level of expression of the apoptosis marker protein was monitored by Western blot analysis. Actin was used as a loading control. (B) Quantification of the band density of the blots was presented as a bar graph with fold increase. Data represent mean \pm SD and different letters (a-c) indicate significant differences ($p < 0.05$).

3. GF가 tBHP에 의한 ROS 과다 생성에 미치는 영향

세포자멸사를 유도한 tBHP는 유기 산화제로서 세포의 산화 스트레스를 유도함으로 GF의 신경세포 보호 효과가 ROS의 생성 억제로 나타나는지 조사하였다. tBHP를 처리한 PC12 신경세포에서 DCFH-DA로 염

색하여 ROS를 측정된 결과, 대조군에 비하여 ROS의 생성이 증가하였다. GF를 전처리하고 tBHP에 노출하였을 때는 ROS의 생성이 유의하게($p < 0.05$) 감소되었다(Fig. 3). 이 결과는 GF의 ROS 억제 효과가 부분적으로 항세포자멸사에 관여했음을 보여준다.

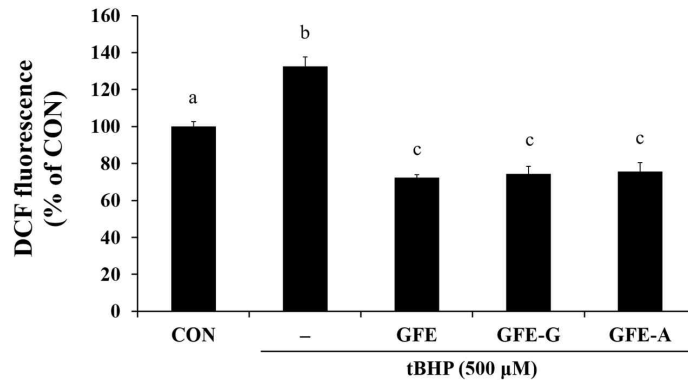


Fig. 3. Effect of GF on tBHP-induced ROS production. ROS level was detected using DCFH-DA, which emits green fluorescence in the presence of ROS. Fluorescence intensity was expressed as percentage of control. Data represent mean \pm SD and different letters (a-c) indicate significant differences ($p < 0.05$).

4. GF가 tBHP에 의한 글루타티온(GSH) 감소에 미치는 영향

비효소적 항산화제인 글루타티온에 tBHP와 GF가 미치는 영향도 살펴보았다. tBHP는 대조군과 비교하여 $43.15 \pm 6.07\%$ 로 GSH의 감소를 유도하였고 GF의 전처리에 의해 GSH의 감소가 억제됨을 확인하였다.

GFE-G와 GFE-A는 각각 $70.27 \pm 9.29\%$, $70.12 \pm 6.24\%$ 로 tBHP에 비해 글루타티온 함량을 유의하게($p < 0.05$) 증가시켰다. GFE를 전처리한 경우에는 $58.86 \pm 5.42\%$ 로 tBHP보다 글루타티온을 증가시켰으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig.4). 이러한 결과는 신경세포에서 GFE에 비해 GFE-G와 GFE-A가 더 효과적인 글루타티온 조절작용을 나타냄을 보여준다.

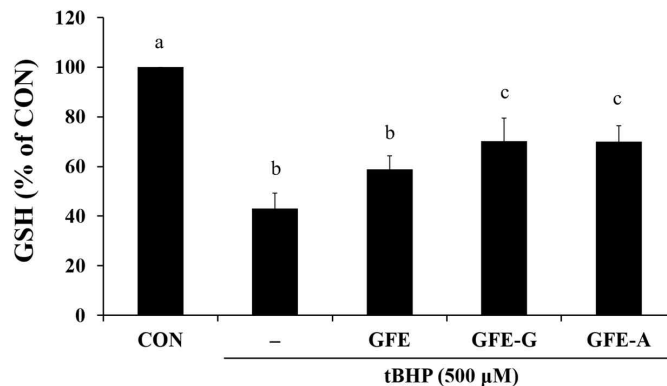


Fig. 4. Effect of GF on tBHP-induced GSH depletion. GSH contents were measured in cell homogenates as described in material and method section. Data represent mean \pm SD and different letters (a-c) indicate significant differences ($p < 0.05$).

5. GF가 Nrf2의 단백질 발현에 미치는 영향

Nrf2는 세포가 산화 스트레스에 노출되었을 때 항산화 유전자의 발현 유도에 관여하는 전사인자로 신경세포의 보호 효과도 Nrf2와 관련이 있음이 보고되어 있다^{19,20}. 본 연구에서 tBHP에 노출된 신경세포의 핵분획물에서 Nrf2의 발현이 11.72 ± 1.68 배 증가하였다. GF에 의한 효과를 살펴보면 GFE-G와 GFE-A는 각각

12.04 ± 1.72 , 12.49 ± 2.08 로 Nrf2의 발현을 감소시키지 않고 유지하였다. GFE를 전처리한 경우 10.59 ± 0.98 로 평균적으로 tBHP에 비해 Nrf2의 발현이 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 5). 이 결과를 통해 GF가 증가된 Nrf2의 발현을 유지함으로써 세포내 항산화 작용에 역할을 하는 것을 알 수 있다.

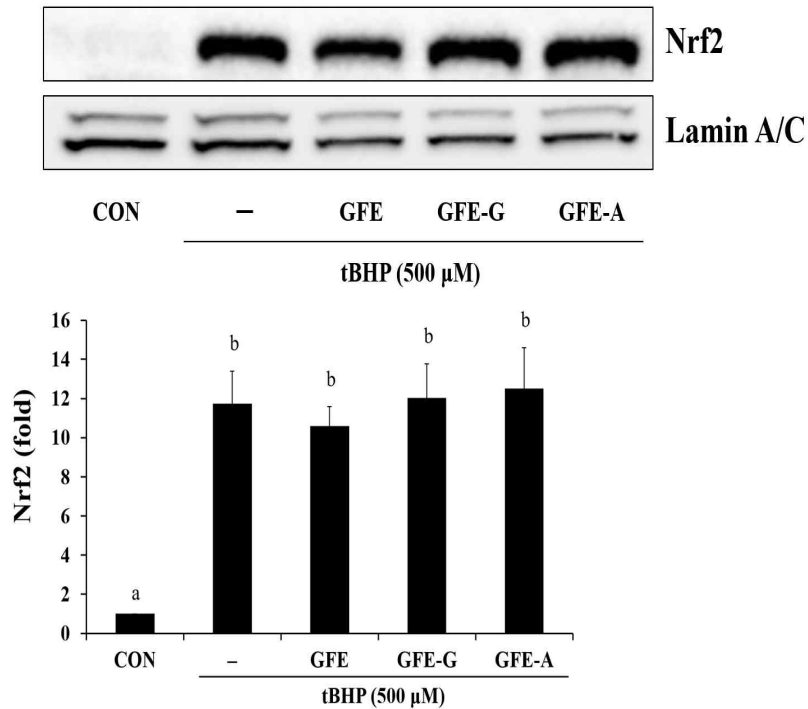


Fig. 5. Effect of GF on Nrf2 overexpression. Nuclear Nrf2 expression was measured by Western blot analysis after 24 h incubation of GF and 1 h exposure of tBHP. Lamin A/C was used as a loading control. Quantification of the band density of the blots was presented as a bar graph with fold increase. Data represent mean \pm SD and different letters (a-b) indicate significant differences ($p < 0.05$).

6. GF가 MAPK의 단백질 발현에 미치는 영향

세포자멸사와 항산화 시스템에서 주요한 역할을 하는 MAPK 신호경로가 신경세포에서 GF에 의해 어떠한 영향을 받는지 조사하였다. tBHP는 ERK의 인산화는 감소시키고 JNK와 p38의 인산화는 증가시켰다. GF는 감소된 p-ERK의 발현을 증가시켰고 증가했던 p-p38의

발현은 감소시켰지만 p-JNK의 발현 변화에는 영향을 주지 않았다(Fig. 6). 이러한 결과로부터 GF는 p-ERK와 p-p38의 발현을 조절하여 항세포자멸사와 항산화 효과를 발휘함으로써 tBHP에 대한 신경세포 보호효과를 나타낸다고 할 수 있다.

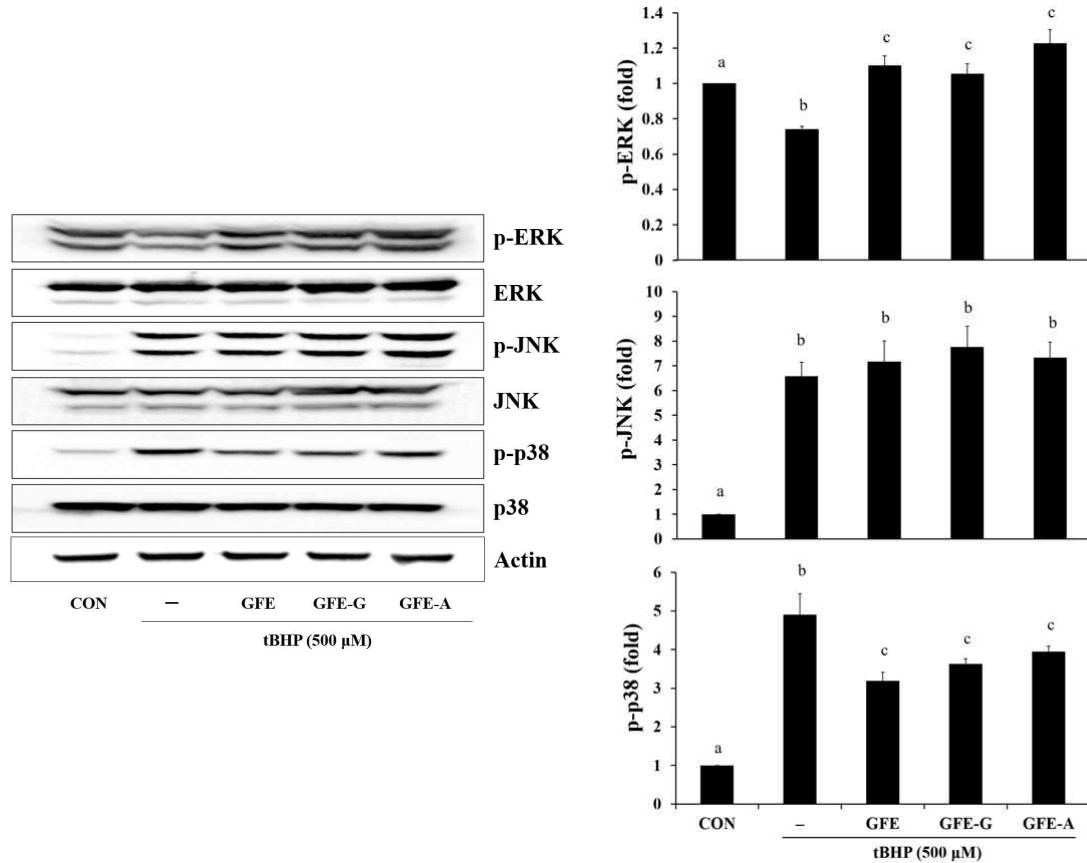


Fig. 6. Effect GF on phosphorylation of MAPK. Expression of phosphorylated MAPK protein was monitored by Western blot analysis after 24 h incubation of GF and 30 min exposure of tBHP. Quantification of the band density of the blots was presented as a bar graph with fold increase. Data represent mean \pm SD and different letters (a-c) indicate significant differences ($p < 0.05$).

IV. 고찰

본 연구에서는 tBHP를 처리한 PC12 신경세포에서 치자(GF)의 항세포자멸사 및 항산화 효과를 확인하였다. 치자는 일반 치자(GFE)와 생강즙, 주정을 각각 보료로 볶은 수치 치자(GFE-G, GFE-A)를 사용하였으며 tBHP에 의해 감소된 GSH를 증가시키는데 수치 치자가 일반 치자에 비해 우수한 효과를 나타낸 것을 제외하고 수치에 의한 치자의 생리활성 차이는 나타나지 않았다.

산화 스트레스 유도제인 tBHP를 적용한 PC12 세포는 산화 스트레스에 대한 신경보호 효과를 연구하기 위한 잘 확립된 모델로서 산화적 손상에 의한 신경세포 사멸을 유도하게 되는데 tBHP에 의한 세포 사멸은 세

포자멸사에 기인하는 것으로 알려져 있다^{24,25}. 세포자멸사는 생리학적 조건 하에서 유도될 수 있는 매우 잘 제어되고 프로그래밍된 과정으로 caspase의 활성화가 주요한 역할을 담당하고 있다²⁶. Caspase는 proenzyme 형태로 존재하다 세포 신호에 의해 분해되고 절단된 형태(cleaved form)로 활성화된다. 세포사멸 신호에 의해 procaspase-9에서 절단되어 활성화된 caspase-9은 procaspase-3를 절단하여 세포자멸사의 실행자인 caspase-3를 활성화한다²⁷. DNA 손상을 인지하여 수선하는 역할을 담당하는 PARP는 caspase-3에 의하여 분해가 일어나는 대표적인 기질 단백질로 절단되어 불활성화되면 DNA 수선 기능을 잃어 세포자멸사를 유발하게 된다²⁸. 본 연구에서는 tBHP에 의해 유도된 신경세포의 세포자멸사를 확인하였고 GF에 의해 세포자멸



사가 감소하여 신경세포 보호 효과가 나타남을 알 수 있었다. GF는 tBHP에 의해 감소된 procaspase-9과 -3, PARP의 단백질 발현을 증가시켰고 이 결과는 GF가 procaspase가 절단되고 활성화되는 것을 억제하여 PARP의 불활성화를 막았다고 할 수 있다. 또한 GF는 tBHP에 의해 증가된 AIF의 발현을 저해하여 미토콘드리아 인자에 의해 매개되는 세포자멸사와의 연관성을 보여주었다. 하지만 미토콘드리아 매개 세포자멸사에 대한 GF의 효과를 규명하기 위해서는 미토콘드리아 막 전위의 변화, Bcl-2 계열 단백질의 변화 등을 더 살펴볼 필요가 있다.

PC12 신경세포에서 tBHP는 ROS의 과다 생성을 유발할 수 있으며 세포내 항산화 시스템이 ROS를 제대로 소거하지 못하면 세포사멸이 유도된다²⁹⁾. ROS에 의한 신경세포의 자멸사는 알츠하이머와 파킨슨병 같은 신경퇴행성 질환의 원인이 될 수 있음으로^{14,15)} 신경세포에서 ROS의 소거능력은 관련 질환의 예방 및 치료를 위한 분자메커니즘으로 활용 가능성이 높다할 수 있다. 본 연구에서 tBHP는 세포내 ROS의 생성을 증가시켰고 GF는 ROS 소거 효과를 나타내었다. ROS 소거에 의한 GF의 항산화 효과는 비효소적 항산화물질인 글루타티온(GSH)의 조절에서도 확인되었다. tBHP에 의해 고갈되었던 글루타티온이 GF에 의해 증가되었으며, 특히 글루타티온의 조절 작용에서 GFE에 비해 GFE-G와 GFE-A가 더 효과적으로 나타났다. 이러한 결과로부터 한의학에서 약효는 증강시키고 독성과 같은 부작용은 줄이기 위해 사용해 왔던 한약재 수치의 목적을 객관적으로 살펴볼 수 있다. Lipopolysaccharid로 염증을 유발한 대식세포²³⁾와 산화적 손상을 유발한 위상피세포³⁰⁾를 활용한 연구에서도 수치 치자는 일반 치자에 비해 좀 더 효과적으로 항염증 및 위세포 보호 작용을 보였다.

Nrf2는 항산화 관련 유전자의 유도발현을 조절하는 전사인자로 여러 연구에서 Nrf2의 손실 또는 조절 장애가 다양한 산화 스트레스 유발 질병과 관련이 있음이 입증되었으며^{31,32)} 산화제에 대한 신경보호 효과도 이 경로를 통해 나타나는 것으로 보고되었다^{19,20)}. 이번 연구에서 GF가 핵분획의 Nrf2 발현 증가를 통해 세포내 항산화 능력을 향상시키는지 여부를 조사한 결과 GF 전처치가 tBHP의 존재 하에서 증가된 Nrf2 발현을 유지할 수 있음을 확인하였다. 또한 이전 연구에서는 산화 스트레스가 MAPK 신호 전달의 활성화를 매개하여 신경세포의 세포 사멸을 촉진할 수 있음을 보여주었다

²⁹⁾ 본 연구에서도 tBHP에 의한 산화 스트레스로 인해 ERK, JNK 및 P38 MAPK의 인산화에 변화가 나타남을 확인하였다. tBHP 자극에 의해 JNK와 p38 MAPK의 인산화가 크게 증가한 반면 ERK의 인산화 수준은 감소하였다. 이러한 MAPK의 서로 다른 인산화 조절 양상은 이전의 연구에서도 동일하게 확인되었다²⁹⁾. GF는 p38의 인산화를 감소시키고 ERK의 인산화 수준을 증가시켰지만 JNK의 인산화에는 영향을 주지 않았다. 이러한 결과는 MAPK의 인산화 수준 변화가 GF의 항산화 및 항세포자멸사 활성을 매개할 수 있으며, ERK와 p38 MAPK은 서로 다른 역할과 조절 작용을 통해 GF의 신경세포 보호 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

V. 결론

본 연구에서는 일반 치자와 생강즙과 주정을 보료로 사용하여 붉은 수치 치자를 사용하여 tBHP로 산화적 손상을 유도한 PC12 세포에서 신경보호 효과를 살펴보았다. 일반 치자와 수치 치자 사이에서 효과의 차이는 유의성있게 나타나지 않았지만 항세포자멸사 및 항산화 활성을 통한 치자의 신경세포 보호 효과를 확인하였다. Caspase의 활성화와 PARP의 불활성화를 저해함으로써 항세포사멸 효과가 나타났으며 세포내 ROS 생성과 글루타티온 고갈을 억제함으로써 항산화 활성이 나타났다. 또한 Nrf2 발현 증가와 ERK와 p38 MAPK의 인산화 조절 과정이 치자의 신경세포 보호 작용에 관여함을 확인하였다. 이러한 결과는 항산화 및 신경보호 화합물의 공급원으로서 치자의 활용 가능성을 보여준다.

Acknowledgment

This work was supported by the National Research Foundation of Korea(NRF) grant funded by the Korea government(MOE) (No. 2017R1D1A3B03031863).

References

1. Lipnicki DM, Crawford JD, Dutta R, Thalamuthu A, Kochan NA, Andrews G, et al. Age-related cognitive decline and associations with sex, education and apolipoprotein E genotype across ethnocultural groups

- and geographic regions: a collaborative cohort study. *PLoS Med.* 2017;14(3):e1002261.
- Hodges JR. Decade in review-dementia: a decade of discovery and disappointment in dementia research. *Nat Rev Neurol.* 2015;11(11):613-4.
 - Yang Z, Liu J, Wei S, Deng J, Feng X, Liu S, et al. A novel strategy for bioactive natural products targeting NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease. *Front Pharmacol.* 2023;13:1077222.
 - Kim IR. A research on the origin and daily dose of *Gardeniae Fructus* in Shanghanlun. *Kor J Herbol.* 2011;26(4):155-61.
 - Shin YW, Kim DH, Kim NJ. Studies on the processing of crude drugs(7) - On the constituents and biological activities of *Gardeniae Fructus* by processing. *Kor J Pharmacogn.* 2003;34(1):45-54.
 - Park CH, Kang SI. Processing of Herbal Medicines. Seoul:Chungmunkak. 2002 : 15-19.
 - Xiao W, Li S, Wang S, Ho CT. Chemistry and bioactivity of *Gardenia jasminoides*. *J Food Drug Anal.* 2017;25(1):43-61.
 - Shan M, Yu S, Yan H, Guo S, Xiao W, Wang Z, et al. A review on the phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of geniposide, a natural product. *Molecules.* 2017;22(10):1689.
 - Liu S, Lin Y, Huang T, Huang S, Peng WH. Anti-depressive activity of *Gardeniae fructus* and geniposide in mouse models of depression. *Afr J Pharm Pharmacol.* 2011;5:1580-8.
 - Alavizadeh SH, Hosseinzadeh H. Bioactivity assessment and toxicity of crocin: a comprehensive review. *Food Chem Toxicol.* 2014;64:65-80.
 - Wang QS, Tian JS, Cui YL, Gao S. Genipin is active via modulating monoaminergic transmission and levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat model of depression. *Neuroscience.* 2014;275:365-73.
 - Yu Y, Xie Z, Gao H, Ma W, Dai Y, Wang Y, et al. Bioactive iridoid glucosides from the fruit of *Gardenia jasminoides*. *J Nat Prod.* 2009;72:1459-64.
 - Su C, Yang X, Lou J. Geniposide reduces α -synuclein by blocking microRNA-21/lysosome-associated membrane protein 2A interaction in Parkinson disease models. *Brain Res.* 2016;1644:98-106.
 - Yin D, Chen K. The essential mechanisms of aging: Irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions. *Exp Gerontol.* 2005;40(6):455-65.
 - Lv J, Jiang S, Yang Z, Hu W, Wang Z, Li T, et al. PGC-1 α sparks the fire of neuroprotection against neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev.* 2018;44:8-21.
 - Calabrese V, Sultana R, Scapagnini G, Guagliano E, Sapienza M, Bella R, et al. Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(11-12):1975-86.
 - Mandal PK, Roy RG, Samkaria A. Oxidative Stress: Glutathione and its potential to protect methionine-35 of A β peptide from oxidation. *ACS Omega.* 2022;7(31):27052-61.
 - Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* 2002;62(18):5196-203.
 - Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2013;100:30-47.
 - Dasuri K, Zhang L, Keller JN. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med.* 2013;62:170-185.
 - Martín C, Martínez R, Navarro R, Ruiz-Sanz JI, Lacort M, Ruiz-Larrea MB. tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals. *Biochem Pharmacol.* 2001;62(6):705-12.
 - Davies MJ. Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. *Biochem J.* 1989;257(2):603-606.



23. An I, Kim SC, Byun SH, Lee JR, Park SJ. Anti-inflammatory effect of the processed Gardeniae Fructus in LPS-induced macrophages. *Herb Formula Sci.* 2019;.27(4):245-55.
24. Lin J, Pan X, Huang C, Gu M, Chen X, Zheng X, et al. Dual regulation of microglia and neurons by Astragaloside IV-mediated mTORC1 suppression promotes functional recovery after acute spinal cord injury. *J Cell Mol Med.* 2020;24(1):671-85.
25. Sarkar MK, Sil PC. Prevention of tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative impairment and cell death by a novel antioxidant protein molecule isolated from the herb, *Phyllanthus niruri*. *Toxicol In Vitro.* 2010;24(6):1711-9.
26. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007. 35: 495-516.
27. Fiandalo MV, Kyprianou N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp Oncol.* 2012;34:165-75.
28. Yinjun L, Jie J, Weilai X, Xiangming T. Homoharringtonine mediates myeloid cell apoptosis via upregulation of pro-apoptotic bax and inducing caspase-3-mediated cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). *Am J Hematol.* 2004;76(3): 199-204.
29. Wang YJ, Wang XY, Hao XY, Yan YM, Hong M, Wei SF, et al. Ethanol Extract of *Centipeda minima* Exerts Antioxidant and Neuroprotective Effects via Activation of the Nrf2 Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:9421037.
30. Lee JR, Kim SC, Park SJ. Cytoprotective effect of the processed Gardeniae Fructus on oxidative stress-induced gastric epithelial cells. *Kor J Herbol.* 2023;38(1):21-30.
31. Li S, Wang W, Niu T, Wang H, Li B, Shao L, et al. Nrf2 deficiency exaggerates doxorubicin-induced cardiotoxicity and cardiac dysfunction. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:748524.
32. Strom J, Chen QM. Loss of Nrf2 promotes rapid progression to heart failure following myocardial infarction. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017;327: 52-8.