

신경세포와 미세신경교세포에서의 궁천피 추출물의 항신경염증 및 항산화 효능을 통한 신경보호작용

최연희, 정성철, 은수용

제주대학교 의학전문대학원 생리학교실

Abstract

Anti-neuroinflammatory and anti-oxidative activities of the ethanol extract from *Citrus unshiu* MARC.

Yan Ji Cui, Sung-Cherl Jung, Su-Yong Eun

Department of Physiology, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

Citrus peel extract has shown anti-inflammatory and anti-oxidative effects in several tissues. Therefore, we investigated whether the ethanol extract from fruit peel of *Citrus unshiu* MARC. suppresses brain insult-induced excessive microglial activation and neuronal oxidative stresses. Releases of NO, the major inflammatory mediator in microglia, and iNOS mRNA expressions were markedly inhibited in a dose dependent manner following treatment of the ethanol extract from *Citrus unshiu* MARC. in LPS-stimulated BV-2 microglia cells. In addition, the extract significantly suppressed LPS-induced mRNA expression of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-1 β and IL-6. On the other hand, the ethanol extract exerted intracellular ROS scavenging activities in HT-22 neurons in a dose dependent manner (50-400 μ g/ml), suggesting the potent anti-oxidative stress effects in neurons. Taken together, these results suggest that *Citrus unshiu* MARC. peel extract has therapeutic potential against neuroinflammation and neurodegeneration via suppression of brain insult-induced microglial activation and neuronal oxidative stresses. (J Med Life Sci 2010;7:88-93)

Key Words : Anti-neuroinflammatory, Anti-oxidative, Neurotrophic, Reactive oxygen species, Microglial activation, Citrus

서론

노인 인구가 급증하는 고령화 사회에서 치매, 파킨슨병 등 퇴행성 뇌질환의 유병률이 증가하고 뇌의 노화로 인한 삶의 질 저하가 사회의 중요한 이슈가 되면서 이의 예방과 기능개선, 치료기술 개발의 필요성이 급속도로 대두되고 있다. 국내 천연물 추출 및 활용 기술이 하나의 성장동력으로 상당한 국제적 경쟁력을 갖추고 있어 이를 기반으로 하여 천연물에서 노화, 뇌질환 예방 및 치료제, 뇌기능 개선제 관련 신약 및 건강기능 식품의 후보물질을 발굴하여 실용화 하려는 노력이 활발하다.

신경염증(neuroinflammation)은 뇌졸중¹⁾, 알츠하이머 치매²⁾

파킨슨병³⁾과 같은 퇴행성 뇌질환의 발병과 밀접한 연관이 있다고 한다. 관절염 환자와 같이 항염제인 non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)을 장기적으로 투여하고 있는 환자에게서 치매 유병률이 상대적으로 낮다는 역학보고가 있으며⁴⁾ 현재 신경염증과 퇴행성 뇌질환 발병과의 연관관계에 대한 연구가 활발하다⁵⁾. 실제로 신경염증은 퇴행성 뇌질환의 직접적인 병인은 아니지만 질병의 발병 초기나 진행과정에 작용하여 질병을 악화시키는 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있어 신경염증의 예방 및 억제기술은 퇴행성 뇌질환의 예방, 기능 개선 및 치료제 개발 전략에서 중요한 기능을 할 수 있는 것으로 보고 있다.

중추신경계의 염증세포인 미세신경교세포(microglia)의 활성화는 정상적인 염증 반응의 일환이지만 과도한 미세신경교세포의 활성화는 오히려 신경세포(neuron) 손상 및 사멸을 유발시켜 뇌졸중이나 퇴행성 뇌질환에서 하나의 중요한 병인기전으로 작용한다⁶⁾. 이는 순기능 및 역기능을 동시에 가진 염증 반응의 양면성에 해당한다. 따라서, 미세신경교세포 활성화에 의해 유발되는 염증 매개인자인 산화질소(nitric oxide: NO)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6)과 같은 염증성 사이토카인(proinflammatory

Address for correspondence : Su-Yong Eun
Department of Physiology, Jeju National University School of Medicine, 66 Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea
E-mail : syeun@jejunu.ac.kr

This study was supported by a grant from Biomedical Brain Research Center of the Korea Health 21 R&D Project funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (A040042)

cytokines)의 과도한 병적 생성을 억제하는 항염 효능을 가지는 천연물 추출물은 뇌에서 발생할 수 있는 다양한 원인(예 β -amyloid, bacteria, glutamate, thrombin 등)에 의한 염증반응을 효과적으로 억제하여 신경세포의 퇴행 및 사멸로부터 보호할 수 있는 신물질로서 탐색되고 있다⁶⁻¹⁰⁾.

신경염증과 더불어 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)에 의한 신경세포 손상 및 사멸은 뇌졸중과 알츠하이머 치매와 같은 퇴행성 뇌질환의 발병기전에서 공통적으로 존재하는 중요한 요소이다¹¹⁾. 프리라디칼(free radical)들은 전자쌍을 이루지 못해 매우 불안정한 높은 에너지 전위를 가지고 있어 전자를 가져올 수 있는 물질들을 무차위 공격하여 세포의 지질막, 단백질, DNA 등의 무차별 파괴를 가져올 수 있어 암, 죽상경화증, 염증, 퇴행성 뇌질환, 노화 등 많은 질병의 병인기전에 관여하고 있다^{12, 13)}. 중추신경계는 많은 산소를 필요로 하고 또 불포화지방산이 많이 분포되어 있는 만큼 특히 ROS에 의한 산화적 스트레스의 영향을 쉽게 받는다. 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환의 발병기전은 보통 산화적 스트레스와 신경염증 이 두 과정을 동반하기 때문에 이 두 가지를 겸비한 약물은 단일 항산화제 혹은 항염제 치료제보다 더 효과적일 수 있을 것이다.

감귤의 주요한 생리활성물질로서 플라보노이드(flavonoids)는 과육보다 감귤 껍질에 많으며, 탄저레틴(tangeretin), 노블레틴(nobiletin), 헤스페리딘(hesperidin), 나린진(naringin), 루틴(rutin) 등의 단일 화합물들로 구성되어 있다. 이들은 항산화, 항염증 및 항암 작용이 있으며 또한 천식, 소화불량, 콜레스테롤 저하, 비만 억제, 고혈압, 동맥경화 및 심혈관 질환, 간염 바이러스, 알코올성 간질환, 당뇨병 예방 등에도 효능이 있다고 보고되고 있다¹⁴⁾.

제주도에서 생산되는 감귤은 크게 여섯 가지로 천혜향, 흥진조생, 극조생, 궁천조생, 청진, 한라봉으로 구분할 수 있는데, 궁천조생(*Citrus unshiu* MARC.)은 제주도에서 가장 많이 재배되는 품종으로 하우스 감귤로 재배하는 경우가 많다. 감귤의 종에 따라 생리활성 물질의 구성 성분, 함량 및 비율이 다르고 이에 따라 차별적인 효능을 가지고 있어 현재 이에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

본 연구에서는 궁천조생 껍질(궁천피) 에탄올 추출물의 미세신경세포 및 신경세포에서의 각각 항염 및 항산화 효능을 조사하여 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환의 예방 치료제 개발의 타겟으로서 가능성을 탐색하고자 하였다. 이를 위하여 미세신경교세포에서의 LPS에 의한 신경염증 모델에서 신경세포 퇴행 및 사멸을 초래하는 것으로 알려진 NO와 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6)의 발현을 억제하는지 조사하였고, 추출물 자체의 프리라디칼 소거활성 조사와 함께 HT-22 신경세포에서 H₂O₂에 의해 유발시킨 산화적 손상 모델에서 ROS 발현양에 대한 억제 효능을 조사하였다. 이러한 궁천피 에탄올 추출물의 항염 및 항산화 효능은 뇌질환의 병인기전 중의 중요한 요소인 신경세포의 손상 및 사멸을 방지하는 신경세포 보호효능에 해당할 것이다.

실험재료 및 방법

실험재료

궁천피의 에탄올 추출물(C-80E, 김세재 교수님, 제주대학교 자연과학대학 생명과학과)을 DMSO로 녹여 실험에 사용하였다. 별도로 공급처를 언급하지 않은 시약은 Sigma®에서 구입하였다.

세포배양

HT-22 신경세포주와 BV-2 미세신경교세포주^{15, 16)}는 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco BRL)과 1% penicillin streptomycin (Gibco BRL)이 함유된 Dulecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco BRL) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, BV-2 미세신경교세포주는 매일 계대 배양하였고, HT-22 신경세포주는 2일에 한번씩 계대배양하였다.

Nitric oxide (NO) 측정

NO는 L-arginine이 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 citrulline으로 변화되면서 생성되는 프리라디칼로서 세포 상층액에 방출된 nitrite (NO₂)를 간접적으로 측정함으로써 NO양을 조사한다. 즉, sulfanilamide가 nitrite와 반응을 하게 되고, 여기에 다시 naphthyl ethylene diamine이 결합하게 되면서 색깔 변화(colorimetric change)가 일어나며 microplate reader (Model 550, Bio-Rad)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite 농도 계산은 sodium nitrite를 표준 물질로 사용하여 구하였다.

ROS의 정량적 측정 (DCF-DA 측정법)

DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein)는 acetylated form으로 세포막 투과가 가능하며 세포 내로 들어와서는 세포내의 esterase에 의해 acetate 기가 제거된다. 평상시 형광을 띠지 않지만, 세포에 발생한 ROS에 의해 산화되면 구조가 바뀌어 형광을 띠는 특징을 이용하여 DCF-DA 형광의 및 정성적 분석을 할 수 있다. HT-22 신경세포주에서 H₂O₂를 1 mM 농도로 30 분 처리하여 ROS를 발생시킨 후 50 μ M 농도의 DCF-DA를 30 분 반응시켜 ROS에 의해 산화된 DCF-DA가 형광을 띠는 구조로 바뀌면 microplate reader (Tecan, Spectra fluor)를 이용하여 그 흥분/방출 파장 (485 nm/535 nm)에서 형광의 정량적 및 정성적 분석을 하였다. ROS 소거작용의 측정치(%)는 약물 처리 없이 H₂O₂만을 처리했을 때의 ROS 양을 기준으로 아래의 계산식에 의해 구한다.

약물의 ROS 소거작용 (%) = $\frac{[\text{약물처리 없이 H}_2\text{O}_2\text{만을 처리했을 때의 형광 강도}] - [\text{약물 처리군의 형광 강도}]}{[\text{약물처리 없이 H}_2\text{O}_2\text{만을 처리했을 때의 형광 강도}]} \times 100(\%)$.

DPPH assay

DCF-DA 측정법처럼 세포 안에서의 ROS 소거작용을 측정하

는 방법과는 달리 시험관 수준에서 궁천피 추출물 자체의 프리라디칼 제거효과를 알아보기 위하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay를 시행하였다. DPPH는 프리라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 프리라디칼이 소멸되고 색깔이 보라색으로부터 노란색으로 변하는데 항산화효과가 클수록 노란색의 강도가 더 증가하게 된다. 궁천피 추출물 10 μ l와 DPPH (150 μ M) 190 μ l를 1 시간 반응시켜 DPPH의 색깔 변화를 유도하고 이를 microplate reader (Tecan, Spectra fluor)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 프리라디칼 소거작용의 측정치(%)는 약물 처치 없이 DPPH 만을 처치했을 때의 흡광도를 기준으로 아래의 계산식에 의해 구한다.

약물의 ROS 소거작용 (%) = {[약물처치 없이 DPPH 만을 처치했을 때의 흡광도] / [약물 처치군의 흡광도]} / [약물처치 DPPH 만을 처치했을 때의 흡광도] x 100(%)

역전사증합효소연쇄반응 (RT-PCR)

BV-2 세포에 C-80E와 LPS를 처리한 다음 Tri-reagent를 이용하여 mRNA를 추출하였다. Oligo (dT)를 이용하여 역전사효소로 cDNA를 합성하고 이 cDNA를 주형 DNA로 하여 PCR 반응과 전기영동을 실시하여 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1, IL-6의 mRNA를 검출, 정량하였다. TNF- α , IL-1, IL-6, iNOS, GAPDH 의 primer sequence는 아래와 같다: TNF- α (forward 5'-ATGAGCACAGAAAGCATGAT-3', reverse 5'-TGACTTTCCTCCTGCTATGA-3'), IL-1 (forward 5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3', reverse 5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC-3'), IL-6 (forward 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3', reverse 5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'), iNOS (forward 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3', reverse 5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'), GAPDH (forward 5'-GTCCACATTGTTGCCATCAACGAC-3', reverse 5'-TTTCTCGTGGTTACACCCATCAC-3').

통계처리

실험결과를 Image J와 Origin50 프로그램으로 분석했다. 통계 처리한 후 평균 \pm 표준오차 (standard error)로 나타내었다. 두 집단 사이의 평균을 비교할 때는 Student's t-test를 실시하여 p 값을 비교했다. p<0.05인 경우를 통계적으로 유의하다고 평가하였다.

결 과

미세신경교세포 신경염증모델에서의 NO의 생성 및 iNOS mRNA의 발현에 대한 궁천피 추출물의 억제 작용

iNOS는 염증 반응에 동반하는 NO 생성을 담당하는 효소이다 13). 궁천피 추출물 C-80E가 iNOS mRNA 발현에 미치는 영향을

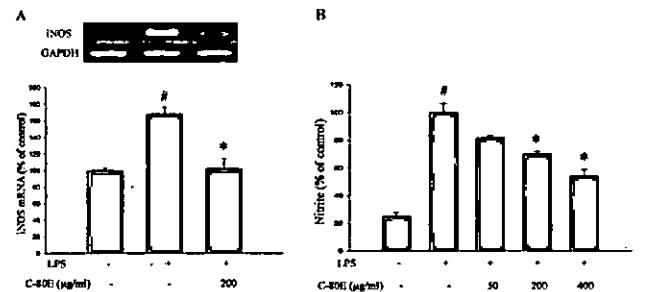
조사하기 위하여 BV-2 미세신경교세포에 C-80E를 200 μ g/mL 농도로 6시간 전처리 후 200 ng/mL 농도의 LPS를 24시간 처리하여 배양한 다음 RT-PCR 방법으로 iNOS mRNA 발현양을 조사하였다. 실험 결과 C-80E는 LPS에 의한 iNOS mRNA 발현을 39.11% 정도 현저하게 억제하였다(Fig. 1-A).

그람 음성 세균의 세포벽 성분인 LPS에 의하여 염증효소인 iNOS가 활성화 되어 NO의 생성이 수반되며, 아질산염의 증가는 뇌 손상 시 세포독성에 매우 중요하게 작용한다. BV-2 미세신경교세포를 24-well plate에 분주 배양 후 C-80E를 농도별(50, 200, 400 μ g/mL)로 6시간 전처리 후 200 ng/mL 농도의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 배지에 방출된 NO의 양을 측정할 결과 C-80E는 농도의존적으로 LPS에 의한 NO의 생성을 현저하게 억제하였다. 즉, 200 μ g/mL에서 29.8%, 400 μ g/mL에서 45.8% 정도 감소하는 효과를 보여 주었다(Fig. 1-B).

미세신경교세포 신경염증모델에서의 IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA 발현에 대한 궁천피 추출물의 억제 작용

IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 염증성 사이토카인으로 LPS 등 염증 자극물질에 의해 분비된다고 알려져 있다¹⁴⁾. 궁천피 추출물 C-80E의 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성에 대한 억제작용을 RT-PCR 방법으로 조사하였다. BV-2 미세신경교세포에 C-80E를 200 μ g/mL 농도로 6시간 전처리 후 200 ng/mL 농도의 LPS를 24시간 처리하여 배양한 다음 RT-PCR 방법으로 IL-1 β (Fig. 2-B), IL-6 (Fig. 2-C) 그리고 TNF- α (Fig. 2-D)의 mRNA 발현양을 조사하였다. 실험 결과 C-80E는 LPS에 의한 IL-1 β 의 발현을 45.75 \pm 5.51%, IL-6의 발현을 48.73 \pm 0.59%, TNF- α 의 mRNA 발현을 25.05 \pm 2.95% 정도 현저하게 억제하였다.

Figure 1. 미세신경교세포 신경염증모델에서의 NO의 생성 및 iNOS mRNA의 발현에 대한 궁천피 추출물의 억제 작용



(A) 미세신경교세포를 1 x 10⁶ 농도로 6-well 세포배양기에 분주하여 배양하였다. 12시간 안정화 시킨 후 200 μ g/ml 농도의 궁천피 추출물 C-80E를 6시간 전처리 한 다음 LPS (200 ng/ml)를 24시간 처리하여 반응시켰다. RT-PCR 방법으로 iNOS mRNA 발현양을 조사하였다 (B) 미세신경교세포를 2 x 10⁶ 농도로 24-well 세포배양기에 분주하여 배양하였다. 12시간 안정화 시킨 후 C-80E를 농도별로 6시간 전처리 한 다음 200 ng/ml 농도의 LPS를 24시간 처리하여 반응시켜 NO assay로 NO를 측정하였다. 측정치는 대조군의 RT/PCR mRNA 발현양의 optic density와 NO 방출량(μ M)을 기준으로 한%로서 나타내었다. #P<0.001 or *P<0.05(#P: LPS를 처치하지 않은 대조군과 비교 *P: LPS 만을 처치한 대조군과 비교).

신경세포의 산화적 손상모델에서의 궁천피 추출물의 활성산소종 소거 작용

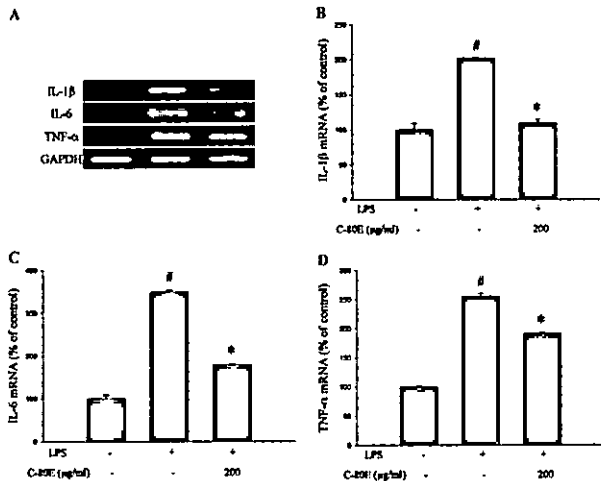
궁천피 추출물 C-80E의 신경세포내 ROS 발현양에 대한 억제 효능을 DCF-DA 방법으로 측정하였다. 헤마 신경세포주인 HT-22 신경세포를 96 well-세포배양기에 분주 배양한 다음 C-80E를 농도별(50, 200, 400 µg/mL)로 30분 처리한 후 H₂O₂를 1 mM 농도로 30분 처리하였다. 여기에 50 µM DCF-DA를 첨가하여 흡광도를 측정한 결과 C-80E는 뉴런세포내의 ROS를 농도의존적으로 억제하였다. 50 µg/mL 농도에서 37.17±1.81%, 200 µg/mL 농도에서 88.57±1.84%, 400 µg/mL 농도에서 91.52±5.99% 정도의 항산화효과를 나타내었다(Fig. 3-A).

C-80E 물질 자체의 프리라디칼에 대한 소거활성 효능을 조사하기 위하여 DPPH assay를 시행하였다. 실험 결과 C-80E는 농도의존적으로 프리라디칼을 소멸하는 효능을 보여주었다. 50 µg/mL 농도에서 7.79±0.26%, 100 µg/mL 농도에서 13±0.89%, 200 µg/mL 농도에서 31.81±0.89g/mL, 400 µg/mL 농도에서 43.79±1.26% 정도의 항산화효과를 나타내었다(Fig. 3-B).

고찰

본 연구에서는 궁천피 추출물이 LPS에 의한 BV-2 미세신경교세포의 신경염증 모델에서 신경세포 퇴행 및 사멸을 초래하는 것으로 알려져 있는 염증성 매개인자인 NO (Fig. 1)와 염증성 사이토카인(IL-1β, IL-6, TNF-α)의 발현을 억제하는 것을 확인하였고(Fig. 2). H₂O₂에 의한 HT-22 신경세포의 산화적 손상

Figure 2. 미세신경교세포 신경염증모델에서의 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 발현에 대한 궁천피 추출물의 억제 작용.



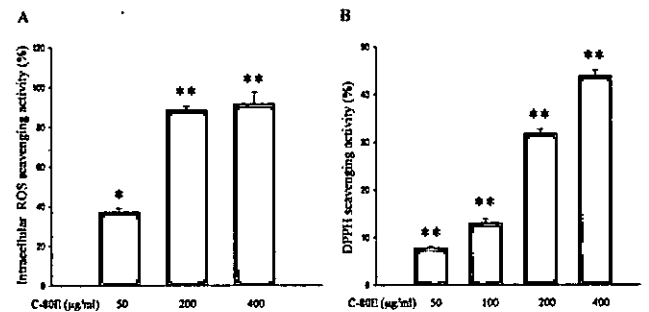
미세신경교세포를 1 x 10⁶ 농도로 6-well 세포배양기에 분주하여 배양하였다. 12시간 안정화 시킨 후 200 µg/ml 농도의 궁천피 추출물 C-80E를 6시간 전처리 한 다음 LPS (200 ng/ml)를 24시간 처리하여 반응시켰다. RT-PCR 방법으로 IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA 발현양을 조사하였다. 측정치는 대조군의 RT/PCR mRNA 발현양의 optic density를 기준으로 한 %로서 나타내었다. #P<0.001 or *P<0.05(#P: LPS를 처리하지 않은 대조군과 비교 *P: LPS만을 처리한 대조군과 비교).

모델에서 ROS에 대한 소거 활성이 있음을 확인하였다(Fig. 3). 궁천피 추출물의 신경세포 보호효능을 제시하였다. 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환의 발병기전은 보편적으로 산화적 스트레스와 신경염증 이 두 과정을 동반하기 때문에 이 두 가지를 겸비한 약물은 단일 항산화제 혹은 항염제 치료제보다 더 효과적일 수 있다는 측면에서 궁천피 추출물은 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료제, 기능 개선제로서의 강점을 가진다고 볼 수 있다.

미세신경교세포는 LPS⁶⁾, glutamate¹⁷⁾, thrombin¹⁸⁾, ganglioside¹⁹⁾, beta amyloid²⁰⁾와 같은 여러 가지 내인성, 외인성 자극물질에 의해 활성화된다고 알려져 있다. LPS는 그람 음성 세균의 세포벽을 구성하는 독성 물질로서 미세신경교세포의 강력한 자극물질이다. LPS에 의한 미세신경교세포의 활성화가 신경염증과 퇴행성뇌질환에서는 실제로 흔하고 보편적이지는 않지만 가장 강력한 자극을 유발시킬 수 있고 가장 많은 문헌정보를 참조할 수 있어서 실험적으로는 가장 많이 사용되는 신경염증 모델이다. BV-2 미세신경교세포의 활성화 기전과 생화학적 특성은 일차 세포(primary microglia)의 특성과 크게 다르지 않다는 연구결과가 저자의 실험실을 포함하여 상당히 언급이 되어 있어^{6, 17, 19)}, BV-2 미세신경교세포를 이용한 신경염증모델은 비록 일차 세포배양에서 이루어지지는 않았지만 충분히 유용한 정보를 줄 것으로 사료된다.

이러한 신경염증 기전 외에, 뇌졸중을 비롯하여 노화, 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병, 루게릭병 등 퇴행성 뇌질환에서 동반되는 신경세포 손상 및 사멸기전의 또 하나의 공통적이고 주요한

Figure 3. 신경세포의 산화적 손상모델에서의 궁천피 추출물의 활성산소종 소거 작용.



(A) HT-22 신경세포주를 2 x 10⁴ 농도로 96-well 세포배양기에 분주하여 배양하였다. 24시간 안정화 시킨 후 궁천피 추출물 C-80E를 농도별로 처리하여 30분간 반응시키고 다음 산화적 손상을 유도하기 위해 H₂O₂를 1 mM 농도로 30분 처리하여 ROS를 발생시킨 후 50 µM 농도의 DCF-DA를 30분 반응시켜 산화된 DCF-DA의 형광 강도를 그 흥분/방출 파장 (485nm/535nm)에서 microplate reader를 이용하여 분석하였다. ROS 소거작용의 측정치(%)는 약물 처리 없이 H₂O₂만을 처리했을 때의 형광 강도를 기준으로 계산식에 의해 구한다 ('실험재료 및 방법' 참조). (B) DCF-DA 측정법처럼 세포 안에서의 ROS 소거작용을 측정하는 방법과는 달리 시험관 수준에서 C-80E 자체의 프리라디칼 제거기능을 알아보기 위하여 DPPH assay를 시행하였다. 궁천피 추출물 10 µg와 DPPH (150 µM) 190 µl를 1 시간 반응시켜 DPPH의 색깔 변화를 유도하고 이를 microplate reader를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 프리라디칼 소거작용의 측정치(%)는 약물 처리 없이 DPPH만을 처리했을 때의 흡광도를 기준으로 계산식에 의해 구한다 ('실험재료 및 방법' 참조). *P<0.05 or **P<0.001.

기전이 산화적 손상이다. 프리라디칼들은 전자쌍을 이루지 못해 매우 불안정한 높은 에너지전위를 가지고 있어 전자를 가져올 수 있는 물질들을 공격하여 세포의 지질막, 단백질, DNA 등의 파괴를 가져올 수 있어 암, 죽상경화증, 염증, 퇴행성 뇌질환, 노화 등 많은 질병의 병인기전에 관여하고 있다. 일반적으로 산화적 스트레스라 하면 ROS의 생성과 소멸의 생리적인 균형이 왜곡되어 세포의 손상을 초래할 때를 이른다. 과도하게 ROS가 생성시키는 병적 상황 및 ROS를 소멸시키는 항산화 기작(기전)에 결함이 오게 되면 산화적 손상과 관련된 질병들이 유발되게 된다.

본 논문에서는 궁천피 추출물이 물질 자체적으로 프리라디칼 소거기능이 있는 것을 DPPH assay로 밝혔고(Fig. 3-B), H₂O₂에 의한 HT-22 신경세포의 산화적 손상 모델에서 궁천피 추출물에 의해 세포내 ROS의 발현양이 감소되었음을 DCF-DA 측정법으로 확인하였다(Fig. 3-A). DPPH assay 결과에 미루어 볼 때, DCF-DA 측정법의 ROS의 발현양 감소는 신경세포내에서의 궁천피 추출물에 의한 프리라디칼 소거기능에 의한 것으로 사료된다. 이러한 프리라디칼 소거기전 외에도, 신경세포의 산화적 손상기전에 관여할 것으로 생각되는 인자에는 미토콘드리아의 전자전달계 기능, 세포내 과산화수소 분해효소(catalase)와 superoxide dysmutase (SOD), glutathione, glutathione peroxidase (GSH)와 같은 항산화효소의 활성 등이 관여하지만 본 논문의 실험결과로는 궁천피 추출물의 프리라디칼 소거기전에 의한 항산화효능에 대해서만 언급할 수 있다.

궁천피 추출물에는 탄저페틴, 노블레틴, 헤스페리딘, 나린진, 루틴 등 다양한 생리활성 물질들이 존재하는데 본 논문에서 제시한 항신경염증 및 항산화효능이 어떤 단일 화합물에서 오는지, 혹은 여러 단일 화합물들의 특수한 배합에서 오는 효과(synergy effect)인지는 차후 더 자세한 연구가 필요하다고 본다.

노인 인구가 급속도로 증가하고 이에 따라 퇴행성 뇌질환 치료제에 대한 수요와 의료시장은 확장되어 가지만, 아직까지 퇴행성 뇌질환에 대한 확실한 치료제는 개발되지 못한 실정이다. 이러한 현실을 감안할 때 신경세포의 손상 및 사멸을 유발시키고 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환의 발병 초기부터 진행과정에서 직접적으로 관여하는 신경염증 반응과 산화적 손상 반응을 제어할 수 있는 신약개발물질 탐색은 비록 뇌질환에 대한 질병특이성은 떨어지지만 효과적인 질병제어 기능에서 볼 때 매우 효과적인 치료제 개발 전략이 될 수 있을 것이다. 따라서 미세신경교세포에서의 항신경염증 효능과 신경세포에서의 산화적 손상을 경감시킬 수 있는 생리활성이 있는 천연물 탐색은 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환의 신약개발연구의 한 축으로서 매우 전망이 높은 분야가 될 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* 2001;21:2580-8.
- 2) McGeer EG, McGeer PL. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:741-9.
- 3) Kim YS, Joh TH. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Mol Med* 2006;38:333-47.
- 4) Breitner JC, Gau BA, Welsh KA, Plassman BL, McDonald WM, Helms MJ, et al Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study. *Neurology* 1994;44:227-32.
- 5) Combs CK, Johnson DE, Karlo JC, Cannady SB, Landreth GE. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J Neurosci* 2000;20:558-67.
- 6) Ock J, Kim S, Yi KY, Kim NJ, Han HS, Cho JY, et al A novel anti-neuroinflammatory pyridylimidazole compound KR-31360. *Biochem Pharmacol* 2010;79:596-609.
- 7) Jin DQ, Lim CS, Hwang JK, Ha I, Han JS. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of macelignan in murine hippocampal cell line and primary culture of rat microglial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:1264-9.
- 8) Chen CJ, Raung SL, Liao SL, Chen SY. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by baicalein in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. *Biochem Pharmacol* 2004;67:957-65.
- 9) Moon DO, Park SY, Lee KJ, Heo MS, Kim KC, Kim MO, et al Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Int Immunopharmacol* 2007;7:1092-101.
- 10) Oh YT, Lee JY, Lee J, Kim H, Yoon KS, Choe W, et al Oleic acid reduces lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 in BV2 murine microglial cells: possible involvement of reactive oxygen species, p38 MAPK, and IKK/NF-kappaB signaling pathways. *Neurosci Lett* 2009;464:93-7.
- 11) Gibson GE, Huang HM. Oxidative processes in the brain and non-neuronal tissues as biomarkers of Alzheimer's disease. *Front Biosci* 2002;7:d1007-15.
- 12) Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 2002;23:795-807.
- 13) Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47.
- 14) Choi SY, Ko HC, Ko Sy, Hwang JH, Park JG, Kang SH, et al Correlation between flavonoid content and the NO

- production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Bio Pharm Bull* 2007;30:772-8.
- 15) Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 1990;27:229-37.
- 16) Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Blasi E, Sick P, Kettenmann H. An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J Neurosci Res* 1992;31:616-21.
- 17) Eun SY, Hong YH, Kim EH, Jeon H, Suh YH, Lee JE, et al. Glutamate receptor-mediated regulation of c-fos expression in cultured microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:320-7.
- 18) Choi SH, Joe EH, Kim SU, Jin BK. Thrombin-induced microglial activation produces degeneration of nigral dopaminergic neurons in vivo. *J Neurosci* 2003;5877-86.
- 19) Min KJ, Pyo HK, Yang MS, Ji KA, Jou I, Joe EH. Gangliosides activate microglia via protein kinase C and NADPH oxidase. *Glia* 2004; 48: 197-206.
- 20) Coombs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. Beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2001;21:1179-88.