



금은화에서 분리한 Kaempferol-3-O-glucoside의 글루타메이트로 유도시킨 산화적 스트레스에 대한 HT22 신경세포 보호활성

마충제^{1,2*}

Kaempferol-3-O-glucoside Isolated from *Lonicera japonica* Protects Neuronal HT22 Cells against Glutamate-Induced Oxidative Stress

Choong Je Ma^{1,2*}

ABSTRACT

Received: 2022 April 18

1st Revised: 2022 May 9

2nd Revised: 2022 June 27

3rd Revised: 2022 July 12

Accepted: 2022 July 12

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background: In this study, we aim to test the neuroprotective activity of kaempferol-3-O-glucoside in HT22 cells originating from mice hippocampus against glutamate induced oxidative stress and to elucidate the mechanisms of action of this neuroprotective activity.

Methods and Results: Pretreatment of HT22 cells with kaempferol-3-O-glucoside increased cell viability after exposure to glutamate induced oxidative stress. Kaempferol-3-O-glucoside decreased reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺ concentration, which increased with glutamate induced oxidative stress. Moreover, kaempferol-3-O-glucoside maintained the mitochondrial membrane potential at control levels, increased glutathione reductase and glutathione peroxidase levels, and synthesized high levels of the endogenous antioxidant glutathione.

Conclusions: Overall, these results suggest that kaempferol-3-O-glucoside isolated from *Lonicera japonica* exerted a potent neuroprotective activity in glutamate injured HT22 cells through the anti-oxidative pathway and can be potentially used for the treatment or prevention of Alzheimer's disease.

Key Words: *Lonicera japonica*, Alzheimer's Disease, Antioxidant, Kaempferol-3-O-glucoside, Neuroprotection



서 언

전 세계적으로 인간의 평균 수명이 의학 기술의 발달과 과학의 발전으로 인하여 크게 늘어나고 있어서 우리는 급격한 인구 통계학적인 변화를 겪고 있다. 2017년에 대략 10억 명으로 추정되던 60 세 이상의 인구는 2050년이 되면 두 배가 될 것이라고 평가되고 있다 (WHO, 2021). 이러한 노령 인구 증가의 결과로 인하여 1990년에서 2016년 사이에 치매 환자의 수는 두 배가 되었고, 그 수는 4,400만 명에 이르렀으며 현재에는 치매 환자의 수는 약 5,500만 명에 이르며 해마다 1,000만 명의 새로운 환자들이 발생하고 있어 2050년에는 세

배가 될 것이라고 예측되고 있다 (Fiest *et al.*, 2016; GBD 2016 Dementia Collaborators, 2019; WHO, 2021).

치매는 물리적, 심리적, 사회적 및 경제적으로 충격을 주기 때문에 환자 자신 뿐 아니라 환자를 돌보는 가족들과 사회 전체적으로 고통을 주는 사회적으로 매우 심각한 문제가 되고 있지만, 치료제의 개발은 별로 이루어지지 않았고, 개발된 치료제는 근원적인 치매의 치료를 할 수 있는 것이 아니라 증상의 완화나 경감을 통하여 치매의 진행을 늦추어 주는 정도에 불과한 실정이다 (Aisen *et al.*, 2011; Folch *et al.*, 2016). 이러한 이유로 치매를 근본적으로 치료할 수 있는 치료제의 개발은 현 시점에서 매우 시급한 문제가 되고 있다.

*Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6565 (E-mail) cjma@kangwon.ac.kr

¹강원대학교 생물의소재공학과 교수 / Professor, Department of Medical Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

²강원대학교 의생명과학연구소 연구원 / Reseracher, Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

치매를 유발하는 원인으로는 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 퇴행 및 파킨슨병 등과 같이 매우 다양한 것이 알려져 있지만, 알츠하이머성 치매가 치매 중에서 가장 많은 부분을 차지하고 있으며, 그 증상으로는 기억력을 포함한 인지 기능 저하, 성격의 변화, 우울증, 망상이나 환각, 공격성 증가 및 수면 장애 등과 같은 정신적인 증상이 있고 더 나아가 신경학적 장애로 인하여 신체적인 손상도 나타날 수 있다 (Hampel *et al.*, 2018; Lane *et al.*, 2018).

알츠하이머병의 발병 원인은 명확하게 밝혀져 있지 않지만 β -amyloid plaque, 신경섬유의 뭉침, 뇌의 신경 연결 손상 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있고, 이외에도 산화적인 스트레스나 신경 염증반응 등으로 인한 신경세포의 사멸과도 관련이 높은 것으로 알려져 있다 (Seidler and Squire, 2005; Kuhla *et al.*, 2007; Sultana and Butterfeld, 2010; Srivastava *et al.*, 2011).

특히, glutamate는 체내에 존재하는 흥분성 신경전달 물질로서 대뇌가 발달하는 과정에 있어서 필수적으로 수반되는 신경세포의 분화과정과 신경세포의 사멸을 막아주는 중요한 역할을 한다 (Lin and Beal, 2006). 그러나 세포 내에 고농도의 glutamate가 존재하면 glutamate는 독성물질로 작용하여 신경세포가 손상되거나 사멸하게 되는데 이러한 신경세포의 손상은 산화적 스트레스와 흥분성 신경독성에 의한 것으로 보고되어 있다 (Kim *et al.*, 2017).

신경세포의 손상이나 사멸은 glutamate에 의하여 증가하게 되는 활성산소종으로부터 영향을 받아 나타나게 되는데 활성산소종의 증가는 세포 내에 Ca^{2+} 의 농도의 증가를 수반하게 된다. 세포 내 Ca^{2+} 의 증가는 다양한 효소의 활성을 증가시키게 되고 대표적으로 산화질소 생성효소의 활성을 증가시켜 세포내 산화질소의 생성을 촉진시킨다. 이는 세포 내에 독성을 나타내어 신경세포의 손상 및 사멸을 유도하게 된다. 또한, 고농도의 glutamate는 산화적인 스트레스를 유발하게 되는데 인체에서 항산화물질로 작용하는 glutathione의 생성과 관련한 glutathione peroxidase와 glutathione reductase의 활성을 억제하여 결과적으로 총 glutathione의 생성량을 감소시킴으로써 산화적인 스트레스를 극복하지 못하고 신경세포의 손상이나 사멸을 야기한다고 알려져 있다 (Helmut, 1999; Carrano *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2013).

이러한 다양한 원인으로 신경세포가 사멸하게 되면 뇌와 같은 신경계 기관의 손상으로 이어져 결과적으로 인간에게 알츠하이머, 파킨슨병 등과 같은 퇴행성 뇌신경 질환을 야기하게 된다. 그러므로, 뇌신경 세포를 보호하는 물질은 퇴행성 뇌신경계 질환 치료제 개발의 주요한 타겟이 될 수 있다.

최근 뇌신경계 질환 치료제 개발을 위한 소재 탐색을 위하여 정상 수준을 넘어서는 고농도의 glutamate를 투여하여 흥분성 신경독성 및 산화적 스트레스를 유발하고 이들 신경세포

를 활성 검색계로 사멸에 대한 보호 효과를 나타내는 다양한 약리적 성분을 약용식물에서 찾고자 하는 노력이 진행되고 있다 (Elufioye *et al.*, 2017).

이전 연구를 통하여금은화 (*Lonicera japonica*)의 총 메탄올 추출물이 유의성 있는 일차 배양한 대뇌 피질세포에서 강력한 신경세포 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었다 (Weon *et al.*, 2011a). 활성물질을 규명하기 위하여금은화 총 메탄올 추출물로부터 수종의 화합물을 분리·정제하였고, 일차 배양한 대뇌 피질 신경세포에서 분리한 화합물의 신경세포 보호활성을 평가하여 분리한 물질 중 4종의 물질이 신경세포 보호활성을 나타냄을 확인하였다. 이들 화합물은 각각 luteolin, lonicerin, caffeic acid, kaempferol-3-O-glucoside이었다.금은화 메탄올 추출물 중 kaempferol-3-O-glucoside의 함량은 0.086%였고, 일차 배양한 대뇌피질 세포에서의 신경세포 보호활성은 100 mM의 농도에서 25.1%의 보호활성으로 나타내어 4종의 화합물 중 가장 낮은 편이었다 (Weon *et al.*, 2011b). 또한,금은화에서 분리된 luteolin, lonicerin, caffeic acid의 신경세포 보호에 관한 약리학적 작용기전을 보고한 바 있다 (Son and Ma, 2020; Lee and Ma, 2021; Kim and Ma, 2022).

본 연구에서는 신경세포 보호활성을 나타낸금은화 유래 화합물의 신경세포 보호활성 작용기전을 규명하는 연구의 일환으로서 마우스에서 유래한 해마 신경세포인 HT22 세포에서 kaempferol-3-O-glucoside의 신경세포 보호활성을 다시 한번 검증하고자 하였고, 신경세포 보호활성의 약리학적 작용기전을 규명하고자 하였다.

이를 위하여 glutamate로 신경독성을 유발한 HT22 세포를 활성 검색계로 하여 신경세포의 사멸과 관련된 바이오 마커의 변화를 평가하여 kaempferol-3-O-glucoside의 약리 작용기전을 규명하는 연구를 수행하였으며 이를 통하여 kaempferol-3-O-glucoside의 알츠하이머병의 치료 및 예방에 적용될 수 있는지에 대한 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS)은 Gibco (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였고, glutamic acid, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution, trolox, nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), glutathione disulfide reductase (GSSG-R), GSSG oxidase, L-glutathione reduced (GSH), 2,7-dichlorofluorecin diacetate (DCF-DA), Fura-2AM, rhodamine 123, triton X-100, penicillin과 streptomycin은 Sigma-Aldrich

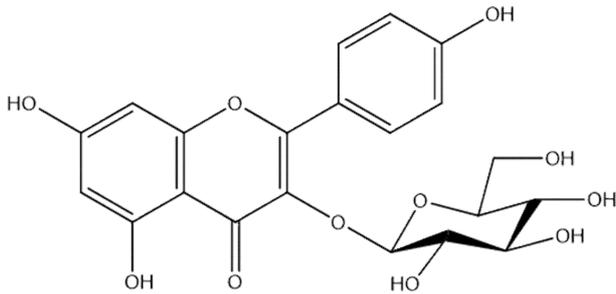


Fig. 1. Structure of kaempferol-3-O-glucoside isolated from *L. japonica*.

(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 대정화학(주) (시흥, 경기, 한국)에서 구입하여 사용하였다. kaempferol-3-O-glucoside은 기존에 분리하고 구조 동정한 화합물을 사용하였다 (Qi *et al.*, 2009; Weon *et al.*, 2011A Fig. 1).

2. HT22 세포 배양

마우스 해마 유래 세포주인 HT22 세포의 세포 배양은 기존에 발표했던 Jung 등 (2018)의 방법을 수정하여 수행하였다.

HT22 세포는 10%의 FBS와 1%의 penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂로 자동 조절되는 CO₂ incubator (BB 15 CO₂ incubator, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 배양하였다. 활성평가를 위하여 시료나 독성물질을 처리하기 전까지 세포가 최적의 조건으로 배양될 수 있도록 2 일 - 3 일 마다 한 번씩 계대 배양하였다.

3. 뇌신경세포 보호 활성 측정

뇌신경세포 보호 활성은 기존의 Kim과 Ma (2022)의 방법을 수정하여 진행하였다. Glutamate에 의하여 산화적 스트레스를 가한 후 살아남은 세포의 생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다.

배양된 HT22 세포를 48 well plate에 1.7 × 10⁴ cell/well의 농도로 seeding 하고 37°C, 5%의 CO₂의 조건으로 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 배양 후 control 그룹과 glutamate 투여 그룹에는 DMEM 배지만 30 μl를 처리하고, 시료 투여 군에는 농도를 달리한 kaempferol-3-O-glucoside를 각각 1 μM, 10 μM, 100 μM 농도로 하여 투여하였으며, 양성 대조군으로는 50 μM의 trolox를 투여한 그룹을 사용하였다.

투여한 지 한 시간이 지난 후 control 그룹을 제외한 나머지 그룹에 3 mM의 glutamate를 30 μl 수준으로 투여하였다. Glutamate의 농도는 신경세포가 40% 정도 사멸하였을 때의 농도로 결정하였다. Glutamate 투여 후 23 시간 동안 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 23 시간 동안 배양한 후 모

든 well에 150 μl의 MTT solution (1 mg/ml in phosphate buffered saline)을 가하였다. 37°C에서 3 시간이 지난 후 각 well에 남아 있는 DMEM 배지를 모두 제거하고 DMSO 300 μl를 처리하였다.

빛을 차단한 상태에서 30 분간 두어 살아있는 세포를 표지하여 생성된 formazan crystal을 충분히 녹여주었다. 다 녹인 formazan solution을 96 well plate에 100 μl씩 분주하고 microplate reader (BioTek EL808, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 같은 조건에서 3 회 반복하였다.

4. 세포 내 ROS 측정

HT22 세포에 존재하는 free radical과 같은 활성 산소종의 양은 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 사용한 Goodman과 Mattson (1994)의 방법으로 측정하였다.

세포 생존율 측정 실험에서와 같이 control 그룹과 glutamate 투여 그룹에는 DMEM 배지만 투여하고, 양성 대조군과 시료 투여군에는 각각 trolox (50 μM) 및 kaempferol-3-O-glucoside (1 μM, 10 μM, 100 μM)를 처리하였다.

1 시간이 지난 후 control 그룹을 제외한 모든 그룹에 3 mM의 glutamate를 처리하였다. 8 시간 배양 후 100 μM의 DCF-DA를 40 μl 수준으로 첨가하고 1 시간 동안 반응시켰다. 1 시간 반응 후 배지를 제거하였고 PBS로 3 회 세척한 후 1.0%의 triton X-100으로 세포를 37°C에서 15 분간 녹여 내었다. 녹여낸 용액을 96 well plate에 옮겨 담고 microplate reader (BioTek EL808, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 형광도를 측정하였다. 형광도는 490 nm에서 exciting 시킨 후 525 nm에서 emission light를 측정하였으며 같은 조건에서 3 회 반복하여 실시하였다.

5. 세포 내 Ca²⁺ 농도 측정

HT22 세포에 존재하는 세포내 Ca²⁺의 농도는 Ca²⁺에 민감하게 반응하는 형광물질인 Fura-2AM을 사용하여 측정하였다. 세포 생존율 측정 실험에서와 같이 control 그룹과 glutamate 투여 그룹에는 DMEM 배지만 투여하고, 양성 대조군과 시료 투여군에는 각각 trolox (50 μM) 및 kaempferol-3-O-glucoside (1 μM, 10 μM, 100 μM)를 처리하였다.

1 시간이 지난 후 control 그룹을 제외한 모든 그룹에 3 mM의 glutamate를 처리하였다. 1 시간 배양 후 배양한 HT22 세포에 20 μM의 Fura-2AM 10 μl를 투여한 후 1 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서의 CO₂ 배양기에서 반응시켰다. 1 시간 반응 후 배지를 제거하였고 PBS로 3 회 세척한 후 1.0%의 triton X-100으로 세포를 37°C에서 15 분간 녹여 내었다. 녹여낸 용액을 96 well plate에 옮겨 담고 microplate reader (BioTek EL808, BioTek Instruments, Winooski, VT,

USA)를 사용하여 형광도를 측정하였다. 형광도는 340/380 nm에서 exciting 시킨 후 510 nm에서 emission light를 측정하였으며 같은 조건에서 3 회 반복하여 실시하였다.

6. 미토콘드리아 막전위 손상 억제 효과 측정

HT22 세포에서 미토콘드리아 막전위 손상 정도를 평가하기 위하여 rhodamine 123이라고 하는 형광물질을 사용하여 측정하였다.

Control 그룹과 glutamate 투여 그룹에는 DMEM 배지만 투여하고, 양성 대조군과 시료 투여군에는 각각 trolox (50 μ M) 및 kaempferol-3-O-glucoside (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M)를 처리하였다. 1 시간이 지난 후 control 그룹을 제외한 모든 그룹에 3 mM의 glutamate를 처리하였다. 1 시간 배양 후, 배양한 HT22 세포에 10 μ l의 20 μ M rhodamine 123을 투여한 후 30 분간 37°C, 5% CO₂ 조건에서의 CO₂ 배양기에서 반응시켰다. 30 분 반응시킨 후 배지를 제거하였고 PBS로 3 회 세척한 후 1.0%의 triton X-100으로 세포를 37°C에서 15 분간 녹여 내었다.

녹여낸 용액을 96 well plate에 옮겨 담고 microplate reader (BioTek EL808, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 형광도를 측정하였다. 형광도는 488 nm에서 exciting 시킨 후 525 nm에서 emission light를 측정하였으며 같은 조건에서 3 회 반복하여 실시하였다.

7. 글루타치온 총 함량 및 항산화 효소 활성 측정

배양된 HT22 세포를 6 well plate에 2.0×10^4 cell/well의 농도로 seeding하고 37°C, 5%의 CO₂의 조건으로 24 시간 동안 배양하였다.

Control 그룹과 glutamate 투여 그룹에는 DMEM 배지만 투여하고, 양성 대조군과 시료 투여군에는 각각 trolox (50 μ M) 및 kaempferol-3-O-glucoside (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M)를 처리하였다. 1 시간이 지난 후 control 그룹을 제외한 모든 그룹에 3 mM의 glutamate를 처리하였다. 24 시간 배양 후 배지를 제거하고 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4)로 2 회 세척한 후 sulfosalicylic acid로 단백질을 추출하였다. 세포는 $3,000 \times g$, 4°C 조건으로 30 분간 원심분리를 한 후 상층액을 수집하여 항산화 효소와 glutathione의 양을 측정하였다.

Glutathione 총 함량은 환원형 GSH와 DTNB의 반응에 근거하여 측정하였는데, 세포 상층액 또는 glutathione 표준품을 5 unit/ml glutathione reductase 및 0.3 mM NADPH가 담긴 반응액에 첨가하였고 0.5 mM DTNB를 첨가하여 37°C에서 30 초 동안 반응시킨 다음 microplate reader (BioTek EL808, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glutathione의 양은 표준품 glutathione의 표준치를 기준으로 하여 결정하였다.

Glutathione reductase는 NADPH를 포함한 glutathione의 환원반응에 의하여 결정하였다. 세포 상층액에 1 mM glutathione과 0.1 mM NADPH를 포함한 phosphate buffer를 반응시켰다. 반응시킨 후 바로 340 nm에서 15 초 간격으로 15 분간 형광을 측정하였다. Glutathione peroxidase의 활성은 GSH가 GSSG로 산화되는 정도를 평가하여 측정하였다. 세포 상층액과 0.4 mM NADPH, 0.2 mM H₂O₂, 1 mM 환원형 glutathione을 섞은 후 1 unit/ml의 glutathione reductase를 반응시켰다. 반응시킨 후 340 nm에서 형광을 측정하였다.

8. 통계 분석

통계 분석은 Excel (Microsoft, Los Angeles, CA, USA) 프로그램으로 One-way ANOVA test를 하였고, 3 반복으로 측정된 결과 값을 평균치 \pm 표준오차 (means \pm SE)로 나타내었다. 대조군에 대한 통계적 유의성을 5%, 1%, 0.1%에서 검증하였다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

결과 및 고찰

1. 금은화에서 분리한 Kaempferol-3-O-glucoside의 HT22 신경세포 보호효과

금은화 (*Lonicera japonica*)에서 분리한 kaempferol-3-O-glucoside이 어떠한 약리학적 작용기전을 통하여 신경세포 보호 활성을 나타내는지 확인하고자 하였다. 먼저 이러한 kaempferol-3-O-glucoside이 마우스 유래 해마 세포주인 HT22 세포에서도 신경세포 보호활성을 나타내는지 확인하기 위하여 glutamate로 산화적 스트레스를 유발한 HT22 세포를 활성검색제로 하여 신경세포 보호활성 평가 실험을 수행하였다.

Oxytosis는 미토콘드리아 기능 장애와 산화적 스트레스의 증가와 관련된 non-apoptotic 형태의 세포 사멸이다 (Dolga *et al.*, 2013; Neitemeier *et al.*, 2016). Oxytosis라는 용어는 신경세포의 세포 사멸과 관련된 연구 결과에 기초하여 처음 도입되었으며, 세포 내 또는 미토콘드리아에 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 축적되는 특징이 있다 (Tan *et al.*, 2001). 이러한 것이 원인이 되어 뇌의 손상 또는 퇴행으로 진행된다는 여러 증거들이 제시되고 있다. Oxytosis에 의한 신경세포의 사멸은 알츠하이머 병과 같은 인간의 노화와 관련한 퇴행성 신경계 질환과 매우 깊은 연관이 있는 것으로 확인되었으며, oxytosis에 의한 세포의 사멸은 cysteine/glutamate antiporter system을 억제하는 glutamate의 투여에 의하여 개시된다고 알려져 있다 (Reuther *et al.*, 2014).

과도한 양의 glutamate는 cysteine/glutamate antiporter system을 차단하여 cysteine의 유입을 방해하게 되어 연속적으로 항산화 물질의 생성 및 항산화 효소의 활성을 낮추어 산화적인 스트레스를 강하게 한 결과 신경세포를 사멸하게 만든다

(Maher, 2005).

Kaempferol-3-O-glucoside를 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M의 농도로 투여한 후 1 시간 뒤에 3 mM의 glutamate를 처리하였고 24 시간 뒤에 MTT assay를 통하여 세포의 생존율을 평가하였다. Kaempferol-3-O-glucoside를 투여한 실험군에서 농도의존적으로 유의성 있는 신경세포 보호활성을 나타내었다 (Fig. 2).

2. Kaempferol-3-O-glucoside가 ROS의 생성에 미치는 영향

Kaempferol-3-O-glucoside의 신경세포 보호활성 작용기전을 확인하기 위하여 항산화 활성과 관련한 다양한 바이오 마커의 변화를 평가하는 실험을 진행하였다. 항산화와 관련한 바이오 마커로서 세포 내 ROS, Ca²⁺ 농도, 미토콘드리아 막전위의 손상 억제 및 glutathione 총 함량과 glutathione reductase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소의 활성 등을 평가하였다.

세포 수준에서 glutamate의 농도가 증가하면 세포 내 ROS가 다량 축적되어 세포 내 활성산소종이 증가하여 심각한 신경독성이 발생하게 되고 이로 인하여 신경세포의 사멸이 증가하게 된다 (Nicholls and Budd, 2000).

Kaempferol-3-O-glucoside이 고농도의 glutamate에 의한 신경세포의 사멸에 미치는 영향 중 ROS의 생성량에 미치는 영향을 확인하기 위하여 형광 시약 DCF-DA를 사용하였다. Kaempferol-3-O-glucoside를 투여하고 1 시간 후 3 mM glutamate를 투여한 후 ROS의 생성량을 측정하였다. Kaempferol-3-O-glucoside는 glutamate에 의하여 증가한 ROS의 생성을 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시킴을 확인할 수 있었다.

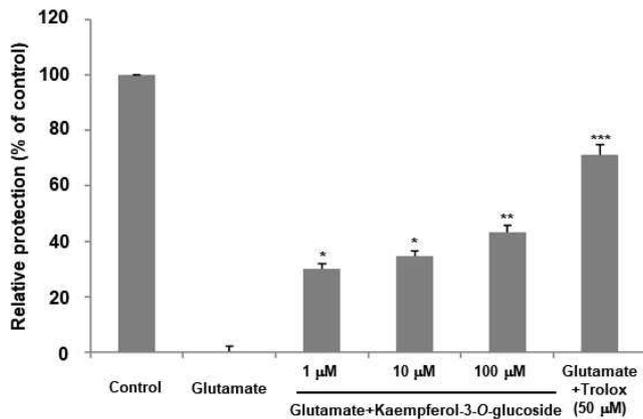


Fig. 2. Effect of kaempferol-3-O-glucoside (1, 10 and 100 μ M) on glutamate-induced death of HT22 cells. Data expressed as means \pm the standard error of the mean. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 versus the glutamate-treated group. The data was analyzed by One-way ANOVA using Excel software of Microsoft.

Glutamate 투여에 의하여 ROS의 생성은 대조군에 비하여 153.2%로 증가하였고, kaempferol-3-O-glucoside를 1 mM, 10 mM, 100 mM 농도로 투여하였을 때 ROS의 생성이 대조군에 비하여 각각 132.8%, 121.5%, 112.8%로 증가하여 glutamate 투여군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 3).

3. Kaempferol-3-O-glucoside가 세포 내 Ca²⁺의 농도에 미치는 영향

장기간의 세포 외 glutamate의 농도 증가는 Ca²⁺의 증가로 이어져 신경 세포의 괴사 및 apoptotic 신경 세포 사멸을 초래한다고 알려져 있다 (Tan *et al.*, 1998). 산화 물질과 항산화 물질의 적절한 균형과 이온의 항상성은 행동을 조절하기 위한 적합한 뇌기능을 형성하기 위하여 필수적이다 (Khatri *et al.*, 2018). 많은 연구 결과들을 종합하여 보면 세포 내 Ca²⁺의 농도가 증가가 ROS의 생성 및 축적으로 이어짐을 확인할 수 있다 (Ishige *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2018).

Kaempferol-3-O-glucoside가 glutamate로 산화적 스트레스를 유발한 HT22 세포에서 세포 내 Ca²⁺ 이온의 농도에 어떠한 영향을 주는지를 확인하기 위하여 Ca²⁺에 민감하게 반응하는 형광염료인 Fura-2AM을 사용하였다.

Kaempferol-3-O-glucoside를 투여하고 1 시간 후 3 mM glutamate를 투여한 후 Ca²⁺의 농도를 측정하였다. Kaempferol-3-O-glucoside는 glutamate에 의하여 증가한 세포내 Ca²⁺의 농도를 투여 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시킴을 확인할 수 있었다. Glutamate 투여에 의하여 세포 내 Ca²⁺은 대조군에 비하여 159.2%로 증가하였고, kaempferol-3-O-glucoside를 1 mM, 10 mM, 100 mM 농도로 투여하였을 때 대조군에 비하여 각각 128.2%, 125.6%, 108.4% 만큼 증가하여

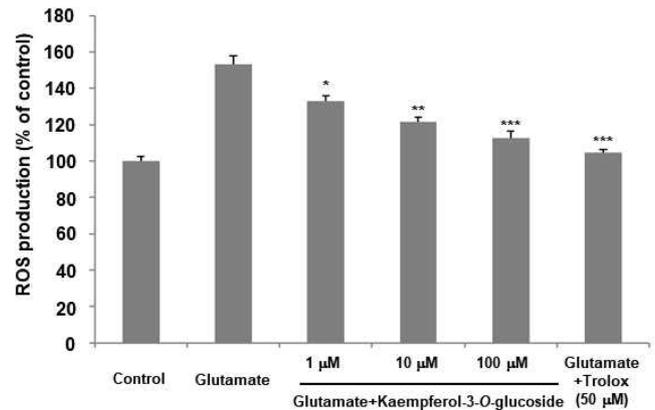


Fig. 3. Effect of kaempferol-3-O-glucoside (1, 10 and 100 μ M) on reactive oxygen species production in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as means \pm the standard error of the mean. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 versus the glutamate-treated group. The data was analyzed by One-way ANOVA using Excel software of Microsoft.

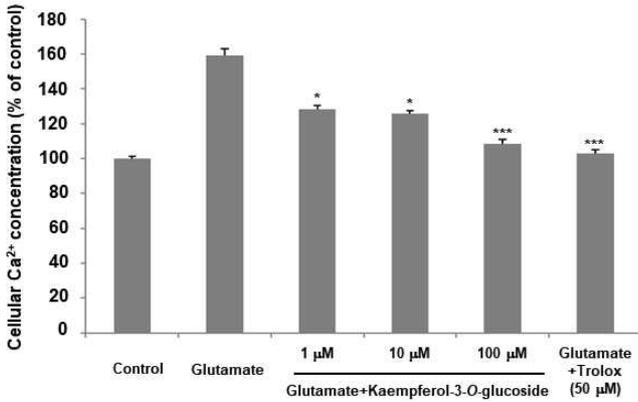


Fig. 4. Effect of kaempferol-3-O-glucoside (1, 10 and 100 mM) on calcium ion influx in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as means \pm the standard error of the mean. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group. The data was analyzed by One-way ANOVA using Excel software of Microsoft.

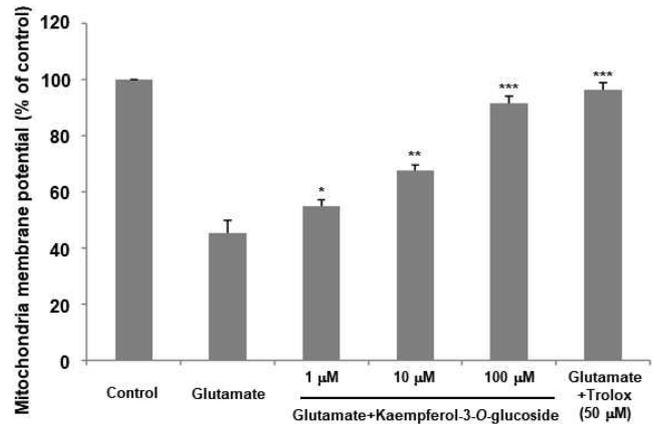


Fig. 5. Effect of kaempferol-3-O-glucoside (1, 10 and 100 mM) on glutamate-induced disruption of mitochondrial membrane potential in HT22 cells. Data expressed as means \pm the standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group. The data was analyzed by One-way ANOVA using Excel software of Microsoft.

glutamate 투여군에 비하여 유의성 있는 감소를 보였다 (Fig. 4).

4. Kaempferol-3-O-glucoside가 미토콘드리아의 막 전위에 미치는 영향

Glutamate에 의하여 매개되는 산화적 스트레스의 메커니즘은 HT22 세포에서 광범위하게 연구되어 있다. 독성을 유발할 수 있는 고농도의 glutamate는 신호전달 체계를 거쳐서 신경 세포의 사멸을 유발하게 되는데 이는 미토콘드리아의 손상을 수반한다고 알려져 있다. Oxytosis 과정 중에 미토콘드리아의 기능은 손상되는데 이는 미토콘드리아 막의 투과성을 높이고 cytochrome C를 세포질로 방출시켜 미토콘드리아의 막 전위를 감소시킨다고 알려져 있다 (Tobaben *et al.*, 2011; Sabogal-Guáqueta *et al.*, 2019).

Kaempferol-3-O-glucoside가 glutamate로 산화적 스트레스를 유발한 HT22 세포에서 미토콘드리아의 손상을 평가하기 위하여 형광염료 rhodamine 123을 사용하여 미토콘드리아의 막 전위를 측정하였다. Kaempferol-3-O-glucoside를 투여하고 1 시간 후 3 mM glutamate를 투여한 후 glutamate에 의하여 감소한 미토콘드리아의 막 전위를 측정하였다.

Kaempferol-3-O-glucoside는 glutamate에 의하여 감소한 미토콘드리아의 막전위를 농도 의존적으로 유의성 있게 회복시켜 주었다. Glutamate 투여에 의하여 미토콘드리아의 막전위는 대조군에 비하여 45.2%로 감소하였고, kaempferol-3-O-glucoside를 1 mM, 10 mM, 100 mM 농도로 투여하였을 때 대조군에 비하여 각각 54.9%, 67.5%, 91.4%로 감소하여 glutamate 투여군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다 (Fig. 5).

5. Kaempferol-3-O-glucoside가 glutathione의 생성량 및 glutathione reductase, glutathione peroxidase의 활성에 미치는 영향

Glutathione은 산화방지제로 잘 알려져 있으며 산화적 스트레스나 다른 형태의 스트레스에 저항할 수 있는 주요 방어작용을 하는 생체 내에서 생성되는 물질이다. 이는 주로 glutathione peroxidase나 S-transferase 효소들의 보조 인자로 작용하여 항산화활성을 나타낸다고 알려져 있다 (Dickinson and Forman, 2002; Ballatori *et al.*, 2009). Glutathione의 대사는 glutamate가 개별 단계에서 첨가되고 방출되는 glutathione cycle에 의해 조절되는데, glutamate의 농도가 증가하면 glutathione cycle이 정상적으로 작동하지 않아 glutathione의 생성이 감소하게 된다 (Forman *et al.*, 2009).

따라서, kaempferol-3-O-glucoside가 glutathione 및 그의 합성과 관련한 효소인 glutathione reductase 및 glutathione peroxidase의 활성에 미치는 영향을 평가하였다.

Kaempferol-3-O-glucoside를 투여하고 1 시간 후 3 mM glutamate를 투여한 후 glutamate에 의하여 감소한 총 glutathione의 양을 측정하였다. Kaempferol-3-O-glucoside는 glutamate에 의하여 감소한 총 glutathione의 양을 농도 의존적으로 유의성 있게 회복시켜 주었다. Glutamate 투여에 의하여 총 glutathione의 양은 대조군에 비하여 56.3%로 감소하였고, kaempferol-3-O-glucoside를 1 mM, 10 mM, 100 mM 농도로 투여하였을 때 대조군에 비하여 각각 58.1%, 65.8%, 71.2%로 감소하여 glutamate 투여군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다 (Fig. 6).

또한, glutamate 투여 시 glutathione reductase의 활성은

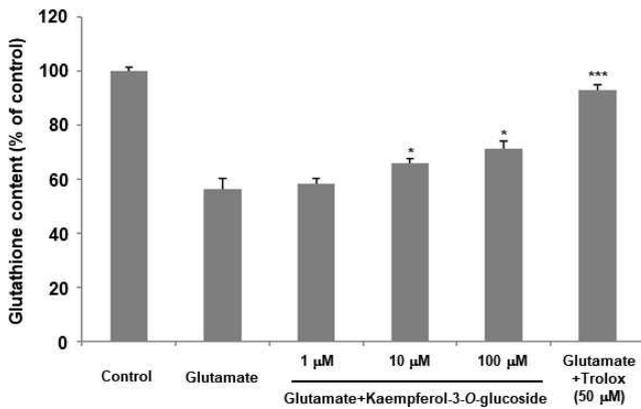


Fig. 6. Effect of kaempferol-3-O-glucoside (1, 10 and 100 mM) on glutathione level in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as means \pm the standard error of the mean. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group. The data was analyzed by One-way ANOVA using Excel software of Microsoft.

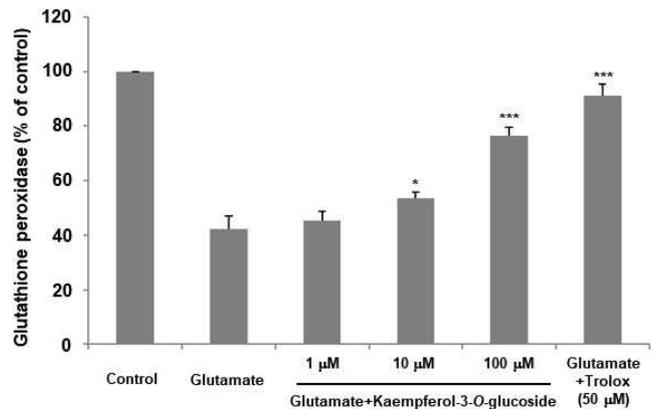


Fig. 8. Effect of kaempferol-3-O-glucoside (1, 10 and 100 mM) on glutathione peroxidase in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as means \pm the standard error of the mean. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group. The data was analyzed by One-way ANOVA using Excel software of Microsoft.

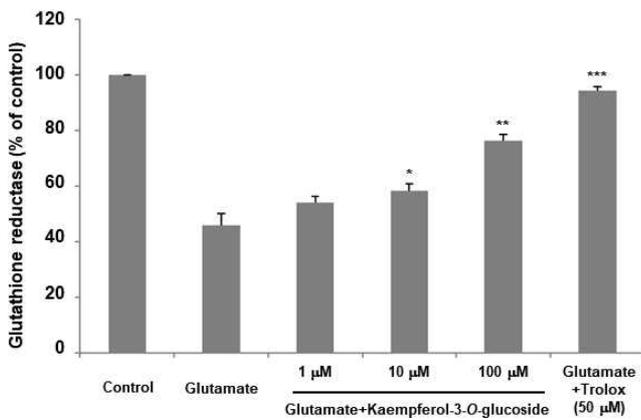


Fig. 7. Effect of kaempferol-3-O-glucoside (1, 10 and 100 mM) on glutathione reductase in glutamate injured HT22 cells. Data expressed as means \pm the standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the glutamate-treated group. The data was analyzed by One-way ANOVA using Excel software of Microsoft.

45.8%로 감소하였으나, kaempferol-3-O-glucoside의 처리에 의하여 100 mM의 농도에서 glutamate만 투여한 군에 비하여 glutathione reductase의 활성이 76.3%로 증가하였다 (Fig. 7). Kaempferol-3-O-glucoside은 glutathione peroxidase의 활성 또한 증가시켰는데 glutamate 투여 시 glutathione peroxidase의 활성은 42.1%로 감소하였으나, kaempferol-3-O-glucoside의 처리에 의하여 100 mM의 농도에서 glutamate만 투여한 군에 비하여 glutathione peroxidase의 활성이 76.3 %로 증가하였다 (Fig. 8).

Kaempferol-3-O-glucoside는 메꽃과 식물인 갯실새삼 (*Cuscuta chinensis*) 등과 같은 다양한 식물에 포함되어 있는 플라보

노이드 성분이다 (Riaz *et al.*, 2018). 생물학적인 활성을 나타내고 질병의 치료에도 효과적인 화합물인 kaempferol-3-O-glucoside는 astragalin이라고도 하며 항암, 항염증, 항산화, 신경세포 보호, 항당뇨, 심장보호, 항우울 등과 같은 광범위한 약리학적 특징을 나타낸다. 그리고 이에 대한 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 연구를 통하여 약학적인 특징과 활성 기전이 확인되고 있다 (Riaz *et al.*, 2018).

신경세포 보호 활성에 대한 kaempferol-3-O-glucoside 보호 작용도 기존에 일부 보고된 바가 있지만, 6-hydroxydopamine에 유도된 신경독성에 대한 신경세포 보호 활성이나 (Li *et al.*, 2016) ischemic brain injury로 인한 신경독성에 대하여 신경세포 보호 활성이 확인되었으나 (Yan and Zhou, 2012), HT22세포에서 glutamate에 의한 산화적인 스트레스에 대한 kaempferol-3-O-glucoside의 신경세포 보호 활성은 확인된 바 없다.

이상의 결과를 통하여 kaempferol-3-O-glucoside는 많은 종류의 식물에서 포함되어 있는 단순한 구조의 flavonoid로서 이 화합물의 신경세포 보호 활성과 작용기전을 연구한 결과 glutamate에 의한 산화적 스트레스에 의한 HT22 세포의 손상 및 사멸을 효과적으로 억제한다는 사실을 알게 되었고 이러한 신경세포 보호 활성은 kaempferol-3-O-glucoside이 가지고 있는 항산화 활성 기전을 통하여 나타남을 확인할 수 있었다.

세포 수준에서 실험한 결과를 바탕으로 kaempferol-3-O-glucoside은 종합적으로 알츠하이머병과 같은 퇴행성 뇌신경계 질환의 치료제 및 예방약으로 개발할 가능성이 있음을 시사하며 향후 동물 행동 실험을 통하여 기억력이나 인지능 개선 활성을 평가하고 활성을 검증해 볼 만한 가치가 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Aisen PS, Gauthier S, Ferris SH, Saugier D, Haine D, Garceau D, Duong A, Suhy J, Oh J, Lau WC and Sampalis J. (2011). Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease - a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study(the Alphase Study). Archives of Medical Science. 7:102-111.
- Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K and Hammon CL. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. Biological Chemistry. 390:191-214.
- Carrano A, Hoozemans JJM, van der Vies SM, Rozemuller AJM, van Horssen J and de Vries HE. (2011). Amyloid beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. Antioxidants and Redox Signaling. 15:1167-1178.
- Dickinson DA and Forman HJ. (2002). Glutathione in defense and signaling: Lessons from a small thiol. Annals of the New York Academy of Sciences. 973:488-504.
- Dolga AM, Netter MF, Perocchi F, Doti N, Meissner L, Tobaben S, Grohm J, Zischka H, Plesnila N, Decher N and Culmsee C. (2013). Mitochondrial small conductance SK2 channels prevent glutamate-induced oxytosis and mitochondrial dysfunction. Journal of Biological Chemistry. 288:10792-10804.
- Elufioye TO, Berida TI and Habtemariam S. (2017). Plants-derived neuroprotective agents: Cutting the cycle of cell death through multiple mechanisms. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine. 2017:3574012. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2017/3574012/> (cited by 2022 April 1).
- Fiest KM, Roberts JI, Maxwell CJ, Hogan DB, Smith EE, Frolkis AF, Cohen A, Kirk A, Pearson D, Pringsheim T, Venegas-Torres A and Jetté N. (2016). The prevalence and incidence of dementia due to Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. Canadian Journal of Neurological Science. 43:51-82.
- Folch J, Petrov D, Ettcheto M, Abad S, Sánchez-López E, Garcia ML, Olloquequi J, Beas-Zarate C, Auladell C and Camins A. (2016). Current research therapeutic strategies for Alzheimer's disease treatment. Neural Plasticity. 2016:8501693. <https://www.hindawi.com/journals/np/2016/8501693/> (cited by 2022 April 1).
- Forman HJ, Zhang H and Rinna A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Molecular Aspects of Medicine. 30:1-12.
- GBD 2016 Dementia Collaborators. (2019). Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: A systematic analysis for the global burden of disease study 2016. Lancet Neurology. 18:88-106.
- Goodman Y and Mattson MP. (1994). Selected forms of *b*-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid *b*-peptide-induced oxidative injury. Experimental Neurology. 128:1-12.
- Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavedo E, Snyder PJ and Khachaturian ZS. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. Brain. 141:1917-1933.
- Helmut S. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. Free Radical Biology and Medicine. 27:916-921.
- Ishige K, Schubert D and Sagara Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. Free Radical Biology and Medicine. 30:433-446.
- Jung YS, Weon JB, Yang WS, Ryu G and Ma CJ. (2018). Neuroprotective effects of Magnoliae Flos extract in mouse hippocampal neuronal cells. Scientific Reports. 8:9693. <https://www.nature.com/articles/s41598-018-28055-z> (cited by 2022 April 1).
- Khatri N, Thakur M, Pareek V, Kumar S, Sharma S and Datusalia AK. (2018). Oxidative stress: Major threat in traumatic brain injury. CNS and Neurological Disorders - Drug Targets. 17:689-695.
- Kim ES and Ma CJ. (2022). Neuroprotective activity of luteolin isolated from *Lonicera japonica*. Korean Journal of Pharmacognosy. 53:1-7.
- Kim MS, Seo JY, Oh JS, Jang YK, Lee CH and Kim JS. (2017). Neuroprotective effect of halophyte *Salicornia herbacea* L. is mediated by activation of heme oxygenase-1 in mouse hippocampal HT22 cells. Journal of Medicinal Food. 20:140-151.
- Kuhla B, Haase C, Flach K, Luth HJ, Arendt T and Münch G. (2007). Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation. Journal of Biological Chemistry. 282:6984-6991.
- Lane CA, Hardy J and Schott JM. (2018). Alzheimer's disease. European Journal of Neurology. 25:59-70.
- Lee H and Ma CJ. (2021). Neuroprotective activity of lonicerin isolated from *Lonicera japonica*. Korean Journal of Pharmacognosy. 52:19-25.
- Li H, Shi R, Ding F, Wang H, Han W, Ma F, Hu M, Ma CW and Huang Z. (2016). Astragalus polysaccharide suppresses 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016:4856761. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/4856761/> (cited by 2022 April 1).
- Lin MT and Beal MF. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature. 443:787-795.
- Maher P. (2005). The effects of stress and aging on glutathione metabolism. Ageing Research Reviews. 4:288-314.
- Neitemeier S, Dolga AM, Honrath B, Karuppagounder SS, Alim I, Ratan RR and Culmsee C. (2016). Inhibition of HIF-prolyl-4-hydroxylases prevents mitochondrial impairment and cell death in a model of neuronal oxytosis. Cell Death Disease. 7:e2214. <https://www.nature.com/articles/cddis2016107> (cited by 2022 April 1).
- Nicholls DG and Budd SL. (2000). Mitochondria and neuronal survival. Physiological Reviews. 80:315-360.
- Qi LW, Chen CY and Li P. (2009). Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in Flos *Lonicerae Japonicae* by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry. Rapid Communications in Mass

- Spectrometry. 23:3227-3242.
- Reuther C, Ganjam GK, Dolga AM and Culmsee C.** (2014). The serine protease inhibitor TLCK attenuates intrinsic death pathways in neurons upstream of mitochondrial demise. *Apoptosis*. 19:289-316.
- Riaz A, Rasul A, Hussain G, Zahoor MK, Jabeen F, Subhani Z, Younis T, Ali M, Sarfraz I and Selamoglu Z.** (2018). Astragalin: A bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2018: 9794625. <https://www.hindawi.com/journals/aps/2018/9794625/> (cited by 2022 April 1).
- Sabogal-Guáqueta AM, Hobbie F, Keerthi A, Oun A, Kortholt A, Boddeke E and Dolga AM.** (2019). Linalool attenuates oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated by glutamate and NMDA toxicity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 118:109295. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332219323625> (cited by 2022 April 1).
- Seidler NW and Squire TJ.** (2005). A β -polyacrolein aggregates: Novel mechanism of plastic formation in senile plaques. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 335:501-504.
- Son YR and Ma CJ.** (2020). Neuroprotective activity of caffeic acid isolated from *Lonicera japonica*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 51:30-35.
- Song JH, Shin MS, Hwang GS, Oh ST, Hwang JJ and Kang KS.** (2018). Chebulinic acid attenuates glutamate-induced HT22 cell death by inhibiting oxidative stress, calcium influx and MAPKs phosphorylation. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*. 28:249-253.
- Srivastava S, Sithu SD, Vladykovskaya E, Haberzettl P, Hoetker DJ, Siddiqui MA, Conklin DJ, D'Souza SE and Bhatnagar A.** (2011). Oral exposure to acrolein exacerbates atherosclerosis in apoE-null mice. *Atherosclerosis*. 215:301-308.
- Sultana R and Butterfield DA.** (2010). Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 19:341-353.
- Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P and Schubert D.** (1998). The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *Journal of Cell Biology*. 141:1423-1432.
- Tan S, Schubert D and Maher P.** (2001). Oxytosis: A novel form of programmed cell death. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 1:497-506.
- 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 and Differentiation*. 18:282-292.
- Weon JB, Yang HJ, Lee BY, Yun B and Ma CJ.** (2011a). Neuroprotective compounds isolated from the methanolic extract of *Lonicera japonica*. *Natural Product Science*. 17:221-224.
- Weon JB, Yang HJ, Lee BY, Yun B, Ahn JH, Lee HY and Ma CJ.** (2011b). Neuroprotective activity of the methanolic extract of *Lonicera japonica* in glutamate-injured primary rat cortical cells. *Pharmacognosy Magazine*. 7:284-288.
- World Health Organization(WHO).** (2021). Dementia key facts. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (cited by 2022 June 14).
- Yan L and Zhou QH.** (2012). Study on neuroprotective effects of astragalin in rats with ischemic brain injury and its mechanisms. *Chinese Journal of Applied Physiology*. 28:373-377.
- Yan MH, Wang XL and Zhu XW.** (2013). Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 62:90-101.