

고삼 (苦蔘, *Sophorae Radix*) 70% 에탄올 추출물의 비수용성 분획물의 Heme Oxygenase-1 발현을 통한 뇌세포 보호 작용

이영숙*

원광대학교 약학대학

Neuroprotective Effect of the Water-insoluble fraction of Roots of *Sophora flavescens* 70% Ethanolic Extract on Glutamate-Induced Oxidative Damage in Mouse Hippocampal HT22 Cells

Young Sook Lee*

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Republic of Korea

Abstract – Oxidative stress or the accumulation of reactive oxygen species (ROS) leads neuronal cellular death and dysfunction, and it contributes to neuronal degenerative disease such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and stroke. Glutamate-induced oxidative injury contributes to neuronal degeneration in many central nervous system (CNS) diseases, such as epilepsy and ischemia. Heme oxygenase-1 (HO-1) enzyme plays an important role of cellular antioxidant system against oxidant injury. The expression of HO-1 has cytoprotective effects in glutamate-induced oxidative cytotoxicity in HT22 cells. The induction of HO-1 is primarily regulated at the transcriptional level, and its induction by various inducers is related to the nuclear transcription factor-E2-related factor 2 (Nrf2). Nrf2 is a master regulator of the antioxidant response. NNMBS008, the water-insoluble fraction of the 70% EtOH extract of roots of *Sophora flavescens*, showed dominant neuroprotective effects on glutamate-induced neurotoxicity in mouse hippocampal HT22 cells by induced the expression of HO-1 and increased HO activity. In mouse hippocampal HT22 cells, NNMBS008 makes the nuclear accumulation of Nrf2 pathway. In conclusion, the water-insoluble fraction of the 70% EtOH extract of roots of *S. flavescens* (NNMBS008) significantly protect glutamate-induced oxidative damage by induction of HO-1 via Nrf2 pathway in mouse hippocampal HT22 cells. These results suggest that these extracts could be the effective candidates for the treatment of ROS-related neurological diseases.

Key words – *Sophora flavescens*, Heme oxygenase-1, HT22, Glutamate, Neuroprotective effect

미토콘드리아 내의 산화환원 효소계, 외부 항원에 노출된 면역세포에 의해 그리고 외부적으로는 방사선 또는 여러 화합물 등에 의해 생체 내에는 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 활성산소종이 너무 많이 생성되거나 항산화 시스템의 기능이 저하되어 활성산소종의 생성과 제거 사이의 균형이 파괴되면 생체는 활성산소종에 의해 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 받게 된다.¹⁾ 산화적 스트레스는 심장병, 암, 당뇨 등 다양한 질병의 발생과 진행을 촉진하며 특히 알츠하이머 증후군을 비롯한 퇴행성 뇌 질환을 일으키는 중요한 요인으로 알려져 있다.²⁻⁴⁾ Heme oxygenase (HO)는 세포의 항산화 시스템에서 중요한 구성

요소로서 HO 유도체중 하나인 HO-1은 세포내의 heme을 분해하여 일산화탄소, 철, biliverdin을 만든다.⁵⁾ 분해된 생성물인 일산화탄소, 철, biliverdin과 HO-1 그 자체는 세포 손상 및 사멸의 억제, 항염증 및 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근에는 뇌 보호 기전 중, HO-1과 그 부산물들의 항산화 작용을 비롯한 다양한 생리활성으로 인하여 뇌 세포 보호에 관여하게 되는 것으로 현재 많은 연구가 진행되고 있다.⁶⁾ HO-1 단백질 발현에 관여하는 메커니즘 중 nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)의 핵 내로의 전사가 매우 중요한 인자로 작용한다고 알려져 있다. 전사 인자로서의 Nrf2는 HO-1과 같은 항산화 단백질 유전자에 존재하는 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 이들 유전자의 발현과 단백질 생성을 향진시킴으로써 산

*교신저자 (E-mail): ylee289@wku.ac.kr
(Tel): +82-63-850-6821

화적 스트레스에 대한 생체방어기전의 핵심적 역할을 담당한다.^{7,8)}

산화적 스트레스 및 ROS는 신경 세포의 파괴와 기능이상을 초래하여 알츠하이머, 파킨슨병, 뇌졸중 등의 신경 퇴행성 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다.^{2,4)} 중추 신경계(central nervous system, CNS)의 대표적인 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트는 시냅스에서 신경전달, 뉴런의 형성과 성장, 행동이나 학습 및 기억력 등에 매우 중요한 역할을 한다.⁹⁾ 하지만 이러한 생리화학적 기능에도 불구하고 글루타메이트의 독성은 신경세포에 손상을 미치거나 급성 또는 만성 퇴행성 뇌질환을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다.^{10,11)} 글루타메이트가 유발하는 신경세포 손상은 크게 두 가지 요인으로 구분할 수 있는데, 글루타메이트 수용체의 과다흥분에 의한 독성과 글루타메이트 수용체의 매개 없이 산화적 스트레스를 유발하여 세포에 손상을 미치는 것이다.^{12,13)} 본 실험에서는 글루타메이트의 수용체가 결여되어있는 쥐의 해마유래인 HT22 세포주를 사용하여 글루타메이트 처리시 수용체 과다 흥분에 의한 독성이 아닌 산화적 스트레스로 인한 세포의 손상을 확인 할 수 있도록 하였다.¹⁴⁾

고삼(苦蔘, *Sophora flavescens*)은 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 초본인 도둑놈의 지팡이의 주피를 거의 벗긴 뿌리로 이노, 이질, 해열, 습진, 위출혈 등에 쓰이는 생약이다. 이 약의 성상은 원주형을 이루고 길이 5~20 cm, 지름 2~3 cm, 바깥 면은 어두운 갈색~황갈색이며 껍은 면은 약간 섬유성이다. 횡단면은 피부의 두께가 약 1 mm이며 사부부근은 약간 어두운 색을 띠고 목부와외의 구별이 뚜렷하다. 특이한 냄새가 있고 맛은 매우 쓰며 잔류성이다.^{15,16)} 산지는 우리 나라와 중국, 일본 등지이며, 성분으로는 수종의 quinolizidine alkaloid, flavonoid, saponin 등이 보고되어 있다.^{17,18)} 한방에서는 전통적으로 맛이 쓰고 청열조습, 살충지양, 이노 등의 효능이 있어 소화불량, 신경통, 간염, 황달, 치질 등에 처방해왔다. 또한 임상적으로 습진, 피부 화농증, 여성의 음부소양 등의 피부병에 대하여 외용하며, 또한 세균성이질, 장염에 고삼, 감초, 목향을 물에 달여서 복용하면 효과 있다고 하였다.^{19,20)} 현재까지 알려진 고삼의 성분으로는 alkaloid, flavonoid, saponin 등이 알려져 있고 주요 성분으로는 alkaloid 1-2%와 flavonoid 약 0.5%등이 함유되었다고 보고되었다.²¹⁾ 최근의 연구에 의하면 고삼에서 분리한 flavonoid 성분인 8-lavandulylkaempferol이 free radical과 ONOO를 제거하는 능력이 있는 것으로 보고된 바 있으며,²²⁾ lavandulyl flavanones 성분인 (2S)-2'-methoxykurarinone, sophora-flavanone G, leachianone A 및 (-)-kurarinone 등이 항말라리아 활성이나 항균 활성이 있는 것이 밝혀지고 있다.^{23,24)} 따라서, 본 연구에서는 고삼의 70% 에탄올 추출물의 비수용성 분획물인 NNMBS008의 뇌세포 보호효과를 밝

혔으며 그 보호 기전이 Nrf의 핵 내 전사를 통한 HO-1 발현에 의한 것임을 확인하였다..

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 고삼은 2009년 9월 익산시 신용동 소재 대한한약국에서 구입하였으며, 형태학적 평가를 통하여 동정하였고 표본시료는 천연물신약표준화소재은행에 보관하였다. 고삼 70% 에탄올 추출물(NNMBS007)과 각 분획물(NNMBS008, NNMBS009)은 천연물신약표준화소재 은행에서 분양 받아 사용하였다.

시약 및 기기 - DMEM 배지와 trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Gibco Laboratorie사에서 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone Laboratories사에서 구입하였다. L-glutamate, Trolox와 3'-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma사에서 구입하였다. 96-Well tissue culture plates와 기타 tissue culture dishes는 Nunc사 제품을 이용하였다. 흡광도는 BioRad사의 Microplate Reader를 이용하여 측정하였다. TLC (Thin layer chromatography) plate는 MERCK사의 Silica gel 60 F₂₅₄ plate를 이용하였다.

시료 제조 - 고삼 50 g을 70% 에탄올 수용액 300 ml로 2시간 동안 가열환류추출하고 여과한 다음 여액을 감압 농축하여 고삼의 70% 에탄올추출물 (NNMBS007) 8.85 g을 얻었다. 얻어진 고삼 70% 에탄올 추출물에 증류수 100 ml를 넣고 교반하여 현탁시킨 후 24시간 동안 실온에서 방치하고, 3000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 침전물을 취함으로써 고삼 70% 에탄올추출물의 비수용성 분획물 (NNMBS008) 1.48 g과 수용성 분획 (NNMBS009) 1.04 g을 제조하였다. 각 시료는 실험에 사용한 배지에 녹여서 사용하였다. 제조된 각 시료 (NNMBS007 ~ 009)는 박층크로마토그래프(TLC)법으로 함유 성분 패턴 분석을 하였다. 각 시료를 2.5 mg/ml의 농도로 메탄올에 용해시켜 검액을 만들고, 10 µl 씩 TLC판에 점적하여 CHCl₃ : MeOH (20 : 1)의 용매 조건으로 전개시키고 이를 10% 황산에 발색하였다. NNMBS007와 NNMBS009에서는 나타나진 않던 스팟이 NNMBS008에서는 R_f값이 각각 0.2, 0.32, 0.52 인 세개의 스팟이 확인 되었다.

HT22 세포배양 및 뇌 세포 보호활성 측정 - 생쥐 해마 유래 HT22 세포주는 목인회 교수 (서울대학교)로부터 분양하여 사용하였으며, 글루타메이트로 독성을 유발한 세포주에 대한 보호활성 측정은 정 등의 방법²⁵⁾에 따라 실시하였다. HT22 세포 (2×10⁵ cells/well)를 10% heat-inactivated FBS, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100ig/ml)을 함유한 DMEM배지에 분주하고 5% CO₂ 배양기 내에서 37°C 에서 24시간 배양한 다음, 각각의 시료 용액 (25, 50,

100, 200 µg/ml)과 5 mM 글루타메이트를 처리한 후 12시간 동안 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였으며, 세포생존율은 MTT법을 활용하여 측정하였으며, 양성대조약물로는 Trolox 50 µM를 사용하였다. 또한, 모든 실험치는 대조군에 대한 세포보호율을 mean±S.D.로 표시하였으며, 각각 3회 반복 실험치를 이용하여 계산하였다.

ROS 측정 - 배양된 세포를 PBS로 세척한 후, 10 µM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, 35845)를 포함하는 Hank's balanced salt 용액에서 30분 동안 암실에서 반응시킨 후 세포의 형광광도 (SpectramaxGemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 측정하였다 (excitation wavelength: 490 nm; emission wave length : 525 nm).

Western Blot Analysis - HT22 세포를 60 mm dish에 3×10⁵ cells/well 밀도로 24시간 배양한 후 각각의 시료를 농도 별 또는 시간 별로 처리 하였다. HT22 세포에 RIPA buffer를 첨가한 다음, 4°C, 14,000×g 에서 25분간 원심분리하고 상등액을 튜브에 옮겼다. 단백질 정량은 BSA 단백질 실험 키트를 이용하였고 각각의 시료를 12% SDS-polyacrylamide gel에서 영동하고 nitrocellulose membrane (NC membrane)으로 전사하였다. 전사된 NC membrane을 5% 무 지방유가 포함된 신선한 blocking buffer (0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline) 에서 blocking한 후 HO-1 antibody를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 2차 antibody (Anti-mouse IgG)를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응한 다음, ECL 용액을 1:1로 잘 섞어서 NC membrane 위에 가하여 발광시키고 암실에서 X 선 필름에 감광한 후 현상하였다. 같은 방법으로 actin antibody를 이용하여 actin을 측정한다.

Heme Oxygenase Activity - HO 효소 활성을 Tenhunen 등의 방법²⁵⁾에 의해 다음과 같이 측정하였다. 세포로부터 얻어진 microsome에 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)와 랫의 간 cytosol에서 얻어진 biliverdin reductase를 포함하는 반응용액인 100 mM PBS, 2 mM MgCl₂, 3 mg의 랫의 간 cytosol, 0.8 mM NADPH, 2 mM glucose-6-phosphate, 0.2 U의 glucose-6-phosphate dehydrogenase 등을 첨가하고 기질로서 hemin을 20 µM 처리한 후 37°C에서 1시간 동안 암실에서 반응한 뒤 1 ml의 chloroform으로 반응을 종결하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

핵과 세포질 분획의 분리 - HT22 세포에 protease inhibitor cocktail I과 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 첨가한 PER-mammalian protein extraction buffer를 첨가하여 균질화하고 4°C에서 15,000×g로 원심분리 하였다. 10분간 원심분리 후 상등액을 세포질 분획으로 사용하기 위하여 -80°C에서 저장하였다. 나머지 침전물은 PBS로 세척한 후 RIPA buffer [150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM

glycerophosphate, 20 mM NaF, 20 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM Na₃VO₄, protease inhibitors]를 첨가하고 4°C에서 15분간 혼합한 후 4°C, 16,000×g에서 15분간 원심분리 하였다. 이후의 과정은 앞에서 설명한 western blotting 방법을 이용하였다.

통계처리 - 본 실험의 통계처리는 GraphPad Prism, version 3.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA)을 사용하였다. 각 실험군의 결과는 평균치와 표준오차로 나타내었으며, 각 실험군 간의 결과는 ANOVA test를 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다. 실험군 간의 차이는 95% 수준(*p*<0.05)에서 유의성 있는 것으로 하였다.

결과 및 고찰

알츠하이머 증후군, 파킨슨 증후군, 헌팅턴 증후군과 같은 중추신경계 퇴행성 뇌 질환은 개개인의 정상적인 사고와 그에 따른 행동양상을 어렵게 함으로써 인간이 인간다운 생활을 영위하는데 크나큰 장애를 주고 있다. 이와 같은

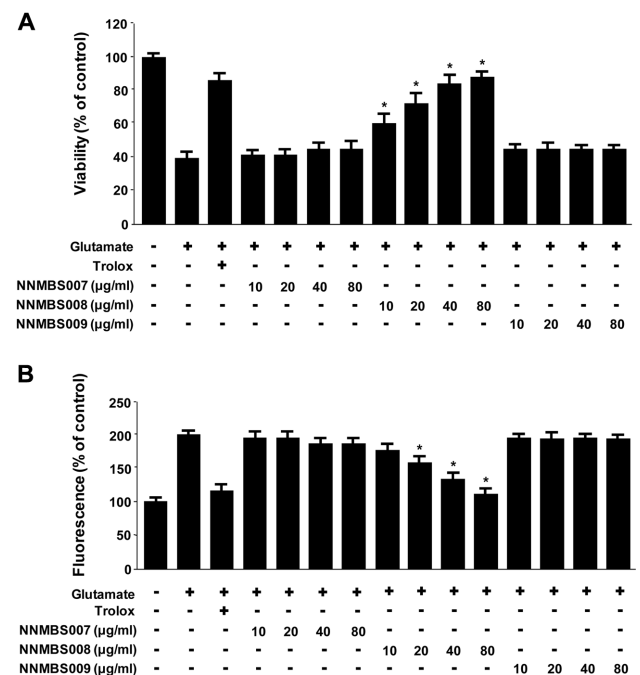


Fig. 1. Cytoprotective effect of NNMS007 ~ 009 against glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells. (A) Cytotoxicity was assessed after 12 h incubation period with 5 mM of glutamate. (B) ROS production was assessed after 12 h incubation period with 5 mM of glutamate. Each value represents the mean ± S.D. of three experiments. Significantly different from the control; **p*<0.05. Trolox (50 µM) was used as a positive control.

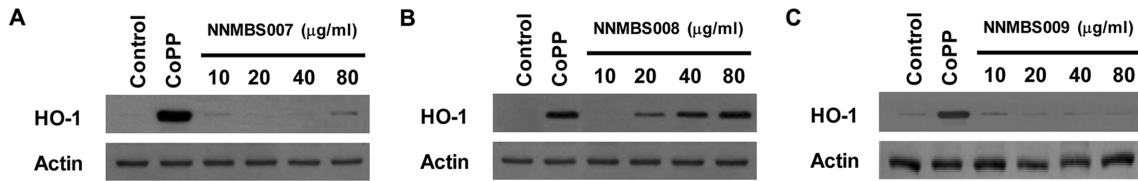


Fig. 2. Effects of NNMBS007 ~ 009 on HO-1 expression in HT22 cells. Cells were incubated with NNMBS007 ~ 009 for 12 h. Expression of HO-1 was determined by Western blot analysis, and representative blots of three independent experiments are shown.

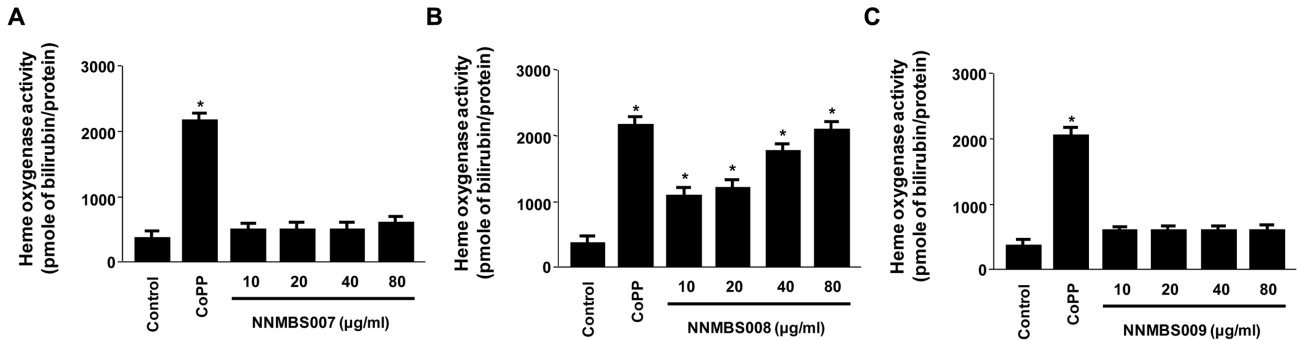


Fig. 3. Effects of NNMBS007 ~ 009 on HO activity in HT22 cells. Cells were incubated with NNMBS007 ~ 009 for 12 h. HO activity was determined via bilirubin formation at 12 h after treatment with various concentration of NNMBS007 ~ 009. Each value represents the mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from the control; * p <0.05.

중추신경계 퇴행성 뇌 질환의 주요한 요인 중의 하나가 산화적 스트레스이며, 특히 글루타메이트는 중추신경계에서 산화적 스트레스를 유발하는 물질로 알려져 있다.^{14,26} 본 연구에서는 고삼의 70% 에탄올 추출물(NNMBS007)과 70% 에탄올 추출물의 비수용성 분획물(NNMBS008), 수용성 분획물(NNMBS009)이 갖는 뇌세포 보호효과와 항산화 효과를 측정하고자 글루타메이트로 산화적 손상을 유발시킨 생쥐 해마 유래 HT22 세포를 이용하여 세포 생존율과 그 보호 기전을 연구하였다.

각각의 시료 NNMBS007 ~ 009를 농도별 처리한 후 12 시간 동안 글루타메이트와 함께 처리한 결과, 고삼 70% 에탄올 추출물의 비수용성 분획물(NNMBS008)이 세포독성을 나타내지 않은 농도(10~80 µg/ml)에서 다른 두 시료(NNMBS007, NNMBS009)에서는 보여지지 않은 유의한 세포보호 활성을 나타내었으며 (Fig. 1A), 동시에 강력한 활성산소종(reactive oxygen species : ROS) 소거 효과를 나타내었다 (Fig. 1B). NNMBS008의 처리 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 증가하였으며, ROS 소거 활성 역시 NNMBS008의 농도에 비례하여 감소하였다 (Fig. 1). 세포 생존율과 ROS 소거 활성 실험에는 항산화물질로 알려진 trolox 50 µM을 양성 대조약물로 사용하였다. 또한, 산화적 스트레스로부터의 뇌세포 보호 기전에 관여하는 중요한 단백질인 Heme oxygenase (HO)-1의 발현 정도를 알아보기 위하여 각 시료를 12 시간 동안 HT22 세포에 처리한 결과, 고삼의 70% 에탄올 추출물(NNMBS007)과 수용성 분획물

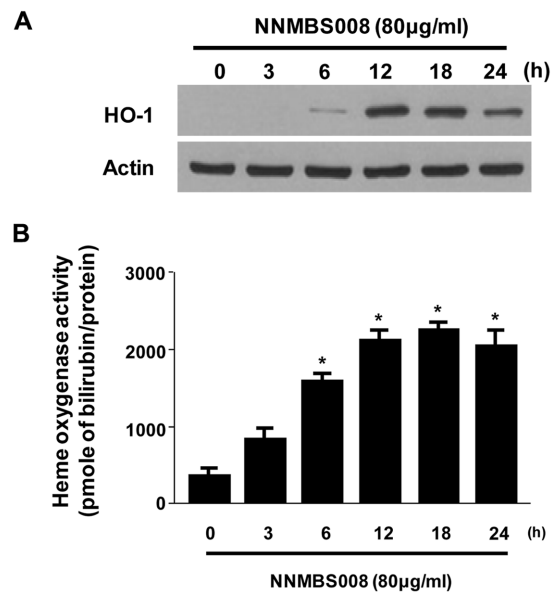


Fig. 4. Effects of NNMBS008 on HO-1 expression and HO activity in HT22 cells. (A) Cells were incubated for indicated periods with 80 µg/ml of NNMBS008. Expression of HO-1 was determined by western blot analysis, and representative blots of three independent experiments are shown. (B) HT22 cells were treated with 80 µg/ml of NNMBS008, and HO activity was measured at the indicated time points.

(NNMBS009)을 처리하였을 때는 HO-1의 발현이 거의 일어나지 않았으며 (Fig. 2A and 2C), 이에 상응하게 HO

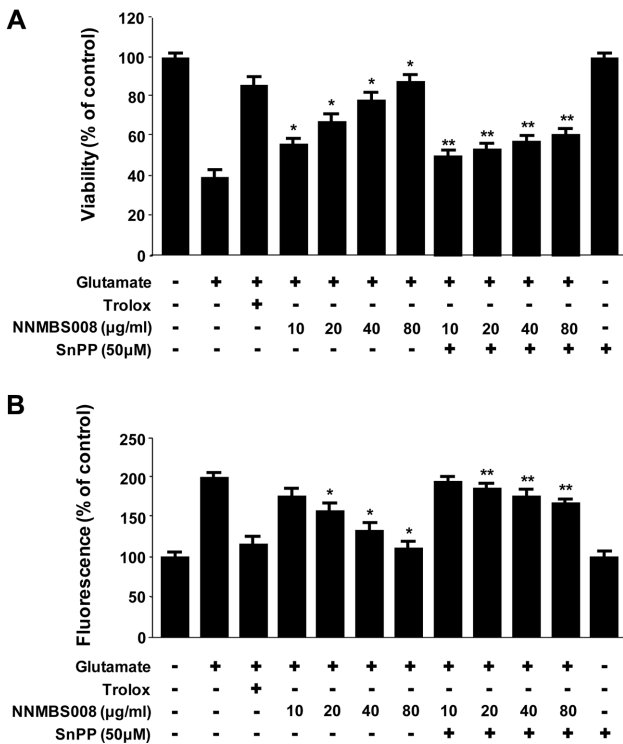


Fig. 5. Effects of HO-1 induction by NNMBS008 on glutamate-induced oxidative neurotoxicity. (A) Cells were treated with 10 and 80 μg/ml of NNMBS008 or 50 μM SnPP and then exposed to 5 mM glutamate for 12 h. (B) ROS production was assessed after 12 h incubation period with 10 and 80 μg/ml of NNMBS008 or 50 μM SnPP and then exposed to 5 mM glutamate. Each bar represents the mean ± S.D. of three experiments. **p*<0.05 vs. glutamate (5 mM), ***p*<0.05 vs. same treatment plus SnPP.

activity 역시 변화가 없었다 (Fig. 3A and 3C). 이에 반하여, 비수용성 분획물(NNMBS008)을 처리 하였을 때는 HO-1의 발현이 농도 의존적으로 뚜렷하게 증가 하였고 (Fig. 2B), 이와 유사하게 HO activity 역시 증가함을 나타냈다 (Fig. 3B). 고삼 70% 에탄올 추출물의 비수용성 분획물(NNMBS008)을 처리한 HT22 세포에서 6시간부터 HO-1 발현이 시작되어 18시간에서 최고 농도에 도달하여 점차 발현이 감소하는 양상을 보였다(Fig. 3). HO activity 역시 18시간까지 시간에 비례하여 점차 증가하였고 18시간 이후에서는 감소하였다 (Fig. 4). HO-1의 발현과 HO activity 측정 실험에는 HO-1의 유도물질로 알려진 CoPP 20 μM을 양성 대조약물로 사용하였다. NNMBS008의 뇌세포 보호 효과와 ROS 소거 작용과 HO-1의 발현간의 직접적인 관계를 알아보기 위하여, HO-1 발현의 억제제인 SnPP를 이용한 세포생존을 실험을 하였다. HO-1 발현 억제제인 SnPP를 NNMBS008 (10 ~ 80 μg/ml)과 함께 12시간 동안 처리한 실험에서 뇌세포 보호 효과가 억제되며, ROS 소거능 또한 감소하는 것을 확

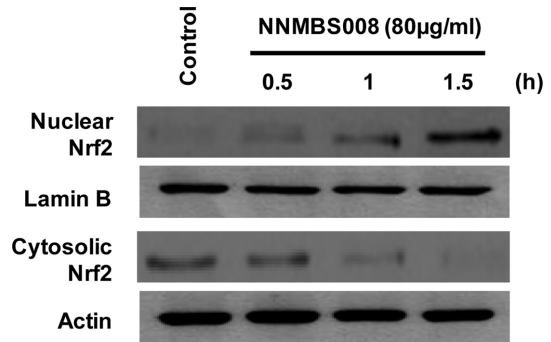


Fig. 6. Effects of NNMBS008 on nuclear translocation of Nrf2. Cells were treated with 80 μg/ml of NNMBS008 for 0.5, 1.0 and 1.5 h. The nuclei were fractionated from the cytosol using PER-Mammalian Protein Extraction buffer as described in Experimental part. Nrf2 protein was detected by Western blot analysis, and representative blots of three independent experiments are shown.

인하였다 (Fig. 5). 이와 같은 결과를 통해 산화적 스트레스로부터 나타나는 NNMBS008의 세포생존을 증가와 ROS 생성 억제능이 HO-1 단백질 발현과 관련 있음을 확인 하였다.

한편, HO-1과 같은 제 2 상 대사 효소의 발현에 의한 해독작용의 메커니즘 중에서 nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)의 세포질에서 핵 내로의 전사가 매우 중요한 인자로 작용한다고 알려져 있다.^{7, 8)} NNMBS008에 의한 Nrf2의 전사 여부를 알아보기 위하여 80 μg/ml 농도의 NNMBS008을 0, 0.5, 1, 1.5 시간 별로 처리하고 Western blot을 이용하여 분석하였다. 시간이 경과함에 따라 세포질의 Nrf2는 점점 감소하는 반면, 핵 내부의 Nrf2는 증가하는 양상을 보이는 것으로 보아 Nrf2의 핵 내로의 전사가 이루어졌음을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 따라서 본 연구를 통해 고삼 70% 에탄올 추출물의 비수용성 분획물(NNMBS008)은 마우스 해마 유래 HT22 세포에서 Nrf2를 핵 내로 전사하고 이를 통하여 HO-1 단백질 발현을 함으로써 글루타메이트에 의한 산화적 독성으로부터 보호활성을 나타낸다는 사실을 확인하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 향후 NNMBS008의 추가적인 *in vitro* 기전 연구와 더불어 *in vivo* 실험을 통한 퇴행성 뇌 질환 치료제 선도 물질 개발 연구 진행이 이뤄질 수 있을 것으로 기대 된다.

결 론

본 연구에서는 고삼 추출물 및 분획물의 뇌세포 보호 효과와 그 보호 기전을 탐색하였으며, 그 결과 고삼 70% 에탄올 추출물의 비수용성 분획물인 NNMBS008가 글루타메이트로 유발한 생쥐 해마 유래 HT22 세포주의 독성에 대하여 유의한 세포보호 활성을 나타내었다. 이는 Nrf2의 핵 내 전사 유도를 통하여 발현되는 HO-1 단백질에 의한 것으

로 생각된다. 이와 같은 결과는 향후 고삼을 이용한 뇌 보호 선도 물질 탐색 연구에 기초적인 역할을 할 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 2009학년도 원광대학교의 교비에 의해서 수행됨.

인용문헌

- Coyle, J. T. and Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* **262**: 689-695.
- Satoh, T., Enokido, Y., Kubo, K., Yamada, M. and Hatanaka, H. (1999) Oxygen toxicity induces apoptosis in neuronal cells. *Cell Mol. Neurobiol.* **18**: 649-666.
- Satoh, T., Okamoto, S., Cui, J., Watanabe, Y., Furuta, K., Suzuki, M., Tohyama, K. and Lipton, S. A. (2006) Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophilic] phase II inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 768-773.
- Satoh, T. and Lipton, S. A. (2007) Redox regulation of neuronal survival mediated by electrophilic compounds. *Trends Neurosci.* **30**: 37-45.
- Lee, M. S., Lee, J., Kwon, D. Y. and Kim, M. S. (2006) Ondamtanggamibang protects neurons from oxidative stress with induction of heme oxygenase-1. *J. Ethnopharmacol.* **108**: 294-298.
- Choi, B. M., Kim, H. J., Oh, G. S., Pae, H. O., Oh, H. C., Jeong, S. J., Kwon, T. O., Kim, Y. M. and Chung, H. T. (2002) 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose protects rat neuronal cells (Neuro 2A) from hydrogen peroxide-mediated cell death via the induction of heme oxygenase-1. *Neurosci. Lett.* **328**: 185-189.
- Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C. J., Foresti, R., Alam, J. and Motterlini, R. (2003) Curcumin activates the heme oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem. J.* **371**: 887-895.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 313-322.
- Alibright, T. D., Jessel, T. M., Kandel, E. R. and Poster, M. I. (2000) Neural science: a century of progress and the mysteries that remain. *Cell* **18**: 209-216.
- Siesjö, B. K. (1981) Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1**: 155-185.
- Greenamyre, J. T., Penney, J. B., Young, A. B., D'Amato, C. J. and Hicks, S. P. (1985) Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's disease. *Science* **4693**: 1496-1499.
- Choi, D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron* **1**: 623-634.
- Lipton, S. A. (2007) Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**: 803-808.
- Rössler, O. G., Bauer, I., Chung, H. Y. and Thiel, G. (2004) Glutamate-induced cell death of immortalized murine hippocampal neurons: neuroprotective activity of heme oxygenase-1, heat shock protein 70, and sodium selenite. *Neurosci. Lett.* **362**: 253-257.
- 생약학교재편찬위원회(2007) 생약학, 218-220. 동명사, 서울.
- Huang, K. C. (1993) The Pharmacology of Chinese Herbs, pp. 63-66. CRC Press, Boca Raton.
- Ryu, S. Y., Lee, H. S., Kim, Y. K. and Kim, S. H. (1997) Determination of Isoprenyl and Lavandulyl Positions of Flavonoids from *Sophora flavescens* by NMR Experiment. *Arch. Pharm. Res.* **20**: 491-495.
- Wu, L. J., Miyase, T., Ueno, A., Kuroyanagi, M., Noro, T. and Fukushima, S. (1985) Studies on the Constituents of *Sophora flavescens* AITON. II. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 3231-3236.
- Tang, W. and Eisenbrand, G. (1992) Chinese Drugs of Plant Origin, pp. 931-943. Springer-Verlag, Berlin.
- Woo, E.-R., Kwak, J. H., Kim, H. J. and Park, H. K. (1998) A new Prenylated Flavonol from the Roots of *Sophora flavescens*. *J. Nat. Prod.* **61**: 1552-1554.
- 육장수, 김성만, 정진모, 정명숙, 김정화, 김승배 (1995) 한약의 약리성분, 임상응용, 414-416. 계축문화사, 서울
- Jung, H. J., Kang, S. S., Woo, J. J. and Choi, J. S. (2005) A new lavandulylated flavonoid with free radical and ONOO⁻ scavenging activities from *Sophora flavescens*. *Arch. Pharm. Res.* **28**: 1333-1336.
- Kim, Y. C., Kim, H. S., Wataya, Y., Shon, D. H., Kang, T. H., Kim, M. S., Kim, Y. M., Lee, G. M., Chang, J. D. and Park, H. (2004) Antimalarial activity of lavandulylated flavonones isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 748-750.
- Kim, H. A., You, H. K., Shin, H. S., Kim, Y. C., Kang, T. H., Yu, H. H. and You, Y. O. (2003) Effects of aqueous extract of *Sophora flavescens* on the expression of cell cycle regulatory proteins in human oral mucosal fibroblasts. *Am. J. Chin. med.* **69**: 559-561.
- Jeong, G. S., Li, B., Lee, D. S., Byun, E., Kang, D. K., Lee, H. S. and Kim, Y. C. (2007) Cytoprotective constituents of *Alipinia katsumadai* seeds against glutamate-induced oxidative injury in HT22 cells. *Nat. Prod. Sci.* **13**: 268-272.
- Tan, S., Schubert, D. and Maher, P. (2001) Oxytosis: a novel form of programmed cell death. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**: 497-506.

(2011. 8. 17 접수; 2011. 9. 13 심사; 2011. 9. 26 게재확정)