pISSN 1225-4339 eISSN 2287-4992
Korean J. Food Nutr. Vol. 28. No. 6, 965~972 (2015)
http://dx.doi.org/10.9799/ksfan.2015.28.6.965

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

청국장 메탄올 추출물이 T98G 세포와 허혈성 뇌졸중 백서에 미치는 영향

한경훈 · 김도희 · 송관영* · 이석원** · †한성희***
서울의료원 의학연구소, *서울의료원 신경외과
**유한대학교 호텔관광외식조리과, ***고려대학교 보건과학대학 생물신소재연구소

The Effects of Methanol Extract from *Cheonggukjang* in T98G Cells and Early Stage of Focal Ischemia Rodent Models

Kyung-Hoon Han, Doh-Hee Kim, Kwan-Young Song*, Seog-Won Lee** and †Sung-Hee Han***
Research Institute, Seoul Medical Center, Seoul 131-865, Korea
**Dept. of Neurosurgery, Seoul Medical Center, Seoul 131-865, Korea*
***Dept. of Hotel Tourism & Culinary Arts, Yuhan University, Buchon 422-749, Korea*
****Institute for Biomaterials, College of Health Science, Korea University, Seoul 136-713, Korea*

Abstract

This study was conducted to evaluate the neuroprotective effects of *Cheonggukjang* extract in *in-vitro* and *in-vivo* models. T98G-human glioblastoma cells were pretreated with various concentrations (1~10 mg/mL) of *Cheonggukjang* extract for 24 h and then exposed to H_2O_2 (1 mM) for 3 h. The neuroprotective effects of *Cheonggukjang* extract were measured using a CCK-8 kit assay, total antioxidant capacity (TAC) assay, reactive oxygen species (ROS) assay, and lactate dehydrogenase (LDH) release assay. The early stage focal ischemia rodent model was used as the *in-vivo* neurotoxicity model. Various concentrations (10~200 mg) of *Cheonggukjang* extract were administered to the animal models for 1 week. Peripheral blood was analyzed for glutathione peroxidase (GPx) expression by ELISA, and infarct volume reduction was analyzed by TTC staining. *Cheonggukjang* extract significantly ($p<0.05$) increased cell viability in T98G cells against H_2O_2 as well as against the induced neurotoxicity. Indeed, treatment with the *Cheonggukjang* extract induced a decrease in ROS and LDH expression and increased TAC significantly ($p<0.05$). However, *Cheonggukjang* extract did not induce a decrease in infarct volume or an increase in GPx expression in the *in-vivo* model. Despite the limitation in neuroprotection, *Cheonggukjang* extract may be useful for treating ROS injury.

Key words: *Cheonggukjang*, antioxidant, neuroprotection, focal ischemia rodent models

서 론

최근 통계자료에 따르면, 2014년 국내 고령인구의 비율이 12.7%로 높은 비중을 차지하고 있으며, 2060년에는 고령인구 비율이 40.1%로 급증할 것으로 예상하고 있다. 이로 인하여 노인질병의 증가에 따른 삶의 질 저하, 과도한 의료비 지출이 사회, 국가적인 문제로 대두되고 있다(통계청 2014). 노화와 밀접한 관련을 갖는 뇌혈관계 질환은 암 다음으로 발병률과 사망률이 가장 높은 단일질환이다. 특히 비만, 당뇨병 등과 같은 복잡한 질환과 밀접한 연관성을 가지고 있으며, 그 유병률이 계속적으로 증가하고 있는 실정이다(Chung 등 2001). 이러한 질환들은 대사과정에서 발생하는 활성산소와 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다(Miriam 등 2008).

한국 내 뇌졸중 발병의 약 80%를 차지하는 허혈성 뇌졸중

† Corresponding author: Sung-Hee Han, Institute for Biomaterials, College of Health Science, Korea University, Seoul 136-713, Korea. Tel: +82-2-3290-5622, E-mail: sungheeh3@gmail.com

은 혈관이 좁아지거나 막혀서 산소와 영양분을 공급하지 못해서 뇌가 손상되며, 산소결핍 상태가 지속될 경우 재관류 과정에서 뇌조직에 많은 손상이 나타나는 질병이다(Yovuz 등 1997; Kim 등 1999). 재관류 시에 내피세포로부터 발생하는 다량의 유리기(free radical)가 분비되어 뇌혈관문을 파괴하며, 염증세포를 활성화시키고, 그 결과 염증관련 싸이토카인들과 adhesion molecule이 유리되어 염증부위를 확대하며, 세포 손상을 유발시키게 된다(Ikeda 등 1990). 이로 인해 손상된 뇌조직은 다시 재생되기 어렵고, 뇌졸중의 증상이 개선되었어도 한 번 손상된 뇌혈관의 손상은 그대로 남아 있기 때문에, 재발 방지를 위해 평생 약물을 복용하게 되지만, 더 이상의 치료가 불가능한 것이 현 실정이다. 이에 국내 많은 연구자들은 인체에 부작용이 없고 산화스트레스를 차단하는 천연 항산화제를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Carrea 등 1992).

콩은 육류를 대신하여 단백질과 지방질을 보충할 수 있는 식물성 단백질 공급원으로 이소플라본, 사포닌, 레시틴, 항산화물질 등과 같은 기능성 물질을 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(Kwon 등 1999; Ryu 등 2006). 그 콩을 원료로 한 청국장은 우리나라 대표적 발효식품으로 단백질과 지방 함량이 높고, 발효기간이 짧은 고영양 식품이며, 이소플라본 함유량이 원료인 콩보다 청국장에서 더 높은 것으로 보고되었다(Lee 등 2002). 지금까지 청국장의 생리활성에 대한 연구로는 혈전 용해 효과(Yoo 등 1998), 항산화 효과(Joo 등 2011), 당뇨 예방효과(Kwon 등 2010), 항암 효과(Min 등 2008), 혈당조절 및 지질대사 개선효과가 있다고 보고되었다(Shon 등 2007).

이에 본 논문에서는 과산화수소(H_2O_2)로 유발된 산화 스트레스 상태의 T98G 신경교세포와 허혈성 뇌졸중 백서 모델에서 청국장 메탄올 추출물의 신경 보호 효과를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출액의 제조

본 실험에 사용된 청국장 분말(뚝배기표)은 서울시 중랑구에 위치한 대형마트에서 구입하였다. 청국장 추출물은 청국장 분말 10 g에 메탄올 100 mL를 첨가하여 70℃에서 2시간 동안 추출하였으며, 와트만페이퍼 No. 2 여과지를 이용하여 여과하였다. 여과된 청국장 메탄올 추출물은 진공농축기(Alpha 2-4LD PLUS, CHRST Co., Germany)로 농축 후 동결 건조하여 −70℃ 초저온 냉동고에서 보관하며, 본 실험에 사용하였다.

2. 세포배양 및 배양방법

본 실험에서 사용한 세포는 인간 신경 교세포 유래의 T98G glioblastoma cell(American Type Culture Collection, USA)을 DMEM 배지(supplemented with 10% v/v fetal bovine serum, FBS) 와 1% Penicillin/Streptomycin를 사용하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양액은 48시간을 주기로 교체하였다.

3. 산화 스트레스 유도

신경세포에서의 산화적 스트레스를 유도하기 위해서 T98G 신경교세포를 96-well plate에 5×10^3 cell/well을 분주한 후 37℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 T98G 신경교세포에 과산화수소를 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000 μM의 농도 별로 각각 3시간씩 처리하였다. 이 후 CCK-8 assay(CK04-01, Dojindo Molecular Technologies, Inc., Japan) kit 용액을 첨가하고, 2시간 후 microplate reader (Sunrise Basic Tecan, Tecan Co., Austria)를 사용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 산화적 스트레스로 인하여 세포사멸이 유의적으로 차이가 나는 과산화수소 농도를 본 연구에 사용하였다.

4. 청국장 메탄올 추출물의 세포 독성 평가

T98G 신경교세포에서의 청국장 메탄올 추출물의 독성을 알아보기 위하여 세포를 96-well plate에 5×10^3 cell/well로 분주하고, 청국장 메탄올 추출물을 농도별로 처리한 후 37℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 CCK-8 assay kit 용액을 첨가하고, 2시간 후 microplate reader를 사용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 청국장 메탄올 추출물로 인한 세포사멸이 나타나지 않는 청국장 메탄올 추출물의 농도를 본 연구에 사용하였다.

5. 세포 생존율 측정

세포 생존율을 측정하기 위해서 T98G 신경교세포를 96-well plate로 5×10^3 cell/well로 분주하고, 청국장 메탄올 추출물이 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL의 농도로 첨가된 배양액에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 과산화수소 1,000 μM을 각각의 well에 3시간 동안 처리하였다. 이후 CCK-8 assay kit 용액을 첨가하고, 2시간 후 microplate reader를 사용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 값은 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

6. Lactate dehydrogenase(LDH) 측정에 의한 세포막 손상 억제 확인

T98G 신경교세포에 청국장 메탄올 추출물을 24시간 동안 전처리시킨 후, 1,000 μM의 과산화수소를 3시간 처리한 후, 원심분리(500×g)하여 상등액을 새로운 well에 옮겼다. Cell cyto-

toxicity assay(DG-LDH500, DOGEN Co., Korea) kit를 사용하여 흡광도를 측정한 후 세포막 손상을 확인하였다

7. 항산화 효소 활성 분석

1) Total antioxidant capacity(TAC) 측정

Total antioxidant capacity assay(K274-100, Biovision Co., USA) kit 시약을 사용하여 측정하였다. T98G 신경교세포를 청국장 메탄올 추출물과 24시간 전배양 후, 과산화수소를 3시간 처리하였다. 그렇게 얻어진 각각의 청국장 메탄올 추출물 배양액은 protein mask와 1:1로 희석시킨 후 96-well plate에 10 μL씩 분주하였으며, ddH_20? 90 μL와 Cu^{2+} working solution 100 μL를 첨가하여 1.5시간 정도 상온에 방치한 후 micro plate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) Reactive oxygen species(ROS) 측정

Reactive oxygen species assay(STA-342, CELL BIOLABS, Japan) kit 시약을 사용하여 측정하였다. T98G 신경교세포를 청국장 메탄올 추출물과 24시간 전배양 후, 과산화수소를 3시간 처리하였다. 그렇게 얻어진 각각의 청국장 메탄올 추출물이 들어있는 배양액 50 μL를 Catalyst 50 μL와 혼합하여 96 well plate에 분주하였으며, 실온에서 5분간 방치하였다. 형광반응을 위한 DCFH 용액 100 μL를 첨가 후 30분간 암실에서 반응시킨 후 형광흡광측정기(Infinite M200, Tecan Trading AG., Switzerland)를 이용하여 480 nm/530 nm(excitation/emission)에서 형광을 측정하였다.

8. 실험동물 및 사육조건

백서에게 시술한 모든 과정은 대한민국 식품의약품안전처(임상제도과)의 실험동물의 관리 및 사용에 관한 규정을 준수하였다. 본 실험에 사용된 Spague-Dawley(SD) 백서는 ㈜코아텍(KOATECH, Kyunggi-do, Korea)를 통해 구입하였으며, 체중 250±10 g의 수컷을 구입하여 실험에 사용하였다. 동물실험실의 사육환경은 항온(20~22℃), 항습(55~65%)을 유지시켰고, 08:00에서 20:00까지 12시간 간격으로 명암주기를 유지하며 사육하였으며, 사료와 물은 실험 전까지 자유 급이하였다.

9. 청국장 메탄올 추출물의 급여

실험이 진행되는 2주간의 사육기간에는 일반 고형사료(코아텍사료, 실험동물용)를 자유 급여하였다. 실험에 사용될 청국장 메탄올 추출물은 증류수 1 mL에 10 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg의 농도로 각각 희석시킨 후, 1주일간 존대를 이용하여 1일 1회 허혈성 뇌졸중 모델 실험 전까지 경구 투여하였다.

10. 허혈성 뇌졸중 동물 모델 제작

중뇌대동맥폐쇄 방법(Middle Cerebral Artery Occlusion; MCAo)은 Longa 등(1989)과 Koizumi 등(1986)의 방법을 변형하여 시행하였다. 백서를 70% nitrous oxide 및 30% oxygen의 혼합기체와 함께 isoflurane(3% for induction and 2% for surgical procedure)으로 마취하였고, 체온은 온도 조절판을 이용하여 37±0.5℃로 유지하였다. Internal Carotid Artery(ICA)와 common carotid artery를 확인한 후, 이들을 수술실로 일시적으로 occlusion 시키고, external carotid artery의 stump에 작은 구멍을 뚫어, 4~0 nylon을 삽입, ICA의 방향을 따라 밀어 넣었다. 삽입된 nylon 실이 middle cerebral artery(MCA)의 기시부를 막게 되어 뇌졸중 모델을 만들었으며, 백서가 마취에서 깨어나면 신경학적 검사를 하여 뇌졸중이 일어났음을 확인하였다. 혈중 antioxidant의 차이를 확인하기 위해 해부 시 채혈을 동시에 진행하였으며, 채취한 혈액은 1시간 정도 4℃ 냉장 보관한 후 5℃ 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 따로 분리하였다. 분리된 혈청은 각각 100 μL씩 micro tube에 넣어 실험 전까지 －70℃에서 보관하였다.

11. 뇌경색의 부피 측정

허혈성 뇌졸중 백서의 뇌를 적출한 후, 뇌 형상틀(JEUNG DO BIO & PLANT CO., LTD, Seoul, Korea)을 이용하여 2 mm 간격으로 절단하였다. 뇌절편은 실온에서 인산염완충용액(Phosphate bugger solution, PBS)으로 녹인 다음, 2,3,5-TTC(Triphenyltetrazonlium chloride) 용액 (Sigma-Aldrich Co. St Louis, Missouri, USA)에 약 20여분 동안 침적 후 10% neutral buffered formalin으로 고정하였다. 뇌경색의 면적은 Image J(Freeware from the National Institutes of Health(http://rsb.info.nih.gov/ij/)를 이용하여 측정하였으며, 부피(mm^3)는 뇌절편의 경색부피(뇌절편경색면적×두께)들의 합으로 계산하였다(Kim 등 2011).

12. 혈중 Glutathione Peroxidase Activity(GPx) 측정

허혈성 뇌졸중 백서의 해부 시 채혈을 통해 혈청은 －70℃에 보관하였다가 glutathione peroxidase activity colorimetric assay(K762-100, BioVision, Milpitas, CA, USA) kit를 이용하여 허혈성 뇌졸중 모델에서 청국장 메탄올 추출물 급여에 따른 발현 차이를 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

13. 통계처리

모든 실험 결과는 각 항목에 따라 평균±표준편차로 표시하였다. 통계적 분석은 SPSS 20.0 K를 이용하여 one way ANOVA를 시행하였으며, $p<0.05$ 미만의 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 과산화수소(H_2O_2) 처리에 따른 세포사

인간은 산소를 이용하여 대사과정을 하게 되며, 그 과정에서 활성산소들을 발생하게 된다. 과산화수소는 신체 내에서 일정량 발생하며, 그로 인해 세포 내 유전자 발현, 세포 활동 등을 조절하는 신호전달 물질이지만, 과잉될 경우 알츠하이머, 치매, 파킨슨씨 병 등과 신경퇴행성 질환에 큰 영향을 준다고 보고되었다(Heo 등 2008). 이에 본 연구에서는 뇌 손상에 있어서 일차적인 보호기능을 가지고 있는 교세포 유래 세포인 T98G 신경교세포를 이용하여 청국장 메탄올 추출물의 항산화 효과를 알아보고자 하였다. 연구에 사용될 과산화수소의 세포 내 처리 농도를 알아내기 위하여 성장배양액에 과산화수소를 100~1,000 μM의 농도에 따라 각각 세포에 첨가하였으며, 24시간 후 세포의 생존율을 CCK-8 assay를 이용하여 측정하였다. Fig. 1에서와 같이 과산화수소를 1,000 μM의 농도로 처리하였을 때 세포 생존율이 정상군과 비교 시 30% 정도 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이에 본 연구에서는 과산화수소 처리농도는 1,000 μM로 사용하였다.

2. 청국장 메탄올 추출물 처리에 따른 세포사

여러 연구에서 항산화 효과로 세포를 보호한다고 알려져 있는 청국장이 T98G 신경교세포의 세포사에 미치는 영향을 확인하기 위하여 청국장 메탄올 추출물을 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL의 농도로 24시간 동안 처리한 후 CCK-8 assay를 이용하여 측정하였다. 정상군에 비하여 청국장 메탄올 추출물 10 mg/mL 처리군에서만 흡광도가 유의적인 차이로 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이는 10 mg/mL 이상의 고농도 청국장 메탄올 추출물에서는 T98G 신경교세포에 독성을 나타낼 수 있다는 것으로 사료된다. 이에 모든 실험에서 청국장 메탄올 추출물의 처리 농도는 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL를 사용하였다.

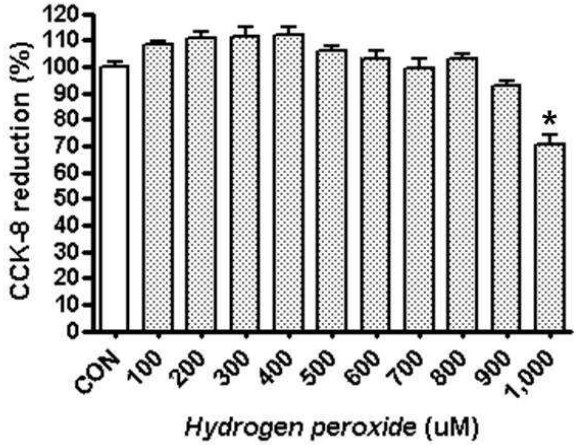

Fig. 1. Concentration dependent effects of H_2O_2 on T98G cell viability. Cells were treated with various concentrations (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, and 1,000 μM) of H_2O_2 and cell viability were measured by CCK-8 assay. The data shown are means±SE. *Statistical significant difference between groups (p<0.05).

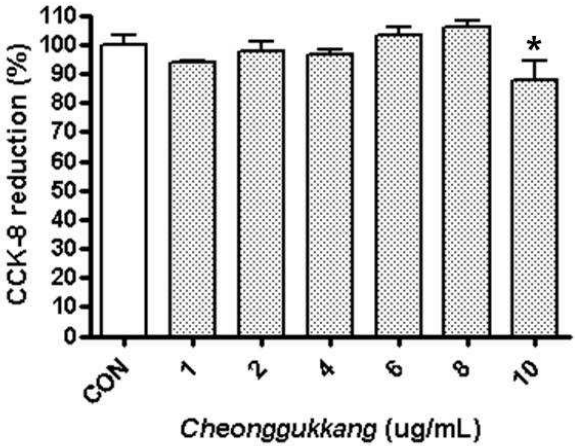

Fig. 2. Concentration dependent effects of *Cheonggukjang* extract on T98G cell viability. Cells were treated with various concentrations (1, 2, 4, 6, 8, and 10 mg/mL) of *Cheonggukjang* extract and cell viability were measured by CCK-8 assay. The data shown are means±SE. *Statistical significant difference between groups (p<0.05).

3. 신경세포 보호 효과

과산화수소에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태의 T98G 신경교세포에서 청국장 메탄올 추출물 처리에 따른 보호 효과를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 과산화수소 단독 처리군과 청국장 메탄올 추출물 처리군과의 비교 시, 청국장 메탄올 추출물 처리군 8 mg/mL에서 유의적 차이를 확인할 수 있었다. 인삼, 어성초, 녹차, 카노신 등은 천연 항산화 소재로 산화 스트레스로부터 신경세포를 보호하는 효과가 있는 것으로 보고된 것과 같이(Kim 등 2009; Jeong 등 2011; Choi 등 2003; Park 등 2014), 청국장 메탄올 추출물이 함유하고 있는 항산화 물질들로 인하여 산화 스트레스 상태의 T98G 신경교세포가 보호되고 있음을 확인할 수 있었다.

4. 세포막 보호 효과

인간의 뇌는 전체 산소 소비량의 20% 정도를 소모하기 때문에 체내에서 가장 많은 활성산소를 발생한다. 신경세포 세포막의 경우, 지질 함량이 높아 산화적 스트레스에 의해서 더욱 쉽게 파괴되는 구조를 가지고 있으며, 뇌에는 활성산소를 제거해주는 항산화제가 적기 때문에 쉽게 산화적 스트레스

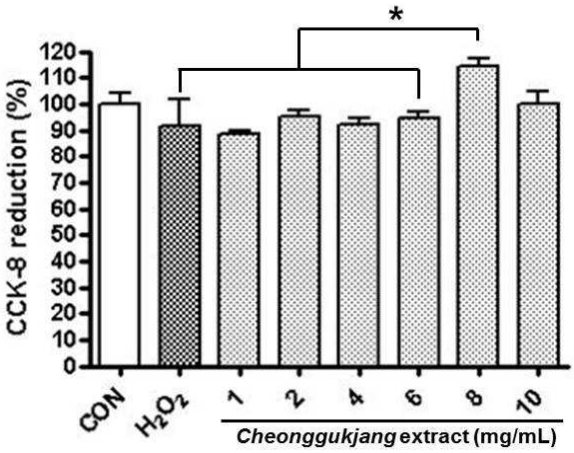

Fig. 3. Neuroprotective effects of *Cheonggukjang* extract. T98G cell was pretreated for 24 h with various concentrations. The cells were then treated with 1,000 μM H_2O_2 for 3 h. The cell viability was measured by CCK-8 assay. The data shown are means±SE. *Statistical significant difference between groups (p<0.05).

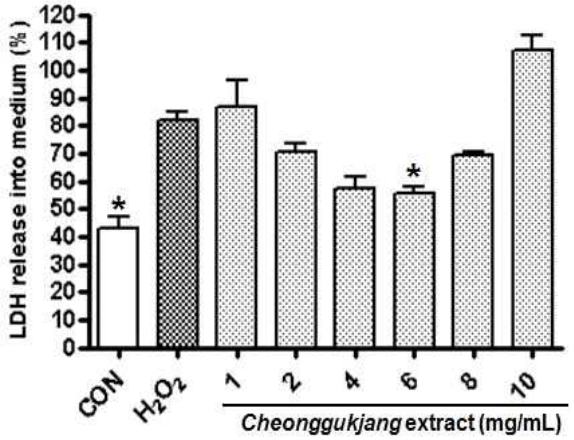

Fig. 4. Effects of *Cheonggukjang* extract against H_2O_2 induced cell membrane toxicity in T98G cell. The cells were pretreated for 24 h with various concentrations and then treated with 1,000 μM of H_2O_2 for 3 h. The inhibition effect of LDH release on H_2O_2 induced cell was measured by cell membrane toxicity assay kit. The data shown are means±SE. *Statistical significant difference between groups (p<0.05).

상태에 놓이게 되며, 이로 인하여 신경세포가 사멸하게 된다 (Lenaz G 1998). 따라서, 과산화수소를 이용하여 T98G 신경교세포를 산화적 스트레스 상태로 유도함으로써 청국장 메탄올 추출물의 세포막 보호 효과를 알아보기 위해 연구를 진행하였다. 세포질 성분인 Lactate dehydrogenase(LDH)를 측정한 결과는 Fig. 4와 같으며, 청국장 메탄올 추출물의 농도 증가에 따라서 LDH의 방출량이 과산화수소 단독 처리군과 비교 시 감소하는 경향을 보였다. 청국장 메탄올 추출물을 6 mg/mL에서는 정상군과의 유의적 차이를 발견할 수 없을 정도로 감소를 하였으며, 이는 메탄올 추출물이 산화 스트레스에 대한 세포 보호 성분들을 많이 함유하고 있기 때문일 것이라고 사료된다.

5. Total antioxidant capacity(TAC) 측정

청국장 메탄올 추출물 농도가 증가함에 따라 배양액 내의 TAC의 값이 비례적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 그 중에서도 청국장 메탄올 추출물 처리군 8, 10 mg/mL의 농도에서 과산화수소 단독 처리군과 비교 시 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이는 청국장 메탄올 추출물은 농도의 증가에 따라서 ABTS radical의 소거활성이 증가하는 것을 나타내는 것으로 사료된다.

6. Reactive oxygen species(ROS) 측정

청국장 메탄올 추출물을 T98G 신경교세포에 24시간 동안 전처리한 후, 과산화수소를 3시간동안 처리하였다. 그 이후 발생하는 ROS의 양을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 생성된 ROS의 값을 확인해 본 결과, 과산화수소 단독 처리군에서 ROS가 매우 높게 생성되었으며, 청국장 메탄올 추출물 처리군과 비교 시 모든 농도에서 ROS 값은 유의적으로 낮게 나오는 것을 확인할 수 있었다. 그 중 4 mg/mL의 농도에서 가장 낮은 수준의 ROS가 측정되었으며, 세포 수준에서 청국장 메탄올 추출물이 과산화수소로 인한 ROS의 생성을 억제할 수

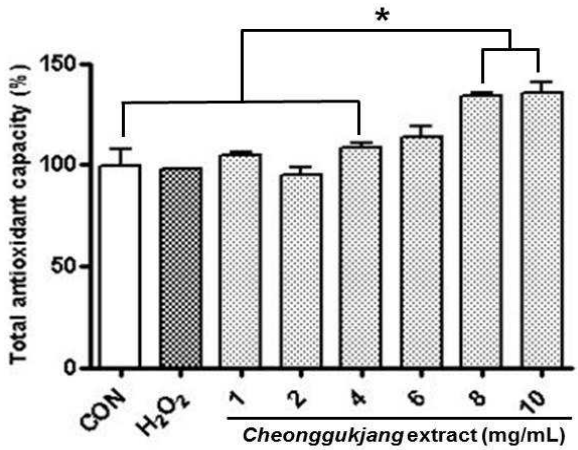

Fig. 5. Measurement of total antioxidant capacity (TAC) in culture media. *p<0.05 on 2, 4, 6, and 8 mg/mL of *Cheonggukjang* extract treatment group. TAC was measured by antioxidant capacity assay kit. The data shown are means±SE. *Statistical significant difference between groups (p<0.05).

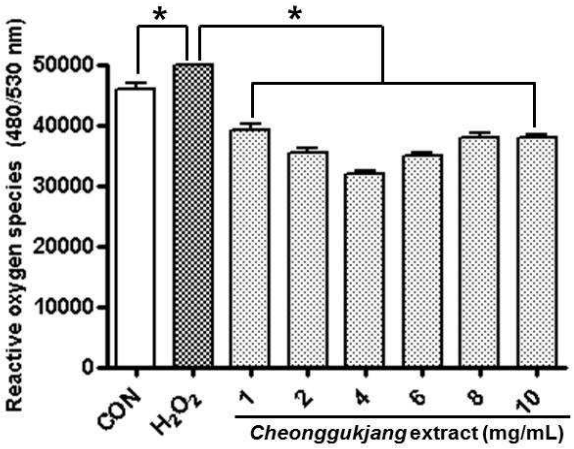

Fig. 6. Expression of reactive oxygen species (ROS) in culture media. *p<0.05 on 1, 2, 4, 6, and 8 mg/mL of *Cheonggukjang* extract treatment group. ROS was measured by reactive oxygen species assay kit. The data shown are means±SE. *Statistical significant difference between groups (p<0.05).

있다는 것으로 사료된다.

7. 뇌병변 부피 측정

뇌졸중 모델에서 각 그룹에서 적출된 뇌 조직 절편은 TTC 염색을 실시한 후, Image J 프로그램을 사용하여 각각의 조직의 손상 정도를 뇌 피질과 해마부위에서 각각 측정하였다. 측정 결과, 뇌졸중 모델과 청국장 메탄올 추출물 투여군의 비교 시 200 mg/kg에서 뇌조직의 손상 정도가 줄어드는 경향이 보였으나, 유의적인 차이가 나타나지 않는 것으로 확인하였다. 이는 청국장 추출물의 짧은 급여기간과 낮은 투여 농도로 인한 것으로 사료된다.

8. 혈중 Glutathione peroxidase(GPx) 분석

활성산소의 공격을 차단 또는 감소시키는 항산화 기전에 작용하는 효소계 물질인 GPx는 뇌졸중 모델을 만든 후 3시간째 채혈한 혈청을 사용하였으며, ELISA를 이용하여 발현 정도를 측정하였다. 각각의 그룹에서 측정한 결과는 Fig. 8과 같다. GPx의 발현농도는 Middle cerebral artery(MCAo) 모델과 청국장 메탄올 추출물 투여군 간에 차이를 발견할 수 없었으나, 농도의 증가에 따라 발현이 증가하는 경향을 확인할 수 있었다.

요약 및 결론

본 연구에서는 청국장 메탄올 추출물의 뇌세포 보호 효과

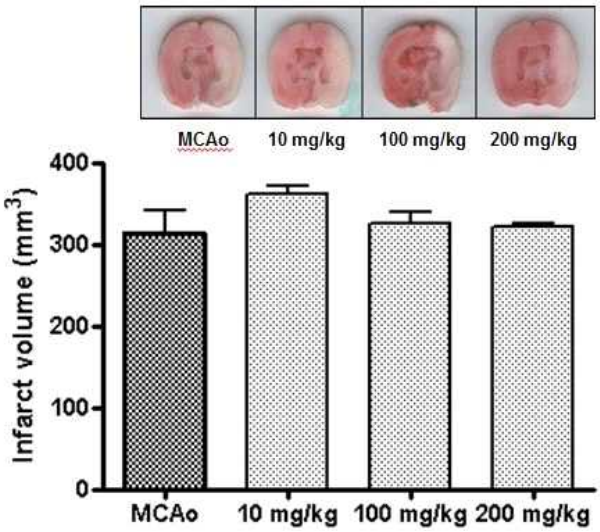

Fig. 7. Representative brain sections stained with TTC showing the ischemic core and penumbra at 3 hours after MCAo brain injury in control and *Cheonggukjang* extract treatment group (n=5/group). *Cheonggukjang* extract is not induced decrease of infarct volume. The densitometric analysis of the infarct volume (mm^3) is calculated in TTC-stained brain section with Image J analyzer of NIH.

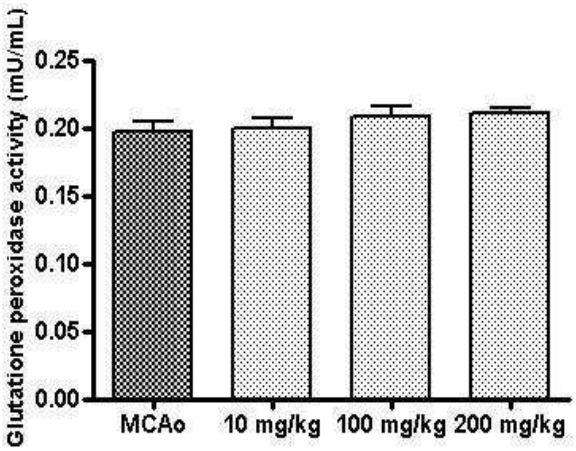

Fig. 8. *Cheonggukjang* extract was not related to glutathione peroxidase activity in blood. Glutathione peroxidase activity was calculated by hydrogen peroxide inhibition. Histogram values present means±SE.

를 T98G 신경교세포와 허혈성 뇌졸중 백서 모델에서 확인하고자 하였다. T98G 신경교세포에 청국장 메탄올 추출물 1, 2, 4, 6, 8 mg/mL를 24시간 전처리한 후, 과산화수소를 1,000 μM의 농도로 3시간 처리한 후 CCK-8 assay를 통하여 청국장 메탄올 추출물 처리군이 과산화수소 단독 처리군보다 높은 세

포 생존율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 청국장 메탄올 추출물 처리군에서는 세포막 보호 효과를 알 수 있는 LDH의 값과 ROS의 경우, 과산화수소 단독 처리군보다 낮게 발현되었으며, 항산화능을 알 수 있는 TAC의 값이 과산화수소 단독 처리군보다 높은 발현을 나타냈다. 이는 청국장 메탄올 추출물이 가지고 있는 여러 항산화 물질들이 산화 스트레스 상태의 T98G 신경교세포를 보호하고 있음을 확인할 수 있었다. 하지만 백서를 이용한 허혈성 뇌졸중 모델에서는 청국장 메탄올 추출물을 10 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg을 일주일간 경구투여 후 확인한 결과, 뇌병변 감소와 같은 보호 효과는 보이지 않았다. 또한 혈액 내 항산화 효소인 GPx의 발현 결과 또한 청국장 메탄올 추출물 처리에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않아, 청국장 메탄올 추출물이 *in-vivo* 모델에서는 단독으로 나타내지 못하는 것으로 사료된다. 본 실험에서는 청국장 메탄올 추출물의 투여기간과 투여용량을 제한적으로 적용하였으며, 다양한 투여기간, 투여용량 그리고 투여방법을 추가하는 *in-vivo* 실험과 임상적으로 사용되고 있는 항산화 약물들과의 시너지 효과에 대한 연구가 후속적으로 필요하다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 서울시 재원으로 보조금 지원을 받아 수행된 2013년 “서울 시민의 뇌건강을 위한 뇌졸중 모델에서 기능성 발표물질의 효과 기전 연구”의 연구 결과로 이에 감사드립니다.

References

Carrea FP, Lesnefsky EJ, Kaiser DG, Horwitz LD. 1999. The lazaroid U74006F, a 21-aminosteroid inhibitor of lipid peroxidation, attenuates myocardial injury from ischemia and reperfusion. *J Cardiovas Pharmacol* 20:230-235

Choi YB, Park JW, Han SR, Lee KS, Kim BS. 2003. Protective effects of the green tea polyphenol(−)-epigallocatechin gallate against ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *Korean Neurol Assoc* 21:387-391

Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. 2001. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 242:1075-1079

Heo HJ, Choi SJ, Choi SG, Shin DH, Lee JM, Lee CY. 2008. Effects of banana, orange, and apple on oxidative stress-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J Food Sci* 73:28-32

Ikeda Y, Long DM. 1990. The molecular basis of brain injury and brain edema; The role of oxygen free radicals. *Neurosurg* 27:1-11

Joo EY, Park CS. 2011. Antioxidant and fibrinolytic activities of extracts from soybean and *Chungkukjang* (fermented soybean paste). *Korean J Food Preserv* 18:930-937

Jeong HR, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Jeong CH, Heo HJ. 2010. Antioxidant and neuronal cell protective effects of an extract of *Houttuynia cordata* Thunb (a culinary herb). *Korean J Food Preserv* 17:720-726

Kim HY, Koh SH, Kim SH. 2011. Rat models for ischemic stroke. *Korean J Stroke* 13:107-113

Kim SH, Lee CH, Lee JM, Cho JH, Jang JB, Lee KS. 2009. Neuroprotective effect of *Insamyangyung-tang*. *The Journal of Oriental Obstrics & Gynecology* 22:1-14

Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. 1999. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 84:253-256

Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. 1986. Experimental studies of ischemic brain edema. I : A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 8:1-8

Kwon HJ. 1999. Bioactivity compounds of soybean and their activity in angiogenesis regulation. *Korean Soybean Digest* 16:63-68

Kwon DY, Daily JW 3rd, Kim HJ, Park S. 2010. Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. *Nutr Res* 30:1-13

Lenaz G. 1998. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Biochim Biophys Acta* 1366:53-67

Lee MH, Park YH, Oh HS, Kwak TS. 2002. Isoflavone content in soybean and its processed products. *Food Sci Biotechnol* 37:255-260

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91

Min HK, Kim HJ, Chang HC. 2008. Growth-inhibitory effect of the extract of porphyra *Chungkookjang* on cancer cell. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37:826-833

Miriam S, Kisrten A, Martin L, Tina G, Barry H, Tinna S, Ulla W, Vilhelm A. 2008. Aging-From molecules to populations. *Mech Aqeing Dev* 129:614-623

Park HS, Han KS, Shin JA, Park JH, Song KY, Kim DH . 2014. The neuroprotective effects of carnosine in early stage of focal ischemia rodent model. *J Korean Neurosurg Soc* 55:

125-130

Ryu TW. 2006. Health, emerging soybean as a functional food. *Korean Soybean Digest* 23:1-2

Shon MY, Lee SW, Nam SH. 2007. Antioxidant and anticancer activities of glycine semen germinatum fermented with germinated black soybean and some bacteria. *Korean J Food Preserv* 14:538-544

Yavuz O, Turkozkan N, Bilgihan A, Dogulu F, Aykol S. 1997. The effect of 2-chloro adenosine on lipid peroxide level during experimental cerebral ischemia-reperfusion in gerbils. *Free Radic Biol Med* 22:337-241

Yoo CK, Seo WS, Lee CS, Kang SM. 1998. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme exerted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from *Chungkookjang*. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 26:506-514

통계청 (2014) 2014 고령자통계 (http://sgis.kosta.go.kr/ publics model/)

Received 28 October, 2015
Revised 11 November, 2015
Accepted 30 November, 2015