

# The Protective Effect of Rosmarinic Acid on the Aluminum of Dementia Inducer

In-Ju Jung<sup>1</sup>, Young-Mi Seo<sup>2</sup>, Seung-Joo Jekal<sup>3</sup><sup>1</sup>Department of Cosmetology, Dongshin University, Naju, Korea<sup>2</sup>Department of Nursing, Seonam University, Namwon, Korea<sup>3</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan, Korea

## 치매유발제인 알루미늄에 대한 Rosmarinic Acid의 보호 효과

정인주<sup>1</sup>, 서영미<sup>2</sup>, 제갈승주<sup>3</sup><sup>1</sup>동신대학교 뷰티미용학과, <sup>2</sup>서남대학교 간호학과, <sup>3</sup>원광보건대학교 임상병리학과

To examine the protective effect of rosmarinic acid on the aluminum of dementia inducer, cultured C6 glioma cells were treated with various concentrations of aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) or rosmarinic acid. The cell viability, electron donating ability (EDA), superoxide dismutase (SOD)-like activity, and inhibitory activity of lipid peroxidation were evaluated for the antioxidant effect of rosmarinic acid. In these cultures, AlCl<sub>3</sub> showed a cytotoxic effect by decreasing the cell viability in a dose-dependent manner: then, the XTT<sub>50</sub> value was measured at 142.2 μM of AlCl<sub>3</sub> after treating the cultured C6 glioma cells with media containing 120~160 μM AlCl<sub>3</sub>. Therefore, its toxicity was determined as mid-cytotoxic by Borenfreund and Puerner's toxic criteria; while, vitamin E of antioxidant markedly increased the cell viability on AlCl<sub>3</sub>-induced cytotoxicity in these cultures. This study showed the antioxidant effect of rosmarinic acid via several assays, such as electron donating activity (EDA), superoxide dismutase (SOD)-like activity, and inhibitory activity of lipid peroxidation. From these findings, it is suggested that the oxidative stress is involved in AlCl<sub>3</sub>-induced cytotoxicity, and rosmarinic acid was effective in the protection of AlCl<sub>3</sub>-induced cytotoxicity by antioxidant activity. In conclusion, natural resources, like rosmarinic acid, may be a putative antioxidant agent for the treatment of reactive oxygen species (ROS)-mediated disease, such as dementia.

**Key words:** Dementia, Antioxidant effect, Cytotoxicity, Cell viability

Corresponding author: Seung-Joo Jekal  
Department of Clinical Laboratory Science,  
Wonkwang Health Science University, 514  
Iksan-daero, Iksan 54538, Korea  
Tel: 82-63-840-1215  
Fax: 82-63-840-1219  
E-mail: sjjei@wu.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2017 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: February 11, 2017  
Revised 1<sup>st</sup>: February 26, 2017  
Revised 2<sup>nd</sup>: February 27, 2017  
Accepted: February 28, 2017

## 서론

치매(dementia)는 뇌의 위축과 함께 기억력 저하, 사고 장애 및 판단 이상과 같은 임상적 특징을 나타내는 질환으로 이환될 경우, 정상적인 삶의 영위는 물론, 개인적인 인격 상실과 같은 증상을 초래한다[1]. 특히, 우리나라는 미국이나 일본과 같은 선진국처럼 빠르게 고령화 사회로 전환되는 시점에서 노인들에서

빈번히 나타나는 노인성 치매(Alzheimer's disease, AD)는 시급히 해결해야 할 중요한 과제가 되었다[2]. 더욱이, 치매의 임상학적 조사에서 신경세포 내 신경섬유의 변성을 비롯한 노인반(senile plaque), 신경세포의 변성(degeneration)과 같은 신경조직의 퇴행성 변화가 밝혀졌다[3]. 특히, 노인반은 중심에 위치하는 베타-아밀로이드 섬유(β-amyloid fiber) 주위에 신경돌기나 별아교세포(astrocyte)가 모여 있는 것으로서 대뇌의 마

이너트(Meynert) 기저핵의 세포사멸과 함께 대표적인 현상의 하나이다[4]. 특히,  $\beta$ -amyloid는 amyloid precursor protein (APP)의 C-terminal fragment가 감마 시크리타아제( $\gamma$ -secretase)에 의하여 잘려져 만들어진 것으로서 노인반의 침착에 있어 중요한 역할을 한다[5]. 따라서, AD의 치료적 방법의 하나로  $\beta$ -amyloid의 생성억제를 위하여 APP의 대사나 secretase의 활성을 억제시키는 측면에서 치료를 위한 약물개발의 연구가 이루어지고 있다[6]. AD의 발생에는  $\beta$ -amyloid 외에도 apolipoprotein을 비롯한 presenilin (PS), neurotrophic factor (NTF)와 같은 여러 병인들이 복합적으로 관여하고 있다[7]. 최근, AD의 병인의 하나로 알루미늄이 제시된 바 있는데, 알루미늄은 포장용기를 비롯하여 페인트재료, 의약품이나 음료수캔과 같은 다양한 용도로 사용되고 있다. 그러나 인체에 축적될 경우 AD의 발병과 밀접한 관련이 있다고 제시되면서 이의 사용에 특별한 주의를 요하고 있다[8]. 더욱이 알루미늄과 같은 몇몇 중금속류는 이의 붕괴시 자유라디칼을 생성함으로써, 파킨슨병(Parkinson's disease)을 비롯한 AD와 같은 난치성 뇌질환의 병인으로 제시되면서, 이들 질환들이 산화적 손상(oxidative stress)과 밀접한 관련이 있다고 알려져 이에 대한 연구가 관심의 대상으로 떠오르게 되었다[9]. 산화적 손상은 super oxide radical ( $\cdot O_2^-$ )이나 hydroxyl radical ( $\cdot OH$ )과 같은 산소자유기에 의하여 막의 지질과산화(lipid peroxidation)를 비롯하여 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 과활성 및 세포내 항산화 효소의 활성저해와 같은 여러 세포퇴행적 변화를 초래한다고 알려져 있다[10]. 최근, 약용식물이나 한약제에는 항산화제를 비롯한 항염, 항독, 항염과 같은 생리활성을 나타내는 천연성분들이 다량 함유되어 있다고 보고되고 있다[11]. 천연성분 중 rosmarinic acid는 자소(*Perilla frutescens*)와 같은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 식물에서 추출되는 정유성분의 하나로 polyphenol의 주성분으로 알려져 있다[12]. Polyphenol은 페놀류의 성분으로서 이들의 분자구조에 수산기(-OH)를 가지고 있어 다른 화합물과의 결합력이 강하기 때문에 항산화제를 비롯한 항암, 항염 등에 유효한 효능을 가지고 있다고 알려져 있다[13]. 그러나 rosmarinic acid의 항산화에 대한 연구는 그리 많이 되어 있지 않다. 본 연구는 치매에 대한 rosmarinic acid의 영향을 조사하기 위하여 배양 대뇌의 신경교종세포를 재료로 치매유발제인 염화알루미늄( $AlCl_3$ )의 독성과 이에 대한 rosmarinic acid의 영향을 산화적 손상 측면에서 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

C6 glioma 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Maryland, USA)에서 분양 받아 사용하였다.

### 2. 약제 제조

본 실험에 사용한 rosmarinic acid를 비롯한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), pyrogallol, ethyl alcohol, Tris-HCl buffer (pH 8.5), linoleic acid, phosphate buffered saline (PBS), trypsin, ammonium thiocyanate, dimethylsulfoxide (DMSO), vitamin E 및 2, 3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, disodium salt (XTT)는 Sigma사(Sigma Chemical, Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Rosmarinic acid의 제조는 에탄올이나 working solution에 녹여 각각 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M의 저장액을 만들어 사용하였으며, XTT는 PBS를 사용하여 50 mg/mL 농도의 저장액을 만든 후 냉암소에 넣어 보관 후 실험 당일 필요량을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

### 3. Vitamin E의 항산화능 측정

Vitamin E의 항산화능 조사를 위하여 배양중인 C6 glioma 세포에 20  $\mu$ M  $H_2O_2$ 를 처리하기 2시간 전에 vitamin E가 각각 10  $\mu$ M과 30  $\mu$ M로 각각 포함된 배양액에서 세포를 처리한 후 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

### 4. $AlCl_3$ 의 처리

$AlCl_3$ 가 배양 C6 glioma 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여  $AlCl_3$ 가 각각 120~160  $\mu$ M 농도로 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

### 5. $AlCl_3$ 에 대한 vitamin E의 영향

$AlCl_3$ 에 대한 vitamin E의 영향을 조사하기 위하여 배양 C6 glioma 세포에  $AlCl_3$ 를 처리하기 2시간 전에 vitamin E가 10  $\mu$ M과 30  $\mu$ M 농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 세포생존율에 의하여  $AlCl_3$ 의 처리와 비교 조사하였다.

### 6. $AlCl_3$ 에 대한 rosmarinic acid의 영향

$AlCl_3$ 에 대한 rosmarinic acid의 영향을 알아보기 위하여  $AlCl_3$ 를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 rosmarinic acid가

각각 20  $\mu\text{M}$ 과 40  $\mu\text{M}$ 로 포함된 배양액에 처리한 후 세포생존율에 의하여 이의 영향을 조사하였다.

## 7. 세포 배양

세포의 배양은 Park 등[14]의 방법에 따라, 0.025% trypsin을 사용하여 부착세포를 분리한 후 10% 혈청이 함유된 MEM 배양액에 넣어 균질화 한 다음 세포수가  $1 \times 10^5/\text{well}$ 이 되도록 산정하여 배양용기에 심었다. 용기내의 세포들은 72시간 동안 5%  $\text{CO}_2/95\%$  air로 조절된 정온기에서 배양 후 실험에 사용하였다.

## 8. 세포생존율(cell viability) 측정

Borenfreund와 Puerner [15]의 방법에 따라, C6 glioma 세포에 여러 농도의 약제를 처리한 다음 실험전에 제조한 XTT 50 mg/mL를 배양용기 당 10  $\mu\text{L}$ 씩을 넣은 후 4시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 DMSO를 넣은 다음 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

## 9. 전자공여능(electron donating ability, EDA) 측정

전자공여능의 측정은 Blois [16]의 방법에 따라, 메탄올 시료에 0.3 mM DPPH 메탄올용액 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 30분간 처리하였다. 처리 완료 후 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료첨가군과 시료무첨가군간의 차이를 백분율로 나타냈으며, 또한 vitamin E의 활성을 양성대조군으로 하여 비교 조사하였다.

## 10. SOD-유사활성(SOD-like activity) 측정

SOD-유사활성 측정은 Marklund & Marklund [17]의 방법에 따라, 시료에 Tris-HCl buffer와 10 mM pyrogallol을 가하고 25°C에서 10분 동안 처리하였다. 처리 완료 후 HCl로 반응시킨 다음 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, vitamin E를 양성대조군으로 하여 비교 조사하였으며, SOD-유사활성은 시료첨가군과 무첨가군의 차이에 의한 백분율로 표시하였다.

## 11. 지질과산화(lipid peroxidation) 측정

지질과산화는 Kikuzaki & Nakatani [18]의 방법에 따라, 시료 3.9 mL를 에탄올과 혼합하고 에탄올에 녹인 2.52% linoleic acid와 0.05 M PBS (pH 7.0)용액 12.1 mL를 첨가하여 40°C에

서 24시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 에탄올과 30% ammonium thiocyanate로 처리한 후 0.02 M ferrous chloride를 0.1 mL 가하여 실온에서 3분간 반응하였다. 반응이 완료된 후 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices)를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 증류수를 대조군으로 사용하였으며 양성대조군으로는 vitamin E를 사용하였다.

## 12. 통계처리

실험 자료에 대한 분석은 SPSS version 12 (SPSS, Chicago, IL, USA)에 의하였고 mean  $\pm$  SD로 표시하였다. 자료에 의한 유의성 검정은 일변량분산분석 (ANOVA)에 의하였으며 *p*-value가 0.05 미만의 경우를 유의한 것으로 하였다.

## 결 과

### 1. $\text{AlCl}_3$ 의 세포독성 측정

$\text{AlCl}_3$ 의 세포독성 조사를 위하여  $\text{AlCl}_3$ 가 120~160  $\mu\text{M}$  농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 처리한 결과 처리농도에 의존적으로 세포생존율을 유의하게 감소시켰으며, XTT<sub>50</sub>값은 142.2  $\mu\text{M}$ 에서 나타났다(Table 1). 본 실험에서  $\text{AlCl}_3$ 의 XTT<sub>50</sub>값이 142.2  $\mu\text{M}$ 로 나타남으로서 Borenfreund와 Puerner [15]의 독성판정기준에 따라 중간독성인 것으로 나타났다.

### 2. Vitamin E의 항산화능 측정

Vitamin E의 항산화능을 알아보기 위하여 10  $\mu\text{M}$ 과 30  $\mu\text{M}$ 의 vitamin E를 각각 처리한 결과 20  $\mu\text{M}$ 의  $\text{H}_2\text{O}_2$  단독 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% ( $0.362 \pm 0.02$ )에 비하여 41.7% ( $0.151 \pm 0.01$ )로 나타났다. 이에 비하여 10  $\mu\text{M}$  vitamin E의 처리에서는 80.1% ( $0.290 \pm 0.01$ )로 나타나 이는  $\text{H}_2\text{O}_2$  단

**Table 1.** The cytotoxicity of aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3$ ) on cultured C6 glioma cells

Treatment	XTT assay (450 nm)	
	Mean $\pm$ SD	% of control
Concentrations of $\text{AlCl}_3$ ( $\mu\text{M}$ )		
Control	0.324 $\pm$ 0.03	100
120	0.228 $\pm$ 0.02	70.4**
140	0.206 $\pm$ 0.02	63.6***
160	0.134 $\pm$ 0.01	41.4***
142.2 (XTT <sub>50</sub> )	0.162 $\pm$ 0.01	50.0***

C6 glioma cells were treated with 120, 140 and 160  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . The data indicate the mean  $\pm$  SD for 3 times on triplicate experiments. Significantly different from the control.

\*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

Abbreviation:  $\text{AlCl}_3$ , Aluminum chloride.

독 처리에 비하여 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ ). 또한, 30  $\mu\text{M}$ 의 처리에서는 세포생존율이 90.3% ( $0.327 \pm 0.02$ )로 나타남으로서 이 역시  $\text{H}_2\text{O}_2$  단독 처리에 비하여 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ ) (Table 2). 본 실험 결과는 vitamin E가 처리 농도에 비례하여 항산화능의 증가를 보여주었으며, 특히 10  $\mu\text{M}$  농도에서는 80% 이상의 높은 항산화능을 나타냈다(Table 2).

### 3. $\text{AlCl}_3$ 에 대한 vitamin E의 영향

$\text{AlCl}_3$ 의 독성에 대한 vitamin E의 영향을 조사하기 위하여 배양 세포에 XTT<sub>50</sub>값의  $\text{AlCl}_3$ 를 처리하기 2시간 전에 10  $\mu\text{M}$ 과 30  $\mu\text{M}$ 의 vitamin E를 각각 처리한 결과  $\text{AlCl}_3$  단독 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% ( $0.297 \pm 0.02$ )에 비하여 36.4% ( $0.108 \pm 0.01$ )로 나타남에 비하여 10  $\mu\text{M}$  vitamin E의 처리에서는 72.4% ( $0.215 \pm 0.01$ )로 나타나 이는  $\text{H}_2\text{O}_2$  단독 처리에 비하여 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ ). 또한, 30  $\mu\text{M}$ 의 처리에서는 세포생존율이 83.5% ( $0.248 \pm 0.02$ )로 나타남으로써 이 역시  $\text{AlCl}_3$  단독 처리에 비하여 유의한 증가를 보였다( $p < 0.001$ ) (Table 3).

**Table 2.** The antioxidant effect of vitamin E on  $\text{H}_2\text{O}_2$  in cultured C6 glioma cells

Treatment Concentrations of vit. E ( $\mu\text{M}$ )	XTT assay (450 nm)	
	Mean $\pm$ SD	% of control
Control	0.362 $\pm$ 0.02	100
20 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	0.151 $\pm$ 0.01	41.7
10	0.290 $\pm$ 0.01	80.1***
30	0.327 $\pm$ 0.02	90.3***

C6 glioma cells were pretreated with 10 and 30  $\mu\text{M}$  vitamin E for 2 hours. The data indicate the mean  $\pm$  SD for 3 times on triplicate experiments. Significantly different from the positive control ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

\*\*\* $p < 0.001$ .

Abbreviation: Vit. E, Vitamin E;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Hydrogen peroxide.

**Table 3.** The effect of vitamin E on  $\text{AlCl}_3$ -induced cytotoxicity in cultured C6 glioma cells

Treatment Concentrations of vit. E ( $\mu\text{M}$ )	XTT assay (450 nm)	
	Mean $\pm$ SD	% of control
Control	0.297 $\pm$ 0.02	100
$\text{AlCl}_3$ (XTT <sub>50</sub> )	0.108 $\pm$ 0.01	36.4
10	0.215 $\pm$ 0.01	72.4***
30	0.248 $\pm$ 0.02	83.5***

C6 glioma cells were pretreated with 10 and 30  $\mu\text{M}$  vitamin E for 2 hours. The data indicate the mean  $\pm$  SD for 3 times on triplicate experiments. Significantly different from the positive control (XTT<sub>50</sub>  $\text{AlCl}_3$ ).

\*\*\* $p < 0.001$ .

### 4. $\text{AlCl}_3$ 에 대한 rosmarinic acid의 영향

$\text{AlCl}_3$ 에 대한 rosmarinic acid의 영향을 알아 보기 위하여 rosmarinic acid를 각각 20  $\mu\text{M}$ 과 40  $\mu\text{M}$ 의 농도로 세포에 처리한 결과 20  $\mu\text{M}$ 의 처리에서는 세포생존율이 51.8%로 나타나  $\text{AlCl}_3$  단독 처리에 비하여 다소 증가한 것으로 나타났다. 이에 비하여, 40  $\mu\text{M}$ 의 처리에서는 63.9%로 나타나 이는  $\text{AlCl}_3$  단독 처리에 비하여 유의한 증가를 보였다( $p < 0.01$ ) (Table 4).

### 5. 전자공여능(EDA) 측정

Rosmarinic acid에 대한 전자공여능을 측정하기 위하여 각각 20  $\mu\text{M}$ 과 40  $\mu\text{M}$  농도의 rosmarinic acid 시료를 분석한 결과 20  $\mu\text{M}$  처리에서는 전자공여능은 21.3% ( $p < 0.01$ )로 나타났으며, 40  $\mu\text{M}$  처리에서는 39.5% ( $p < 0.001$ )로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다. 특히 40  $\mu\text{M}$  농도에서 rosmarinic acid의 전자공여능은 양성대조군으로 사용한 10  $\mu\text{M}$  vitamin E의 활성값인 77.1% ( $p < 0.001$ )값의 50% 이상인 것으로 나타났다(Table 5).

**Table 4.** The effect of rosmarinic acid on  $\text{AlCl}_3$ -induced cytotoxicity

Treatment Concentrations of rosmarinic acid ( $\mu\text{M}$ )	XTT assay (450 nm)	
	Mean $\pm$ SD	% of control
Control	0.305 $\pm$ 0.01	100
$\text{AlCl}_3$ (XTT <sub>50</sub> )	0.130 $\pm$ 0.01	42.6
20	0.158 $\pm$ 0.01	51.8
40	0.159 $\pm$ 0.02	63.9**

The data indicate the mean  $\pm$  SD for 3 times on triplicate experiments. Significantly different from the positive control (XTT<sub>50</sub>  $\text{AlCl}_3$ ).

\*\* $p < 0.01$ .

**Table 5.** The electron donating activity (EDA) of rosmarinic acid determined at a wavelength of 517 nm

Treatment Concentrations of rosmarinic acid ( $\mu\text{M}$ )	EDA (517 nm)	
	Mean $\pm$ SD	% of control
Control	0.258 $\pm$ 0.02	0
10 $\mu\text{M}$ vitamin E	0.059 $\pm$ 0.02	77.1***
20	0.203 $\pm$ 0.04	21.3**
40	0.156 $\pm$ 0.01	39.5***

Vitamin E was used as positive control. The data indicate the mean  $\pm$  SD for 3 times on triplicate experiments. Significantly different from the control.

\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Abbreviation: EDA, Electron donating ability.

**Table 6.** The SOD-like activity of rosmarinic acid determined at a wavelength of 420 nm

Treatment	SOD-like activity (420 nm)	
	Mean±SD	% of control
Concentrations of rosmarinic acid (μM)		
Control	0.274±0.03	100
10 μM vitamin E	0.431±0.02	157.3***
20	0.319±0.02	116.4*
40	0.357±0.01	130.3***

Vitamin E was used as positive control. The data indicate the mean±SD for 3 times on triplicate experiments. Significantly different from the control.

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Abbreviation: SOD, Superoxide dismutase.

## 6. SOD-유사활성(SOD-like activity) 측정

Rosmarinic acid 시료에 대한 SOD-유사활성 측정에 있어서 20 μM 농도처리에서는 SOD-유사활성은 대조군에 비하여 116.4% ( $p < 0.05$ )로 나타났으며, 40 μM 농도처리에서는 130.3% ( $p < 0.001$ )로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 특히, 40 μM 농도의 rosmarinic acid 처리에서는 양성대조군인 vitamin E 활성값인 157.3% ( $p < 0.001$ )의 80%와 거의 동등한 값을 나타냈다(Table 6).

## 7. 지질과산화(lipid peroxidation) 측정

Rosmarinic acid에 대한 지질과산화의 조사에 있어서 20 μM 농도의 rosmarinic acid 처리에서는 지질과산화가 대조군에 비하여 75.7%로 나타났으며, 40 μM 농도처리에서는 58.4%로 나타나 모두 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다. 따라서, 지질과산화 억제능은 각각 24.3% ( $p < 0.01$ )와 41.6% ( $p < 0.001$ )로 모두 유의하게 증가하였다. 특히, 40 μM 농도처리에서는 양성대조군인 vitamin E의 활성값인 62.7%와 근접한 값을 보였다(Table 7).

## 고 찰

AlCl<sub>3</sub>의 세포독성의 조사에서 AlCl<sub>3</sub>는 배양 C6 glioma 세포에 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시킴으로서 독성효과를 나타냈으며 Borenfreund와 Puerner [15]의 독성판정기준에 의하여 중간독성인 것으로 나타났다. 본 실험 결과는 Crapper 등[19]이 뇌조직에 처리한 알루미늄이 신경세포 내 신경원섬유의 퇴화를 보임으로서 세포독성을 나타냈다는 연구보고나, Han 등[20]이 흰쥐에 AlCl<sub>3</sub>를 처리한 결과 간과 허파에 심한 독성을 나타냈다는 연구보고의 결과와 일치하였다.

**Table 7.** The effect of rosmarinic acid on lipid peroxidation determined at a wavelength of 500 nm

Treatment	Lipid peroxidation (500 nm)	
	Mean±SD	% of control
Concentrations of rosmarinic acid (μM)		
Control	0.346±0.02	100
10 μM vitamin E	0.130±0.01	37.3**
20	0.262±0.01	75.7**
40	0.202±0.02	58.4***

Vitamin E was used as positive control. The data indicate the mean±SD for 3 times on triplicate experiments. Significantly different from the control.

\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

이 같은 AlCl<sub>3</sub>의 세포독성은 AlCl<sub>3</sub>가 세포내 단백질합성계의 손상이나 또는 DNA나 RNA와 같은 핵물질의 손상에 의한 영향도 간과할 수는 없겠지만[21], 그 보다는 알루미늄의 독성이 산화적 손상과 깊은 관련이 있다는 것을 고려할 때[22], 아마도 AlCl<sub>3</sub>에 의한 세포내 항산화 효소의 손상이나 전자전달계의 활성저해와 같은 원인이 더 클 것으로 생각된다. 이 같은 이유의 하나로서 본 실험에서 AlCl<sub>3</sub>의 세포독성이 항산화제인 vitamin E에 의하여 감소되었다는 결과가 이를 증명하고 있다.

한편, vitamin E의 항산화능 조사에 있어서, 자유라디칼의 일종인 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 대한 vitamin E의 처리에서 vitamin E는 처리한 농도에 비례하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 손상된 세포생존율을 유의하게 증가시켰으며( $p < 0.001$ ), 특히 10 μM 농도처리에서는 80% 이상의 높은 항산화능을 나타냈다(Table 2). 따라서, vitamin E가 강력한 자유라디칼의 일종인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 독성을 방어함으로써 라디칼 제거능을 입증하였으며 또한, 이 같은 증거로는 Vatassery [23]에 의해 vitamin E가 vitamin C와 같이 peroxynitrite와 같은 독성이 강한 자유라디칼을 제거하는데 유효한 효능을 나타냈다는 보고나 Cho 등[24]이 자유라디칼인 xanthine oxidase (XO)로 손상된 세포생존율을 vitamin E가 유의하게 증가시켰다는 연구 결과들이 vitamin E가 강력한 항산화제라는 것을 증명하고 있다.

본 실험에서 AlCl<sub>3</sub>의 독성에 대한 vitamin E의 영향을 조사한 결과 vitamin E는 AlCl<sub>3</sub>의 독성을 유효하게 방어한 것으로 나타남으로써 AlCl<sub>3</sub>의 독성이 산화적 손상과 관련이 있다는 것을 알 수 있었다. 알루미늄은 쉽게 혈액-뇌관문(blood-brain barrier, BBB)을 통과하여 뇌세포에 손상을 주게 되는데 이 경우 세포손상이 산화적 손상에 의한 경우 AlCl<sub>3</sub>가 수은이나 크롬과 같이 자유라디칼을 생성하여 세포에 직접 영향을 주었거나[25], 또는 항산화계에 속하는 항산화 효소의 기능저해나 전자전달계에 손상을 초래함으로써 세포사멸을 유도하였을 가능성이 클 것으로 생각된다.

한편, AlCl<sub>3</sub>의 독성에 대한 rosmarinic acid의 영향에 관한 조사에 있어서 rosmarinic acid가 AlCl<sub>3</sub>의 독성을 방어하였는데, 이는 아마도 rosmarinic acid의 주성분이 항산화능이 강한 polyphenol로 이루어져 있어[12], 이로 인해 AlCl<sub>3</sub>에 의한 산화적 손상을 방어한 결과일 것으로 생각된다. 이 같은 이유의 하나로 Lee 등[26]에 의해 rosmarinic acid가 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이나 질소산소종(nitric oxide species, NOS)과 같은 자유라디칼을 제거하였다는 연구 보고가 이를 증명해 주고 있다. Polyphenol은 flavonoid나 isoflavone과 같은 페놀화합물의 일종으로 분자구조 내의 수산기(-OH)의 작용으로 인하여 강한 결합력을 형성함으로써 항산화를 비롯한 항균이나 항독과 같은 유효한 생리활성을 가지고 있다고 알려져 있다[27]. 위에서 살펴본 바와 같이 rosmarinic acid는 vitamin E처럼 유효한 항산화능 뿐만 아니라 그 밖에도 항염작용에도 탁월한 효능이 있으며, 이의 성분들이 민트류(mints)와 같은 허브에 다량 함유되어 있어 간편하면서도 저렴하게 추출할 수 있는 잇점이 있다. 더욱이 rosmarinic acid는 천연성분으로서 기존의 화학치료제에 비하여 안전하여 부작용이 없으며 또한 효능이 뛰어나다는 장점이 있다[12]. 따라서, 본 연구에서는 rosmarinic acid의 항산화능에 대하여 알아 보았다.

먼저 전자공유능에 대한 조사에서 20 μM과 40 μM의 rosmarinic acid 처리에서 대조군에 비하여 공유능이 유의하게 높게 나타남으로서 rosmarinic acid가 자유라디칼 제거능의 효과가 있음을 말해 주고 있다. 이 같은 공유능 효과는 rosmarinic acid의 성분중 polyphenol과 같은 항산화능이 강한 성분의 영향인 것으로 생각된다[28]. 본 결과는 Osakabe [12]나 Lee 등 [26]이 rosmarinic acid의 자유라디칼 제거능이나 지질과산화 억제능을 보고한 연구 결과와도 일치하였다. 전자공여능 측정법은 자유라디칼에 전자를 공여함으로써 산화를 억제시킬 수 있는 능력을 측정할 수 있는 정량법으로 산화적 손상에 대한 항산화능을 분석하는데 널리 사용되고 있다[16].

한편, rosmarinic acid의 SOD-유사 활성능 조사에 있어서, 20 μM과 40 μM rosmarinic acid의 처리에서 대조군에 비하여 모두 유사 활성이 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ ). 본 실험 결과는 rosmarinic acid가 SOD와 유사한 자유라디칼 제거를 위한 효소활성이 있음을 말해주고 있으며, 이 같은 항산화 활성은 본 실험에서 행한 전자공여능의 분석과도 일치함을 알 수 있었다. 인체의 항산화계에서는 대사과정 중에 생성된 hydroxyl anion radical ( $\bullet\text{OH}^{-1}$ )이나 superoxide anion radical ( $\bullet\text{O}^{-2}$ )과 같은 자유라디칼을 SOD를 비롯한 catalase나 glutathione peroxidase (GSHpx)와 같은 항산화 효소들이 물로 변환시켜

줌으로서 인체에는 아무런 영향을 미치지 않게 된다[29].

지질과산화 억제능의 분석에 있어서 20 μM과 40 μM rosmarinic acid 처리에서 모두 지질과산화의 높은 억제능을 보였다( $p < 0.001$ ). 본 실험 결과는 rosmarinic acid가 막의 지질과산화를 억제함으로써 세포손상을 방어하였음을 말해주고 있으며[30], 이는 본 실험의 전자공여능 분석이나 SOD-유사활성의 분석 결과와도 일치함을 알 수 있었다. 지질과산화분석은 산화적 손상에 의하여 막을 구성하고 있는 인지질 등을 산화시킴으로서 나타나는 막손상 정도를 측정하는 정량분석 방법의 하나이다. 그러나 rosmarinic acid와 같은 천연물질에 대한 성분활성을 항산화 측면에서 규명하기 위하여서는 세포내 항산화계와 관련된 신호전달계나 또는 산화적 손상으로 인한 세포고사와 관련이 깊은 수용체와 같은 측면에서 지속적으로 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 요약

치매유발제인 AlCl<sub>3</sub>에 대한 rosmarinic acid의 영향을 알아보기 위하여 뇌세포종인 배양 C6 glioma 세포를 배양한 후 세포 생존율을 비롯한 전자공여능(electron donating ability, EDA), SOD-유사활성(superoxide dismutase-like activity) 및 지질과산화(lipid peroxidation) 억제능을 조사하였다. 본 연구에서 AlCl<sub>3</sub>는 배양 세포에 농도 의존적으로 세포생존율을 대조군에 비하여 유의하게 감소시킴으로서 세포독성을 나타냈다. 또한, AlCl<sub>3</sub>의 XTT<sub>50</sub>값이 142.2 μM에서 나타남으로 이는 Borenfreund와 Puerner의 독성판정기준에 의하여 중간독성(mid-toxic)인 것으로 나타났다. 한편, rosmarinic acid가 AlCl<sub>3</sub>에 미치는 영향에 있어서, 40 μM rosmarinic acid 처리에서는 AlCl<sub>3</sub>만의 처리에 비하여 세포생존율을 유의하게 증가시킴으로서 AlCl<sub>3</sub>의 산화적 손상으로부터 세포손상을 보호하였다. 또한 rosmarinic acid는 전자공여능을 비롯한 SOD-유사활성 및 지질과산화의 억제효과를 보임으로서 항산화능을 나타냈다. 이상의 결과로부터 산화적 손상이 AlCl<sub>3</sub>의 독성에 관여하고 있으며, rosmarinic acid는 항산화능에 의하여 AlCl<sub>3</sub>의 독성을 효과적으로 방어하였다. 따라서, rosmarinic acid와 같은 천연성분은 치매와 같이 산화적 손상과 관련된 병변의 치료적 개선을 위한 천연 소재로서의 가능성을 제시하였다.

Acknowledgements: None

Funding: None

Conflict of interest: None

## REFERENCES

- McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanism in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 1998;33(5): 371-378.
- Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pietra C, Villetti G, Kendrick, et al. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2919, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294:187-194.
- Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lemdon CL, Ossa J, Sadio TC, et al. The E280A presenilin-1 Alzheimer mutation procedures increased alpha-beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med.* 1996;2(10):1146-1150.
- Kimberly WT, Xia W, Rahmati T, Wolfe MS, Selkoe DJ. The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for secretase activity and amyloid-protein generation. *J Biol Chem.* 2000;275(5):3173-3178.
- Bryan-Sisneros AA, Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB, Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminal fragment and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  gradients. *Neuroreport.* 2000;11(15):3357-3360.
- Yu G, Nishimura M, Arakawa S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, et al. Nicastrin modulates presenilin mediated notch/glp-1 signal transduction and APP processing. *Nature.* 2000;407:48-54.
- Steiner H, capell A, Pesold B, Citron M, Kloetzel PM, Selkoe DJ, et al. Expression of Alzheimer's disease associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J Biol Chem.* 1998;273:32322-32331.
- Klein GL. Nutritional aspects of aluminum toxicity. *Nutr Res Rev.* 1990;3(1):117-141.
- Kontush A. Amyloid-beta: an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(9):1120-1131.
- Yamamoto T, Yaksh TL. Comparison of the antinociceptive effects of pre- and post-treatment with intrathecal morphine and MK-801, an NMDA antagonist, in the formalin test in the rat. *Anesthesiol.* 1992;77(4):757-763.
- Kim TY, Jekal SJ. Antioxidative effect of *Chelidonium majus* extract on cultured NIH3T3 fibroblasts injured by cadmium chloride of toxicant. *Kor J Clin Lab Sci.* 2016;48(1):1-7.
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Sanbongi C, Kato Y, Osawa T, et al. Rosmarinic acid, major polyphenolic compound of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(6):798-806.
- De-Heredia JB, Torregrosa J, Dominguez JR, Peres JA. Kinetic model for phenolic compound oxidation by Fenton's reagent. *Chemosphere.* 2001;45(1): 85-90.
- Park ST, Choi MK, Lee KC, Cho KH, Jeon BH, Woo WH. Study on the effect of vitamin E on methylmercury in cultured spinal motor neurons. *Kor J Oriental Med Pathol.* 2000;14(3):7-10.
- Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth.* 1984;9(1):7-9.
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;26:1199-1200.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974;47(3): 468-474.
- Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci.* 1993;58(6):1470-1410.
- Crapper DR, Krishnan SS, Dalton AJ. Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Sci.* 1973;180:511-513.
- Han SH, Kim IS, Kim JM. Effects of aluminum compound in lung and liver tissues of rat. *Kor J Gerontol.* 1997;7(2):24-28.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-protein reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-271.
- Linert W, Bridge MH, Huber M, Bjugstad KB, Grossman S, Arendash GW. In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine: relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Biochem Biophysiol.* 1999;1454(2):143-152.
- Vatassery GT. Oxidation of vitamin E, vitamin C, and thiols in brain synaptosomes by peroxynitrite. *Biochem Pharmacol.* 1996;52(4):579-586.
- Cho CG, Kim HM, Park ST. Effect of vitamin E on cultured mouse cerebral neurons damaged by oxidative stress. *Kor J Gerontol.* 1998;8(3):17-22.
- Jesberger JA, Richardson JS. Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int Neurosci.* 1991;57:1-17.
- Lee JY, No JK, Soung DY, Kim YJ, Je JH, Kim MS, et al. ROS/RNS scavenging activity of rosmarinic acid. *Kor J Gerontol.* 2005; 15(2):10-16.
- Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, DE Vivo I, Rosen B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2007; 121(10):2225-2232.
- Sanbongi C, Takano H, Osakabe N, Sasa N, Natsume M, Yanagisawa R, et al. Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(8):1060-1069.
- Rosen D, Siddique T, patterson D, Figlewicz D, Sapp P. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993;362: 59-62.
- Hall E, Braughler JM. Lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. *CNS Trauma.* 1986;3(4):281-294.