

신경세사 단백질의 산화적 손상에 엄나무 발효물이 미치는 영향

강정훈[†]

청주대학교 바이오메디컬학과
(2018년 2월 16일 접수; 2018년 3월 15일 수정; 2018년 3월 19일 채택)

Effects of Fermented *Kalopanax pictus* on oxidative damage of neurofilament protein

Jung Hoon Kang[†]

Department of Biomedical Science, Cheongju University, Chungbuk 28160, Korea
(Received February 16, 2018; Revised March 15, 2018; Accepted March 19, 2018)

요약 : 본 연구는 신경퇴행성질환과 밀접한 관련이 있는 neurofilament-L(NF-L)의 산화적 손상에 엄나무 발효물이 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 용액 상에서 peroxy radical을 생성하는 AAPH를 처리하여 NFL의 산화적 변형을 유도하고 엄나무 추출물(KP), 노루궁뎅이버섯 균사체 추출물(HE), 엄나무 발효물(KP-HE)을 각각 처리하여 어떤 영향을 미치는 지를 알아보고자 하였다. KP와 HE는 peroxy radical에 의한 NF-L의 산화적 손상을 막지 못했으나 KP-HE는 NF-L의 변형을 효과적으로 억제하였다. KP-HE는 peroxy radical에 의한 NF-L 변형에서 나타나는 dityrosine 형성을 효과적으로 억제하였고 peroxy radical 소거활성도 증가시켰다. 파킨슨병 환자에서 발견되는 신경독성물질인 tetrahydropapaveroline(THP)에 의한 NFL의 변형에 KP, HE, KP-HE가 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 KP-HE는 KP와 HE에 비해서 THP에 의한 NF-L의 변형을 효과적으로 억제하는 것으로 관찰되었다. 또한 KP-HE는 THP에 의한 NF-L 변형에서 나타나는 dityrosine 형성도 효과적으로 억제하였고 THP에 의해 유도되는 활성산소 생성도 현저히 감소시켰다. 이와 같은 결과들은 KP-HE가 활성산소와 신경독성물질에 의한 산화적 스트레스로부터 세포를 보호해 줄 수 있을 것으로 사료되었다. 그러므로 엄나무 발효물은 신경퇴행성질환을 예방할 수 있는 식품소재로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

주제어 : 엄나무, 활성산소, 신경세사단백질, 신경독성물질, 신경퇴행성질환

Abstract : This study was to investigate the effect of the extract(KP-HE) from *Kalopanax pictus*(KP) fermented with *Hericium erinaceum*(HE) mycelium on oxidative modification of neurofilament-L(NF-L) which is closely related to neurodegenerative disorders. The oxidative modification of NF-L was induced by AAPH producing peroxy radicals in solution, and KP, HE, and KP-HE was investigated. KP and HE did not protect NF-L against peroxy radical-mediated NF-L modification whereas KP-HE significantly prevented NF-L modification induced by peroxy radical. KP-HE inhibited the formation of dityrosine in oxidative modification of NF-L and

[†]Corresponding author
(E-mail: jhkang@cju.ac.kr)

stimulated the peroxy radical scavenging activity. The effects of KP, HE, and KP-HE on the modification of NF-L by tetrahydropapaveroline(THP), a neurotoxin found in patients with Parkinson's disease was investigated. KP-HE also prevented THP-mediated NF-L modification as compared to KP and HE. In addition, KP-HE significantly inhibited the formation of dityrosine in oxidative modified NF-L and enhanced the inhibition of reactive oxygen species(ROS) was generated by THP. The results suggested that KP-HE can contribute to protected cell from oxidative stress was induced by ROS and neurotoxin. Therefore, KP-HE could potentially be used as a valuable functional food ingredient to prevent neurodegenerative disorders.

Keywords : *Kalopanax pictus*, *reactive oxygen species*, *NF-L*, *neurotoxin*, *neurodegenerative disorder*

1. 서론

최근 급격한 인구 고령화에 따라 향후 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disorders)의 유병률 및 관련 의료비용이 지속적으로 증가할 것으로 예상된다. 이에 따라 효과적 치료제 개발과 예방법에 대한 요구가 확대되고 있다. 신경퇴행성질환에는 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성경화증, 헌팅턴병, 근위축성 측삭경화증 등이 포함된다. 신경퇴행성질환은 노화에 따른 신경퇴화, 유전적 요인, 환경적 요인들로 인한 단백질 응집으로 신경 세포가 사멸돼 일어나는 것으로 알려져 있다. 그러나 아직 정확한 원인 규명 및 근본적인 치료제 개발에 대한 보고는 미흡한 실정이다. 지금까지 알려진 신경퇴행성질환의 직접적인 발병 원인으로 neuronal intermediate filament 단백질의 비정상적인 변형이나 축적이 보고된 바 있다[1]. Intermediate filament의 type 4에 해당하는 neurofilaments(NFs)는 중추신경계와 말초신경계의 neuron 내에 밀집되어 있으며, 크기에 따라 68 kDa의 neurofilament-low(NF-L), 160 kDa의 neurofilament-medium(NF-M), 200 kDa의 neurofilament-high(NF-H)로 존재한다[2]. NF-L은 다른 NFs와 다르게 성인 이후에도 발현되기 때문에 다른 신경세사 단백질들 중 가장 많은 부분을 차지하고 있으므로 NF-L의 변형은 퇴행성 신경질환의 발병원인과 밀접한 관계가 있는 것으로 예상된다. 대표적 신경퇴행성질환인 파킨슨병을 앓고 있는 환자들의 경우 뇌의 흑색질에서 Lewy body라고 하는 비정상적인 단백질 응집체가 발견되었다[3]. Lewy body 형성은 신경단백질이 변형, 축적되어 형성되는 것으로 알려져 왔고 질병의 진행에 주된 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 신경단백질이 변형되는 원인 중 하

나는 활성산소종에 의한 산화적 스트레스에 기인한다는 보고가 있으며 도파민의 비정상적 대사물인 tetrahydropapaveroline(THP)에 의한 NF-L의 변형도 보고된 바 있다[4].

엄나무(*Kalopanax pictus*)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 활엽수로서 각종 비타민과 무기질, 사포닌 등이 함유되어 있으며 거풍습, 활혈, 소종 작용이 있다. 그밖에 위액 분비 항진, 거담 작용이 있으며 진통 소염작용이 있어 신경통, 근육통, 관절염, 요통, 암 예방 등에 널리 사용하고 있다. 최근에는 엄나무 햇순의 데침에 따른 영양학적 특성변화, 잎 추출물의 항산화효과와 줄기로부터 항산화 활성 물질의 분리동정 등 많은 연구가 보고되고 있다[5,6].

한편 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*)은 동남아시아, 유럽, 일본 등에 분포되어 가을철 활엽수의 고목이나 생목에서 주로 발생한다. 노루궁뎅이버섯은 탄수화물, 아미노산, 무기염류 및 비타민 등이 풍부하며 치매억제 기능의 성분인 신경성장인자(NGF)가 분리되었고[7] 노화를 억제하는 기능이 있다는 사실도 보고되었으며[8] 항암 활성과 면역증강 활성, 콜레스테롤 저하 및 항산화 활성 등을 가지고 있다고 알려져 있다 [9,10]. 또한, 노루궁뎅이버섯의 인지능력 개선 효능이 알려지면서 치매의 예방효과도 제시되고 있다[11]. 현재까지 엄나무의 항염증, 간 보호 등의 생리활성에 관한 연구가 보고되었으며[12], 노루궁뎅이버섯의 생리활성에 관한 항산화, 치매, 항암효과 등의 연구는 진행되었으나[6,13] 버섯균사체를 이용한 엄나무 발효물의 생리활성에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 신경퇴행성질환에서 나타날 수 있는 신경단백질의 산화적 손상에 엄나무 발효물이 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

본 연구에 사용한 엽나무(*Kalopanax pictus*; KP)는 2013년 7월에 충청북도 제천에서 채취한 것을 사용하였으며, 노루궁뎅이 버섯(*Hericium erinaceum*; HE)균사체는 충북농업 기술원 (Chungbuk, Korea)으로부터 분양받아 potato dextrose agar(PDA, Difco, Detroit, MI, USA) 사면배지에서 25°C에서 10일간 배양한 후 4°C에서 보존한 노루궁뎅이 버섯균사체를 사용하였다. Tetrahydropapaveroline(THP), Coomassie brilliant blue R-250, EGTA 등은 Sigma 사의 제품을 사용하였다. 2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride(AAPH)는 Wako(Chuo-Ku, Osaka, Japan)에서 구입한 시약을 사용하였고 그 밖에 실험에 사용한 모든 시약은 시중에서 구입한 최상품을 사용하였다.

2.2. 엽나무의 발효

엽나무의 1.5배수의 정제수를 첨가하여 4시간 동안 침지 시킨 후 고온고압멸균기에 121°C에서 2시간 동안 멸균한 후 10%의 노루궁뎅이버섯 균사체를 접종하여 25°C에서 30일간 배양한 후 60°C에서 2일간 건조시켜 발효 엽나무를 제조하였다. 이 발효물의 열수 추출물을 제조하기 위하여 엽나무 발효물에 20배의 증류수를 첨가하고 homogenizer(Ultra-turrax T-50, KG-IKA-Labortechnik, Staufen, Germany)로 5,000 rpm에서 10분간 분쇄한 후 열수 추출하였으며, 여과지(No. 2, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 잔사와 추출액을 분리하고 잔사는 다시 반복 추출 하였다. 3회 반복 추출하였으며 총 열수 추출액을 4°C에서 30분 동안 8,000 x g로 원심분리하여 불용성 침전물을 제거하고 상층액을 농축 및 동결건조 하여 실험에 사용하였다.

2.3. NF-L의 발현 및 정제

Full-length neurofilament-L cDNA가 포함된 대장균을 ampicillin이 첨가된 LB 배양액 500 ml에 넣고 37°C에서 3 시간 배양하였다. 여기에 IPTG가 0.5 mM 되게 첨가해 준 후 다시 37°C에서 3 시간 배양하여 sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 통해 발현정도를 확인하였다. 배양액으로부터 세포를 수집하여 Kim 등의 방법[14]을 변형하여

단백질을 정제하였다. 수집한 세포에 standard filament forming buffer(50 mM MES, 170 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 6.25)를 2배의 부피로 넣어준 후 잘 용해하였다. 이 세포용액을 french pressure (pressure of 20,000 p.s.i)로 파쇄하여 4°C에서 15 분 동안 8,000 x g로 원심분리 한 후 얻은 상층액을 단백질의 filament forming을 위해 37°C에서 3 시간 동안 방치하였다. 이 상층액을 100,000 x g에서 20 분간 초원심분리 한 후 침전물을 최소량의 urea buffer(25 mM sodium phosphate, 6 M urea, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7.5)로 용해하여 4°C에서 30 분 동안 10,000 x g로 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 얻어 DEAE sepharose column (3×15 cm)을 사용하여 정제하였다. 단백질이 있는 부분을 SDS-PAGE로 확인한 후 모아 amicon concentrator로 농축시켰다. 정제된 단백질은 -70°C에 보관하면서 여러 실험에 사용하였다.

2.4. 단백질의 산화적 손상에 대한 보호 효과

단백질의 산화적 손상에 대한 보호 효과를 확인하기 위해 SDS-PAGE 방법을 이용하였다. 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 완충 용액에 NF-L(0.2 mg/mL)과 50 mM AAPH를 첨가하여 6시간 동안 반응을 시켰다. 또한 같은 조건에서 AAPH 대신 0.1 mM THP를 첨가하여 24시간 동안 반응을 시켰다. 반응물을 4-20% SDS Precast gel(Komabiotech, Korean)을 사용하여 SDS-PAGE하였다. Coomassie brilliant blue R-250으로 단백질을 염색하고 탈색한 후 gel 상의 단백질 띠의 변화를 관찰하였다.

2.5. Dityrosine 측정

Dityrosine을 측정하기 위하여 50 mM AAPH 또는 5 mM THP를 함유한 10 mM potassium phosphate (pH 7.4) buffer에 NF-L(0.2 mg/mL)을 첨가하여 37°C에서 2 시간 동안 반응 시켰다. 각 반응액을 spectrofluorometer CYT3MF(BioTek Instruments, Winooski, USA)를 이용하여 excitation spectrum 330 nm, emission spectrum 360-460 nm 영역에서 형광 광도를 측정하였다.

2.6. Peroxyl radical 소거활성

Peroxyl radical 소거활성을 Ohkawa 등의 방법[15]을 변형하여 측정하였다. 50 mM AAPH와

10 mM 2-deoxy-D-ribose를 함께 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응 시키고, 1X PBS 용액, 2.8% TCA 용액, 1% TBA 용액을 각각 200 μ L씩 첨가하고 100°C에서 10분간 가열한다. 반응액을 10,000 x g에서 10분간 원심분리한 후 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다. Peroxyl radical 소거활성은 다음 식(1)에 의해 백분율로 나타내었다.

$$\text{Peroxyl radical scavenging activity (\%)} = \{1 - (A_{\text{Experiment}}/A_{\text{Control}})\} \times 100 \quad (1)$$

2.7. 활성산소 측정

활성산소는 deoxyribose assay로 측정 하였다. 활성산소는 2-deoxy-D-ribose를 분해하여 thiobabutaric acid와 반응할 수 있는 물질인 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)로 전환된다. 따라서, TBARS의 양을 측정함으로써 활성산소 생성정도를 관찰하였다[16]. 10 mM potassium phosphate (pH 7.4)완충용액, 1 mM THP, 10 mM 2-deoxy-D-ribose가 포함되게 한 후 37°C에서 2 시간 동안 반응 시켰다, 반응 혼합물에 0.2 ml PBS와 TBARS 발색시약(2.8% TCA, 1% TBA가 포함된 50 mM NaOH 용액)을 0.4 ml 넣은 후 100°C에서 10 분간 반응 시켰다. 반응 혼합물은 10,000 x g에서 10 분간 원심분리 한 후 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정 하였다.

2.8. 통계처리

실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험값은 3회 이상 반복 실시한 결과를 평균 \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 95%($P < 0.05$)의 유의수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 구간의 유의적 차이를 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Peroxyl radical에 의한 NF-L의 산화적 손상에 대한 보호 작용

NF-L은 파킨슨병, 알츠하이머병, 신경성 근위축증 등 많은 신경퇴행성질환들과 밀접한 관련이 있는 신경단백질이다. NF-L의 비정상적인 변형은 신경세포의 사멸과 함께 나타나며, 이러한 현상은 여러 신경퇴행성질환 유발에 중요한 원인으로 제시되고 있다[17]. NF-L 단백질에 50 mM AAPH를 처리하여 peroxyl radical에 의한 산화적 손상을 유발한 후 옴나무 추출물(KP), 노루궁뎅이버섯 균사체 추출물(HE), 옴나무 발효물(KP-HE)을 각각 처리하여 단백질 보호 영향을 알아보았다. NF-L 단백질이 peroxyl radical에 의해 산화적 손상이 일어나 단백질 응집이 관찰되었다(Fig. 1A, B, C; lane 2). KP, HE를 농도별로 처리한 반응에서는 단백질 응집이 거의 억제되지 않았다(Fig. 1A, B). 반면, KP-HE를 농도별로 처리한 결과 0.5 mg/mL의 농도에서 대조군에 비해 산화적 손상 보호 효과가 나타났으며 1 mg/mL의 농도로 처리한 결과에서는 현저한 보호 효과를 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 1C). NF-L 단백질 띠를 밀도 측정기로 측정된 결과 농도별 KP, HE를 처리한 단백질 띠의 밀도가 AAPH만을 처리한 군과 동일하게 거의 관찰되지 않았다. 반면, KP-HE를 1 mg/mL의 농도로 처리한 결과에서는 산화적 손상이 일어난 대조군에 비하여 74% 이상 보호 효과를 가지는 것으로 확인되었다(Fig. 1D). 또한 KP-HE를 농도별로 처리한 결과 농도에 비례하여 NF-L 단백질 띠의 밀도가 유의하게 증가하였다.

Free radical은 단백질의 산화적 변형을 유도하는데 단백질의 절단뿐만 아니라 단백질 사이의 결합을 일으킨다[18]. 산화적 손상을 받은 단백질은 tyrosine 잔기가 서로 covalent cross-linking이 일어나 dityrosine이 형성하게 된다[19]. 두 개의 tyrosine side chain은 free radical에 의해 radical isomerization을 형성하고, di-radical reaction, enolization을 거쳐 최종적으로 o,o-dityrosine을 형성한다[20]. Dityrosine은 대사되지 않고 소변으로 검출되기 때문에 단백질의 변형을 측정하는 유용한 biomarker로 알려져 왔다. 본 연구에서는 peroxyl radical에 의한 NF-L의 응집에서 나타나는 o,o-dityrosine의 생성에 옴나무 발효물이 미치는 영향을 관찰하였다. NF-L(0.2 mg/mL)에 50 mM AAPH와 농도별 KP, HE, KP-HE를 첨가하여 측정하였다. KP와 HE의 경우 o,o-dityrosine cross-link의 형성이 거의 감소되지 않았으며, KP-HE는

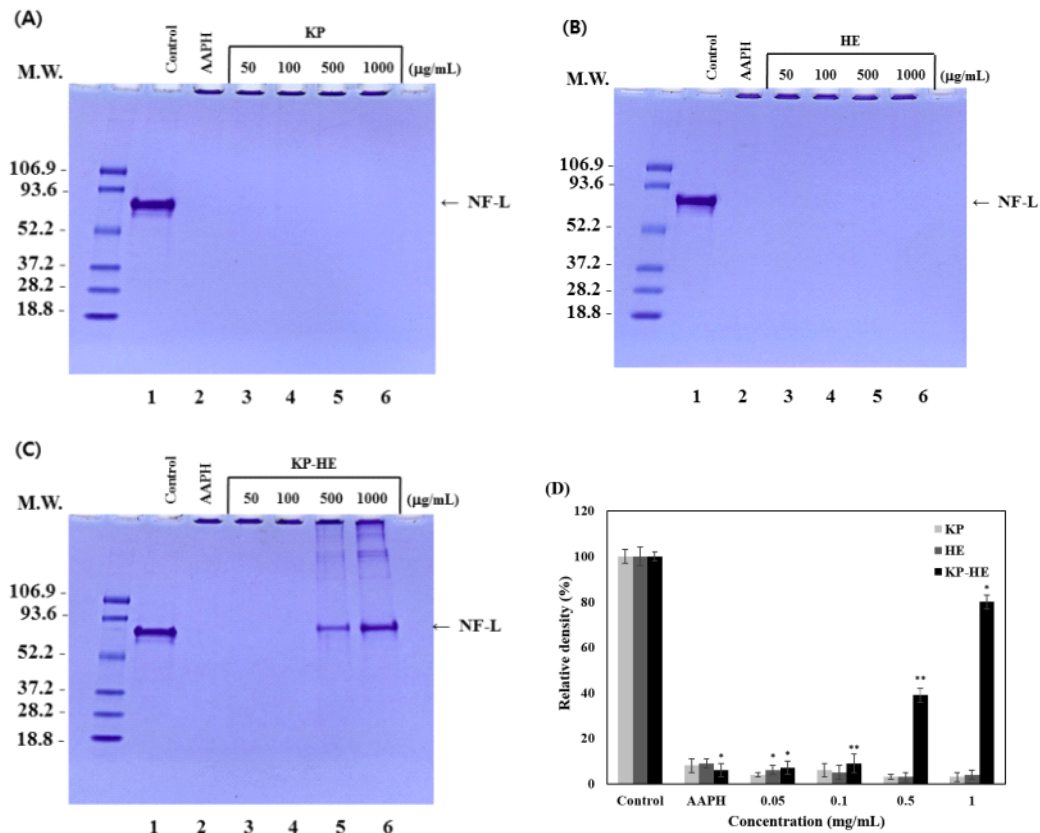


Fig. 1. Protective effects on oxidative modification of NF-L induced by peroxy radical. NF-L was incubated with 50 mM AAPH in the presence of various concentrations of KP(A) or HE(B) or KP-HE(C) at 37°C for 24h. Lane 1, control NF-L; lane 2, lane 1 + AAPH; lane 3, lane 2 + 0.05 mg/mL KP or HE or KP-HE; lane 4, lane 2 + 0.1 mg/mL KP or HE or KP-HE; lane 5, lane 2 + 0.5 mg/mL KP or HE or KP-HE; lane 6, lane 2 + 1 mg/mL KP or HE or KP-HE. (D) Relative staining intensity of SDS-PAGE gel was analyzed by densitometric scanning. The results represent the mean ± S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. *p < 0.05, **p < 0.01.

o,o-dityrosine을 현저하게 감소시켰다 (Fig. 2). Peroxyl radical에 의한 NF-L의 손상에 대한 엄나무 발효물의 보호 작용이 peroxy radical을 소거하는 것에 기인할 것으로 예상되어 thiobarbituric acid(TBA)를 이용하여 확인해 보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 KP의 경우 0.1 mg/mL 농도에서 25.22%의 peroxy radical 소거활성을 나타내었고, HE의 경우 0.1 mg/mL 농도에서 30.47%의 소거활성을, KP-HE의 경우는 같은 농도에서 52.12%의 활성을 나타내었다. 또

한 KP-HE의 경우 농도가 증가함에 따라 활성이 유의하게 증가 하는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 엄나무 발효물의 NF-L 단백질의 보호 작용은 peroxy radical 소거활성에 기인하는 것으로 사료된다.

3.2. THP에 의한 NF-L의 산화적 손상에 대한 보호 작용

파킨슨병 환자들의 경우 도파민의 양이 감소하는 것으로 알려져 있는 데[21], 이는 비정상적인

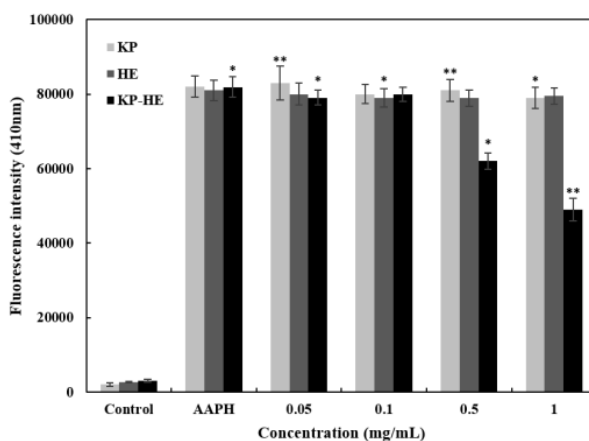


Fig. 2. Protective effects on the formation of dityrosine in AAPH-treated NF-L. The fluorescence spectra of dityrosine formation were observed when NF-L (0.2 mg/mL) was incubated with various concentrations of KP or HE or KP-HE and 50 mM AAPH in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C for 2 h. The fluorescence emission spectrum of the sample was then monitored between 360 and 460 nm (excitation, 330 nm) using CYT3MF spectrofluorometer (BioTek). The results represent the mean \pm S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. * p <0.05, ** p <0.01.

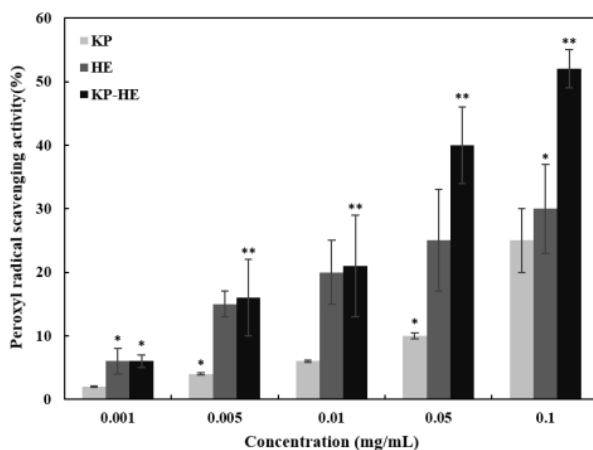


Fig. 3. Peroxyl radical scavenging activity. The reaction mixture contained 10 mM deoxyribose and 50 mM AAPH in the presence or absence of various concentrations of KP or HE or KP-HE at 37°C for 2 h. The values represent the mean \pm S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. * p <0.05, ** p <0.01.

대사작용으로 dopamine이 THP로 전환되어 세포 및 단백질에 손상을 일으켜 질환을 촉진시킬 수 있을 것으로 사료된다. THP는 dopamine과 dopamine의 알데히드 대사체인 3,4-dihydroxy phenylacetaldehyde 사이의 비효소적 Pictet-

Spengler 축합 반응을 통해 합성되는 것으로 알려져 있으며, 사람의 소변과 혈장 그리고 뇌에서 발견된다[22,23]. 최근 보고에 의하면 THP는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)를 생성하여 세포 독성을 유발하므로 신경퇴행성질환을

일으킬 수 있는 물질로 알려져 있다[4]. NF-L 단백질에 0.1 mM THP를 처리하여 산화적 손상을 유발한 후 KP, HE, KP-HE를 첨가하여 SDS-PAGE를 통해 산화적 손상에 대한 단백질 보호 작용을 확인하였다. THP를 NF-L에 처리했을 때 산화적 손상을 유발하여 단백질의 응집 현상이 일어났으며 응집된 단백질이 stacking gel 부분에 위치하였다(Fig. 4A, B, C; lane 2). KP를 농도별로 처리한 반응에서는 단백질 응집이 거의 억제되지 않았고 HE를 처리한 반응에서는

단백질 응집이 미약하게 억제되었다(Fig. 4A, B). 반면, KP-HE를 농도별로 처리한 결과에서는 0.25 mg/mL 농도에서 대조군에 비하여 단백질을 보호하기 시작하여 2.5 mg/mL 농도 이상에서는 단백질을 현저히 보호하는 것으로 나타났다(Fig. 4C). NF-L 단백질 띠를 밀도 측정기로 측정된 결과 KP를 처리한 반응에서는 THP만을 처리한 군과 동일하게 단백질 띠의 밀도가 거의 측정되지 않았고 HE를 처리한 반응에서는 고농도(5 mg/mL)에서 27% 높게 측정되었다. 반면,

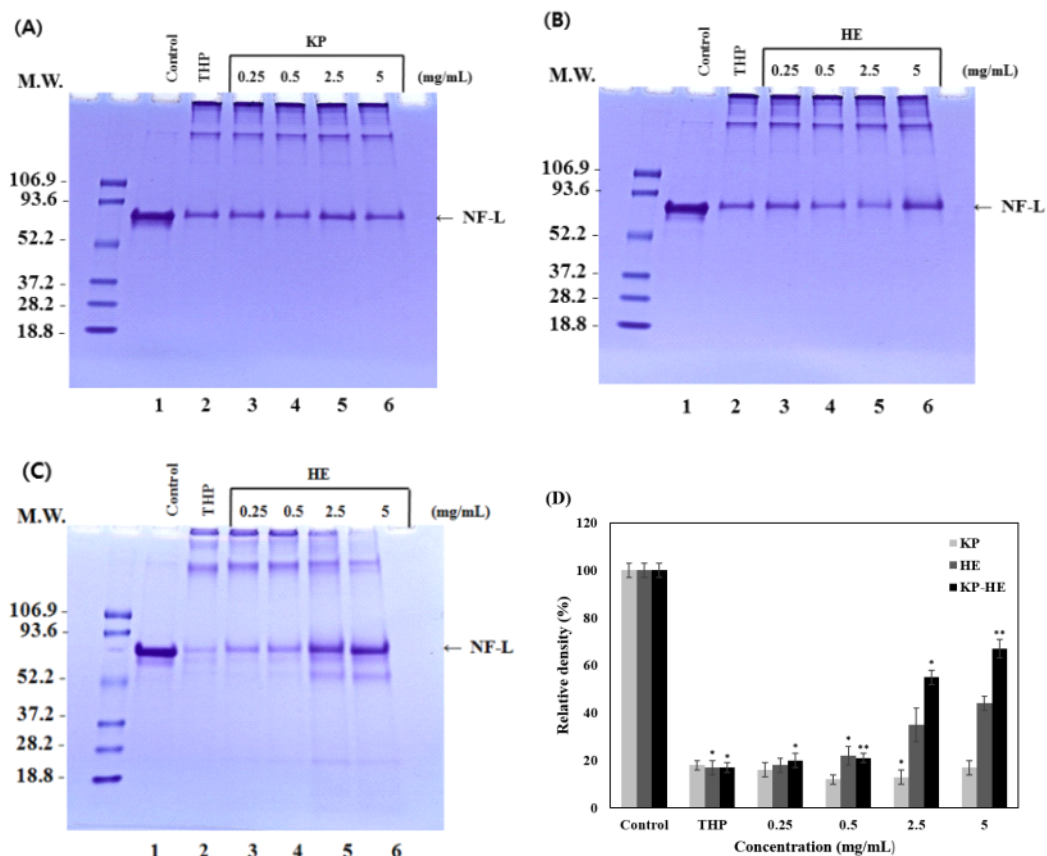


Fig. 4. Protective effects on oxidative modification of NF-L induced by THP. NF-L was incubated with 0.1 mM THP in the presence of various concentrations of KP(A) or HE(B) or KP-HE(C) at 37°C for 24 h. Lane 1, control NF-L; lane 2, lane 1 + THP; lane 3, lane 2 + 0.25 mg/mL KP or HE or KP-HE; lane 4, lane 2 + 0.5 mg/mL KP or HE or KP-HE; lane 5, lane 2 + 2.5 mg/mL KP or HE or KP-HE; lane 6, lane 2 + 5 mg/mL KP or HE or KP-HE. (D) Relative staining intensity of SDS-PAGE gel was analyzed by densitometric scanning. The results represent the mean \pm S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

KP-HE를 처리한 반응에서는 0.25 mg/mL의 농도에서 단백질 피가 38% 높게 측정되었고 5 mg/mL 농도에서는 50% 이상 높게 측정되었다(Fig. 4D). 또한 KP-HE를 농도별로 처리한 결과 농도에 비례하여 NF-L 단백질 피의 밀도가 유의하게 증가하였다. 따라서 엄나무 발효물은 THP에 의한 NF-L 단백질의 산화적 손상 보호 기능도 월등히 높은 것으로 사료되었다.

THP에 의한 NF-L의 응집에서도 o,o-dityrosine이 형성된다는 보고가 있어[4] NF-L(0.2 mg/mL)에 5 mM THP와 농도별 KP, HE, KP-HE를 첨가하여 o,o-dityrosine을 측정 한 결과 KP는 o,o-dityrosine cross-link의 형성을 거의 억제하지 않았고 HE는 o,o-dityrosine 형성을 다소 감소 시켰다. 반면, KP-HE는 1 mg/mL 농도에서 o,o-dityrosine을 50% 이상 감소시켰다(Fig. 5).

최근 연구결과에 의하면 THP에 의한 단백질의 변형이 활성산소의 생성에 기인한다는 보고가 있다[4]. 따라서, THP에 의한 신경세사 단백질의 손상 억제가 활성산소의 소거기능에 의한 것인지를 관찰하였다. KP의 경우 1 mg/mL 농도에서 활성산소 생성을 25.25% 억제하였고, HE의 경우

1 mg/mL 농도에서 40.18% 억제하였으며 KP-HE의 경우는 같은 농도에서 59.47%의 억제를 나타내었다(Fig. 6). 또한 KP, HE 및 KP-HE 모두 농도가 증가함에 따라 억제정도가 유의하게 증가 하는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 엄나무 발효물의 NF-L의 보호 작용은 활성산소 소거 작용에 기인하는 것으로 사료되었다.

4. 결론

본 연구는 신경퇴행성질환에서 발견되는 neurofilament-L(NF-L)의 산화적 손상에 엄나무 발효물이 미치는 영향을 알아보려 하였다. 용액 상에서 peroxy radical을 생성하는 AAPH와 파킨슨병 환자에서 발견되는 신경독성물질인 tetrahydropapaveroline(THP)를 이용하여 NF-L의 산화적 변형을 유도하고 엄나무 추출물(KP), 노루궁뎅이버섯 균사체 추출물(HE), 엄나무 발효물(KP-HE)의 영향을 비교 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

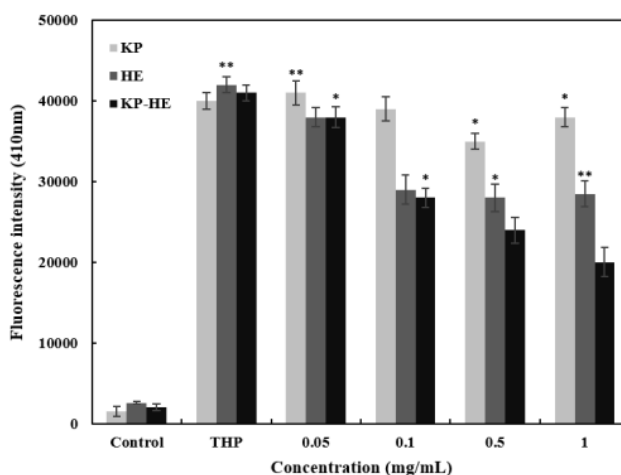


Fig. 5. Protective effects on the formation of dityrosine in THP-treated NF-L. The fluorescence spectra of dityrosine formation were observed when NF-L (0.2 mg/mL) was incubated with various concentrations of KP or HE or KP-HE and 5 mM THP in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C for 2 h. The fluorescence emission spectrum of the sample was then monitored between 360 and 460 nm (excitation, 330 nm) using CYT3MF spectrofluorometer (BioTek). The results represent the mean \pm S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. * p <0.05, ** p <0.01.

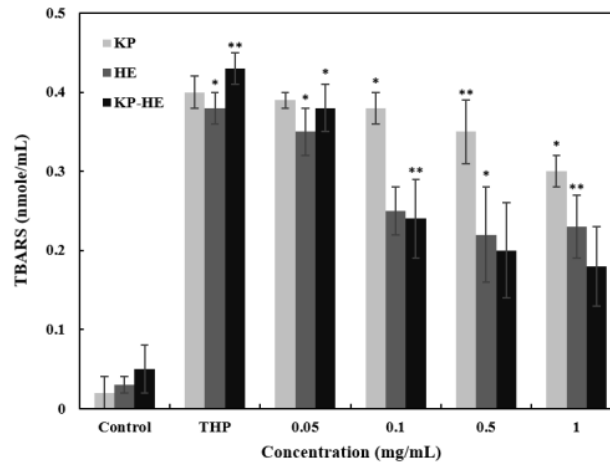


Fig. 6. Inhibitory effect on oxygen radical formation. The reaction mixture contained 10 mM deoxyribose and 1 mM THP in the presence or absence of various concentrations of KP or HE or KP-HE at 37°C for 2 h. The values represent the mean±S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control. *p<0.05, **p<0.01.

1. KP-HE는 1 mg/mL의 농도에서 peroxy radical에 의한 NF-L 변형을 대조군에 비하여 74% 이상 억제하였고 dityrosine의 형성도 효과적으로 억제하였다. 또한 KP-HE는 0.1 mg/mL 농도에서 52.12%의 peroxy radical 소거활성도 촉진시켰다. 이와 같은 결과는 농도에 따라 비례적으로 증가하였다.
2. KP-HE는 5 mg/mL의 농도에서 신경독성 물질인 THP에 의한 NF-L의 변형을 대조군에 비하여 50% 이상 억제하였고 dityrosine의 형성도 효과적으로 억제하였다. 이와 같은 결과가 활성산소의 소거에 기인한 것인지 알아본 결과 KP-HE는 1 mg/mL 농도에서 THP에 의해 생성되는 활성산소의 생성을 59.47% 감소시켰다.

이와 같은 결과들을 통해 엄나무 발효물은 활성산소와 신경독성물질에 의한 산화적 스트레스로부터 세포를 보호해 줄 수 있을 것으로 사료되었다. 그러므로 엄나무 발효물은 천연 항산화 소재로서 신경퇴행성질환을 예방할 수 있는 식품소재로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. R. Perrot, J. Eyer, "Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders", *Brain Res. Bulletin.*, Vol.80, No.4-5 pp. 282-295, (2009).
2. U. Lendahl, L. B. Zimmerman, R. D. McKay, "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein", *Cell*, Vol.60, No.4 pp. 585-595. (1990).
3. K. Kosaka, S. Oyanagi, M. Matsushita, A. Hori, "Presenile dementia with Alzheimer-, Pick- and Lewy-body changes", *Acta Neuropathol. (Berl)* Vol.36, No.3 pp. 221-233, (1976).
4. I. G. Kyeong, W. S. Eum, S. Y. Choi, J. H. Kang, "Oxidative modification of neurofilament-L and neuronal cell death induced by the catechol neurotoxin, tetrahydropapaveroline" *Toxicol. Lett.*, Vol.217, No.1 pp. 59-66, (2013).
5. J. D. Hwang, J. S. Choi, J. B. Kim, S. L. Yang, "Antioxidant Activities of Bark Extracts from *Kalopanax picuts*", *J. Invest.*

- Cosmet.*, Vol.7, No.4 pp. 329–337, (2011).
6. M. H. Kim, S. Y. Park, Y. J. Jeong, K. Y. Yoon, "Sensory Properties of *Kalopanax pictus* and *Cedrela sinensis* Shoots under Different Blanching Conditions and with Different Thawing Methods", *Korean J. Food Preserv.*, Vol.19, No.2 pp. 201–208, (2012).
 7. H. Kawagishi, A. Shimada, K. Shizuki, H. Mori, H. Sakamoto, S. Furukawa, E. F. Erinacines, "Stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the myclia of *Hericium erinaceum*", *Tetrahedron Lett.*, Vol.41, No.2 pp. 7399–7402, (1996).
 8. S. H. Park, J. S. Chang, K. R. Lee, "Effect of *Hericium erinaceus* extract on cancer cell growth and expression of cell cycle associated proteins", *J of Korean Society of Food Sci. Nutr.*, Vol.32, No.6 pp. 931–936, (2003).
 9. M. A. Choi, N. Y. Park, S. M. Woo, Y. J. Jeong, S. R. Shin, "Characteristics of *Hericium erinaceus* and its extracts", *Korean J. Food Preser.,.* Vol.10, No.4 pp. 560–564, (2003).
 10. T. Mizuno, T. Wasa, H Ito, C. Suzuki, N. Ukai, "Antitumor-active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, an edible and medicinal mushrooms called yamabushiotake or houtou", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol.56, No.2 pp. 347–348, (1992).
 11. Z. Liu, Q. Wang, J. Cu, L. Wang L. Xiong, W. Wang, D. Li, N. Liu, Y. Wu, C. Mao, "Systemic Screening of Strains of the Lion's Mane Medicinal Mushroom *Hericium erinaceus*(Higher Basidiomycetes) and Its Protective Effects on A β -Triggered Neurotoxicity in PC12 Cells", *Int. J. Med. Mushrooms.*, Vol.17. No.3 pp. 19–29, (2015).
 12. T. K. Hyun, J. S. Kim, "The pharmacology and clinical properties of *Kalopanax pictus*", *J. Med. Plants Res.*, Vol.3, No.9 pp. 613–620, (2009).
 13. K. A. Yearul, K. Shuichi, "Dietary mushroom reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rat", *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, Vol.35, No.1 pp. 91–98, (1989).
 14. N. H. Kim, J. H. Kang, "Oxidative modification of neurofilament-L by copper-catalyzed reaction", *J. Biochem. Mol. Biol.*, Vol.36, No.5 pp. 488–492, (2003).
 15. H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction", *Anal. Biochem.*, Vol.95, No.2 pp. 351–358, (1979).
 16. J. A. Buege, S. D. Aust, "Microsomal lipid peroxidation", *Methods Enzymol.*, Vol.52, pp. 302–310, (1978).
 17. I. V. Mersiyanova, A. V. Perepelov. A. V. Polyakov, V. F. Sitnikov, E. L. Dadali, R. B. Oparin, A. N. Petrin, O. V. Evgrafov, "A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene", *Am. J. Hum. Genet.*, Vol.67, No.1 pp. 37–46, (2000).
 18. B. S. Berlett, E. R. Stadtman, "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress", *J. Biol. Chem.*, Vol.272, No.33 pp. 20313–20316, (1997).
 19. E. R. Stadtman, B, S, Berlett, "Fenton chemistry: amino acid oxidation", *J. Biol. Chem.*, Vol.266, No.26 pp. 17201–17211, (1991).
 20. D. O. Kim, K. W. Lee, C. Y. Lee, "Vitamin C equivalent antioxidant capacity(VCEAC) of phenolic phytochemicals", *J. Agri. Food Chem.*, Vol.50, No.13 pp. 3713–3717, (2002).
 21. R. A. Floyd, "Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Vol.222, No.3 pp. 236–245, (1999).
 22. R. Deitrich, V. Erwin, "Biogenic amine-aldehyde condensation products: tetrahydroisoquinolines and tryptolines (β

- carbolines)", *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, Vol.20, pp. 55-80, (1980).
23. F. De Marco, M. Perluigi, M. L. Marcante, R. Coccia, C. Foppoli, C. Blarzino, M. A. Rosei, " Cytotoxicity of dopamine-derived tetrahydroisoquinolines on melanoma cells", *Biochem. Pharmacol.*, Vol.64, No.10 pp. 1503-1512, (2002).