

Original Article

## 등대(燈臺)풀 유래 Furosin의 glutamate에 의한 HT22 세포 사멸 억제 효과

백지윤<sup>1,2</sup>, 송지훈<sup>2</sup>, 최성열<sup>3</sup>

<sup>1</sup>경남과학기술대학교, <sup>2</sup>가천대학교 한의과대학, <sup>3</sup>가천대학교 한의과대학 한방신경정신과

### Protective effect of furosin isolated from *Euphorbia helioscopia* against glutamate-induced HT22 cell death

Ji Yun Baek<sup>1,2</sup>, Ji Hoon Song<sup>2</sup>, Sung Youl Choi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kyeongnam National University of Science and Technology

<sup>2</sup>College of Korean Medicine, Gachon University

<sup>3</sup>Department of Oriental Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Gachon University

**Objectives:** In the brain, glutamate is the most important excitable neurotransmitter in physiological and pathological conditions. However, the high level of glutamate induces neuronal cell death due to excitotoxicity and oxidative stress. The present study investigated to evaluate a possible neuroprotective effect of furosin isolated from *Euphorbia helioscopia* against glutamate-induced HT22 cell death.

**Methods:** Furosin was isolated from methanol extract of *Euphorbia helioscopia* and examined whether it protects glutamate-induced neuronal cell death. The cell viability was determined using Ez-Cytox assay. Anti-oxidative effect of furosin was determined by DPPH scavenging activities, and the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) were determined by the fluorescent intensity after staining the cells with H<sub>2</sub>DCFDA. To evaluate apoptotic cell death, we performed nuclear staining and image-based cytometric analysis.

**Results:** The cell viability was significantly increased by treatment with furosin compared with the treatment with glutamate. Furosin showed a strong DPPH radical scavenging activity (EC<sub>50</sub>=1.83 μM) and prevented the accumulation of intra cellular ROS. Finally, the presence of 50 and 100 μM furosin significantly the percentage of apoptotic cells compared with glutamate treatment.

**Conclusion:** The present study found that furosin is a potent neuroprotectant against glutamate-induced oxidative stress through inhibition of apoptotic cell death induced by glutamate. Therefore, the present study suggests that furosin as a bioactive compound of *E. helioscopia* can be a useful source to develop a drug for the treatment of neurodegenerative diseases and acute brain injuries.

**Key Words** : Furosin, *Euphorbia helioscopia*, Glutamate, Apoptotic cell death, HT22 cells.

### 서론

퇴행성 뇌질환과 급성 뇌손상에서 신경세포 사멸의

주요 원인 중 하나는 흥분성 신경전달 물질로 잘 알려진 glutamate의 과다 분비로 인한 흥분 독성 (excitotoxicity)과 산화적 손상 (oxidative stress)이

• Received : 13 February 2017

• Revised : 13 March 2018

• Accepted : 14 March 2018

• Correspondence to : 최성열(Sung Youl Choi)

가천대학교 한의과대학 한방신경정신과

1342 Seongnam-Daero, Sujung-Gu, Seongnam 13120, South Korea

Tel : 82-32-770-1343, e-mail : pc1075@gachon.ac.kr

다.<sup>1)</sup> 흥분 독성은 뇌에서 과다 분비된 glutamate로 인해 세포의 발화 역치가 비정상적으로 낮아지게 되고, 적절한 제어가 되지 않아 세포 사멸을 일으키게 된다.<sup>2)</sup> 산화적 손상은 세포내 비정상적인 활성산소종의 축적에 의해 유도되며 glutamate에 의한 세포 사멸에서 매우 중요한 요인으로 알려져 있다.<sup>3)</sup> 이러한 신경 세포 사멸은 알츠하이머병 병과 파킨슨병 등과 같은 퇴행성 뇌질환은 물론, 허혈성 뇌졸중, 간질, 외상성 뇌손상 등과 같은 급성 뇌손상 발병에서 매우 중요하다.

산화적 손상은 세포에서 활성산소 종이 과도하게 생성되고, 생체 항산화 시스템 기능의 약화로 인해 세포 내 활성산소 종의 과도한 축적이 원인이 된다. 활성 산소종은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide anion, hydroxyl radical 등을 포함하고 있으며, 체내 산소 소비 과정에서 발생하는 반응성이 매우 높은 물질이다.<sup>4)</sup> 특히 뇌의 경우 체내 산소 소비량의 20%에 해당하는 산소 소비하고 다량의 활성산소종이 생성되지만, 항산화 시스템에 의해 균형이 유지된다. 이러한 균형이 파괴될 경우 산화적 손상이 유발되고 신경 세포 사멸이 일어나게 된다.<sup>5)</sup> glutamate의 과다 분비는 세포 내 칼슘 농도가 비정상적으로 증가함과 동시에 세포 내 활성산소종이 축적되어 산화적 손상을 일으킨다고 보고되었다.<sup>6)</sup> 또한 glutamate에 의한 산화적 손상은 매우 빠른 시간 내에 세포괴사를 유도 하고, 시간이 경과하면서 apoptosis 형태의 세포 사멸을 유도한다고 보고되었다.<sup>6,7)</sup> 최근 유해성 활성산소 종을 조절할 수 있는 항산화제에 의한 신경 보호 효과에 관한 연구들이 활발히 진행되고 있으며, 특히, 식물 추출물에 많이 함유되어있는 flavonoid 와 phenolic 성분 들은 항산화 효능이 매우 뛰어나 산화적 손상에 의한 신경 세포 사멸을 억제하는데 매우 효과적이라고 보고되었다.<sup>8,9)</sup> 이처럼, 천연 항산화제의 경우 섭취 시 비교적 안전하고 합성 약물이 갖는 부작용을 대체할 수 있는 가능성이 있어 최근 들어 활발히 연구가 진행되고 있다.

등대풀(*Euphorbia helioscopia*)은 우리나라의 중부 이남 지방에 분포하는 2년 초로서, 澤漆(택칠)이라고 하는 全草(전초)를 말려 약용으로 사용 하며, 行水(행

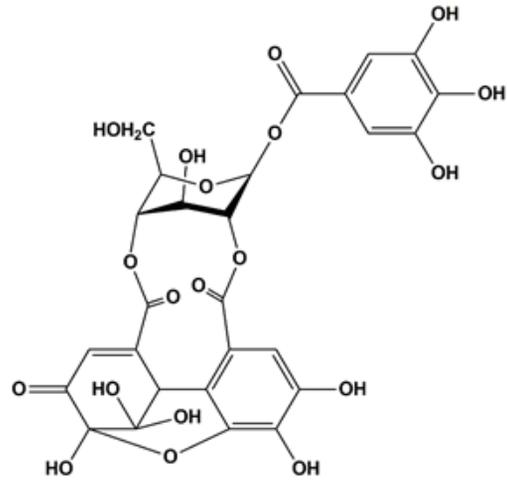


Fig. 1. Chemical structure of furosin (Fur).

수), 消痰(소담), 살충, 消毒(소독)의 효능이 있다. 또한, 등대풀은 전통의학에서 水氣腫滿(수기종만), 痰飲喘咳(담음천해), 말라리아, 細菌性下痢(세균성하리), 나력, 癬瘡(선창), 結核性痔漏(결핵성치루), 骨髓炎(골수염)을 치료에 사용되어 왔다.<sup>10)</sup> 등대풀에는 flavonoid 와 phenolic 물질이 풍부한 식물로 알려져 있다.<sup>11)</sup> Phenolic 물질은 종류가 다양하지만 생체방어 기능에 있어 필수적인 요소이며, 하나 또는 두 개 이상의 수산기로 치환된 방향족환을 가지고 있는 식물성분의 총칭으로 식물계에 넓게 분포한다.<sup>9,12)</sup> 대표적인 phenolic 물질인 tannin은 항바이러스 작용, 효소활성의 저해작용, 혈압 강하 작용, 혈중 요질소 저하작용, 항 ACE 활성 저해작용, 항 HIV 작용 등의 생리 활성이 보고되고 있다.<sup>13)</sup> 이러한 성분들을 포함하고 있는 등대풀 용매 추출물의 항산화 및 항균 활성에 대한 연구가 보고되어 있다.<sup>14)</sup> 본 연구에 사용된 등대풀 성분 중 하나인 furosin (Figure 1)은 ellagitannin 계열의 hydrolysable tannin 중 하나로 1-position에서 하나의 galloyl 그룹을 함유하고, glucose의 2,4-position에서 dehydrohexahydroxydiphenoyl을 함유하고 있는 항산화 물질로 보고되어 있다.<sup>15)</sup> 선행 연구에서는 furosin이 RPMI-7951 melanoma 세포에서 세포 독성과 RANKL에 의해 유도되는 osteoclast 분화를 억제

한다는 보고가 있다.<sup>16,17)</sup> 또한, furosin이 사람의 keratinocyte와 dermal fibroblasts의 분화와 콜라겐 합성을 촉진에 효과가 있다고 보고되었다.<sup>18)</sup> 그러나, furosin의 신경 세포 보호 효능에 관하여 보고된 바가 없다.

이에 전통 의학에서 다양한 효능이 밝혀져 약용식물로서 활용가치가 높은 등대풀로부터 생리 활성 성분 중 하나인 furosin을 분리하여, 신경세포 보호 효과를 확인 하고, 퇴행성 뇌질환 치료 및 예방을 위한 임상 적용 가능성을 제시하기 위해 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

실험에 사용된 시약으로 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)은 HyClone (Longan, UT, USA)에서, fetal bovine serum(FBS), phosphate buffered saline(PBS), trypsin-EDTA, antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)에서, glutamate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA), Hoechst33342는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서, Ez-Cytox assay kit은 Dail-lab science (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

### 2. 약재 및 성분 분리

실험에 사용한 *E. helioscopia* (Euphorbiaceae)는 (주)옥천당에서 구입하였으며, 500g을 80% MeOH (1.5ℓ)로 상온 25℃에서 세 번 추출하여 감압 건조하여 메탄올 추출물 104.5g을 얻었다. Furosin를 분리하기 위해 *E. helioscopia* 메탄올 추출물을 증류수로 혼탁 시킨 후 separatory funnel에 넣어 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, n-BuOH 순서로 분획 과정을 거친 후 각각의 분획물을 수득하였다. 그 중 EtOAc 분획물을 Sephadex LH-20 column을 사용한 크로마토그래피 방법으로 분리하여 TLC로 분리 정도를 확인하였고, HPLC와 재결정의 방법으로 정제하여 NMR, MS의 분석방법

으로 furosin를 수득하였다.

### 3. 세포배양

본 연구에서는 마우스 해마 유래 HT22 세포주를 이용하였다. HT22 세포는 10% FBS, 100U/mL penicillin, 그리고 100 mg/mL streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 배양하였다.

### 4. 세포 생존율 측정

세포사멸 억제 효과를 검증하기 위해, HT22 세포를 96-well plate의 각 well에 1×10<sup>4</sup> 개의 세포를 접종 한 후 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 HT22 세포에 5mM glutamate (Glu)를 다양한 농도의 furosin와 함께 24시간 동안 처리하였다. 또한, furosin의 자가 독성을 확인하기 위해 glutamate 없이 다양한 농도의 furosin를 세포에 처리하였다. 세포 생존율은 Ez-Cytox assay 시약을 이용하여 측정하였다. Glutamate 혹은 furosin 처리 24시간 후, 10μl Ez-Cytox assay 시약을 30분 동안 처리하여, microplate reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 퍼센트로 표시하였다.

### 5. DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능을 확인하기 위해, 각 농도의 시료 100μL와 동량의 60μM DPPH 용액을 넣어 혼합하였다. 실온에서 30분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 550nm에서 흡광도를 사용하여 측정하였다.

### 6. 세포 내 ROS 측정

세포 내 활성산소 종은 H<sub>2</sub>DCFDA로 세포를 염색하여 형광 plate reader를 이용하여 형광 강도를 측정하였다. HT22 세포를 96-well black plat의 각 well에 1×10<sup>4</sup> 개의 세포를 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 다양한 농도의 furosin를 glutamate와 함께 8시간 동안 처리 한 후 10 μM H<sub>2</sub>DCFDA를 처리하여 10분

동안 추가적으로 배양하였다. PBS를 이용하여 활성 산소 종과 결합하지 않은 잔여 H<sub>2</sub>DCFDA를 제거한 후 형광 plate reader를 이용하여 485nm/535nm (ex/em)에서 DCF의 형광 세기를 측정하였다. 결과는 대조군에 대한 형광 세기 증가 배수로 나타냈다.

### 7. 핵 염색

세포를 Hoechst33342를 이용하여 핵을 염색 한 후 핵의 형태 변화를 관찰하였다. 세포는 12-well plate의 각 well에 1×10<sup>5</sup> 개 세포를 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 세포 사멸 억제 효과가 있는 50 혹은 100 μM furosin를 glutamate와 함께 처리하여 12 시간 동안 배양 한 후, 10 μM Hoechst33342를 이용하여 10 분간 염색하였다. 핵의 형태는 CCD 카메라가 부착된 형광 현미경을 이용하여 관찰하였으며, 형광 이미지 얻었다.

### 8. 세포 사멸 유형 분석

세포 사멸 유형을 분석하기 위해, 2×10<sup>5</sup> 개 세포를 6-well plate 각 well에 접종하였다. 24시간 동안 배양 후, 50 혹은 100 μM furosin를 glutamate와 함께 12 시간 동안 처리하였다. 세포를 plate 각 well로부터 떼어내어 PBS로 잔여 배지를 제거하였다. Annexin-V binding buffer를 이용하여 세포를 잘 풀어 준 후, Alexa fluor-488이 결합된 Annexin V와 propidium iodide를 용하여 세포를 염색하였다. PBS를 이용하여 잔여 형광 물질을 제거 한 후, Tali-Image based Cytometer를 이용하여 세포 사멸 유형을 분석하였다. 결과는 각 그룹의 전체 세포 수 중 Annexin V로 염색된 세포의 %로 표시하였다.

### 9. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 3회 이상 반복 실험을 수행하였으며, 평균치±표준편차(mean ± SD)로 나타내었다. 통계분석은 SPSS 프로그램(SPSS 12.0 for windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 활용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였다. p 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 하였다.

## 결 과

### 1. Furosin의 신경세포 사멸 억제 효과

본 연구에서 신경세포 보호 효과를 확인하기 위해 Ez-Cytox assay를 수행하였다. 배양된 HT22 세포에 다양한 농도의 furosin를 24 시간 처리 한 결과 처리한 결과 농도가 높아지더라도 세포 생존율에는 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다(Fig. 2A). 이후 동일 농도의 furosin를 glutamate와 함께 24시간 처리하여 세포 생존율을 확인하였다. Glutamate 처리 군의 세포 생존율은 33.73%로 나타났으며, 대조군에 비해 현저하게 감소하였다. 그러나 50 μM 과 100 μM furosin를 glutamate와 처리하였을 때 농도 세포 생존율이 각각 65.75% 그리고 86.07%로 glutamate 단독 처리군 보다 현저히 증가하였다 (Fig 2B). 현미경을 이용하여 세포 형태를 확인한 결과, glutamate 처리

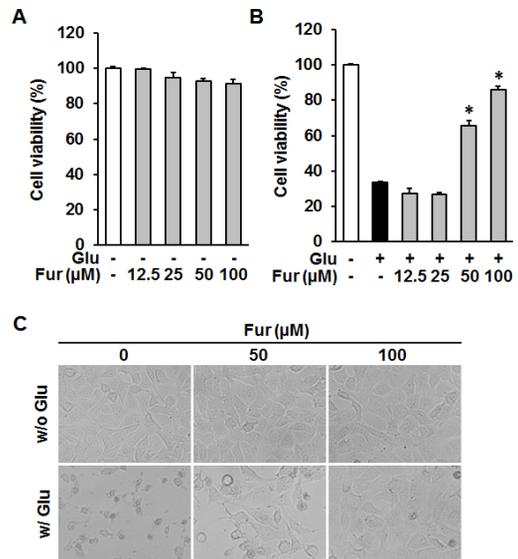


Fig. 2. Furosin inhibited glutamate-induced HT22 cell death. HT22 cells were treated with the indicated concentrations of furosin in the presence or absence of 5 mM glutamate. (A and B) To determine the self toxicity and protective effect of furosin, the cell viability was determined using Ez-Cytox assay kit after the exposure to glutamate for 24 h. Bars denote the percentage of cell viability compared with non-treated groups (mean±S.E.M., \*p<0.05 compared with glutamate-treated group). (C) Morphological changes were observed under the phase contrast microscope.

군에서 세포 사멸이 관찰되었으나, 50  $\mu$ M 과 100  $\mu$ M furosin를 glutamate와 함께 처리하였을 때는 세포 사멸이 관찰되지 않음을 확인하였다 (Fig. 2C). 이러한 결과는 furosin이 glutamate에 의한 독성으로부터 HT22 세포를 보호하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

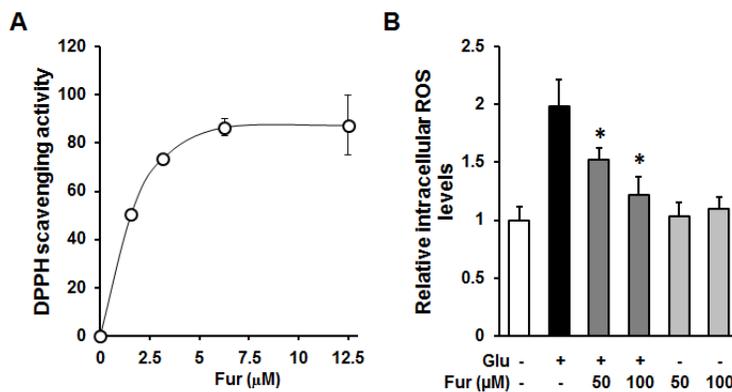
## 2. Furosin의 항산화 효과 및 세포 내 활성산소종 축적 억제 효과

Furosin의 항산화 효능을 확인하기 위해 DPPH radical 소거능을 확인하였다. 다양한 농도의 furosin를 DPPH 용액과 반응시켜 DPPH 소거능을 확인 한 결과, furosin이 DPPH radical 소거 능력이 매우 뛰어난 것을 확인하였고, IC50는 2.5  $\mu$ M로 산출되었다 (Fig. 3A). 세포 내 활성산소 종 축적은 H<sub>2</sub>DCF-DA를 이용하여 측정하였다. 배양된 HT22 세포에 세포 생존율에서 유의성을 보이는 농도인 50  $\mu$ M 과 100  $\mu$ M furosin를 glutamate와 함께 처리하여 H<sub>2</sub>DCFDA를 이용하여 염색하여 분석하였다. 그 결과, glutamate를 처리한 결과 세포 내 ROS 양이 glutamate를 처리하지 않은 세포에서 보다 1.98배 증가하였고, 50  $\mu$ M 과 100  $\mu$ M furosin를 glutamate를

처리하였을 때 세포 내 ROS가 현저하게 감소함을 확인하였다(Fig. 3B). 이상의 결과로부터 furosin이 강력한 항산화 효능을 갖고 있으며, 이를 통해 glutamate에 의한 과도한 활성산소 종 축적을 저해함으로써 신경 세포 보호 효과를 나타냄을 확인하였다.

## 3. Furosin의 glutamate에 의한 chromatin 응축과 apoptosis 억제 효과

배양된 HT22 세포에 생존율에서 유의성을 보이는 50  $\mu$ M 과 100  $\mu$ M furosin를 glutamate와 함께 12 시간 처리한 후 chromatin 응축과 세포 사멸 유형을 규명하였다. Chromatin 응축은 Hoechst33342 형광 dye를 이용하여 핵을 염색한 후 크로마틴 응축을 관찰하였다. Glutamate 처리 시 chromatin 응축이 현저하게 증가하는 반면, 50  $\mu$ M과 100  $\mu$ M furosin은 glutamate에 의한 크로마틴 응축을 효과적으로 억제하였다 (Fig. 4A). 세포 사멸 유형을 분석하기 위해, 세포를 Alexa Fluor488이 결합되어 있는 Annexin V와 propidium iodide (PI)로 세포를 염색하여, Image-based cytometric 분석을 수행하였다. Annexin V로 염색된 세포인 apoptotic 세포는 대조군에 비해 glutamate 처리 군에서 현저하게 증가하였으며, furosin과 glutamate



**Fig. 3.** Furosin prevented intracellular ROS accumulation through their antioxidant capacity. (A)The indicated concentrations of furosin was incubated with DPPH radical reagent for 30 min and obtained using microplate reader at 550 nm. (B)HT22 cells were treated with 50 or 100 uM furosin in the presence (dark gray) or absence (gray) of 5 mM glutamate for 8 h and stained with H<sub>2</sub>DCFDA, a fluorescent indicator of ROS. The fluorescent intensity of DCF was measured using a fluorescent microplate reader. Bars denote the fold increases of intracellular ROS level compared with non-treated groups (mean  $\pm$ S.E.M., \*(<0,05 compared with glutamate-treated group).

혼합 처리는 두 농도에서 모두 감소함을 확인하였다 (Fig. 4B). 또한, 정량적인 분석 결과로부터, apoptotic 세포는 glutamate 처리 군에서 56.23%로 대조군 6.3%에 비해 유의성 있게 증가한 반면, furosin 처리는 두 농도에서 각각 25.56%와 16.25%로 glutamate 처리 군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4C). 이상의 결과는 등대풀 추출물에 포함된 생물학적 활성 물질인 furosin의 신경 세포 보호 효과는 glutamate에 의한 apoptotic 세포 사멸 억제를 통해 나타남을 확인 하였다.

### 고 찰

Glutamate는 뇌에 존재하는 대표적인 흥분성 신경 전달 물질로 잘 알려져 있으며 뇌의 생리학적으로 매우 중요한 역할을 수행한다. 그러나 신경세포 외부로의 과도한 분비는 신경세포사멸을 유도하게 되며, 이러한 신경 세포 사멸은 퇴행성 뇌질환이나 급성 뇌손

상의 주된 원인이 된다. 신경세포 외부에 과도한 glutamate 존재는 전형적인 excitotoxicity를 유도함은 물론 산화적 손상을 일으키는데, 초기에는 necrotic 세포 사멸을 일으키고 이후 apoptotic 세포사멸을 유도한다는 보고가 되어있다.<sup>7)</sup> 특히 산화적 손상은 신경 세포사멸을 일으키는 요인으로 잘 알려져 있으며, 노화와 신경퇴행성 질환과 밀접하게 연관되어 있다.<sup>19)</sup> 신경 세포의 경우 더 이상 세포분열을 하지 않고 재생이 되지 않기 때문에 산화적 손상에 매우 취약한 세포이다.<sup>20)</sup> 이는 산화적 손상에 의한 신경 세포 사멸 억제가 급성 뇌손상이나 신경퇴행성 질환치료제 개발에서 매우 중요함을 나타낸다.

본 연구에 사용된 마우스 유래 신경세포주인 HT22 세포는 glutamate에 의한 apoptotic 세포사멸 기전 연구 및 신경 보호 물질 효과를 검증하는데 많이 사용되어지고있다.<sup>3)</sup> 이에 본 연구에서는 항산화 효능이 확인된 등대풀 추출물 성분인 furosin이 glutamate에 의한 신경세포 사멸에 미치는 영향을 검증 하였

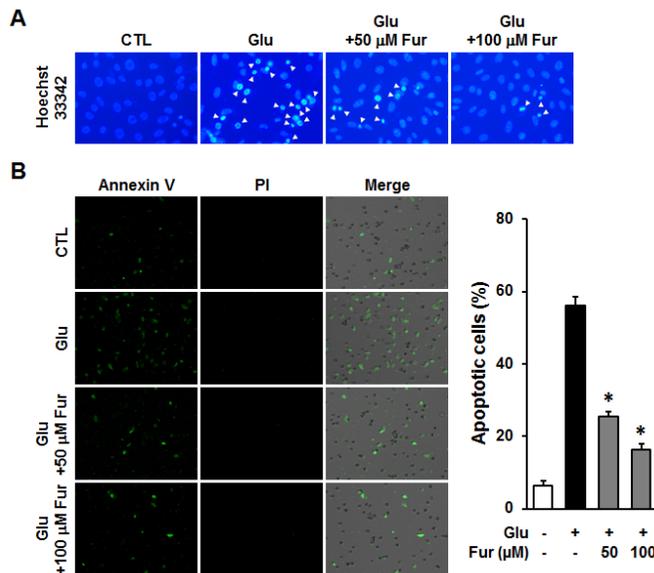


Fig. 4. Furosin prevented glutamate-induced apoptotic HT22 cell death. HT22 cells were incubated with glutamate in the presence or absence of furosin for 12 h. (A) Chromatin condensation was determined using Hoechst33342 and observed under a fluorescent microscope. (B) The number of apoptotic cells were analyzed using Tali-image based cytometric analysis. The proportion of apoptotic cells were represented by the percentage of Annexin V-positive cells (mean±S.E.M., \* <0.05 compared with glutamate-treated group).

다. 그 결과, furosin 자체가 신경세포 독성이 없음을 물론, glutamate에 의한 신경 독성으로부터 보호 효과가 매우 뛰어남을 확인할 수 있었다.

이미 보고된 바에 따르면, glutamate에 의한 신경 세포 사멸은 세포 내 활성산소종의 과도한 생성과 항산화 기능 약화로 활성산소 종이 과도한 축적으로 인해 발생하는 산화적 손상이 주된 원인 중 하나라고 잘 알려져 있다.<sup>3,5)</sup> 이와 더불어, 선행 연구들은 이러한 신경 세포에서 활성산소 종 축적을 막음으로써 신경 세포 사멸이 억제된다고 보고하였다. 따라서, 본 연구에서 furosin의 항산화 효능에 대하여 우선 적으로 검증을 하였다. 그 결과, furosin이 DPPH radical 소거능이 매우 뛰어남을 확인하였다. 이는 furosin이 항산화제로써 glutamate에 의한 산화적 손상을 억제할 수 있을 것으로 예측할 수 있었다. 또한, 세포 내 활성산소종 축적을 확인한 결과, glutamate 처리 군은 대조군에 비해 세포 내 활성산소 종이 현저히 증가함을 확인하였다. 그러나 furosin은 glutamate에 의한 세포 내 활성산소종 증가를 효과적으로 억제함을 확인하였다. 이러한 결과들은 furosin이 강력한 항산화제로써 glutamate에 의해 활성산소종이 세포 내에 과도하게 축적되는 것을 막음으로써 신경세포를 보호한다는 것을 확인할 수 있었다.

일반적으로 세포사멸은 necrosis, apoptosis, autophagy 혹은 복합적인 형태로 나타난다.<sup>21)</sup> 특히, apoptotic 세포 사멸은 glutamate에 의한 세포사멸의 대표적인 유형으로 잘 알려져 있다. glutamate에 의해 유도된 산화적 스트레스가 HT22 세포의 apoptosis 를 유도하며, flavonoid 및 polyphenol 류의 물질들은 glutamate에 의한 apoptotic 세포 사멸을 효과적으로 억제한다고 보고 되었다.<sup>22,23)</sup> 이러한 성분들이 포함된 천연물 추출물들은 항산화 효능이 뛰어나 glutamate에 의한 apoptotic 신경 세포 사멸을 효과적으로 억제한다는 보고들이 되었다.<sup>9)</sup> 또한, 최근 본 연구진은 HT22 세포를 이용하여 ellagitannin으로 알려져 있는 casuarinin과 chebulinic acide가 glutamate에 의해 유도되는 apoptotic 세포사멸을 효과적으로 억제함을 보고하였다.<sup>24,25)</sup> 본 연구에서는 항산화 효능이 있

면서 신경 세포 보호 효과가 있는 furosin이 glutamate에 의한 apoptotic 세포 사멸을 억제하는지를 검증하였다. 그 결과, furosin을 처리하였을 때 apoptotic 세포사멸 마커인 Annexin V에 염색된 세포 비율이 glutamate 처리군에서 보다 현저하게 감소함을 확인하였다. 이결과는 사용된 furosin이 glutamate에 의한 apoptotic 세포 사멸을 효과적으로 억제 함으로써 신경 세포 보호 효과를 나타냄을 보여준다.

## 결론

본 연구는 등대풀 추출물의 생리 활성 성분 중 하나인 furosin 분리하여 glutamate에 의한 신경세포 사멸 억제 효능을 검증하기 위해 수행되었으며, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 마우스 해마 유래 신경세포주인 HT22 세포주를 이용하여 furosin의 신경 세포사멸 억제 효과를 확인한 결과, glutamate에 의한 신경세포 사멸을 효과적으로 억제하였다.
2. Furosin은 DPPH radical을 효과적으로 제거한다는 결과로 furosin이 강한 항산화 물질임을 확인하였다.
3. 신경 세포 사멸의 원인이 되는 세포 내 활성산소종 축적을 확인한 결과 furosin은 glutamate에 의한 세포내 활성산소 종 축적을 효과적으로 억제하였다.
4. Glutamate에 의한 신경세포 사멸 유형을 분석한 결과, glutamate에 의해 apoptotic 세포 사멸을 유도하지만, furosin은 glutamate에 의한 apoptotic 신경세포 사멸을 효과적으로 억제함을 확인하였다. 이상의 결과들로부터, furosin은 산화적 손상에 의해 유도되는 세포 사멸과 밀접하게 연관된 퇴행성 뇌 질환 및 급성 뇌 손상에 대한 치료 및 예방에 적용 가능할 것으로 사료되며, 관련 후속 임상 연구를 위한 기초 연구 자료로 가치가 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2017년도 정부(미래창조과학부)의 재원

으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2017R1C1B5018382).

### 참고문헌

1. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4:399-415.
2. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* 1990;186:1-85.
3. Tan S, Wood M, Maher P. Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *J Neurochem.* (1998) 71:95-105.
4. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7:65-74.
5. Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol.* 1992;32:S22-7.
6. Choi DW. Glutamate Neurotoxicity and Diseases Review of the Nervous System. *Neuron.* 1988;1:623-34.
7. Fukui M, Song JH, Choi JY, Choi HJ, Zhu BT. Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Eur J Pharmacol.* 2009;617:1-11.
8. Gutierrez-Merino C, Lopez-Sanchez C, Lagoa R, Samhan-Arias AK, Bueno C, Garcia-Martinez V. Neuroprotective actions of flavonoids. *Curr Med Chem.* 2011;1195-211.
9. Spagnuolo C, Napolitano M, Tedesco I, Moccia S, Milito A, Russo GL. Neuroprotective Role of Natural Polyphenols. *Curr Top Med Chem.* 2016;16:1943-50.
10. Mohamed AEH, Hegazy ME, Moustafa MF, El-Sayed MA, Abdel-Farid I, Esmail AM, et al. *Euphorbia helioscopia*: Chemical constituents and biological activities. *Int J Phytopharm.* 2012;3:78-90.
11. Ben Mohamed Maoulainine L, Jelassi A, Hassen I, Ould Mohamed Salem Ould Boukhari A. Antioxidant proprieties of methanolic and ethanolic extracts of *Euphorbia helioscopia*, (L.) Aerial parts. *Int Food Res J.* 2012;19:1125-30.
12. Ahn YJ, Lee SHM, Kang SJ, Hwang BY, Park WY, Ahn BT, et al. The Phenolic Components of *Sapium japonicum*. *Yakhak Hoeji.* 1996; 40(2):183-192.
13. Nishioka I. Chemistry and Biological Activities of Tannins. *Yakugaku Zasshi.* 1983;103(2): 125-142.
14. Kim JY, Lee JA, Kim KN, Song GP, Park SY, Antioxidative and antimicrobial activities of *Euphorbia helioscopia* extracts. *J Kor Soc Food Sci Nutr.* 2007;36: 1106-12.
15. Yokozawa T, Chen CP, Dong E, Tanaka T, Nonaka GI, Nishioka I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem Pharmacol.* 1998;56:213-22.
16. Kashiwada Y, Nonaka G, Nishioka I, Chang JJ, Lee KH. Antitumor agents, 129. Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents. *J Nat Prod.* 1992;55:1033-43.
17. Park EK, Kim MS, Lee SH, Kim KH, Park JY, Kim TH, et al. Furosin, an ellagitannin suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation and function through inhibition of MAP kinase activation and actin ring formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;325: 1472-80.
18. Agyare C, Lechtenberg M, Deters A, Peterleit

- F, Hensel S. Ellagitannins from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell.: Geraniin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. *Phytomedicine*. 2011;18: 617-24.
19. Cao X, Fang Y. Transducing oxidative stress to death signals in neurons. 2015;211:741-3.
  20. Mattson MP, Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci*. 2006;7:278-94.
  21. Zhang LN, Hao L, Wang HY, Su HN, Sun YJ, Yang XY, et al. Neuroprotective effect of resveratrol against glutamate-induced excitotoxicity. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24:161-5.
  22. Cong L, Cao C, Cheng Y, Qin XY. Green Tea Polyphenols Attenuated Glutamate Excitotoxicity via Antioxidative and Antiapoptotic Pathway in the Primary Cultured Cortical Neurons. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;doi: 10.1155/2016/2050435.
  23. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death. *Cell Death Differ*. 2009;16:3-11.
  24. Song JH, Shin MS, Hwang GS, Oh ST, Hwang JJ, Kang KS. Chebulinic acid attenuates glutamate-induced HT22 cell death by inhibiting oxidative stress, calcium influx and MAPKs phosphorylation. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018;28:249-53.
  25. Song JH, Kang KS, Choi YK. Protective effect of casuarinin against glutamate-induced apoptosis in HT22 cells through inhibition of oxidative stress-mediated MAPK phosphorylation. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017;27:5109-13.

## ORCID

Ji Yun Baek <https://orcid.org/0000-0002-3012-1028>  
 Ji Hoon Song <https://orcid.org/0000-0001-5141-5546>  
 Sung Youl Choi <https://orcid.org/0000-0002-3652-1997>