

여주의 페놀성 화합물인 Protocatechuic Acid의 산화적 스트레스 개선 및 신경염증 보호 효과

김지현[†] · 최정란[†] · 조은주 · 김현영¹

부산대학교 식품영양학과, ¹경남과학기술대학교 식품과학부

Protective Effect of Protocatechuic Acid, Phenolic Compound of *Momordica Charantia*, against Oxidative Stress and Neuroinflammation in C6 Glial Cell

Ji-Hyun Kim, Jung Ran Choi, Eun Ju Cho, Hyun Young Kim¹

Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, ¹Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology

Received: May 5, 2020
Revised: June 2, 2020
Accepted: June 10, 2020

[†]Ji-Hyun Kim and Jung Ran Choi contributed equally to this study.

Correspondence to: Hyun Young Kim
Department of Food Science,
Gyeongnam National University of
Science and Technology, 33,
Dongjin-ro, Jinju 52725, Korea
Tel: +82-55-751-3277
Fax: +82-55-751-3279
E-mail: hykim@gntech.ac.kr

Copyright © 2020 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: Oxidative stress-mediated neuroinflammation has been supposed as a crucial factor that contributes to the pathogenesis of many neurodegenerative diseases. In this study, we aimed to investigate the protective activity against oxidative stress and neuroinflammation of protocatechuic acid (PA), active phenolic compound from *Momordica Charantia*.

Methods: Protective activity of PA from oxidative stress was performed under *in vitro* conditions. Our study investigated the protective mechanism of PA from neuroinflammation in cellular system using C6 glial cell. To investigate the improvement the effects on oxidative stress and neuroinflammation, we induced oxidative stress by H₂O₂ (100 μM) stimulation and induced neuroinflammation by treatment with lipopolysaccharide (LPS) (1 μg/mL) and interferon-gamma (IFN-γ) (10 ng/mL) in C6 glial cells.

Results: PA showed strong radical scavenging effect against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, hydroxy radical (·OH) and nitric oxide (NO). Under oxidative stress treated by H₂O₂, the result showed the increased mRNA expressions of oxidative stress markers such as nuclear factor-kappaB (NF-κB), cyclooxygenase (COX-2) and inducible nitric oxide (iNOS). However, the treatment of PA led to reduced mRNA expressions of NF-κB, COX-2 and iNOS. Moreover, PA attenuated the production of interleukin-6 and scavenged NO generated by both endotoxin LPS and IFN-γ together. Furthermore, it also reduced LPS and IFN-γ-induced mRNA expressions of iNOS and COX-2.

Conclusions: In conclusion, our results collectively suggest that PA, phenolic compound of *Momordica Charantia*, could be a safe anti-oxidant and a promising anti-neuro-inflammatory molecule for neurodegenerative diseases.

Key Words: Neuroglia, *Momordica charantia*, Inflammation, Oxidative stress, Protocatechuic acid

서론

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 정상적인 체내 대사과정 동안에 미토콘드리아, 식세포 및 세포질에서 생성된다¹⁾. Superoxide anion (O₂⁻), hydroxy radical (·OH),

hydrogen peroxide (H₂O₂), singlet oxygen (¹O₂) 등의 ROS는 일반적으로 체내 superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase 등 항산화 효소들에 의해 제거 및 방어가 가능하다²⁾. 하지만 다양한 환경적 요인에 의해 ROS의 양이 증가하고, 체내에서 과잉 생성된 ROS는 반응성과 파

괴성이 매우 높아 생체 내 세포막의 불포화지방산을 과산화시켜 세포 손상, DNA 및 주요 효소에 영향을 미치고, 이에 따라 노화 이외의 관상동맥질환, 염증, 뇌졸중, 암 등의 다양한 만성 및 퇴행성 질환의 발병 원인이 된다³⁾. 특히 중추신경계는 ROS를 제거하는 항산화 효소들이 충분하지 않아⁴⁾ 제거하지 못한 ROS가 축적되어 산화적 스트레스를 일으키고 이는 신경퇴행성 질환에 영향을 주는 인자로 뇌 속 세포의 세포막 불포화지방산을 과산화시켜 알츠하이머병, 파킨슨병 같은 퇴행성 뇌질환의 원인이 된다^{5,6)}.

현대사회는 의학의 발달로 고령화 사회로 접어들면서 노인성 질환인 신경퇴행성 질환 또한 증가하고 있다. 이와 같은 퇴행성 뇌질환의 발생은 뇌에 존재하는 면역세포인 신경아교세포(neuroglia)의 염증반응에 의해 분비되는 물질들과 관련이 있다는 보고가 있다⁷⁾. 따라서 산화적 스트레스에 의하여 신경아교세포에서 다양한 염증물질이 분비되고 이에 의해 신경염증반응을 일으킬 것으로 추정 가능하다. 최근 연구에 의하면 산화적 스트레스로부터 다양한 항산화제가 뇌 속의 신경세포 및 신경아교세포를 보호할 수 있다는 보고가 있으므로⁸⁾ 인체 유해성이 적을 것으로 예상되는 식용식물의 항산화 및 다양한 활성물질의 효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이다.

여주(*Momordica charantia*)는 박과(Cucurbitaceae)의 덩굴식물로 미숙과일의 쓴맛 때문에 쓴오이(bitter melon)라고 불리고 고야라고도 부른다. 아시아, 아프리카, 남아메리카에서 널리 경작되고 있으며 긴 타원형으로 양끝이 뾰족하고 혹 모양의 돌기로 덮여 있는 것이 특징이고, 한국에서는 예로부터 관상용으로 심어온 여름 채소로 최근에는 천연 인슐린이라고 불릴 정도로 당뇨치료에 탁월한 효과가 알려져 많은 사람들에게 주목받고 있다⁹⁾. 우리나라 함양 여주의 활성성분은 크게 flavan-3-ols (epigallocatechin, catechin, epicatechin)와 phenolic acids (gallic acid, protocatechuic acid [PA], tannic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, vanilic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-comaric acid, ferulic acid) 성분이 포함되어 있다¹⁰⁾. Choi 등에 의하면 여주의 과실에는 다른 phenolic acids와 비교하여 PA의 함량이 가장 높은 수치를 나타내어 PA가 여주의 주요 활성물질로 보고되었다¹¹⁾. PA는 식용으로 많이 섭취하는 여주 열매에 풍부하게 함유되어 있으며 열을 이용하여 가공하였을 경우 그 함량은 더 증가하게 된다¹¹⁾. PA의 다양한 생리학적 활성이 보고되고 있지만^{12,13)}, 신경세포 보호작용에 대한 연구는 An

등의 연구에서 PC12 세포에서 익지인(*Alpinia oxyphylla*)으로부터 추출한 PA의 신경독성 보호효과¹⁴⁾, Ban 등의 랫트의 대뇌 피질 신경세포에서의 도복령(*Smilacis chinae rhizoma*)에서 추출한 PA의 신경보호효과¹⁵⁾ 및 Kim 등의 SK-N-MC에서 여주추출물의 신경세포사멸 억제 기전 연구가 보고되었고¹⁶⁾, 이외에는 미비한 실정이다. 더욱이 성상세포인 C6 신경아교세포(glia cells)는 central nervous system (CNS)에 가장 많이 존재하는 세포로서 다양한 자극에 의해 chemokines, cytokines, immune mediators, nitric oxide (NO)와 같은 염증성 물질을 분비한다^{17,18)}. 따라서 많은 연구에서 뇌 염증억제 효능평가에 C6 신경아교세포가 이용되고 있다^{19,20)}. 우리는 이전 연구에서 C6 신경아교세포를 이용하여 여주의 주요 활성성분인 PA의 산화적 스트레스에 대한 신경아교세포 보호효과가 있음을 증명하였다²¹⁾. 따라서 본 연구에서는 C6 신경아교세포에서 PA의 산화적 스트레스 개선 및 신경염증반응에 대한 보호 효과를 검증하고 그 작용기전을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 및 시약

실험에 사용된 PA는 여주 주요 성분의 하나이며, Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하여 사용하였다. 산화적 스트레스를 유발하기 위해 사용한 H₂O₂는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)사에서 구입하였다. 또한, sodium nitroprusside (SNP)는 Wako (Tokyo, Japan)사에서 구입하여 사용하였으며 lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma Chemical사 제품을 interferon-gamma (IFN- γ)는 Pepro Tech (Cranbury, NJ, USA)사 제품을 사용하였다. mRNA 발현의 측정을 위해 사용된 nuclear factor-kappa B (NF- κ B), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cylooxygenase-2 (COX-2), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primer는 Bioneer (Daejeon, Korea)사의 제품을 사용하였고, 단백질 발현을 측정하기 위해 사용된 β -actin, NF- κ B, COX-2, iNOS antibody는 Merck Millipore (Billerica, MA, USA)사 제품을 사용하였다.

2. 세포 배양 및 C6 신경아교세포의 염증반응 모델 제작

C6 신경아교세포(C6 glial cell)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 배양을 위해 사용

한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지, fetal bovine serum (FBS)과 100 units/mL penicillin streptomycin은 Welgene (Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. C6 신경아교세포는 100 unit/mL의 penicillin streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 배양된 세포는 1-2일에 한 번 배양액을 바꾸어 주면서 배양하여 세포분화가 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline로 세포를 세척한 후 0.05% trypsin과 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 혼합액으로 부착된 세포를 분리한 뒤 원심 분리하여 세포를 모은 다음 세포와 배지를 잘 혼합하여 계대 배양하여 사용하였다. C6 신경아교세포의 염증반응 모델 제작에 관해서는 세포배양액에 LPS (8 µg/mL)와 IFN-γ (10 ng/mL)를 처리하여 36시간 동안 자극시켜 신경염증반응을 유도하였다²²⁾.

3. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 측정

각 농도별로 ethanol에 녹인 시료(5, 10, 50 µg/mL) 100 µL와 60 µM DPPH 100 µL를 96 well plate에 혼합하여 실온에서 30분 방치시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 자유 라디칼(free radicals) 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다²³⁾.

4. ·OH 소거능 측정

Fenton 반응에 따라 10 mM FeSO₄ · 7H₂O-EDTA에 10 mM의 2-deoxyribose solution과 농도별 시료용액을 혼합한 다음 10 mM H₂O₂를 첨가하여 37°C에서 4시간동안 배양하였다. 이 혼합액에 2.8% trichloroacetic acid와 1.0% thio-barbituric acid solution를 각각 첨가하여 20분간 끓여 식힌 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다²⁴⁾. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 ·OH 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다.

5. NO 소거능 측정

NO 소거능은 Marocci 등의 방법으로 측정하였다. 10 mM SNP solution에 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 녹인 각 농도별 시료를 넣고 25°C에서 150분간 반응시켰다. 이 반응 혼합액은 96 well plate에 주입하여 0.1%의 naphthylethylenediamine dihydrochloride와 1%의 sulfanilamide를 함유한 5%의 phosphoric acid를 동량으로 섞은 griess reagent를 넣어 실온에서 30분간 반응시킨 후 540 nm에서

흡광도를 측정하여 NO 저해 활성을 확인하였다²⁵⁾. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 NO 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다.

6. NO 생성 억제 측정

C6 신경아교세포는 96 well plate에 1×10⁶ cells/mL로 seeding하여 2시간 배양 후 시료를 농도별로 처리하여 3시간 동안 재배양하였다. LPS와 IFN-γ는 8 µg/mL과 10 ng/mL 농도로 처리하여 36시간 동안 37°C에서 산화시킨 후 상측액과 griess reagent를 동량으로 반응시켰다. 이후 빛을 차단하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. Interleukin (IL)-6 생성량 측정

세포내 IL-6 생성량은 Mouse Interleukin 6 ELISA kit (Abfrontier, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. C6 신경아교세포를 96 well plate에 seeding하여 시료를 농도별로 처리하여 3시간 동안 재배양한 후 LPS와 IFN-γ를 8 µg/mL과 10 ng/mL 농도로 처리하여 36시간 배양하였다. 반응이 끝나면 상측액을 취하여 IL-6를 측정하였다. IL-6의 함량은 표준 kit에 포함된 IL-6 표준곡선을 이용하여 산출하였다.

8. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 조절 기전

동일한 조건에서 준비된 세포주로부터 trizol을 이용하여 total RNA를 분리 정량한 후, Top script™ One-step RT PCR DryMIX (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 이용하여 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA는 template를 이용하여 염증반응 관련인자 NF-κB, iNOS, COX-2 유전자를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. 이 때 housekeeping 유전자인 GAPDH 유전자를 internal control으로 사용하였다(Table 1). 각 PCR 산물은 1% agarose gel에 Midori green Advanced DNA stain (Nippon Genetics Europe, Dueren, Germany)를 첨가하여 염색한 후 전기영동하여 slider imager (Maestrogen Inc., Hsinchu, Taiwan)을 이용하여 확인하였다.

9. 통계분석

대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 평균±표준편차로 나타내었고, SAS 4.2 (SAS Institute Inc., Cary,

Table 1. Primers and Conditions Used in PCR

mRNA	Primer sequence	PCR conditions
NF- κ B	F: GCA-GCC-TAT-CAC-CAA-CTC T R: TAC-TCC-TTC-TTC-ACC A	48°C cycle: 35
iNOS	F: CCT-CCT-CCA-CCC-TAC-CAA-GT R: CAC-CCA-AAG-TGC-CTC-AGT-CA	48°C cycle: 30
COX-2	F: AAG-ACT-TGC-CAG-GCT-GAA-CT R: CTT-CTG-CAG-TCC-AGG-TTC-AA	48°C cycle: 30
GAPDH	F: TCA-TGA-AGT-GTG-ACG-TTG-ACA-TCC-GT R: CCT-AGA-AGC-ATT-TGC-GGT-GCA-GGA-TG	62°C cycle: 35

PCR: polymerase chain reaction, NF- κ B: nuclear factor-kappaB, iNOS: inducible nitric oxide, COX-2: cyclooxygenase, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

NC, USA)를 이용하여 각 실험 결과로부터 analysis of variance를 구한 후 Duncan's multiple test ($P < 0.05$)를 이용하여 각 군의 평균 간의 유의성을 검정하였다.

결과

1. *In vitro*에서 PA의 산화적 스트레스 조절 효과

여주의 활성물질인 PA의 *In vitro*에서 산화적 스트레스에 대한 보호 효과를 살펴보기 위하여 DPPH 라디칼, \cdot OH 라디칼, 그리고 NO 소거효과를 확인하였다. 먼저, DPPH 라디칼 소거효과를 농도별(5, 10, 50 μ g/mL)로 살펴본 결과 5 μ g/mL의 낮은 농도에서 75% 이상의 소거효과를 보였으며 농도 의존적으로 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 또한 \cdot OH의 경우 PA의 처리 농도에 따라 농도 의존적으로 \cdot OH 소거효과가 증가하는 것을 볼 수 있었으며 50 μ g/mL의 농도에서는 70% 이상의 소거효과를 나타내었다(Fig. 2). 한편, PA의 NO 생성 저해활성을 측정된 결과, 농도 의존적인 활성을 확인할 수는 없었으나 각 농도별로 NO 저해효과가 있었으며 특히 10 μ g/mL의 농도에서 가장 높은 NO 저해활성을 보였다(Fig. 3).

2. C6 신경아교세포에서 H₂O₂로 유발된 산화적 스트레스 관련 단백질 발현 조절 효과

C6 신경아교세포에서 H₂O₂를 처리한 후 PA에 의한 산화적 스트레스 관련 mRNA 발현 조절을 확인하였다. H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유발한 control군에서는 normal군과 비교하여 NF- κ B, COX-2, iNOS의 mRNA 발현이 증가된 것을 알 수 있었고, PA에 의해 NF- κ B, COX-2,

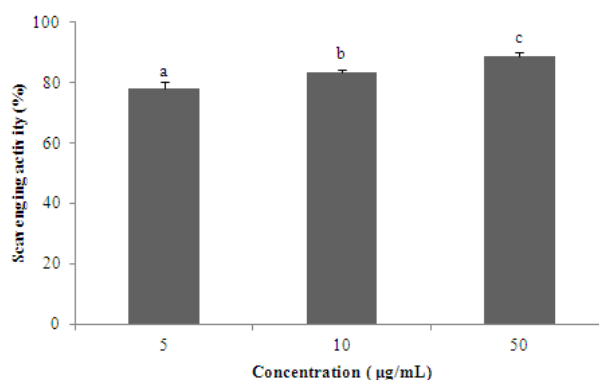


Fig. 1. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of protocatechuic acid. Values are mean \pm standard deviation (n=6). Different letters, a, b, and c, are significantly different ($P < 0.05$) among each other group by Duncan's multiple range test.

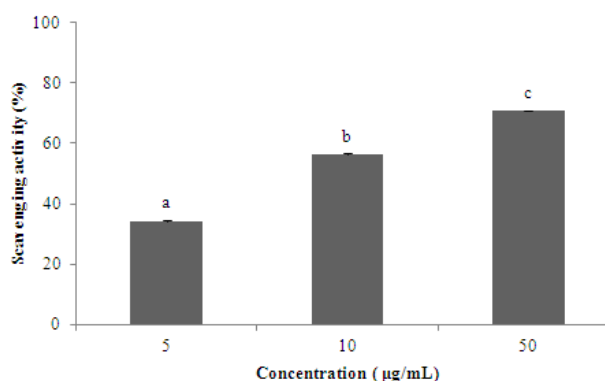


Fig. 2. Hydroxy radical scavenging activity of protocatechuic acid. Values are mean \pm standard deviation (n=6). Different letters, a, b, and c, are significantly different ($P < 0.05$) among each other group by Duncan's multiple range test.

iNOS 모두에서 control군에서보다 mRNA 발현이 억제되어 낮은 mRNA 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

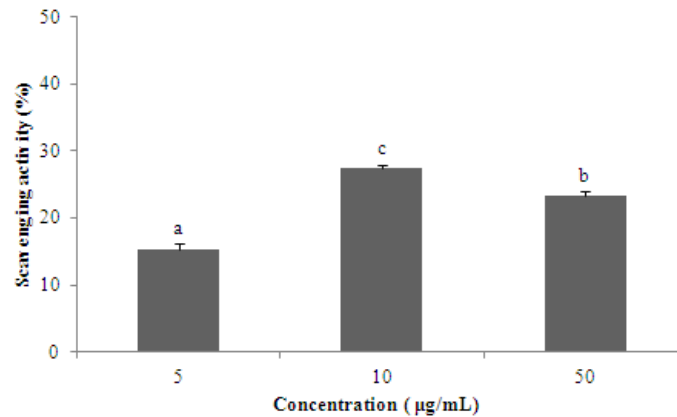


Fig. 3. Nitric oxide scavenging activity of protocatechuic acid. Values are mean±standard deviation (n=6). Different letters, a, b, and c, are significantly different (P<0.05) among each other group by Duncan's multiple range test.

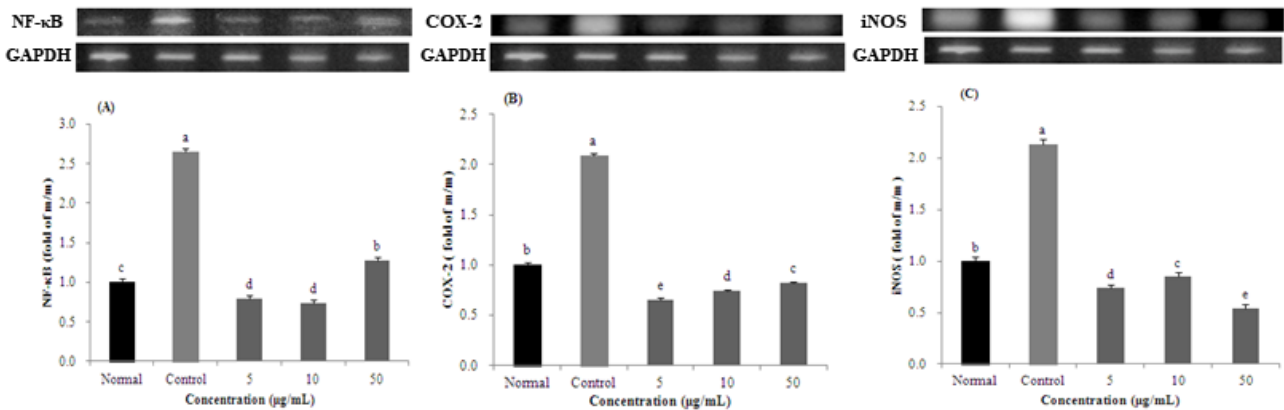


Fig. 4. Effect of protocatechuic acid on mRNA expression of NF-κB (A) and COX-2 (B) and iNOS (C) under H₂O₂ induced oxidative stress in C6 glial cell. Cells were incubated with protocatechuic acid for 24 hrs and total RNA was isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. The amplified PCR products were run a 1% agarose gel. GAPDH was used as a house-keeping control gene. The results are presented as the mean±standard deviation (n=4). Different letters, a, b, c, d, and e, are significantly different (P<0.05) among each other group by Duncan's multiple range test. NF-κB: nuclear factor-kappaB, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, COX-2: cyclooxygenase, iNOS: inducible nitric oxide, RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction.

3. C6 신경아교세포에서 LPS와 IFN-γ로 유발된 IL-6 분비 및 NO 생성 억제 효과

C6 신경아교세포에서 LPS와 IFN-γ를 처리하여 전염증성 cytokine인 IL-6 분비능에 대한 PA의 효과에 대해 알아보았을 때 control군이 가장 높은 IL-6 분비를 보인 반면 PA는 농도의존적으로 IL-6의 분비를 감소시켰고, 10 µg/mL, 50 µg/mL 농도에서는 normal군과 비슷한 수준으로 IL-6의 분비를 억제할 것을 알 수 있었다(Fig. 5). 또한 C6 신경아교세포에서 LPS와 IFN-γ의 처리로 인한 염증반응에 대한 PA의 억제 효과를 NO 생성량 측정을 통해 알아보았는데 Fig. 6은 C6 신경아교세포에 LPS와 IFN-γ를 처리하여 발생하는 NO 생성량을 측정하는 것으로 control군의

NO 생성량을 100%로 보았을 때 PA를 처리한 경우, 농도 유의적인 감소효과를 보이지 않았으나 control보다 낮은 NO 생성량을 나타내었다.

4. C6 신경아교세포에서 LPS와 IFN-γ로 유발된 염증반응 관련 단백질 발현 조절 효과

LPS와 IFN-γ에 의해 유발된 신경아교세포 염증반응에 대한 PA의 보호효과를 알아보기 위하여 염증유발인자인 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 검토한 결과(Fig. 7), normal군과 비교하여 LPS와 IFN-γ를 처리한 control군의 iNOS와 COX-2의 발현이 증가한 반면, PA 처리 시 농도 유의적으로 mRNA 발현을 감소시켰으며 특히 50 µg/mL의

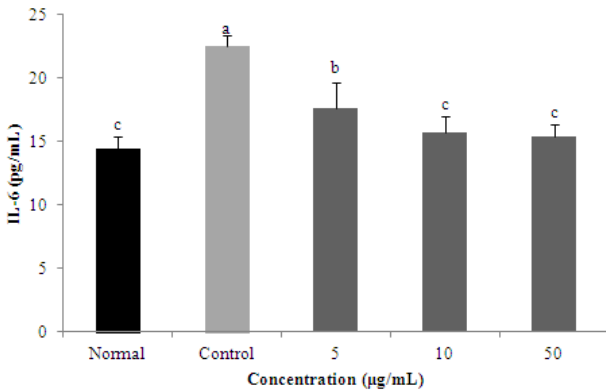


Fig. 5. Effect of protocatechuic acid on IL-6 production by LPS plus IFN- γ stimulated C6 glial cell. Values are mean \pm standard deviation (n=4). Different letters, a, b, and c, are significantly different (P<0.05) among each other group by Duncan's multiple range test. IL-6: interleukin-6, LPS: lipopolysaccharide, IFN- γ : interferon-gamma.

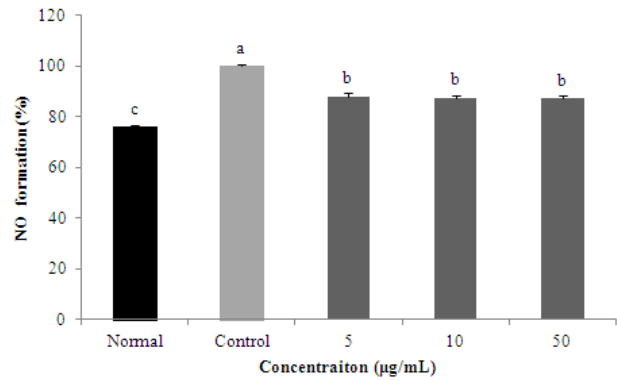


Fig. 6. Effect of protocatechuic acid on NO scavenging activity of C6 glial cell treated with LPS plus IFN- γ . Values are mean \pm standard deviation (n=4). Different letters, a, b, and c, are significantly different (P<0.05) among each other group by Duncan's multiple range test. NO: nitric oxide, LPS: lipopolysaccharide, IFN- γ : interferon-gamma.

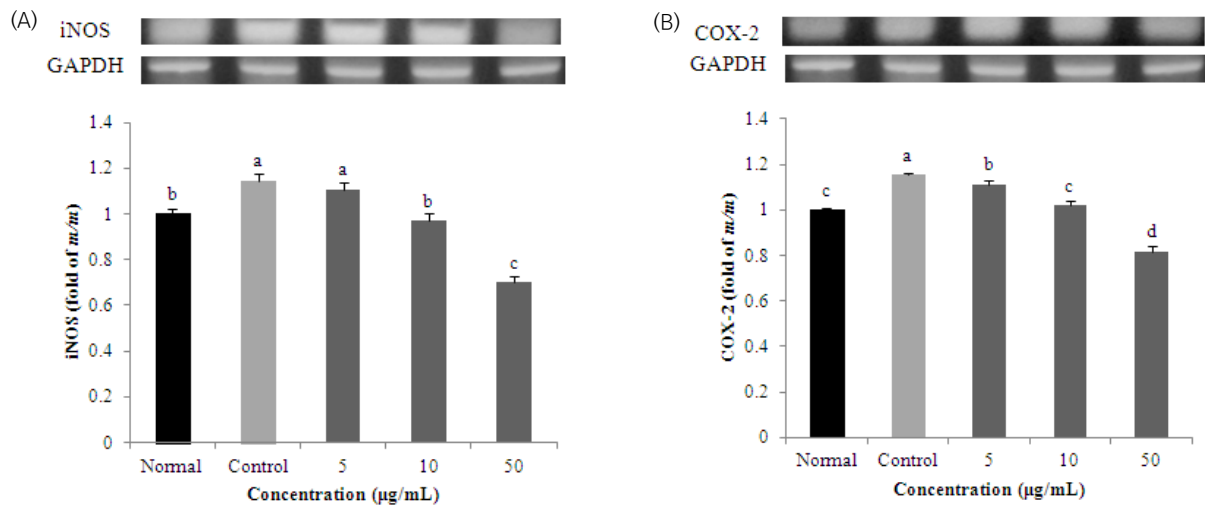


Fig. 7. Effect of protocatechuic acid on mRNA expression of iNOS (A) and COX-2 (B) under LPS plus IFN- γ induced neuroinflammation in C6 glial cell. Cells were incubated with protocatechuic acid for 24 hrs and total RNA was isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. The amplified PCR products were run a 1% agarose gel. GAPDH was used as a house-keeping control gene. The results are presented as the mean mean \pm standard deviation (n=4). Different letters, a, b, c, and d, are significantly different (P<0.05) among each other group by Duncan's multiple range test. iNOS: inducible nitric oxide, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, COX-2: cyclooxygenase, LPS: lipopolysaccharide, IFN- γ : interferon-gamma, RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction.

농도에서는 normal군보다 낮은 iNOS와 COX-2의 발현을 확인하였다.

고찰

DPPH 라디칼 소거능은 자유 라디칼 소거능 측정을 위해 널리 사용되는 방법으로 짙은 보라색을 띠는 안정하지

않은 DPPH 라디칼이 수소공여자인 항산화제로부터 수소 이온을 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여 노란색으로 전환된다²⁶⁾. 따라서 DPPH 라디칼을 환원하거나 상쇄하는 능력이 크면 높은 항산화 활성을 가질 것이라 기대할 수 있다. 한편, \cdot OH은 반감기가 짧으며 반응성이 큰 ROS의 하나로 인접한 생체분자에 심각한 손상을 야기하며 지질과산화물을 일으키고 특히 DNA 돌연변이를

일으키는 주된 물질이다. 이러한 손상은 압, 노화, 동맥경화 등 다양한 질환의 원인이 될 수 있다²⁷⁾. 또한, 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 ROS와 마찬가지로 산화적 손상을 일으키는 물질로 NO, nitrogen dioxide (NO₂), peroxyntirite (ONOO⁻) 등이 포함된다. RNS의 한 종류인 NO는 불안정한 기체 상태의 자유 라디칼이며 체내에서 생리 및 병리적 환경에서 중요한 역할을 한다. 생리적 pH 상태(pH 7.4)의 SNP 용액에서 NO는 자연스럽게 생성되며²⁸⁾, 생성된 NO는 산소와 반응하여 nitrite (NO₂⁻)를 생성하고 이는 greiss reagent를 이용해 확인할 수 있다. 따라서 SNP을 이용하여 과잉으로 생성된 NO를 제거하는 활성은 자유 라디칼의 독성으로부터 보호효과로 기대된다. 본 연구에서는 위에서 제시한 DPPH 라디칼, ·OH, 그리고 NO에 대한 PA의 소거효과를 검토하였고 세 가지 자유 라디칼 모두 우수한 억제 활성을 나타내었다. PA의 라디칼 소거 효과를 양성 대조군으로 주로 사용되는 ascorbic acid 결과와 비교하였을 때 DPPH 라디칼 소거 효과에서 PA는 IC₅₀가 0.007 ug/mL로 Lee 등이 보고한²⁹⁾ ascorbic acid의 IC₅₀값인 2.770 ug/mL과 비교하여 높은 활성을 나타내었다. 반면 ·OH 소거 효과에 관해서 PA의 IC₅₀는 10.491 ug/mL으로 Lee 등이 보고한²⁹⁾ ascorbic acid의 IC₅₀ 결과값인 0.040 ug/mL과 비교해서 활성이 낮았다. 따라서 PA는 ·OH 소거 효과보다 DPPH의 소거 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

중추신경계는 면역기능이 없는 기관으로 알려져 있었지만 Alzheimer's disease (AD), 파킨슨병, 다발성 경화증 등 신경퇴행성 질환의 기전에서 염증반응이 중요한 작용을 한다는 사실이 알려지고 있다³⁰⁾. 뇌를 구성하는 중추신경계는 뇌의 핵심적 기능을 수행하는 신경세포와 신경세포들을 지지해주는 신경아교세포(glia cell)로 구성되어 있으며, 신경아교세포에는 미세아교세포(microglia), 성상세포(astrocyte), 희소돌기아교세포(oligodendrocyte), 뇌실막 세포(ependymal cell), 신경집세포(schwann cell), 신경절아교세포(satellite cell)가 포함된다. 기존 연구 보고에 따르면 C6 신경아교세포는 1차 배양된 성상세포와 특징이 비슷하고 신경아교세포 성장인자(glia cell line-derived neurotrophic factor)의 분비량이 많다고 알려져 있다³¹⁾. 성상세포는 CNS에서 가장 풍부한 신경아교세포의 한 종류로 CNS 기능을 유지하고, 시냅스 활성, 신경전달물질의 항상성 및 혈류를 조절할 뿐만 아니라 신경세포와 blood-brain

barrier의 구조 유지에도 필수적인 역할을 한다^{17,18)}. 또한 다양한 자극에 노출되면 chemokine, cytokine, immune mediator, NO를 분비하고 전염증 상태에 이르게 하여 신경 손상을 초래하게 된다²²⁾. 더욱이 성상세포를 LPS, IFN- γ 로 자극하게 되면 염증단백질인 iNOS의 발현 증가로 NO 생성이 자극되어 염증반응을 일으킨다²²⁾. 따라서 C6 신경아교세포는 신경염증 억제 효능평가 연구에 활용되어 왔다^{19,20)}. 본 연구에서도 C6 신경아교세포에 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 후 PA의 보호 작용기전과 LPS, IFN- γ 병용처리에 의한 신경아교세포 염증반응 유도에 따른 PA의 보호기전에 대해 확인하였다. 세포 실험에 사용한 PA 농도는 이전 실험²¹⁾을 통하여 세포 생존도(cell viability)를 평가함으로써 세포독성을 확인하고 독성이 나타나지 않는 농도 범위 내에서 수행하였다.

생체는 산소를 소비하는 대사과정 중 O₂⁻, H₂O₂, ·OH과 같은 ROS를 생성하게 되며 그 중 H₂O₂는 그 자체로는 반응성이 크지 않지만 세포내에서 ·OH 등의 반응성이 큰 ROS를 발생시키는 작용을 하여 DNA 손상을 일으키는 강력한 산화제이다³²⁾. 또한 fenton 반응에 의해 구리나 철이온 등과 반응하여 ·OH로 전환되어 산화적 스트레스를 유발한다³³⁾. NF- κ B는 많은 염증성 질환을 일으키는 주요 인자로서 노화, 압, 동맥경화증, 급성 염증상태, 조직손상 등 여러 가지 병리적인 상태와 관련되어 있다³⁴⁾. NF- κ B는 inhibitor κ B (I κ B)인 억제단백질과 결합되어 불활성화 상태로 세포질에 존재하나 ROS와 같은 자극이 발생하면 I κ B kinase가 활성화되어 I κ B와 분리되고 분리된 NF- κ B는 핵 안으로 들어가 iNOS와 COX-2의 발생을 유도한다³⁵⁾. iNOS의 경우 L-arginine와 deamination을 자극해서 NO를 생성시키고 대량 생성된 NO는 ONOO⁻의 생성을 더욱 증가시킨다. ONOO⁻의 경우 염증, 감염 등과 같은 상태에서 대량 생성되며 NO나 O₂보다 강력한 독성을 나타낸다³⁶⁾. COX-2의 경우 정상상태에서는 거의 발현되지 않지만 염증인자나 cytokine, endotoxin 등에 의해 빠르게 발현되고 이는 통증, 염증, 발열, 종양형성에 영향을 미치는 prostaglandin E2을 생성한다³⁷⁾. 따라서 ROS에 의해 유발되는 NF- κ B를 조절하고 COX-2, iNOS의 발현을 억제하면 신경아교세포의 신경염증반응을 감소시켜 노화 및 노인성 질환을 예방할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 C6 신경아교세포에 H₂O₂를 처리하여 염증 촉진인자인 NF- κ B, COX-2, iNOS의 발현을 통한 산화적 스트

레스 보호효과에 대해 알아보았고, 여주 활성물질인 PA는 H₂O₂로 유발된 산화적 스트레스에 의해 증가된 NF-κB, COX-2, iNOS의 mRNA 발현을 감소시키고 신경아교세포 염증반응에 대한 보호효과가 있는 것으로 확인하였다.

중추신경계에서의 IL-1β, IL-6 및 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)의 전염증성 cytokine은 AD를 비롯한 신경퇴행성 질환과 관련이 있다³⁸⁾. IL-1β는 Aβ 생성을 증가시켜 Aβ 축적으로 세포사멸을 일으키며, IL-1β와 TNF-α에 의해 증가된 IL-6는 APP messenger RNA를 증가시켜 Aβ의 축적을 유도하여 AD를 유발시킬 수 있다³⁹⁾. 신경아교세포에 LPS와 IFN-γ를 처리하면 iNOS의 생성이 활성화되고, 이는 전염증성 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성을 유도한다⁴⁰⁾. 또한 활성화된 iNOS에 의해 생성된 NO는 세포사멸을 일으킨다는 보고가 있었다⁴¹⁾. 따라서 C6 신경아교세포에 LPS 및 IFN-γ를 처리하여 IL-6 분비량과 NO 생성량을 측정하여 신경아교세포 염증반응에 대한 개선효과에 대해 알아보았고, PA는 LPS와 IFN-γ에 의해 유도된 IL-6 분비량과 NO 생성량을 억제하여 신경아교세포 염증반응 및 세포사멸에 보호효과가 있는 것으로 확인하였다.

C6 신경아교세포에서 LPS를 처리하면 NF-κB가 활성화되어 핵 안으로 들어간 후 iNOS를 증가시키고 iNOS에 의해 유도된 NO는 그 자체로 COX-2를 유도하거나 O₂와 결합하여 ONOO⁻를 생성함으로써 COX-2를 증가시킨다. 이렇게 증가된 iNOS 및 COX-2는 염증반응을 일으켜 세포사멸을 일으키게 된다⁴²⁾. 따라서 LPS와 IFN-γ에 의해 유발된 신경아교세포 염증반응에 대한 PA의 보호효과를 알아보기 위하여 염증유발인자인 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 검토하였다. LPS와 IFN-γ 처리 후 iNOS와 COX-2의 발현이 정상군에 비해 증가하였고, 이는 IL-6 분비 및 NO 생성량 증가와 유사하게 나타났다. 또한 PA에 의해 이들의 발현이 감소하여 PA가 염증반응을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

이상의 연구결과에서 PA의 뛰어난 산화적 스트레스 개선효과와 신경아교세포 보호효과를 확인하였다. *In vitro*에서 PA의 우수한 자유 라디칼 소거능은 C6 신경아교세포에서 H₂O₂와 LPS 및 IFN-γ로 유발된 산화적 스트레스에 대한 NO 생성, IL-6 분비를 억제하고 NF-κB, iNOS, COX-2의 mRNA 발현 감소를 유도하여 생체 방어를 통한 보호효과를 나타내는 것으로 생각된다. 본 연구는 위의 연구결과를 근거로 여주의 주요 phenolic compound인 PA

가 산화적 스트레스 개선 및 C6 신경아교세포에서 신경염증반응 보호효과를 증명함으로써 계속 증가하고 있는 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 신경퇴행성 질환의 예방 및 치료에 유용한 기능성 후보물질로의 가능성을 확인했다는 데에 큰 의의가 있다고 생각한다.

결론

본 연구에서는 PA를 이용하여 산화적 스트레스 개선을 통한 신경아교세포 보호효과에 대해 알아보았다.

1. PA는 우수한 DPPH, ·OH, NO 소거능을 보였으며, C6 신경아교세포에 H₂O₂를 처리하였을 때 염증반응인자인 NF-κB, COX-2, iNOS의 mRNA 발현을 약 2배 이하로 감소시키는 효과를 보였다.
2. LPS와 IFN-γ를 처리하였을 때 NO 생성과 IL-6 분비를 억제하였으며, 신경염증 반응과 관계가 있는 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현을 조절하여 신경아교세포 보호효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

본 결과로부터 여주 과실의 주요 활성물질인 PA는 우수한 자유 라디칼 소거능으로 산화적 스트레스를 개선하며, 신경아교세포에서 염증반응을 억제함으로써 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료 소재로 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 2010년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임 (2010-0005480).

References

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radical and antioxidants in normal physiological function and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007 ; 39(1) : 44-84.
2. Kang SJ, Park WC, Kim TS. Changes in antioxidant and antioxidant enzymes activities of soybean leaves subjected to water stress. *J Korean Soc Appl Bi.* 1999 ; 42(3): 246-51.

3. Kumar R, Balaji S, Sripriya R, Nithya N, Uma TS, Sehgal PK. In vitro evaluation of antioxidants of fruit extract of *Momordica charantia* L. on fibroblasts and keratinocytes. *J Agric Food Chem.* 2010 ; 58(3) : 1518-22.
4. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993 ; 362(6415) : 59-62.
5. Reynolds A, Laurie C, Mosley RL, Gendelman HE. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol.* 2007 ; 82 : 297-325.
6. Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzell E Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2008 ; 9(7) : 505-18.
7. Han IO, Kim KW, Ryu JH, Kim WK. p38 mitogen-activated protein kinase mediates lipopolysaccharide, not interferon- γ , -induced inducible nitric oxide synthase expression in mouse BV2 microglial cells. *Neurosci Lett.* 2002 ; 325(1) : 9-12.
8. Pillot T, Drouet B, Queillé S, Labeur C, Vandekerckhove J, Rosseneu M, et al. The nonfibrillar amyloid β -peptide induces apoptotic neuronal cell death. *J Neurochem.* 1999 ; 73(4) : 1626-34.
9. Grover JK, Yadav S, Vats V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J Ethnopharmacol.* 2002 ; 81(1) : 81-100.
10. Lee HJ, Moon JH, Lee WM, Lee SG, Kim AK, Woo YH, et al. Charantin contents and fruit characteristics of bitter melon (*Momordica charantia* L.) accessions. *J Bio-Env Con.* 2012 ; 21(4) : 379-84.
11. Choi JS, Kim HY, Seo WT, Lee JH, Cho KM. Roasting enhances antioxidant effect of bitter melon (*Momordica charantia* L.) increasing in flavan-3-ol and phenolic acid contents. *Food Sci Biotechnol.* 2012 ; 21(1) : 19-26.
12. Zhang Q, Mejia EG. Protocatechuic acid attenuates adipogenesis-induced inflammation and mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocytes by regulation of AMPK pathway. *J Funct Foods.* 2020 ; 69 : 103972.
13. Akanni OO, Owumi SE, Olowofela OG, Adeyanju AA, Abiola OJ, Adaramoye OA. Protocatechuic acid ameliorates testosterone-induced benign prostatic hyperplasia through the regulation of inflammation and oxidative stress in castrated rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2020 ; e22502.
14. An LJ, Guan S, Shi GF, Bao YM, Duan YL, Jiang B. Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food Chem Toxicol.* 2006 ; 44 : 436-43.
15. Ban JY, Cho SO, Jeon S-Y, Bae K, Song K-S, Seong YH. 3,4-Dihydroxybenzoic acid from *Smilacis chinae* rhizome protects amyloid β protein (25-35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. *Neurosci Lett.* 2007 ; 420 : 184-8.
16. Kim KB, Lee S, Heo JH, Kim JH. Neuroprotective effects of *Momordica charantia* extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SK-N-MC cells. *J Nutr Health.* 2017 ; 50(5) : 415-25.
17. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010 ; 119(1) : 7-35.
18. O'Brien ER, Howarth C, Sibson NR. The role of astrocytes in CNS tumors: pre-clinical models and novel imaging approaches. *Front Cell Neurosci.* 2013 ; 7 : 40.
19. Falsig J, Latta M, Leist M. Defined inflammatory states in astrocyte cultures: correlation with susceptibility towards CD95- driven apoptosis. *J Neurochem.* 2004 ; 88(1) : 181-93.
20. Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med.* 2004 ; 4(2) : 193-205.
21. Choi JR, Choi JM, Lee S, Cho KM, Cho EJ, Kim HY. The protective effects of protocatechuic acid from *Momordica charantia* against oxidative stress in neuronal cells. *Kor J Pharmacogn.* 2014 ; 45(1) : 11-6.
22. Bi J, Jiang B, Zorn A, Zhao R-G, Liu P, An L-J. Catalpol inhibits LPS plus IFN- γ -induced inflammatory response in astrocytes primary cultures. *Toxicol In Vitro.* 2013 ; 27(2) : 543-50.
23. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, et al. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI.: Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull.* 1989 ; 37(8) : 2016-21.
24. Chung SK, Osawa T, Kawakishi S. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci Biotech Biochem.*

- 1997 ; 61(1) : 118-23.
25. Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT, Packer L. The nitric oxide-scavenging properties of ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 ; 201(2) : 748-55.
 26. Hong J, Wie M, Leem D, Park KS, Yoon T, No K-M, et al. Evaluation of antioxidants activity through the chemical assay. *J Biomed Res.* 2010 ; 11(1) : 1-8.
 27. Sakanaka S, Tachibana Y, Okada Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chem.* 2005 ; 89 : 569-75.
 28. Nakagawa T, Yokozawa T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol.* 2002 ; 40(12) : 1745-50.
 29. Lee AY, Lee MH, Lee S, Cho EJ. Comparative study on antioxidant activity of vegetable oils under *in vitro* and cellular system. *J Agric Sci.* 2015 ; 7(3) : 58-65.
 30. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 1988 ; 38(8) : 1285-91.
 31. Furukawa Y, Hara R-I, Nakaya M, Okuyama S, Sawamoto A, Nakajima M. Citrus auraptene induces glial cell line-derived neurotrophic factor in C6 cells. *Int J Mol Sci.* 2019 ; 21(1) : 253.
 32. Gülçin I, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytother Res.* 2007 ; 21(4) : 354-61.
 33. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. 2005. *Free Radic Biol Med.* 2005 ; 38(11) : 1433-44.
 34. Korhonen P, Helenius M, Salminen A. Age-related changes in the regulation of transcription factor NF- κ B in rat brain. *Neurosci Lett.* 1997 ; 225(1) : 61-4.
 35. Luo SF, Wang CC, Chien CS, Hsiao LD, Yang CM. Induction of cyclooxygenase-2 by lipopolysaccharide in canine tracheal smooth muscle cells: involvement of p42/p44 and p38 mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B pathways. *Cell Signal.* 2003 ; 15(5) : 497-509.
 36. Chung HY, Kim HJ, Jung KJ, Yoon JS, Yoo MA, Kim KW, et al. The inflammatory process in aging. *Rev Clin Gerontol.* 2000 ; 10(3) : 207-22.
 37. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum.* 2003 ; 33(3) : 155-67.
 38. Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. Glial cytokines in Alzheimer's disease: Review and pathogenic implications. *Hum Pathol.* 1995 ; 26(8) : 816-23.
 39. Del Bo R, Angeretti N, Lucca E, De Simoni MG, Forloni G. Reciprocal control of inflammatory cytokines, IL-1 and IL-6, and β -amyloid production in cultures. *Neurosci Lett.* 1995 ; 188(1) : 70-4.
 40. Pan MH, Lai CS, Ho CT. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct.* 2010 ; 1(1) : 15-31.
 41. Lee P, Lee J, Kim S, Lee M-S, Yagita H, Kim SY, et al. NO as an autocrine mediator in the apoptosis of activated microglial cells: correlation between activation and apoptosis of microglial cells. *Brain Res.* 2001 ; 892(2) : 380-5.
 42. Youssef S, Steinman L. At once harmful and beneficial: the dual properties of NF- κ B. *Nat Immunol.* 2006 ; 7(9) : 901-2.