

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2022.8.3.291

JCCT 2022-5-36

## 아리큐민의 In-vitro 신경보호 효과

### In-vitro Neuroprotective Effect of Aricumini(Turmeric extract)

윤남규\*, 김병권\*\*, 유현열\*\*\*, 서보승\*\*\*\*, 신창호\*\*\*\*\*, 김관규\*\*\*\*\*, 이한주\*\*\*\*\*

**Yoon Nam kyu\*, Kim Byung Kwon\*\*, Ryu Hyeon yeol\*\*\*,  
Seo Bo Seung\*\*\*\*, Shin Chang Ho\*\*\*\*\*, Kim Kwan Kyu\*\*\*\*\*, Lee Han Joo\*\*\*\*\***

**요약** 퇴행성 신경질환 치료를 위한 AChE inhibitor 관련 연구로써 생물학적 유용성을 높인 커큐민에 대한 연구를 수행하게 되었다. 본 연구의 목적은 아리큐민(강황추출물)에 대한 in vitro 신경보호 효과를 확인하는데 있다. 신경보호 효과를 확인하기 위해 아리큐민(강황추출물)에 대한 AChE inhibition을 평가하였고, HT-22 세포에 대한 세포생존율을 분석하였으며, 산화스트레스(glutamate, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 유발에 따른 HT-22 세포생존을 확인하였다. 아리큐민(강황추출물)의 AChE 저해를 변화결과 아리큐민 39.06µg/ml 이상의 농도에서 약 20% 이상의 AChE 활성을 저해하는 것으로 확인하였다. 그리고 산화스트레스(glutamate 5 mM 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM) 유발 HT-22 cell의 세포 독성을 0.01~0.1 mg/ml 농도에서부터 유의하게 억제하는 것을 확인하였다(p<0.05). 이와 같은 결과로 볼 때 아리큐민(강황추출물)은 신경보호 효과 효능이 우수한 것으로 확인되었다.

**주요어** : 강황추출물, 신경보호효과, 세포생존, 산화스트레스, 기억력

**Abstract** This study was conducted on curcumin which had increased bioavailability as a potential AChE inhibitor for the treatment of neurodegenerative diseases. The purpose of this study is to confirm the in vitro neuroprotective effect on Aricumini (turmeric extract). To confirm the neuroprotective effect, AChE inhibition for Aricumini was evaluated, and cell viability was analyzed for HT-22cell, and oxidative stress (glutamate, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced HT-22 cytotoxicity was evaluated. As a result of the change in the AChE inhibition rate of Aricumini (Turmeric extract), it was confirmed that Aricumini at a concentration of 39.06µg/ml or higher inhibited AChE activity by about 20% and more. And it was confirmed that the cytotoxicity of HT-22 cells induced by oxidative stress (Gluamate 5 mM and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM) was significantly inhibited from 0.01 to 0.1 mg/ml concentration (p<005). These results suggest that Aricumini (turmeric extract) have potential neuroprotective effects.

**Key words** : Turmeric Extract, Neuroprotective Effect, Cell Survival, Oxidative Stress, Memory

\*정회원, 주식회사 아리비앤씨 기업부설연구소 소장 (제1저자) Received: April 25, 2022 / Revised: May 5, 2022

\*\*정회원, 주식회사 아리비앤씨 수석연구원 (참여저자) Accepted: May 8, 2022

\*\*\*정회원, 한국건설생활환경시험연구원 책임연구원(참여저자) \*\*\*\*\*Corresponding Author: hjlee@aribnc.com

\*\*\*\*정회원, 주식회사 아리바이오 소장 (참여저자) Dept. of R&D, ARIBNC Co., Ltd, Korea

\*\*\*\*\*정회원, 성균관대학교 스포츠과학과 박사수료 (참여저자)

\*\*\*\*\*정회원, 용인대학교 체육학과 교수 (참여저자)

\*\*\*\*\*정회원, 주식회사 아리비앤씨 차장 (교신저자)

접수일: 2022년 4월 25일, 수정완료일: 2022년 5월 5일

게재확정일: 2022년 5월 8일

## I. 서론

퇴행성신경질환은 인지능 및 기억력과 운동협응 능력에 따른 행동 등의 변화를 야기시키는 임상적 특징이 알려져 있다 [1]. 퇴행성신경질환에 대한 신경병리학적 특성은 세포의 amyloid-β peptide(Aβ)에 기인된 세포 외 senile plaques와 neurofibrillary tangle에 수반된 세포 내 세포와 시냅스의 광범위한 손실이 동반되는 protein aggregate 그리고 신경전달물질계의 변화 등이 보고되고 있다 [1].

특히, 퇴행성신경질환 중 인지능과 기억력 관련 우선되는 원인으로 전뇌 기저부(basal forebrain)에서의 cholinergic cell 손실에 따른 신경전달물질 소실인 cholinergic 가설이 주장되고 있다 [2]. 근래 인지능과 기억력의 개선과 치료를 위해 cholinergic 가설을 기반으로한 신경연접부위에서 ACh 분해 담당효소 AChE를 억제하여 인지능과 기억력을 개선하고자 중추신경계의 cholin성 연접에서의 ACh 이용을 증가시키는 다양한 AChE inhibitor 개발에 대한 다양한 연구들이 진행되고 있다.

커큐민은 인도, 중국을 포함한 남아시아, 아프리카 및 라틴아메리카에 걸쳐 분포하고 있는 생강과(Zingiberaceae)에 속해 있는 강황(Curcuma longa L.)에 2-8% 정도 함유된 다양한 생리활성에 우수한 성분으로 알려져 있으며, 섭취 시 안전성도 우수한 것으로 보고되고 있다 [3][4]. in vitro와 in vivo 연구결과 커큐민의 농도의존적 AChE inhibitor의 우수한 효과가 보고되고 있지만 [5], 임상시험에서의 긍정적 효과를 기대하기에는 생물학적 유용성(bioavailability)의 이해가 부족하다. Yang et al.(2007)은 rats을 이용 정맥으로 커큐민 10mg/kg을 투여했을 때(0.36μg/ml)와 구강섭취 시켰을 때(0.06μg/ml) 생물학적 유용성의 차이범위가 큰 것으로 보고하고 있어 [6] 커큐민의 우수한 기능을 보전하기 위한 높은 생물학적 유용성의 커큐민 소재개발의 필요성이 대두되고 있다. 이와 같이 커큐민의 생물학적 유용성은 임상학적으로 18개월 장기간 커큐민 섭취에 따른 기억력 개선효능에서도 미치는 영향이 크므로 인해 커큐민을 이용한 퇴행성신경질환 예방 효과를 위해, 생물학적 유용성을 높일 수 있는 다양한 방법을 이용한 소재개발의 필요성이 있다 [7][8].

이번 연구는 커큐민의 낮은 생물학적 유용성으로 지적되고 있는 유효성분들의 낮은 활성(low intrinsic activity),

작은 흡수(poor absorption), 높은 대사체로의 전환율(high rate of metabolism), 신속한 체내 배출(rapid elimination) 등의 문제를 극복하기 위해 소수성 폴리페놀 성질을 친수성으로 변화시키는 단순 추출공정 이외 nanosuspension, nanoemulsion 기술을 기반으로 친수성으로 제조된 아리큐민을 이용 신경보호 효과를 확인하는데 연구의 목적이 있다.

## II. 연구방법

### 1. 시험물질

실험에 사용된 아리큐민(강황추출물 CM-SD; 커큐민 40%)은 (주)아리바이오에이치엔비로부터 시험물질로 제공되었다. (주)사빈사로부터 공급받은 원재료 강황추출분말(Curcumin C3 complex)을 이용하여 정제수, 인산, 가티검과 혼합 후 20시간 이상 분산입도 과정을 통해 여과 후 텍스트린 6.76%를 첨가, 최종적으로 분무건조기(Spray dryer)를 이용하여 건조된 시험물질 아리큐민(강황추출물 CM-SD, 400mg/g)은 (주)아리바이오 에이치엔비에서 제조되었다. 실험에 사용 전까지 빛과 습기로부터 보호하기 위해 4℃에서 냉장보관 하였다.

### 2. 시험관시험

아리큐민의 Acetylcholinesterase(AChE) 저해 활성 평가를 위한 시험관 실험을 위해 Acetylcholinesterase assay kit(DG-ACE100, DoGenBio, Korea)를 이용 검액 및 표준물질은 각각 78.13 μg/ml, 31.25 μg/ml 농도를 고 농도로 설정하고 공비를 2로 두어 희석 하였으며, 25 μl 농도별 검액에 50 μl 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0), 25 μl AchE(2.5 U/ml)를 혼합 후 37 °C에서 10 분간 반응시켰다. 각 Well에 50 μl AchE reaction mixture(45 μl assay buffer, 2 μl AchE probe, 1 μl AchE substrate)를 넣어준 뒤 Microplate reader(Molecular devices, SoftMax Pro5, USA)를 이용 570 nm 파장에서 흡광도 측정을 하였으며, AChE의 저해능을 상대적인 백분율(%)로 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{AChE Inhibition rate(\%)} = \left(1 - \frac{\text{ODA}^*}{\text{ODB}^{**}}\right) \times 100$$

\* ODA: 시료첨가군의 흡광도

\*\* ODB: 무첨가군의 흡광도

표 1. 아리큐민의 농도의존적 AchE 저해율 변화

Table 1. Concentration-dependent AchE Inhibition Rate Change of Aricumín

아리큐민					
농도, $\mu\text{g/ml}$	0	9.77	19.53	39.06	78.13
저해도, %	0 $\pm$ 5.84	12.58 $\pm$ 2.29	14.53 $\pm$ 1.97	19.60 $\pm$ 2.54	27.17 $\pm$ 1.53
커큐민					
농도, $\mu\text{g/ml}$	0	3.91	7.81	15.63	31.25
저해도, %	0 $\pm$ 5.84	4.79 $\pm$ 0.60	8.62 $\pm$ 0.98	19.76 $\pm$ 3.57	27.81 $\pm$ 6.55

### 3. In vitro 연구

#### 1) 세포배양

세포주는 HT-22 마우스 해마 신경세포(SCC129, Millipore, Temecula, CA, USA)을 사용하였고 10% fetal bovine serum(FBS; Australian Origin, HyClone™, Logan, UT, USA)과 100 units/ml의 penicillin(Grand Island, NY, USA), 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 streptomycin(Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA)을 함유한 DMEM Medium (HyClone™)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 CO<sub>2</sub> incubator(311-TIF, Thermo Fisher Scientific Forma®, MA, USA)에서 배양하였다.

#### 2) 세포독성평가

강황 추출물(CM-SD, (0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5 및 10 mg/ml)의 처리가 HT-22 마우스 해마 신경 세포주 1×10<sup>4</sup> cells에 대한 생존율에 미치는 영향을 EZ-Cytox cell viability assay kit(EZ-3000, Daeillab, Seoul, Korea)를 이용하여 매체 대조군(0 mg/kg)에 대한 비율로 평가하였다. CM-SD는 72시간 동안 처리하였으며, VersaMax™ microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 3) 산화스트레스 유발 세포독성에 대한 신경세포 보호 효과 평가

CM-SD(0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5 및 10 mg/ml)의 산화스트레스(5mM glutamate 또는 500  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 유발 HT-22 마우스 해마 신경세포주 1×10<sup>4</sup> cells에 대한 생존율에 미치는 영향을 EZ-Cytox cell viability assay kit를 이용하여 정상 매체 대조군에 대한 비율로 평가하였다. CM-SD는 5mM glutamate 또는 500  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 30분 전부터 12.5시간 동안 처리하였으며, VersaMax™ microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. 통계분석방법

수집된 모든 자료는 SPSS 21.0(IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA)을 이용 평균과 표준편차를 산출하였으며, 시험물질과 대조물질의 차이검증은 One-way ANOVA와 사후분석 Tukey's Honest Significant Difference를 실시하였다. 대조군 대비 변화율은 “((glutamate, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Date of intact control)/ Data of intact control) × 100”으로 계산되었으며, 유의검증 수준은 p<0.05로 설정하였다.

## III. 연구결과

### 1. 아리큐민의 AchE 활성 저해 효과

78.13, 39.06, 19.53, 9.77  $\mu\text{g/ml}$  보편적인 아리큐민의 AchE 활성저해도는 시료를 반응시키지 않은 음성대조군(0  $\mu\text{g/ml}$ ) 대비, 약 27.17, 19.60, 14.53, 12.58%의 활성저해를 보였으며, 표준물질(커큐민 99%)은 31.25, 15.63, 7.81, 3.91  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 약 27.81, 19.76, 8.62, 4.79 %의 AchE 활성저해를 나타내었다(Table 1). 시험물질인 아리큐민이 AchE 활성저해에 미치는 영향을 확인하기 위해 대조물질 커큐민 99%의 AchE 활성저해도를 측정하여 비교 평가하였다. 위의 조건으로 시험을 진행한 결과, 아리큐민 39.06  $\mu\text{g/ml}$ , 커큐민 15.63  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 약 20% 및 그 이상의 활성저해를 보였다. 아리큐민에 포함된 커큐민 40%를 고려했을 때 커큐민 99% 성분 대비 동등 또는 이상의 AchE 활성저해 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

### 2. 아리큐민의 HT-22 세포에 대한 세포 생존률

매체 대조군(0 mg/ml 처리군)과 비교하여 유의성 있는 HT-22 세포 생존률의 변화는 모든 7 가지 농도의 아리큐민 처리군에서 인정되지 않았다(Figure 1). 아리큐민 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5 및 10 mg/ml 농도 처리군에서는

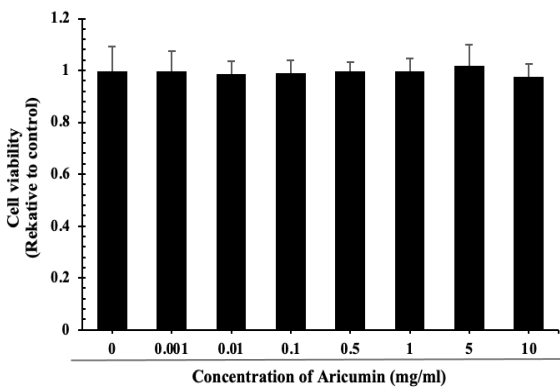


그림 1. 아리큐민의 농도별 세포생존율 변화(incubated 72시간)  
Figure 1. Changes in cell viability by concentration of aricumin.

매체 대조군(0 mg/ml 처리군)에 비해 각각 -0.17, -1.34, -0.83, 0.00, -0.17, 2.00 및 -2.34%의 HT-22 세포 생존률의 유의한 변화는 나타나지 않았다.

3. 아리큐민의 glutamate 유발 산화스트레스성 HT-22 세포독성 보호효과

HT-22 세포는 신경의학분야에서 in vitro 세포독성 및 세포 보호 효과를 평가하기 위해 주로 사용되는 마우스

해마 신경세포 주이다 [9][10][11]. 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) HT-22 세포 생존률의 감소가 glutamate 5 mM 처리 대조군에서 인정되었으나, 아리큐민 0.1 mg/ml 처리군부터 10 mg/ml 처리군에 걸쳐 glutamate 5 mM 처리 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) HT-22 세포 생존률의 증가가 처리 농도 의존적으로 각각 인정되었다(Figure 3). 또한, HT-22 세포 생존률은 glutamate 5 mM 처리 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -56.76%의 변화를 나타내었으나, 아리큐민 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5 및 10 mg/ml 농도 처리군에서는 glutamate 5 mM 처리 대조군에 비해 각각 -1.93, 30.50, 40.15, 48.26, 52.12, 69.88 및 79.54%의 변화를 나타내었다. 따라서 적어도 본 연구의 in vitro 실험 조건 하에서 아리큐민은 HT-22 세포에 직접적인 세포독성 없이, 항산화 효과를 통한 신경세포 보호 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.

4. 아리큐민의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유발 산화스트레스성 HT-22 세포 독성 보호효과

정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) HT- 22

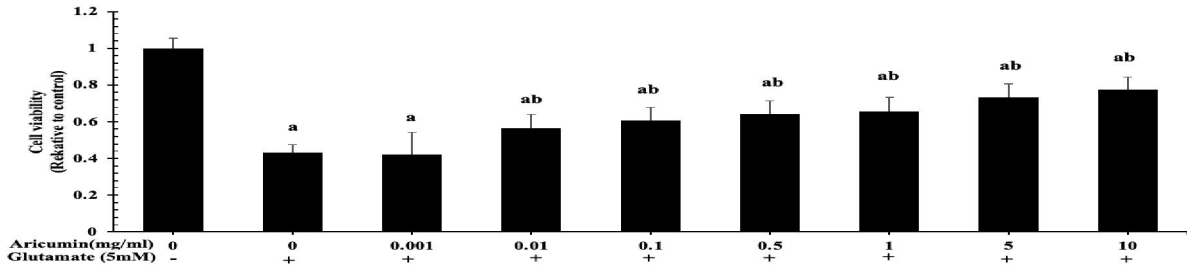


그림 2. 아리큐민의 농도의존적 Glutamate 유발 산화스트레스성 HT-22 세포 독성 보호효과  
(a; 음성대조군 대비  $p < 0.01$ , b; 양성대조군 대비  $p < 0.01$ )

Figure 2. Aricumin concentration-dependent glutamate-induced oxidative stress protective effect on HT-22 cytotoxicity  
(a;  $p < 0.01$  compared to negative control, b;  $p < 0.01$  compared to positive control)

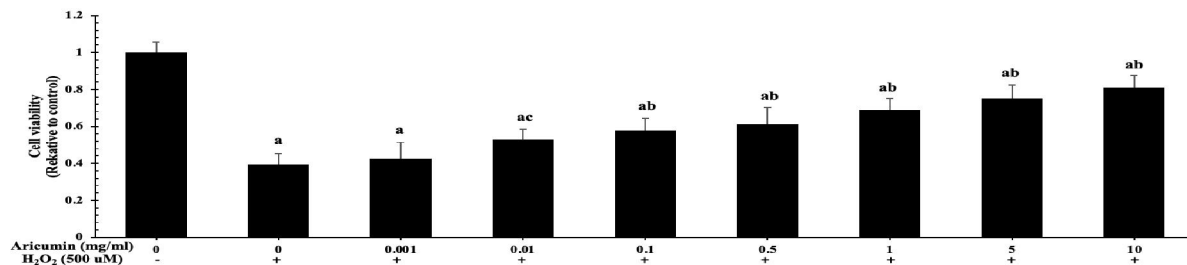


그림 3. 아리큐민의 농도의존적 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유발 산화스트레스성 HT-22 세포독성 보호효과  
(a; 음성대조군 대비  $p < 0.01$ , b; 양성대조군 대비  $p < 0.01$ , c; 양성대조군 대비  $p < 0.05$ )

Figure 3. Aricumin concentration-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress HT-22 cytotoxicity protective effect  
(a;  $p < 0.01$  compared to negative control, b;  $p < 0.01$  compared to positive control c;  $p < 0.05$  compared to positive control)

세포 생존률의 감소가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM 처리 대조군에서 인정되었으나, 아리큐민 0.01 mg/ml 처리군부터 10 mg/ml 처리군에 걸쳐 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM 처리 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01 또는 p<0.05) HT-22 세포 생존률의 증가가 처리 농도 의존적으로 각각 인정되었다 (Figure 3).

HT-22 세포 생존률은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM 처리 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -60.50%의 변화를 나타내었으나, 아리큐민 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5 및 10 mg/ml 농도 처리군에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM 처리 대조군에 비해 각각 7.59, 33.76, 45.57, 54.85, 74.26, 90.30 및 105.06%의 변화를 나타내었다.

#### IV. 결론

이번 연구는 생물학적 유용성이 고려된 아리큐민(강황추출물)의 신경보호효과를 규명하기 위해 시험관시험을 통한 AChE 저해율 변화를 확인하였으며, 마우스 해마 신경세포주 HT-22 세포에 대한 신화스트레스 (glutamate 5 mM 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM) 유발 HT-22 세포 독성을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 아리큐민의 AChE 저해율 변화결과 아리큐민 39.06 μg/ml 이상의 농도에서 약 20% 이상의 AChE 활성저해를 보였다. HT-22세포에 별다른 직접적인 세포 독성 없이, 신화스트레스(glutamate 5 mM 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM) 유발 HT-22 세포 세포독성을 0.01~0.1 mg/ml 농도에서부터 유의성 있게 억제하였으며, 이와 같은 결과를 종합해 볼 때 아리큐민(강황추출물)의 신경보호효과가 확인 되었으며, 기억력개선을 포함한 다양한 퇴행성신경질환 예방에 도움을 줄 수 있는 기능성 식품소재로서 개발 가능성이 매우 높을 것으로 기대된다.

#### References

[1] B.N. Dugger, and D.W. Dickson, "Pathology of neurodegenerative disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Vol. 9, No. 7, a028035. July, 2017. DOI: <https://doi:10.1101/cshperspect.a028035>

[2] K. Okada, K. Nishizawa, T. Kobayashi, S. Sakata, K. Hashimoto, and K. Kobayashi, "Different cholinergic cell groups in the basal forebrain regulate social interaction and social recognition

memory." *Scientific Reports*. Vol. 11, No. 1, pp. 1-12, June 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93045-7>

[3] P.G. Bradford, "Curcumin and obesity." *Biofactors* Vol. 39, No. 1, pp. 78-87. January 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/biof.1074>

[4] D.B. Kim, E.Y. Ahn, and E.J. Kim, "Improvement of Insulin Resistance by Curcumin in High Fat Diet Fed Mice." *The Journal of the Convergence on Culture Technology (JCCT)*, Vol. 4, No. 1, pp. 315-323, February 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.1.315>.

[5] T. Ahmed, and A. Gilani, "Inhibitory effect of curcuminoids on scetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in Alzheimer's disease." *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Vol. 91, No. 4, pp. 554-559. February 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.09.010>

[6] K.Y. Yang, L.C. Lin, T.Y. Tseng., S.C. Wang, and T.H. Tsai, "Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS." *Journal of Chromatography B*. Vol. 853., No. 1-2, pp. 183-189. June, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.03.010>

[7] H.K. Kim, and J.H. Lee, "Anticardiovascular Diseases Effects of Fermented Garlic and Fermented Chitosan." *The International journal of advanced culture technology(IJACT)*. Vol. 6, No. 4, pp. 109-115. November, 2018. DOI: <https://doi.org/10.17703/IJACT2018.6.4.109>

[8] S. Prasad, A. K. Tyagi, and B. B. Aggarwal, "Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice." *Cancer research and treatment*. Vol. 46, No. 1, pp. 2-18. January, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4143/crt.2014.46.1.2>

[9] J.R. Hu, Y.S. Chun, J.K. Km, I.J. Cho, and S.K. Ku, "Ginseng berry aqueous extract prevents scopolamine-induced memory impairment in mice." *Experimental and Therapeutic Medicine*. Vol. 18, No. 6, pp. 4388-4396. October, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8090>

[10] M.C. Jin, J.M. Yoo, D.E. Sok, and M.R. Kim, "Neuroprotective effect of N-acyl 5-hydroxytryptamines on glutamate-induced cytotoxicity in HT-22 cells." *Neurochemical Research*. Vol. 39, No. 12, pp. 2440-2451. October, 2014. DOI: [doi 10.1007/s11064-014-1448-2](https://doi.org/10.1007/s11064-014-1448-2)

- [11]J.M. Yoo, B.D. Lee, D.E. Sok, J.Y. Ma, and M.R. Kim, "Neuroprotective action of N-acetyl serotonin in oxidative stress-induced apoptosis through the activation of both TrkB/CREB/BDNF pathway and Akt/Nrf2/Antioxidant enzyme in neuronal cells." *Redox Biology*. Vol. 11, pp 592-599. April, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.034>

※ 이 논문은 중소벤처기업부 산연협력(사업화 R&D) 지원(S2889318)에 의하여 연구되었음.