

# Neuroprotective effects of three flavonoids from *Acer okamotoanum* against neurotoxicity induced by amyloid beta in SH-SY5Y cells

Ji Hyun Kim<sup>1</sup>, Sanghyun Lee<sup>2</sup>, Eun Ju Cho<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea

<sup>2</sup>Department of Plant Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

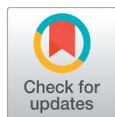
<sup>3</sup>Department of Food Science and Nutrition & Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 46241, Korea

\*Corresponding author: [ejcho@pusan.ac.kr](mailto:ejcho@pusan.ac.kr)

## Abstract

Amyloid beta (A $\beta$ ) is produced from an amyloid precursor protein by the activation of the amyloidogenic pathway, and it is widely known to cause Alzheimer's disease (AD). In this study, we investigated the neuroprotective effects of three flavonoids, quercitrin, isoquercitrin, and afzelin, from *Acer okamotoanum* against A $\beta$ -induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuronal cells. A $\beta_{25-35}$  treatments resulted in decreased cell viability and increased levels of nuclei condensation and fragmentation. However, an isoquercitrin treatment dose-dependently increased cell viability and decreased nuclei condensation and fragmentation levels. SH-SY5Y cells treated with A $\beta_{25-35}$  showed increased reactive oxygen species (ROS) production compared to that from cells not treated with A $\beta_{25-35}$ . However, treatment with the three flavonoids significantly inhibited ROS production compared to an A $\beta_{25-35}$ -treated control group, indicating that the three flavonoids blocked neuronal oxidative stress. For a closer examination of the neuroprotective mechanisms, we measured the expressions of the non-amyloidogenic pathway-related proteins of a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and the tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme (TACE). An isoquercitrin treatment enhanced the expressions of ADAM10 compared to the control group. In addition, the three flavonoids activated the non-amyloidogenic pathway via the upregulation of TACE. In conclusion, we demonstrated neuroprotective effects of three flavonoids from *A. okamotoanum*, in particular isoquercitrin, on neurotoxicity by the regulation of the non-amyloidogenic pathway in A $\beta_{25-35}$ -treated SH-SY5Y cells. Therefore, we suggest that flavonoids from *A. okamotoanum* may have some potential as therapeutics of AD.

**Key words:** afzelin, amyloid beta, isoquercitrin, neurotoxicity, quercitrin



## OPEN ACCESS

**Citation:** Kim JH, Lee S, Cho EJ. Neuroprotective effects of three flavonoids from *Acer okamotoanum* against neurotoxicity induced by amyloid beta in SH-SY5Y cells. Korean Journal of Agricultural Science 49:227-237. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20220019>

**Received:** February 09, 2022

**Revised:** March 22, 2022

**Accepted:** April 12, 2022

**Copyright:** © 2022 Korean Journal of Agricultural Science



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.

## Introduction

전 세계적으로 인구 고령화 현상으로 인해 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease)와 같은 신경퇴행성질환 발병률이 증가하고 있으며, 이는 각종 사회적·경제적 문제를 야기하고 있다 (Sengoku, 2020). 알츠하이머성 치매는 뇌 내 amyloid beta (A $\beta$ ) 단백질이 응집되어 A $\beta$  plaque

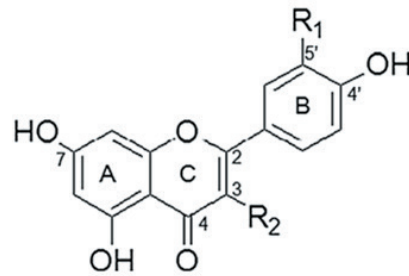
형태로 축적되는 병리학적 특징을 나타내며, 이는 알츠하이머성 치매의 주요 원인으로 알려져 있다(Gouras et al., 2015; Tiwari et al., 2019). A $\beta$ 는 amyloidogenic pathway에 의해 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein, APP)로부터  $\beta$ -,  $\gamma$ -secretase 효소 활성화에 의해 순차적으로 분리되어 생성된다(Gouras et al., 2015). Amyloidogenic pathway에 의해 과생성된 A $\beta$ 는 뇌 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성량을 증가시켜 산화적 손상을 유도하고, 이는 결국 뇌 신경세포 사멸을 일으켜 인지능력 및 기억력 손상을 유도한다(Cheignon et al., 2018). 반면 APP로부터  $\alpha$ -secretase 효소의 작용 시 non-amyloidogenic pathway가 활성화되는데, 이는 APP로부터 A $\beta$ 로 분리되는 과정을 억제시켜 결국 A $\beta$  생성을 저하시킨다(Kojro and Fahrenholz, 2005; Tang, 2005). 따라서 국내외 연구에서 APP로부터 A $\beta$  생성을 억제하는 non-amyloidogenic pathway 활성화에 도움을 줄 수 있는 알츠하이머성 치매 예방 및 개선용 소재 개발에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Wang et al., 2016).

우산고로쇠(*Acer okamotoanum*)는 우리나라의 울릉도에서 자생하는 단풍나무과 식물로서, quercetin, kampferol, tannic acid, gallic acid, cleomiscosin A, C 등의 생리활성물질을 함유하는 것으로 보고되었다(Kim et al., 1998; Jin et al., 2007; Takayama et al., 2012). 또한 국내외 연구를 통해 우산고로쇠의 항암 효능, 면역 활성화, 항비만 효과, 고혈압 개선 효과 등의 생리활성이 보고되었다(Qadir et al., 2007; Yang et al., 2012; Kim et al., 2018). 사전 연구를 통해 우산고로쇠 ethyl acetate (EtOAc) 분획물은 *in vitro* 항산화 활성과 A $\beta$ 로 손상을 유도한 신경교세포에서 신경교세포 보호 효능이 다른 추출 및 분획물에 비해 우수함을 확인하였다(Choi et al., 2017a). 또한 우산고로쇠 활성분획물인 EtOAc 분획물은 A $\beta$ 로 알츠하이머성 치매를 유도한 동물모델에서 인지능 개선 효과를 나타냄을 확인하였다(Choi et al., 2017b). 뿐만 아니라, 우산고로쇠 EtOAc 분획물로부터 quercitrin (quercetin-3-rhamnoside), isoquercitrin (quercetin-3-glucoside), afzelin (kaempferol-3-rhamnoside)과 같은 3가지 flavonoids 성분을 분리하였으며, 이들은 항산화 활성을 통한 신경교세포 보호 효과를 나타내었다(Lee et al., 2018; Kim et al., 2019). 그러나 우산고로쇠 EtOAc로부터 분리한 3가지 flavonoids의 A $\beta$ 로 손상을 유도한 신경세포에서의 보호 효과와 non-amyloidogenic pathway 조절 관련 메커니즘 규명에 관한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 우산고로쇠 EtOAc 분획물로부터 분리한 quercitrin, isoquercitrin, afzelin과 같은 3가지 flavonoids 성분이 A $\beta$  유도 신경독성에 대한 SH-SY5Y 신경세포 보호 효과를 확인하고, 관련 메커니즘을 규명하고자 한다.

## Materials and Methods

### 실험재료

실험재료인 quercitrin, isoquercitrin, afzelin은 사전연구를 통해 우산고로쇠 EtOAc 분획물로부터 분리하여 실험에 사용하였다(Lee et al., 2018). 환류냉각장치를 이용하여 995.4 g의 우산고로쇠 지상부를 methanol로 추출하였으며, 이로부터 176.1 g의 methanol 추출물을 얻었으며, 이를 물에 현탁 후 *n*-hexane (27.6 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.8 g), EtOAc (35 g), *n*-BuOH (7.4 g)로 분획하여 각 분획물을 얻었다. 그 중 EtOAc 분획물을 사용하였다. 우산고로쇠 EtOAc 분획물(30 g)은 CHCl<sub>3</sub>/MeOH 용매조성으로 silica gel column chromatography를 이용하여 12개의 소분획을 얻었으며, 9번 분획물을 LiChroprep 크로마토그래피를 실시하여 소분획5번으로부터 재결정화 과정을 거쳐 afzelin을, 소분획 10번으로부터 재결정화 과정을 거쳐 quercitrin을, 소분획 11번으로부터 Sephadex LH-20을 통과시켜 isoquercitrin을 분리하였다. 각 화합물의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MS data를 이용하여 3가지 flavonoids 성분을 동정하였다. 각 성분은 HPLC/UV 분석기기를 이용하여 INNO column과 water : acetonitrile의 기울기 용매조성 및 UV 330 nm 측정으로 정량분석을 실시하였다. 각 성분의 함량은 afzelin (2.66  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), quercitrin (48.26  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), isoquercitrin (5.84  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )으로 확인되었다(Lee et al., 2018). 이들 flavonoids의 구조는 Fig. 1과 같다(Lee et al., 2018).



Compound	R1	R2
Quercitrin	OH	O-Rhamnoside
Isoquercitrin	OH	O-Glucoside
Afzelin	H	O-Rhamnoside

**Fig. 1.** Structures of three flavonoids from *Acer okamotoanum* (Lee et al., 2018).

### 세포 종류 및 배양

SH-SY5Y 신경세포는 한국세포주은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. SH-SY5Y 신경세포는 fetal bovine serum (FBS), 100 units·mL<sup>-1</sup>의 penicillin streptomycin 용액이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지를 이용하여 배양하였으며, 이들 시약은 Welgene (Daegu, Korea)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였고, 배양된 세포가 80% 이상 증식되었을 때, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세포를 세척 후 trypsin ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Welgene, Daegu, Korea)를 이용하여 부착된 세포를 분리하여 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

### 세포 생존율 측정

세포를 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cells·well<sup>-1</sup>로 seeding하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 배양시킨 뒤, 우산고로쇠 flavonoids를 각각 농도별로 처리하여 4시간 배양하였다. 이후 신경독성을 유도하기 위해 25 μM Aβ<sub>25-35</sub> (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 처리하여 배양하였다. 24시간 뒤, 각 well에 5 mg·mL<sup>-1</sup>의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Bio Basic, Toronto, Canada) solution을 주입하여 incubator에서 4시간 재배양하였다. 이후 MTT solution을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Bio Pure, Ontario, Canada)를 각 well에 주입하여 생성된 formazan 결정을 30분간 빛이 차단된 상태에서 녹여 540 nm에서 microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 기기를 이용하여 흡광도를 측정하였다(Mosmann, 1983).

### Reactive oxygen species (ROS) 소거능 측정

각 well에 80 μM의 dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma, Saint Louis, USA) solution 을 주입하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 30분간 재배양한 뒤, 이를 excitation-480 nm, emission-535 nm에서 FLUO star OPTIMA (BMG Labtech., Ortenberg, Germany) 기기를 이용하여 형광도를 측정하여 각 군별 ROS 소거능을 계산하였다(Wang and Zhu, 2003).

## Hoechst 33342 staining

SH-SY5Y 세포를 8 well chamber slides에 seeding하여 시료를 농도별로 처리하여 4시간 배양시킨 뒤, 25  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 24시간동안 처리하였다. 이 후 PBS로 세척한 뒤 4% paraformaldehyde를 10분간 처리하여 세포를 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS로 세척한 뒤 Hoechst 33342 (NucBlue<sup>®</sup> Live Ready Probes<sup>®</sup> Reagent, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 시약을 20분간 처리하여 세포를 염색시켰다. 염색된 세포는 fluorescence microscope (Olympus BX50, Tokyo, Japan) 기기를 이용하여 세포의 apoptotic bodies를 관찰하였다.

## Western blot analysis

세포는 RIPA cell lysis buffer (Elpis Biotech, Daejeon, Korea)를 이용하여 단백질을 추출한 뒤, Bio-Rad assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 단백질 정량을 실시하였다. 동일한 단백질 양을 10 - 13% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel에 전기영동하여 분리한 뒤, 이를 polyvinylidene fluoride membranes에 transfer 시켰다. 5% skim milk를 이용하여 1시간 동안 membrane을 blocking 시킨 뒤, 1차 항체로 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입한 a disintegrin and metalloprotease domain 10 (ADAM10), tumor necrosis factor a cleaving enzyme (TACE)을 PBST에 희석하여 membrane과 반응시켰다. 이 후 2차항체와 반응시킨 뒤 chemiluminescent imaging system (Davinci Chemi, CoreBio Systems, Seoul, Korea)을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. 각 군별 단백질 발현량은 Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 정량화하였다.

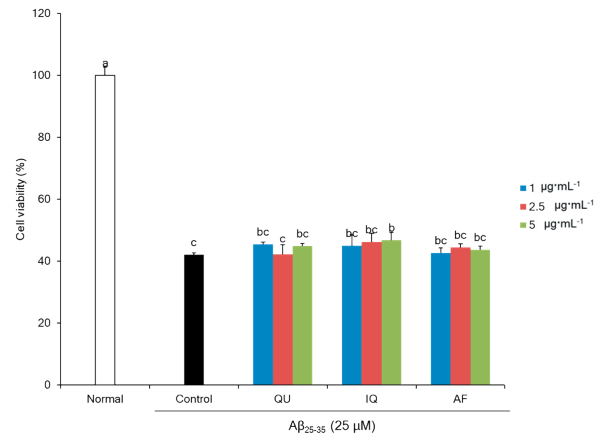
## 통계 분석

모든 실험 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었고, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 각 실험결과들로부터 analysis of variance (ANOVA)를 구한 뒤, Duncan's multiple range test를 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 각 군의 평균간의 유의성을 검정하였다.

## Results and Discussion

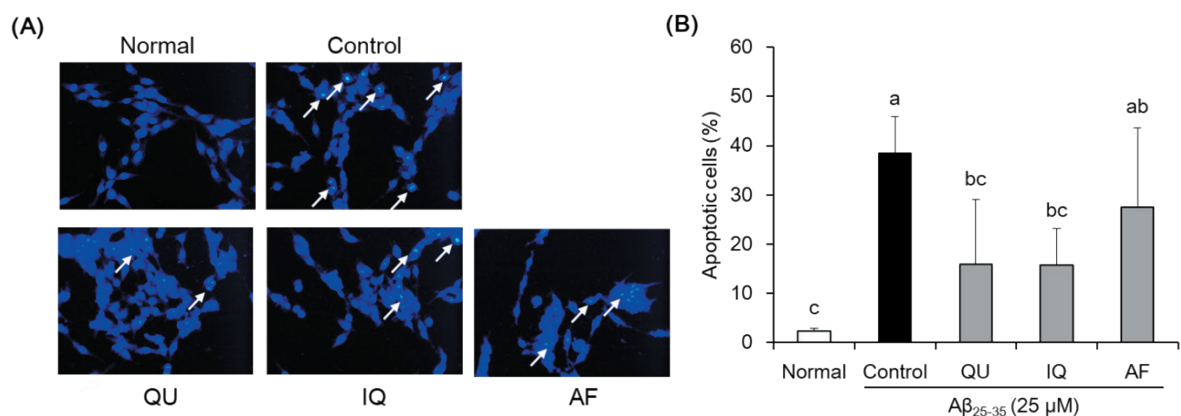
뇌 내  $\text{A}\beta$  plaque 침착은 알츠하이머성 치매의 대표적인 병리학적 특징으로 보고됨에 따라,  $\text{A}\beta$ 를 생성하는 amyloidogenic pathway는 알츠하이머성 치매의 주요 원인으로 보고되고 있다(Gouras et al., 2015; Tiwari et al., 2019).  $\text{A}\beta_{25-35}$ 는 39 - 43개의 아미노산을 포함하는 full length  $\text{A}\beta$ 의 절단된 형태로써, full length  $\text{A}\beta$ 와 유사한 독성을 나타낸다(Pike et al., 1995; Varadarajan et al., 2001). 특히  $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 신경세포에 처리했을 때 ROS 과생성으로 인해 산화적 손상이 유도되었으며, 이는 뇌 신경세포 사멸을 일으키는 것으로 보고되었다(Cheignon et al., 2018). 따라서  $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 이용하여 신경독성에 대한 천연물 유래 생리활성물질의 신경세포 보호 효과를 확인하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Sarkar et al., 2017; Yang et al., 2018). 따라서 본 연구에서  $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 이용하여 신경독성을 유도한 SH-SY5Y 신경세포에서 우산고로쇠 3가지 생리활성물질인 quercitrin, isoquercitrin, afzelin의 신경세포 보호 효과를 확인하고자 하였다.

먼저 우산고로쇠 3가지 flavonoids의  $\text{A}\beta_{25-35}$ 에 대한 SH-SY5Y 신경세포에 대한 보호 효과를 확인하기 위해 세포생존율을 측정하였다.  $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 처리한 control군은  $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 처리하지 않은 normal군 100%에 비해 세포생존율이 42.08%로 감소하여  $\text{A}\beta_{25-35}$  처리로 인해 신경독성이 유도됨을 알 수 있었다(Fig. 2). 반면 우산고로쇠 3가지 flavonoids를 1, 2.5, 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도별로 각각 처리하였을 때 isoquercitrin을 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도로 처리한 군에서 46.74%의 세포생존율을 나타내어 control군에 비해 유의적으로 세포생존율이 증가함을 알 수 있었다.



**Fig. 2.** Effect of three flavonoids from *Acer okamotoanum* on the cell viability in  $\text{A}\beta_{25-35}$ -treated SH-SY5Y cells. Values are mean  $\pm$  SD. a - c: Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. QU, quercitrin; IQ, isoquercitrin; AF, afzelin.

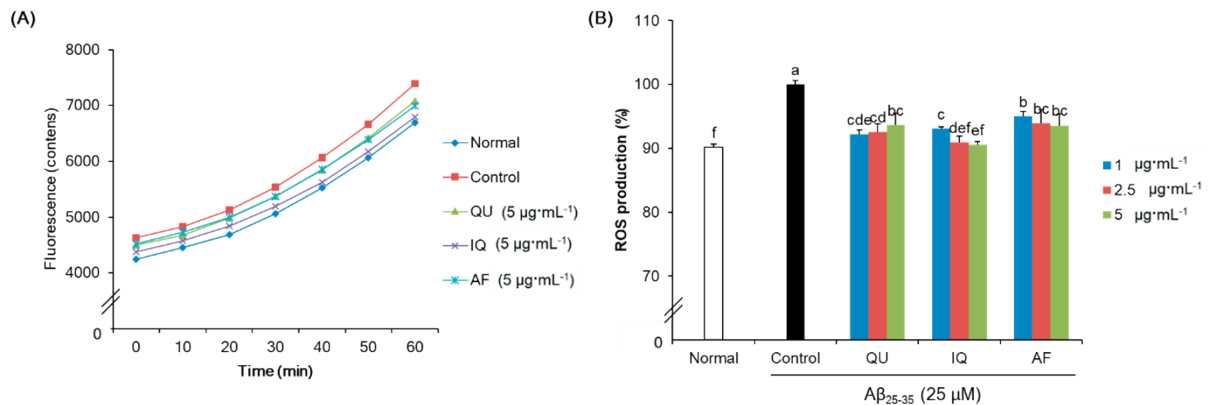
신경세포에  $\text{A}\beta$ 가 과다하게 생성될 경우 산화적 스트레스, 신경염증 반응 등을 통해 신경독성이 유도된다(Cai et al., 2014; Cheignon et al., 2018). 뇌 내  $\text{A}\beta$ 로 인한 신경독성은 세포 핵의 condensation과 fragmentation을 일으켜 결국 뇌 신경세포가 사멸되는 apoptosis를 유발시킨다(Li et al., 1996; Brewer et al., 2005). 이는 뇌의 정상적인 기능을 수행하는 인지능 및 기억력 손상을 유도하여 알츠하이머성 치매의 원인이 된다(Li et al., 1996; McPhie et al., 2001). 우산고로쇠 EtOAc 분획물로부터 분리한 3가지 flavonoids의  $\text{A}\beta_{25-35}$ 로 유도된 신경세포 사멸에 대한 보호 효과를 확인하기 위해 Hoechst 33342 staining을 통해 apoptotic cell을 분석하였다. 아무것도 처리하지 않은 normal군의 핵은 타원형의 온전한 형태를 나타내었으나,  $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 처리한 control군에서 핵 내 condensation과 fragmentation을 통한 apoptotic body가 증가하여  $\text{A}\beta_{25-35}$  처리로 인해 신경독성이 유도됨을 알 수 있었다(Fig. 3). 반면 quercitrin과 isoquercitrin을  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도로 처리했을 때 control군에 비해 핵 내 condensation과 fragmentation이 감소하여 유의적으로 apoptotic cell이 억제된 것을 알 수 있었다.



**Fig. 3.** Effect of three flavonoids from *Acer okamotoanum* on nuclei condensation and fragmentation in  $\text{A}\beta_{25-35}$ -treated SH-SY5Y cells. The nuclear morphology (400x) of cells (A) and quantification of the nuclei demonstrating apoptotic bodies (B). Values are mean  $\pm$  SD. a - c: Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. QU, quercitrin; IQ, isoquercitrin; AF, afzelin.

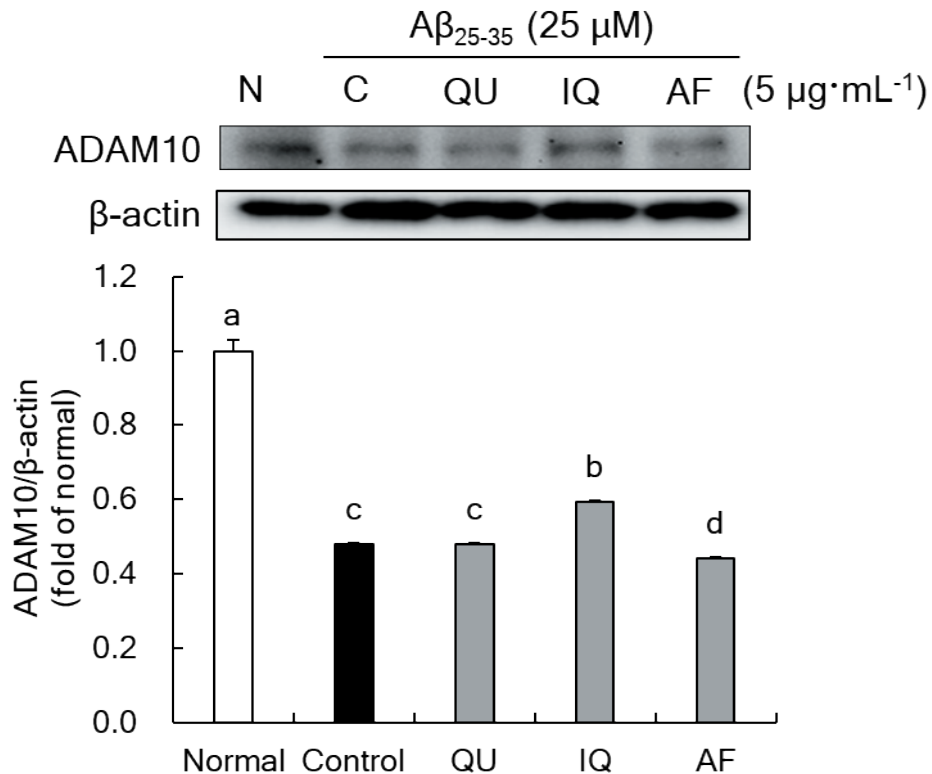


Amyloidogenic pathway 활성화로 인해 생성된 A $\beta$ 는 뇌 내에서 plaque를 형성하고 이는 ROS를 과생성하는 것으로 알려져 있다(Cheignon et al., 2018). 특히 과생성된 ROS는 신경세포막의 지질과산화, 뇌 내 DNA 및 RNA 손상, 단백질 변성 등 생체분자의 손상을 일으킨다(Butterfield et al., 2002; Bhatt et al., 2021). 이처럼 ROS 과생성으로 인해 손상 받은 신경세포는 결국 세포 사멸을 일으켜 인지능력 및 기억력 저하를 유도하여 뇌의 정상적인 기능을 방해한다(Butterfield et al., 2002). 따라서 많은 연구에서 산화적 손상을 억제하는 기능을 갖는 항산화제를 이용하여 알츠하이머성 치매를 개선하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다(Simunkova et al., 2019). 특히 자연계에 널리 분포하는 폴리페놀 성분에 포함되는 flavonoids는 ROS 생성 억제능이 우수하여 천연물 유래의 대표적인 항산화제로 널리 알려져 있다(Panche et al., 2016). 본 연구에서 우산고로쇠 EtOAc 분획물로부터 분리한 flavonoids의 A $\beta_{25-35}$ 로 유도된 산화적 손상에 대한 보호 효과를 확인하기 위해 ROS 생성량을 측정하였다. 시간이 증가할수록 normal군에 비해 A $\beta_{25-35}$ 를 처리한 control군의 ROS 생성량이 증가하여 A $\beta_{25-35}$  처리를 통해 산화적 손상이 유도되었음을 알 수 있었다(Fig. 4). 반면 quercitrin, isoquercitrin, afzelin을 1, 2.5, 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도로 각각 처리했을 때 모든 군에서 control군에 비해 유의적으로 ROS 생성량이 감소되어 산화적 손상에 대한 보호 효과를 확인하였다. 특히 isoquercitrin 처리 군에서는 control군에 비해 농도의존적으로 ROS 생성량이 감소하였으며, 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서 90.53%의 수치를 나타내어 다른 flavonoids 처리군에 비해 가장 우수한 ROS 소거능을 나타냄을 알 수 있었다.



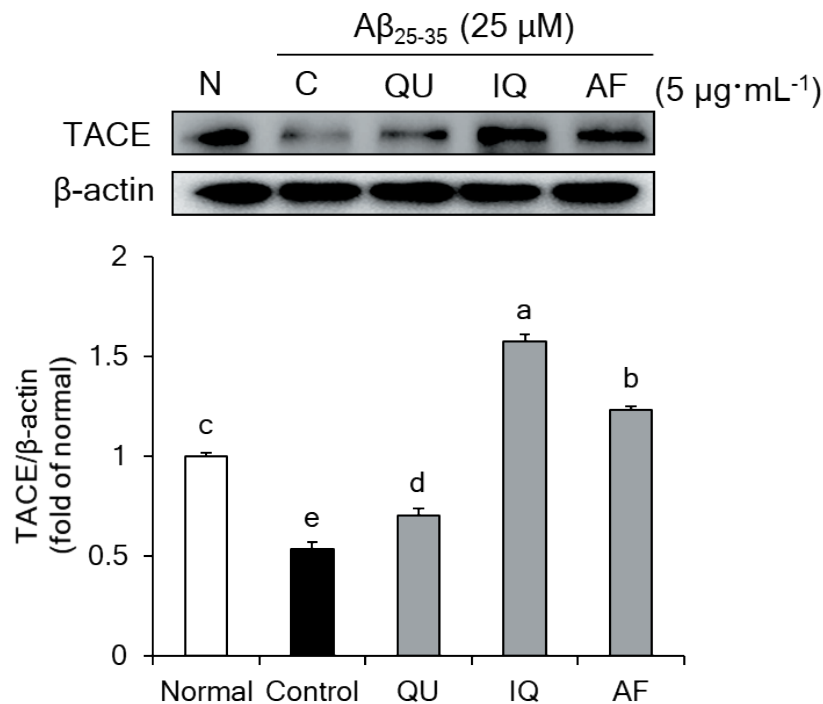
**Fig. 4.** Effect of three flavonoids from *Acer okamotoanum* on reactive oxygen species (ROS) production in A $\beta_{25-35}$ -treated SH-SY5Y cells. Time course of change in intensity of ROS fluorescence (A) and production of ROS (B). Values are mean  $\pm$  SD. a - f. Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. QU, quercitrin; IQ, isoquercitrin; AF, afzelin.

APP로부터  $\alpha$ -secretase가 작용할 경우 non-amyloidogenic pathway가 활성화되고, 이는 amyloidogenic pathway로의 진입이 줄어들어 결국 A $\beta$  생성을 억제시킨다(Kojro and Fahrenholz, 2005; Hooper and Turner, 2002).  $\alpha$ -Secretase의 명확한 단백질 분해효소가 밝혀지지 않았지만, ADAM10과 TACE는  $\alpha$ -secretase의 주요 단백질 분해효소로 보고되고 있다(Lammich et al., 1999; Buxbaum et al., 1998). 특히 신경세포에서 ADAM10 발현을 증가시켰을 때  $\alpha$ -secretase 효소 활성이 증가하는 것이 보고됨에 따라 ADAM10의 발현은  $\alpha$ -secretase 활성 조절을 확인하는 중요한 지표로 알려져 있다(Lammich et al., 1999; Allinson et al., 2003). 본 연구에서 우산고로쇠 EtOAc 분획물로부터 분리한 3가지 flavonoids 성분이 non-amyloidogenic pathway에 미치는 영향을 확인하기 위해 ADAM10 단백질 발현을 측정하였다. 아무것도 처리하지 않은 normal군에 비해 A $\beta_{25-35}$ 를 처리한 control군은 ADAM10 단백질 발현이 유의적으로 감소하였다(Fig. 5). 반면 quercitrin, isoquercitrin, afzelin을 각각 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도로 처리하였을 때, isoquercitrin을 처리한 군에서 control군에 비해 유의적으로 ADAM10 단백질 발현이 증가함을 알 수 있었다. 따라서 우산고로쇠의 3가지 flavonoids 성분 중에서 isoquercitrin이 ADAM10 단백질 발현을 증가시켜 A $\beta_{25-35}$  유도 신경독성에 대한 신경세포 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다.



**Fig. 5.** Effect of three flavonoids from *Acer okamotoanum* on expression of a disintegrin and metalloprotease domain 10 (ADAM10) in  $A\beta_{25-35}$ -treated SH-SY5Y cells. Values are mean  $\pm$  SD. a - d: Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.  $\beta$ -actin was used as a loading control. QU, quercitrin; IQ, isoquercitrin; AF, afzelin.

TACE는 ADAM10과 같이  $\alpha$ -secretase를 구성하는 요소로 보고되었다(Pietri et al., 2013). TACE가 결핍된 동물 모델에서  $\alpha$ -secretase 활성화로 인해 생성되는 APP $\alpha$  단백질 발현이 증가되지 않는 것으로 보고됨에 따라, TACE는  $\alpha$ -secretase 활성을 확인할 수 있는 지표로서 이용되고 있다(Buxbaum et al., 1998). Flavonoids 성분을 포함하는 polyphenol 화합물은 TACE 및 ADAM10을 조절하여 non-amyloidogenic pathway를 활성화시킴에 따라 알츠하이머성 치매 예방 및 개선용 소재로서 각광을 받고 있다(Obregon et al., 2006; Chen et al., 2020). 본 연구에서 우산고로쇠 3가지 flavonoids의 non-amyloidogenic pathway 조절 효능을 확인하기 위해 각 군별 TACE 단백질 발현을 측정된 결과, normal군에 비해  $A\beta_{25-35}$ 를 처리한 control군에서 유의적으로 TACE 발현이 감소되어 non-amyloidogenic pathway가 비활성화되었음을 알 수 있었다(Fig. 6). 반면 우산고로쇠 3가지 flavonoids를  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도로 처리하였을 때, 3가지 활성물질 처리군 모두  $A\beta_{25-35}$ 를 처리한 control군에 비해 유의적으로 TACE 단백질 발현이 증가하였다. 따라서 우산고로쇠 3가지 flavonoids 성분은 TACE 단백질 발현 증가를 통해 non-amyloidogenesis 활성화를 유도함을 알 수 있었다. 특히 3가지 활성성분 중에서 isoquercitrin의 TACE 단백질 발현이 가장 우수함을 알 수 있었다.



**Fig. 6.** Effect of three flavonoids from *Acer okamotoanum* on expression of tumor necrosis factor a cleaving enzyme (TACE) in  $A\beta_{25-35}$ -treated SH-SY5Y cells. Values are mean  $\pm$  SD. a - e: Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.  $\beta$ -actin was used as a loading control. QU, quercitrin; IQ, isoquercitrin; AF, afzelin.

## Conclusion

본 연구에서는 우산고로쇠 활성분획물인 EtOAc 분획물로부터 분리한 quercitrin, isoquercitrin, afzelin과 같은 3가지 flavonoids의  $A\beta$  유도 신경독성에 대한 신경세포 보호 효과와 작용메커니즘에 대해 연구하였다. 우산고로쇠 3가지 flavonoids 성분 중에서 isoquercitrin은 다른 성분에 비해 세포생존율 증가와 nuclear fragmentation 감소를 통해 세포사멸을 억제함을 알 수 있었다. 또한 3가지 활성물질은  $A\beta$ 로 증가된 ROS 생성량을 유의적으로 억제시켰으며 특히 isoquercitrin은 농도유의적으로 ROS 생성을 억제시켜 신경세포에 대한 보호 효과를 나타내었다. 신경세포 보호 작용메커니즘을 확인하기 위해 non-amyloidogenesis에 관여하는 ADAM10 및 TACE 단백질 발현을 분석한 결과, 3가지 활성물질 중에서 isoquercitrin 처리 군에서 유의적으로 ADAM10 단백질 발현을 증가시킨 반면 3가지 활성물질 처리 군에서 모두 control군에 비해 유의적으로 TACE 단백질 발현을 증가시켰다. 본 연구를 통해 우산고로쇠 3가지 flavonoids 성분이 non-amyloidogenesis를 활성화시켜 신경세포에 대한 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었으며 특히 isoquercitrin이  $A\beta$ 로 유도된 신경독성에 대한 신경세포 보호 효과가 우수한 것으로 사료된다.

## Conflict of Interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.



## Acknowledgements

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

## Authors Information

Ji Hyun Kim, <https://orcid.org/0000-0001-6617-2129>

Sanghyun Lee, <https://orcid.org/0000-0002-0395-207X>

Eun Ju Cho, <https://orcid.org/0000-0003-4282-3219>

## References

- Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM. 2003. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *Journal of Neuroscience Research* 74:342-352.
- Bhatt S, Puli L, Patil CR. 2021. Role of reactive oxygen species in the progression of Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today* 26:794-803.
- Brewer GJ, Lim A, Capps NG, Torricelli JR. 2005. Age-related calcium changes, oxyradical damage, caspase activation and nuclear condensation in hippocampal neurons in response to glutamate and beta-amyloid. *Experimental Gerontology* 40:426-437.
- Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J. 2002. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiology of Aging* 23:655-664.
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA. 1998. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *Journal of Biological Chemistry* 273:27765-27767.
- Cai Z, Hussain MD, Yan LJ. 2014. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *International Journal of Neuroscience* 124:307-321.
- Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. 2018. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology* 14:450-464.
- Chen J, Luo B, Zhong BR, Li KY, Wen QX, Song L, Xiang XJ, Zhou GF, Hu LT, Deng XJ, et al. 2020. Sulfuretin exerts diversified functions in the processing of amyloid precursor protein. *Genes & Diseases* 8:867-881.
- Choi SY, Kim JH, Lee J, Lee S, Cho EJ. 2017a. Protective effect of *Acer okamotoanum* from oxidative stress in C6 glial cells. *Journal of Applied Biological Chemistry* 60:141-147.
- Choi SY, Lee J, Lee DG, Lee S, Cho EJ. 2017b. *Acer okamotoanum* improves cognition and memory function in A $\beta$ <sub>25-35</sub>-induced Alzheimer's mice model. *Applied Biological Chemistry* 60:1-9.
- Gouras GK, Olsson TT, Hansson O. 2015.  $\beta$ -Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 12:3-11.
- Hooper NM, Turner AJ. 2002. The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry* 9:1107-1119.
- Jin W, Thuong PT, Su ND, Min BS, Son KH, Chang HW, Kim HP, Kang SS, Sok DE, Bae K. 2007. Antioxidant activity of cleomiscosins A and C isolated from *Acer okamotoanum*. *Archives of Pharmacal Research* 30:275-281.
- Kim EJ, Kang MJ, Seo YB, Nam SW, Kim GD. 2018. *Acer okamotoanum* Nakai leaf extract inhibits adipogenesis via suppressing expression of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  in 3T3-L1 cells. *Journal of Microbiolog and Biotechnology* 28:1645-1653.

- Kim HJ, Woo ER, Shin CG, Park H. 1998. A new flavonol glycoside gallate ester from *Acer okamotoanum* and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase. *Journal of Natural Products* 61:145-148.
- Kim JH, Quilantang NG, Kim HY, Lee S, Cho EJ. 2019. Attenuation of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells by three flavonoids from *Acer okamotoanum*. *Chemical Papers* 73:1135-1144.
- Kojro E, Fahrenholz F. 2005. The non-amyloidogenic pathway: Structure and function of alpha-secretases. *Subcellular Biochemistry* 38:105-127.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:3922-3927.
- Lee J, Lee DG, Rodriguez JP, Park JY, Cho EJ, Jacinto SD, Lee S. 2018. Determination of flavonoids in *Acer okamotoanum* and their aldose reductase inhibitory activities. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 59:131-137.
- Li YP, Bushnell AF, Lee CM, Perlmutter LS, Wong SK. 1996. Beta-amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. *Brain Research* 738:196-204.
- McPhie DL, Golde T, Eckman CB, Yager D, Brant JB, Neve RL. 2001. Beta-secretase cleavage of the amyloid precursor protein mediates neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer's disease mutations. *Brain Research Molecular Brain Research* 97:103-113.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63.
- Obregon DF, Rezai-Zadeh K, Bai Y, Sun N, Hou H, Ehrhart J, Zeng J, Mori T, Arendash GW, Shytle D, et al. 2006. ADAM10 activation is required for green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* 281:16419-16427.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. 2016. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science* 5:e47.
- Pietri M, Dakowski C, Hannaoui S, Alleaume-Butaux A, Hernandez-Rapp J, Ragagnin A, Mouillet-Richard S, Haik S, Bailly Y, Peyrin JM, et al. 2013. PDK1 decreases TACE-mediated  $\alpha$ -secretase activity and promotes disease progression in prion and Alzheimer's diseases. *Nature Medicine* 19:1124-1131.
- Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. 1995. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: Contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry* 64:253-265.
- Qadir SA, Kim CH, Kwon MC, Lee HJ, Kang HY, Choi DH, Lee HY. 2007. Comparison of anticancer and immunomodulatory activities in the different parts of the *Acer mono* Max. and *Acer okamotoanum*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 15:405-410. [in Korean]
- Sarkar B, Dhiman M, Mittal S, Mantha AK. 2017. Curcumin revitalizes amyloid beta (25-35)-induced and organophosphate pesticides pestered neurotoxicity in SH-SY5Y and IMR-32 cells via activation of APE1 and Nrf2. *Metabolic Brain Disease* 32:2045-2061.
- Sengoku R. 2020. Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology* 40:22-29.
- Simunkova M, Alwasel SH, Alhazza IM, Jomova K, Kollar V, Rusko M, Valko M. 2019. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. *Archives of Toxicology* 93:2491-2513.
- Takayama K, Sun BY, Stuessy TF. 2012. Genetic consequences of anagenetic speciation in *Acer okamotoanum* (Sapindaceae) on Ullung Island, Korea. *Annals of Botany* 109:321-330.
- Tang BL. 2005. Alzheimer's disease: Channeling APP to non-amyloidogenic processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331:375-378.
- Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. 2019. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine* 14:5541-5554.
- Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA. 2001. Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta (1-42) and A beta(25-35). *Journal of the American Chemical Society* 123:5625-5631.

- Wang RG, Zhu XZ. 2003. Subtoxic concentration of manganese synergistically potentiates 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Brain Research* 961:131-138.
- Wang YQ, Qu DH, Wang K. 2016. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease through stimulating of non-amyloidogenic processing of amyloid precursor protein. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 20:2389-2403.
- Yang H, Hwang I, Koo TH, Ahn HJ, Kim S, Park MJ, Choi WS, Kang HY, Choi IG, Choi KC, et al. 2012. Beneficial effects of *Acer okamotoanum* sap on L-NAME-induced hypertension-like symptoms in a rat model. *Molecular Medicine Reports* 5:427-431.
- Yang JS, Jeon S, Yoon KD, Yoon SH. 2018. Cyanidin-3-glucoside inhibits amyloid  $\beta$ 25-35-induced neuronal cell death in cultured rat hippocampal neurons. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* 22:689-696.