Korean Society for
Clinical Laboratory ScienceKorean Journal of
CLINICAL LABORATORY SCIENCE

ORIGINAL ARTICLE

Antioxidative Effect of *Phrymaleptostachyavar. Asiatica* HARA Extract on the Neurotoxicity of Aluminum Sulfate, Environmental PollutantSun-Mi Yoo¹, Jun-Hee Lee²¹Department of Public Health, Graduate School of Wonkwang University, Iksan, Korea²Department of Emergency Medicine, Sanbon Hospital, Wonkwang University College of Medicine, Sanbon, Korea환경오염물질인 황산알루미늄의 신경독성에 대한
파리풀 추출물의 항산화 효과유선미¹, 이준희²¹원광대학교 대학원 보건학과, ²원광대학교 의과대학 산본병원 응급의학과

ARTICLE INFO

Received May 2, 2019
Revised May 17, 2019
Accepted May 22, 2019

Key words

Environmental pollutant
Neurotoxicity
Oxidative stress

ABSTRACT

This study examined the neurotoxicity of aluminum sulfate (AS), an environmental pollutant, and the protective effect of *Phrymaleptostachya var. asiatica* HARA (PLVAH) extract on the neurotoxicity induced by AS in the cultured C6 glioma cells. For this study, the cell viability and antioxidative effects, such as electron donating (ED) activity, lipid peroxidation (LP) activity, and superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity, were analyzed. AS decreased the cell viability significantly in a dose-dependent manner and the XTT₅₀ value was measured at 120.0 μ M of AS. The neurotoxicity of AS was determined to be mid-toxic by Borenfreund and Puerner's toxic criteria. In addition, the catalase (CAT), antioxidant enzyme remarkably increased the cell viability injured by AS-induced neurotoxicity in these cultures. Regarding the protective effect of the PLVAH extract on AS-induced neurotoxicity, PLVAH extract significantly increased the ED ability, and the inhibitory ability of the LP and SAR scavenging ability. These findings suggest that oxidative stress is involved in the cytotoxicity of AS, and the PLVAH extract effectively protected against AS-induced neurotoxicity by its antioxidative effects. Natural resources, such as the PLVAH extract may be a putative therapeutic agent for the treatment of the toxicity induced by heavy metallic compounds, such as AS correlated with the oxidative stress.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

카드뮴을 비롯한 수은, 알루미늄과 같은 중금속류는 공기오염은 물론 발암원으로도 잘 알려져 있다[1]. 이 중 알루미늄(Al)은 공기나 수증 또는 토양에 널리 분포되어 있는 중금속의 일종

으로 타 중금속과 마찬가지로 이의 흠(fume)이나 분진 및 먼지 입자들이 호흡기나 입을 통하여 인체내에 다량 축적될 경우 중독을 유발한다[2]. Al은 카드뮴이나 크롬 등 타 중금속에 비하여 독성이 약하고 체외 배출도 잘 된다는 이점도 있지만 일상생활에서 수시로 접하는 기회가 많아 장기간 동안 지속적으로 축적되면 치매를 비롯한 각종 뇌질환을 유발함으로써 이의 예방과 치료가 절실하다[3]. Al중독에 노출되기 쉬운 이유의 하나로, Al은 우리가 음용하는 음료수 캔을 비롯하여 식품조리기구, 과자나 음식의 포장지 및 양은냄비와 같은 식기나 포장제조에 널리

* Corresponding author: Jun-Hee Lee
Department of Emergency Medicine, Sanbon Hospital, 327 Sanbon-ro, Gunpo 15865, Korea
E-mail: inhaed@hanmail.net
* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9427-7195>

사용되고 있을 뿐만 아니라, 그 밖에도 항공산업이나 금속매염제 제조와 같은 공정에도 사용되고 있다[4]. 이같이 Al의 사용범위는 넓지만 이에 의한 중독시 이를 효과적으로 치료할 수 있는 뚜렷한 치료적 방법이 매우 미흡한 상태에 있다. Al에 의한 중독시에는 복통을 비롯하여 위장장애나 빈혈, 두통과 같은 증상이 나타나며 더욱 진행되면 간과 신장의 기능저하를 비롯하여 건망증이나 언어장애와 같은 증상을 초래한다고 한다[5]. 특히, Al은 다른 금속에 비하여 쉽게 혈액-뇌관문(blood-brain barrier)을 통과함으로써 뇌세포에 손상을 일으켜 그 결과 치매(dementia)를 유발하는 요인으로도 잘 알려져 있다[6]. 특히, Al염화합물 중 황산알루미늄(aluminum sulfate, AS)은 일부 위 용도 이외에도 산업폐수를 비롯한 주택이나 위생용 폐수처리의 응집제로 사용하고 있을 뿐만 아니라 제지 생산이나 태닝 및 내화제는 물론, 더욱이 빵이나 과자 제조시 팽창제로 사용하고 있어 우리의 일상생활과 식생활과도 매우 밀접하게 관련되어 있다. 그러나 앞에서 언급한 바와 같이 장기간에 걸쳐 AS가 먼지나 분진 등을 통해 인체에 흡수될 경우 뇌조직 손상에 의한 신경독성을 유발하여 심각한 후유증을 초래하기 때문에 이의 독성에 많은 관심이 집중되고 있다[7]. 그러나, 현재 이의 독성을 완화하거나 제거할 수 있는 치료약제에는 한계가 있으며, 또한 신약제의 개발 역시 미비한 수준에 있기 때문에, AS에 대한 독성기전은 물론, 독성을 치료할 수 있는 방법이나 대체약물 개발이 최우선적인 과제로 부각되었다[3]. 최근, 카드뮴을 비롯한 수은이나 납과 같은 몇몇 중금속화합물들은 이들의 분해시 자유라디칼을 생성한다고 제시되면서 이들의 독성과 산화적 손상간의 상호관련성을 밝히기 위한 연구가 이루어지고 있다[8]. 실제로, 한 연구에서 카드뮴염화물의 독성을 황산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT)가 방어하였다는 것이 보고되어 있다[9]. 최근, 각종 식물을 비롯한 약초나 한약재 또는 허브와 같은 여러 식물에 함유되어 있는 성분 중에는 황산화를 비롯한 항암이나 항염 및 항독 등에 유용한 생리활성물질들이 다량 함유되어 있다고 밝혀지면서 이들을 이용하여 질환을 치료할 수 있는 연구를 시도하고 있다[10]. 이들 성분 중에는 페놀화합물(phenolic compound)을 비롯한 이소프레노이드(isoprenoid)나 지방산과 단백질 배당체와 같은 다양한 물질들이 있으며, 특히, isoprenoid나 phenolic compound에 속하는 폴리페놀류(polyphenols)나 플라보노이드류(flavonoids)와 같은 성분은 황산화나 항염에 뛰어난 효능이 있다고 알려져 있다[11]. 식물 중 파리풀(*Phrymyleptostachya var. asiatica* HARA, PLVAH)은 파리풀과(Phrymaceae)에 속하는 여러해살이풀로 우리나라 전국의 산의 나무 그늘에 서식하고 있다. 꽃은 7~9월경에 연

보라 빛의 색깔로, 뿌리를 비롯해 전초를 약제로 사용하는데, 여름이나 가을에 채취하여 햇볕에 말려 사용한다[12]. PLVAH에는 황산화 작용이 뛰어난 플라보노이드 배당체인 캄페롤(kaempferol)과 퀘세틴(quercetin), 캄페롤-3-아라비노시드(kaempferol-3-arabinoside), 퀘세틴-3-글루코시드(quercetin-3-glucoside)를 비롯하여, 시아니딘-3-글루코시드(cyanidin-3-glucoside), 인돌-3-아세토니트릴(indole-3-acetonitrile)과 같은 성분들이 들어 있어 오래전부터 해독을 비롯한 살충제, 종기의 독제거, 부스럼치료 등과 같은 질환에 사용되어 왔다[13]. 특히, kaempferol, quercetin, kaempferol-3-arabinoside, quercetin-3-glucoside의 성분들은 페놀화합물 계통의 플라보노이드류로 황산화 작용이 뛰어난 것으로 잘 알려져 있다[14]. 근래, 각종 세포를 배양한 후 병변 모델의 제작, 화학제의 안전성 검사, 약물의 효능검정에 대한 조사 등을 정량적으로 분석할 수 있음으로서 시험관내 유용한 분석도구로 활용되고 있다. 시험관내 분석은 검정약물이 오직 배양 세포에 직접적으로 작용하기 때문에 약물의 독성이나 효능을 단시간 내에 빠르고 정확하게 분석할 수 있다는 장점이 있다[15]. 본 연구에서는 Al화합물인 황산알루미늄(AS)의 신경독성을 배양 C6 신경교종(glioma) 세포를 재료로 산화적 손상 측면에서 조사하였으며, 또한 AS 신경독성에 대한 PLVAH 추출물에 대한 영향을 황산화 측면에서 조사함으로써 AS 독성을 완화 내지는 개선할 수 있는 천연 소재로서의 가치를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포주

본 실험에 사용한 C6 신경교종(glioma) 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, CCL 107)에서 분양 받아 사용하였다. C6 glioma 세포종은 유일하게 생쥐나 흰쥐와 같은 척추동물의 정상뇌세포에서 발현되는 S-100 단백질을 생성함으로써 정상세포와 같은 특징을 가지고 있다[16].

2. 약제 제조

본 실험에 사용한 시약으로 aluminum sulfate (AS)를 비롯한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), xanthine, ethyl alcohol, linoleic acid, ammonium thiocyanate, ferrous chloride, dimethylsulfoxide (DMSO), catalase (CAT), hydrogen peroxide (H₂O₂), phosphate buffered saline (PBS) 및 XTT는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. AS의 제조는 Jung 등[2]과 Kim 등[4]의 연구를 근거로,

XTT₅₀값을 구하기 위하여 fetal bovine serum (FBS, Gibco-Thermo Fisher Scientific Inc, USA)이 없는 minimum essential medium (MEM, Gibco-Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA)을 사용하여 각각 100~160 μ M의 저장액을 만들어 사용하였다. 세포생존율의 분석을 위하여 XTT (2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, disodium salt를 PBS로 50 μ g/ml의 저장액을 만들어 사용하였다.

3. PLVAH 채취 및 추출

전복 야산에서 파리풀(PLVAH)의 전초를 채취한 후 대학부설 생명자원과학연구소에서 동정 확인 후 사용하였다. 채취한 전초는 세척 후 통풍이 잘 되는 그늘에서 충분히 말린 후 냉암소에 보관하여 시료로 사용하였다. 추출 시 추출물속에 함유된 일부 알칼로이드 성분의 유출방지를 위하여 용매추출보다는 열수추출을 시행하였다[12, 17]. 즉, 보관중인 시료 72.6 g을 잘게 파쇄한 다음 시료와 이의 3배 정도의 증류수를 1,000 mL의 환저 플라스크에 함께 넣고 4시간 동안 가열하였다. 위의 과정을 3회 반복 추출하여 여과한 다음 3,000 rpm에서 30분 동안 원심시켰다. 원침 후 진공농축기에서 감압 농축시킨 다음 3.1 g의 시료를 얻었으며, 이 때 수율은 4.3%로 나타났다.

4. 세포 배양

C6 신경교종(glioma) 세포의 배양은 Kim 등[18]의 방법에 따라 행하였다. 즉, 실험을 위하여 세포주를 4~5회에 걸쳐 세대 배양한 세포를 trypsin을 이용하여 배양 용기로부터 떼어 낸 후 원침 과정을 거쳤다. 모아진 세포들을 10% FBS가 함유된 MEM 배양액에서 균질화 시킨 다음 well당 세포밀도가 1×10^5 cells/well이 되도록 조절한 후 96-well 배양용기에 넣은 후 36°C, 5% CO₂로 조절된 정온기로 72시간 동안 배양하였다.

5. 세포생존율 분석

Mosmann [19]의 방법에 따라서, 약제나 또는 시료추출물을 농도별로 처리한 배양 세포에 실험 당일 제조한 XTT (50 μ g/mL)을 well당 10 μ L씩 넣고 36°C로 조절된 정온기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 DMSO를 넣고 일정 시간 정지한 다음 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 450 nm에서 측정된 흡광도를 대조군과 비교 조사하였다. XTT₅₀값의 산출은 회귀직선식에 의하여 구하였다.

6. AS 처리

배양 세포에 AS 추출물이 100~160 μ M 농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 48시간 동안 처리 후 세포생존율분석에 의하여 XTT₅₀ 농도를 측정하였다.

7. CAT의 항산화능 측정

항산화 작용이 강한 CAT효소[20]에 대한 항산화능을 조사하기 위하여 Lee 등[21]의 연구를 근거로 활성산소의 일종인 30 μ M H₂O₂를 배양 세포를 처리하기 2시간 전에 CAT가 30 μ M과 40 μ M로 각각 포함된 배양액에서 세포를 처리한 다음 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 또한, 각 항산화능의 분석에 있어서 이를 양성대조군으로 사용하였다.

8. AS 독성에 대한 CAT의 영향

XTT₅₀ 농도의 AS를 배양세포에 처리하기 2시간 전에 CAT가 30 μ M과 40 μ M로 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

9. PLVAH 추출물의 세포독성

PLVAH 추출물에 대한 독성을 조사하기 위하여 추출물이 각각 5~25 μ g/mL로 포함된 배양액에서 48시간 배양 후 대조군과 세포생존율을 비교 조사하였다.

10. PLVAH 추출물의 함량 분석

폴리페놀분석은 AOAC [22]의 방법에 의하여, 추출시료 0.2 mL에 phenol reagent 0.2 mM를 첨가하여 3분 동안 정치 후 0.4 mL sodium carbonate를 가하여 1시간 동안 반응시켜 ELISA로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tannic acid를 표준시약으로 하여 검량곡선을 작성하였다. 플라보노이드 분석은 Nieva Moreno 등[23]의 방법에 따라 시료용액 0.1 mL에 10% aluminum nitrate와 1 M potassium acetate 혼합물 0.2 mL에 에탄올 4.7 mL를 가하여 25°C에서 40분 동안 반응 후 ELISA로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 quercetin을 이용하여 검량곡선을 작성하였다.

11. PLVAH 추출물 처리

AS에 대한 PLVAH 추출물의 영향을 조사하기 위하여 배양 세포에 AS XTT₅₀ 농도를 처리하기 2시간 전에 15 μ g/mL와 20 μ g/mL의 추출물이 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 이의 영향을 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

12. 전자공여(electron donating, ED) 활성 측정

ED 활성의 측정은 Blois [24]의 방법에 의해, 메탄올 시료에 0.3 mM DPPH 메탄올 용액 100 mL를 가하여 30분 동안 정치하였다. 정치 완료 후 ELISA로 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, ED 활성은 대조군에 대한 백분율로 하였으며 CAT를 양성 대조군으로 하여 비교 조사하였다. 또한, ED능(%)=100-[(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도)×100]으로 나타냈다.

13. 지질과산화(lipid peroxidation, LP) 활성 측정

LP활성 측정은 Kikuzaki와 Nakatani [25]의 방법에 따라, 시료 3.9 mL를 에탄올과 혼합하고 에탄올에 녹인 2.52% linoleic acid와 0.05 M PBS (pH 7.0)용액 12.1 mL를 첨가하여 40°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 에탄올과 30% ammonium thiocyanate로 처리한 다음 0.02 M ferrous chloride 0.1 mL를 가하여 실온에서 3분 동안 정치하였다. 정치 완료 후 ELISA로 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 증류수를 대조군으로 사용하였으며, CAT를 양성대조군으로 하여 비교 조사하였다. LP활성은 대조군에 대한 백분율로 하였다. 또한, 지질과산화저해능(%)=100-[(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도)×100]으로 나타냈다.

14. 과산소음이온라디칼(Superoxide anion-radical, SAR) 소거활성 측정

SAR 소거능 측정은 nitroblue tetrazolium (NBT)의 환원방법에 따라, 시료용액 0.1 mL와 0.4 mL potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 0.4 mM xanthine과 NBT를 가하여 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시켜 생성된 SAR 양을 ELISA로 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거활성의 측정은 시료첨가군과 무첨가군의 차이에 의한 백분율로 표시하였으며, CAT의 활성을 양성대조군

으로 사용하였다. 또한, SAR 소거능(%)=100-[(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도)×100]으로 나타냈다.

15. 통계 처리

실험결과는 SPSS/WIN 18.0을 이용하여 Mean±SD로 표시하였다. 실험결과에 대해 one way ANOVA를 시행하였고 사후분석은 Tukey HSD에 의하였으며, 유의수준은 $P<0.05$ 에서 채택하였다.

결 과

1. AS의 신경독성 측정

AS의 독성조사를 위하여 배양 C6 신경교종 세포에 AS가 100~160 μ M 농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 48시간 동안 처리한 결과, AS는 처리 농도 의존적으로 세포생존율을 감소시킴으로서 독성을 나타냈다($P<0.001$). 이 과정에서 XTT₅₀ 값은 120.0 μ M의 처리에서 나타났다(Table 1). 사후검정 결과 160 μ M AS, 130 μ M AS, 100 μ M AS, 대조군 순으로 독성이 높은 것으로 나타났다.

2. CAT의 항산화능 측정

CAT의 항산화능 측정을 위하여 30 μ M 농도의 H₂O₂를 배양 세포에 처리하기 전에 CAT가 각각 30 μ M과 40 μ M로 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 전 처리하였다. 그 결과, H₂O₂만을 처리한 경우 대조군에 비하여 세포생존율이 51.0% (0.25±0.02)로 나타난 반면, 30 μ M과 40 μ M로 CAT 처리한 세포생존율은 각각 78.4% (0.40±0.02)와 88.2% (0.45±0.02)로 나타났다($P<0.001$) (Table 2). 사후검정 결과 대조군, 40 μ M CAT, 30 μ M CAT, 30 μ M H₂O₂순으로 세포생존율이 높은 것으로 나타났다.

Table 1. The cytotoxicity of aluminum sulfate (AS) on cultured C6 glioma cells

Concentrations of AS (μ M)	XTT assay (450 nm) Mean±SD	F	P	Tukey HSD
Control ^a	0.36±0.02	301.07	<0.001	a>b>c>d
100 AS ^b	0.22±0.02			
130 AS ^c	0.16±0.01			
160 AS ^d	0.13±0.02			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviation: AS, aluminum sulfate.

Table 2. The antioxidative ability of catalase (CAT) on the hydrogen peroxide (H₂O₂) in cultured C6 glioma cells

Concentrations of CAT (μ M)	XTT assay (450 nm) Mean±SD	F	P	Tukey HSD
Control ^a	0.51±0.04	163.23	<0.001	a>d>c>b
30 H ₂ O ₂ ^b	0.25±0.02			
30 CAT ^c	0.40±0.02			
40 CAT ^d	0.45±0.02			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: CAT, catalase; H₂O₂, hydrogen peroxide.

3. AS 신경독성에 대한 CAT의 영향

AS의 독성에 대한 항산화제인 CAT의 영향을 알아보기 위하여 AS (XTT₅₀)를 배양 세포에 처리하기 전에 CAT가 각각 30 μ M과 40 μ M이 포함된 배양액에서 2시간 동안 전 처리하였다. 그 결과, XTT₅₀ 농도의 AS만 처리한 세포생존율이 대조군에 비하여 45.0% (0.18 ± 0.01)로 나타난 것에 비하여 30 μ M과 40 μ M의 CAT를 처리한 세포생존율은 각각 80.0% (0.32 ± 0.02)와 90.0% (0.36 ± 0.03)로 나타났다($P < 0.001$) (Table 3). AS에 대한 CAT의 항산화능력의 사후검정 결과 대조군, 40 μ M CAT, 30 μ M CAT, AS (XTT₅₀) 순으로 세포생존율이 높은 것으로 나타났다.

4. PLVAH 추출물의 세포독성

PLVAH 추출물에 대한 독성을 위하여 추출물이 각각 5~25 μ g/mL로 포함된 배양액에서 배양한 결과 5 μ g/mL와 10 μ g/mL 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% (0.44 ± 0.01)에 비하여 97.7% (0.43 ± 0.02)와 95.5% (0.42 ± 0.02)로 각각 나타났다. 또한, 15 μ g/mL, 20 μ g/mL, 25 μ g/mL에서는 세포생존율이 각각 93.2% (0.41 ± 0.03), 90.9% (0.40 ± 0.02),

Table 3. The effect of catalase (CAT) on the cytotoxicity induced by aluminum sulfate (AS) in cultured C6 glioma cells

Concentrations of CAT (μ M)	XTT assay (450 nm) Mean $\pm$ SD	F	P	Tukey HSD
Control ^a	0.40 ± 0.03	99.18	<0.001	a>d>c>b
AS (XTT ₅₀) ^b	0.18 ± 0.01			
30 CAT ^c	0.32 ± 0.02			
40 CAT ^d	0.36 ± 0.03			

The data indicate the mean $\pm$ SD for triplicate experiments. Abbreviations: CAT, catalase; AS, aluminum sulfate.

Table 4. The cytotoxicity of *Phrymyleptostachya* var. *asiatica* HARA (PLVAH) extract on cultured C6 glioma cells by XTT assay

Concentrations of PLVAH (μ g/mL)	XTT assay (450 nm) Mean $\pm$ SD	F	P	Tukey HSD
Control ^a	0.44 ± 0.01	6.25	<0.001	a>b>c>d>e>f
5 PLVAH ^b	0.43 ± 0.02			
10 PLVAH ^c	0.42 ± 0.02			
15 PLVAH ^d	0.41 ± 0.03			
20 PLVAH ^e	0.40 ± 0.02			
25 PLVAH ^f	0.39 ± 0.01			

The data indicate the mean $\pm$ SD for triplicate experiments. Abbreviation: PLVAH, *Phrymyleptostachya* var. *asiatica* HARA.

88.6% (0.39 ± 0.01)로 나타났다($P < 0.001$) (Table 4, Figure 1). 따라서, 최대허용한계농도는 25 μ g/mL로 판단하여 본 실험에서는 25 μ g/mL 이하의 농도를 사용하였으며, 또한, 추출물의 최대효과를 얻기 위하여 독성이 없는 두농도를 선정하여 분석하였다. PLVAH에 대한 세포독성의 사후검정 결과 25 μ g/mL, 10 μ g/mL와 5 μ g/mL PLVAH와 대조군 순으로 독성이 높은 것으로 나타났으며, 20 μ g/mL와 15 μ g/mL PLVAH간의 독성은 차이가 없었다. 20 μ g/mL PLVAH는 25 μ g/mL PLVAH와 통계적인 차이가 없었으며, 15 μ g/mL PLVAH는 10 μ g/mL AS와 통계적인 차이가 없었다.

5. PLVAH 추출물의 함량 분석

PLVAH 추출물의 함량조사에 있어서 폴리페놀의 함량은

Figure 1. The cytotoxicity of *Phrymyleptostachya* var. *asiatica* HARA (PLVAH) extract. Values are mean $\pm$ SD. The data indicate the Mean $\pm$ SD for triplicate experiments.

Figure 2. The component of *Phrymyleptostachya* var. *asiatica* HARA (PLVAH) extract. Values are mean $\pm$ SD. The data indicate the Mean $\pm$ SD for triplicate experiments.

41.3 mg/g으로 나타났으며, 플라보노이드 함량은 21.2 mg/g으로 각각 나타났다(Figure 2).

6. AS의 신경독성에 대한 PLVAH 추출물의 영향

PLVAH 추출물이 AS의 세포독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양 세포에 AS (XTT₅₀)를 처리하기 전에 15 µg/mL와 20 µg/mL의 PLVAH 추출물을 각각 처리한 결과, AS로 처리한 세포생존율이 대조군에 비하여 38.3% (0.23±0.02)로 나타났는데 비하여 15 µg/mL 추출물 처리에서는 46.7% (0.28±0.02)로 나타났다. 또한 20 µg/mL 추출물 처리에서는 58.3% (0.35±0.02)로 나타나 AS만의 처리에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 보였다(*P*<0.001) (Table 5). AS와 PLVAH에 대한 사후검정 결과 대조군, 20 µg/mL PLVAH, 15 µg/mL PLVAH, AS (XTT₅₀) 순으로 세포생존율이 높은 것으로 나타났다.

7. 전자공여(ED) 활성 측정

ED 활성을 측정하기 위하여 15 µg/mL와 20 µg/mL 농도의 PLVAH 추출물 시료를 처리하여 분석한 결과 15 µg/mL 농도처

Table 5. The protective effect of *Phrymyleptostachya* var. *asiatica* HARA (PLVAH) extract on the cytotoxicity induced by aluminum sulfate (AS) in cultured C6 glioma cells

Concentrations of PLVAH (µg/mL)	XTT assay (450 nm) Mean±SD	F	P	Tukey HSD
Control ^a	0.60±0.06	182.89	<0.001	a>d>c>b
AS (XTT ₅₀) ^b	0.23±0.02			
15 PLVAH ^c	0.28±0.02			
20 PLVAH ^d	0.35±0.02			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: PLVAH, *Phrymyleptostachya* var. *asiatica* HARA; AS, aluminum sulfate.

Table 6. The electron donating (ED) activity of *Phrymyleptostachya* var. *asiatica* HARA (PLVAH) extract determined at a wavelength of 517 nm

Concentrations of PLVAH (µg/mL)	ED activity (517 nm) Mean±SD	F	P	Tukey HSD
Control ^a	0.53±0.02	788.70	<0.001	a>c>d>b
40 CAT ^b	0.09±0.01			
15 PLVAH ^c	0.46±0.02			
20 PLVAH ^d	0.40±0.02			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: ED, electron donating; PLVAH, *Phrymyleptostachya* var. *asiatica* HARA; CAT, catalase.

리에서는 활성이 대조군에 비하여 86.8%로 나타났으며, 20 µg/mL의 처리에서는 75.5%로 나타났다. 따라서, 15 µg/mL와 20 µg/mL 농도에서 ED능은 각각 13.2%와 24.5%로 나타나 이는 대조군에 비하여 모두 유의한 증가를 나타냈다(*P*<0.001) (Table 6, Figure 3). 또한, 사후검정 결과 40 µM CAT, 20 µg/mL PLVAH, 15 µg/mL PLVAH, 대조군 순으로 ED능이 높은 것으로 나타났다.

8. LP 저해 활성 측정

LP 저해 활성 측정을 위하여 15 µg/mL와 20 µg/mL 농도의 PLVAH 추출물 시료를 분석한 결과 15 µg/mL 농도처리에서는 활성이 대조군에 비하여 84.0%로 나타났으며, 20 µg/mL의 처리에서는 70.0%로 나타났다. 따라서, LP 저해능은 15 µg/mL와 20 µg/mL에서 각각 16.0%와 30.0%로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의한 저해능을 나타냈다(*P*<0.001) (Table 7, Figure 4). 또한, 사후검정 결과 40 µM CAT, 20 µg/mL PLVAH, 15

Figure 3. The electro donating ability of *Phrymyleptostachya* var. *asiatica* HARA (PLVAH) extract. Values are mean±SD. The data indicate the Mean±SD for triplicate experiments.

Table 7. The lipid peroxidation (LP) activity of *Phrymyleptostachya* var. *asiatica* HARA (PLVAH) extract determined at a wavelength of 500 nm

Concentrations of PLVAH (µg/mL)	LP activity (500 nm) Mean±SD	F	P	Tukey HSD
Control ^a	0.50±0.02	493.55	<0.001	a>c>d>b
40 CAT ^b	0.07±0.01			
15 PLVAH ^c	0.42±0.03			
20 PLVAH ^d	0.35±0.03			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: LP, lipid peroxidation; PLVAH, *Phrymyleptostachya* var. *asiatica* HARA; CAT, catalase.

μg/mL PLVAH, 대조군 순으로 LP 저해능이 높은 것으로 나타났다.

9. 과산소음이온라디칼(SAR) 소거활성 측정

PLVAH 추출물에 대한 SAR-소거활성 측정을 위하여 15 μg/mL 와 20 μg/mL의 농도의 추출물 시료를 각각 분석한 결과 15 μg/mL 추출물의 처리에서는 소거활성이 80.7%로 나타났으며, 20 μg/mL의 처리에서는 68.2%로 나타났다. 따라서, 소거능은 15 μg/mL와 20 μg/mL에서 각각 21.2%와 33.3%로 대조군에 비하여 유의한 소거능을 나타냈다($P < 0.001$) (Table 8, Figure 5). 또한, 사후검정 결과 40 μM CAT, 20 μg/mL PLVAH, 15 μg/mL PLVAH, 대조군 순으로 SAR 소거능이 높은 것으로 나타났다.

고 찰

항산알루미늄(AS)은 물에 쉽게 용해하는 특성을 가지고 있으

Figure 4. The inhibitory ability of LP in *Phrymyleptostachya var. asiatica* HARA (PLVAH) extract. Values are mean±SD. The data indicate the Mean±SD for triplicate experiments.

Table 8. The superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity of *Phrymyleptostachya var. asiatica* HARA (PLVAH) extract determined at a wavelength of 560 nm

Concentrations of PLVAH (μg/mL)	SAR scavenging activity (560 nm)	F	P	Tukey HSD
	Mean±SD			
Control ^a	0.33±0.03	73.57	<0.001	a>c>d>b
40CAT ^b	0.06±0.01			
15PLVAH ^c	0.26±0.02			
20PLVAH ^d	0.22±0.02			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: SAR, superoxide anion-radical; PLVAH, *Phrymyleptostachya var. asiatica* HARA; CAT, catalase.

며, 특히 우리의 일상생활과도 밀접히 관련되어 있는 금속염으로 장기적인 축적에 의한 중독은 장기손상을 초래할 뿐만 아니라, 특히 신경계에 영향을 주어 신경독성을 유발하게 된다[2]. 따라서, 본 연구에서는 AS의 신경독성을 조사하기 위하여 C6 신경교종 세포를 배양한 후 AS 100~160 μM 농도가 각각 포함된 배양액에서 세포를 48시간 동안 처리한 결과, AS 처리 농도에 따라 세포생존율이 감소하였으며, 이 때 XTT₅₀값이 120.0 μM로 나타남으로서 Borenfreund와 Puerner [26]의 독성 판정기준에 따라 중간독성(mid-toxic)인 것으로 나타났다. 이들은 약제의 독성을 XTT₅₀값이 100 μM 이하인 경우는 고독성(highly-toxic)으로, 100~1,000 μM 이면 중간독성(mid-toxic)으로, 1,000~2,000 μM이면 저독성(lower-toxic)으로 각각 판정하였다. 본 결과는 AS가 배양 C6 신경교종 세포에 신경독성이 있음을 알 수 있었으며, 이는 AS와 같은 알루미늄 염화합물인 AlCl₃가 신경독성을 나타냈다는 연구 보고나[2], 알루미늄과 같은 중금속인 납이 신경독성을 보였다는 연구보고[27]와 일치함을 알 수 있었다. 본 연구에서 AS가 세포독성을 나타낸 것은 AS가 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체와 관련된 칼슘채계에 영향을 미쳐 신경전달물질을 방해하였거나[28], 또는 세포내 신경원섬유의 타우단백질 인산화에 영향을 줌으로서 세포손상을 초래하였을 가능성을 배제할 수는 없지만[29], 그 보다는 AS의 산화적 손상에 의한 세포퇴화를 초래하였을 가능성이 클 것으로 생각된다. 최근, 수은을 비롯한 몇몇 중금속류는 이들의 붕괴시 자유라디칼을 생성함으로써 산화적 손상을 초래한다고 제시된 바 있다[30]. 산화적 손상은 세포내 superoxide dismutase (SOD)나 catalase (CAT)와 같은 항산화효소의 활성 저해를 비롯하여[31], 막지질의 과산화 반응 촉진[25] 및 세포내

Figure 5. The SAR-scavenging ability of LP in *Phrymyleptostachya var. asiatica* HARA (PLVAH) extract. Values are mean±SD. The data indicate the Mean±SD for triplicate experiments.

핵전사인자인 NF- κ B 활성의 과발현과 같은 세포퇴행적 변화를 초래한다고 알려져 있다[32]. 따라서, 본 연구에서는 AS의 신경독성과 산화적 손상간의 관련성을 알아보기 위하여 AS를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 항산화제의 일종인 CAT가 30 μ M과 40 μ M로 포함된 배양액에서 처리한 결과, AS만의 처리에 비하여 모두 유의한 세포생존율의 증가를 보였다. 본 연구 결과는 항산화제인 CAT가 AS의 신경독성을 방어하였음을 말해주고 있으며, 이는 다시 말해 AS의 독성 기전이 산화적 손상과 연관되어 있음을 나타내고 있다. 본 연구 결과는 알루미늄의 신경독성을 항산화제인 vitamin E[4], butylated hydroxytoluene (BHT)가 방어하였다는 연구 보고와도 일치함으로서 이를 증명하고 있다[2]. 한편, 본 연구에서 PLVAH 추출물이 AS의 신경독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양 세포에 XTT₅₀농도의 AS를 처리하기 전에 15 μ g/mL와 20 μ g/mL 추출물을 각각 2시간 동안 배양 세포에 처리한 결과, AS만의 처리에 비하여 모두 세포생존율의 증가를 보였으며, 특히 20 μ g/mL 추출물 처리에서는 유의한 세포생존율의 증가를 보여 AS의 독성을 방어한 것으로 나타났다. 이같은 결과는 PLVAH 추출물에 대한 본 연구의 총 폴리페놀과 플라보노이드에 대한 함량분석에 있어서와 같이, 추출물속에 함유되어 있는 페놀화합물에 속하는 kaempferol, quercetin과 같은 flavonoid류의 성분에 의한 항산화 작용의 결과라고 생각된다. 따라서, 본 연구에서는 kaempferol, quercetin과 같은 각 항산화 성분에 대한 효능은 이미 밝혀진 바 [33, 34], 추출물의 항산화효과는 이들 각 성분들의 상호작용에 의한 결과에 근거하여 각 성분에 대한 정성분석대신 kaempferol과 quercetin이 속하고 있는 폴리페놀은 물론, 특히 폴리페놀류 내의 플라보노이드의 항산화 물질에 대한 정량적 분석을 시행하였다. 동시에 위 물질의 함량분석을 통하여 항산화 효능이 입증된 타 물질과의 상호비교를 통하여 아래와 같이 본 연구에서 행한 몇가지 항산화 분석과 함께 PLVAH 추출물의 항산화 효능을 조사하였다. 항산화능을 측정하는 정량적 분석방법은 산화적 손상기전에 따라 다양하다. 예를 들면, nuclear factor kappa-B (NF- κ B)활성을 비롯하여[32], N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 과활성[27], 세포내 다량의 Ca^{2+} -influx [35], 흥분성 아미노산(excitatory amino acids, EAAs)의 분비 [36] 및 항산화효소의 활성 저해[31]와 같은 다양한 기전이 존재하고 있다. 본 연구에서는 이들의 기전들과 밀접한 관련성이 있는 아래와 같은 항산화능을 조사하였다. 위에서와 같이 항산화 분석기술은 많이 개발되어 있으나, 본 연구에서 행한 분석법 중 전자공여(ED) 활성 측정법은 자유라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력을 분석함으로써 항산화능의 정도를 알아보

는 분석법이다[24]. 또한 LP 저해능은 막을 구성하고 있는 인지질이 산화적 손상에 의하여 산화되는 것을 억제하는 능력을 측정하는 것으로서 항산화능의 정도를 측정할 수 있는 분석법이다[25]. 한편, 과산소음이온라디칼(SAR) 소거능은 자유라디칼의 일종인 음이온을 띤 과산소라디칼(superoxide radical)을 제거하는 능력정도를 측정함으로써 항산화능을 분석하는 방법이다[2]. 따라서, 본 연구에서는 PLVAH 추출물에 대한 항산화능의 조사를 위하여 ED능을 비롯한 지질과산화(LP) 저해능 및 과산소음이온라디칼(SAR) 소거능에 대하여 분석하였다. 먼저, 본 연구의 ED능에 있어서, PLVAH 추출물 15 μ g/mL와 20 μ g/mL의 농도에서 각각 12.4%와 23.6%로 나타나 이는 대조군에 비하여 유의한 ED능을 보였다. 본 연구 결과는 망간에 대한 한련초 추출물(110 μ g/mL)의 24.2% [20]와 초산납에 대한 지금초 추출물(100 μ g/mL)의 28.6% [21]와 거의 유사한 ED능을 보여주었다. LP 저해능에 있어서, 본 연구의 추출물 15 μ g/mL와 20 μ g/mL의 농도에서 각각 15.7%와 29.3%로 이는 대조군에 비하여 유의한 LP 저해능을 보였다. 본 연구 결과는 수은에 대한 꿀풀 추출물(80 μ g/mL)의 31.3%[30]와 초산납에 대한 지금초 추출물(100 μ g/mL)의 25.0%[21] 보다 더 높거나 또는 거의 유사한 저해능을 보여주었다. SAR 소거능에 있어서는, 본 연구의 PLVAH 추출물 15 μ g/mL와 20 μ g/mL의 농도에서 각각 19.3%와 31.7%로 이는 대조군에 비하여 유의한 SAR 소거능을 보였다. 본 연구 결과는 Al에 대한 금은화 추출물(100 μ g/mL)의 35.8%[2]와 카드뮴에 대한 애기똥풀 추출물(80 μ g/mL)의 48.0%[9]에 비하여 다소 낮으나 이들과 같이 높은 소거능을 보였다. 이상의 연구 결과로부터 AS의 독성에 산화적 손상이 관여하고 있으며, 또한 이에 대한 PLVAH 추출물은 kaempferol과 quercetin과 같은 폴리페놀계통의 플라노이드물질에 의한 항산화능에 의하여 AS의 산화적 손상을 효과적으로 방어하였다.

요 약

본 연구는 배양된 C6 신경교종(glioma) 세포에서 환경오염 원인 황산알루미늄에 의한 신경 독성과 파리풀(PLVAH)추출물의 AS에 의해 유도된 신경 독성에 대한 보호효과를 확인해 보았다. 이를 위해 세포생존력과 전자공여(ED)능, 지질과산화(LP) 저해능 및 과산소음이온라디칼(superoxide anion-radical, SAR) 소거능과 같은 항산화효과를 조사하였다. AS는 용량의존적으로 현저히 세포생존율을 감소시켰고 AS의 XTT₅₀ 값은 120.0 μ M로 측정되었다. AS의 신경 독성은 Borenfreund와 Puerner의 독성 기준에 의해 중간 독성으로 판정되었다. 또한,

항산화제인 catalase (CAT)는 AS의 신경독성에 의해 손상된 세포의 생존력을 현저히 증가시켰다. AS 유발 신경 독성에 대한 PLVAH 추출물의 보호 효과에서, PLVAH 추출물은 ED의 능력, LP의 억제 능력 및 SAR 소거능을 유의하게 증가시켰다. 이러한 결과로부터 산화 스트레스가 AS의 세포독성에 관여하고 있으며, PLVAH 추출물의 항산화 작용에 의해 AS에 의해 유도된 신경 독성을 효과적으로 보호한다는 것을 알 수 있었다. PLVAH 추출물과 같은 천연 성분은 산화스트레스를 만드는 AS와 같은 중금속 화합물로 인한 독성을 치료할 수 있는 잠재적 치료제가 있다고 사료된다.

Acknowledgements: None

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Yoo SM¹, Researcher; Lee JH², Professor.

REFERENCES

- Wang S, Shi X. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem*. 2001;222:3-9. <https://doi.org/10.1023/A:1017918013293>.
- Jung JY, Jung IJ, Jekal SJ. The protective effect of *Lonicerae flos* extract on cultured C6 glioma cells damaged by aluminum of dementia. *Kor J Clin Lab Sci*. 2017;49:271-278.
- Jung JY, Joe DY, Park SH, Seo YM. Protective effect of *Rumex crispus* L. extract on cultured NIH3T3 fibroblasts damaged by cadmium of environmental pollutant. *J Kor Soc People Plants Environ*. 2014;17:15-21.
- Kim SJ, Yu YW, Lee JK. Cytotoxicity and protective effect of *Portulaca oleracea* L. extract on cultured neuroglioma cells damaged by aluminum of dementia-induced agent. *J Kor Soc People Plants Environ*. 2013;16:251-256.
- Deloncle R, Guillard O. Mechanism of Alzheimer's disease: arguments for a neurotransmitter-aluminum complex implication. *Neurochem Res*. 1990;15: 1239-1245.
- Deloncle R, Guillard O, Clanet F, Courtois P, Piriou A. Aluminum transfer as glutamate complex through blood-brain barrier. *Biological Trace Element Res*. 1990;25:39-45.
- Kim YS, Lee MH, Wisniewski HM. Aluminum induced reversible changes in permeability of the BBB to ¹⁴C-sucrose. *Brain Res*. 1986;337:286-291.
- Jung JY, Joe DY, Park SH, Seo YM. Protective effect of *Rumex crispus* L. extract on cultured NIH3T3 fibroblasts damaged by cadmium of environmental pollutant. *J Kor Soc People Plants Environ*. 2014;17:15-21.
- Kim TY, Jekal SJ. Antioxidative effect of *Chelidonium majus* extract on cultured NIH3T3 fibroblasts injured by cadmium chloride of toxicant. *Kor J Clin Lab Sci*. 2016;48:1-7. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2016.48.1.1>.
- Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Hung YP, et al. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2007;113:115-124.
- Ma J, Luo XD, Protiva P, Tang H, Ma C, Basile MJ, et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manikarzapota*(*Sapodolla*). *J Nat Prod*. 2003;66:983-986.
- Chang JK. The wild plants for human body. 2nd ed. Seoul: Nexus publishing; 2003. p478.
- Shin MK. Herbalogy of extracting therapy at traditional herb medicine. 1st ed. Iksan: Jindalrae publishing; 2007. p602-603.
- Wang LTY, Lian TW, Hung TJ, Yen JH, Wu MJ. Distinguive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem*. 2006;54:9798-9804.
- Jo EH, Lee JW, Park SY, Kim PP, Choi KH, Eom IC. Pre-validation of colony forming efficiency assay for assessing the cytotoxicity of nanomaterials. *J Environ Health Sci*. 2015;41: 17-23.
- Hay R, Caputo J, et al. ATCC catalogue of cell lines and hybridomas. 7th ed. Rockville: American TC Collection; 1992. p63-162.
- Lee KS. Dictionary of biochemical molecular biology. 1st ed. Iksan: Daewhak publishing; 2000. p23.
- Kim SE, Yang BS, Choi YS. Cytotoxicity and effect of *Lonicerae flos* extract against chromium, contact dermatitis-induced agent in cultured human skin fibroblasts. *J Kor Soc People Plants Environ*. 2012;15:407-412.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 1983;65:55-63.
- Lee SH, Jung IJ, Jang HS. The antioxidative effect of *Ecliptaprostrata* L. extract on cultured NIH3T3 fibroblasts injured by manganese-induced cytotoxicity. *Biomed Sci Lett*. 2018;24:1-8. <https://doi.org/10.15616/BSL.2018.24.4.357>.
- Lee SH, Seo YM. Alleviating effects of *Euphorbiae humifusae* L. extract on the neurotoxicity induced by lead. *Kor J Clin Lab Sci*. 2018;50:501-510.
- Association of official analytical chemists. Official methods of analysis 18th ed. [Internet]. Arlington: Association of official analytical chemists; 2005 [cited 2019 May 16]. Available from: <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/aoac.methods.1.1990.pdf>.
- Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the three radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol*. 2000; 71:109-114.
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;26:1199-1200.
- Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci*. 1993;58:1410-1420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06194.x>.
- Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth*. 1984;9:7-9.
- Son YW, Rim YS, Seo YM. Protective effect of NMDA receptor antagonist on the neurotoxicity induced by lead as an environmental pollutant. *J Kor Soc Occup Environ Hyg*. 2017;27: 193-200. <https://doi.org/10.15269/JKSOEH.2017.27.3.193>.

28. Ha DH, Yang HW, Lee JH, Lee KC. Effect of NMDA receptor antagonist on osteoblasts damaged by methylmercuric chloride. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2003;17:412-415.
29. Waltz JA, Knowlton BJ, Boone KB, Back-Madruga C, McPherson S, et al. Relational integration and executive function in Alzheimer's disease. *Neuropsychol.* 2004;18:296-302.
30. Oh YH, Park ST. Protective effect of *Prunella vulgaris* L. var *lilacina* Nakai extract on cultured NIH3T3 fibroblasts damaged by mutagenic mercury-induced toxicity. *J Kor Soc People Plants Environ.* 2015;18:41-46.
31. Seo YM, Kim NS. Effect of superoxide dismutase on oxidative stress of reactive oxygen species in cultured human skin melanocyte. *J Kor Soc Occp Environ Hyg.* 2009;19:261-269.
32. Gracia-Lopez D, Cuevas MJ, Almar M, Lima E, Paz JA, Gonzalez-Gallego J. Effects of eccentric exercise on NF-kB activation in blood monolayer cells. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39:653-664.
33. Kim MS, Seo YM, Park ST. Antioxidant effect of kaempferol on cultured human skin fibroblasts damaged by methylmercuric chloride. *J Kor People Plants Environ.* 2010;13:23-29.
34. Graefe EU, Wittig J, Mueller S. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol.* 2001;41:492-499.
35. Kim YR, Jang SJ. HO-1 mediates intracellular calcium modulation and inhibits TNF-a-induced NF-kB activity in human colonic epithelial cell line. *Kor J Ana.* 2006;39:401406.
36. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla V, Moroni F. Excitatory amino acid and free radicals formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci.* 1990;10:1035-1041.