

## 과산화수소의 산화적 스트레스로 유도된 Apoptosis에 대한 생약복합조성물(HemoHIM)의 방호효과 평가

신성해<sup>1</sup>, 김도순<sup>1</sup>, 김미정<sup>1</sup>, 김성호<sup>2</sup>, 조성기<sup>3</sup>, 변명우<sup>3</sup>, 이성태<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>순천대학교 생물학과

<sup>2</sup>전남대학교 수의학과

<sup>3</sup>한국원자력연구소 방사선연구원 방사선식품생명공학팀

### Protective Effects of a Herbal Composition (HemoHIM) Against Apoptosis Induced by Oxidative Stress of Hydrogen Peroxide

Sung-Hae Shin<sup>1</sup>, Do-Soon Kim<sup>1</sup>, Mi-Jung Kim<sup>1</sup>, Sung-Ho Kim<sup>2</sup>,  
Sung-Kee Jo<sup>3</sup>, Mung-Woo Byun<sup>3</sup> and Sung-Tae Yee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biology, College of Natural Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-752, Korea

<sup>3</sup>Radiation Food and Biotechnology Team, Advanced Radiation Technology Institute,  
Jeongup Campus of Korea Atomic Energy Research Institute, Jeonbuk 580-185, Korea

#### Abstract

In our previous study, a novel herb mixture (HIMI) of *Angelica gigas radix*, *Cnidium officinale rhizoma*, and *Paeonia japonica radix* was developed to protect the intestinal and immune systems and promote its recovery against radiation damage. A new herbal composition (HemoHIM) with the high immune modulating activity was developed from HIMI. HIMI was fractionated into ethanol fraction (HIMIE) and polysaccharide fraction (HIMIP). And HemoHIM was prepared by adding HIMIP to HIMI. HemoHIM showed more effective than HIMI in immune modulation as well as radioprotection. The present study is designed to investigate the protective effects of HIMI, HIMIP, and HemoHIM on hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced apoptosis of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. It was shown that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment reduced the viability of cells, and increased appearance of DNA ladders, hypodiploid (subG1) cells, and phosphatidylserine translocation level. Pretreatment of HemoHIM significantly reduced the cytotoxic effect induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, associated with reducing the translocation of phosphatidylserine, hypodiploid cells and DNA ladders. HemoHIM appeared to be more protective than HIMI against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis whereas, it exhibited similar activity to HIMIP. These results indicated that HemoHIM might be an useful agent for protection against oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced apoptosis as well as immune modulation, especially since it is a relatively nontoxic natural product.

**Key words:** a herbal composition, hydrogen peroxide, apoptosis, oxidative stress

#### 서 론

과산화물 음이온(superoxide anion), 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 수산화 라디칼(hydroxyl radical, OH) 등과 같은 반응성 산소종(ROS, reactive oxygen species)은 산화적 스트레스를 유발한다(1). 반응성 산소종은 염증, 노화, 암발생과 같은 다양한 병리학적인 요인으로 알려져 있다(2-4). 반응성 산소종의 농도와 표적세포의 종류에 따라 돌연변이, 염색체 절단, 세포독성, 암발생, 지질 과산화, 단백질 교차결합, 세포 파괴와 같은 다양한 생물학적 손상의 원인이 되며, 부분적으로 항산화제와 자유 라디칼 소거제(scavenger)에 의해 억제된

다. 일부 천연 항산화 물질은 세포의 산화적 손상을 방호하는 것으로 알려져 있다. 천연 생약재에서 발견되는 flavonoids는 혈관 이완작용, 항염증, 항바이러스, 항산화, 항암 효과를 나타내는 약리 활성 성분으로 알려져 있다(5-9). 특히 quercetin, catechin, kaempferol 같은 flavonoids는 비타민 C 또는 비타민 E보다 항산화력이 뛰어나다(10).

현대의학의 발전에 따라 각종 질병에 대한 원인이 밝혀지고 치료를 위한 의약품이 개발되고 있다. 그러나 아직도 많은 질병에 대한 효과적인 의약품이 개발되지 않았거나 지속적인 약물 사용에 따른 부작용이 나타나는 등 치료에 따른 많은 문제점이 나타나고 있다. 따라서 독성이 적으면서 효과

\*Corresponding author. E-mail: sungtae@sunchon.ac.kr  
Phone: 82-61-750-3618, Fax: 82-61-750-3608

가 입증된 천연물을 이용한 대체요법 치료와 질병 예방을 위한 건강 기능성식품 개발의 필요성이 증가하고 있다. 천연물을 이용한 질병 치료는 동아시아와 일부 유럽에서 응용되고 있으며, 동양에서는 한의학의 처방에 따라 여러 종류의 생약을 혼합한 후 열탕 추출하여 사용하기도 한다. 이러한 한의학 처방제는 여러 종류의 급만성 질병에 대한 치료 효과가 일부 알려져 있으나 정확한 약리학적 작용기전 또는 성분이 명확히 밝혀져 있지 않으며, 최근에 이와 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구팀에서는 동양의학에서 사용되고 있는 다양한 생약재 및 한약 처방제의 방사선에 대한 보호 효과를 보고한 바 있으며(11-18), 최근에 식품 원료로 사용 가능한 생약재 3종 당귀, 천궁, 백작약을 이용하여 새로운 생약복합물 HIM-I를 개발하여 면역세포 활성화 효과, 면역조절계 회복촉진 효과, 재생조직 및 면역조절계의 방어 효과, 항산화 효과에 대해 보고하였다(19). 그리고 HIM-I에서 면역 및 조절기능 활성화 효과가 강화된 새로운 생약복합조성물을 개발하고자 HIM-I에 그 조다당 분획이 첨가된 HemoHIM을 제조하여 그 효능을 검증하였다(20). 그 결과 생약복합물 HIM-I에 조다당 분획을 첨가하여 개발한 새로운 생약복합조성물 HemoHIM이 방사선에 의해 유발된 위장관 및 면역계 조직의 손상을 감소시켜 생존을 증가시키는 효과가 있으며, 특히 HemoHIM은 HIM-I과 비교하여 재생조직의 산화적 손상억제 효과는 비슷하게 유지되면서도 면역조절세포 방호 및 회복촉진 효과가 높은 것으로 관찰되었다. 따라서 본 실험은 과산화수소에 의해 유도된 apoptosis에 대한 생약복합조성물 HemoHIM의 방호 효과를 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 시약

세포배양에 필요한 배지 RPMI 1640과 배지에 첨가하는 항생제(antibiotic-antimycotic), FBS(fetal bovine serum)는 Gibco(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였으며, 2-mercaptoethanol, sodium bicarbonate( $\text{NaHCO}_3$ )는 Sigma(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 유세포분석기에 사용한 시약 trypsin, ribonuclease A, propidium iodide는 Sigma(St. Louis, MO, USA) 제품을, Annexin V-FITC는 PharMingen(San Diego, CA, USA) 제품을 사용하였다. 세포표면 및 세포주기 분석을 위해서는 유세포분석기(Beckman COULTER, EPICS XL, USA)를 사용하였다.

### 세포주 배양법

사람의 전골수세포주(promyelocytic leukemia) HL-60은 한국세포주은행(서울대학교 의과대학 암연구소)에서 구입하였다. 세포배양은 RPMI 1640 배지에 sodium bicarbonate( $\text{NaHCO}_3$ , 2 g/L), 항생제(100 units/mL penicillin G sodium, 100 units/mL streptomycin sulfate, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  am-

photericin B), 2-mercaptoethanol(50  $\mu\text{M}$ ), 10% FBS(fetal bovine serum)를 첨가한 것을 이용하였다.

### 생약복합조성물(HemoHIM) 및 분획의 제조

생약복합조성물(HemoHIM)은 아래와 같은 방법으로 제조한 시료를 (주)선바이오텍에서 제공받아 사용하였다. 서울경동 한약재 시장에서 구입한 생약재 3종 즉, 당귀(Danggui, *Angelica gigas* Nakai)의 뿌리, 천궁(Chuanxiong, *Cnidium officinale* Makino)의 근경, 백작약(Baishaoyao, *Paeonia japonica* Miyabe)의 뿌리를 동일한 무게비율로 혼합한 후, 혼합생약재 100 g당 증류수 1,000 mL을 가하고 4시간 열탕 추출하였다. 추출물의 고형분을 제거하고 감압농축하여 생약복합물 HIM-I를 얻었다. HIM-I에 4배 부피의 100% 에탄올을 주정을 첨가하고 25°C 이하에서 16시간 경치한 후, 원심분리하여 침전된 조다당 분획(HIM-I-P)을 수거하였다. 수거한 조다당 분획의 일부를 이에 해당하는 HIM-I에 첨가하여 생약복합조성물 HemoHIM을 제조하였다. HIM-I, HIM-I-P, HemoHIM은 동결건조하여 냉동 저장하였으며, 실험 직전에 증류수에 녹여 사용하였다.

### 세포생존을 측정

과산화수소(hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )에 의한 apoptosis를 측정하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 먼저 일정한 농도의 시료를 첨가한 배지에서 세포 HL-60을 24시간 전처리한 실험군과 전처리를 하지 않은 대조군을 충분히 세척한 후, 세포( $5 \times 10^5$  cells/well)에 30  $\mu\text{M}$ 의 과산화수소를 첨가하여 6시간 배양한 다음, 생존한 세포수를 trypan blue (0.2%)로 염색하여 계측하였다.

### 세포막 변화 측정

세포 HL-60을 24-well plate에 well당  $5 \times 10^5$  cells씩 분주한 후 시료를 첨가하고 24시간 배양한 다음 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포에 과산화수소를 첨가하여 6시간 배양한 후 원심분리하여 세포를 회수하였다. 그리고 세포막의 안쪽에 존재하는 phosphatidylserine에 특이적으로 부착하는 Annexin V-FITC와 DNA를 염색하는 propidium iodide로 염색한 후, 유세포분석기로 분석하였다.

### 세포주기 측정

세포 HL-60을 24-well plate에 well당  $5 \times 10^5$  cells씩 분주한 후 시료를 첨가하고 24시간 배양한 다음 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포에 과산화수소를 첨가하여 6시간 배양한 후 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포에 trypsin을 처리하고 ribonuclease A로 RNA를 제거하였다. Propidium iodide(416  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 넣고 냉암소에서 2시간 염색한 후, 유세포분석기로 분석하였다.

### DNA 절편 측정

세포 HL-60을 6-well plate에 well당  $5 \times 10^6$  cells씩 분주한 후 시료를 첨가하고 24시간 배양한 다음 세포를 회수하였

다. 회수한 세포에 과산화수소를 첨가한 후에 다시 6시간 배양하고 원심분리하여 회수하였다. 회수한 세포에 NET buffer(NaCl 0.1 M, TrisHCl 10 mM, EDTA 1 M), proteinase K(100 µL/mL), SDS(20%)를 첨가하여, 55°C에서 4시간 동안 세포를 용해시켰다. Phenol, chloroform과 iso-amylalcohol을 이용하여 DNA를 분리하고 에탄올로 침전시켰다. 추출한 DNA를 TE buffer(Tris 10 mM, EDTA 1 mM)에 녹여 RNase(50 µg/mL)를 처리한 후 2% agarose gel에서 100 V로 전기영동한 다음 자외선으로 DNA 절편을 확인하고 사진 촬영을 하였다.

시료의 방호 효과를 계산

각 실험에서 과산화수소 처리에 대한 시료의 방호 효과는 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\% \text{ of protective effect} = \frac{(\text{무처리 대조군} - \text{전처리 후 H}_2\text{O}_2 \text{ 처리})}{(\text{무처리 대조군} - \text{무처리 후 H}_2\text{O}_2 \text{ 처리})} \times 100$$

결과 및 고찰

세포생존율에 미치는 과산화수소의 영향

과산화수소에 의한 HL-60 세포주의 생존율 변화를 알아보기 위해, 과산화수소를 처리한 후 살아 있는 세포수를 측정하였다. 즉 과산화수소를 처리하지 않은 대조군과 1 µM ~ 10 mM의 과산화수소를 처리한 실험군을 설정하여 6시간 후에 세포를 회수한 다음 trypan blue로 염색하고 염색되지 않은 살아있는 세포수를 계산하였다. 그 결과 과산화수소의 농도가 증가할수록 세포생존율이 서서히 감소하여 10 µM에서 대조군의 약 87%였다가 30 µM에서 약 29%로 급격히 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 따라서 본 실험에서는 apoptosis를 유도하기에 충분한 농도인 30 µM의 과산화수

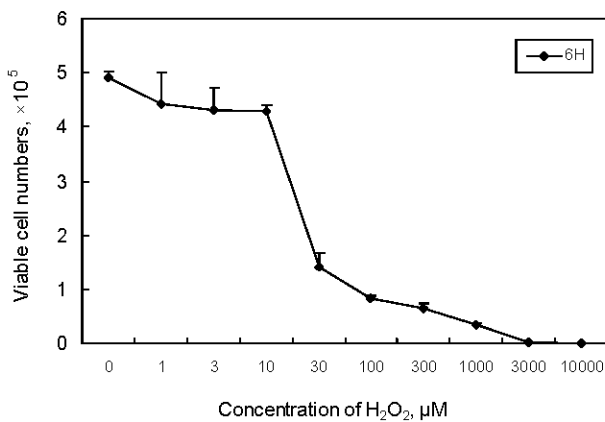


Fig. 1. Effect of hydrogen peroxide on the HL-60 cell viability.

Cells were treated with hydrogen peroxide at the indicated concentrations. Six hours after cells were seeded, viable cells were counted by trypan blue staining. Data represent the mean ± SD of triplicate cultures.

소를 사용하였다.

과산화수소에 의한 apoptosis

Apoptosis는 세포사의 형태로, 1972년 Kerr, Wyllie, Currie 등의 병리학자들이 그 때까지 알려진 세포사인 괴사(necrosis)와 형태학적으로 다른 세포사가 존재한다는 것을 밝혔다. 즉 apoptosis가 일어나면 염색질의 응축, 핵의 응축, 세포의 축소, apoptotic body의 출현, 대식세포에 의한 탐식작용 등과 같은 현상들이 관찰된다(21). 따라서 과산화수소에 의한 세포사가 괴사인지 apoptosis인지 알아보기 위하여 과산화수소 처리로 죽은 세포의 형태와 세포내 DNA의 구조적 변화를 관찰하였다. 그 결과 과산화수소에 의해 세포내 endonuclease가 활성화되어 DNA가 일정한 크기(200 base pair)로 잘라져 나타나는 전형적인 DNA ladder formation 현상(Fig. 2A)과 세포의 전체적인 윤곽은 남아있지만 세포질이 응축되고 세포질에 다량의 기포가 나타나는 세포형태 변화(Fig. 2B)가 관찰되었다. 즉 과산화수소에 의한 세포사는 전형적인 apoptosis인 것을 확인할 수 있었다. 따라서 apoptosis가 일어날 때 나타나는 현상인 세포 내막의 파괴, hypodiploide 세포 증가, DNA ladder formation 등을 관찰하여 시료의 방호 효과를 평가하였다.

세포생존율에 대한 방호 효과

과산화수소에 의한 apoptosis에 대해 HemoHIM 및 그 분획 시료가 방호 효과를 나타내는지 측정하였다. 즉 HL-60 세포주를 배양할 때 세 가지 시료인 HIM-I, HIM-I-P, HemoHIM을 1, 10, 100 µg/mL씩 첨가하여 24시간 동안 전처리 배양하였다. 배양한 세포를 충분히 세척하여 동일한 세포수로 조정하고 30 µM의 과산화수소를 6시간 동안 처리

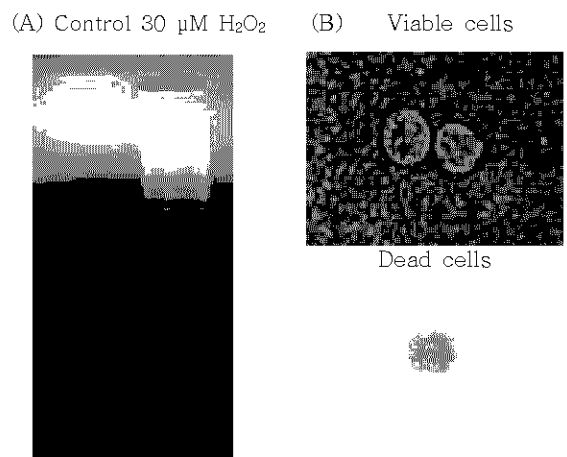


Fig. 2. DNA fragmentation and morphological identification of apoptosis in HL-60 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Cells were incubated for 6 hours with 30 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and experimental procedures performed as outlined in Material and Methods. (A) An ethidium bromide stained agarose gel shows DNA laddering pattern in cells incubated with 30 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (B) Viable and dead cells were observed using trypan blue dye exclusion.

**Table 1. Protective effects of HIM-I, HIM-I-P and HemoHIM on viability of HL-60 cells treated with hydrogen peroxide**

Concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	$\text{H}_2\text{O}_2$ , 30 $\mu\text{M}$	% of protection	
Control	2.31 $\pm$ 0.18	1.42 $\pm$ 0.28	0	
HIM-I	1	2.14 $\pm$ 0.11	1.60 $\pm$ 0.28	20.2
	10	2.09 $\pm$ 0.18	1.86 $\pm$ 0.08	49.4
	100	2.09 $\pm$ 0.10	1.62 $\pm$ 0.08	22.5
HIM-I-P	1	2.61 $\pm$ 0.30	1.93 $\pm$ 0.24	57.3
	10	2.10 $\pm$ 0.17	1.88 $\pm$ 0.17	51.7
	100	2.31 $\pm$ 0.01	1.93 $\pm$ 0.04	57.3
HemoHIM	1	2.29 $\pm$ 0.16	1.93 $\pm$ 0.21	57.3
	10	2.01 $\pm$ 0.10	1.93 $\pm$ 0.16	57.3
	100	2.28 $\pm$ 0.08	1.84 $\pm$ 0.28	47.2

Cells were preincubated with samples for 24 hours, and then incubated for 6 hours in the presence or absence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Viable cells were counted by trypan blue staining. Data represent the mean $\pm$ SD of triplicate cultures.

한 후 세포를 회수하여 trypan blue(0.2%)로 염색하고 살아 있는 세포수를 계산하였다. 그 결과 시료로 전처리 배양을 하지 않은 대조군의 세포는 30  $\mu\text{M}$  과산화수소로 처리하였을 때 약 40%의 세포가 죽는 것으로 나타났다(Table 1). 그러나 HIM-I, HIM-I-P 및 HemoHIM으로 전처리 배양한 경우에는 각각 약 20~50%(최대 49.4%), 약 51~58%(최대 57.3%), 약 47~58%(최대 57.3%) 정도의 과산화수소에 의한 apoptosis에 대해 방호 효과가 있는 것으로 나타났다. 즉 HemoHIM 및 그 분획 시료는 과산화수소 처리에 의해 유도되는 apoptosis를 방호하여 세포의 생존율을 높이는 방호 효과가 있는 것으로 나타났다. 즉 HemoHIM을 전처리하였을 때 HIM-I에 비해 방호 효과가 증가하였으며 HIM-I-P와 비슷한 것으로 나타났다.

#### 세포막 손상에 대한 방호 효과

Apoptosis의 다른 특징 중의 하나는 세포막의 변화이다(22,23). 생세포의 세포막 내측에 PS(phosphatidylserine)이 존재하는데, apoptosis가 일어난 세포에서는 초기단계에 세포막 내측에만 존재하는 PS가 세포막 외측으로 표출된다. 따라서 세포막 외측으로 표출된 PS를 검출하면 DNA 절단 현상보다 초기단계의 apoptosis를 정량적으로 측정할 수 있

다. Annexin V는 320개의 아미노산으로 이루어진 단백질로 생리적인  $\text{Ca}^{2+}$  농도에서 인지질에 높은 친화성을 가진다. 즉, 음전하를 가지는 인지질에 대해서는 선택적인 친화성을 가지는데, 특별한 조건에서는 특히 PS에 대해 높은 친화성을 나타내기 때문에 apoptosis에 의해 세포막 외측으로 표출되는 PS를 검출하는데 매우 유용한 분자이다(24). 한편, apoptosis가 진행되어 세포막이 계속적으로 파괴되는 것은 세포막의 파괴로 PI(propidium iodide)가 세포질로 스며들어가 DNA에 결합하는 정도로 판단할 수 있다.

먼저, HL-60 세포에 HIM-I, HIM-I-P, HemoHIM을 100  $\mu\text{g/mL}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 전처리 배양한 후, 충분히 세척하여 동일한 세포수로 조정하고 과산화수소 30  $\mu\text{M}$ 을 6시간 동안 처리하였다. 세포를 회수하여 Annexin V-FITC와 PI로 염색한 다음 유세포분석기를 사용하여 분석하였다. 그 결과 무처리 대조군에 비해 시료를 전처리하지 않고 과산화수소만을 처리하였을 경우, apoptosis의 초기단계(early apoptosis)에서 PS가 세포막 외측으로 표출되는 정도를 나타내는 [AV(+), PI(-)]영역이 0.3%에서 10.8%로 증가하는 것으로 나타났다(Table 2). 그리고 apoptosis가 진행됨에 따라 세포막이 파괴되어 PI가 세포질로 스며들어가는 후기단계(late apoptosis)를 나타내는 [AV(+), PI(+)]영역이 0.4%에서 9.9%로 증가하였다. 즉 과산화수소 처리에 의해 세포막 내측에 있는 PS이 세포막 외측으로 노출되고 막의 파괴로 인해 세포질로 PI가 스며들어 가는 세포수가 증가하는 것을 알 수 있었다. 그러나 HIM-I, HIM-I-P와 HemoHIM으로 전처리 배양하였을 경우에는 [AV(+), PI(-)]영역이 각각 6.4%, 7.5%, 6.7%로, 전처리 배양을 하지 않았을 때인 10.8%보다 감소하는 것으로 나타났으며, [AV(+), PI(+)]영역은 전처리 배양 후에 각각 8.0%, 7.3%, 7.4%로 전처리 배양을 하지 않았을 때인 9.9%보다 감소하였다. 즉 초기 세포막 파괴에 대한 방호 효과는 HIM-I(41.9%)과 HemoHIM(39.0%)의 경우 전처리하였을 때 약 40% 정도로 비슷하였으며 HIM-I-P(31.4%)에 비해 높은 것으로 나타났다.

#### SubG1기 세포 증가에 대한 방호 효과

염색시약인 PI는 DNA 이중나선에 결합하므로 PI염색으

**Table 2. Flow cytometric analysis of Annexin V and PI stained HL-60 cells following induction of apoptosis with hydrogen peroxide**

Conditions	% of positive staining cells			
	AV(-)/PI(-)	AV(-)/PI(+)	AV(+)/PI(-) (% of protection)	AV(+)/PI(+) (% of protection)
Control	98.9	0.5	0.3	0.4
$\text{H}_2\text{O}_2$	76.6	2.7	10.8 (0.0)	9.9 (0.0)
$\text{H}_2\text{O}_2$ +HIM-I	80.5	3.1	6.4 (41.9)	8.0 (20.0)
$\text{H}_2\text{O}_2$ +HIM-I-P	81.8	3.4	7.5 (31.4)	7.3 (27.4)
$\text{H}_2\text{O}_2$ +HemoHIM	81.1	2.8	6.7 (39.0)	7.4 (26.3)

Cells were preincubated with samples for 24 hours, and then incubated for 6 hours in the presence or absence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Apoptotic cells stained with Annexin V-FITC and PI.

AV: Annexin V, PI: Propidium iodide.

**Table 3. Flow cytometric analysis of PI stained HL60 cells based on DNA content following induction of apoptosis with hydrogen peroxide**

Conditions	% of positive staining cells			
	SubG1 (% of protection)	G1	S	G2/M
Control	2.1	49.3	29.5	19.3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	57.8 (0)	24.5	12.6	5.4
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + HIM-I	49.1 (15.6)	28.3	15.4	7.4
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + HIM-I-P	34.3 (42.2)	34.7	20.3	11.0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + HemoHIM	45.0 (23.0)	29.1	17.0	9.1

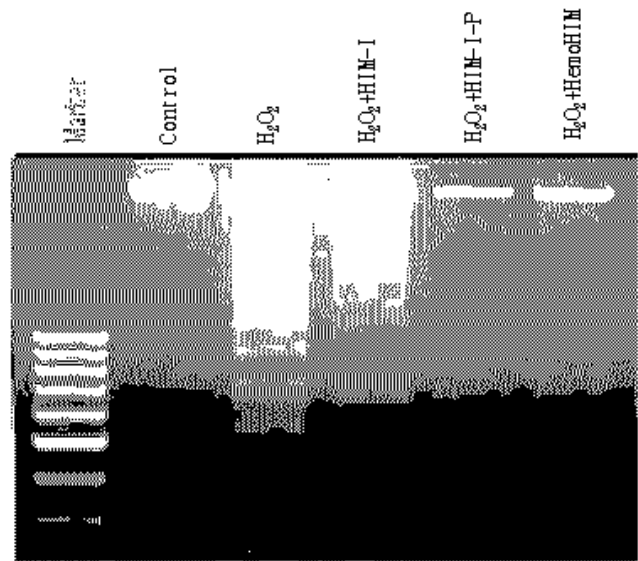
Cells were preincubated with samples for 24 hours, and then incubated for 6 hours in the presence or absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Apoptotic cells stained with PI.

로 DNA 양을 측정하여 세포주기를 알 수 있다(26). 즉, 세포 주기는 G1기(세포가 증식을 하지 않는 시기), S기(세포 증식을 위해 DNA를 복제하여 DNA 양이 2배까지 증가하는 시기), G2/M기(세포의 DNA 복제가 끝나 세포 내 DNA 양이 2배가 된 상태) 3단계로 나눌 수 있다. Apoptosis의 후기단계에서는 endonuclease에 의해 DNA가 일정한 길이(약 200 base pair)의 배수로 절단되는 현상이 일어난다(26,27). 이때 절단된 DNA에는 PI가 결합하는 양이 감소한다. 따라서 PI 염색 후 유세포분석기로 분석하였을 때 G1기보다 적은 DNA 양을 가진 세포(subG1기)는 apoptosis가 일어난 것으로 생각할 수 있다.

HemoHIM 및 그 분획 시료가 과산화수소에 의한 apoptosis를 방호하는 정도를 측정하기 위해 PI로 염색된 DNA 양을 유세포분석기로 분석하였다. 그 결과 무처리 대조군에 비해 과산화수소만을 처리하였을 경우에 subG1기 세포수가 2.1%에서 57.8%로 증가하는 것으로 나타났다(Table 3). 그러나 100 µg/mL의 HIM-I, HIM-I-P, HemoHIM으로 전처리 배양하였을 경우에 각각 49.1%, 34.3%, 45.0%로 subG1기 세포수가 감소하는 것으로 나타났다. 즉 HIM-I, HIM-I-P와 HemoHIM으로 전처리 배양하였을 경우에 DNA 절편에 대해 각각 15.6%, 42.2%, 23.0% 정도의 방호 효과가 있는 것으로 생각된다. 즉 방호 효과는 HIM-I-P를 처리하였을 때 가장 높게 나타났으며 HIM-I보다 HemoHIM에서 높은 것으로 나타났다.

**DNA 절단에 대한 방호 효과**

다음으로 모든 실험 조건은 동일한 후, 세포에서 DNA를 추출하여 전기영동법으로 DNA 절단 현상을 직접 확인하였다. 그 결과 과산화수소를 처리하지 않은 대조군에서는 DNA 절단 현상이 관찰되지 않았지만, 과산화수소만을 처리한 세포에서 분리한 DNA에서는 전형적인 절단 현상이 관찰되었다(Fig. 3). 그러나 HIM-I, HIM-I-P, HemoHIM으로 전처리 배양한 세포에서 분리한 DNA에서는 절단 현상이 관찰되지 않거나 또는 약하게 나타나는 것을 알 수 있었다. 즉 HIM-I-P를 처리한 경우 DNA 절편이 거의 관찰되지 않



**Fig. 3. DNA ladder formation in HL60 cells induced by hydrogen peroxide.**

Cells were preincubated with samples for 24 hours, and then incubated for 6 hours in the presence or absence of 30 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. An ethidium bromide stained agarose gel shows DNA laddering pattern.

았고, HemoHIM 그리고 HIM-I 순서로 DNA 절편의 양이 증가하는 것으로 나타났다. 위 실험에서 Annexin V를 이용한 세포막 변화 측정과 PI 색소를 이용한 DNA 양 분석에 의한 subG1 세포수 측정에서 나타난 결과와 일치하였다.

이상의 결과 HemoHIM 및 그 분획 HIM-I, HIM-I-P를 각각 전처리 배양을 하였을 경우 과산화수소로 유도되는 apoptosis에 대해 모두 방호 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

**요 약**

본 연구팀에서는 방사선으로부터 위장관과 면역조절계를 방호하기 위하여 당귀, 천궁, 백작약으로 새로운 생약복합물 HIM-I을 개발하였고, HIM-I을 에탄올 침전하여 에탄올 분획(HIM-I-E)과 조다당 분획(HIM-I-P)을 얻은 후, HIM-I에 조다당 분획을 첨가하여 HemoHIM을 제조하여 실험하였으며, 과산화수소를 이용하여 산화적 스트레스를 유발한 후 HemoHIM의 apoptosis 억제 효과를 측정하였다. 과산화수소를 세포주에 처리한 결과 세포독성 증가, 세포막 파괴, subG1기 세포 증가, DNA 절단 현상 등이 관찰되었다. 이때 HIM-I, HIM-I-P, HemoHIM을 첨가하여 전처리 배양한 다음에 과산화수소로 apoptosis를 유도하였다. 그 결과 과산화수소에 의한 세포독성, 세포막 파괴, subG1기 세포, DNA 절단현상 등이 현저하게 감소하는 것으로 나타났다. 전반적으로 HemoHIM의 방호 효과는 HIM-I-P와 비슷하였으며 HIM-I보다 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과로 HemoHIM은 면역기능 방호회복 물질로서 뿐만 아니라 산화적 스트

레스에 대한 항산화제로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력 연구개발 중장기계획사업의 지원을 받아 수행하였기에 감사드립니다.

### 문헌

- Berlet BS, Stadtman ER. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 20313-20316.
- Dhar A, Young MR, Colburn NH. 2002. The role of AP-1, NF-kappaB and ROS/NOS in skin carcinogenesis: the JB6 model is predictive. *Mol Cell Biochem* 234-235: 185-193.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhedov A, Erusalimsky JD. 2004. Chronic oxidative stress compromise telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 117: 2417-2426.
- Cuda G, Paterno R, Ceravolo Candigliota M, Perrotti N, Perticone F, Paniello MC, Schepis F, Ruocco A, Mele B, Cassano S, Bifulco M, Santillo M, Awedimento EV. 2002. Protection of human endothelial cells from oxidative stress: role of Ras-ERK1/2 signaling. *Circulation* 105: 968-974.
- Chen YC, Shen SC, Lin HY. 2003. Rutinoid at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 66: 1139-1150.
- Ko CH, Shen SC, Chen YC. 2004. Hydroxylation at C4' or C6 is essential for apoptosis-inducing activity of flavanone through activation of the caspase-3 cascade and production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36: 897-910.
- Shen SC, Ko CH, Tseng SW, Tasi SH, Chen YC. 2004. Structurally related antitumor effects of flavanones in vitro and in vivo: involvement of caspase 3 activation p21 gene expression, and reactive oxygen species production. *Toxicol Appl Pharmacol* 197: 84-95.
- Shen SC, Ko CH, Hsu KC, Chen YC. 2004. 3-OH flavone inhibition of epidermal growth factor-induced proliferation through blocking prostaglandin E2 production. *Int J Cancer* 108: 502-510.
- Lin Hy, Juan SH, Shen SC, Hsu FL, Chen YC. 2003. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves hemo oxygenase-1. *Biochem Pharmacol* 66: 1821-1832.
- Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME. 1998. Effect of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 67: 1210-1218.
- Kim SH, Lee SE, Oh H, Kim SR, Yee ST, Yu YB, Byun MW, Jo SK. 2002. The radioprotective effects of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang: A prescription of traditional Chinese medicine. *Am J Chin Med* 30: 127-137.
- Jo SK, Yu YB, Oh H, Kim SR, Kim SH. 2000. The effects of Shi-Quan-Dai-Bu-Tang and its ingredients on the survival of jejunal crypt cells and hematopoietic cells in irradiated mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 93-98.
- Kim SH, Lee SE, Oh H, Yang JA, Chung CY, Jang JS, Yu YB, Jo SK. 1999. The radioprotective effect of Kuei-Pi-Tang as a prescription of traditional Chinese medicine in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 698-704.
- Oh H, Park HR, Jeong IY, Kim SH, Jo SK. 2002. Protective effects of *Paeonia japonica* against radiation-induced damage. *J Korean Assoc Radiat Prot* 27: 181-188.
- Kim SH, An MR, Nah SY, Lee JH, Kim JH, Jo SK, Jang SJ, Shin DH. 2001. The effects of herbs on the radiation-induced apoptosis in intestinal crypt cells. *J Korean Assoc Radiat Prot* 26: 27-33.
- Kim SH, Oh H, Kim SR, Jo SK, Byun MW, Kim KS, Lee JH, Shin DH. 2001. The radioprotective effects of radices herbs. *Korea J Vet Res* 41: 105-111.
- Lee SE, Oh H, Yang JA, Jo SK, Byun MW, Yee ST, Kim SH. 1999. Radioprotective effects of two traditional Chinese medicine prescriptions: Si-Wu-Tang and Si-Jun-Zi-Tang. *Am J Chin Med* 27: 387-396.
- Kim SH, Oh H, Lee SE, Jo SK, Byun MW. 1998. Effect of Si-Wu-Tang and Si-Jun-Zi-Tang on the survival of jejunal crypt cells and hematopoietic cells in irradiated mice. *Korean J Food Sci Technol* 30: 888-894.
- Park HR, Kim SH, Yee ST, Byun MW, Jo SK. 2005. Effects of a herb mixture (HIM-I) on the protection of the hematopoietic-immune system and self-renewal tissues against radiation damage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 605-612.
- Jo SK, Park HR, Jung UH, Oh H, Kim SH, Lee SE. 2005. Protective effect of a herbal preparation (HemoHIM) on the self-renewal tissues and immune system against  $\gamma$ -irradiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 805-813.
- Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. 1996. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 10: 587-597.
- Collins MKL, Lopez-Rivas A. 1993. The control of apoptosis in mammalian cells. *Trends in Biochem Sci* 18: 307-309.
- Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos T. 1997. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27: 1-20.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51.
- Johnson N, Ng TT, Parkin JM. 1997. Camptothecin causes cell cycle perturbations within T-lymphoblastoid cells followed by dose dependent induction of apoptosis. *Leuk Res* 21: 961-972.
- Walker RP, Kokileva L, LeBlanc J, Sikorska M. 1993. Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *Biotechniques* 15: 1032-1036.
- Sakahira H, Enari M, Nagata S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99.

(2006년 8월 2일 접수; 2006년 8월 25일 채택)