

줄풀 줄기의 Neuro2A 신경세포고사에 대한 억제 효과

차윤엽*

삼지대학교 한의과대학 한방재활의학과

Inhibition Effect on Neuro2A Cell by Apoptosis of Zizania latifolia Rhizoma

Yun-Yeop Cha*

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Sangji University

To prevent human body injury from oxidative stress, antioxidants are very important and many research about antioxidants are generally being conducted. Hydrogen peroxide(H₂O₂) that is one of vitality oxygen species has been seen that cause various diseases, DNA damage and gene change. The purpose of this study was to examine the inhibition effect of Zizania latifolia Rhizoma on apoptosis induced by H₂O₂ in Neuro2A cell. Neuro2A cells were cultivated in RPMI(GibcoBRL) with 5% FBS and treated with H₂O₂ and Zizania latifolia Rhizoma. We measured the cell viability and analyzed DNA fragmentation. Activity of PARP, Cytochrome C, caspase-9, caspase-3, p53, p21, Bax and Bcl-2 in the cell was examined by using western blot. The results obtained were as Follows: The cell viability in Zizania latifolia Rhizoma treatment (60ug/ml<) decreased significantly compared with that of none treatment. (P<0.001) Zizania latifolia Rhizoma increased cell viability about twice as much as that being injury by H₂O₂. (Zizania Latifolia Rhizoma 20ug/ml, H₂O₂ 200uM, P<0.001) DNA fragmentation developed by H₂O₂, but was not developed in Zizania latifolia Rhizoma treatment. PARP, Cytochrome C, caspase-9 and caspase-3 activated all by H₂O₂ but were not activated in Zizania latifolia Rhizoma treatment. P53, P21 and Bax activated by H₂O₂, and Bcl-2 got into inactivation. But the opposite results appeared in Zizania latifolia Rhizoma treatment. In conclusion, these results suggest that Zizania latifolia Rhizoma inhibit the development of DNA fragmentation and apoptosis by H₂O₂ and the antioxidant action of Zizania latifolia Rhizoma is effective. More researches about effect of Zizania latifolia Rhizoma are considered to need.

Key words : Zizania latifolia Rhizoma, Neuro2A cell, apoptosis

서론

노화란 생명체의 성장과 동시에 진행되는 일련의 반응으로서 생명체의 발육, 성장, 성숙과 쇠퇴의 과정에서 형태적·기능적 퇴축, 예비력과 적응력의 저하로 최종적으로는 사망에 귀착되는 보편적인 생리현상을 말하는데^{1,2)}, 최근 들어 생활 수준의 향상으로 질병예방 및 노화방지, 장수를 추구하는 경향이 더욱 두드러지고 있으며 이를 해결하기 위한 수단으로 다양한 치료방법들이 개발되고 있다. 노화에 대해서는 최근 많은 과학자들이 주장하는 바가 있지만 치료의 개념에 있어서는 활성산소설이라는 일련의 이론으로 모아지고 있다. 즉, 활성산소에 의한 손상이 노화와 수

명결정에 중요하다고 생각하게 된 것이다³⁾. 활성 산소 중에서 H₂O₂는 O₂-(superoxide), OH-(hydroxy radical) 등을 포함하는 종의 하나로 심혈관계나 노화 등 각종 질환의 발병인자로 인식되고 있다^{4,5)}. 이런 활성 산소종으로부터 자신을 보호하기 위하여 인체는 유해산소제거효소(SOD), 카탈라아제(CAT) 등의 방어 시스템에 의하여 활성 산소 소거 기능을 하며 이들 항산화효소들은 O₂·, H₂O₂ 그리고 OH· 등의 독성을 해소 또는 약화시킴으로써 그 기능을 나타낸다^{6,7)}.

한의학에서는 줄풀의 뿌리를 菰根, 열매를 菰米라 하여 消滯이나 利尿劑로 사용하였으며⁸⁾ 민간에서는 고혈압, 관절염, 변비, 피부병 등에 이용하였다⁹⁾. 또한 최근에 나온 박¹⁰⁾의 논문에 의하면 줄풀 뿌리의 Neuro2A 신경세포고사에 대한 억제 효과에 관하여 유의성 있는 결과가 있다고 하여 이에 저자는 Neuro2A 신경 세포에 H₂O₂를 투여하여 산화적 손상을 유도하고 줄풀 뿌리가 아닌 줄기 추출물을 처리한 후 세포생존율,

* 교신저자 : 차윤엽, 강원도 원주시 우산동 660 삼지대학교 부속한방병원

· E-mail : omdcha@sangji.ac.kr, · Tel : 033-741-9260

· 접수 : 2005/10/04 · 수정 : 2006/01/03 · 채택 : 2006/01/26

DNA fragmentation 및 세포고사에 관련된 PARP, Cytochrome C, caspase-3, caspase-9 및 p53, p21, Bax, Bcl-2를 western blot 을 통한 활성분석을 하여 뿌리 뿐만 아니라 줄기에서도 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

경기도 가평군 청평호 일대에서 5월에 직접 채취한 줄풀 (*Zizania latifolia*) 줄기로서 바람이 잘 통하는 그늘에서 2주 동안 건조하여 사용하였다.

2. 줄풀 줄기 추출물

줄풀의 줄기 부분 20g을 증류수 100ml에 넣고 끓인 후 식혀 물 부분만 여과시켜 -50℃에서 얼려 cryostate 상태로 건조시킨 후 PBS에 녹여 사용하였다.

3. Neuro2A 신경세포주 배양

Neuro2A 신경세포주를 한국세포주은행에서 구입하여 RPMI (GibcoBRL)에 5% FBS와 Fungizone을 첨가하여 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다.

4. 줄풀 줄기의 농도에 따른 Neuro2A 세포생존율 측정

24-well culture plate에 각 well 당 2×10^5 cells를 넣어 배양한 후 줄풀 줄기 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 더 배양하였다. 24시간이 지난 후 세포배양액을 제거하고 PBS로 두 번 washing 한 후 0.5% crystal violet(in 20% methanol)을 300 μ l/well로 첨가하여 상온에서 5분간 방치한 다음 tap water로 재빨리 세척한 후 건조시켰다. 다음 1% SDS를 100 μ l 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 570nm (reference 450nm)에서 흡광도를 측정하였다. 전 과정을 각각 4회 반복하였다.

5. H₂O₂ 처리물과 H₂O₂ 처리물에 줄풀 줄기 추출물을 첨가한 후의 세포생존율 측정

4번 실험에서 줄풀 줄기 추출물 처리 시 줄풀 줄기 대신 H₂O₂ 200 μ M 처리를 한 것과 H₂O₂ 200 μ M에 줄풀 줄기 5 μ g/ml 와 20 μ g/ml를 각각 첨가 처리한 후 10시간 배양 후 똑같은 방법으로 흡광도를 측정하였으며 이를 각각 4회 반복하였다.

6. 세포고사 확인을 위한 DNA fragmentation 분석

처리한 배양세포를 얼음으로 차게 한 PBS로 한번 세척한 후 세포 침전물을 700 μ l의 lysis buffer (20mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, 0.5 % Triton X-100)로 현탁시키고, 얼음에서 45분간 항온 시키면서 가끔씩 침전된 세포를 현탁시켜 세포의 lysis 를 용이하게 하였다. 파쇄된 세포를 4℃에서 13,000 x g로 20분간 원심분리하여 세포질 부분을 회수하였다. 이 세포질 용액을 phenol/chloroform으로 두 번 extraction하여 단백질을 제거하고 세포질내로 유출된 DNA와 RNA를 sodium acetate/isopropanol

로 침전시켰다. 침전된 핵산을 40 μ l의 TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA)로 용해시키고, 200 μ g/ml의 농도가 되게 DNase-free RNase를 넣고 37℃에서 1시간 항온시켰다. RNA가 제거된 DNA 용액을 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, DNA를 ethidium bromide로 염색한 후 UV light하에서 사진을 찍어 가시화하였다.

7. Western blot을 이용한 PARP, Cytochrome C, caspase-3, caspase-9 및 p53, p21, Bax, Bcl-2의 활성분석

1) 단백질 추출

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1×10^7 의 세포 당 lysis buffer (10 mM Tris · HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% SDS) 100 μ l로 현탁시켜 얼음 위에서 한 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. 14,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겨 다음 실험을 수행하였다.

2) 단백질 농도 측정

단백질 정량은 Bicinchoninic Acid(BCA, Sigma, USA) 용액을 이용하여 bovine serum albumin(BSA, Sigma, USA)을 표준 곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA(1 μ g/ μ l)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, 16 μ g/ μ l에 BCA 용액 100 μ l를 첨가하여 20분간 37℃에서 방치한 다음 흡광도 540 nm에서 측정하여 표준 곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2 μ l와 BCA 용액 100 μ l를 섞은 뒤 20분간 37℃에서 방치한 후 540nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

3) 전기영동 및 Western blot

추출한 단백질 100 μ g을 Cytochrome C, caspase-9, 3와 p53, p21, Bax, Bcl-2 및 actin을 확인하기 위하여 15% SDS-polyacrylamide gel에, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 10% SDS-poly acrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% milk을 함유한 PBS-Tween (0.01%)에서 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. 이 membrane을 PARP (PharMingen, USA), Cytochrome C (PharMingen, USA), caspase-9 (PharMingen, USA), caspase-3 (PharMingen, USA), p53 (Santa Cruz, USA), p21 (Santa Cruz, USA), Bax (Santa Cruz, USA), Bcl-2 (Santa Cruz, USA), Actin (Santa Cruz, USA)의 항체를 사용하여 1시간동안 상온에서 shaking하면서 hybridization 시키고 난 후 PBS-Tween 20으로 세척하고, membrane을 horse -radish peroxidase로 conjugated 된 antimouse IgG 또는 antirabbit IgG로 다시 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. Membrane을 PBS-Tween으로 네 번 세척한 후 chemiluminescence 시약(DuPont, NEM)으로 반응시킨 후 Fuji X-ray film으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

8. 통계분석을 통한 유의성 검정

결과는 대조군의 평균값을 100%로 환산한 기준으로 평균값 \pm 표준편차로 나타내었다. 검정은 one-way ANOVA 검정을 통하여 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성을 알아보고, P 값이 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 줄풀 줄기의 농도에 따른 Neuro2A 신경세포생존율

줄풀 줄기의 농도에 따른 Neuro2A 신경세포의 생존율을 알아보기 위하여 용량 의존적으로 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 줄풀 줄기 추출물 40 μ g/ml 이하에서는 약 90% 이상의 생존율을 보이나 60 μ g/ml에서는 약 58%, 80 μ g/ml에서는 약 31%의 생존율을 보여($P < 0.001$) 60 μ g/ml 이상의 농도에서 줄풀 줄기에 의한 Neuro2A 신경세포 상해작용이 있었다(Fig. 1).

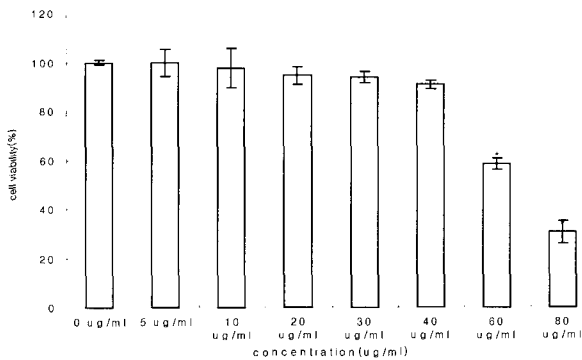


Fig. 1. Effect of Zizania latifolia Rhizoma on cell viability in Neuro2A cell were RPMI(GibcoBRL) with 5% FBS for 24 hours after initial time of Zizania latifolia Rhizoma treatment. * $p < 0.001$ compared with control

2. H₂O₂로 유발된 세포 상해에 대한 줄풀 줄기 추출물의 보호효과

Neuro2A 신경 세포에 H₂O₂ 200 μ M을 처리 한 후 10시간이 경과하면 37.33 \pm 2.54%의 세포생존율을 보여 약 60%이상의 세포 독성율을 관찰할 수 있었다. ($P < 0.001$) 줄풀 줄기 5 μ g/ml와 20 μ g/ml를 H₂O₂ 200 μ M과 동시에 처리하였을 경우, 줄풀 줄기의 농도가 5 μ g/ml에서는 56.84 \pm 0.69%, 20 μ g/ml 에서는 71.9 \pm 3.4%의 생존율을 각각 나타내어($P < 0.001$) H₂O₂ 200 μ M 처리군 대비 약 1.54배, 1.95배의 세포생존율 증가를 보였다(Fig. 2).

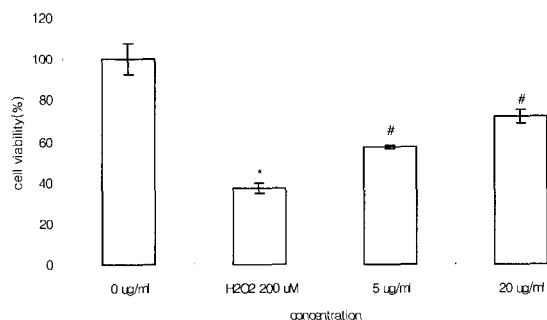


Fig. 2. The protective effects of Zizania latifolia Rhizoma on injury induced by H₂O₂. Cell were treated for 10 hours with Zizania latifolia Rhizoma (5 μ g/ml, 20 μ g/ml) and H₂O₂ 200 μ M. * $p < 0.001$ compared with control. # $p < 0.001$ compared with H₂O₂ 200 μ M

3. H₂O₂ 및 줄풀 줄기 추출물 첨가에 의한 DNA fragmentation

H₂O₂에 의한 세포고사를 확인하기 위하여 DNA

fragmentation 현상을 조사하였다. H₂O₂ 200 μ M을 처리했을 DNA fragmentation이 일어났으나 줄풀 줄기를 첨가하여 처리한 경우는 5 μ g/ml, 20 μ g/ml 각각의 경우 모두 DNA fragmentation 현상이 억제되었다(Fig. 3).

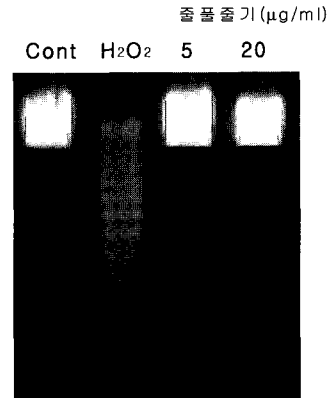


Fig. 3. Analysis of DNA fragmentation in the Neuro2A cell after H₂O₂ 200 μ M, H₂O₂ 200 μ M and Zizania latifolia Rhizoma 5 μ g/ml, H₂O₂ 200 μ M and Zizania latifolia Rhizoma 20 μ g/ml treatment. DNA fragmentation increase in H₂O₂ 200 μ M treatment.

4. H₂O₂ 및 줄풀 줄기 추출물 첨가에 의한 PARP, Cytochrome C, caspase-3, caspase-9의 활성분석

DNA fragmentation 현상이 일어나기 위해서는 세포고사 과정에서 PARP, Cytochrome C, caspase-9 및 caspase-3가 활성화 된다. H₂O₂ 200 μ M을 처리한 경우 모두 활성화가 일어났으나 줄풀 줄기를 처리한 경우는 5 μ g/ml, 20 μ g/ml 각각의 경우 모두 활성화가 억제되었다(Fig. 4).

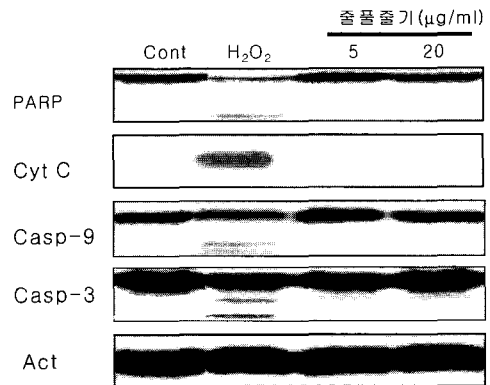


Fig. 4. Western blot analysis of PARP, Cytochrome C, caspase-9 and caspase-3 in the Neuro2A cell after H₂O₂ 200 μ M, H₂O₂ 200 μ M and Zizania latifolia Rhizoma 5 μ g/ml, H₂O₂ 200 μ M and Zizania latifolia Rhizoma 20 μ g/ml treatment. Actin was used as a loading control.

5. H₂O₂ 및 줄풀 줄기 추출물 첨가에 의한 p53, p21, Bax, Bcl-2의 활성분석

세포고사 과정에서 p53, p21, Bax는 활성화 되며 Bcl-2는 활성이 억제된다. H₂O₂ 200 μ M을 처리한 경우 p53, p21, Bax는 활성화되고 Bcl-2는 활성이 억제되었으나 줄풀 줄기를 처리한 경우는 5 μ g/ml, 20 μ g/ml 각각의 경우 모두 p53, p21, Bax는 활성화가 억제, Bcl-2는 활성화가 일어났다(Fig. 5).

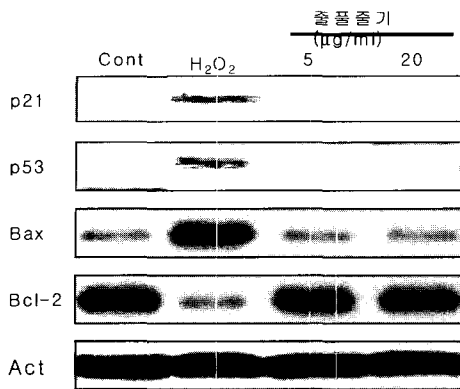


Fig. 5. Western blot analysis of p53, p21, Bax and Bcl-2 in the Neuro2A cell after H₂O₂ 200µM, H₂O₂ 200µM and Zizania latifolia Rhizoma 5µg/ml, H₂O₂ 200µM and Zizania latifolia Rhizoma 20µg/ml treatment. Actin was used as a loading control.

고찰

老化는 대부분 生理的인 과정중의 하나로 인식되어지고 있다. 그래서 老化란 '나이가 증가함에 따라 나타나는 普遍性的인 生物學的인 自然現象으로서 점차적인 臟腑의 消滅과 變質이 老衰와 더불어 진행성으로 나타나는 現象으로 간주한다¹¹⁾.

老化의 원인에 대해서 生物學的으로 消耗說, 新陳代謝速度說, 內分泌說, 生氣說, 衝擊說, 中毒說, 臟器의 原發性萎縮說, 細胞學說, 突然變異說, 細胞遺傳學說, 自己免疫說 등이 있고, 生化學的으로는 DNA說, 化學反應說, collagen의 老化說, free radical, 酵素作用障礙說 등이 있으며, 形態學的으로는 組織再生機能의 老化, 細胞數의 變化와 老化, 核의 變化와 老化, 結合組織의 老化 등이 있으며, 生理학적 원인은 항상성의 파탄, 적응력의 결함, 반응력의 변화, 臟器들의 豫備力 減少說 등이 있는데, 최근에는 Harman에 의해 提唱된 free radical에 의한 연쇄적인 유해반응의 결과로 노화과정이 진행된다는 학설이 유력한 것으로 보고되고 있다^{12,13)}.

Free radical은 人體의 radiation에 의한 노출이나 내부효소 반응에 의하여 생성되는데, 단백질의 -SH기와 반응하여 효소의 활성을 잃게 되거나 假橋結合의 촉진, DNA, RNA, 효소 및 membrane에 손상을 일으켜 세포괴사를 유발한다¹⁴⁾. 즉, free radical theory는 代謝過程에서 발생하는 superoxide anion(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂) 및 hydroxy radical(OH⁻) 등의 free radical이 세포나 結체조직에 작용하여 해로운 물질을 생성하게 되고 이를 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)이라고 한다. 이것이 축적된 결과가 노화와 만성 퇴행성 질병의 근본적인 原因이라고 보는 것으로, free radical이 축적되는 것을 방지하기 위하여 정상세포는 O₂를 분해하는 superoxide dismutase(SOD)와 H₂O₂를 분해하는 catalase와 같은 효소들을 가지게 된다¹⁵⁾.

세포괴사(necrosis)는 조직화되지 않은 비생리학적 형태의 세포죽음을 말하며, 세포괴사(apoptosis)는 초기 단계에서 세포 자체에는 변화가 없이 세포막의 뒤뜰림 현상(membrane blebbing)이 나타나고 세포괴사가 진행하면서 특징적으로 세포괴사소체(apoptotic body), 염색체 응축과 핵의 분절을 동반하며, 세포크기가 축소되면서 세포죽음에 이르기 때문에 염증 반응을

동반하지 않는다. 한편 활성 산소종은 세포괴사(Apoptosis)의 과정에서 중요한 요소로 작용되어 지는데 세포괴사란 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상인 계획된 세포죽음을 말한다^{16,17)}.

세포괴사 과정은 진화학상으로 매우 유사하며 세포가 가진 고유한 과정으로서 유전적으로 형성되는 활성 과정과 외부적으로 유래하는 여러 가지 단백질, 시토킨, 호르몬, 방사선, 산화 스트레스(oxidative stress), 저산소(hypoxia) 등에 의해 활성화 되는 기전으로 구별된다. 이러한 세포괴사의 기능 이상은 많은 종류의 질병 유발 및 진행 과정에 관여한다¹⁷⁾.

韓醫學에서는 『素問·上古天眞論』¹⁸⁾에 “女子七歲, 腎氣盛…五七, 陽明脈衰, 面始焦, 髮始墮…七七, 任脈虛, 太衝脈衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形壞而無子也…丈夫八歲, 腎氣實…五八, 腎氣衰, 髮墮齒槁…八八, 則齒髮去, 腎者主水, 受五臟六腑之精而藏之”, “天壽過度, 氣脈相通, 而腎氣有餘也”라 하였고, 虞는 “腎元盛則壽延, 腎元衰則壽夭”라 하여 腎臟의 盛衰가 老化와 壽命에 깊은 관련이 있음을 언급하였다.

『素問·陰陽應象大論』¹⁹⁾에서는 “年四十, 而陰氣自半也, 起居衰矣. 年五十, 體重, 耳目不聰明矣, 年六十, 陰痿, 氣大衰, 九竅不利, 下虛上實, 涕泣俱出矣”라 하였고, 『靈樞·天年篇』²⁰⁾에서는 “五十歲, 肝氣始衰, 肝葉始薄, 膽汁始減, 目視不明…九十歲, 腎氣焦, 四藏經脈空虛, 百歲五臟皆虛 神氣皆怯”이라 하여 나이가 들에 따라 각 기관의 構造的, 機能的 변화를 언급하였다. 臨床에서 老衰로 因하여 나타나는 耳目不清, 心失神則健忘, 飲食無味, 腰酸, 陰疝 症狀과 各種運動器 障礙 등이 주로 腎과 相生關係에 있는 肝의 機能 低下에 의해 誘發되므로 肝, 腎의 機能이 老化와 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다.

최근에 북한, 일본 및 세계 여러 나라에서 줄풀에 대한 연구가 있어왔는데, 북한에서는 류마티스 관절염, 고혈압, 변비 그리고 당뇨에 줄풀을 가루 내어 만든 줄풀산이나 달인 물인 줄풀탕 등으로 치료한 예가 있으며²¹⁾, 일본에서는 '고갱', 서양에서는 줄풀 열매를 Wild Rice, 곧 야생쌀이라 하여 건강식품으로 사용하고 있다²²⁾. 국내에서도 줄풀 뿌리에 대한 연구로 박¹⁰⁾ 등이 세포괴사를 억제하는 작용이 있다고 발표한 바가 있다.

줄풀은 우리나라에서는 황해도와 강원도 이남의 지역과 제주도 분포하며, 못이나 도랑, 강가의 얇은 물속에서 무리지어 자라는 벼과에 속하는 여러해살이 풀이다. 크기가 크며 굵은 뿌리줄기가 땅속을 뻗으며, 한 자리에서 여러 개의 굵은 줄기가 곧게 서서 높이가 2m에 달하며 몸집은 밋밋하고 푸르다. 길이가 1m, 너비가 2~3cm 정도 되는 길고 뺏뺏한 잎이 줄기와 평행해서 곧게 서며 좁은 피침꼴이며, 6월에서 8월 사이에 보라빛의 푸른 꽃이 줄기 끝에서 30~50cm의 크기로 핀다²³⁾.

《中藥大辭典》⁸⁾에서는 줄풀을 菘, 蔣草, 菘蔣草 등으로 부르며 뿌리줄기 및 뿌리, 열매를 약용으로 쓴다고 하였다. 그 뿌리줄기 및 뿌리를 菘根 또는 菘蔣根이라고 하며 《本草綱目》²⁴⁾에는 “甘, 大寒, 無毒. 腸胃痼熱, 消渴, 止小便利. 搗汁飲之. 燒灰, 和鷄子白, 塗火燒瘡. 小兒風瘡, 毒蛇傷齒”, 《醫學入門》²⁵⁾에는 “味甘, 大寒. 無毒. 主腸胃痼熱煩渴, 止小便利, 去胸中浮熱風, 利五臟

邪氣, 酒敷面赤, 白癩, 癩瘍大瘡, 除目黃, 止熱痢"이라 하였으며 《本草衍義》²⁶⁾에서는 "彼人收之, 合粟爲粥, 食之甚濟饑"이라 하여 구황식품으로 이용하기도 하였다.

같은 벼과에 속하는 야생벼에 대한 항산화 실험²⁷⁾ 등은 많이 있었으며, 이미 박¹⁰⁾ 등에 의하면 줄फल 뿌리는 항산화효과 및 세포고사 억제작용이 있다고 발표하였다. 이에 저자는 줄फल 줄기 또한 비슷한 효과 아니면 더 나은 효과가 있지 않을까 하여 줄फल 줄기가 Neuro2A 신경세포에 대한 항산화효과 및 산화로 발생된 세포고사에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다.

먼저 Neuro2A 신경세포에 대한 줄फल 줄기의 독성을 알아보기 위하여 5ug/ml에서 80ug/ml까지의 농도로 줄फल 줄기 추출물을 신경세포 처리하여 생존율을 살펴보았다. 대조군의 생존율 100%를 기준으로 40ug/ml 이하에서는 약 90% 이상의 생존율을 보이나 60ug/ml에서는 약 58%, 80ug/ml에서는 약 31%의 생존율을 보여 (P<0.001) 60ug/ml 이상의 농도에서 줄फल 줄기에 의한 Neuro2A 신경세포 상해작용이 있었다(Fig. 1). 그리하여 본 실험에서는 비교적 독성이 없는 5ug/ml와 20ug/ml 농도로 실험을 하였다.

항산화 효과는 활성 산소종의 하나인 H₂O₂를 이용하였는데, H₂O₂(Hydrogen peroxide)는 O₂(superoxide), OH⁻(hydroxy radical) 등을 포함하며 심혈관계나 노화 등 각종 질환의 발병인자로 인식되고 있으며^{4,5)}, 본 실험에서도 H₂O₂를 산화제로 이용하여 신경세포에 대한 상해를 일으켜, 상해된 세포에 줄फल 줄기를 농도별(5ug/ml, 20ug/ml)로 처리하여 생존율을 살펴보았다. 그 결과 Neuro2A 신경 세포에 H₂O₂ 200uM을 처리 한 후 10시간이 경과하면 37.33±2.54%의 세포생존율을 보여 약 60%이상의 세포 독성율을 관찰할 수 있었다. (P<0.001) 줄फल 줄기 5ug/ml와 20ug/ml를 H₂O₂ 200uM과 동시에 처리하였을 경우, 줄फल 줄기의 농도가 5ug/ml에서는 56.84±0.69%, 20ug/ml에서는 71.9±3.4%의 생존율을 각각 나타내어(P<0.001) H₂O₂ 200uM 처리군 대비 약 1.54배, 1.95배의 세포생존을 증가를 보였다(Fig. 2). 그 외에도 세포고사에 대한 줄फल 줄기의 억제효과를 알아보기 위해 DNA fragmentation 및 세포고사와 관련된 단백질 및 유전자 검사를 실시하였다.

H₂O₂ 200uM로 DNA fragmentation이 일어나면서 UV light 하에서 찍은 사진 필름 상에서 절편화된 사다리꼴의 형태가 나타났으나, 줄फल 줄기를 동시에 처리한 것에는 5ug/ml, 20ug/ml 모두 DNA 분절화가 일어나지 않음을 알 수 있다(Fig. 3). 그리고 여러 단백질 혼합물로부터 특정 단백질의 존재여부를 밝혀내는 western blot을 이용하여 세포고사시 활성화되는 효소 및 단백질을 분석하였다. 자극에 의해 미토콘드리아 막에서 세포질로 유출되는 Cytochrome C와 단백질 분해 효소인 caspase-9, caspase-3 그리고 세포고사 최종 단계인 PARP가 H₂O₂ 200uM에 의해 모두 활성화 되었으나 줄फल 줄기를 첨가 처리한 것에는 활성화가 일어나지 않았다. 그 외 세포고사와 관련된 p53, p21, Bax 유전자도 H₂O₂ 200uM 단독 처리시 활성화가 야기되었으며 억제작용기전에 속하는 Bcl-2는 억제되었다. 줄फल 줄기 첨가 처리한 경우는 반대의 현상을 보여 결과적으로 H₂O₂에 의한 세포고사가 줄फल 줄기에 의해 억제됨을 알 수 있었다.

일반적으로 세포 고사 기전은 caspase라 불리는 단백질 분해 효소에 의해 세포 내 단백질이 분해되면서 신호가 전달되는데, 자극에 의해 미토콘드리아 막에 존재하는 Cytochrom C가 세포질 밖으로 방출되어 Apaf-1, caspase-9, dATP와 결합하여 caspase-9를 활성화시키고 이렇게 활성화된 caspase-9는 caspase-3를 활성화시켜 세포고사를 유도한다²⁸⁾.

이 외에 p53이나 p21, Bax 그리고 Bcl-2와 같은 유전자가 세포고사와 연관성을 가지고 있는데, p53은 대표적인 종양억제 유전자로서 세포증식, 분화, 유전체의 안정성, 자기 살해능 등의 조절에 관여한다^{29,30)}.

p21은 p53에 의하여 그 발현이 촉진되는 대표적인 유전자로서 cyclin-dependent kinase를 억제하는 기능을 통해 p53의 세포증식 억제기능을 실질적으로 매개하는 중요한 인자이다. p21 유전자의 전사는 정상적인 p53에 의하여 크게 촉진되며 이러한 현상은 p21 유전자의 upstream 약 2.4 kb 부분에 위치하는 p53 binding element를 통하여 일어난다. p53에 의한 p21의 유도는 세포증식의 억제 또는 자기살해능의 유발로 이어지며 antisense p21 mRNA를 이용하여 p21의 발현을 억제시킬 경우 세포분열 주기가 다시 활성화됨이 발견되었다³¹⁻³⁴⁾. Bcl-2는 분자량 26kD으로 Fas Ag과 TNF receptor를 매개로 하는 자기살해능을 차단하며 자기살해능 과정의 중요 유전자인 Cpp32의 활성을 저지하고 Bcl-2를 과발현시키면 자기살해능을 억제하여 세포수명이 연장되는 것이 알려져 있다³⁵⁾. Bax는 Tumor suppressor로 p53 mediated 자기살해능을 자극하며 chemotherapy로 유발되는 자기살해능에서 증가한다³⁶⁻³⁸⁾. 또한, Bax는 Bcl-2와 유전자 염기서열이 비슷하여 Bcl-2 family에 속하는데, Bcl-2 family중 Bcl-2, Bcl-XL은 자기살해능을 억제하고 Bcl-Xs, Bax, Bak, Bad는 세포사를 증진시키는 것으로 알려져 있다³⁹⁾.

이상의 결과에서 줄फल 줄기 추출물이 H₂O₂에 의해 유발된 신경세포고사를 억제하여 세포 보호 기능이 있음을 알 수 있다. 이는 줄फल이 뿌리뿐만 아니라 줄기도 항산화제로서의 역할을 할 수 있다고 생각되며 향후 추가적인 실험 및 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

H₂O₂로 유발된 Neuro2A 신경세포 상해에 대한 줄फल 줄기 추출물의 보호효과를 알아보기 위해 실험한 결과 다음과 같다.

줄फल 줄기의 농도에 따른 Neuro2A 신경 세포 생존율은 40ug/ml 이하에서는 약 90% 이상이었으나 60ug/ml에서는 약 58%, 80ug/ml에서는 약 31%의 생존율을 보여 60ug/ml 이상의 농도에서 줄फल 줄기에 의한 Neuro2A 신경세포 상해작용이 있었다. H₂O₂ 200uM로 처리한 Neuro2A 신경세포의 생존율은 37.33±2.54%이지만, 줄फल 줄기의 농도가 5ug/ml에서는 56.84±0.69%, 20ug/ml에서는 71.9±3.4%의 생존율을 각각 나타내어(P<0.001) H₂O₂ 200uM 처리군 대비 약 1.54배, 1.95배의 유의성 있는 세포 생존율 증가를 보였다. 세포고사 시 발생하는 DNA fragmentation은 H₂O₂ 200uM을 처리했을 경우는 일어났으나 줄फल 줄기를 첨

가하여 처리한 경우는 5ug/ml, 20ug/ml 각각의 경우 모두 억제되었다. 세포고사 시 발현되는 PARP, Cytochrome C, caspase-9 및 caspase-3가 H₂O₂ 200uM을 처리한 경우 모두 활성화가 일어났으나 줄풀 줄기를 처리한 경우는 5ug/ml, 20ug/ml 각각의 경우 모두 활성화가 억제되었다. 세포고사 시 p53, p21, Bax는 활성화되며 Bcl-2는 활성이 억제되는데 H₂O₂ 200uM을 처리한 경우 p53, p21, Bax는 활성화되고 Bcl-2는 활성이 억제되었으나 줄풀 줄기를 처리한 경우는 5ug/ml, 20ug/ml 각각의 경우 모두 p53, p21, Bax는 활성화가 억제, Bcl-2는 활성화가 일어났다.

결론적으로 줄풀 줄기가 H₂O₂로 유도된 세포상해와 고사에 대해서 보호, 억제하는 효과가 있음을 알았고, 향후 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

1. 최진호. 노화의 메카니즘과 연구방향. 생화학뉴스. 한국생화학회 5(3):39-53, 1985.
2. 沈吉浩. 노화의 개념과 예방. 성문출판사. pp 15-17, 1987.
3. Cohen, G. The generation of hydroxyl radicals in biological system. Photobiol. 28, 669-675, 1978.
4. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In free radicals in biology and medicine. 2nd Ed. Oxford, Clarendon Press. pp 22-31, 1989.
5. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Protection against oxidants in biological systems : the superoxide theory of oxygen toxicity. In free radicals in biology and medicine. 2nd Ed. Oxford, Clarendon Press. pp 86-89, 1989.
6. Hertog, M.G.L., P.C.H. Hollman. Potential health effects of the dietary flavonoid quercetin. Eur J Clin Nutr 50(2):63-66, 1996.
7. Benavente-Garcisa, O., J. C. Marrin, F. R. Ortuno, A. Rio. Uses and properties of citrus flavonoids. J Agric Food Chem 45, 4505-4515, 1997.
8. 中藥大辭典. 서울, 醫聖堂. p 2052, 1994.
9. 동식, 김근하, 김영호, 최승문. 고려치료경험 내과편. 의학과 학술판사. p 71, 76, 114, 122, 132, 166, 345, 386, 1996.
10. 박원형. H₂O₂로 유발된 Neuro2A 신경세포고사에 대한 줄풀의 억제 효과. 상지대학교 석사학위논문. 2005.
11. 두호경 편저. 동의신계학. 서울, 동양의학연구원. pp 1327-1329, 1993.
12. 김숙희, 김화영. 老化, 서울, 민음사, pp 77-85, 94, 1991.
13. Cutler, R.G. Antioxidant, aging and longevity. Free Radicals in Biology(ed. Pryor, W.), Academic Press. 6, 371-424, 1984.
14. Feher, J., Cosmos, G., Vereckei, A. The free radical theory of aging Free Radicals Reactions in Medicine. Springer-Verlag. Berlin. pp 57-59, 1987.
15. 김영곤, 김영균. 프리라디칼. 서울, 여문각. pp 31-35, 98-101, 259-260, 278-286, 396-400, 425-426, 564-568, 1997.
16. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26(4):239-257, 1972.
17. Sarraf, C.E., Bowen, I.D. Proportions of mitotic and apoptotic cells in a range of untreated experimental tumours. Cell Tissue Kinet 21(1):45-49, 1988.
18. 흥원식 편. 精校黃帝內經. 서울, 東洋醫學研究院. pp 19-20, 11, 246, 301, 1981.
19. 南京中醫學院醫經教研組. 黃帝內經素問譯解. 上海, 上海科學技術出版社. pp 4-5, 1983.
20. 南京中醫學院醫經教研組. 黃帝內經素問譯解. 上海, 上海科學技術出版社. p 337, 1986.
21. 동식, 김근하, 김영호, 최승문. 고려치료경험 내과편. 의학과 학술판사. p 71, 76, 114, 122, 132, 166, 345, 386, 1996.
22. 최진규. 약이 되는 우리풀·꽃·나무2. 서울, 한문화. pp 141-147, 2003.
23. 고정식. 가을에 꽃 피는 야생식물. 서울, 일진사. p 56, 2004.
24. 李時珍. 本草綱目. 北京, 人民衛生出版社. p 1366, 1982.
25. 李樾. 編注 醫學入門. 서울, 醫聖堂. p 331, 1994.
26. 寇宗奭. 本草衍義. 서울, 醫聖堂. p 74, 1994.
27. Su-Noh Ryu, Sun-Zik Park, Hong-Yeol Kim. Antioxidant Activity in Rice Cultivar, Wild Rice, and Barley. Korean J Crop Sci 47(1):54-61, 2002.
28. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 91(4):479-489, 1997.
29. Levine, A.J. The p53 tumor suppressor gene and product. Cancer Surveys. 12, 59-79, 1992.
30. Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., Reed, J.C. Identification of a p53-dependent negative response element in the Bcl-2 gene. Cancer Res 54, 3131-3135, 1994.
31. El-deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Brrrell, M., Hill, D.E., Wang, Y, Wiman, K.G., Mercer, W.E., Kastan, M.B., Kohn, K.W., Elledge, S.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. Waf1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res 54, 1169-1174, 1994.
32. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 75, 805-816, 1993.
33. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler,

- K.W., Vogelstein, B. Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825, 1993.
34. Nakanishi, M., Adami, G.R., Robetorye, R.S., Noda, A., Venable, S.F., Dimitrov, D., Pereira-Smith, O.M., Smith, J.R. Exit from G0 and entry into the cell cycle of cells expressing p21Sdi1 antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 4352-4356, 1995.
35. Itoh, N, Tsujimoto, Y., Nagata, S. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *the journal of immunology* 151(2):621-627, 1993.
36. Schlesinger, P.H., Gross, A., Yin, A.M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., Korsmeyer, S.J. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(21):11357-11362, 1997.
37. Tu, Y., Feng-hao Xu, Jin Liu, Versco, R., Berenson, J., Fady, C., Lichtanstein, A. Upregulated Expression of Bcl-2 in multiple myeloma cells induced by exposure to Doxorubicin, Etoposide, and Hydrogen peroxide. *Blood* 88(5):1805-1812, 1996.
38. Lisovsky, M., Estrov, Z., Zhang, X., Consoli, U., Sanchez-Williams, G., Snell, V., Munker, R., Goodacre, A., Savchenko, V., Andreeff, M. Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells : Regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood* 88(10):3987-3997, 1996.
39. Findly, H/W., Gu, L., Yeager, A.M., Zho, M. Expressio and regulation of Bcl-2, Bcl-xL, Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 89(8):2986-2993, 1997.