

## PC12 Cell에 대한 菟絲子の 안전성 및 항산화작용에 대한 연구

동국대학교 한의과대학 한방부인과학교실

도용호, 김동일

### ABSTRACT

Safety and Antioxydative effects of *Cuscuta chinensis* Lam. in PC12 Cell

Yong-Ho Do, Dong-Il Kim

Dept. of Ob&Gy, College of Oriental Medicine, Dongguk University

**Purpose** : *Cuscuta chinensis* Lam. is utilized extensively as important medicines for threatened abortion habitual abortion. However, objective data related to an embryo is not existed until now. Therefore, this study is focused to find out stability of *Cuscuta chinensis* Lam. about an embryo during pregnancy based on data related to stability of nerve cell and antioxydative effect by using neural cell line, PC 12 cell.

**Methods** : Experimentation concerns cytotoxic effects and antioxydative effect through methods such as MTT ssay, western botting after abstracting an undiluted solution from domestic *Cuscuta chinensis* Lam.

**Results** : 1. As a result of experimentation on MTT assay according to each magnification from *Cuscuta chinensis* Lam. extraction solution with different abstraction methods, cytotoxic effect is not observed to all extract except an undiluted solution which is abstracted from MeOH stiring. Also, an undiluted solution in stiring with MeOH could not confirm whether come from *Cuscuta chinensis* Lam. or not.  
2. As a result of revelation of Bax and GSK-3 $\beta$  which is responsive to the first stage from general stress in order to observe antioxydative effects of *Cuscuta chinensis* Lam. revelation of Bax by *Cuscuta chinensis* Lam. appeared to decrease.

**Conclusion** : Cytotoxic effects with *Cuscuta chinensis* Lam. about PC12 cell is not discovered and it assume that it would be anti apoptotic effect by ROS as Bax and GSK-3 $\beta$  inviable effect. In the future, this study could be used as basic data for additional research on *Cuscuta chinensis* Lam. and effect and stability of complicated prescriptions for keeping pregnancy.

**Key words** : *Cuscuta chinensis* Lam. PC12 Cell. antioxydative effects, safety

## I. 緒 論

최근 洋藥에 비해 상대적으로 안전하고 부작용이 없을 것이라는 韓藥의 안전성에 대한 국민적 믿음이 의외로 내외의 환경 변화에 따라 다양한 방식으로 재검토되기 시작하였다. 韓藥의 안전성에 대한 시각들은 객관적이며 합리적인 것에서부터 편향된 시각에 이르기까지 다양하게 표출되고 있다. 韓藥의 독성과 안전성 그리고 효능에 대한 객관적 검증은 한의학의 대중화와 세계화 추세 속에서 필연적으로 거쳐야하는 과정으로 인식된다. 특히 생식내분비 계통에 영향을 미치는 韓藥의 경우에는 여성의 가임력 보존과 胎兒의 안전성까지 고려한 엄격한 기준이 필요하다.

菟絲子(*Cuscuta chinensis* Lamark)는 神農本草經 上品에 처음으로 記載된 후로 많은 本草書에서 補腎益精, 養肝明目, 益脾止瀉, 安胎, 調經 등에 應用되는 重要한 약재의 하나이다.<sup>1)</sup> 한방부인과 영역에서는 張<sup>7)</sup>이 著述한 《醫學衷中參書錄》에서 胎動·胎漏를 치료하는 처방으로 菟絲子가 포함된 壽胎丸이 사용된 이후로 菟絲子는 墮胎유산과 습관성 유산의 치료에 중요한 약물로 광범위하게 활용되고 있다. 근래에는 월경불규칙과 배란장애 및 불임증에도 널리 활용되고 있다.

菟絲子에 대한 약리학적 연구로, 한 등<sup>2)</sup>은 고혈압에 미치는 영향에 대해 연구했으며, 이 등<sup>3)</sup>은 항암작용 및 면역효과에 대해 연구하였으며, 김 등<sup>4)</sup>은 菟絲子の 항산화효과에 대해 연구하였다. 또한, 王 등<sup>5)</sup>은 菟絲子에 난소의 황체형성을 촉진하는 작용이 있음을 설명하고 있

으며, 周<sup>6)</sup>는 질 상피세포의 각화를 촉진하고 자궁 중량을 증가시키는 효능이 있다고 하였다. 최근 정<sup>20)</sup> 등은 菟絲子가 포함된 한약물의 신경세포 보호효과에 대한 연구를 하여 고혈압 및 뇌혈관 질환에 효과가 있음을 보고하였으나, 菟絲子 자체의 신경세포 독성에 관한 선행 연구는 없는 실정이다.

태아의 발생과정 초기에 나타날 수 있는 일련의 비정상적 진행과정들은 신경세포의 분화 및 증식과정과 관련되어 있으며, 이에 관여하는 다양한 인자에 대한 연구들이 현재 활발히 이루어지고 있다. 그러나 이들 인자들에 대한 연구가 현실적으로 쉽지만은 않다. 왜냐하면, 첫째로 많은 문헌적 고찰이 필요하며, 둘째로 韓藥은 다른 화학물처럼 단순한 구조 또는 단일 성분이 아니기에 독성연구에 많은 어려움이 따르기 때문이다.

韓藥에 대한 연구는 일반적으로 유효성과 안전성에 대한 연구로 구분하여 나눌 수 있다. 韓藥은 이미 임상적으로 사용되고 있으므로 안전성 및 유효성에 대한 임상적 기반은 상당한 수준으로 구축되었다고 볼 수 있다. 그러나 안전성 및 유효성에 대한 과학적인 연구가 없어 사회가 요구하는 더 높은 수준의 안전성 기준에 따르기에는 어려운 문제가 생기기도 한다.

이에 저자들은 이러한 일련의 안전성과 효능 검증을 위한 연구 과정에서 일차적으로 菟絲子 추출물이 신경세포 발생단계 과정에서 나타날 수 있는 안전성 유무 및 산화적 스트레스에 대한 보호효과를 확인하고자 하였다. 菟絲子 추출물이 신경세포의 안전성(증식과 분화)에 미치는 영향과 항산화효과를 관찰하기

위하여 신경세포 안전성 연구에 많이 사용되고 있는 PC12 cell 세포주를 이용하여 안전성 및 항산화효과에 대한 결과를 얻었기에 이 논문을 통해 보고하는 바이다.

## II. 實驗方法

### 1. 재료 및 추출물의 제조

국내에서 채취한 자연산 菟絲子를 전문 약재상을 통해 구입한 다음 세정하여 실험에 사용하였다. 菟絲子 50g을 3차 증류수와 MeOH에 넣고 증탕하였다. 물 증탕은 임상적 전탕 시간에 근사한 2시간 동안 증탕하였다. MeOH 증탕은 1시간 30분 동안 증탕하였다. 각 추출물로부터 雜質를 제거하기 위해 advantec toyo filter paper #2 (Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 사용하여 여과하였다. 미세한 입자의 pellet을 제거하기 위하여 5000rpm으로 30분씩 2번 centrifuge(한일과학산업, Korea) 하였다. 그런 다음 추출액을 동결건조(동결건조기: ilshin Lab, Korea)시켰다. 동결건조 후 세포처리에 적합한 pH를 맞추기 위하여 고형분에 10x PBS (phosphate-buffered salines)와 cell and tissue culture grade water (Welgene, Korea)에 녹여 pH 7.0에 맞추었다. 얻어진 물 증탕 추출물의 total volume은 11 ml이며, MeOH 증탕 추출물의 total volume 역시 11ml였다.

최종적으로 clean bench에서 구멍 0.2  $\mu$ m인 syringe filter (Nalgene, USA)로 여과하였다. 그런 다음 원액과 희석액(10배 dillution, 20배 dillution, 40배

dillution, 80배 dillution)의 sample을 -20°C에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 세포주

한국세포주은행에서 분양받은 Pheochromocytoma12 cell (PC12 cell)을 RPMI Medium에  $5 \times 10^6$ 개가 되도록 100 mm 배양접시에 分株하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에 계속 계대 배양하였다.

#### 2) MTT assay

MTT(tetrazolium-3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)2,5diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma)는 세포내로 흡수된 후, 미토콘드리아의 Succinate dehydrogenase에 의해 formazan을 형성하는데 이 물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하므로 세포의 생존율을 측정하는 방법으로 이용하였다.

세포를 채취하여 96well plate에  $2.5 \times 10^4$  cell/ 200  $\mu$ l의 세포를 分株하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 버리고, 菟絲子를 농도별로 처리한 배지를 넣어주고 다시 24시간 배양하였다. 다음날 각 well의 배지를 버리고 새로운 배지 200  $\mu$ l와 MTT(2mg/ml) 50  $\mu$ l를 넣어준 후 2시간 이상 반응시켰다. 2시간 이상 경과한 후에 각 well의 배지를 제거한 후 DMSO를 150  $\mu$ l 첨가하여 microplate mixer상에서 5분간 잘 혼합하여 보라색의 침전물을 용해시킨 후 ELISA plate reader (Molecular device, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 3) Western blotting

## (1) 단백질 준비

菟絲子 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 Scraper로 세포를 모으고 모은 세포를 담겨있던 배지와 함께 1000rpm에서 원심분리하여 상층액을 버린 뒤 2ml의 cold PBS로 두 번 세척하였다. 여기서 1% Triton X-100, 50mM Tris-HCl(pH8.0) 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, protease inhibitor cocktail로 구성된 lysis buffer를 200 $\mu$ l를 가해 10분정도 vortexing하고 10분정도 용해시킨 후 4 $^{\circ}$ C, 15000rpm에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리한 후 상층액만 취해서 단백질양은 Protein assay kit(Bio-rad)를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였다.

## (2) 전기영동 및 Transfer

정량이 된 단백질에 lysis buffer와 sample buffer(60mM tris: pH6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue)를 섞어 단백질 양을 같게 한 후 100 $^{\circ}$ C heat block에서 5분 동안 끓인 후, spin-down하여 시료를 모았다. 30% polyacrylamide mix와 3차 증류수, 1.5M tris(pH8.8), 10% SDS, 당일 제조된 10% ammonium persulfate, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(이하 TEMED)를 혼합하여 separating gel(12%~15%)을 만든 다음, 깨끗이 세척하여 조립된 전기영동 유리판에 용액을 부어 gel을 굳혔다. Stacking gel은 30% polyacrylamide mix와 3차 증류수, 1M tris(pH6.8), 10% SDS, 당일 제조된 10% ammonium persulfate, TEMED를 혼합하여 separating gel 위에 부어 완전한 gel을 형성하였다. 전기영동 running buffer는 tris base 30g, glycine 144g,

SDS 10g을 1 $\ell$ 에 녹여 10x stock을 만들었다. 정량한 단백질을 10~20 $\mu$ l를 loading하고 100V로 약 1시간 running하였다. 전기 영동된 gel은 nitrocellulose membrane에 100V 1시간동안 transfer되었다. Transfer buffer의 조성은 1 $\ell$ 에 tris-base 3.03g glycine 14.63g, methanol 200ml으로 만들어서 4 $^{\circ}$ C 보관 후 사용하였다. Transfer된 membrane은 200mM tris-base, 1.54M NaCl, 3차 증류수, tween 20으로 조성된 TTBS(pH7.5)용액으로 세척 후 5% skim milk에 담아 4 $^{\circ}$ C에 overnight하였다.

## (3) Western blotting 및 ECL detection

다음날 blocking 용액 제거 후, 1차 항체(anti Bax 1:500, GSK-3 $\beta$  1:200, Santacruz Co)를 5% skim milk로 1000배 희석하여 만든 용액에 membrane을 넣어 1시간 반응시킨 후, TTBS용액으로 10분간 3회 세척하였으며, 2차 항체를 5% skim milk로 1000배 희석하여 만든 용액에 membrane을 넣어 1시간 동안 반응을 유도시켰다. 용액을 제거한 후, TTBS로 10분씩 3번 세척하였다. ECL kit(Amersham,USA) 용액 A와 B를 40:1로 잘 섞어 membrane에 적시고 1분간 반응시킨 후 cassette에 membrane을 올려놓고 X-ray film으로 감광시켰다. 일정 시간 감광시킨 다음 develop하여 band 확인한 후 fixer에 담고 고정시켰다. 고정이 끝난 후, 흐르는 물로 깨끗이 씻어 건조 후 scanning하여 densitometer (Bio-rad)로 각 밴드의 광학밀도를 측정하였다.

### Ⅲ. 結果

#### 1. 菟絲子の 세포독성 실험(MTT assay)

菟絲子の 세포 독성을 확인하기 위하여 추출방법을 달리한 추출액으로 각각의 배율로 MTT assay를 실시한 결과

Fig1부터 Fig5까지 보여지 듯 MeOH로 stiring으로 추출한 원액(X0)을 제외한 모든 추출물에서 세포독성을 관찰할 수 없었다. MeOH로 stiring한 원액에서 나타나는 미미한 세포독성은 잔존될 수 있는 MeOH에 의한 것으로 추측되며, 菟絲子 유래인지 확인할 수 없었다.

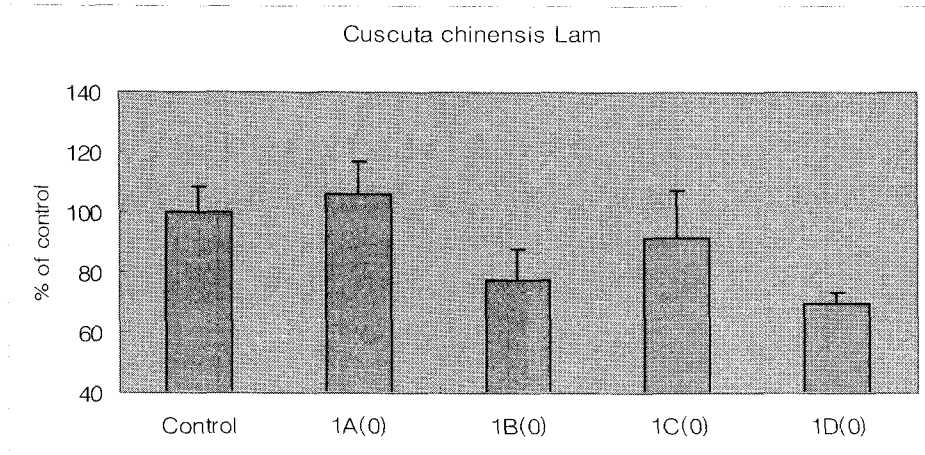


Fig 1. Compare of cytotoxicity in PC12 cell treated each extract from several methods of *Cuscuta chinensis* Lam. Control, 1A(0) Non diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of water double boiler, 1B(0) Non diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of Stiring, 1C(0) Non diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of MeOH double boiler, 1D(0) Non diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of MeOH Stiring.

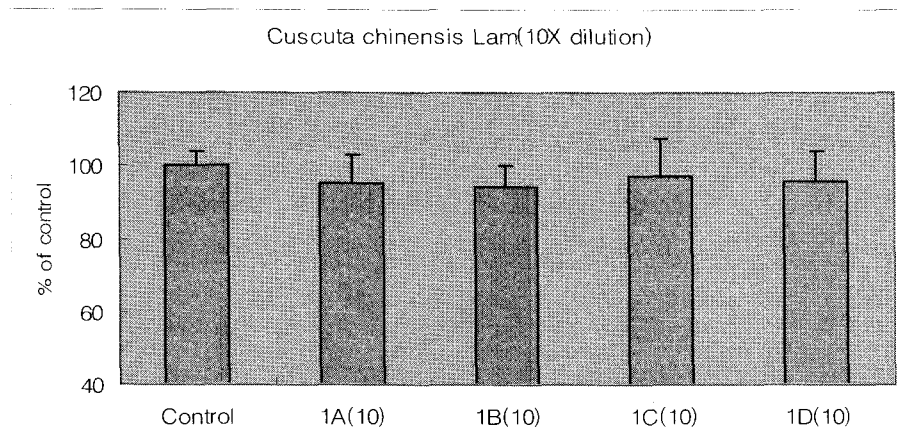


Fig 2. Compare of cytotoxicity in PC12 cell treated each extract from several methods of *Cuscuta chinensis* Lam. Control, 1A(10) 10X diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of water double boiler, 1B(10) 10X diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of Stiring, 1C(10) 10X diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of MeOH double boiler, 1D(10) 10X diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of MeOH Stiring.

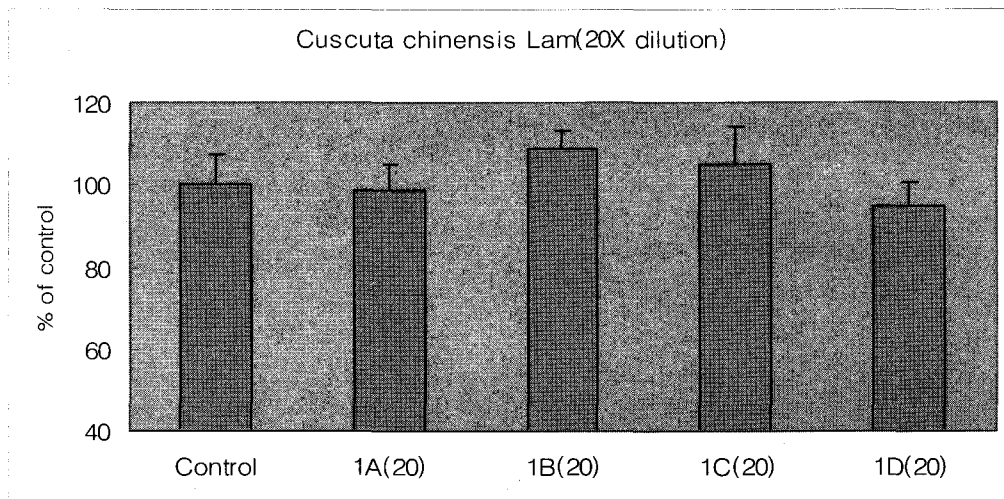


Fig 3. Compare of cytotoxicity in PC12 cell treated each extract from several methods of *Cuscuta chinensis* Lam. Control, 1A(20) 20X diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of water double boiler, 1B(20) 20X diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of Stiring, 1C(20) 20X diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of MeOH double boiler, 1D(20) 20X diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of MeOH Stiring.

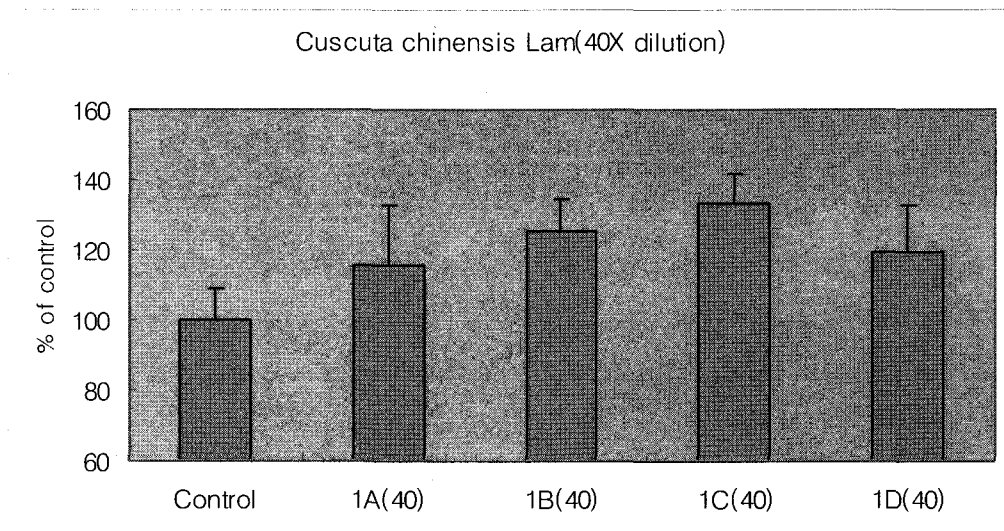


Fig 4. Compare of cytotoxicity in PC12 cell treated each extract from several methods of *Cuscuta chinensis* Lam. Control, 1A(40) 40X diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of water double boiler, 1B(40) 40X diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of Stiring, 1C(40) 40X diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of MeOH double boiler, 1D(40) 40X diluted *Cuscuta chinensis* Lam extract of MeOH Stiring.

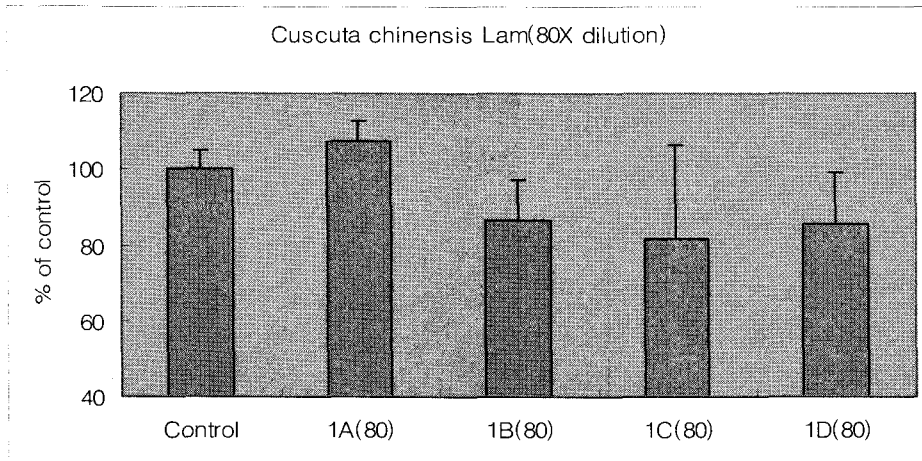


Fig 5. Compare of cytotoxicity in PC12 cell treated each extract from several methods of Cuscuta chinensis Lam. Control, 1A(80) 80X diluted Cuscuta chinensis Lam extract of water double boiler, 1B(80) 80X diluted Cuscuta chinensis Lam extract of Stiring, 1C(80) 80X diluted Cuscuta chinensis Lam extract of MeOH double boiler, 1D(80) 80X diluted Cuscuta chinensis Lam extract of MeOH Stiring.

2. 菟絲子の 항산화효과(Western blotting)

菟絲子の 항산화효과를 관찰하기 위하여 일반적 stress에서 초기 반응을 일으

키는 菟絲子を 2시간 및 6시간 전에 처리한 후 Bax의 발현량을 관찰한 결과 菟絲子에 의한 Bax의 발현량이 감소하는 결과를 나타내고 있었다.

BAX(2h)

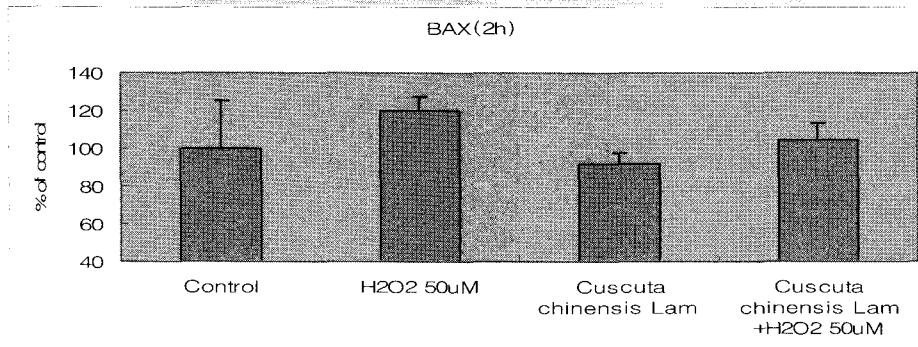


Fig.6. Expression of Bax after 2hr in Cuscuta chinensis Lam treated PC12 cell

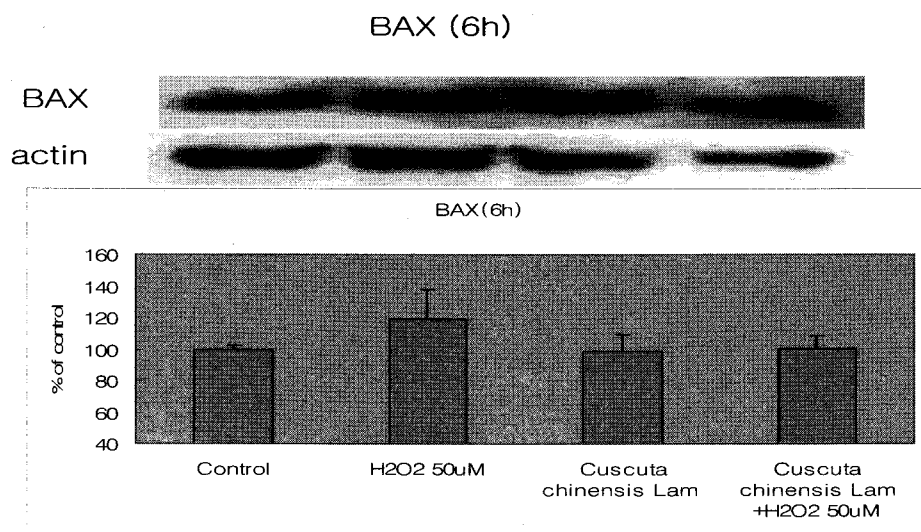


Fig.7. Expression of Bax after 6hr in Cuscuta chinensis Lam treated PC12 cell

Bax의 발현양상을 확인한 후 Bax의 인산화에 관련이 있는 인자 중 하나인 Glycogen Synthase Kinase-3β(GSK-3β)의 발현을 확인하기 위하여 菟絲子를 2시간 및 6시간 전에 처치한 후 GSK-3β

의 발현을 확인 한 결과 2시간, 6시간 모든群에서 GSK-3β의 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 특히 菟絲子 단독 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 동시에 처치한 群에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처치군 보다 줄어든 GSK-3β를 확인할 수 있었다.

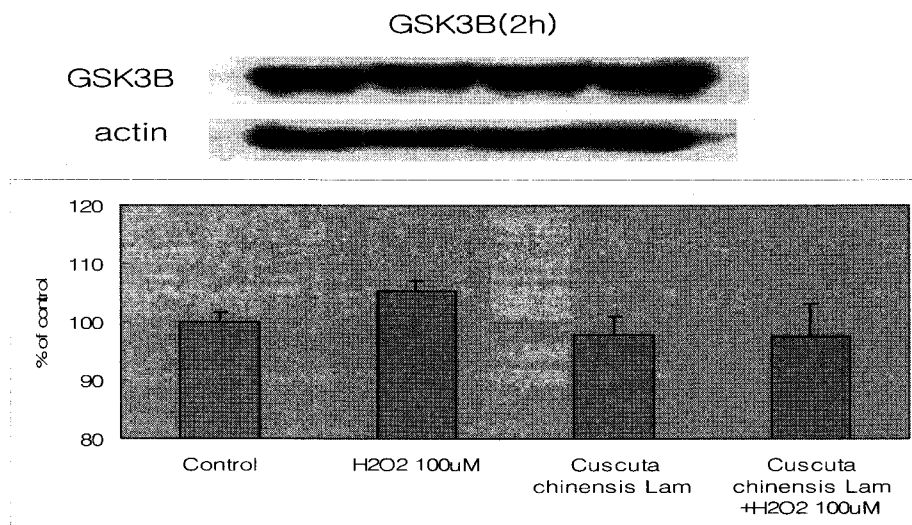


Fig.8. Expression of GSK 3B after 2hr in Cuscuta chinensis Lam treated PC12 cell



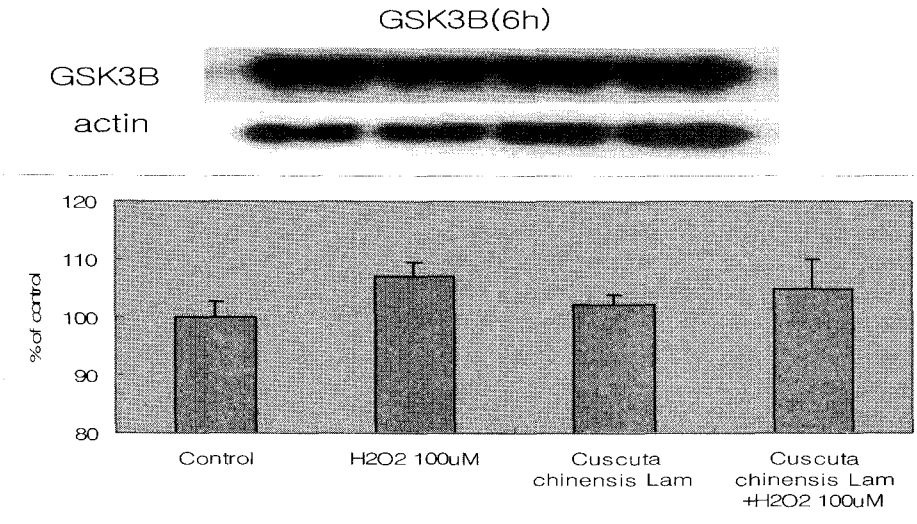


Fig.9. Expression of GSK 3B after 6hr in Cuscuta chinensis Lam treated PC12 cell

#### IV. 考 察

菟絲子是 杜冲 續斷 桑寄生 山茱萸 熟地黃 등과 함께 널리 활용되는 대표적인 補腎安胎 약물이다. 菟絲子の 安胎 작용은 매우 효과적이어서 腎虛證에 의한 胎動胎漏에 활용함은 물론 實熱證에 의한 胎動胎漏를 제외한 모든 변증유형의 胎動胎漏에 변증에 따른 처방에 가미하여 활용하게 된다.

菟絲子が 포함된 처방으로는 張<sup>7)</sup>의 壽胎丸을 위시하여 壽胎丸加味<sup>8)</sup>(川續斷 桑寄生 阿膠 黨蔘 白朮 山藥), 傅<sup>9)</sup>의 保產無憂散(當歸 荊芥穗 川芎 艾葉 枳殼 黃芪 菟絲子 厚朴 羌活 貝母 白芍藥 甘草 生薑) 등이 있다.

菟絲子 성분에 대한 Umehara K. 등<sup>9)</sup> 연구에 따르면 갯실새삼(菟絲子: Cuscuta Chinensis Lam)은 carbohydrate, amylase, vitamine을 함유하고 meletin, astragalin, hyperoside,

meletin-3-O-β-galactose-7-O-β-glucoside 등 4종의 flavone류 화합물로 구성되어 있으며, 실새삼(C. australis R.Brown)은 glycoside, vitamin A 등을 함유하고 있다.

세포수준에서 약물의 안전성과 관련하여 실시하는 가장 기초적인 연구방법으로는 세포생존율 측정방법을 통해 독성 여부를 확인하는 것이 있다. 이를 통해 독성의 존재 여부가 확인된 후에는 이들의 apoptosis 기전을 확인하는 방법으로 안전성의 여부를 확인한다. 또한 유효성과 관련하여 실시하는 연구방법으로는 임상적 약물들이 가지는 일차적인 효과 이외에 일반적으로 apoptosis의 기전을 차단 또는 억제인자로서 작용을 하는가 하는 부분을 포함하고 있으며, 이러한 apoptosis 억제 또는 보호효과 역시 유효성을 확인하는 부분으로 분류되고 있다.<sup>10,16-18)</sup>

신경세포는 일반적으로 초기배아에서

분화하며, 증식단계를 거치는데 이 때 독성물질 등에 의해 정상적인 신경세포 분화 및 증식에 장애를 초래하며 그 결과 여러 가지 중추신경계 결손 및 장애를 유발한다고 알려져 있다.<sup>11,12)</sup>

일반적으로 배아 혹은 태아에 대한 약물 안전성 연구의 기초적 자료는 살아있는 배아 및 태아세포를 이용한 일차세포 배양법(Primary cell culture)과 세포주를 이용한 실험법에 의해 얻어진 것을 활용하고 있다. 또한 대뇌신경배양법(Cortical cell culture), 중뇌세포배양법(Midbrain cell culture) 및 별아교세포배양법(Astrocyte culture), 미세아교세포배양법(Microglia cell culture)과 같은 특정 세포 배양법 등을 필요에 따라 사용되는 일차세포배양법과 배아전체를 배양하는 전배아배양법(Whole embryo culture) 등을 통하여 실시되는 경우가 있다. 그러한 이러한 실험들은 대부분 동물을 사용해야 하는 문제점을 가진다. 이를 해결하기 위하여 개발된 대체시험법이 바로 세포주를 이용한 것이다. 이러한 세포주를 이용한 실험에 사용되는 대표적인 신경세포주로는 PC12 cell과 Neuroblastoma cell등이 많이 사용되고 있다.<sup>12,13)</sup>

한편, 독성으로 인한 세포의 사멸은 괴사, 염증 및 apoptosis 중 한 경로를 통하여 이루어진다. 괴사는 빠른 시간내에 발생하는 집단적 apoptosis를 말하며, 이러한 집단적 apoptosis의 특징은 세포막이 먼저 파괴되는 형태를 띤다. 하지만 세포사멸로 불리는 apoptosis는 세포 내부의 여러 경로를 통하여 핵의 응축 및 붕괴가 유발되는 형태를 띤다. 세포독성을 유발하는 여러 원인 중 독성이

약한 물질에 의한 세포 사멸은 주로 apoptosis를 통하여 발생한다. Apoptosis가 진행되면 caspase-3를 활성화시키는 미토콘드리아와 관련한 intrinsic pathway, extrinsic pathway 그리고 caspase-independent AIF(Apoptosis Inducing Factor) pathway의 경로로 cell death가 진행된다.<sup>13)</sup> 먼저 intrinsic pathway는 미토콘드리아에서 세포질로 cytochrome C가 방출되어 Afaf-1과 복합체를 이루어 caspase-9을 활성화시키고, 활성화된 caspase-9는 caspase-3를 활성화시켜 apoptosis를 유발한다.<sup>14,15)</sup> Extrinsic pathway는 Fas 또는 TNF(Tumor necrosis factor) membrane receptor system에 의해 활성화된 caspase-8이 caspase-3를 활성화시켜 apoptosis가 일어나는 것이다.<sup>15-17)</sup> AIF는 미토콘드리아에서 방출되며 apoptogenic effect를 보이고<sup>15)</sup> 이는 caspase-independent 양상으로 염색질축축(chro-matin condensation)과 핵응축(nuclear shrinkage)을 유발하여 apoptosis를 일으킨다.<sup>18)</sup> 이 중 apoptosis의 intrinsic pathway 중 Bax가 미토콘드리아의 자극을 유도하기 때문에 Bax는 일반적으로 apoptosis의 발생에서 초기에 발현되는 물질로 알려져 있다. 이러한 Bax의 인산화에 관여하는 물질 중 Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ 가 존재하는데, GSK-3 $\beta$ 는 serine/threonine protein kinase로서 포유류에서 GSK-3 $\alpha$ 와 GSK-3 $\beta$ , 이 두 가지 isoform을 가지고 있다. 이 GSK는  $\beta$ -catenin, CREB, p53, c-Myc, c-Jun, heat shock factor-1, cyclin D1, Bax, axin 등의 인산화에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한

GSK-3 $\beta$ 의 발현증가는 일반적으로 apoptosis 과정에서 관찰할 수 있으며, 이들의 증가는 apoptosis를 증가시키는 결과로 알려져 있다. 또한 GSK-3 $\beta$ 는 insulin, Wnt, 그리고 Hedghog signal pathways 등 몇몇 신호전달과 관련이 있다는 보고가 있으며, 이 중 발생단계와 관련된 Wnt signaling에서 GSK-3 $\beta$ 는  $\beta$ -catenin과 관련이 있다고 알려져 있다.<sup>19-24)</sup>

韓藥에 대한 apoptosis 관련 연구는 주로 이의 유발과 관련된 연구가 주류를 이루었다. 본 실험과 유사한 연구로서, Chingwaysan을 사용하여 사람 구강암세포주인 OC2와 TSCCa에 대한 apoptosis에 대한 연구를 통하여 MTT assay 및 western blot을 통하여 확인한 연구가 있다. 이에 따르면 OC2와 TSCCa 세포에서 apoptosis를 유발하여 세포생존율이 감소하였으며, Bax의 축적이 용량 의존적으로 증가하는 것으로 관찰되었다고 보고하였다.<sup>25,26)</sup> 그러나 본 연구에서는 이러한 방법을 통해 안전성을 규명하고자 하였다. 그 결과 菟絲子는 PC12 cell을 이용한 MTT assay에서 세포생존율에 대한 변화는 관찰되지 않았으며, Bax의 발현이 감소하는 것이 관찰되었다. 또한 GSK-3 $\beta$ 의 발현이 감소됨으로써 菟絲子가 스트레스 상황에서 나타날 수 있는 apoptosis를 차단하는 항산화효과를 가지는 물질일 가능성이 있음을 나타내었다.

백혈병 및 고형종양의 치료에 사용되는 항암제인 adriamycin을 투여하여 세포독성을 유발시킨 심장근육세포(H9C2 cell)의 生地黃의 보호효과에 대한 연구에서 adriamycin의 세포독성 기전은 세

포내에서 ROS의 생성으로 발생하기 때문에 이 ROS에 의한 세포독성은 미토콘드리아를 통하여 apoptosis를 유발하며, 결국 effector caspase 인 caspase-3의 활성화에 의하여 apoptosis가 발생된다. 이러한 기전에 生地黃은 초기 apoptosis에 관여하는 Bax의 증가를 차단시키는 작용을 하며 그 작용은 bcl-2에 의한 것이라고 보고하였다.<sup>27)</sup> 또한 Yang 등<sup>28)</sup>은 국소부위 뇌경색을 유발한 쥐에서 Angelica를 사용하여 뇌경색의 진행정도를 관찰한 연구에서 Angelica가 뇌경색 부위를 감소시켰으며, 신경세포의 apoptosis를 현저하게 감소시킴을 확인할 수 있었는데, 그 원인은 Bax의 감소에 따른 것이라고 보고하였다.

본 연구에서도 菟絲子를 먼저 처치한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 PC12 cell에서 Bax 및 GSK-3 $\beta$ 의 발현이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독으로 처치했을 때보다 감소하는 결과를 나타냄으로써 같은 결과를 나타내고 있었다. 이상과 같은 결과에서 菟絲子에 의한 Bax 및 GSK-3 $\beta$  억제효과는 ROS에 의한 항산화효과를 나타냄으로써 동일하게 신경세포의 apoptosis를 현저하게 감소시킴을 확인할 수 있었다. 이상과 같은 결과에서 菟絲子에 의한 Bax 항산화물질로서 계속 연구될 수 있을 것으로 사료된다.

이상과 같은 연구 결과를 통해 전통적으로 壽胎丸 등에 포함되어 安胎의 목적으로 사용해온 菟絲子는 MTT assay에서 세포에 대한 독성이 없으며, 이에 의한 Bax 및 GSK-3 $\beta$  억제효과를 가짐으로써 ROS에 의한 apoptosis에 대한 항산화효과를 가져 발생과정의 신경세포와 관련 조직 손상에 대한 방어효과를 기대

할 수 있을 것으로 추측된다. 이러한 결과는 향후 菟絲子 및 이를 포함한 복합 처방들의 효능과 안전성에 관한 추가적 연구를 위한 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 結 論

임신유지를 위해 활용하는 菟絲子の 독성 및 안전성에 대해 실험적으로 규명하고자 菟絲子 추출물을 이용하여 PC12 cell에 대한 세포독성 및 항산화 효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

추출방법을 달리한 菟絲子 추출액으로 각각의 배율로 MTT assay를 실시한 결과 MeOH로 stirring으로 추출한 원액(X0)을 제외한 모든 추출물에서 세포독성을 관찰할 수 없었으며, MeOH로 stirring한 원액에서 역시 세포독성이 菟絲子 유래인지 확인할 수 없었다.

菟絲子の 항산화효과를 관찰하기 위하여 일반적 stress에서 초기 반응을 일으키는 Bax 및 GSK-3 $\beta$ 의 발현을 확인한 결과 菟絲子에 의한 Bax 및 GSK-3 $\beta$ 의 발현량이 감소하는 결과가 나타났다.

이상을 종합하여 보면 PC12 cell에 대한 菟絲子の 독성효과는 없으며, Bax 및 GSK-3 $\beta$  차단효과로 ROS에 의한 apoptosis 방어 효과를 가질 것으로 사료된다. 이번 실험은 향후 임신유지를 위한 菟絲子 및 菟絲子를 포함한 복합 처방들의 효능과 안전성에 대한 추가적 연구를 위한 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

□ 투 고 일 : 2006년 07월 26일

□ 심 사 일 : 2006년 08월 01일

□ 심사완료일 : 2006년 08월 09일

## 參 考 文 獻

1. 윤성중, 이상인. 菟絲子에 관한 문헌적 고찰. 대한본초학회지 1991;6(1): 59-65.
2. 한정우 외. 菟絲子 약침이 자연발증 고혈압 백서의 혈장 Renin 활성도, 혈장 Aldosterone 및 Atrial Natriuretic peptide 농도에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1998;15:2.
3. 이재복, 이병령. 菟絲子 약침의 항암 작용 및 면역효과에 대한 실험적 연구. 대한침구학회지 2001;18(3):94-104.
4. 김봉수, 박용기, 강병수. 菟絲子類의 항산화작용에 대한 연구. 대한본초학회지 1997;Vol12(1):67-83.
- 5.王永炎, 王耀廷. 今日中醫婦科. 北京: 人民衛生出版社 2000:269.
6. 周金鳳. 壽胎丸加味治療先兆流產的臨床觀察及實驗研究. 中西醫結合雜誌. 1987;7:407.
7. 張錫純. 醫學衷中參西錄(上冊). 石家莊市. 河北科學技術出版社. 1985:353-355.
8. 傅靑主. 傅靑主女科. 서울: 대성문화사 1984:173.
9. Umehara K et al. Isolation of a new 15-membered macrocyclic glycolipid lactone, Cuscutic Resinoside a from the seeds of *Cuscuta chinensis*: a stimulator of breast cancer cell proliferation. *Planta Med.* 2004 Apr;70(4):299-304.

10. Nakahara K et al. Antimutagenicity of some edible Thai plants, and a bioactive carbazole alkaloid, mahanine, isolated from *Micromelum minutum*. *J Agric Food Chem.* 2002 Aug 14;50(17):4796-4802.
11. Vekrelis K et al. Bax promotes neuronal cell death and is down regulated during the development of the nervous system. *Development* 1997;(124):1239-1249.
12. Deckwerth, T. L. et al. (1996). Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 17,401-411.
13. Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Cancer Biol.* 4,327-332.
14. Saleh, A. et al. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 1999;274:17941-17945.
15. Graham, S. H., and J. Chen. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:99-109.
16. Wallach, D. et al. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999;17:331-367.
17. Rao, R. V. et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *J Biol Chem* 2001;276:33869-33874.
18. Daugas E. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. 2000 Jul 7;476(3):118-23.
19. Ali A et al Glycogen synthase kinase-3: Properties, functions, and regulation. *Chem. Rev.* 2001;101:2527-2540.
20. Bhatt RV et al. Glycogen synthase kinase 3: A drug target for CNS therapies. *J. Neurochem* 2004;89:1313-1317.
21. Cho JH et al. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  phosphorylates tau at both primed and unprimed sites: Differential impact on microtubule binding. *J. Biol Chem.* 2003;278:187-193.
22. Doble BW and Woodgett JR : GSK-3 $\beta$ : Tricks of the trade of a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 2003;116:1175-1186.
23. Godemann R et al Phosphorylation of tau protein by recombinant GSK-3 $\beta$ : Pronounced phosphorylation at select Ser/Thr-Pro motifs but no phosphorylation at Ser262 in the repeat domain. *FEBS Lett.* 1999;454(1,2):157-164.
24. Linseman DA et al Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J. Neurosci* 2004;24(44):9993-10002.
25. Chor S.Y. et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of herbal

- medicine on hepatic stellate cell. J Ethnopharmacol 2005;100,180-186.
26. Liao PH et al. Induction of apoptosis in human oral cancer cell lines, OC2 and TSCCa, by chingwaysan. Am J Chin Med. 2005;33(1):21-7.
27. Chae HJ et al. Saeng-Ji-Hwang has a protective effect on adriamycin induced cytotoxicity in cardiac muscle cells. Life Sci. 2005;76(18): 2027-42.
28. Yang JW et al. The effects of Chinese herb Angelica in focal cerebral ischemia injury in the rat. Clin Hemorheol Microcirc. 2005;32(23):209-15.
29. Chung TW et al. Neuroprotective effect of a chuk-me-sun-dan on neurons from ischemic damage and neuronal cell toxicity. Neurochem Res. 2006 Jan;31(1):1-9.