

원저

## 紫菀 水抽出物이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 誘導된 PC-12 細胞株의 細胞死에 미치는 影響

신오철<sup>1</sup>, 신유정<sup>1</sup>, 김승모<sup>2</sup>, 박치상<sup>1</sup>

<sup>1</sup>대구한의대학교 한의과대학 심계내과학교실

<sup>2</sup>대구한의대학교 한의과대학 간계내과학교실

### Study of Apoptotic Effect on Hydrogen Peroxide-induced Rat PC-12 Cells by *Aster tataricus* Water Extract

Oh-chul Shin<sup>1</sup>, Yoo-jung Shin<sup>1</sup>, Seung-mo Kim<sup>2</sup>, Chi-sang Park<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine

<sup>2</sup>College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

**Objective :** Alzheimer's disease (AD) is a geriatric dementia that is widespread in old age. With an aging populace, AD is a looming problem in public health service. Alzheimer's disease is characterized by specific neuronal degeneration in certain areas of the brain. Mutations and abnormal expression of several genes are associated with  $\beta$ -amyloid deposits and Alzheimer's disease; among them APP, PS1, and PS2, SOD, free radical, ROS.

**Methods:** We studied herbal medicines that have a relationship to brain degeneration. From pre-modern times, although a variety of oriental prescriptions of *Aster tataricus* have been traditionally utilized for the treatment of AD, their pharmacological effects and action mechanisms have not yet been fully elucidated.

**Result :** Based on morphological observations by phase-contrast microscope, TUNEL assay and MTT in the culture media, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death was significantly inhibited by Aticus. We examined by ROS formation, catalase activity and GSH activity. We studied the protective effect and inhibitory effects of neurotoxicity in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC-12 cells by Aticus. Findings from our experiments show that Aticus inhibits apoptosis, which has neurotoxicities and cell damage in PC-12 cells. In addition, treatment with Aticus (>25 $\mu$ g/ml for 6hrs) partially prevented H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in PC-12 cells, and induced a protective effect.

**Conclusion :** As the result of this study, in the Aticus group, the apoptosis in the nervous system was inhibited, protected against the degeneration of PC-12 cells by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Taken together, Aticus exhibited inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptotic cell death. Aticus was found to induce protective effect on GSH and catalase in PC-12 cells. Based on these findings, Aticus may be beneficial for the treatment of AD.

**Key Words :** Alzheimer's disease (AD), *Aster tataricus*, brain degeneration

### 緒論

· 접수 : 2007년 5월 23일 · 논문심사 : 2007년 5월 24일  
· 채택 : 2007년 6월 13일  
· 교신저자 : 신오철, 대구 수성구 상동 165 대구한방병원  
심계내과학교실  
(Tel : 053-770-2104, Fax : 053-764-0566,  
E-mail : damoongo@hanmail.net)

치매는 정상적으로 성숙한 뇌가 후천적인 외상이 아닌 질병 등 요인에 의해서 기질적으로 손상 내지는 파괴되어 전반적으로 지능·학습·언어 등의 인지기능과 고도 정신기능이 감퇴되는 복합

적인 임상증후군이다<sup>1)</sup>. 원발성 퇴행성 치매인 Alzheimer's disease(이하 AD)가 치매의 42-81%를 차지하고, 뇌혈관의 병변으로 발생하는 다발성 경색 치매가 나머지 대부분을 차지한다<sup>2)</sup>.

AD의 원인으로 병리학적 특징 중 하나인 노인반(senile plaques)의 주성분인  $\beta$ -amyloid protein(A $\beta$ )이 지목되어 왔으나<sup>3,4)</sup> 최근의 연구결과로는 A $\beta$ 의 대사물인 c단 단백질(carboxyl terminal fragment of APP)이 A $\beta$ 보다 더 독성이 있다고 알려져 있어서 활발한 연구가 진행중이다<sup>5-8)</sup>.

또한 산화적 손상으로 인한 신경세포의 상해는 치매 등의 뇌의 퇴행성 변화로 인한 중추신경계의 이상을 초래할 수 있다. 활성산소는 반응성이 대단히 높아 세포의 주요 구성물질인 지질, 단백질 및 핵산을 파괴하여 조직에 산화적 손상을 초래하고 결국 치명적인 세포사 또는 괴사를 유도한다. 이러한 산화적 스트레스는 APP에 의해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 매개로 하여 신경세포의 세포사를 야기한다고 보고되었다<sup>9-13)</sup>.

한의학에서 치매는 呆病이라고 하며, 稟賦不足, 肝腎虧虛, 痰濁阻竅, 瘀阻腦臟 등의 원인에 의해 발생되고, 神志淡漠, 寡言小語, 終日不語, 閉戶獨處, 言辭顛倒, 忽笑忽哭 등의 증상을 나타내며, 원인에 따라 補益精氣, 益腎健腦, 化痰宣竅, 活血通竅 등의 치법이 응용된다<sup>14-19)</sup>.

紫菀은 국화과 식물인 개미취 Aster tataricus L.의根 및 根莖을 건조한 것으로, 효능은 潤肺下氣, 化痰止咳, 安五臟, 潤肌膚, 添骨髓, 解蟲毒이며<sup>20-21)</sup> 약리작용은 祛痰鎮咳, 항균작용, 항암작용 등<sup>22)</sup>이 있다. 최근 紫菀에 관한 연구로는 항산화<sup>23)</sup>, 항염증<sup>24)</sup>, 항암<sup>25)</sup>등이 다양하게 진행중이나 아직까지 紫菀의 항산화 효능이 신경세포에 미치는 영향에 대한 연구보고는 없었다.

이에 저자는 紫菀의 항산화 효능이 신경세포에 미치는 효과를 알아보기 위해 紫菀 水抽出물을 이용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 PC-12 세포주의 세포사를 관찰한 결과, 유의한 결과를 얻어 다음과 같이 보고하는 바이다.

## 實 驗

### 1. 材料

#### 1) 試藥 및 機器

실험에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin, trypsin, lipofectin(Gibco BRL), EtOH(Merck, Germany), dimethyl formamide, sodium dodecyl sulfate(SDS), catalase, succinate dehydrogenase, formazan, NaCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, trypan blue, formaldehyde, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2y-]2,5-diphenyltetrazolium bromide), phosphate-buffered saline(PBS), peroxides, 2-vinylpyridine, 5'-5' dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, EDTA, digitonin, sodium phosphate, 3 carboxy-4 nitrophenyl disulfide(DTNB)는 Sigma CO.에서 구입하였고, D2DCFDA(2'-7'-dichlorofluorescein diacetate)는 Molecular Probes(USA)에서, Fluorescan Ascent FL는 Thermo Labsystem (Finland)에서 구입하였고, 그 외 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다.

실험에 사용된 기기는 CO<sub>2</sub> incubator(VS-9108 MS, vision scientific Co.), phase-contrast microscope (Olympus), ELISA reader(enzyme-linked immunosorbent assay, Bio-Red, USA), U.V. spectrophotometer (Pharmacia, USA), Turner fluorometer(Turner design Co. Canada) 등을 사용하였다.

#### 2) 試料의 調製

실험에 사용한 紫菀(Aster tataricus L.)은 대구 한의대부속 대구한방병원 약재과에서 1kg을 엄선하여 잘게 분쇄한 후, 3차 증류수 5ℓ를 넣고 80℃의 조건하에서 열탕 추출을 실시하여 거르로 여과하고 감압농축기로 증발 농축하였다. 회수한 물추출액 200g은 동결건조하여 분말상태로 85g을 회수하였다. 紫菀 水抽出물은 4℃에 보관하였고, 사용시에는 미리 1,000mg/ml 농도로 희석하였다.

## 2. 方法

### 1) PC-12 세포주의 배양

실험에 사용된 포유동물 세포주인 PC-12 cell은 서울대학교 암연구소 한국 세포주은행으로부터 분양 받아서 계대배양시켜 5% FBS가 함유한 RPMI배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask 내지 cell culture용 dish에 배양하면서 1×10<sup>3</sup> 세포수로 6-well plate에 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 하룻밤 배양한 다음 80%정도 조밀하게 배양하여 새로운 6-well plate에 다시 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

### 2) 세포 형태학적 관찰

세포사를 유도하기 위해 200µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 처리한 PC-12 세포주를 1×10<sup>3</sup>세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 紫菀 水抽出物을 25µg/ml 농도로 처리하고 6시간동안 배양하여 세포사의 억제유무를 관찰하였다. 세포사는 phase-contrast microscope의 200배율에서 세포사가 유도된 200개정도 세포수를 촬영하여 관찰하였다.

### 3) Trypan blue exclusion에 의한 생존도 측정

200µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 처리하여 세포사를 유도한 PC-12 세포주를 5, 10, 25 및 50µg/ml 紫菀 水抽出物을 처리하고 6시간 동안 배양한 후, 0.2% trypan blue를 PBS에 5분간 첨가하여 phase-contrast microscopy로 관찰하였다. 세포사를 유도한 세포는 적자색으로 관찰되고, 생존세포들은 무색으로 관찰되며, 생존세포수는 전체 세포수 200개에서 생존율을 측정하였다.

### 4) MTT assay 측정

세포생존율을 측정하기 위해서 Denizot의 방법 26을 이용하였는데 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)가 생존세포수의 비율에 의해 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase가 작용하여 무색에서 formazan의

적자색 반응 정도를 확인하였다. PC-12세포주를 96-well plates에 3×10<sup>3</sup>cells/well를 분주한 다음, 세포사를 유도하기 위해 200µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 처리하였다. 각각 5, 10, 25 및 50µg/ml 紫菀 水抽出物을 처리한 다음 6시간동안 배양하고 phosphate-buffered saline과 0.5mg/mL MTT를 첨가하고 37°C 에서 3시간동안 배양하고, 반응을 정지하기 위해 50% dimethylformamide, 20% sodium dodecyl sulfate(SDS)100µL를 첨가하여 570nm/630nm의 흡광도에서 ELISA reader로 측정하였으며, catalase효소 활성도는 측정은 Aebi 방법27을 통해 측정하였다.

### 5) DCF fluorescent assay 측정

질인 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFDA; Molecular Probes, USA)로 확인하였다. PC-12 세포주를 6-well plates에 1×10<sup>4</sup>cells/well를 분주한 다음 세포사를 유도하기 위해 200µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 처리하였다. 5, 10, 25 및 50µg/ml 紫菀 水抽出物을 처리한 다음 6시간동안 배양하였다. 10µM DCFDA를 30분간 37°C에서 반응시킨 다음 PBS로 2회 세척하고 50µM digitonin을 첨가하고 세포 내 형광물질인 fluorescence정량을 위해 Turner fluorometer(488nm/525nm)로 측정하였다.

### 6) Glutathione assay 측정

1×10<sup>4</sup>cells/well를 분주한 다음 세포사를 유도하기 위해 200µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 처리하였다. 5, 10, 25 및 50µg/ml 紫菀 水抽出物을 처리한 다음 6시간동안 배양하였다. 활성화 정도를 측정할 목적으로 Griffith 방법을28 사용하였다. 세포를 PBS로 2번 세척한 다음, 3% perchloric acid를 처리하고 15분간 4°C에서 원심분리하였다. 상등액인 0.1mM NaH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>와 5mM EDTA를 첨가하고 glutathione (GSH+GSSG)을 넣은 다음, 412nm흡광도에서 U.V. spectrophotometer으로 측정하였다. GSSG는 GSH를 2-vinylpyridine으로 전처리한 후 측정하였다.

### 7) TUNEL assay 측정

PC-12 세포주를 6-well plates에  $1 \times 10^4$  cells/well를 분주한 다음 세포사를 유도하기 위해  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 처리하였다. 5, 10, 25 및  $50 \mu\text{g/ml}$  紫菀 水抽出物을 처리한 다음 6시간동안 배양하였다. 5분간  $4^\circ\text{C}$  조건하에서 원심분리하고 세포를 PBS로 재현탁하였다. 4% formaldehyde을 넣고 80% ethanol로 고정한 후 glass slides에 분주하고 TdT-Frag EL DNA fragmentation detection kit(Oncogene Research Products, Boston, MA, USA)을 통해 세포사의 정도를 methyl green으로 확인하였다. 전체 세포수 200개에서 TUNEL-positive cells를 계산하였으며, 동일 방법으로 3회 반복 실시하여 측정하였다.

### 8) 통계처리

모든 실험 결과는  $\text{mean} \pm \text{S.D}$ 로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여,  $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

## 成績

### 1. 세포형태학적 영향

신경세포인 PC-12가  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 의한 세포사를 확인하기 위해 위상차현미경하에서 관찰한 결과, 정상군에 비해 대조군은 형태학적으로 큰 변화가 나타났는데, 정상적인 형태가 아닌 둥근

형태의 세포사 특징을 가진 세포들이 관찰되었다. 반면 紫菀 水抽出物 처리군은  $25 \mu\text{g/ml}$  농도에서 세포사가 억제되고 신경돌기의 신장이 촉진되는 양상이 관찰되었다(Fig. 1).

### 2. 농도별 세포의 생존율에 미치는 영향

$\text{H}_2\text{O}_2$ 에 의한 세포사는 紫菀 水抽出物에 의해 얼마나 억제되는지를 알아보기로 세포사의 비율을 trypan blue로 염색하여 조사하였다. PC-12 세포의 세포사 비율은 정상군, 정상군에 紫菀 水抽出物 처리군, 대조군은 각각  $10 \pm 1.0\%$ ,  $12 \pm 0.5\%$ ,  $43 \pm 1.5\%$ 으로 나타났으며, 5, 10, 25,  $50 \mu\text{g/ml}$  紫菀 水抽出物을 처리한 경우 각각  $36 \pm 1.1\%$ ,  $33.1 \pm 0.5\%$ ,  $21 \pm 1.1\%$ ,  $16.1 \pm 0.3\%$ 로 나타났다. 특히 25,  $50 \mu\text{g/ml}$  紫菀 水抽出物 처리시 세포사가 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 억제되었다(Fig. 2).

### 3. 생존율과 catalase 효소 활성도에 미치는 영향

紫菀 水抽出物에 의해 생존율이 얼마나 촉진되는지 알아보기 위해 MTT assay를 통해 조사하였다. PC-12 세포의 생존율은 정상군, 정상군에 紫菀 水抽出物 처리군, 대조군에서는 각각  $100\%$ ,  $99 \pm 0.5\%$ ,  $34 \pm 1.5\%$ 으로 나타난 반면, 5, 10, 25,  $50 \mu\text{g/ml}$  紫菀 水抽出物을 처리한 군에서는 각각  $37 \pm 1.4\%$ ,  $52.1 \pm 0.5\%$ ,  $69 \pm 1.1\%$ ,  $91.1 \pm 0.5\%$ 로 나타났다. 특히 25,  $50 \mu\text{g/ml}$  紫菀 水抽出物 처리시 생존

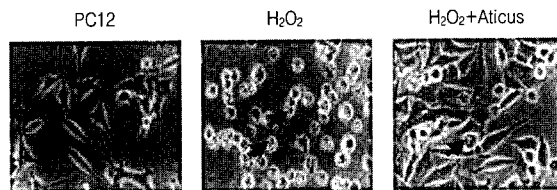


Fig. 1. Representative phase-contrast photographs after  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced PC-12 cells in the absence or presence of Aticus.

Left panel: No treatment Middle panel: PC-12 cells exposed to  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 6hrs Right panel: PC-12 cells treated with  $25 \mu\text{g/ml}$  Aticus for 6hrs followed by exposure to  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for additional 6hrs

율이 유의성(p<0.05) 있게 활성화 되었다(Fig. 3A).  
紫菀 水抽出物에 의해 생존에 관여하는 항산화 효소인 catalase의 비율이 촉진되는지를 알기 위해

catalase효소 활성도를 조사하였다. 정상군, 정상군에 紫菀 水抽出物 처리군, 대조군에서는 각각 100%, 98±1.5%, 33±2.0%이 나타난 반면, 5, 10,

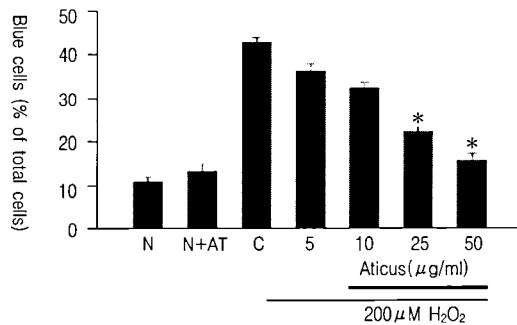


Fig. 2. Treatment of Aticus protects PC-12 cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in the concentration-dependent manner.

Cell viability assessed by trypan blue staining in 25µg/ml Aticus versus control cells after 6hrs exposure to 200µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The number of dead cells in both cell types were assessed by quantitating the percentage of blue cells per total cell number.

\*: p<0.05

N: No treatment group

AT: 25µg/ml Aticus

C: Control group

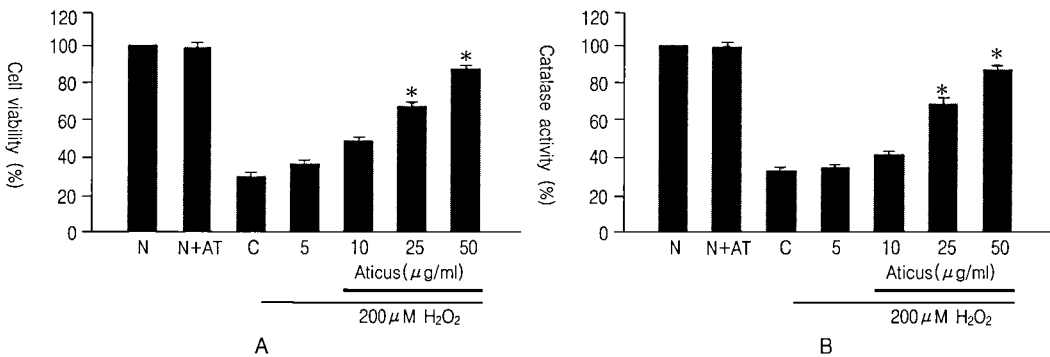


Fig. 3. The effects of Aticus on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC-12 cells.

(A) PC-12 cells were treated with various concentrations of Aticus for 6hrs and cell viability measured by the MTT reduction assay.

\*: p<0.05, Data is expressed as mean absorbance at 570nm/well, n=8

(B) Catalase-positive cells were treated with Aticus at various concentrations (5, 10, 25 and 50µg/ml) for 6hrs and catalase activity measured.

\*: p<0.05, Data is expressed as mean±S.D, n=8

N: No treatment group

AT: 25µg/ml Aticus

C: Control group

25, 50 $\mu\text{g/ml}$  紫菀 水抽出物을 처리한 경우 각각 33 $\pm$ 2.4%, 42.1 $\pm$ 0.5%, 69 $\pm$ 1.1%, 86.1 $\pm$ 1.5%로 나타났다. 특히 25, 50 $\mu\text{g/ml}$  紫菀 水抽出物 처리시 활성도가 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 나타났다(Fig. 3B).

#### 4. Peroxide양적 변화와 GSH효소 활성

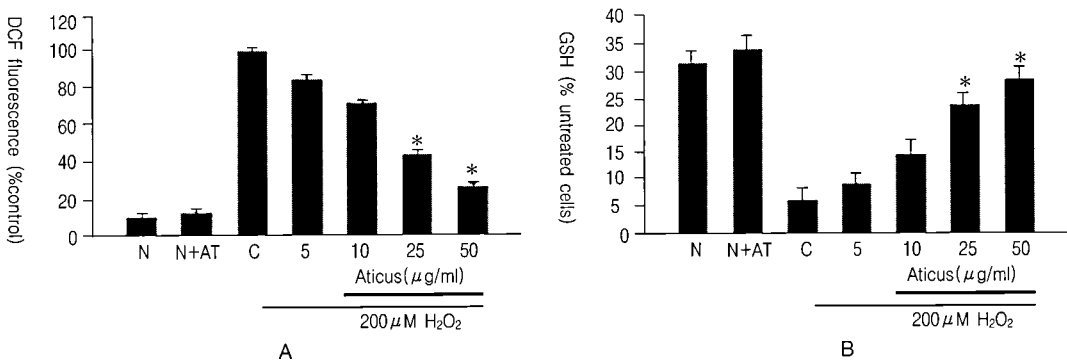
紫菀 水抽出物에 의해 peroxide생성 억제를 조사하기 위해 비형광물질인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFDA; Molecular Probes, USA)의 최종산물인 DCF형광물질의 생성을 통해 관찰하였다. DCF측적을 억제하는 정도는 정상군, 정상군에 紫菀 水抽出物 처리군, 대조군에서 각각 10%, 12 $\pm$ 0.5%, 100%으로 나타난 반면, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$  紫菀 水抽出物을 처리한 경우 각각 85 $\pm$ 2.1%, 76.1 $\pm$ 1.5%, 42 $\pm$ 2.1%, 29.1 $\pm$ 0.5%로 나타났다. 특히 25, 50 $\mu\text{g/ml}$  紫菀 水抽出物 처리시 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 억제되었다(Fig. 4A).

紫菀 水抽出物에 의해 GSH가 활성화 되는지 알

아보기 위해 세포내 GSH효소 활성도를 측정하였다. PC-12세포내의 GSH효소 활성도가 정상군, 정상군에 紫菀 水抽出物 처리군, 대조군에서 각각 30 $\pm$ 4%, 33 $\pm$ 1.5%, 6 $\pm$ 3%으로 나타난 반면, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$  紫菀 水抽出物을 처리한 경우 각각 7 $\pm$ 2.1%, 13.2 $\pm$ 1.5%, 23 $\pm$ 1.8%, 26.1 $\pm$ 1.5%로 나타났다. 특히 25, 50 $\mu\text{g/ml}$  紫菀 水抽出物 처리시 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 GSH효소가 활성화되었다 (Fig. 4B).

#### 5. TUNEL assay에 의한 세포사멸에 미치는 영향

紫菀 水抽出物이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포주의 세포사를 억제하는지 TUNEL assay를 통해 관찰하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리와 같은 산화적 스트레스로 신경상해를 유도한 PC-12세포내의 세포생존에서 정상군은 녹색으로 나타낸 반면, 대조군은 짙은 갈색의 형광으로 보여 PC-12에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리로 인한 세포사가 촉진됨을 시사하고 있으며, 紫菀 水抽出物을 처리한 경우, 생존하고 있다는 증거인 녹색형광 그리고



**Fig. 4.** The effects of Aticus in PC-12 decreases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. (A) PC-12 cells were treated with Aticus(5, 10, 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$ ) for 6hrs followed by a 6hrs exposure to 200 $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cells were then monitored for peroxide levels following a 30min incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$  in 10  $\mu\text{M}$  2',7' dichlorofluorescein diacetate. \*:  $p < 0.05$ , Data is mean $\pm$ S.D (B) Levels of GSH were measured after 6hrs exposure to 200 $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \*:  $p < 0.05$ , Data is mean $\pm$ S.D  
N: No treatment group  
AT: 25 $\mu\text{g/ml}$  Aticus  
C: Control group

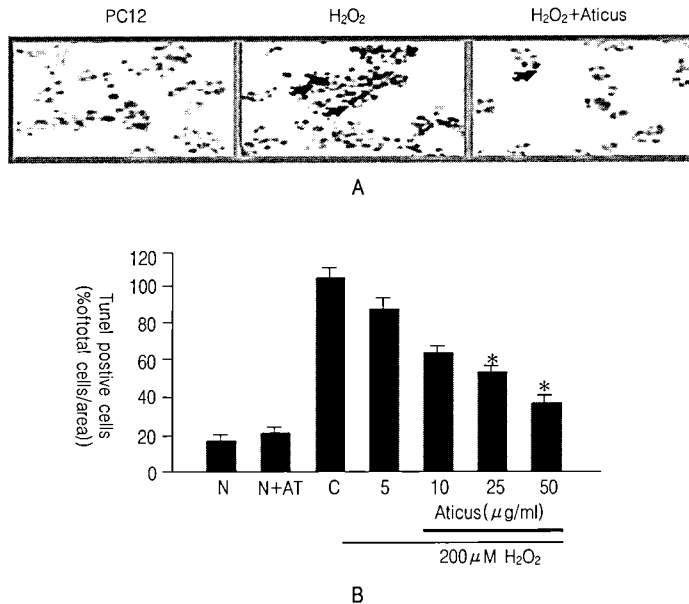
세포사로 인한 갈색이 존재하지만 대조군에 비해 크게 감소함이 관찰되었다(Fig. 5A).

이를 통계처리한 결과 정상군, 정상군에 紫菀 水抽出物 처리군, 대조군은 각각 10±0.5%, 13±1.5%, 68±1%으로 나타난 반면, 5, 10, 25, 50µg/ml 紫菀 水抽出物을 처리한 경우 각각 54±2.%, 39±0.5%, 31±1.5%, 22±0.5%로 나타났다. 특히 25, 50µg/ml 紫菀 水抽出物 처리시 유의성(p<0.05) 있게 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포주의 세포사를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 5B).

### 考 察

인구증가와 인류의 평균수명 연장으로 노령인구가 점점 증가하게 됨에 따라 뇌의 퇴행성 변화로 인한 질환이 경제적, 사회적으로 문제가 되고 있다. 그 중에서 노인성 치매는 오늘날 큰 관심거리로 떠오르고 있어 그에 따른 연구가 활발하게 이루어 지고 있다<sup>29-30</sup>.

Alzheimer's disease(AD)는 노인성 치매의 높은 비율을 차지하고 있으며, 뇌의 전반적 위축과 특



**Fig. 5.** Effects of Aticus on DNA fragmentation and total cell survival following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure. (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC-12 cells and control cells were incubated for 6hrs with 25µg/ml Aticus and addition of 200µm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cells were collected, fixed and immobilized on slides at 6hrs after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure and TUNEL staining was subsequently performed (dark brown staining); cells were counterstained with methyl green. left panel, no treatment cells, middle panel, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC-12 cells; right panel, 25µg/ml Aticus +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC-12 cells. (B) Quantitation of results from A. Six to eight random fields of stained cells from each treatment condition were counted. Data is expressed as the mean percentage of TUNEL-positive cells per total cells per field(±S.D).  
 \*: p< 0.05, Data is mean±S.D.  
 N: No treatment group  
 AT: 25µg/ml Aticus  
 C: Control group

유의 조직학적 소견인 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성(granulovacuolar degeneration) 등을 특징으로 한다<sup>31-32)</sup>.

AD의 중요한 병변은 42~43개의 아미노산으로 구성된  $\beta$ -amyloid peptide(A $\beta$ )가 세포 밖에 침착하여 신경반을 형성하는 것인데, A $\beta$ 가 세포독성을 나타내기 때문에 A $\beta$ 는 AD의 발병기전에 있어 많은 관심을 끌고 있다<sup>33</sup>. A $\beta$ 는 그 자체가 신경독성이 있는 것이 아니라 이차적으로 glucose의 부족이나 amino toxicity를 자극하여 신경세포가 손상되기 쉽게 만드는 것으로 생각되고 있으며, 최근에는 APP의 c말단 부위인 c말단 단백질이 A $\beta$ 보다 더 독성이 강하다고 알려지고 있고 A $\beta$ 와 c말단 단백질의 독성기전에 대해서는 현재 연구가 진행 중에 있다<sup>34-40)</sup>.

또한 산화적 손상으로 인한 신경세포의 상해는 중추신경계의 이상을 초래할 수 있다. 활성산소는 DNA에 상해를 입혀 미토콘드리아내의 효소를 변이시켜 항산화효소의 수준이 미달되게 하여 조직에 산화적 손상을 초래하고 결국 치명적인 세포사 또는 괴사를 유도한다. 특히 이러한 산화적 스트레스는 APP 같은 것에 의해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 매개로 신경의 세포사를 야기하며 치매 등의 뇌의 퇴행성 변화로 인한 중추신경계의 질환을 일으킬 수 있다<sup>9-13)</sup>.

한의학적으로 치매는 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등의 범주에서 다루어 졌으며, 주요 병인병기로는 七情傷, 痰飲, 稟賦不足, 肝腎虧虛, 瘀血內阻, 心肝火盛 등으로 크게 나눌 수 있고, 각각의 원인에 따라 豁痰開竅, 理氣和血, 滋補肝腎, 活血祛瘀, 清熱瀉火 등의 치법이 응용되며 歸脾湯, 補中益氣湯, 益氣安神湯 등이 사용되었다<sup>14-19)</sup>.

紫菀은 국화과식물인 개미취 *Aster tataricus* L.의 根 및 根莖을 건조한 것으로 性은 溫 無毒하며 味는 苦甘하다. 潤肺下氣, 化痰止咳, 安五臟, 潤肌膚, 添骨髓, 解蟲毒하며<sup>20-21)</sup> 祛痰鎮咳, 항균작용,

항암작용 등의 약리작용<sup>22)</sup>가 있다. 최근 紫菀에 관한 연구로는 항산화<sup>23)</sup>, 항염증<sup>24)</sup>, 항암<sup>25)</sup>등이 다양하게 진행중이나 아직까지 紫菀의 항산화 효능이 신경세포에 미치는 영향에 대한 연구보고는 없었다.

이에 저자는 紫菀의 항산화 효능이 신경세포에 미치는 효과를 알아보기 위해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 PC-12 세포주의 세포사에서 紫菀 水抽出物이 신경세포의 형태학적 변화, 농도별 생존율에 미치는 영향, catalase효소 활성도, peroxide억제 및 GSH효소 활성도 등을 측정하였다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포사를 유도하여 신경세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과 정상군에 비해 대조군은 형태학적으로 큰 변화를 나타내었는데, 정상적인 형태가 아닌 둥근 형태의 세포사 특징을 가진 세포들이 관찰되었다. 반면 紫菀 水抽出物처리군은 25 $\mu$ g/ml 농도에서 세포의 생존율과 신경돌기의 신장이 촉진되고 세포사는 억제되었다(Fig. 1).

농도별 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 trypan blue로 염색하여 조사한 결과, 농도 의존적으로 억제되었으며 특히 25, 50 $\mu$ g/ml 紫菀 水抽出物 처리시 세포사가 유의성(p<0.05) 있게 억제되었다(Fig. 2).

紫菀 水抽出物에 의해 생존율이 얼마나 촉진되는지 알아보기 위해 MTT assay를 통해 조사한 결과, 특히 25, 50 $\mu$ g/ml 紫菀 水抽出物 처리시 생존율이 유의성(p<0.05) 있게 활성화 되었다(Fig. 3A).

Catalase는 항산화효소로 세포사 억제에 관여한다. 紫菀 水抽出物에 의해 얼마나 catalase의 비율을 촉진하는지를 조사하기 위해 catalase효소활성도를 조사한 결과, 특히 25, 50 $\mu$ g/ml 紫菀 水抽出物 처리시 활성도가 유의성(p<0.05) 있게 나타났다(Fig. 3B). 이상에서 볼 때 紫菀 水抽出物은 농도 의존적으로 생존율을 높이며 항산화효소를 활성화 시켜 신경세포의 세포사를 억제하는 것으로 생각된다.



세포내 peroxide 생성은 세포사를 유도한다. 紫菀 水抽出物에 의해 peroxide생성 억제를 조사하기 위해 비형광물질인 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)의 최종산물인 DCF형광물질의 생성을 통해 관찰하였다. DCF측적을 억제하는 정도는 특히 25, 50 µg/ml 紫菀 水抽出物 처리시 유의성(p<0.05) 있게 억제되었다(Fig. 4A). 또한 紫菀 水抽出物에 의해 항산화효소인 GSH의 효소활성도가 얼마나 촉진되는지 조사하기 위해 세포내 GSH효소활성도를 측정하였는데 특히 25, 50µg/ml 紫菀 水抽出物 처리시 유의성(p<0.05) 있게 GSH효소가 활성화되었다(Fig. 4B). 따라서 紫菀 水抽出物이 peroxide 생성은 억제하며 항산화효소 활성도를 촉진시켜 세포사를 억제하는 것으로 사료된다.

紫菀 水抽出物이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포주의 세포사를 억제하는지 Tunel assay를 통해 관찰하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리로 산화적 스트레스 같은 인자에 의해 신경상해를 유도한 PC-12세포내의 세포생존에서 정상군은 녹색으로 나타낸 반면, 대조군은 짙은 갈색의 형광으로 보여 PC-12에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리로 인한 세포사가 촉진됨을 시사하고 있으며, 紫菀 水抽出物을 처리한 경우, 생존하고 있다는 증거인 녹색 형광 그리고 세포사로 인한 갈색이 존재하지만 대조군에 비해 크게 감소함이 관찰되었다(Fig. 5A). 이를 통계처리한 결과 특히 25, 50µg/ml 紫菀 水抽出物 처리시 유의성(p<0.05) 있게 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 유해산소에 대한 세포독성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 5B). 따라서 紫菀 水抽出物이 농도 의존적으로 유해산소에 대한 세포독성을 억제하고 세포의 보호효과가 있다고 추측된다.

이상에서와 같이 紫菀 水抽出物은 PC-12세포주에서의 세포사에 대해 효과적으로 억제하는 효과가 나타나 치매를 비롯한 기타 뇌의 퇴행성 변화에 대해 효과가 있을 것으로 추정되며, 향후 다각적이고 지속적인 임상 및 실험적 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

## 結 論

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도에 의한 PC-12세포주의 신경세포상해로부터 紫菀 水抽出物의 항산화 효능을 규명하기 위해 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 紫菀 水抽出物은 형태학적으로 세포사 억제와 신경돌기의 신장을 촉진하였다.
2. 紫菀 水抽出物은 농도 의존적으로 유의성 있게 신경세포의 세포사를 억제하였다.
3. 紫菀 水抽出物은 catalase항산화효소를 활성화 시켜 유의성 있게 신경세포의 세포사를 억제하였다.
4. 紫菀 水抽出物은 유의성 있는 peroxide 생성 억제와 GSH효소 활성을 나타내어 신경세포의 세포사를 억제하였다.
5. 紫菀 水抽出物은 Tunel assay를 통해 확인한 결과 유의성 있게 세포사를 억제하는 것으로 관찰되었다.

이와 같이 紫菀 水抽出物이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도에 의한 PC-12세포주에서 신경세포의 세포사를 효과적으로 억제하고 신경세포의 상해 보호효과가 있는 것이 입증되었다.

## 參考文獻

1. 민성길. 최신정신의학. 서울:—潮閣. 2000:189.
2. Helmer C, Joly P, Letenneru L, Commenges D, Dartigus JF. Mortality with Dementia: Results from French prospective community-based cohort. Am J Epidemiol. 2001;154: 642-8.
3. Selcoe DJ. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. J Neuropathol Exp Neurol. 1994;53(5):438-47.
4. Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias:amyloid and its

- relationship to tau. *Nat Neurosci.* 1998;1(5): 355-8.
5. Lu DC, Rabizadeh S, Chandra S, Shayya RF, Ellerby LM, Ye X et al. A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat Med.* 2000;6(4): 397-404.
  6. Bryan-Sisneros AA, Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB. Toxic effect of the beta-amyloid precursor protein C-terminus fragment and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> gradients. *Neuroreport.* 2000;11 (15):3357-60.
  7. Lee JP, Chang KA, Kim HS, Kim SS, Jeong SJ, Suh YH. APP carboxyl-terminal fragment without or with Aβ domain equally induces cytotoxicity in differentiated PC-12 cells and cortical neurons. *J Neurosci Res.* 2000;60(4): 565-70.
  8. Seo J, Kim S, Kim H, Park CH, Jeong S, Lee J, et al. Effects of nicotine on APP secretion and Aβ or CT(105)-induced toxicity. *Biol Psychiatry.* 2001;49(3):240-7.
  9. Aust SD, Chignell CF, Bray TM, Kalyanaraman B, Mason RP. Free radicals in toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1993;120: 168-78.
  10. Halliwell B and Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In *free radicals in biology and medicine*. 2nd Edition. Oxford: Clarendon Press. 1989:86-9.
  11. Polidori MC, Mecocci P. Plasma susceptibility to free radical-induced antioxidant consumption and lipid peroxidation is increased in very old subjects with Alzheimer disease. *J Alzheimer Dis.* 2002;4(6):517-22.
  12. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울: 一潮閣. 1994:63-6.
  13. 郭隆燦. 圖解腦神經外科學. 서울: 第一醫學社. 1992:27-31.
  14. 강형원, 유영수, 최용덕, 이광규. 癲呆의 병리에 대한 동서의학적 고찰. 서울: 동의병리학회지. 1999;13(1):36-45.
  15. 錢鏡湖. 辨證奇門全書. 台北: 甘地出版社. 1990: 222-5, 233-5.
  16. 黃大東. 實用中醫內科學. 上海: 上海科學技術出版社. 1989:378-81.
  17. 황의완, 김종우, 이조희, 엄효진, 이승기. 치매에 대한 韓醫學적 임상연구. 동의신경정신과학회지. 1996;7(1):1-13.
  18. 陳士鐸. 辨證錄. 서울: 醫聖堂. 1989:241-6.
  19. 全國韓醫科大學心系內科學教室 編. 心系內科學. 서울: 書苑堂. 1999:285-6, 436-50.
  20. 전국 한의과대학 본초학교수. 本草學. 서울: 永林社. 1999:481-482.
  21. 陳存仁. 陳存仁本草. 서울: 醫聖堂. 1996:176.
  22. 강소신의학원편. 중약대사전. 서울: 鼎談. 1998: 4625-30.
  23. Ng T.B., Liu F., Cheng C. H. K and Wang Z. Antioxidant Activity of Compounds from the Medical Herb *Aster tataricus*. *Comparative Biochemistry and Physiology part C* 136: 2003:109-115.
  24. 최두연. 자완(*Aster tataricus*)의 화학적 성분과 생리활성. 조선대 대학원. 2005:4-21.
  25. Rossi. F., Zanotti G., Saviano M., Iacovino R., Palladino P., Saviano G. New Anti-tumour Cyclic Astin Analogues: Synthesis, Conformation and Bioactivity. *J.Pept.Sci.* 2004;10:92-102.
  26. Denizot F. and Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immun. Methods.* 1986;89:271-7.
  27. Aebi H. Methods of analytical analysis, in *Catalase*, Vol. 1 (Bergmeyer H., ed.). New

- York:Academic Press. 1974:673-84.
28. Griffith O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analyt: Biochem.* 1980;106, 207 - 12.
  29. 이근후. 최신임상정신의학. 서울:하나의학사. 1988.:138, 216-8.
  30. 李東垣 外. 痴呆에 關한 東西醫學的 比較 考察. 大韓韓方內科學會誌 1995;16(1): 2-5, 11, 14.
  31. Reznik-Wolf H, Machado J, Haroutuian V, DeMacro L, Walter GF, Goldman B, Davidson M, Johnston JA, Lannfelt L, Dani SU, Friedman E. Somatic mutation analysis of the APP and Presenilin 1 and 2 genes in Alzheimer's disease brain. *J Neurogenet.* 1998; 12(1):55-65.
  32. Alzheimer's disease collaborative group. The structure of the presenilin 1 (SI82) gene and identification of six novel mutation in early onset AD families. *Nat Genet.* 1995;11(2): 219-22.
  33. Ray WJ, Ashall F, Goate AM. Molecular pathogenesis of sporadic and familial forms of Alzheimer's disease. *Mol Med Today.* 1977;25 (1):70-84.
  34. Engidawork E, Baic N, Fountoulakis M, Dierssen M, Greber-Platzer S, Lubec G. Beta-amyloid precursor protein. ETS-2 and collagen alpha 1(IV) chain precursor, encoded on chromosome 21, are not overexpressed in fetal Down syndrome : further evidence against gene dosage effect. *J Neural Transm Suppl.* 2001;61:335-46.
  35. Russo C, Salis S, Dolcini V, Venezia V, Song XH, Teller JK, Schettini G. Amino-terminal modification and tyrosine phosphorylation of [corrected] carboxy-terminal fragments of the amyloid precuroir protein in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. *Neurobiol Dis.* 2001;8(1):173-80.
  36. SP Fraser, YH Suh, YH Chong and M.B.A. Djamogz. Membrane currents induced in Xenopus oocytes by the C-terminal fragment of the beta-amyloid precursor protein. *J. Neurochemistry.* 1996;66:2034-40.
  37. SP Fraser, YH Chong and M.B.A. Djamogz. Ionic effects of the Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein and metabolic fragment. *Trends Neurosci.* 1997;20:67-72.
  38. SJ Jeong, HS Kim, KA Chang, DH Geum, CH Park, JH Seo, JC Choi, SG Lee, K kim, and YH Suh. Involment of Presenilin 1&2 in cell cycle : association with tublin-β. *FASED.* 2000;14(14):2171-6.
  39. Hoozemans JJ, Rozemuller AJ, Veerhuis R, Eikelenboom P. Immunological aspects of alzheimer's disease : therapeutic implications, *BioDrugs.* 2001;15(5):325-37.
  40. Poirier J. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism, *Ann N Y Acad Sci.* 2000;924:81-90.