생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
39(4) : 290 ~ 294 (2008)

Nitric oxide에 의해 산화적 스트레스를 받은 Neuronal cell에 항산화 효과를 가지는 수종 생약추출물의 검색

구 억 · 이학주[1] · 이동호[2] · 이현정[1] · 함아롬 · 조은영 · 마응천*
서울대학교 약학대학 천연물과학 연구소, [1]국립산림과학원, [2]고려대학교 생명과학대학

Anti-oxidative Effect of Some Plant Extracts Against Nitric Oxide-induced Oxidative Stress on Neuronal Cell

Uk Koo, Hak-Ju Lee, Dong Ho Lee, Hyun-Jung Lee, Ah-Rom Ham, Eun-Young Cho and Woongchon Mar*
Natural Product Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[1]Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea
[2]College of Life sciences & Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract – The objective of this study is screening the anti-oxidative effects of several plant MeOH extracts against oxidative stress in Neuroblastoma cell. Oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of many neurotoxicity, neurodegenerative disorders and cell death. This oxidative stress is generated by ROS (Reactive Oxygen Species) such as nitric oxide, nitrogen dioxide, peroxyl, superoxide (O_2^-), hydroxyl, alkoxyl. So, in the present study, we induced oxidative stress by treatment of sodium nitroprusside (2.5 mM) in human neuroblastoma SH-SY5Y cell which was treated samples before 24hr, and cell viability was measured by MTT reduction assay. Of those tested, the extracts of *Paeonia japonica* (roots), *Eucommia ulmoides* (炒)(barks), *Paeonia japonica* (曝乾)(roots), *Phyllostachys bambusoides* (stems), *Polygala tenuifolia* (去心, 炒)(roots), *Paeonia japonica* (roots), *Polygala tenuifolia* (roots), *Machilus thunbergii* (barks), *Mallotus japonicus* (leaves), *Poria cocos* (whole), *Sophora flavescens* (roots), *Angelica tenuissima* (roots), *Angelica gigas* (當歸尾)(roots) showed anti-oxidative effects[EC_{50}<15.20 μg/ml(Carnosine:Positive control)]in dose dependent manner.

Key words – Sodium nitroprusside, Oxidative stress, Anti-oxidative effects, MTT reduction assay, EC_{50}

인간의 생체 내에서는 면역 활동, 간의 독성물질 무독화 반응, 호흡을 통한 에너지 생산, 생체의 균형을 유지하는 활동, 그리고 운동 등의 정상적인 생체 내 반응이나 활동임에도 불구하고 이런 활동으로부터 ROS (Reactive Oxygen Species)가 생산된다. 그러나 건강한 상태에서는 ROS가 생성되는 속도가 생체조직 항산화 체계의 ROS 제거속도에 미치지 못하여 ROS에 의한 생체 독성이 나타나지 않는다. 하지만 여러 가지 요인에 의해 생체 조직의 항산화 체계에 장애가 있을 시에는 산화적 손상이 발생하게 되고 그러한 경우를 '산화적 스트레스(oxidative stress)'라고 한다.

ROS에는 nitric oxide, nitrogen dioxide, peroxyl, superoxide(O_2^-), hydroxyl, alkoxyl 등이 있으며 이러한 ROS는 생체 세포내 DNA, 세포 구성 단백질, 지질 등에 비가역적인 손상을 줌으로써[1] 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 신경 독성 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 염증, 류마티스, 자가 면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 원인이 된다.[2-5]

특히 뇌세포에서 ROS가 다량 생성되면 그로 인한 산화적 스트레스가 세포내 미토콘드리아의 구조와 기능에 변화를 일으킴으로써 파킨슨씨병, 알츠하이머와 같은 퇴행성 뇌질환을 일으키게 된다.[6]

이러한 배경 하에 본 실험실에서는 산화적 스트레스로 인한 뇌졸중, 신경 독성 그리고 여러 퇴행성 뇌질환 등에 우수한 천연자원을 탐색하여 보고자 neuronal cell death의 모델로 널리 사용되는 human SH-SY5Y neuroblastoma cell을 이용하였으며 nitric oxide donor인 sodium nitroprusside를

*교신저자(E-mail) : mars@snu.ac.kr
(Tel) : 02-880-2473

처리하여 산화적 스트레스를 일으켰다. 그리고 다양한 생약 추출물들을 대상 시료로 하여 산화적 스트레스를 받은 human SH-SY5Y neuroblastoma cell 에 각 시료들의 anti-oxidative effects를 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay를 통해 확인하였다. 또한 부위별로 성분 차이가 많이 나는 생약 추출물들은 부위별로 추출하여 각 부위별 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

생약의 추출 및 시료 조제 – 실험에 사용된 생약시료들은 한국식물추출물은행에서 MeOH 추출물로 구입하여 한국 식물 추출물 은행의 정확한 감정을 거친 후 실험에 사용하였으며 voucher specimen은 자생 식물 사업단에 보관되어 있다.

Cell culture – Human SH-SY5Y neuroblastoma cell (ATCC no. CRL-2266)은 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL, cat.# 16000-044, USA) 및 antibiotics (Sigma-Aldrich, cat.# A5955, USA)가 함유된 Dulbecco's modified eagle's medium (Sigma-Aldrich, cat.# D2902, USA) 배지 하에서 배양하였다. incubator는 37°C 온도를 유지했고 5% CO_2가 계속 공급되어 세포 배양의 적절한 조건을 갖추었다. 세포는 96-well plate에 $1x10^4$ cells/well로 배양하였다.

시료의 전처리 – 시료는 100, 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 μg/ml의 농도별로 SNP 2.5 mM (Sigma-Aldrich, cat.# 228710, USA) 처리 24시간 전에 선행 처리하였으며 각 추출물 시료들의 효과는 EC_{50} 값을 지표로 하여 비교 관찰하였다. 그리고 양성 대조군은 항산화 작용이 널리 보고된 Carnosine[7-9]으로 선정하여 각 시료들의 EC_{50} 값과 비교하여 항산화 보호 작용을 비교하였다. 시료 및 Carnosine은 10% dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich, cat.# D5879, USA)에 녹였으며 처리한 DMSO의 최종 농도는 0.5%가 되게 하였다.

SH-SY5Y Cell의 SNP 농도 별 Cell viability – 96-well plate에 1×10^4 cells/well로 배양한 뒤 48시간 후 SH-SY5Y Cell에 SNP를 각각 1.5, 2, 2.5, 3, 1.5 mM의 농도로 처리하였다. SNP처리 24시간 후 MTT assay를 통해 농도별 Cell viability를 측정하였다. SNP 농도는 위 실험 결과를 토대로 Cell viability 값이 55.95%를 나타냈던 2.5 mM (24hr)로 결정하였다.(Fig. 1)

$$\% \text{ of Cell viability} = (Os - Oi)/(Oc - Oi)\times 100$$

Oc = Optical density of Control
Oi = Optical density of inducer control
Os = Optical density of Sample

MTT reduction assay – 세포 생존율을 측정하기 위해

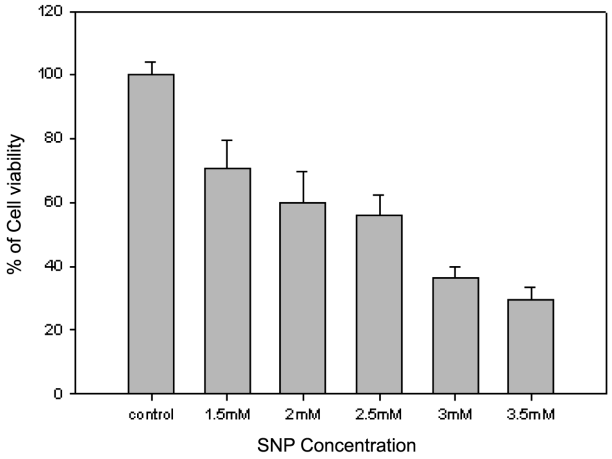

Fig. 1. Cells were treated with 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM, 3.5 mM SNP for 24 hr. Cell viability was determined by the MTT assay.

3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay를 사용하였다. 실험을 수행한 96-well plate에 최종농도가 0.5 mg/ml가 되도록 MTT (Sigma-Aldrich, cat.# M2128, USA)용액을 각 well에 넣었다. 이를 incubator에서 3시간 동안 반응시키면 MTT용액이 살아있는 cell의 mitochondria에 반응하여 보라색 불용성의 formazan을 형성하게 된다. 이때 media와 MTT 용액을 제거한 후 100% DMSO를 넣어서 교반하였다. 형성된 보라색 formazan이 완전히 용해되었을 때 microplate reader (Thermomax, Molecular device, USA)를 이용하여 540 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다. 모든 시s료는 duplicate로 측정하여 평균값을 산출하였고 Cell viability(%)는 SNP를 처리하지 않은 정상 대조군의 흡광도 값에 대한 백분율로 나타냈다. Cell viability로부터 EC_{50}(The term half maximal effective concentration)의 값을 table curve 프로그램을 이용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

두충(*Eucommia ulmoides*) 등 33종 51가지의 생약과 부위별 성분 차이가 많이 나는 종의 각 부위별 MeOH 추출물을 대상으로 하였으며, 몇몇 시료들은 한방 원리에 의해 약효가 달라지는 심을 제거한 겉껍질(거심)을 사용하거나, 볶아서 사용하거나(초), 다른 시료들(음건)과 달리 햇볕건조, 또는 술에 담근 후 말려서 볶는(주초)등의 방법으로 각각의 효과를 알아보았다. 이들 각각의 시료가 Sodium nitroprusside(NO donor)에 의해 산화적 스트레스를 받은 human SH-SY5Y neuroblastoma cell 에서 갖는 항산화 보호 효과는 EC_{50}값을 지표로 하여 비교해 보았다. 각 생약시료 및 Carnosine을 각각 100, 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 μg/ml의 농도로 cell

Table I. Anti-oxidative effects of some plant extracts on SH-SY5Y neuroblastoma cell. Data shown in the table are EC_{50} (The term half maximal effective concentration)

Scientific name	Family name	Part used	Habitat	EC_{50}(μg/ml)
Positive Control (Carnosine)				15.20
Ligustrum japonicum	Oleaceae	leaves	Korea	>100
Mallotus japonicus	Euphorbiaceae	leaves	Korea	9.67
Mallotus japonicus	Euphorbiaceae	stems	Korea	>100
Acer tegmentosum	Aceraceae	leaves	Korea	>100
Acer tegmentosum	Aceraceae	stems	Korea	16.74
Prunus padus	Rosaceae	whole	Korea	>100
Euonymus alatus	Celastraceae	stems	Korea	>100
Euonymus alatus	Celastraceae	leaves	Korea	>100
Ribes fasciculatum var. *chinense*	Saxifragaceae	stems	Korea	>100
Ginko biloba	Gingkoaceae	roots	Korea	>100
Cnidium officinale	Umbelliferae	rhizomes	Japan	>100
Cnidium officinale	Umbelliferae	rhizomes	Korea	>100
Cnidium officinale	Umbelliferae	rhizomes	China	>100
Angelica sinensis	Umbelliferae	roots	China	>100
Angelica sinensis (주근)	Umbelliferae	roots	China	>100
Angelica gigas	Umbelliferae	roots	Korea	46.49
Angelica gigas (당귀미)	Umbelliferae	roots	Korea	13.20
Paeonia japonica	Ranunculaceae	roots	Korea	5.93
Paeonia japonica (주초)	Ranunculaceae	roots	Korea	>100
Paeonia japonica (초)	Ranunculaceae	roots	China	17.00
Paeonia japonica (햇볕건조)	Ranunculaceae	roots	Korea	3.16
Paeonia japonica	Ranunculaceae	roots	China	1.51
Dictamnus dasycarpus	Rutaceae	barks	China	>100
Lespedeza cuneata	Leguminosae	whole	Korea	>100
Ligusticum sinense	Umbelliferae	roots	China	>100
Angelica tenuissima	Umbelliferae	roots	Korea	11.21
Eucommia ulmoides	Eucommiaceae	barks	Korea	>100
Eucommia ulmoides	Eucommiaceae	leaves	Korea	>100
Eucommia ulmoides	Eucommiaceae	branches	Korea	>100
Eucommia ulmoides (초)	Eucommiaceae	barks	Korea	2.76
Sophora flavescens	Leguminosae	roots	China	11.08
Clematis mandshurica	Ranunculaceae	roots	China	>100
Gastrodia elata	Orchidaceae	rhizomes	China	26.36
Poria cocos	Polyporaceae	barks	China	>100
Poria cocos	Polyporaceae	whole	China	10.67
Poria cocos (적복령)	Polyporaceae	whole	China	30.63
Chrysanthemum indicum	Compositae	flowers	China	>100
Polygala tenuifolia (거심)	Polygalaceae	roots	China	26.86
Polygala tenuifolia	Polygalaceae	roots	China	>100
Polygala tenuifolia (거심,초)	Polygalaceae	roots	China	3.64
Polygala tenuifolia	Polygalaceae	roots	Korea	7.75
Acorus gramineus	Araceae	rhizomes	China	31.56
Siegesbeckia glabrescens	Compositae	whole	Korea	>100
Syneilesis palmata	Compositae	whole	Korea	>100
Phyllostachys bambusoides	Gramineae	leaves	Korea	>100
Phyllostachys bambusoides	Gramineae	stems	Korea	3.31
Stachys riederi var. *japonica*	Labiatae	whole	China	>100
Salvia miltiorrhiza	Labiatae	roots	China	>100
Machilus thunbergii	Lauraceae	barks	Korea	8.36
Pueraria lobata	Leguminosae	roots	China	>100
Cornus officinalis	Cornaceae	fruits	China	>100

viability를 test한 결과 20가지의 추출물에서 농도 구배에 맞게 효과가 나타났으며 양성 대조군으로 사용한 Carnosine의 EC_{50}값은 15.20 μg/ml가 나왔다. 특히 *Paeonia japonica* (roots)등 10종 13가지 생약시료들은 항산화 효과가 이미 보고된 Carnosine 의 EC_{50}값인 15.20 μg/ml보다 낮은 농도에서 EC_{50} 값의 효과를 보여 human SH-SY5Y neuroblastoma cell에 sodium nitroprusside로 유도되는 산화적 스트레스에 대한 보호활성을 확인할 수 있었다. 이러한 연구 결과를 토대로 현재 본 연구실에서는 시료농도 Carnosine 의 EC_{50}값인 15.20 μg/ml 보다 낮은 농도에서 EC_{50} 값의 효과를 보인 *Paeonia japonica* (roots), *Eucommia ulmoides* (초)(barks), *Paeonia japonica* (햇볕건조)(roots), *Phyllostachys bambusoides* (stems), *Polygala tenuifolia* (거심, 초)(roots), *Paeonia japonica* (roots), *Polygala tenuifolia* (roots), *Machilus thunbergii* (barks), *Mallotus japonicus* (leaves), *Poria cocos* (whole), *Sophora flavescens* (roots), *Angelica tenuissima* (roots), *Angelica gigas* (당귀미)(roots)등의 생약시료 추출물을 대상으로 하여 각 생약시료의 세부 분획 추출물에 대한 효과를 연구 중에 있다. 또한 본 연구실에서 선행 연구를 통해 동물모델에서 효과가 입증된 시료 농도인, 10 μg/ml 보다 낮은 농도에서 EC_{50} 값의 효과를 보여준 생약시료들은 동물모델에서의 효과가 있을 것으로 예상 되어 뇌졸중, 신경 독성 그리고 각종 퇴행성 뇌질환의 동물모델에도 적용하고자 한다.

그리고 이 중 *Eucommia ulmoides*는 anti-hypertention[10]과 anti-thrombic[11]활성도 있다고 보고되고 있다. 이는 일반적인 뇌졸중 치료제로 쓰이는 네 가지 그룹인 thrombolytic agents, antiplatelet agents, anticoagulants와 neuroprotective agents[12]과 몇 가지 연관이 있어 향후 매우 효과적인 뇌졸중 치료제로 활용할 수 있을 것으로 본다. 그래서 본 연구소에서는 *Eucommia ulmoides*의 세부 분획 추출물에 대한 효과를 연구 중에 있으며 뇌졸중 동물모델(MCAo)에서의 효과 또한 연구중에 있다.

결 론

두충(*Eucommia ulmoides*) 등 33종의 생약과 부위별 성분 차이가 많이 나는 종의 각 부위별 MeOH 추출물을 대상으로, 이들 시료가 각각의 농도별로 sodium nitroprusside (NO donor)에 의해 산화적 스트레스를 받은 neuronal cell 에서 갖는 항산화 효과를 cell viability를 지표로 검색한 결과, *Paeonia japonica* (roots), *Eucommia ulmoides* (초)(barks), *Paeonia japonica* (햇볕건조)(roots), *Phyllostachys bambusoides* (stems), *Polygala tenuifolia* (거심, 초)(roots), *Paeonia japonica* (roots), *Polygala tenuifolia* (roots), *Machilus thunbergii* (barks), *Mallotus japonicus* (leaves), *Poria cocos* (whole), *Sophora flavescens* (roots), *Angelica tenuissima* (roots), *Angelica gigas* (당귀미)(roots) 등 10종 13가지 생약 추출물들이 15.20 μg/ml (Carnosine:positive control) 보다 낮은 농도에서 EC_{50} 값의 효과를 보여 주어 산화적 스트레스에 대한 항산화제나 그로 인한 뇌졸중, 신경 독성에 의한 여러 퇴행성 뇌질환 예방에 사용될 수 있음을 시사하였다.

사 사

본 연구는 국립 산림 과학원의 연구비 지원(FP0702-2008-01)을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**: 44-84.
2. Solov'eva, E. I., Mironova, O. P., Baranova, O. A., Bekman, E. M., Asechev, A. V., Fedin, A. I. and Azizova, O. A. (2008) The free-radical processes and antioxidant therapy in brain ischemia. *Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S S Korsakova.* **108**: 37-42.
3. Castillo, J., Rama, R. and Dávalos, A. (2000) Nitric oxide-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke* **31**: 852-857.
4. Reeve, A. K., Krishnan, K. J. and Turnbull, D. M. (2008) Age related mitochondrial degenerative disorders in humans. *Biotechnol. J.* **3**: 750-756.
5. Puddu, P., Puddu, G. M., Cravero, E., Rosati, M. and Muscari, A. (2008) The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Press* **17**: 70-77.
6. Knott, A. B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R. and Bossy-Wetzel, E. (2008) Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**: 505-518.
7. Calabrese, V., Colombrita, C., Guagliano, E., Sapienza, M., Ravagna, A., Cardile, V., Scapagnini, G., Santoro, A. M., Mangiameli, A., Butterfield, D. A., Giuffrida Stella, A. M. and Rizzarelli, E. (2005) Protective effect of carnosine during nitrosative stress in astroglial cell cultures. *Neurochem. Res.* **30**: 797-807.
8. Chasovnikova, L. V., Formazyuk, V. E., Sergienko, V. I., Boldyrev, A. A. and Severin, S. E. (1990) The antioxidative properties of carnosine and other drugs. *Biochem. Int.* **20**: 1097-1103.
9. Boldyrev, A. A., Dupin, A.M., Bunin, A. Y., Babizhaev, M. A. and Severin, S. E. (1987) The antioxidative properties of carnosine, a natural histidine containing dipeptide. *Biochem. Int.* **15**: 1105-1113.
10. Veretianov II. (1956) Treatment of hypertension with tincture

of Cortex Eucommiae. *Voen. Med. Zh.* **12**: 57-58.
11. Chang, G. T., Min, S. Y., Kim, J. H., Kim, S. H., Kim, J. K. and Kim, C. H. (2005) Anti-thrombic activity of Korean herbal medicine, Dae-Jo-Whan and its herbs. *Vascul. Pharmacol.* **43**: 283-288.
12. Mohammad, Y. M., Divani, A. A., Kirmani, J. F., Harris-Lane, P., Qureshi, A. I. (2004) Acute treatment for ischemic stroke in 2004. *Emerg Radiol.* **11**: 83-86.

(2008년 8월 25일 접수)