

## 五味子(*Fructus Schisandrae*)가 흰쥐 해마신경세포의 저산소증 모델에서 세포사에 미치는 영향

주대환, 신길조, 문일수\*

동국대학교 한의과대학 내과학교실, \*동국대학교 의과대학 해부학교실

### Prevention of ROS Production and MMP Dissipation by *Fructus Schisandrae*(FS) in a Hypoxic Model of Cultured Rat Hippocampal Neurons

Dae-hwan Ju, Gil-cho Shin, Il-soo Moon\*

Dept. of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

\*Dept. of Anatomy, College of Medicine, Dongguk University

#### ABSTRACT

**Objectives :** The purpose of this study was to investigate the effect of FS for the modulation of ROS and MMP in a hypoxic model of cultured rat cortical cells.

**Methods :** For the effect of FS on the viability, FS was added to culture media (neurobasal supplemented with B27) and cell viability was measured by LDH assay. To investigate the effects of FS on ROS generation and MMP preservation, cells grown in FS-containing media were given a hypoxic shock(2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 3 hrs) on DIV 10, stained with H<sub>2</sub>DCF-DA(10 nM) and JC-1, respectively, and observed by fluorescent microscope.

#### Results :

1. FS has a protective effect of cortical cells in both normoxia and hypoxia.
2. FS reduced the generation of ROS and this reduction was especially significant at 3 days after hypoxia.
3. FS was effective for the maintenance of MMP in hypoxia, and this efficacy was especially significant at 3 days after hypoxia.

**Conclusions :** Taken together, these results indicate that FS attenuates ROS generation and MMP dissipation, which eventually protects from neuronal cell death in hypoxia.

**Key words :** *Fructus Schisandrae*, ROS, MMP

## 1. 서론

뇌혈관 질환은 과학기술과 의료의 발달에도 불구하고 현재까지 주요한 사망원인 중의 하나이다<sup>1</sup>. 뇌혈관질환을 극복하기 위하여 이루어지고 있는

여러 연구와 시도 중 최근 신경세포사 기전 및 세포사 예방에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다<sup>2</sup>.

뇌신경세포는 짧은 기간의 허혈·저산소 상태에서 비가역적 손상을 입게 되며, 이는 산화스트레스에 의해 촉진된다<sup>3,4</sup>. 산화스트레스란 인체 대사의 부산물로 발생하는 자유기(free radical)가 인체 내 산화적 손상을 야기하는 것으로 인체에 가장 큰 영향을 미치는 자유기는 산소를 중심으로 한 활성

· 교신저자: 신길조 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2  
동국대학교 분당한방병원 1내과  
TEL: 031-710-3710 FAX: 031-710-3780  
E-mail: shingcho@naver.com

산소(reactive oxygen species, ROS)이다<sup>5</sup>. ROS는 유기호흡 생물의 정상적 대사과정과 내외부의 자극에 의하여 끊임없이 생산되며 뇌허혈, 저산소 등과 같은 흥분독성(excitotoxicity) 상황에서 생성이 촉진되어 신경세포 사멸을 야기한다<sup>6</sup>. 또한 Mitochondria가 ROS에 노출되면 활발한 세포대사를 의미하는 mitochondria membrane potential(MMP)가 감소되어<sup>7</sup>, ATP를 합성할 수 없게 되고 세포내  $Ca^{2+}$ 의 증가가 일어나 세포괴사와 세포자연사를 유발한다<sup>8,9</sup>. 즉, ROS 생성 억제와 MMP 감소 방지는 세포사 예방과 밀접한 관련이 있다.

五味子は 性溫, 酸甘하고, 斂肺·滋腎·生津·收汗·澁精의 효능이 있어, 久咳氣喘, 泄瀉, 津少口渴, 多汗, 心神不安 등에 사용된다. 또한 뇌혈관질환 관련 처방인 腎瀝湯과 地黃飮子 등의 주요구성 약재로 사용되고 있다<sup>10-2</sup>.

최근 중추신경계와 관련하여五味子가 중추신경계 세포를 보호한다는 실험적 연구 결과들이 발표되었는데, 특히 Ko 등<sup>13</sup>은五味子의 주성분인 Schisandrin B의 뇌 산화 스트레스에 대한 항산화 효과를, Kim 등<sup>14</sup>은 흥분독소에 의해 유발된 산화 신경 손상에 대한 치료효과를 보고 하였다. 또한五味子가 주요 약물인 生脈散이 뇌경색의 진행을 막아주는데 유효하다는 Ichikawa 등<sup>15</sup>의 보고도 있다.

그러나五味子가 신경세포사 방지에 있어서 어떠한 역할을 하는지에 대한 연구는 본격적으로 이루어지지 않았다. 이에五味子 추출물이 저산소증에서 흰쥐 대뇌신경세포에 미치는 영향과 생성되는 ROS 양의 변화 및 mitochondria의 막전위에 미치는 영향에 대해 관찰한 바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재 료

#### 1) 동 물

본 연구는 대한동물실험센터에서 구입한 *Sprague-Dawley*계 흰쥐를 대상으로 실험을 실시하였다.

#### 2) 약 재

실험에 사용된五味子(*Fructus Schisandrae*, FS)는 대한약전 및 대한약전의 한약 규격주해에 근거하여 동국대학교 한방병원에서 구입하였다.

#### 3)五味子 추출물 제조

五味子 2 g에 20 ml의 증류수를 넣어 균질화하고 상온에서 4 시간, 4°C에서 18 시간 전탕하였다. 이를 15,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.45  $\mu$ m)한 후 소량씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. 건조물의 양은 1 ml 추출액 4 튜브를 동결건조한 후 평균치를 사용하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 신경세포 배양

임신 18 일(embryonic day 18 : E<sub>18</sub>)의 *Sprague-Dawley*계 흰쥐 대뇌피질신경세포를 Brewer 등<sup>16</sup>의 방법에 따라 배양하였다. 즉, E<sub>18</sub>의 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5 분간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아를 취하고 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질 조직을 37°C에서 12 분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1 mM sodium pyruvate와 10 mM HEPES(pH 7.4)가 첨가된 HBSS용액(Invitrogen Life Technology) 5 ml로 4~5 회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1 ml Hank's용액으로 옮기고, 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6~7 회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 이후 분산된 세포를 모으고 세포수를 측정하여 다음 약 220 cells/mm<sup>2</sup>가 되도록 B27을 첨가한 plating neurobasal media(Invitrogen Life Technology)(100 ml neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I, 0.1 ml 25 mM glutamate, 0.1 ml 25 mM 2-mercaptoethanol)에 접종하여 5% CO<sub>2</sub> 배양조에서 배양한 다음 2~3 일 간격으로 neurobasal feeding media(100 ml neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I)를 1/3씩 첨가하였다.

## 2) 저산소증 유발

Culture plate를 CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator (Forma Scientific Inc.)에 넣고 2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 환경에서 3 시간 처리하여 저산소증을 유도하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소 환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

## 3) LDH assay

배양 시작일인 DIV 0(0 day *in vitro* : DIV)부터 각각 五味子 0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하고, DIV 10에 저산소증을 유도하였다. 저산소증을 유도하기 직전, 즉 정상 산소 환경 및 저산소증 유발 후 1, 3 일에 각각 배양액 50  $\mu\text{l}$ 를 24-well plate에 옮기고 LDH solution C(Takara)를 50  $\mu\text{l}$ 씩 가한 다음, 상온에서 30 분간 흔든 다음 ELISA reader로 흡광도(OD<sub>450</sub>)를 측정하였다.

## 4) 활성산소(ROS) 생성세포 염색

ROS 생성세포는 형광 색소인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(H<sub>2</sub>DCF-DA)를 사용하여 관찰하였다. DIV 0부터 각각 五味子 0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 신경세포를 DIV 10에 저산소증을 유발한 후 1, 3 일에 각각 염색하였다. H<sub>2</sub>DCF-DA 처리 전에 세포를 neurobasal feeding media로 씻어주었다. H<sub>2</sub>DCF-DA를 최종 농도 10 nM이 되도록 배양액에 넣고 10 분 동안 CO<sub>2</sub> 배양조에서 배양시킨 후 neurobasal feeding media로 두 번 씻어준 다음 형광현미경으로 관찰하였다. H<sub>2</sub>DCF-DA는 dimethylsulfoxide(DMSO)로 50 mM의 stock을 만들고 이를 neurobasal feeding media로 5,000 배 희석하여(10 nM) 세포에 처리하였다.

## 5) Mitochondrial membrane potential(MMP) imaging

MMP는 형광 색소인 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl- carbocyanine iodide(JC-1)를 사용하여 관찰하였다. DIV 0부터 五味子 추출물 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 신경세포를 DIV 10에 저산소증을 유발한 후 1, 3 일에 각각 염색하였다. JC-1

처리 전에 세포를 neurobasal feeding media로 씻어 주었다. JC-1을 최종농도 1 ng/ml가 되도록 배양액에 넣고 20 분 동안 CO<sub>2</sub> 배양조에서 배양시킨 후 neurobasal feeding media로 두 번 씻어준 다음 형광현미경으로 관찰하였다. JC-1은 DMSO에 0.5 mg/ml로 stock을 만들고 이를 neurobasal feeding media로 2,000 배 희석하여(1 ng/ml) 세포에 처리하였다.

## 6) 통계처리

LDH 방법을 이용한 생존율은 24-well plate에 세포를 배양 후 4 well의 평균치로 대조군에 대한 백분율(% of control)로 표시하였고, trypan blue 염색에 의한 생존율은 4 well에서부터 5-7개의 현미경사진에서 얻은 약 100개의 세포를 분석하였다. ROS 분석은 4 well에서부터 4-5개의 형광현미경사진에서 얻은 약 50개의 세포를 분석하였으며, MMP은 4-5개 세포로부터 얻은 약 100개의 형광반점(cluster)을 분석하였다. 통계학적 유의성은 Mann-Whitney U test로 검증하였으며, *p* 값이 0.05 이하 및 0.01이하를 유의 및 매우 유의함으로 정의하였다.

## III. 결 과

## 1. 五味子が 정상산소환경(normoxia)에서 신경세포의 생존율에 미치는 영향

五味子 추출물을 농도별로 첨가한 배지에 흰쥐 해마신경세포를 배양하고, 13 일째에 각각 LDH 측정으로 세포 생존율을 조사하였다(Fig. 1C). 그 결과 五味子 추출물로 처리한 실험군은 五味子 추출물로 처리하지 않은 대조군에 비하여 2.5~20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포보호효능이 있었다(Fig. 1A). 이 가운데 5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 가장 좋은 효능을 보였으며, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도부터는 세포체가 모이는 현상이 나타났다(Fig. 1B, arrows).

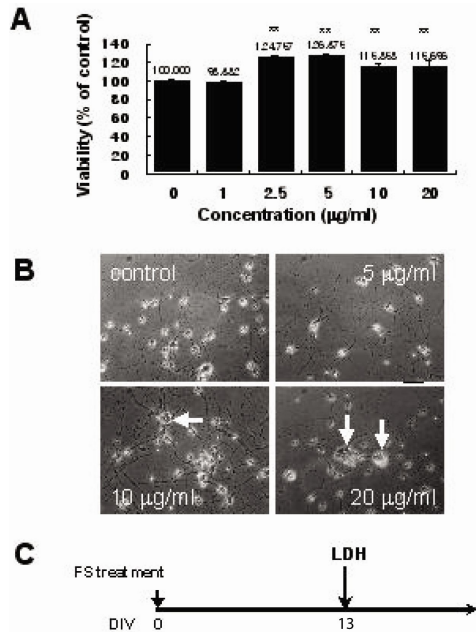


Fig. 1. The effects of *Fructus Schisandrae* on cultured hippocampal neurons.

*Fructus Schisandrae* water extracts were added at various concentration in the culture media from the beginning. Cell viability was measured by LDH assay on 13 days. A, LDH assay. There are neuroprotective effects at 2.5~20 µg/ml. B, Phase-contrast images of typical fields. Aggregation of cell bodies at higher concentrations were marked by arrows. Scale bar, 50 µm. C, Experimental scheme(LDH assay on DIV 13). Control, No-treated *Fructus Schisandrae* water extracts; Sample, treated *Fructus Schisandrae* water extracts with various concentration in the culture media from the beginning.

## 2. 저산소증에서五味자가 신경세포의 생존율에 미치는 영향

五味子 추출물을 농도별로 첨가한 배지에서 흰쥐 해마신경세포를 배양하고, DIV 10에 저산소증(2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 3 hrs)을 유발한 후 3 일째에 각각 LDH 측정으로 세포 생존율을 조사하였다. 그 결과五味자로 처리한 실험군은五味자로 처리하지 않은 대조군에 비하여 1.0~20 µg/ml의 농도에서 세포보호효능이 있었다(Fig. 2).

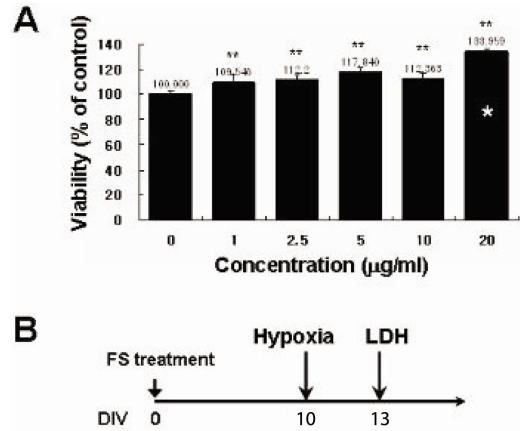


Fig. 2. The neuroprotective effects of *Fructus Schisandrae* in hypoxia.

*Fructus Schisandrae* water extracts were added at the indicated concentrations to hippocampal cultures from the beginning. A hypoxic shock was given(2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 3 hrs) on DIV 10. And then cultures were continued in normoxia and cell viability was measured by LDH assay on 3 days after shock. A, LDH assay. B, Experimental scheme. \*\*, p < 0.01. Control, No-treated *Fructus Schisandrae* water extracts; Sample, treated *Fructus Schisandrae* water extracts with various concentration in the culture media from the beginning.

## 3.五味자가 저산소증에서 활성산소(ROS)의 생성에 미치는 영향

H<sub>2</sub>DCF-DA 염색을 이용하여 ROS 물질 중 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peroxy radical, peroxynitrite anion의 생성을 조사하였다.五味子 추출물이 1.0~20 µg/ml가 첨가된 배지에서 키운 해마신경세포를 DIV 10에 저산소증을 유발하고 24 시간 후에 H<sub>2</sub>DCF-DA로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다(Fig. 3).五味子 추출물로 처리한 실험군에서는五味子 추출물로 처리하지 않은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 형광을 띠는 세포의 수 및 그 강도가 감소되었다(Fig. 4A, 4B). 저산소증 유발 후 3 일째의 ROS 생성을 같은 방법으로 조사한 결과(Fig. 5), 5.0 µg/ml의五味子 추출물을 첨가한 실험군에서는 대조군에 비하여 ROS 생성이 감소되었다(Fig. 5).

험군에서 ROS를 생성하는 세포 수와 그 강도가 유의하게( $p < 0.01$ ) 감소되었다(Fig. 5A-C).

또한 저산소증을 유발하고 24 시간 후에 Trypan blue로 염색하여 세포생존율을 조사한 결과 5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의五味子 추출물을 첨가한 실험군은五味子 추출물로 처리하지 않은 대조군에 비하여 통계적으로 유의한( $p < 0.05$ ) 증가를 나타내었다(Fig. 4C). 저산소증 유발 후 3 일째 Trypan blue 염색에서도 세포생존율을 조사한 결과 5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의五味子 추출물을 첨가한 실험군에서五味子 추출물로 처리하지 않은 대조군에 비하여 통계적으로 유의한( $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었다(Fig. 5D, E).

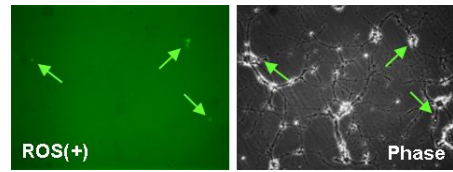


Fig. 3. Detection of reactive oxygen species (ROS)-positive cells.

Hippocampal cultures were grown with or without *Fructus Schisandrae* water extracts. Hippocampal cells were grown as in Fig. 1 and given hypoxic shock on DIV 10, and stained with 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ )(10 nM) 1 day after hypoxic shock. Cells were visualized by green fluorescence(arrow).

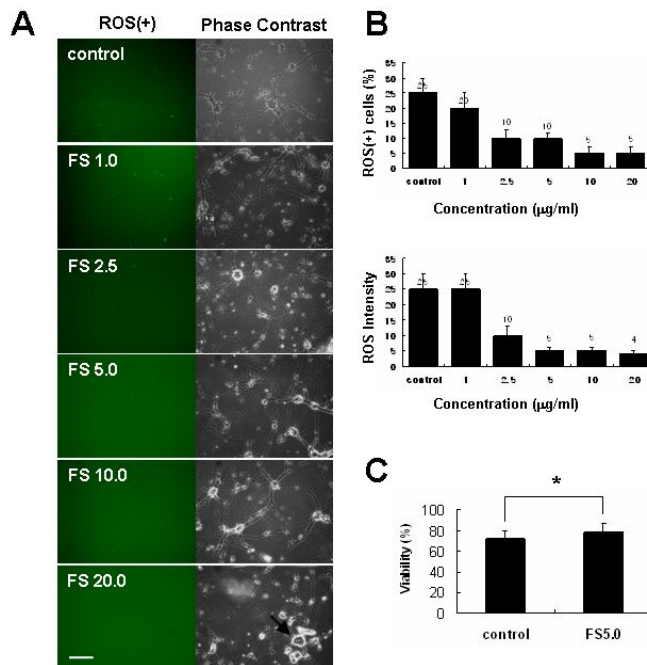


Fig. 4. The effects of *Fructus Schisandrae*(FS) against reactive oxygen species(ROS) generation(1 day after shock).

Hippocampal cells were grown as in Fig. 1 and given hypoxic shock on DIV 10, and stained with 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ )(10 nM) 24 hours after hypoxic shock. A. Fluorescence images of ROS-generating(ROS+) cells(green) and corresponding phase-contrast images are shown. B. Statistics. ROS(+ cells) (% of total; upper panel) and intensities(arbitrary number) of ROS(lower panel) are shown. C. Viability. Cells were stained with trypan blue. \*,  $p < 0.05$ . Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . Control, No-treated *Fructus Schisandrae* water extracts; Sample, treated *Fructus Schisandrae* water extracts with various concentration(1.0~20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the culture media from the beginning.

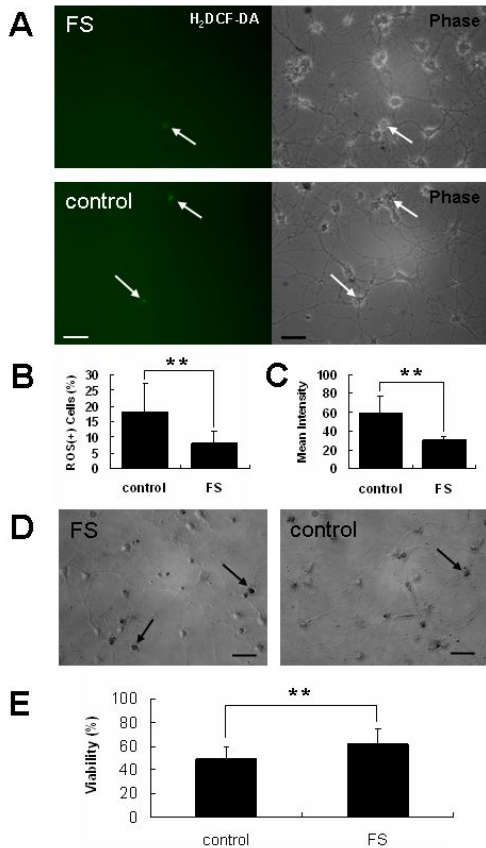


Fig. 5. The effects of *Fructus Schisandrae* against reactive oxygen species(ROS) generation(3 days after shock).

Hippocampal cells were grown as in Fig. 1 and given hypoxic shock on DIV 10, and stained with 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) (10 nM) 3 days after hypoxic shock. A. Fluorescence images of ROS-generating (ROS+) cells(green) and corresponding phase-contrast images are shown. B-C. Statistics. ROS(+) cells (% of total) (B) and intensities (arbitrary number) of ROS(C) are shown. D-E. Viability. Cells were stained with trypan blue(D) and viability(% of total) is shown. \*\*, p < 0.01. Scale bar, 50  $\mu$ m. Control, No-treated *Fructus Schisandrae* water extracts; Sample, treated *Fructus Schisandrae* water extracts with 5.0  $\mu$ g/ml concentration in the culture media from the beginning.

#### 4.五味자가 저산소증에서 MMP 유지에 미치는 효과

五味子 추출물을 5.0  $\mu$ g/ml의 농도로 첨가한 배지에서 키운 흰쥐해마신경세포를 DIV 10에 저산소증을 유발하고, 24 시간 후에 관찰한 모양을 형광현미경사진으로 나타내었다(Fig. 6). 전반적으로五味子로 처리하지 않은 대조군에서는 붉은 색 형광이 실험군에 비하여 미약하였다(Fig. 6A, 6B). 붉은 색 형광의 강도를 측정한 결과 5.0  $\mu$ g/ml의五味子 추출물을 첨가한 실험군은五味子로 처리하지 않은 대조군에 비하여 유의한(p < 0.01) 증가를 나타내었다(Fig. 6C). 저산소증 유발 후 3 일째에도 마찬가지로 유의한(p < 0.01) 증가를 나타내었다(Fig. 7).

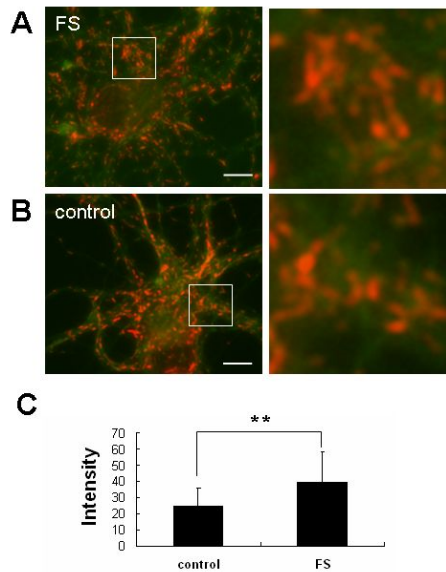


Fig. 6. The effects of *Fructus Schisandrae*(FS) on mitochondrial membrane potential (MMP) at 24 hrs after hypoxic shock.

Hippocampal cells were grown as in Fig. 1 and hypoxic shock was given on DIV 10. A-B. Cells were stained with JC-1(1 nM) at 24 hrs post-shock. Examples of typical fluorescence images were shown. C. Statistics. \*\*, p < 0.01) Scale bar, 10  $\mu$ m. Control, No-treated *Fructus Schisandrae* water extracts; Sample, treated *Fructus Schisandrae* water extracts with 5.0  $\mu$ g/ml concentration in the culture media from the beginning.



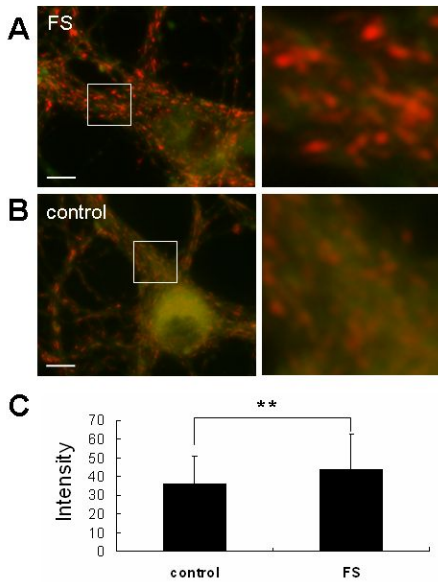


Fig. 7. The effects of *Fructus Schisandrae*(FS) on mitochondrial membrane potential (MMP) on 3 days after hypoxic shock.

Hippocampal cells were grown as in Fig. 1 and hypoxic shock was given on DIV 10. A-B, Cells were stained with JC-1(1 nM) after 3 days post-shock. Examples of typical fluorescence images are shown. C, Statistics. \*\*,  $p < 0.01$  Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . Control, No-treated *Fructus Schisandrae* water extracts; Sample, treated *Fructus Schisandrae* water extracts with 5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration in the culture media from the beginning.

#### IV. 고찰

中風은 人事不省, 手足癱瘓, 口眼喎斜, 言語蹇澀, 偏身麻木 등의 임상증상을 나타내는 병증으로 주요 사망원인 중의 하나인 뇌혈관 질환을 포함하는 한방질환명이다<sup>1,17</sup>. 허혈 및 출혈로 분류되는 뇌혈관질환에서 뇌혈관의 혈류장애로 인한 허혈은 산소, glucose 및 대사물질의 부적절한 공급에 의한 조직관류의 감소로 인하여 발생하며<sup>18</sup>, 뇌신경세포는 허혈·저산소 상태에서 산화스트레스에 의해 비가역적 손상을 입게 되므로<sup>3-4</sup> 신경세포사 예방은

매우 중요하다. 따라서 뇌허혈 급성기에 뇌손상을 감소시키기 위해 신경세포 손상을 최소화시키는 항산화제에 관한 연구가 진행되고 있다.

최근 천연약물의 신경세포 항산화 작용에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데, 黃芩은 대뇌세포의 저산소증 모델에서 유전자 표현에 영향을 미쳐 세포보호효과를 나타내었으며 葛根은 전뇌허혈로 유발된 뇌허혈 손상을 억제하고 oxidative stress에 의한 세포독성을 억제하였다. 黃連 또한 저산소증에서 신경세포사망억제효능을 보여주었으며 활성산소를 제거하였다. 그 밖에 白芷, 石菖蒲, 木香 및 麝香 등도 신경세포사 방지와 세포보호에 유의한 효과를 나타내었다<sup>19-24</sup>.

五味子是 五味子科에 속하는五味子的 열매로 약리작용으로는 혈압강화작용과 심근수축 증가작용이 있으며, 진해작용, 간염 억제작용, 수면시간의 연장과 콜린신경계의 활성화 작용 등이 보고되었다<sup>25</sup>.

최근五味子的 항산화 작용에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데, dibenzocyclooctadiene 유도체의 일종인 Schisandrin B는五味子的 주성분으로 간과 심장에 항산화효능이 있는 것으로 알려져 있다<sup>26</sup>. 또한 신경세포의 항산화작용에 대해서도 그 효과를 나타내고 있는데 Schisandrin B는 지질 과산화화(lipid peroxidation)를 유발하고 글루타티온 항산화제 상태(glutathione antioxidant status)를 손상시키는 tert-butylhydroperoxide(t-BHP)의 독성을 감소시켰다<sup>13</sup>.五味子的 메탄올 추출물은 흰쥐 대뇌신경세포배양에서 L-glutamate에 의한 신경독성을 줄였으며, Kim 등<sup>14</sup>은五味자가 glutamate에 의한 신경세포사 미치는 영향에 대하여 조사한 결과五味子 추출물이 신경세포사 방지에 효능이 있는 것으로 확인하였고, 그 기전으로 칼슘의 세포내 유입 방지, glutathione defense system의 증강, 그리고 세포내 peroxide의 농도감소를 보고하였다. 이러한 결과는五味자가 흥분독성에 의한 신경세포의 손상을 억제함을 시사한다.

인체 내 산화적 손상을 야기하는 ROS는 생체내 산소가 유입되어 세포내에서 이용될 때의 부산물이며, 세포막 내의 불포화지방산, nucleotides, sulfhydryl과 결합함으로써 세포의 생화학적 특성 변화 등 조직 손상을 일으키고, DNA 산화로 염증을 유발해 세포내 신호전달에 영향을 미친다<sup>27-8</sup>. 뇌신경세포에서도 허혈·저산소증 또는 재판류에 의한 흥분독성으로 ROS가 증가하고 세포의 주요 구성물질을 손상시킨다<sup>29</sup>.

ROS의 주된 원천은 mitochondria의 전자전달계이며, 세포내  $Ca^{2+}$ 의 항상성 유지와 ROS의 생산이라는 mitochondria의 역할들이 보고되면서 세포사에 있어서 mitochondria의 중요성이 인식되고 있다<sup>30</sup>. Mitochondria의 막전위(MMP) 소실, 전자전달계인 호흡사슬(respiratory chain)의 와해, ROS의 과잉 생산, mitochondria 막사이 단백질의 용해 및 세포내  $Ca^{2+}$ 와 glutathion의 과다유입 등은 세포괴사와 세포자살을 유발시킨다<sup>31-2</sup>. 따라서 mitochondria의 기능, 특히 MMP 변화 관찰은 세포사 결정에 있어 필수적 요건이다<sup>33</sup>.

Mitochondria가 ROS에 노출되면 mitochondria 내막의 막단백질들이 직경 2~3 nm의 비특이적 미토콘드리아 투과 전이 구멍(mitochondrial permeability transition pore, PTP)을 형성하게 되며<sup>34</sup>, 그 결과 산화적 인산화가 장애를 받게 되어 활발한 세포대사를 의미하는 MMP(mitochondria membrane potential, MMP)가 감소된다<sup>7</sup>. MMP가 감소되면 ATP를 합성할 수 없고 세포내  $Ca^{2+}$ 의 증가가 일어나게 된다<sup>8-9</sup>. 증가된 세포내 칼슘은 미토콘드리아 속에 남아 생물에너지 기능장애를 일으키게 되고<sup>9</sup>, 또한  $Ca^{2+}$ 는 분해효소나 ROS를 생성하는 효소들을 활성화시키거나 비선택적 투과공인 PMT(mitochondrial permeability transition)를 활성화시키므로,  $Ca^{2+}$ 의 세포내 유입방지는 허혈손상으로부터 미토콘드리아를 보호하는데 중요한 역할을 담당하게 된다<sup>35-6</sup>.

본 연구에서는五味子的 추출물이 저산소증 모델의 신경세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여

흰쥐의 뇌 신경세포를 취하여五味子を 농도별로 처리하고 저산소증을 유도한 후 LDH, ROS 및 MMP를 측정하여五味子が 활성산소 생성 및 세포사 억제에 미치는 영향을 조사하였다.

정상산소환경(normoxia)에서 배양 13 일(DIV 13)에 조사한 결과五味子是 세포의 생존율을 유의하게 증가시켰다. 또한 저산소증을 유도한 대뇌신경세포의 세포사 억제효능을 3 일째에 LDH 측정방법으로 조사한 결과五味子 추출물을 첨가한 실험군은 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 생존율 증가를 나타내었다. 이는五味子が 신경세포 보호 효능이 있음을 의미한다.

ROS의 측정은 형광을 생성하는 탐색물질(fluorogenic probe)인 2', 7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate( $H_2DCFDA$ )를 이용하였다.  $H_2DCFDA$ 는 세포와 조직의 산화활성정도를 알아보기 위하여 주로 사용되는데, 이 'dihydro' 유도체는 일부 ROS에 의하여 쉽게 산화되어 원래 물질인 fluorescein으로 돌아갈 수 있으므로 초록색 형광빛을 나타나게 된다<sup>37</sup>.  $H_2DCFDA$ 는 세포막을 통과하여 세포내로 들어갈 수 있으며 세포내에서 탈아세틸화형태인 2'7'- dichlorodihydrofluorescein( $H_2DCF$ )를 형성하고 산화에 민감하게 반응하여 형광산물인 2'7'-dichlorofluorescein(DCF)를 형성하게 된다. 즉 DCF의 세포내축적이 산화환원 활성물질(redox-active substances)의 생성을 의미한다<sup>38</sup>.

본 연구에서 저산소증 처리 후 24 시간 및 3 일 후에 약제를 첨가하지 않은 대조군에서는 전체 세포의 약 25%가 형광염색이 될 정도로 ROS가 생성되었으나,五味子 추출물로 처리한 실험군에서는 이러한 세포수가 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 형광의 강도도 유의하게 감소하였다. 이는五味子 추출물이 ROS를 효율적으로 제거함을 시사한다.

JC-1(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazocarbocyanineiodide)은 양이온 색소로서 색소가 단량체로 존재하면 녹색 형광을 내고 색소가



높은 농도에서는 'J-aggregates'를 형성하여 붉은 색 형광을 낸다. 즉 MMP는 특정 색소를 에너지 생산이 활발한 미토콘드리아로 유인하는데<sup>39</sup>, JC-1은 MMP에 비례하여 미토콘드리아 내로 들어가므로 낮은 막전위에서는 녹색 형광을, 높은 막전위에서는 붉은 색 형광을 내므로 미토콘드리아의 막전위를 민감하게 측정하는데 이용된다.

저산소증과 같은 병리적인 환경에서는 미토콘드리아 내  $Ca^{2+}$ 의 농도가 과도하게 높아져 미토콘드리아의 막전위(MMP)의 소실을 야기하는데<sup>34</sup> 이러한 막전위의 소실은 곧 미토콘드리아의 기능을 나타내는 지표로 간주된다<sup>40</sup>. 본 실험에서는 저산소증 유발 후 24 시간 및 3 일 후에 관찰하였을 때五味子 추출물로 처리한 실험군이 대조군에 비하여 상당히 강한 붉은 색을 띠고 있었다. 이는 곧五味子가 MMP의 유지에 효과가 있음을 의미한다.

이상의 실험결과로五味子是 정상산소 환경 및 저산소증에서 신경세포를 보호하며, 저산소증에서 ROS 생성을 낮추고, MMP 소실을 억제하여 산화스트레스로 인한 세포사를 방지하는 것으로 생각된다.

## V. 결 론

五味子(*Fructus Schisandrae*)의 신경세포 보호작용을 검증하기 위하여 세포사멸억제효능을 확인하고, ROS의 생성 및 MMP 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1.五味子 추출물은 정상산소환경(normoxia) 및 저산소증(hypoxia)에서 신경세포 보호효능이 있었다.
2.  $H_2DCF-DA$ 를 이용하여 ROS의 생성을 조사한 결과五味子 추출물은  $H_2DCF-DA$ 에 염색되는 세포의 수와 정도를 유의하게 감소시켰다.
3. JC-1으로 MMP 변화에 미치는 영향을 조사한 결과五味子 추출물은 MMP 소실을 유의하게

방지하였다.

이상으로五味子是 정상산소 환경 및 저산소증에서 신경세포 보호 작용과 항산화효능이 있음을 확인하였다.

## 참고문헌

1. 통계청. 사망원인통계연보. 2007.
2. 고재영, 김양희. 신경계질환에서의 아포토시스 유전 제2권. 서울:월드사이언스. 1998:147-65.
3. Kenneth W, Lindsay, Ian Bone. 임상신경학. 서울: 범문사: 2002. p. 421-3.
4. Beltran B, Mathur A, Duchon MR, Erusalimsky JD, Moncada S. The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(26):14602-7.
5. Basu AK, Loechler EL, Leadon SA, Essignann JM. Genetic effects of thymine glycol: site-specific mutagenesis and molecular modeling studies. Pro Natl Acad Sci USA. 1989;86:7677-81.
6. Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. Biochimie. 2002;84(2-3):131-41.
7. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사: 2003. p. 2-28.
8. Schild L, Huppelsberg J, Kahlert S, Keilhoff G, Reiser G. Brain mitochondria are primed by moderate  $Ca^{2+}$  rise upon hypoxia · reoxygenation for functional breakdown and morphological disintegration. Biol Chem. 2003;278(28):25454-60.
9. Zaidan E, Sims NR. The calcium content of mitochondria from brain subregions following short-term forebrain ischemia and recirculation in the rat. Neurochem. 1994;63(5):1812-19.
10. 許浚 東醫寶鑑. 서울: 법인문화사: 1999. p. 945-96.

11. 류중훈 외. 한방약리학. 서울: 신일상사; 2005, p. 307-12.
12. 吳普. 神農本草經. 서울: 醫聖堂; 2003, p. 91.
13. Ko KM, Lam BY. Schisandrin B protects against tert-butylhydroperoxide induced cerebral toxicity by enhancing glutathione antioxidant status in mouse brain. *Mol Cell Biochem.* 2002;238(1-2):181-6.
14. Kim SR, Lee MK, Koo KA, Kim SH, Sung SH, Lee NG, Markelonis GJ, Oh TH, Yang JH, Kim YC. Dibenzocyclooctadiene lignans from *Schisandra chinensis* protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced toxicity. *J. Neurosci Res.* 2004;76(3):397-405.
15. Ichikawa H, Wang L, Konishi T. Prevention of cerebral oxidative injury by post-ischemic intravenous administration of Shengmai San. *Am J. Chin Med.* 2006;34(4):591-600.
16. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, and Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci Res.* 1993;35:567-76.
17. 전국한의과대학심계내과학교실. 心系內科學. 서울: 군자출판사; 2006, p. 331-2.
18. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemiareversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Progress in Brain Res.* 1985;63:39-58.
19. 최주리, 신길조, 이원철, 문일수, 정승현. 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 황련의 활성산소 생성 억제와 신경세포사 억제. *생명과학회지.* 2008;18(3):311-7.
20. 김성배, 정승현, 신길조, 이원철. 배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 황芻이 유전자 표현에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 2004;25(4):324-36.
21. 이영호, 정승현, 신길조, 문일수, 이원철. PC12 손상 세포 및 전뇌허혈 유발 Gerbil에 대한 白芷의 細胞保護效果. *대한한의학회지.* 2003;24(1):110-21.
22. 박동준, 정승현, 문일수, 이원철, 신길조. 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 石菖蒲가 유전자 표현에 미치는 영향. *생명과학회지.* 2007;17(1):150-61.
23. 류도균, 정승현, 신길조, 이원철, 문일수. 木香 및 麝香이 저산소증 유발 배양 대뇌신경세포에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 2003;24(2):348-57.
24. 정수현, 정승현, 신길조, 이원철. PC12 손상 세포 및 전뇌허혈 유발 Gerbil에 대한 葛根의 세포보호효과 연구. *대한한방내과학회지.* 2003;24(4):767-77.
25. 김창민 외. 完역. 中약대사전. 서울: 정담; 1998, p. 88-103, 1648-57, 3958-68, 4477-98, 6460-71.
26. Chiu PY, Leung HY, Poon MK, Ko KM. Chronic schisandrin B treatment improves mitochondrial antioxidant status and tissue heat shock protein production in various tissues of young adult and middle-aged rats. *Biogerontology.* 2006;7(4):199-210.
27. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med.* 1999;31:53-9.
28. Balavoine G GA, YV Geletti. Peroxynitrite scavenging by different antioxidants. part 1: convenient assay, Nitric Oxide. *Biology and Chemistry.* 1999;3:40-54.
29. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J. Physiol Cell Physiol.* 2002;282(2):C227-41.
30. Rego AC, Oliveira CR. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity

- and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res.* 2003;28(10):1563-74.
31. Ashktorab H, Ahmed A, Littleton G, Wang XW, Allen CR, Tackey R, Walters C, Smoot DT. p53 and p14 increase sensitivity of gastric cells to *H. pylori*-induced apoptosis. *Dig Dis Sci.* 2003;48(7):1284-91.
  32. Nieminen AL. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. *Int Rev Cytol.* 2003;224:29-55.
  33. Duchen MR. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J. Physiol.* 1999;516:1-17.
  34. Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore: a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg Biomembr.* 1994;26(5):509-17.
  35. Bernardi P. Mitochondria in muscle cell death. *Ital J. Neurol Sci.* 1999;20(6):395-400.
  36. Kudo M, Aono M, Lee Y, Massey G, Pearlstein RD, Warner DS. Effects of volatile anesthetics on N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in primary rat neuronal-glia cultures. *Anesthesiology.* 2001;95(3):756-65.
  37. Zhu H, Bannenberg GL, Moldeus P, Shertzer HG. Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlorofluorescein. *Arch Toxicol.* 1994;68(9):582-7.
  38. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 1983;130(4):1910-7.
  39. Poot M, Pierce RC. Detection of apoptosis and changes in mitochondrial membrane potential with chloromethyl-X-rosamine. *Cytometry.* 1999;36(4):359-60.
  40. Cazzalini O, Lazze MC, Iamele L, Stivala LA, Bianchi L, Vaghi P, Cornaglia A, Calligaro A, Curti D, Alessandrini A, Prosperi E, Vannini V. Early effects of AZT on mitochondrial functions in the absence of mitochondrial DNA depletion in rat myotubes. *Biochem Pharmacol.* 2001;62(7):893-902.