

국내산 참다래 추출물의 신경독성 방어효과

김정희¹, 양희경¹, 홍현주¹, 강원영¹, 김동건¹, 김성철², 송관정³, King Dale¹, 한창훈¹, 이영재^{1*}¹제주대학교 수의과대학, ²국립원예특작과학원 온난화대응농업연구센터, ³제주대학교 생명자원과학대학Neuroprotective Effects of Korean Kiwifruit
against *t*-BHP-induced Cell Damage in PC12 CellsJeong Hee Kim¹, Heekyoung Yang¹, Hyun Ju Hong¹, Won Young Kang¹, Dong Geon Kim¹,
Seong Cheol Kim², Kwan Jeong Song³, Dale King¹, Chang Hoon Han¹, and Young Jae Lee^{1*}¹College of Veterinary Medicine, Jeju National University, 66 Jejudaehakno, Jeju 690-756, Korea²Agricultural research Center for Climate Change, NIHHS, RDA, Jeju 690-150, Korea³Faculty of Bioscience & Industry, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract - Oxidative stress induced by reactive oxygen intermediates has been implicated in a variety of human diseases including neurodegenerative disorders, cancer, cardiovascular and respiratory diseases, and mode of action of environmental toxicants. *Tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) is an organic lipid hydroperoxide analogue, which is commonly used as a pro-oxidant for evaluating mechanisms involving oxidative stress in cells and tissues. In this study, the underlying mechanisms involved in the protective effects of Hwabuk 94 kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. 'Hwabuk 94'), which is cultivated in Jeju, on the *t*-BHP-induced cytotoxicity in PC12 cell. The pretreatment of rat pheochromocytoma cell line PC12 with Hwabuk 94 extract (1-100 µg/ml) resulted in a significant recovery from *t*-BHP-induced cell death and increased Bcl-2 and procaspase-3 expression, whereas the expression of Bax and cleaved PARP were decreased in a dose-dependent manner compared to the control. Furthermore, Hwabuk 94 inhibited the *t*-BHP-induced p38 MAP kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2, but not c-Jun N-terminal kinase activations. Finally, these findings suggest that Hwabuk 94 kiwifruit might attenuate *t*-BHP-induced PC12 cell cytotoxicity, at least in part, through the inhibition of signaling pathways mediated by the ERK1/2 and p38 MAP kinase.

Key words - kiwifruit, Hwabuk 94, *t*-BHP, rat pheochromocytoma (PC12) cells, Bcl-2, Bax, procaspase-3, ERK1/2, p38 MAP kinase

서 언

참다래(Kiwifruit)는 다래나무과(Family *Actinidiaceae*), 다래속(Genus *Actinidia*)에 속하며, 아열대지역에서 자라는 자용이주의 덩굴성 낙엽과수 이다(Lee et al., 1989). 성숙한 과실은 비타민 C의 함량이 높고 Ca, K, Fe 및 Mg 등 다양한 무기양분과 아미노산 및 섬유소가 풍부하여 영양학적 가치가 매우 높은 것으로 알려져 왔다(Cui et al., 2002; Nishiyama et al., 2004).

현대 사회의 눈부신 발달과 더불어 생체조직의 노화를 비롯한 퇴행성 신경질환이 최근 사회적인 문제로 대두되고

있다. 이러한 질환의 주된 원인이 활성산소(free radical, oxygen radical)로 알려져 있어(Sagara et al., 1998), 활성산소를 조절할 수 있는 항산화제의 개발과 연구에 더 많은 관심이 집중되고 있다. 활성산소들은 불안정하고 산화력이 높아 여러 생체물질과 쉽게 반응하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화 스트레스를 유발한다. 그 결과 지질의 과산화, 단백질의 산화, DNA의 변성 등을 야기하고, 그 구조를 파괴함으로써 세포가 정상적인 기능을 할 수 없게 되어 결국 세포사에 이르게 된다(Jacobson, 1996). 특히 다른 장기에 비해서 뇌는 대사를 위한 산소 이용률이 높고 과산화지질의 함량도 높은 반면에 활성산소에 대한 산화방지 효소계나 저분자의 산화방지제가 타 조직에 비해 상대적으로 적은 관개로 유해 활성산소나 라디칼에 의한

*교신저자(E-mail) : yjlee3@jejunu.ac.kr

산화적 손상에 대하여 매우 약하기 때문에 신경세포의 사멸 유도로 인한 퇴행성 신경질환과 관련이 큰 것으로 알려지고 있다(Good et al., 1996; Omodeo-Sale et al., 1997; Choi et al., 2005).

한편, 퇴행성 신경질환 등 성인병에 대한 인식이 최근 점차 높아지고 있고, 과실 소비자들의 건강기능성에 대한 관심도 급격히 증가하고 있다. 이에 따라 참다래에서도 변비개선효과(Rush et al., 2002), 항암작용(Zhong et al., 2005), 항산화 작용(Park et al., 2006) 등 과실의 기능성에 대한 연구가 부분적으로 수행되고 있으나, 참다래의 약리효능적 측면의 연구는 초보적인 단계이며, 특히 신경세포 보호효과와 관련된 연구는 보고된 바가 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 산화적 스트레스로부터 유도되는 신경세포의 사멸을 보호할 수 있는 생리 활성물질을 탐색하기 위한 목적으로 참다래 과실의 추출물을 이용하여 *t*-BHP에 의해 손상된 PC12 신경 세포주에 대한 보호효과를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

참다래(*Actinidia deliciosa*) 과실은 제주도 농촌진흥청 국립원예특작과학원 온난화대응농업연구센터에서 재배한 '화북 94'를 제공받아 사용하였다. 참다래의 과피를 분리 제거 후 과육부위를 건조 및 분쇄하였고, 80% 메탄올을 첨가하였다. 추출액을 여과시킨 후 회전 농축기로 농축시킴으로써 메탄올 추출물을 얻었다.

세포 배양

PC12를 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank; KCLB, 서울, 한국)로부터 분양 받아 penicillin-streptomycin 100 units/mL과 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양을 수행하였다.

MTT assay을 통한 세포 생존율 측정

참다래(화북94)추출물의 신경세포 보호효과를 측정하기 위하여 MTT reduction assay를 실시하였다. 세포주를 1×10⁵ cells/mL로 맞추고 96-well plate에 각각 200 μL씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서

배양한 후, DMSO에 녹인 화북94 추출물을 각각 1, 10, 50, 100 μg/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 배양한 후 600 μM *t*-BHP를 처리하여 3시간 배양하고 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT(2 mg/mL)용액을 50 μL씩 첨가하여 4시간 동안 다시 배양하였다. 반응 후 well 바닥에 형성된 formazan이 흡어지지 않게 상등액을 제거하고 DMSO 200 μL 첨가하여 녹이고 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

신경세포의 형태학적 변화 관찰(Hoechst 33342 염색)

24-well plate에 1×10⁵ cells/mL로 24 시간 동안 배양하여 추출물을 농도별(1, 10, 50, 100 μg/mL)로 24시간 처리한 후 600 μM *t*-BHP를 처리하여 5시간 반응하였다. PBS 완충액으로 2회 세척하고 Hoechst 33342로 30분 동안 염색하였다. 염색 후 형광현미경 하에서 관찰하였다.

DNA 단편화 관찰

PC12 세포(1×10⁵/mL)를 24 시간 동안 배양하여 추출물을 농도별(1, 10, 50, 100 μg/mL)로 24시간 처리한 후 600 μM *t*-BHP를 처리하여 5시간 반응하였다. 세포를 수집한 후 Promega Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit를 사용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.5% agarose gel에서 30분(100 V)동안 전기영동을 한 다음 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator하에서 DNA단편화 현상을 관찰하였다.

Western blot analysis

배양이 끝난 세포를 수집하여 2~3회 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 세척 한 후 500 μL의 lysis buffer을 첨가하여 30분간 lysis 시킨 후 13,000 rpm에서 5분간 원심하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(Bovine Serum Albumin)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량 하였다. 30~50 μg의 lysate를 8~15% mini gel SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF(Polyvinylidene difluoride) membrane(Millipore Corporate, Billerica, MA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 Membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS(TBS + 0.1% Tween 20)용액에서 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정

하였다. 일차항체는 anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-cleaved PARP, anti-pERK1/2, anti-ERK1/2, anti-pp38, anti-p38, anti-pJNK, anti-JNK(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-procaspase-3(Santa cruz Biotech, MA, USA)을 TTBS 용액에서 1: 1000으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 이차항체로는 HRP(Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-mouse 및 anti-rabbit IgG(Santa cruz Biotech, MA, USA)를 1: 5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질(Intron Biotechnology, USA)과 1~3분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

통계처리

각 실험결과는 평균값 ± 표준편차로 나타내었고, student *t*-test를 이용하여 통계 처리한 후 *p*<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

참다래 추출물의 신경세포 보호효과

참다래(화북94)추출물의 *t*-BHP에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에서 PC12 세포주에 대한 신경세포 보호효과에 대한 결과는 Fig. 1과 같다. 먼저 *t*-BHP에 의해 유도되는 PC12세포주의 손상에 대한 신경세포 보호효과를 확인하기 위해 tetrazolium salt의 하나인 MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도로 측정하였다. 아무것도 처리하지 않은 무처리군과 *t*-BHP (600 μ M)을 처리한 대조군 그리고 *t*-BHP와 참다래 추출

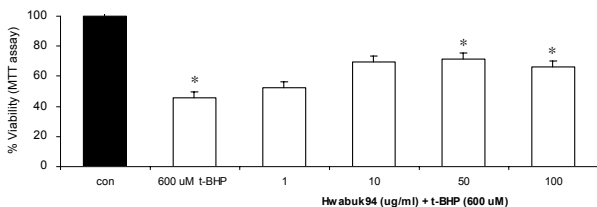


Fig. 1. Effects of Hwabuk 94 kiwifruit extract on *t*-BHP-induced cytotoxicity in PC12 Cells.

PC12 cells were pretreated with Hwabuk 94 kiwifruit extract for 24 h and then exposed to 600 μ M *t*-BHP for additional 3 h. Cell viability was measured by the reduction of MTT. Data are expressed as percent cell viability from untreated control.

물을 농도별로 처리한 실험군을 비교하였다. Fig. 1의 결과와 같이, 대조군의 세포 생존율은 45.9% 수준으로 떨어졌으나, 참다래 추출물 1, 10, 50, 100 μ g/mL로 세포주에 처리했을 때 신경세포 생존율은 52.0%, 69.7%, 71.4%, 66.1%의 농도 의존적으로 세포가 회복되는 수준을 확인할 수 있었다. 이 결과는 참다래 추출물이 *t*-BHP에 의해 유도된 PC12 신경세포 손상을 억제한다는 것을 시사한다.

참다래 추출물의 apoptosis 억제효과

참다래 추출물이 신경세포 보호 효과의 기전 연구를 위하여 산화적 스트레스로부터 유도되는 PC12 세포의 apoptosis의 활성 여부를 확인하였다. Apoptosis의 형태학적 특징 중의 하나인 핵의 변화를 관찰하기 위해서 핵 내 DNA에 특이적으로 결합하는 형광 염색제인 Hoechst 33342를 사용하여 핵을 염색하고 형광 현미경으로 관찰하였다(Fig. 2A). *t*-BHP(600 μ M)을 처리한 세포의 핵은 condensation과 fragmentation으로 인한 apoptotic body가 핵 주변에 나타나는 전형적인 apoptosis 특징을 나타내었다. 그러나 참다래 추출물을 농도별로 처리한 결과 핵의 condensation 현상과 fragmentation이 현저히 감소함을 형광 현미경을 통하여 확인하였다(Fig. 2A). 세포사멸이 일어나면 자가효소에 의해 세포내의 염색체가 잘라지게 되며 약 200-400 bp만큼 씩 불연속적인 절편(fragmentation)이 만들어지는데 이런 세포사의 일차과정인 세포핵의 변화를 관찰하기 위해서 참다래 추출물을 농도별(1, 10, 50, 100 μ g/mL)로 전처리한 다음 *t*-BHP(600 μ M)로 산화적 손상을 유도하여 DNA 단편화 현상을 전기영동으로 관찰하였다. 그 결과, Fig. 2B에서 처럼 무처리군에서는 DNA 단편화 현상이 관찰되지 않았으며 *t*-BHP만 처리하여 세포사가 유도된 경우는 관찰되었다. 하지만 참다래 추출물을 전처리한 경우 ladder가 관찰되지 않는 경향을 나타내었다. Apoptosis가 일어나는 경우에 Bcl-2 단백질의 감소 및 Bax 단백질의 증가가 관찰되는 경우가 많다. Bcl-2는 분자량 26-kDa의 단백질로서 chemoresistance에 중요한 역할을 담당하여 여러 종류의 자극에 대해 apoptosis를 억제하는 특이기능을 가지고 있다고 알려져 있다. Bax는 이와는 반대로 apoptosis를 유발하여 cell death를 촉진하는 기능이 있다. Bax는 Bcl-2와 heterodimer를 형성함으로써 Bcl-2의 anti-apoptotic effects를 방해한다(Kroemer, 1997). 참다래에 의한 신경 세포의 apoptosis 감소가 Bcl-2 계열

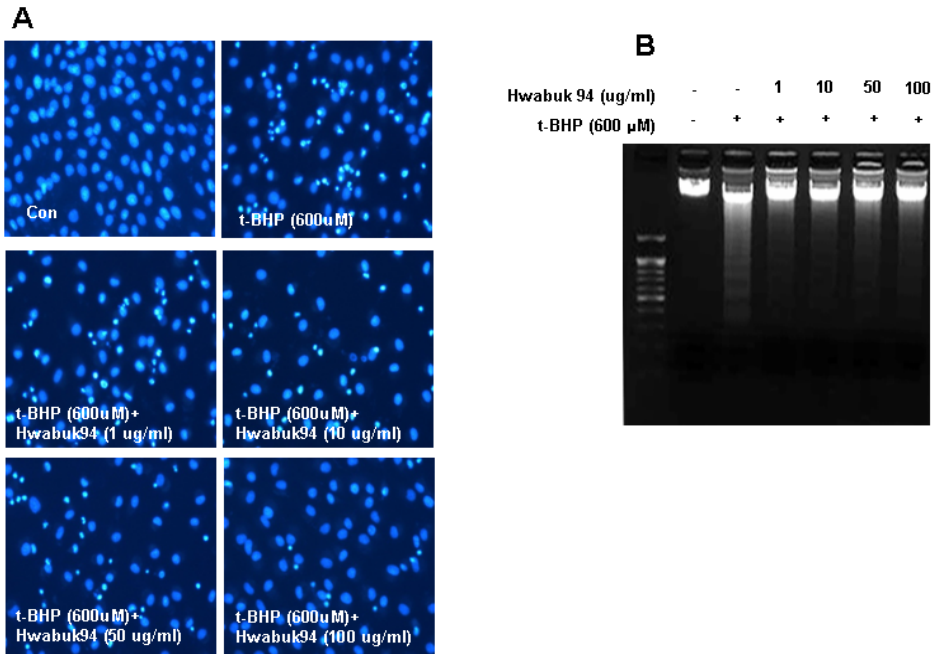


Fig. 2. Effects of Hwabuk 94 kiwifruit extract on DNA damage.

PC12 cells were pretreated with Hwabuk 94 kiwifruit extract for 24 h and then exposed to 600 μ M *t*-BHP for additional 5 h. Nuclear morphology was assessed using Hoechst 33258 (A) and DNA fragmentation was measured by agarose gel electrophoresis (B).

단백질들이 발현여부와 관련이 있는지 Bcl-2 및 Bax의 발현양상의 변화를 조사한 결과, Bcl-2의 발현은 참다래 추출물을 처리하였을 때 농도 의존적으로 증가하였고, 이와는 달리 Bax protein의 발현은 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3). 일반적으로 *t*-BHP에 의한 신경세포의 사멸은 caspase-3을 활성화시키는 apoptosis 경로로 유도된다고 알려져 있다. caspase-3은 다양한 apoptosis 자극에 의해서 공통적으로 활성화될 수 있으며, 활성화된 caspase-3은 여러 종류의 세포내 단백질들을 절단할 수 있다. PARP는 핵내에 존재하는 효소 중의 하나로서, 그 촉매부위는 apoptosis를 거치는 여러 세포에서 효과적으로 caspase-3을 포함한 여러 caspase에 의해 DNA-결합 부위로부터 절단되어 분리된다(Lazebnik et al., 1994). 참다래 추출물을 1, 10, 50, 100 μ g/mL로 처리한 경우 농도 의존적으로 caspase-3의 활성이 감소하였으며, caspase-3 기질의 하나인 PARP(116kDa)는 caspase-3의 활성도와 비례하여, PARP 분해 단백질(85kDa)이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이는 참다래 추출물이 *t*-BHP에 의한 신경세포의 apoptosis 과정 중 Bcl-2의 발현 증가, Bax의 발현 감소 및 caspase-3의 활성 감소를 통하여 신경세포의 산화적 손상을 억제한다는 것을 시사한다.

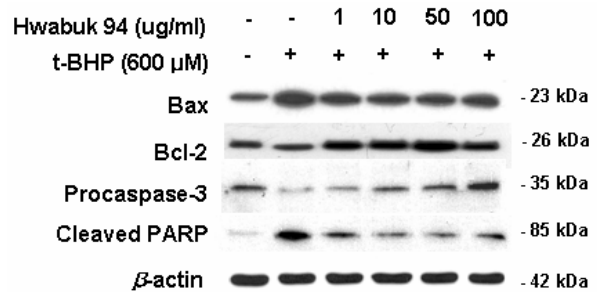


Fig. 3. Effects of Hwabuk 94 kiwifruit extract on *t*-BHP-induced apoptotic signaling in PC12 cells.

PC-12 cells were pretreated with the Hwabuk 94 kiwifruit extract (1-100 μ g/mL) for 24 h, and further incubated in the absence or presence of *t*-BHP (600 μ M) for 5 h; Expressions of Bax, Bcl-2, procaspase-3, PARP and β -actin protein were determined by Western blot.

참다래 추출물이 *t*-BHP에 의한 MAPKs 활성화에 미치는 영향

다양한 세포에서 산화적 스트레스는 MAPKs의 활성을 촉진(Matsuzawa and Ichijo, 2005)할 뿐만 아니라 MAPKs 활성증가가 산화스트레스에 의한 신경세포의 apoptosis에 관여한다고 알려져 있다(Stanciu et al., 2000; Subramaniam et al., 2004). H₂O₂에 의해 유도되는 apoptosis에서 quercetin은 ERK와 JNK 활성을 억제하여 apoptosis를 억제

한다는 보고도 있다(Ishikawa and Kitamura, 2000). 따라서 *t*-BHP 에 의해 유도된 PC12 세포의 apoptosis에서 MAPKs과 관련하여 ERK, p38, JNK 활성화에 대한 참다래 추출물의 효과를 조사하였다.

그 결과, PC12세포에 *t*-BHP를 처리하였을 때, ERK,

p38 그리고 JNK인 경우 60분에서 인산화가 최대로 증가하였다. 그리고 참다래 추출물을 농도별로 전처리 한 ERK, p38인 경우 농도의존적으로 활성이 억제되었다. 그러나 JNK인 경우는 인산화에 영향을 주지 않았다(Fig. 4). 이는 참다래 추출물이 *t*-BHP에 의한 신경세포의 apoptosis 과

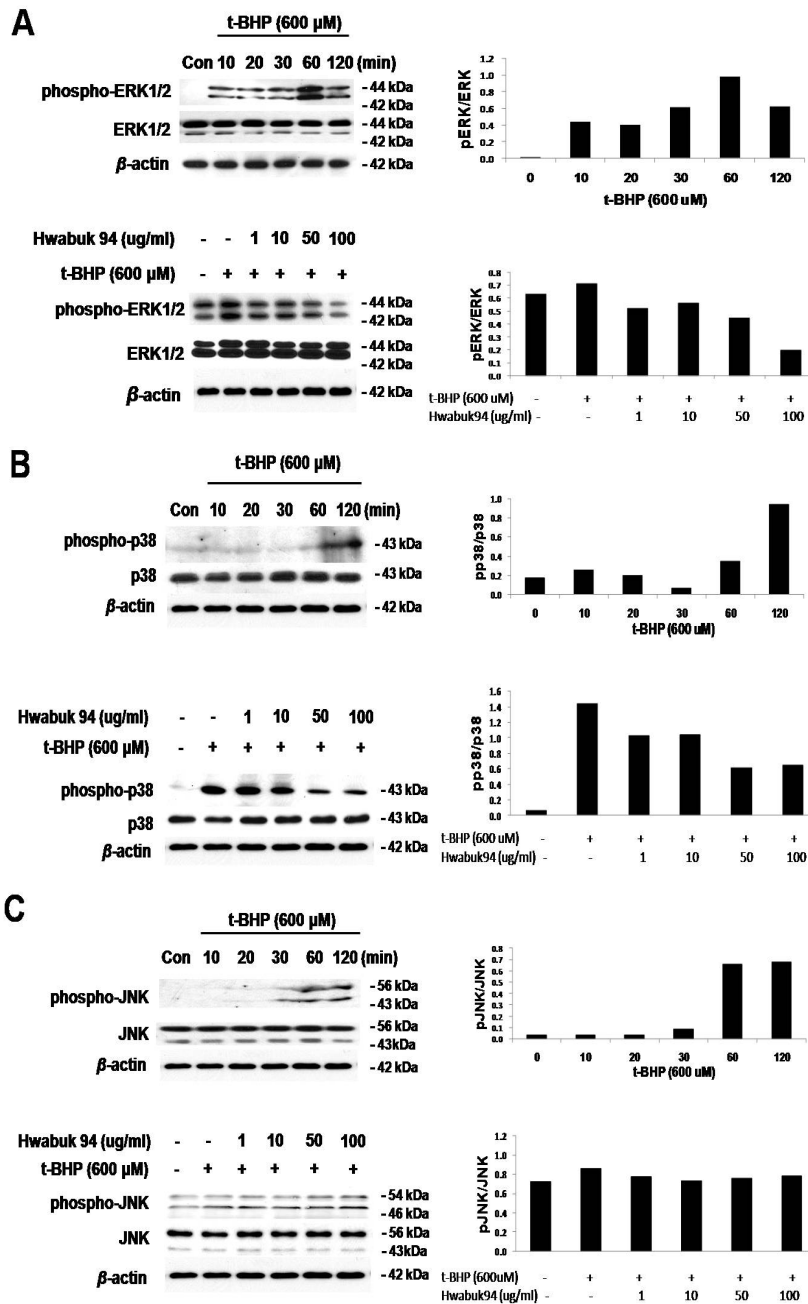


Fig. 4. Effects of Hwabuk 94 kiwifruit extract on *t*-BHP-induced activation of MAP kinase in PC12 cells.

After serum starvation for 24 h, PC-12 cell were pretreated with Hwabuk 94 kiwifruit extract (1-100 μ g/mL) for 24 h, and further incubated in the absence or presence of *t*-BHP (600 μ M) for 1 h.; Levels of the phosphorylated form of each MAPK (ERK: Thr202/Tyr204; JNK: Thr183/Tyr185; p38: Thr180/Tyr182) and the corresponding total protein were determined by Western blots.

정 중 ERK 및 p38활성 감소를 통하여 신경세포의 산화적 손상을 억제한다는 것을 시사한다.

적 요

산화적 스트레스로부터 참다래 과실 추출물의 신경세포 보호효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 신경세포주인 PC12 세포를 이용하여 참다래 과실추출물의 전처리가 산화적 손상으로부터 유발되는 신경세포사멸을 억제할 수 있는지 조사하였다. *t*-BHP에 의해 유도된 신경세포손상으로부터 세포사멸을 억제하여 세포생존도를 증가시켰으며 세포사멸로부터 형성되는 핵의 농축현상과 단편화가 현저히 감소함을 확인 할 수 있었다. 그리고 Bcl-2 단백질 발현 증가, Bax 단백질 발현 감소, caspase-3의 활성화, PARP 분해 단백질(85KDa)감소, ERK, p38 활성을 감소시켰다. 따라서 참다래 과실의 추출물은 신경세포증식효과를 통해 신경세포손상으로부터 유발되는 다양한 퇴행성 뇌질환의 예방에 도움이 될 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: 200806 A01081031)의 지원에 의해 이루어진 것임. 참다래를 제공한 국립원예특작과학원 온난화대응농업연구센터 관계자에게 감사를 표합니다.

인용문헌

Choi, W.H., Y.S. Oh, J.Y. Ahn, S.R. Kim and T.Y. Ha. 2005. Antioxidative and protective effects of *Ulmus davidiana* var. japonica extracts on glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cells. Korean J. Food Sci. Technol. 37:479-483.

Cui, Z.X., H.W. Huang and X.G. Xiao. 2002. *Actinidia* in China. p.1-5. CAST Press, China.

Good, P.F., P. Werner, A. Hsu, C.W. Olanowa and D.P. Perl. 1996. Evidence for neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. Am. J. Pathol. 149:21-28.

Ishikawa, Y. and M. Kitamura. 2000. Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. Kidney Int. 58:1078-1087.

Jacobson, M.D. 1996. Reactive oxygen species and programmed

cell death. Trends Biochem Sci. 21:83-86.

Kroemer, G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. Nat. Med. 3:614-620.

Lazebnik, Y.A., S.H. Kaufmann, S. Desnoyers, Poirier, G.G and W.C. Earnshaw. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature. 371:346-347.

Lee, S.E., D.M. Kim, K.H. Kim and C. Rhee. 1989. Several physico-chemical characteristics of kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch.) depend on cultivars and ripening stages. Korean J. Food Sci. Technol. 21:863-868.

Matsuzawa, A. and H. Ichijo. 2005. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. Antioxid Redox Signal 7:472-481.

Nishiyama, I., Y. Yamashita, M. Yamanaka, A. Shimohashi, T. Fukuda and T. Oota. 2004. Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other *Actinidia* species. J. Agric. Food Chem. 52:5472-5475.

Oliveira, M. M. and L.G. Fraser. 2005. *Actinidia* spp. Kiwifruit, p.2-27. In; R.E. Litz (ed). Biotechnology of fruit and nut crops. CABI Publishing, UK.

Omodeo-Sale, F., D. Gramigna and R. Campaniello. 1997. Lipid peroxidation and antioxidant systems in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. Neurochem. Res. 22:557-582.

Park, Y.S., S.T. Jung, S.G. Kang, J. Drzewiecki, J. Namiesnik, R. Haruenkit, D. Barasch, S. Trakhtenberg and S. Gorinstein. 2006. *In vitro* studies polyphenols, antioxidants and other dietary indices in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Int. J. Food Sci. Nutr. 57:107-122.

Rush, E.C., M. Patel, L.D. Plank and L.R. Ferguson. 2002. Kiwifruit promotes laxation in the elderly. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 11:164-168.

Sagara, Y., R. Dargusch, D. Chambers, J. Davis, D. Schubert and P. Maher. 1998. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. 24:1375-1389.

Stanciu, M., Y. Wang and R. Kentor. 2000. Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures, J. Biol. Chem. 275:12200-12206.

Subramaniam, S., U. Zirrgiebel, Und von Bohlen, O. Halbach, J. Strelau, C. Laliberte, D.R. Kaplan and K. Unsicher. 2004. ERK activation promotes neuronal degeneration predominantly through plasma membrane damage and independently of caspase-3, J. Cell Bio. 165:357-369.

Zhong, Z., W. Zhang, F. Zhang, X. Chen and C. Huang. 2005

Experimental study on the antitumor effects from roots of *Actinidia indochinensis* in carcinoma cell lines. Zhong Yao Cai. 28:215-218.

(접수일 2009.12.30; 수락일 2010.4.20)