

Protective Effect of *Prunella spica* Extracts against H₂O₂-Induced Cytotoxicity in PC12 Cells

Hyun-Jung Kim, Jeung-Min Lee, Seong-Hee Moon and Hae-Ryong Park*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Received May 3, 2010 / Accepted May 26, 2010

The oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) may play an important role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. In this study, we investigated the neuroprotective effects of methanolic extracts of *Prunella Spica* (PSE) against H₂O₂-induced oxidative stress in PC12 cells. The cells exposed to H₂O₂-induced oxidative stress were treated with various concentrations of PSE; this treatment resulted in the induction of a dose-dependent protective effect, which was evidenced by the results of MTT reduction assay, lactate dehydrogenase (LDH) release assay, morphological assay, and colony-formation assay. Interestingly, we also observed reduction of apoptotic bodies in the Hoechst staining and flow cytometric analysis. These data show that apoptosis was significantly suppressed in the PC12 cells that were exposed to H₂O₂-induced oxidative stress and treated with PSE. These results suggest that *Prunella Spica* could be a new potential protective agent against H₂O₂-induced oxidative stress.

Key words : Oxidative stress, neuroprotective effect, *Prunella Spica*, PC12 cells, apoptosis

서 론

현대에 접어들면서 의학기술과 과학의 발달로 인해 점점 인간 수명이 늘어감에 따라 전체 인구 중 노인 인구가 차지하는 비율이 급속도로 증가하고 있다. 따라서 우리나라도 점차 고령사회로 진입하게 되면서 노화 및 이와 관련된 각종 퇴행성 신경질환과 심혈관계질환 등의 질병에 대한 관심이 커지고 있으며, 그 원인이 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 기인된 것이라는 산소 유해설이 점차 인정받고 있다[4,19,26]. 인체는 생명유지에 필요한 에너지를 얻는 호흡과정을 통해 끊임없이 산소를 필요로 하며 체내로 유입된 산소분자는 세포내의 호흡과정을 통해 4개의 전자에 의해 환원되어 물로 전환된다. 그러나 철 분자 존재 하에 라디칼 형태로 불완전하게 환원되면 강력한 산화제가 되는데 그것을 ROS, 활성산소종이라고 한다[6,11].

체내 효소계, 환원대사, 물리적 또는 환경적 요인 등에 의해 끊임없이 생성되고 있는 일중항산소(¹O₂)나 superoxide (O₂^{·-}), hydroxyl radical (OH·)과 같은 짝짓지 않은 상태의 free radical과 hydrogen peroxide (H₂O₂)등이 활성산소에 속한다. 이들은 분자 구조적으로 매우 불안정하기 때문에 고분자의 세포 성분들을 공격하여 산화적 손상들을 유발시킨다[3,16,22,25]. 이렇게 유발되는 일시적인 산화적 스트레스에 대해 우리 인체는 superoxide dismutase (SOD), glutathione, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase (GST), catalase와 같은

항산화 효소들의 작용[12,20,23]을 통해 일차적인 방어를 하게 된다. 하지만 과도한 산화적 스트레스 상태가 지속되게 되면 단백질이상, 지질과산화, DNA 변형 등을 초래하여 세포의 항상성을 파괴하여 유전정보에 손상을 주게 되어 결국은 세포사멸까지 유발하게 함으로써 세포조직 내에 치명적인 손상을 일으켜 암, 알츠하이머병, 파킨슨병, 동맥경화증 등을 유발하게 된다[2,17,24]. 특히, 다른 장기에 비하여 뇌는 활성산소에 대한 산화방지 효소계나 저분자의 산화방지제가 상대적으로 적은 관계로 유해활성산소나 라디칼에 의한 산화적 손상에 대하여 매우 약하기 때문에 신경세포의 사멸유도로 인한 퇴행성 신경질환과 관련이 큰 것으로 보고되어지고 있다[7,9,15,27]. 따라서 산소로부터 유래된 활성산소종을 조절하거나 제거할 수 있는 물질로 알려진 항산화제들의 개발연구가 활발히 진행되고 있으며 그 중요성이 커지고 있다.

본 연구팀에서는 국내, 외에서 자생하고 있는 약용식물 추출물을 대상으로 신경세포를 보호하는 효과를 갖는 천연 추출물의 탐색을 시도하였다. 그 결과, 하고초(*Prunella Spica*) 추출물로부터 강력한 PC12 세포 보호효과를 확인할 수 있었다. 본 연구에서 사용된 하고초는 꿀풀과의 다년생 풀로 꽃이 핀 다음 이삭을 따서 말린 것을 말하며, 성분으로는 triterpenoid, oleanolic acid, ursolic acid, rutin, hyperoside, caffeic acid 등이 있으며 약리작용으로 강압작용, 이노작용, 항균작용, 항염증작용, 항산화작용[5,13,21] 등이 알려져 있지만 하고초에 관한 생리활성물질에 대한 연구는 아직 초보적인 단계에 불과하다.

따라서 본 연구에서는 천연자원에서부터 신경세포를 보호하는 물질을 탐색하기 위한 목적으로 H₂O₂가 유도하는 세포 독성에 대해서 PC12 세포를 보호하는 하고초 추출물의 효과

*Corresponding author

Tel : +82-55-249-2689, Fax : +82-55-249-2995

E-mail : parkhy@kyungnam.ac.kr

를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 실험재료

본 실험에서 사용된 하고초는 (주)금강제약으로부터 제공받아 추출하여 실험에 사용하였다. 하고초의 PC12 세포 보호 효과를 확인하기 위한 실험에 사용된 시약으로 H₂O₂ (hydrogen peroxide solution), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) 제품을 구입하였으며, LDH (lactate dehydrogenase) release assay kit는 Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan)로부터 구입하였다. 세포주 배양을 위해 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), horse serum (HS) 및 penicillin-streptomycin 등은 Invitrogen (NY, USA)에서 구입하였다. 그 외의 시약은 모두 일급 이상을 사용하였다.

하고초 추출물(PSE) 제조

하고초 5 g에 methanol을 100 ml 가하여 3일간 상온에서 추출한 후, Whatman No. 1 filter paper (Advantec, Tokyo, Japan)로 여과하였다. 이 추출여액을 40°C에서 회전감압농축기(EYELA N-1000, Tokyo, Japan)를 이용하여 하고초의 추출물을 얻었으며, 이를 PSE라 명명하였다. PSE는 25 mg/ml로 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹여 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

세포 배양

본 실험에 사용된 세포주는 rat pheochromocytoma PC12 로써 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 사용하였다. 세포 배양을 위해 DMEM medium에 10% fetal bovine serum (FBS), 5% horse serum (HS) 및 100 unit/ml의 penicillin, 100 mg/ml의 streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-18AIC, SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

세포의 형태학적 변화 관찰

PC12 세포의 형태학적인 변화를 관찰하기 위해 6-well plate에 2×10⁵ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. PSE를 농도별로 처리한 후 0.5 mM의 H₂O₂로 2시간 노출시켜 위상차 현미경(TS 100-F, Nikon, Tokyo, Japan)으로 각 well의 세포형태를 관찰하고 100배로 사진 촬영하였다.

MTT 분석을 통한 세포생존율 측정

PC12 세포의 세포생존율 측정을 위하여 MTT reduction as-

say를 실시하였다. 세포를 1×10⁵ cells/ml로 맞추고 96-well plate에 각각 100 µl씩 첨가하여 24시간 동안 배양한 후, DMSO에 녹인 PSE를 50, 100, 250 µg/ml의 농도로 제조하여 PC12 세포에 처리하였다. 30분 동안 배양시킨 후 0.5 mM H₂O₂를 처리하여 2시간 배양하고 각 well에 PBS 완충용액에 녹인 MTT (5 mg/ml) 용액을 10 µl씩 첨가하여 1시간 동안 다시 배양하였다. 1시간 반응 후, formazan 형성을 확인하고 formazan이 흡수되지 않게 상등액을 완전히 제거한 다음, 100 µl의 DMSO를 첨가하여 녹이고 ELISA reader (Model 680, BioRad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 PSE를 처리하지 않고 배양시킨 대조군 세포를 100%로 하였을 때의 상대적인 세포생존율을 구하였다.

LDH 측정에 의한 세포독성 확인

PC12 세포의 세포독성 효과를 측정하기 위한 방법으로 LDH release assay를 실시하였다. 세포를 1×10⁵ cells/ml로 맞춘 후, 100 µl씩 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 뒤, 50, 100, 250 µg/ml의 농도로 제조한 PSE를 세포에 처리하였다. 30분 후 0.5 mM H₂O₂를 처리하여 2시간 배양한 다음, 배양액을 새로운 96-well plate에 50 µl 분주하고, 이 배양액에 LDH reagent를 50 µl씩 첨가하여 상온에서 정치시킨 후, 20분간 반응하였다. 반응이 완료되면 stop solution인 1 N HCl을 100 µl씩 첨가하여 반응을 중지시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 살아남은 세포의 LDH 측정을 위해 배양액을 제거한 후, 0.5% triton X-100 용액을 50 µl 첨가하여 40 rpm으로 10분간 shaking 시켜 세포벽을 깨트린 다음, 같은 방법으로 LDH reagent 50 µl를 첨가하여 반응시키고, 반응이 끝나면 반응 정지액을 넣은 뒤, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH에 의한 세포독성의 백분율은 배양액과 살아있는 세포에서 총 LDH에 대한 배양액으로부터 유리된 LDH의 값으로 계산하여 H₂O₂ 실험군과 비교한 값을 나타내었다.

Colony formation assay

PC12 세포의 세포생존율을 측정하기 위하여 colony formation assay를 실시하였다. 24-well plate에 5×10⁴ cells/ml로 plating하여 24시간 배양시킨 후 PSE 50, 100, 250 µg/ml의 농도로 처리하여 30분 배양시킨 후, 0.5 mM H₂O₂를 처리하고 다시 2시간 반응시킨 후 새로운 배지로 희석하여 6-well plate에 1×10³ cells/ml이 되도록 replating하여 7~8일 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 형성된 colony는 10% formalin으로 고정하고, 0.01% crystal violet으로 염색하여 counting 하였다. 세포생존율은 PSE를 처리하지 않은 대조군 값을 100%로 두고 계산하였다.

Hoechst 33342 염색

PC12 세포의 apoptosis 유도 활성을 측정하기 위하여

Hoechst 33342로 세포의 핵을 염색하였다. 6-well plate에 2×10^5 cells/well로 24시간 동안 배양하여 PSE를 100, 250 μ g/ml 농도로 처리한 후, 0.5 mM H_2O_2 를 처리하여 2시간 반응하였다. PBS 완충용액으로 2회 세척하고 10% formalin을 처리하여 4시간 고정한 후 다시 PBS 완충용액으로 세척하고 Hoechst 33342 (Sigma)로 30분 동안 염색하였다. 염색 후 PBS 완충용액으로 세척하고 형광 현미경으로 각 well의 세포를 관찰하고 400배로 사진 촬영하였다.

Flow cytometric analysis

PC12 세포의 apoptotic cell을 측정하기 위하여 세포주기를 측정하였다. 세포를 6 cm dish에 1.5×10^5 cells/dish로 24시간 배양한 후, PSE를 100, 250 μ g/ml의 농도로 처리하고 30분 후, 0.5 mM H_2O_2 를 처리하여 2시간 배양한 다음, 부유 세포 및 trypsin 처리한 세포들을 모아서 $4^\circ C$, 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리한 후, 70% ethanol 1 ml을 넣고 세포를 고정시켰다. PBS 완충용액으로 수세한 후, propidium iodide/RNase staining buffer (BD pharmingenTM)를 500 μ l 첨가하고, 어두운 상온에서 10분간 staining 한 후, flow cytometry caliber (Beckman coulter epics XL)를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

통계처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치표준편차(SD)를 구하고 PSE의 PC12 세포 보호효과를 비교하기 위해 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고 Scheff's test를 이용하여 대조군과 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

PC12 세포를 보호하는 하고초 추출물(PSE)의 효과

H_2O_2 는 세포내에서 유전자 발현 변화를 조절하기도 하고, 세포의 행동, 운동, 모양 등을 조절하는 신호전달 물질로 작용하며, 생체의 정상적인 영위에서 $10^{-9} \sim 10^{-7}$ M로 항상 생성되어 지고 있다. 하지만 구리(Cu^{2+})나 철(Fe^{2+})이온 존재 하에 hydroxyl radical로 전환되어 산화적 스트레스를 유발함에 따라 세포손상을 일으켜 퇴행성 신경질환, 암 등의 각종 질병을 일으키게 된다[1,18,28]. 본 연구에서는 H_2O_2 가 유발하는 산화적 스트레스로부터의 PC12 세포를 보호하는 PSE의 효과를 확인하기 위해 MTT reduction assay 방법을 이용하여 정상군과 H_2O_2 처리군 그리고 H_2O_2 와 PSE를 농도별로 처리한 실험군을 비교하였다. 그 결과, Fig. 1A와 같이 H_2O_2 처리군의 세포생존율은 정상군에 비해 30.6%로 떨어졌으나 PSE를 50, 100, 250 μ g/ml의 농도로 처리한 PC12 세포의 생존율은 46.5, 64.8, 78.7%로 농도 의존적으로 세포생존율이 회복되는 것을 확인

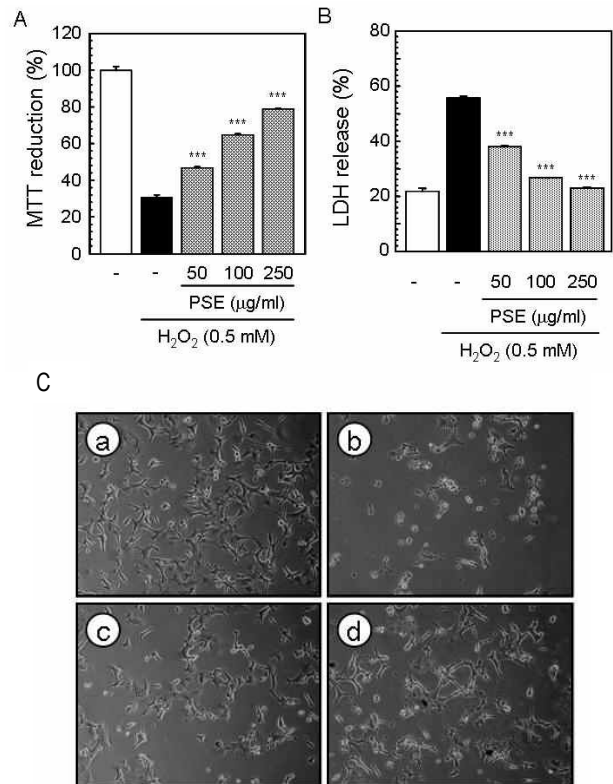


Fig. 1. Protective effect of methanolic extracts of *Prunella Spica* (PSE) on the H_2O_2 -induced oxidative stress in PC12 cells. (A: MTT reduction assay, B: LDH release assay, C: Morphological assay) The cells were pretreatment for 30 min with various concentrations of PSE and then treated with 0.5 mM of H_2O_2 for 2 hr. (A) After MTT assay, the MTT reduction rate was calculated by setting each of control survivals in the absence of H_2O_2 and PSE. (B) As the results of LDH release assay, data were normalized to the activity of LDH released from vehicle-treated cells (100%). ***significant vs. H_2O_2 -treated control group ($p < 0.001$). (C) Morphological changes were monitored for 2 hr. (a: control, b: 0.5 mM H_2O_2 , c: 0.5 mM H_2O_2 /100 μ g/ml PSE, d: 0.5 mM H_2O_2 /250 μ g/ml PSE). Photographs were taken with a phase-contrast microscope at $100\times$ magnification.

할 수 있었다.

PSE의 구체적인 PC12 세포 보호효과를 확인하기 위하여 MTT reduction assay와 동일한 조건하에서 LDH (lactate dehydrogenase) release assay를 실시하였다. LDH의 활성측정은 세포손상 정도를 확인하는 방법 중 하나로 세포의 LDH는 화학적으로나 생물학적으로 안정적 상태이므로 세포배양에서 방출된 LDH의 활성 정도는 세포손상 정도와 비례관계를 가지게 된다. H_2O_2 가 처리된 PC12 세포에 PSE를 50, 100, 250 μ g/ml를 처리하여 H_2O_2 처리군과 비교한 결과, H_2O_2 단독 처리군에서는 55.7%의 LDH를 방출하는 것을 확인할 수 있는데 반해 PSE 처리군에서는 LDH 방출량이 37.9, 26.6, 22.9%로

감소하여 정상군의 수준으로 회복되었다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). H_2O_2 가 세포에 손상을 끼침에 따라 세포막 파괴로 인해 LDH 방출량이 높은 것과 대조적으로 PSE 처리군에서는 농도 의존적으로 H_2O_2 가 유도하는 산화적 스트레스로 인한 세포손상으로부터 PC12 세포를 보호함에 따라 효과적으로 LDH 방출량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 PSE가 H_2O_2 의 산화적 스트레스로부터 유도되는 세포사를 강력하게 억제한다는 것을 시사하고 있다.

신경세포는 외부 환경에 민감하게 자극을 받으면 신경상해를 입는 것과 동시에 세포사가 유도되어 형태학적인 변화를 나타나게 된다. 따라서 H_2O_2 로 유도된 세포독성의 상태에서 PSE가 세포의 형태학적 변화에 영향을 미치는지 알아보기 위해 광학 현미경 하에서 관찰하였다(Fig. 1C). 정상군의 PC12 세포에서는 건강하게 뾰은 돌기를 관찰할 수 있었지만 H_2O_2 처리군은 세포독성으로 인하여 전체적인 세포의 수가 적을 뿐 아니라 돌기가 거의 소멸된 양상을 보여 세포가 형태학적으로 큰 변화가 유도된 것을 확인할 수 있었다. 이때, PSE를 100, 250 $\mu\text{g/ml}$ 전처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 PC12 세포의 생존을 확인할 수 있었다. 그리고 PSE가 PC12 세포의 colony 형성에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 colony formation assay를 실시하였다(Fig. 2). 그 결과, H_2O_2 를 처리하였을 때의 colony 생성능에 비해 PSE를 50, 100, 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 56.1, 65.3, 68.1%로 높은 colony 생성능을 확인할 수 있었다.

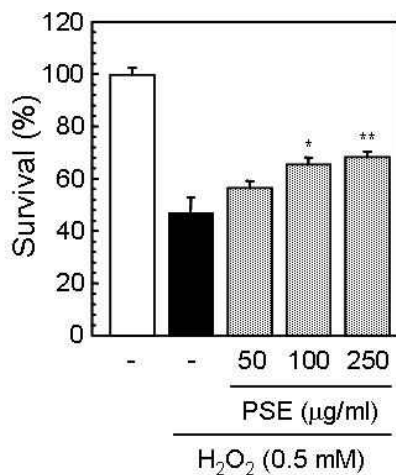


Fig. 2. Protective effect of PSE on the H_2O_2 -induced oxidative stress in PC12 cells. The cells were exposed to the 50, 100, 250 $\mu\text{g/ml}$ of PSE and then treated with 0.5 mM of H_2O_2 for 2 hr. After colony formation, the survival rate was calculated by setting each of the control survival rates. After 7-8 days, the formed colonies were fixed with 10% formaldehyde, stained with 0.01% crystal violet, and counted. Significant vs. H_2O_2 -treated control group (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

이상의 결과로부터 하고초 추출물은 H_2O_2 로 유도되는 세포 독성 상태에서 강력하게 PC12 세포를 보호하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

PSE의 apoptosis 억제 효과

Apoptosis는 다세포 생물에서의 programmed cell death를 일컫는 용어로 세포의 죽음에 관련되어 능동적으로 일어나는 세포의 죽음 과정 중 하나이다. 조직이 상해를 입었거나 바이러스 등에 감염되었을 때 이들을 제거하여 생물체가 최적의 상태로 존재하기 위한 방어기작으로 조직, 개체의 분화, 발생, 생리현상 등에도 관여를 한다. Apoptosis가 일어나면 세포는 면역반응을 일으켜, 핵의 condensation 및 DNA가 일정한 크기로 조각나는 형상을 비롯하여 세포질 속 세포소기관 및 세포막 등에서의 변화가 발생하여 세포가 사멸하게 되는 것으로 알려져 있다[10]. 최근에 퇴행성 신경질환의 유발인자 중 하나로 알려진 활성산소종이 apoptosis를 유도한다는 것이 밝혀짐에 따라 활성산소종과 apoptosis와의 관계에 대해 관심이 커지는 동시에 많은 연구가 진행되고 있다. 산화적 스트레스의 주체인 활성산소종은 세포에 산화적 손상을 일으키는 세포독성 물질로 작용할 뿐 아니라, apoptosis를 유도하는 물질로도 알려져 있다. 활성산소종 중 대표적으로 세포내에서 많이 발견되는 H_2O_2 는 구리나 철과 같은 전이금속과 반응하지 않는 한 상대적으로 안정되어 있고 쉽게 세포막을 통과할 수 있으므로 외부자극에 빠른 시간 내 반응하여 fenton 반응을 통하여 hydroxyl radical로 전환되어 산화적 스트레스를 증가시킴으로 인해서 미토콘드리아 막전위를 감소시켜 미토콘드리아 내부의 cytochrome c 방출을 촉진시켜 caspase-9와 caspase-3의 활성화를 통해 apoptosis를 유발하게 된다[8,14].

H_2O_2 로부터의 PSE의 apoptosis 억제효과를 측정하기 위하여 apoptosis의 형태학적 특징 중의 하나인 핵의 변화, 즉 세포의 수축과 응축으로 인해 일어나는 apoptotic body를 관찰하기 위해서 핵내 DNA에 특이적으로 결합하는 형광 염색체인 Hoechst 33342를 사용하여 핵을 염색하고 형광 현미경으로 관찰하였다(Fig. 3A). 그 결과 H_2O_2 처리군의 세포핵은 condensation과 fragmentation으로 인한 apoptotic body가 핵 주변에 나타나는 전형적인 apoptosis 특징을 보이는 반면에 100, 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 PSE를 처리했을 때 정상군과 유사하게 타원형의 온전한 핵 모양을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 동일한 조건하에서 flow cytometry를 이용하여 세포주기를 분석한 결과, Fig. 3B와 같이 H_2O_2 단독 처리 시 62.3%로 control에 비해 20배에 가까운 sub-G1기 세포가 확인된 반면에 H_2O_2 와 PSE 100, 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서의 sub-G1기 세포는 29.9, 16.6%로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Apoptosis의 중요한 특징 중의 하나인 sub-G1 세포수가 감소했다는 것은 하고초의 다양한 성분 중 하나가 H_2O_2 가 유도하는 apoptosis로부터 PC12 세포의 세포사를 억제하고 있다고 사료된다.

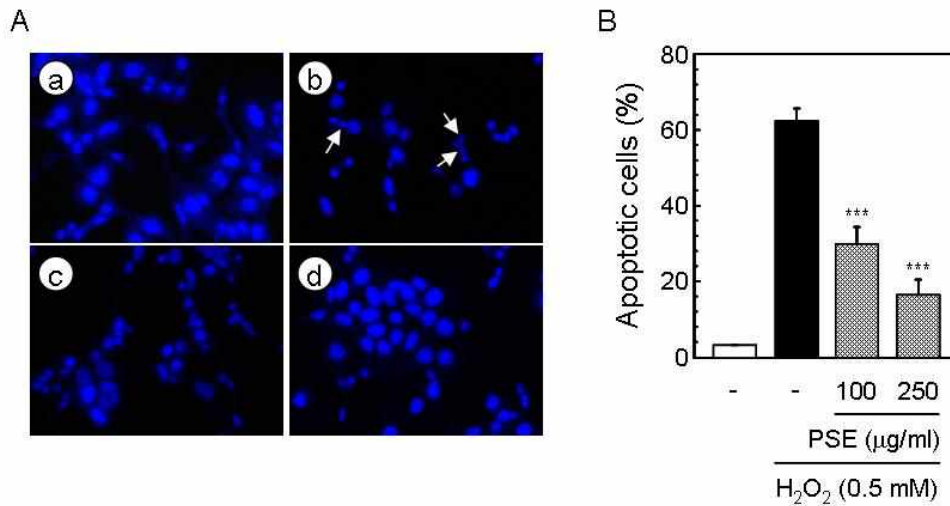


Fig. 3. Protective effect of PSE on the H₂O₂-induced oxidative stress in PC12 cells (A: Hoechst staining, B: Flow cytometric analysis). (A) The cells were treated with PSE and then stimulated with 0.5 mM of H₂O₂ for 2 hr. Cell staining with Hoechst 33342 (10 μ M) and examine by fluorescence microscope (Magnification \times 400, a: control, b: 0.5 mM H₂O₂, c: 0.5 mM H₂O₂/100 μ g/ml PSE, d: 0.5 mM H₂O₂/250 μ g/ml PSE). The arrows indicate apoptotic cells. (B) Flow cytometric analysis of H₂O₂-induced apoptotic PC12 cells exposed to PSE and then treated with 0.5 mM of H₂O₂ for 2 hr. Apoptotic cells were determined by flow cytometric analysis after staining with propidium iodide. ***significant vs. H₂O₂-treated control group ($p < 0.001$).

이상의 결과로부터 하고초는 H₂O₂의 산화적 스트레스로부터 유도되는 세포독성과 apoptosis를 강력하게 억제하여 PC12 세포를 보호하고 있다는 것을 확인할 수 있었으며, 인구 고령화와 더불어 증가하고 있는 퇴행성 신경질환을 치료하거나 예방할 수 있는 치료제로써의 가능성을 제시하였다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2008-331-F00068).

References

- Akiko, O., A. Tamaoka, and W. Araki. 2010. Oxidative stress up-regulates presenilin 1 in lipid rafts in neuronal cells. *J. Neurosci. Res.* **88**, 1137-1145.
- Cecchi, C., C. Fiorillo, S. Sorbi, S. Latorraca, B. Nacmias, S. Bacnoli, P. Nassi, and G. Liguri. 2002. Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free radic. Biol. Med.* **33**, 1372-1379.
- Cha, B. C., E. H. Lee, and M. A. Noh. 2005. Antioxidant activity of Smilacis Chinae Radix. *Kor. J. Pharmacogn.* **36**, 195-200.
- Chai, Y., L. Niu, X. L. Sun, J. H. Ding, and G. Hu. 2006. Iptakalim protects PC12 cell against H₂O₂-induced oxidative injury via opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 307-314.
- Chang, H. J., S. J. Park, J. R. Lee, and S. C. Kim. 2009. Inhibitory Effects of water extract of *Prunellae Spica* on the production of pro-inflammatory mediator in LPS-activated raw 264.7 cells. *Korean J. Oriental physiology & Pathology* **23**, 599-607.
- Choi, K., J. Kim, G. W. Kim, and C. Choi. 2009. Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. *Curr. Neurovasc. Res.* **6**, 213-222.
- 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. *Food Sic. Technol.* **37**, 479-483.
- Circu, M. L. and T. Y. Aw. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Bio Med* **48**, 749-762.
- Good, P. F., P. Werner, A. Hsu, C. W. Olanow, and D. P. Perl. 1996. Evidence for neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **149**, 21-28.
- Hyon, J. S., S. M. Kang, A. D. Kim, M. C. Oh, C. K. Oh, D. W. Kim, Y. J. Jeon, and S. H. Kim. 2009. Induction of apoptosis by *Citrus grandis* osbeck peel (CGP) extract in HL60 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 1317-1323.
- Lee, D. C., C. W. Mason, C. B. Goodman, M. S. Holder, O. W. Kirksey, T. A. Womble, W. B. Severs, and D. E. Palm. 2007. Hydrogen peroxide induced lysosomal protease alterations in PC12 cells. *Neurochem Res.* **32**, 1499-1510.
- Lee, N. H., J. H. Hong, J. Y. Kim, and M. H. Chiang. 2009. Antioxidant properties and protective effects of *Inula Britannica* var. *chinensis* regel on oxidative stress-induced

- neuronal cell damage. *Korean J. Food Sci. Technol.* **41**, 87-92.
13. Lee, S. J., N. J. Sung, H. G. Jeong, J. H. Shin, Y. C. Chung, and J. K. Seo. 2008. Antioxidant activities of methanol extracts from *Prunella vulgaris*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 1535-1541.
 14. Liu, S., L. Xu, T. Zhang, G. Ren, and Z. Yang. 2010. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. *Toxicology* **267**, 172-177.
 15. 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**, 577-582.
 16. Papa, S. and V. P. Skulachev. 1997. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell. Biochem.* **174**, 305-319.
 17. Parco, M. S., Y. Wang, and E. A. Stephen. 2009. Apoptotic signaling induced by H₂O₂-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes. *Life Sci.* **84**, 468-481.
 18. Pavlica, S. and R. Gebhardt. 2010. Protective effects of flavonoids and two metabolites against oxidative stress in neuronal PC12 cells. *Life Sci.* **86**, 79-86.
 19. Sesti, F., S. Liu, and S. Q. Cai. 2009. Oxidation of potassium channels by ROS: a general mechanism of aging and neurodegeneration? *Trends Cell Biol.* **19**, 653-659.
 20. Smeets, K., K. Opdenakker, T. Remans, S. V. Sanden, F. V. Bellegheem, B. Semane, N. Horemans, Y. Guisez, J. Vanronsveld, and A. Cuypers. 2009. Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context. *J. Plant Physiol.* **166**, 1982-1992.
 21. Sun, H. X., F. Qin, and Y. J. Pan. 2005. In vitro and in vivo immunosuppressive activity of *Spica Prunellae* ethanol extract on the immune responses in mice. *J. Ethnopharmacol.* **101**, 31-36.
 22. Uttara, B., A. V. Singh, P. Zamboni, and R. T. Mahajan. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic potions. *Curr. Neuropharmacol.* **7**, 65-74.
 23. Wan, X., J. Tan, S. Lu, C. Lin, Y. Hu, and Z. Guo. 2009. Increased tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco expressing a wheat oxalate oxidase gene via induction of antioxidant enzymes is mediated by H₂O₂. *Physiol. Plant* **136**, 30-44.
 24. Yifeng, D., C. W. Michael, and W. W. Marie. 2009. Oxidative damage to the promoter region of SQSTM1/p62 is common to neurodegenerative disease. *Neurobiol. Dis.* **35**, 302-310.
 25. Yoon, M. Y., B. B. Lee, J. Y. Kim, Y. Kim, E. Park, S. C. Lee, and H. R. Park. 2007. Antioxidant activity and neuroprotective effect of *Psoralea corylifolia* Linne extracts. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**, 84-89.
 26. Yoon, M. Y., H. J. Lee, B. B. Lee, S. M. Lee, J. Y. Kim, Y. Kim, E. Park, and H. R. Park. 2007. Protective effect of *Schizonepeta tenuifolia* briquette extracts on oxidative DNA damage in human leucocytes and on hydrogenperoxide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Food Sci. Biotechnol.* **16**, 858-862.
 27. Yoon, M. Y., J. Y. Kim, J. H. Hwang, M. R. Cha, M. R. Lee, K. J. Jo, and H. R. Park. 2007. Protective effect of methanolic extracts from *Dendrobium nobile* Lindl. on H₂O₂-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**, 63-67.
 28. Zaidi, A., D. Fernandes, J. L. Bean, and M. L. Michaelis. 2009. Effects of paraquat-induced oxidative stress on the neuronal plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1507-1514.

초록 : Hydrogen peroxide가 유도하는 세포독성으로부터 PC12 세포를 보호하는 하고초(*Prunella spica*) 추출물의 영향

김현정 · 이정민 · 문성희 · 박해룡*
(경남대학교 식품생명학과)

활성산소에 의해 유도되는 산화적 스트레스가 노화와 관련된 각종 퇴행성 신경질환의 원인으로 밝혀짐에 따라 본 연구에서는 활성산소종인 H₂O₂가 유도하는 강력한 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하는 물질을 탐색하기 위하여 하고초 추출물(PSE)에 관하여 연구하였다. PC12 세포를 이용하여 MTT reduction assay, LDH release assay 및 colony formation assay 등 여러 가지 생물학적인 assay를 통하여 PSE의 세포 보호효과를 확인하였다. 그리고 광학 현미경을 이용한 형태학적 변화 관찰에서도 H₂O₂ 처리군에 비해 높은 세포 보호효과를 확인할 수 있었으며, Hoechst 33342 염색과 세포주기 분석을 통하여 PSE의 높은 apoptosis 억제효과를 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 하고초는 H₂O₂에 의해 유도된 세포독성으로부터 PC12 세포손상을 강력하게 억제하는 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었으며, 퇴행성 신경질환에 대한 새로운 치료제로서의 가능성을 제시하였다.