

허혈·재관류 유도 신경세포사멸에 대한 일당귀 물추출물의 신경보호효과 연구

오태우¹, 박기호¹, 이미영², 최고야², 박용기^{1*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 한국한의학연구원

Neuroprotective effects of *Angelicae Acutilobae Radix* water extract against ischemia·reperfusion-induced apoptosis in SK-N-SH neuronal cells

Tae-Woo Oh¹, Ki Ho Park¹, Mi Young Lee², Go Ya Choi², Yong-Ki Park^{1,*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

2 : Aging Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseongdae-ro, Yuseong-gu, 305-811, Daejeon, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of the study is to determine the neuroprotective effects of the water extract of *Angelicae Acutilobae Radix*(AA) on ischemia·reperfusion-induced apoptosis in SK-N-SH human brain neuronal cells.

Methods : SK-N-SH cells were treated with different concentrations of AA water extract (0.1, 0.2, 0.5 and 1.0 mg/ml) for 2 hr and then stimulated with Dulbecco's phosphate-buffered saline containing CI-DPBS : 3mM sodium azide and 10 mM 2-deoxy-D-glucose for 45 min, reperfused with growth medium, and incubated for 24 h. Cell viability was determined by WST-1 assay, and ATP/ADP levels were measured by ADP/ATP ratio assay kit. The levels of caspase-3 protein were determined by Western blot and apoptotic body was observed by Hoechst 33258 staining.

Results : AA extract significantly inhibited decreasing the cell viability in ischemia-induced SK-N-SH cells. AA also increased the ratio of ADP/ATP in ischemia-induced neuronal cells and decreased the expression levels of apoptotic protein, caspase-3 and apoptotic DNA damage.

Conclusions : Our results suggest that AA extract has a neuroprotective property via suppressing the apoptosis and increasing the energy levels in neuronal cells, suggesting that AA extract may has a therapeutic potential in the treatment of ischemic brain injury.

Key words : *Angelica acutiloba*, ischemic injury, apoptosis, SK-N-SH neuroblastoma cell, neuroprotective effect

서론

현대 사회는 생명과학 및 의학의 급속한 발전으로 인간의 평균수명이 늘어나 노년 인구의 비중이 점차 늘어나면서 새로운 사회적 문제들이 부각되고 있다. 노인성 뇌질환인 뇌졸중, 헌팅턴, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병 등은 특정 뇌 세포사멸로 인한 치명적인 신경계의 기능장애로 나타나며 이들의 에너지 대사 조절을 통한 세포의 손상과 죽음을 막거나 제어하는 방법 개발에 대한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있는

추세이다^{1,2)}.

세포의 발전소인 미토콘드리아(mitochondria)는 호흡작용이 가장 활발한 산소 소모처로서 모든 세포가 신진대사 활동을 수행하는 장소이며, 이 활동은 세포의 다른 모든 활동에 필요한 에너지를 공급한다³⁾. 미토콘드리아는 자체 DNA를 가지고 있어 뇌의 여러 부위에서 더 많은 유전자 활성을 나타내며 뇌의 활성유전자는 다른 기관보다 많다고 알려져 있다²⁾. 특히 뇌 신경세포는 다른 기관의 세포 보다 에너지 대사가 많이 필요한 세포로 미토콘드리아가 매우 풍부하며, 미토콘드리아의

*교신저자 : 박용기. 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실.
· Tel : 054-770-2661. · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr.
· 접수 : 2011년 11월 8일 · 수정 : 2011년 11월 27일 · 채택 : 2011년 12월 16일

역동적인 변화가 신경세포 발달에 큰 영향을 준다. 미토콘드리아의 산소로 운반되는 전자전달 과정에서 생성되는 $O_2 \cdot^-$ 또는 $OH \cdot$ 같은 reactive oxygen species(ROS)는 미토콘드리아의 구조와 성분을 파괴하고 이는 호흡률과 산화적 인산화 반응에 변화를 유발하여 결국 세포대사를 결정하는 ATP 생성이나 NADH/NAD⁺ 비율에 영향을 주게 된다. 고등동물의 대부분의 에너지는 미토콘드리아에서 합성되는 ATP로 충당되며, 미토콘드리아에서 일어나는 에너지대사 작용은 노화와 밀접한 관계에 있다고 보고 있다⁴⁾. 뇌 조직에서는 노화에 따라 포도당 의존도가 증가하고, NAD⁺-isocitrate dehydrogenase 활성은 감소하며(노화; Vitorica 등, 1987), 허혈에 따른 세포손상은 미토콘드리아막의 투과성에 영향을 미쳐 세포사멸 유도분자인 cytochrome c의 방출과 함께 평소 전자 전달계의 복합체의 일원인 apoptosis inducing factor(AIF) 등의 방출을 유발하게 된다⁵⁾.

일당귀(日當歸: *Angelica acutiloba* Kitagawa: Angelicaceae *Acutilobae* Radix)는 미나리과(繖形科: Umbelliferae)에 속한 다년생 초본인 대화당귀(大和當歸)의 根을 건조시킨 것이다. 한의학에서 당귀는 그 味가 甘辛하고 性은 溫하며 心, 肝, 脾經으로 들어가 補血活血하고 行氣止痛하는 효능이 있으며 心은 血을 主하고 肝은 血을 藏하며 脾는 血을 統括하므로 血證에 두루 사용된다⁶⁾.

동속근연식물인 당귀(當歸: *Angelica Gigas* Nakai: Angelicaceae *Gigantis* Radix)의 약리학적 효능에 대한 실험연구로는 당귀추출물의 증대뇌동맥 폐색에 의한 국소 뇌허혈 흰쥐에서의 뇌경색 억제 및 신경세포 보호효과⁷⁾, 흑색육종세포(B6 melanoma cell)에서의 멜라닌색소 형성(melanogenesis) 억제 효과⁸⁾ 과산화지질 생성 억제를 통한 항산화 효과⁹⁾, 당귀 에탄올추출물의 dinitrofluorobenzene-유도 염증 마우스와 대식세포에서의 항염증 및 항알러지 효과¹⁰⁾, 뇌 신경세포에서의 세포사멸에 대한 보호 효과¹⁵⁾, 당귀 약침의 허혈성 뇌손상에 대한 개선효과¹⁶⁾ 등 다양하게 보고되었다. 또한 최근에는 생리활성성분 연구로 당귀의 decursin, decorsinol 성분의 베타아밀로이드-유도 신경세포 손상에 대한 보호효과¹¹⁾ 및 사람의 신장세포에서의 항산화효과 및 cisplatin-유도 세포사멸에 대한 억제효과¹²⁾ 등 약리효능과 기전에 대한 연구논문이 활발히 보고되고 있으나, 일당귀의 약리효능과 기전에 대한 연구는 드문 실정이다.

본 연구에서는 일당귀 추출물의 사람의 신경세포주인 SK-N-SH 세포에서 화학적 허혈·재관류 손상에 의한 신경세포사멸에서 세포증식 유도, 에너지대사 증가 및 세포사멸 인자들의 발현 억제에 따른 신경보호효과를 확인하고자 수행하였으며 실험적으로 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용된 일당귀는 한국 강원도 정선군에서 생산된 일당귀(*Angelica acutiloba* Kitagawa)의 뿌리로서, 규

격품으로 품질검사필한 절단생약을 제약회사로부터 구입하여 관능검사후 제조한 물추출물을 한국한의학연구원(KIOM)으로부터 제공받아 사용하였다. 약재 표본은 한국한의학연구원에 보관하였다(표본번호 KIOM011927).

2) 시약

본 실험에 사용된 Dulbecco's modified EAAL's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin(P/S) 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 시약 중 Sodium azide, 2-deoxy-D-glucose, Sodium dodesyl sulfate(SDS), Acrylamide, phosphate buffer saline(PBS) 등은 SIGMA(St. Louis, USA)사에서 구입하였다. Cell proliferation reagent 인 WST-1은 Roche (Indianapolis, IN, USA)사에서, ADP/ATP ration kit는 Abcam (Cambridge, MA, USA)사에서 구입하였으며, anti-caspase-3 단클론항체는 Cell signaling(MA, USA)사에서, goat anti-rabbit, goat anti-mouse 단클론항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다. 또한 X-ray film(Kodak Co, Ltd, Burnaby, British Columbia), ECL solution(Pierce Co, IL, USA), protein assay solution(BioRad Laboratories, Inc, CA, USA)을 사용하였으며, 기타 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상을 사용하였다.

2. 방법

2-1. 추출물 제조

일당귀 건조약재에 10배량의 1차 증류수를 가하여 환류냉각기를 장치하고 히팅맨틀을 이용해 2시간 동안 열탕하고 전액을 여과지로 여과하였다. 잔류물을 다시 같은 방법으로 2차 추출하고, 1, 2차 추출액을 혼합한 뒤 동결건조기(Bondiro, Ilshin Lab, Korea)로 동결건조하여 일당귀 물추출물 건조분말을 얻었다. 추출물의 수득률은 건조약재 대비 50.64%였다.

2-2. 세포 배양

SK-N-SH(KCLB 30011, human brain neuroblastoma cell line) 세포는 ATCC(CRK2271, VA, USA)로부터 구입하였으며, 10% FBS과 penicillin·streptomycin(10,000 U/ml, 10,000 µg/ml)을 넣은 Dulbecco's Minimum Essential Medium(DMEM) 배양액으로 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 37°C 조건으로 배양하였다.

2-3. 허혈성 손상 세포배양모델 제작

화학적 허혈성 손상 세포배양모델을 제작하기 위해 산화적 인산화를 억제하는 sodium azide와 해당과정을 차단하는 2-deoxy-D-glucose를 사용하여 저산소증(hypoxia)과 저혈당증(hypoglycemia)을 유도하였다¹³⁾.

(1) Chemical ischemia 손상 유도 시간에 따른 세포 생존도 측정

96-well plate에 세포(1.5×10^4 cell/well)를 분주한 후 하룻밤 배양하고, 배지를 제거한 다음 $1 \times$ PBS로 3회 세척

하였다. 이후 3mM sodium azide와 10 mM 2-deoxy-D-glucose가 포함된 chemical ischemic Dulbecco's phosphate-buffered saline(CI-DPBS)를 넣고 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60분간 배양한 후 WST-1 방법을 이용해 세포 생존도(cell viability)를 측정을 하였다.

(2) Chemical ischemia 손상 유도 후 재관류 시간에 따른 세포 생존도 측정

96-well plate에 세포(1.5×10^4 cell/well)를 분주한 후 하룻밤 배양하고, 배지를 제거한 다음 $1 \times$ PBS로 3회 세척하였다. 이후 3mM sodium azide와 10 mM 2-deoxy-D-glucose가 포함된 chemical ischemic Dulbecco's phosphate-buffered saline(CI-DPBS)를 넣고 45분간 배양한 후 $1 \times$ PBS로 3회 세척하였다. 여기에 growth medium로 교체하여 0, 3, 6, 12, 18, 24 시간 동안 배양한 후 WST-1 방법을 이용하여 세포생존도를 측정을 하였다.

2-4. 세포 생존율 측정

약물에 의한 세포독성과 허혈·재관류 손상에 따른 세포생존도를 측정하기 위해서 WST-1 assay를 수행하였다¹⁴⁾. 먼저 96-well plate에 세포(1.5×10^4 cell/well) 분주하여 24 시간 배양한 후 serum free media(SFM)에 여러 농도(0, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/ml)로 희석한 일당귀 물추출물을 처리하였다. 2시간 배양 후 배지를 제거하고 $1 \times$ PBS로 3회 세척한 다음 CI-DPBS를 처리하여 45 분간 배양하였다. 다시 배지를 제거하고 $1 \times$ PBS로 3회 세척한 후 growth medium로 배지를 교체하고 24 시간 더 배양을 하였다. 배양 종료 후 WST-1 시약을 200 μ l/well씩 넣은 후 37°C CO₂ incubator에서 암실상태를 유지하면서 반응시키고 반응액을 96-well plate에 100 μ l/well씩 옮겨서 Microplate Reader에서 420 nm의 흡광도를 측정하였다.

2-5. 에너지 변화량 측정

SK-N-SH 세포(1.5×10^4 cell/well)를 luminometer plate에 분주하여 하룻밤 배양하고 이전 WST-1 assay에서 독성이 나타나지 않은 농도 범위의 일당귀추출물을 2시간 동안 전처리한 다음, CI-DPBS 45분간 처리하여 재관류시켰다. 이를 다시 growth medium로 교체한 후 24시간 동안 배양하고, 다시 배지를 제거한 다음 $1 \times$ PBS로 3회 세척하였다. 여기에 nuclear releasing reagent를 100 μ l씩 넣고 5분 동안 실온에서 반응시킨 후 ATP monitoring enzyme을 1 μ l씩 넣고 1분 동안 luminometer를 이용하여 측정을 하였다. ADP levels을 측정하기 위해서 다시 10분간 luminometer로 측정하여 값을 기록한 후 ADP converting enzyme을 1 μ l를 넣고 1분 이내에 luminometer로 측정하여 ATP와 ADP의 비율(ATP·ADP ration)을 구하였다.

2-6. Western blot

SK-N-SH 세포로부터 세포사멸 유도 단백질인 caspase-3의 발현을 Western blot으로 측정하였다. 먼저, SK-N-SH 세포에 독성이 없는 농도범위의 일당귀추출물을 2시간 동안 전처리한 다음, CI-DPBS로 교체하여 45분간 처리하고 다시 growth medium로 교체하여 24 시간 동안 재

관류하였다. 각 세포를 $1 \times$ PBS로 3회 세척 후 lysis buffer(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin) 0.1 ml로 lysis시켰다. 이를 12,000 rpm에서 20 분 원심분리함으로써 단백질을 분리하였다. 분리된 각 단백질의 농도를 protein assay solution으로 정량한 다음, 30 μ g 단백질을 $2 \times$ sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)와 섞어 10-15% SDSPAAGE를 통해 분리하였다. 분리된 gel상의 단백질을 NC membrane으로 transfer시키고 각 membrane은 5% skim milk로 실온에서 1시간 blocking하였다. Membrane에 caspase-3 및 β -actin에 대한 일차항체를 넣어 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후 0.05% Tween이 들어간 TBS로 3회 세척하였다. Membrane에 다시 anti-IgG conjugated HRP 항체를 넣은 후 1시간 동안 실온에서 반응시키고 0.05% Tween이 포함된 TBS($1 \times$ TTBS)로 3회 세척하여 ECL용액을 이용하여 x-ray film에 감광시켰다.

2-7. Hoechst33258 염색

Hoechst33258 염색은 Islam (9)의 방법에 따라 수행하였다. 먼저 슬라이드 글라스를 옅은 culture dish에 세포(5×10^5 cell/ml)를 분주하여 24 시간 배양 한 다음, 일당귀 추출물을 농도별(0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/ml)로 처리하여 2 시간 동안 배양한 후 배지를 제거하여 $1 \times$ PBS로 3회 세척하였다. 여기에 SFM에 250 μ M 농도로 희석한 H₂O₂ 용액을 처리한 후 2시간 동안 배양하였다. 여기에 배지를 제거하고 $1 \times$ PBS로 다시 3회 세척한 후 4% paraformaldehyde를 처리하여 4°C에서 30분 동안 세포를 고정하였다. 고정시킨 세포는 $1 \times$ PBS로 3회 세척하여 1 mg/ml의 Hoechst33258이 함유된 PBS를 5 μ l씩 처리하여 실온에서 30 분간 염색하였다. 염색된 세포 내 핵의 형태변화를 형광현미경(Olympus ImAAing America Inc, PA, USA)을 이용하여 관찰하였다.

2-8. 통계처리

결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean)±표준오차(standard error SE)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 GraphPad Prism program의 Student t-test를 수행하여 p 값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 허혈·재관류에 의한 세포손상에 대한 효과

SK-N-SH 세포에서 허혈·재관류에 따른 세포 손상 정도를 측정한 결과, 3 mM sodium azide와 10 mM 2-deoxy-D-glucose을 처리하고 10분 동안 배양하였을 때 세포 독성이 나타나지 않았으나 배양시간에 의존적으로 세포 독성에 의한 세포생존도가 감소되었다(Fig. 1). 즉, 세포생존도가 15분 배양시간 부터 DPBS만 넣은 정상 세포에 비해 유의적으로 감소하였으며, 45분 배양 시 약 50%로 측정되었다

(Fig. 1A). 또한 허혈 후 재관류 시간에 따른 세포생존도를 측정된 결과 24시간 재관류에서 세포생존도가 50%로 나타났으며, 재관류 시간에 의존적으로 감소하였다(Fig. 1B). 따라서 SK-N-SH 세포에서의 일당귀추출물의 세포생존도 감소에 대한 효과를 조사하기 위해서 45분 허혈과 24시간 재관류 조건으로 실험하였다.

한편, SK-N-SH 세포에 일당귀추출물(AA)을 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/ml 농도로 처리한 후 24시간 배양하여 WST-1 assay 방법으로 세포독성을 측정된 결과, 각각 $115.38 \pm 5.21\%$, $114.19 \pm 5.98\%$, $115.61 \pm 2.49\%$, $105.14 \pm 2.76\%$ 로 1 mg/ml 농도까지 독성이 나타나지 않았다(Fig. 2A). 또한 SK-N-SH 세포에 45분 동안 허혈 손상을 준 다음 24시간 재관류하여 세포사멸을 유도한 다음 독성이 없는 농도 범위의 일당귀추출물을 처리하여 세포생존도를 측정된 결과, 일당귀추출물을 처리한 세포에서 허혈·재관류에 의해 감소된 세포생존도가 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2B). 따라서 일당귀추출물은 허혈·재관류 손상에 따른 세포손상으로부터 신경세포를 보호하는 것으로 나타났다.

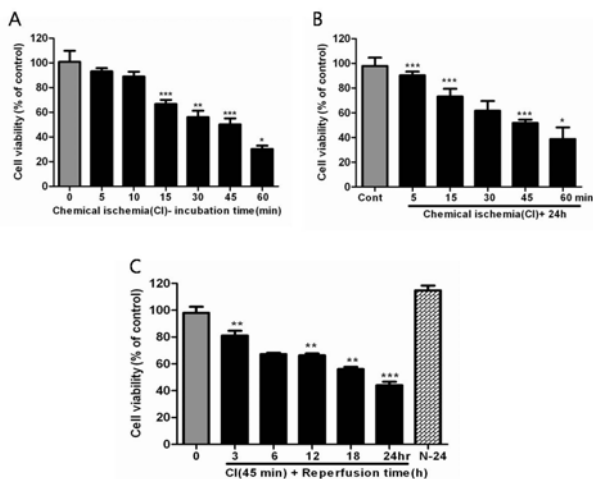


Fig. 1. Induction of chemical ischemia-reperfusion injury in SK-N-SH cells. The changes of cell viability in cells after chemical ischemia. Cells were incubated with CI-DPBS containing 3mM sodium azide and 10 mM 2-deoxy-D-glucose for 0, 5, 15, 30, 45 and 60 min (A), and reperused for 0, 3, 6, 18 and 24 h (B,C). The cell viability was determined by WST-1 assay. B, the changes of cell viability in cells after chemical ischemia and reperfusion. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. cells alone with DPBS.

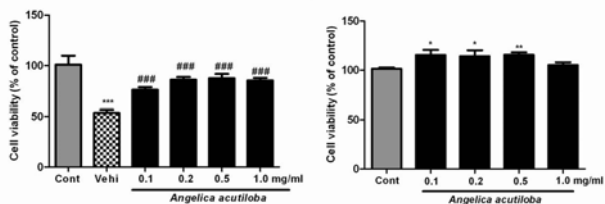


Fig. 2. Effects of Angelicae Acutilobae Radix(AA) water extract on chemical ischemia-reperfusion injury in SK-N-SH cells. Cells were incubated with different concentrations of AA extract (A) or after 45 min chemical ischemia and 24 h reperfusion with CI-DPBS (B). Cell toxicity was measured by WST-1 assay. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. normal cells; and # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. chemical ischemia reperfusion group.

2. 에너지 생성에 대한 효과

일당귀추출물의 신경세포에서의 허혈·재관류 손상에 의한 에너지 감소에 대한 조절 효과를 확인하기 위해 SK-N-SH 세포에 45분 허혈손상과 24시간 재관류 조건으로 세포사멸을 유도한 후 일당귀추출물을 처리하여 ATP/ADP ration을 측정하였다. 그 결과, 허혈성 손상이 유발된 세포(vehicle)에서는 ATP의 생성이 정상 세포에 비해 현저히 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 3A). 또한 일당귀추출물(AA)을 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 ATP의 생성이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3B). 특히 일당귀 추출물을 1 mg/ml 농도로 처리하였을 때 정상 세포와 유사한 수준으로 에너지 생성이 증가하였다.

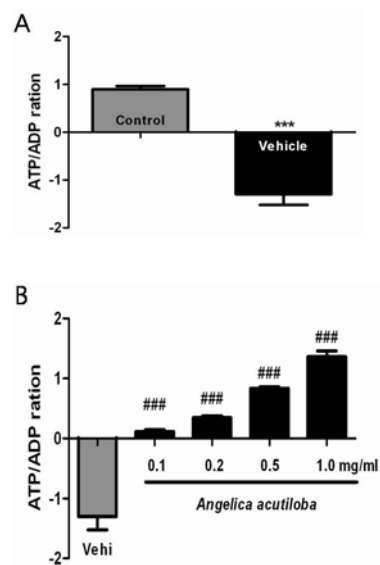


Fig. 3. Effects of Angelicae Acutilobae Radix(AA) water extract on chemical ischemia-reperfusion induced decreasing of ATP levels in SK-N-SH cells. Cells were incubated with CI-DPBS for 45 min and reperused for 24 h. Cells were incubated with different concentrations of AA extract for 2 h (A). The ration of ATP/ADP was measured ATP/ADP ration kit. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. *** $P < 0.001$ vs. control; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. vehicle group.

3. Caspase-3 발현에 대한 효과

Caspase-3는 시스테인 단백질 분해효소(cysteine aspartate specific protease)로서 세포사멸을 유발시키는데 중요한 역할을 한다. 따라서 신경세포에서의 caspase-3의 발현에 대한 일당귀추출물의 효과를 확인하기 위해서 허혈·재관류 손상 후 일당귀추출물을 처리하여 Western blot을 수행하였다. 그 결과 정상세포에 비해 허혈·재관류를 통해 세포사멸이 유발된 신경세포에서 caspase-3의 발현이 현저히 증가하였으며 이는 일당귀추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 4). 특히 일당귀추출물을 1 mg/ml 처리하였을 때 정상세포에서와 유사하게 caspase-3의 발현이 억제되었으며 이는 일당귀추출물이 허혈·재관류 손상에 의한 세포사멸로부터 caspase-3 발현을 억제함으로써 신경세포를 보호할 수 있음을 의미한다.

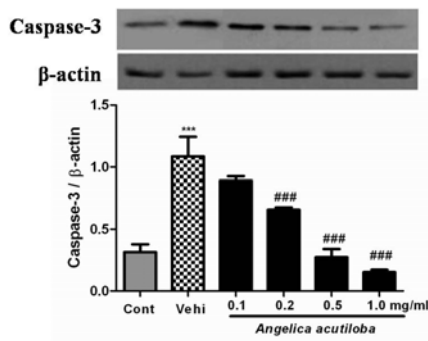


Fig. 4. Effects of *Angelicae Acutilobae Radix* (AA) water extract on chemical ischemia·reperfusion induced expression of caspase-3 protein in SK-N-SH cells. Cells were treated with different concentration (0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/ml) of AA extract after chemical ischemia·reperfusion injury. The expression of caspase-3 protein was determined by Western blot. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments (SD=bars). ***P<0.001 vs. control ; and #P<0.05, ###P<0.001 vs. vehicle (Vehi) group.

4. DNA 변성에 대한 효과

신경세포에서 허혈·재관류 손상에 따른 세포사멸로부터 유발되는 핵의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 허혈·재관류 손상 후 일당귀추출물을 처리한 후 Hoechst33258 염색을 수행하였다. 그 결과, 허혈·재관류 손상으로 세포사멸이 유발된 세포에서 Hoechst33258에 핵이 염색됨으로써 세포사멸 특이적 응축되거나 조각진 핵 내 apoptotic body를 관찰할 수 있었다(Fig. 5a). 또한 일당귀추출물을 처리한 세포에서는 농도에 의존적으로 apoptotic body가 감소한 것을 관찰하였다.

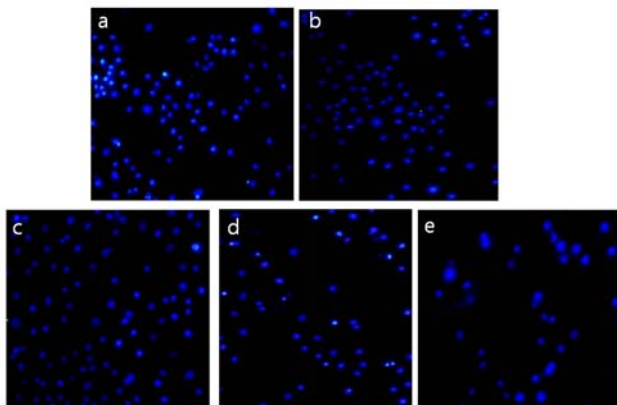


Fig. 5. Effects of *Angelicae Acutilobae Radix* (AA) water extract on chemical ischemia·reperfusion induced production of apoptotic body in SK-N-SH cells by Hoechst 33342 staining. a, vehicle group ; b, AA 0.1 mg/ml ; c, AA 0.2 mg/ml ; d, AA 0.5 mg/ml ; and e, AA 1 mg/ml-treated cells (x400).

고찰

대뇌의 생리적 기능은 혈액으로부터 산소와 포도당 공급에 의존하고 있으며, 뉴런은 저산소증·저혈당 조건에 매우 취약하기 때문에 산소와 포도당 공급이 몇 분 동안만 되지 않아도 치명적인 손상을 유발하게 된다. 뇌에서 허혈성 손상은 과도한 활성산소의 생성을 유도하며 활성산소는 산화적 손상을 통

해 뇌 세포 사멸을 유발하게 된다¹⁵⁾. 또한 노화의 원인은 이러한 활성산소에 의해 세포가 손상되기 때문이며 활성산소는 우리 몸에 필요한 에너지(ATP)를 얻기 위한 대사과정에서 생성된다¹⁶⁾. 한편 미토콘드리아는 산소 호흡 작용 시 생성되는 활성산소의 발생처로 인식되고 있으며 최근 노화 연구의 새로운 중심이 되고 있다. 즉 활성산소와 같은 산화적 스트레스에 의해 초래되는 미토콘드리아 손상과 기능부전이 노화 및 노화 관련 질환의 원인이 되며, 활성산소로 인한 DNA의 체세포 돌연변이, 미토콘드리아 DNA의 전사 장애로 인한 단백질 합성 저하, 이에 따른 다량의 활성산소 발생의 악순환이 반복됨으로써 노화 관련 질환들이 나타나게 되며, 미토콘드리아의 기능은 당뇨병, 동맥경화, 혈관기능, 심부전, 암, 노화, 뇌질환을 유발하는 것으로 보고되고 있다¹⁷⁻²⁰⁾. 뇌졸중과 같은 뇌혈관 질환의 경우, 뇌의 혈액 순환 장애에 의한 급격한 의식 장애와 운동마비를 수반하는 질환으로 주로 영양분과 산소 공급의 부족으로 인한 미토콘드리아 기능 손상과 세포 파괴가 유발되며, 세포사멸에 관여하는 여러 단백질들의 발현을 통해 뇌 신경세포가 죽게 되는 것으로 보고 있다. 즉, 산소와 포도당 고갈에 따른 미토콘드리아 내 에너지 대사이상, 그로인한 세포막 투과성변화에 따른 Ca²⁺ 등의 대량 유입, 세포사멸 관련 분자들의 발현 증가로 세포가 죽게 된다²¹⁾. 따라서 건강증진과 질병예방을 위해 미토콘드리아의 기능 유지 및 회복이 매우 중요한 전략으로 인식되고 있다.

당귀는 참당귀(토당귀 ; *Angelica gigas* Nakai.), 當歸(중국당귀 ; *Angelica Sinensis* Diels.), 大和當歸(일당귀 ; *Angelica acutiloba* Kitag.) 등의 건조한 뿌리로 본초학적 효능으로는 月經不調, 經閉腹痛, 癥瘕痞聚, 崩漏, 血虛頭痛, 眩暈, 痿痺, 腸燥便秘, 癰疽瘡瘍, 跌打損傷 등이 있으며 따뜻하고 무독하며 맛은 달고 시며 약간 쓰고 한의약에서 대표적인 보혈약 중 하나로 여겨진다. 또한 한의 임상에서 補血, 和血效果로 인해 각종 부인병에 널리 처방되고 있으며³⁶⁾, 여성의 혈부족증을 보하며 장기복용하면 자궁발육부전을 치료하는 것으로 알려져 있다. 그러나 시중에서 여러 가지 당귀가 모두 당귀라는 이름으로 유통되고 있지만³⁶⁾ 각 당귀에 따라 그 성분에는 상당한 차이가 있다. 특히 일당귀의 주요 성분은 Butylidene dihydrophthalide, 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone, 9,12-Octadecanoic acid, Butylidene phthalide, β-Farnesene 등이며 참당귀의 주요 성분인 Decursin, Decursinol angelate는 일당귀에는 소량만이 포함되어 있는 등의 차이를 보인다²²⁾. 일당귀의 약리적 효능 연구로는 항산화효과, 중추억제 작용, 간기능 회복 및 면역기능 강화 효과, 돌연변이 유발 억제 효과 및 항균활성 효과, 진통, 소염 및 관절염에 미치는 효능 연구 등이 보고 되고 있다²³⁻²⁸⁾. 본 연구에서는 일당귀 물추출물의 뇌 신경세포에서의 허혈성 손상에 대한 보호효과를 확인하기 위해 sodium azide와 2-deoxy-D-glucose 처리에 의한 chemical ischemia 신경세포 배양모델을 제작하였으며, 허혈과 재관류를 통해 세포사멸이 일어난 SK-N-SH 세포에서 일당귀 물추출물에 의한 세포증식 유도과 에너지대사 변화 및 세포사멸 억제 효과를 확인하였다.

고등동물의 대부분의 에너지는 미토콘드리아에서 합성되는 ATP로 충당되며 미토콘드리아에서 일어나는 에너지대사 작용은 노화와 밀접한 관계에 있다고 보고 있다. 뇌 조직에서 보

고된 결과를 보면, 노화에 따라 포도당 의존도가 증가하며 NAD^+ -isocitrate dehydrogenase 활성은 감소하는 것으로 알려져 있고, 노화된 조직의 Krebs cycle 효소 활성은 감소하고 세포의 미토콘드리아 의존도도 감소하게 된다²⁹⁾. 즉, 노화는 전반적인 미토콘드리아 기능 저하와 연관이 있을 것으로 추측되고 있다³⁰⁾. 본 연구에서 일당귀추출물은 뇌 신경세포에서 허혈·재관류 손상에 따른 현저한 ATP 합성의 감소를 개선시켜 에너지 대사를 증가시킴으로써 세포사멸을 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 또한, 일당귀추출물은 뇌 신경세포에서 화학적 허혈·재관류 손상에 따른 세포사멸 과정을 유도하는 caspase-3의 발현을 처리 농도에 의존적으로 억제함으로써 세포사멸을 차단하는 것으로 나타났다. 뇌졸중에서 허혈성 자극에 따른 혈관 장벽 밀착결합 부위 손상을 통한 혈장의 유출은 조직부종을 발생시키고 결국 관류장애로 인해 신경세포에서 산소를 이용한 에너지 대사 장애를 초래하여 신경세포 손상 및 사멸을 유도하게 된다³¹⁾. 따라서 일당귀추출물의 허혈성 손상에 따른 에너지대사 장애의 극복은 일당귀추출물이 신경세포 손상 및 사멸을 차단함으로써 뇌졸중과 같은 질환을 극복하는데 좋은 약물이 될 수 있음을 의미한다.

뇌 신경세포의 세포사멸은 다양한 뇌 질환의 병태생리와 직접 연관되며 정상적인 발생과정 중에도 이미 생성되었던 많은 여분의 세포들이 자연적으로 사멸하는 과정을 거치게 되기 때문에 세포사멸은 발생 프로그램 진행의 중요한 과정이기도 하다³²⁾. 세포사멸은 세포 표면의 death receptor 중재에 의한 I형 세포사멸과 미토콘드리아 중재에 의한 II형 세포사멸로 나누어지며, I형은 주로 Fas (APO-1/CD95)가 관여하여 caspase 기시체인 caspase-8이 caspase 효과체인 caspase-3를 활성화시킴으로써 세포사멸이 유발되게 된다. 반면 II형은 주로 미토콘드리아에 의해 분비된 cytochrome c가 관여하며 caspase 기시체인 caspase-9가 caspase 효과체인 caspase-3를 활성화시킴으로써 세포사멸을 유발하게 된다^{33,34)}. 특히 caspase-3는 세포사멸에 관여하는 많은 세포 단백질의 분절을 촉진하는 사멸 단백질분해효소(death protease)이다³⁵⁾. 본 연구에서 일당귀추출물은 뇌 신경세포에서 화학적 허혈·재관류 손상에 따른 세포사멸 과정을 유도하는 caspase-3의 발현을 처리 농도에 의존적으로 억제함으로써 세포사멸을 차단하는 것으로 나타났다. 또한, Hoechst 염색에 의한 세포 핵 내 형태학적 변화에서 일당귀추출물의 처리는 세포사멸 특이적 DNA의 응축이나 쪼개진 apoptotic body의 생성을 억제하였으며 이는 일당귀추출물에 의해 세포사멸로부터 신경세포가 보호되었음을 의미한다.

이상의 결과로부터 일당귀의 물추출물은 허혈·재관류 손상으로 부터 세포를 보호함으로써 세포증식을 유도하며, 미토콘드리아에서의 에너지(ATP) 양을 증가시키고, 세포사멸 유도분자의 발현을 억제함으로써 뇌 신경세포를 보호하는 것으로 나타났으며, 이는 일당귀가 에너지대사 향상 뇌 신경 보호 약물로 활용될 수 있음을 의미한다.

결론

본 연구에서는 뇌 신경세포인 SK-N-SH 세포에서 sodium azide와 2-deoxy-D-glucose 처리에 따른 허혈·

재관류 손상에 따른 세포사멸에서 일당귀 물추출물의 세포사멸 억제 및 에너지 증가에 따른 신경보호효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다

1. 일당귀 물추출물은 SK-N-SH 세포에서 허혈·재관류로 인한 손상으로부터 세포 증식을 유도하였다.
2. 일당귀 물추출물은 SK-N-SH 세포에서 허혈·재관류로 인한 에너지(ATP) 감소를 증가시켰다.
3. 일당귀 물추출물은 SK-N-SH 세포에서 허혈·재관류로 인한 caspase-3 발현 증가를 억제하였다.
4. 일당귀 물추출물은 SK-N-SH 세포에서 허혈·재관류로 인한 apoptotic body의 생성과 핵의 형태학적 변화를 감소시켰다.

따라서 일당귀 물추출물은 신경세포에서 세포사멸 유도 단백질의 발현 억제와 에너지 생성 증가를 통해 세포사멸로부터 신경세포를 보호하였으며, 이는 일당귀가 허혈성 손상으로 부터 뇌신경을 보호함으로써 뇌졸중과 같은 각종 뇌 질환 치료제 개발 소재로 활용될 수 있음을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 한국한의학연구원 위탁연구개발사업 연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Volpe JJ. Neurology of the newborn, 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders Co., 1995 : 211-59.
2. Yoon JY, Lee OJ, Song ES. Effect of Aging on Malate Dehydrogenase, Cytochrome c Oxidase Activities and RCR in Rat Liver Mitochondria. Kor J Gerontol, 2001 ; 11(2) : 36-40.
3. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem. J. 1973 ; 134 : 707-716.
4. Lee JW, Shim YH. Mitochondrial Permeability Transition Pore and Cardioprotection Against Ischemia-reperfusion Injury. J Korean Med Assoc. 2009 ; 52(10) : 1007-19
5. Kim GT, Chun YS, Park JW, Kim MS : Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion. Biochem Biophys Res Commun. 2003 ; 309(3) : 619-24.
6. The Concerted Publishing of the Korean National Herbology Professor. Herbology. Seoul : Yeong Lim Sa. 2004 : 632-34.

7. Jun YY, Park CS, Park CG. An Experimental Study of Effect on Brain DamAAe and Neuroprotective Effect of Angelicae Gigantis Radix extract AAainst Cerebral Ischemia in Rats. Kor. J. Herbology 2003 ; 18(4) : 25-35.
8. Lv N, Koo JH, Yoon HY, Yu J, Kim KA, Choi IW, Kwon KB, Kwon KS, Kim HU, Park JW, Park BH. Effect of Angelica gigas extract on melanogenesis in B16 melanoma cells. Int J Mol Med. 2007 ; 20(5) : 763-7.
9. Park YK. The anti-oxidant effects of Ligusticum chuanxiong, Cnidium officinale and their mixyure with Angelica gigas. Kor J Herbology. 2007 ; 22(4) : 101-8.
10. Joo SS, Park D, Shin S, Jeon JH, Kim TK, Choi YJ, Lee SH, Kim JS, Park SK, Hwang BY, Lee do I, Kim YB. Anti-allergic effects and mechanisms of action of the ethanolic extract of Angelica gigas in dinitrofluorobenzene-induced inflammation models. Environ Toxicol Pharmacol. 2010 ; 30(2) : 127-33.
11. Li L, Li W, Jung SW, Lee YW, Kim YH. Protective effects of decursin and decursinol angelate AAainst amyloid β -protein-induced oxidative stress in the PC12 cell line : the role of Nrf2 and antioxidant enzymes. Biosci Biotechnol Biochem. 2011 ; 75(3) : 434-42.
12. Kim JH, Jeong SJ, Kwon HY, Park SY, Lee HJ, Lee HJ, Lieske JC, Kim SH. Decursin prevents cisplatin-induced apoptosis via the enhancement of antioxidant enzymes in human renal epithelial cells. Biol Pharm Bull. 2010 ; 33(8) : 1279-84.
13. Takata T, Okada Y. Effects of deprivation of oxygen or glucose on the neural activity in the guinea pig hippocampal slice-intracellular recording study of pyramidal neurons. Brain Res. 1995 ; 683 : 109-16.
14. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. Biol. Pharmaceut. Bull. 1996 ; 19 : 1518-20.
15. Park YK, Han HS. Protective effects of added Bo-Yang-Oh-Tang on H₂O₂-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuronal cells. Kor J Herbology. 2006 ; 21(4) : 85-92.
16. Schaller B, Graf R. Cerebral ischemia and reperfusion : the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2004 ; 24 : 351-71.
17. Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. Mech Ageing Dev. 2005 ; 126 : 907-8.
18. Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. N Engl J Med. 2007 ; 356 : 1140-51.
19. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. Science 2005 ; 309 : 481-4.
20. Son HY, Park YK. Neuroprotective effect of modified Boyanghwano-Tang and the major medicinal plants, Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix on ischemic stroke in rats. Kor. J. Herbology. 2010 ; 25(2) ; 71-9
21. Kirno T, Tamura A, Aano K. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. Acta Neuropathol(Beri). 1984 ; 64 : 139-47.
22. Cho SK, Abd El-Aty AM, Cho JH, Kim MR, Shim JH. Optimized conditions for the extraction of secondary volatile metabolites in Angelica roots by accelerated solvent extraction. J. Pharm Biomed Anal. 2007 ; 44 : 1154-8
23. Yamada H, Komiyama K, Kiyohara H, Cyong JC, Hirakawa Y, Otsuka Y. Structural characterization and anti-tumor activity of a peptic polysaccharide from the roots of Angelica acutiloba. Planta Medica. 1990 ; 56 : 182-6.
24. Yun KW, Choi SK. Antimicrobial activity in 2 Angelica species extracts. Korean J. Plant Res. 2004 ; 17 : 278-82
25. Dakaki K. Whahanyakmoolhak. Tokyo, Japan : Namsandang. 1982 : 293-7.
26. Han CK. Effects of Angelicae radix on anemic rabbit and content of decursin. Seoul : Kyunghee University. 1983.
27. Ham MS, Kim SS, Hong JS, Lee JH, Chung EK, Park YS, Lee HY. Screening and comparison of active substances of Angelica gigas Nakai produced in Kangwon and Angelica acutiloba Kitagawa produced in Japan. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996 ; 24 : 624-9.
28. Kim JM, Seo BI, Byun BH. Comparative study of efficacy of Angelicae gigantis radix and Angelicae acutilobae radix extract on analgesic effects, anti-inflammatory effects and arthritis. J. Appl. Oriental Med. 2004 ; 4 : 1-13.
29. Vitorica J, Andres A, Satrustegui J and Machado A. Age-related quantitative changes in enzyme activities of rat brain. Neurochem Res. 1981 ; 6 : 127-36.
30. Torii K, Sugiyama S, Takagi K, Satake T and Ozawa T. Age-related decrease in respiratory muscle mitochondrial function in rats. Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 1992 ; 6 : 88-92.

31. Ding Y, Li J, Luan X, Ding Y H, Lai Q, Rafols J A. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. *Neuroscience*, 2004 ; 124 : 583-91.
32. Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol*, 1999 ; 9 : 93-117.
33. Chosa N, Kyakumoto S, Kito N, Kamo M, Sato N. Mechanism of Fas-mediated cell death and its enhancement by TNF- α in human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG. *Eur J Oral Sci*, 2004 ; 112 : 338-46.
34. Jimenez F, Aiba-Masago S, Hashimi IA, Vela-Roch N, Fernandes G, Yeh CK. Activated caspase 3 and cleaved poly (ADP-ribose) polymerase in salivary epithelium suggest a pathogenetic mechanism for Sjogren' s syndrome. *Rheumatology*, 2002 ; 41 : 338-42.
35. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999 ; 6 : 99-104.
36. Song SH, Seo BL, Kim HK, Park JH. The effects of *Angelicae Gigantis Radix*, *Angelicae Acutilobae Radix* and *Angeliae Sinensis Radix* extract on hydrocortisone acetate-induced model of blood stasis. *Kor J Herbology*, 2004 ; 19(1) : 13-21.