

## 遠志물추출물이 Apoptosis에 미치는 효과

이상철<sup>#</sup>, 김연섭<sup>\*</sup>

가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실

### Effects of Polygalae Radix on Apoptosis in PC-12 Cell

Sang-Chul Lee<sup>#</sup>, Youn-Sub Kim<sup>\*</sup>

Department of Anatomy-Pointology, College of Oriental Medicine, Gachon University

#### ABSTRACT

**Objectives** : The purpose of this study was to observe the effects of Polygalae Radix(PR) on 4-HNE-induced apoptosis in PC-12 cell.

**Methods** : A MTT assay was conducted to observe the cytotoxicity of Polygalae Radix on the cell viability and the cytoprotective effect of Polygalae Radix against 4-HNE that causes oxidative stress-induced cytotoxicity, and then a western blot was conducted to observe the expression of TNF- $\alpha$ , caspase-3, Bax and Bcl-2 protein that are important factors involved with apoptosis signaling pathway.

**Results** : The Polygalae Radix water extract 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, 100  $\mu$ g and 200  $\mu$ g/mL had no cytotoxicity on the PC-12 cell. The Polygalae Radix water extract 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g and 100  $\mu$ g/mL had the cytoprotective effect against 4-HNE that causes cytotoxicity on the PC-12 cell. The Polygalae Radix water extract 50  $\mu$ g/mL significantly suppressed the increase in TNF- $\alpha$  protein expression in PC-12 cell. The Polygalae Radix water extract 25  $\mu$ g and 50  $\mu$ g/mL significantly suppressed the increase in caspase-3 protein expression in PC-12 cell. The Polygalae Radix water extract 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g and 100  $\mu$ g/mL suppressed the increase in Bax protein expression in PC-12 cell but had no significance. The Polygalae Radix water extract 25  $\mu$ g and 100  $\mu$ g/mL significantly prevented the decrease in Bcl-2 protein expression in PC-12 cell.

**Conclusions** : These results suggest that the Polygalae Radix water extract is effective in inhibiting apoptosis.

**Key words** : Polygalae Radix, 4-HNE, TNF- $\alpha$ , caspase-3, Bax, Bcl-2

## 서론

세포사멸(apoptosis)이란 세포가 특정 상황에서 스스로 죽기로 결정하고 ATP를 소모하면서 죽음에 이르는 과정을 말한다. 이러한 apoptosis는 세포가 압축되고, 원형질막의 거품이 형성되고, 핵과 세포는 조각나고 염색체는 응축되면서 죽은 세포는 막으로 둘러싸인 조각으로 부서지고 주변세포에 포획되어 흡수되는 것으로 끝난다<sup>1,2)</sup>.

Apoptosis는 크게 두 가지 경로로 일어나는데 외부적 경로(extrinsic pathway)인 죽음수용체 경로(death receptor pathway)와 내재적 경로(intrinsic pathway)인 미토콘드리아 경로(mitochondrial pathway)가 있다<sup>3,4)</sup>. Death receptor

pathway는 세포외부의 죽음신호를 감지하고 세포 내부로 세포사멸 신호를 전달하는 경로로 Tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ 와 같은 특수한 ligand와 죽음수용체(death receptor)와의 결합으로 caspase-3를 활성화시켜서 apoptosis가 시작되고 mitochondrial pathway는 세포 내부에서 만들어진 신호에 의해서 apoptosis를 진행하는 경로로 Bcl-2의 활동이 줄어들고 Bax의 활동이 증가하면서 cytochrome C 등을 방출하면서 apoptosis를 진행한다<sup>5,6)</sup>.

遠志(*Polygala tenuifolia* Willdenow)는 원지과에 속한 다년생 초본인 원지의 뿌리를 건조한 것으로 주로 정신 신경계 질환에 다용하였다<sup>7)</sup>. 신경세포의 손상을 억제하는 효능에 대

\*Corresponding author : Youn-Sub Kim, Department of Anatomy-Pointology, College of Oriental Medicine, Gachon University  
· Tel : +82-31-750-5420 · FAX : +82-31-750-5416 · E-mail : ysk5708@hanmail.net

#First author : Sang-Chul Lee, Department of Anatomy-Pointology, College of Oriental Medicine, Gachon University  
· Tel : +82-31-750-5427 · FAX : +82-31-750-5416 · E-mail : omd1969@empal.com

· Received : 28 December 2014 · Revised : 26 January 2015 · Accepted : 27 January 2015

한 연구가 활발하게 진행되면서 신경세포사(cell death)에 대한 보호 효과<sup>8)</sup>, 항염증 효과<sup>9)</sup>, 퇴행성 뇌질환 보호 효과<sup>10)</sup>, 인지 기능 개선 효과<sup>11)</sup> 등이 있는 것으로 보고되었다. 遠志의 이러한 효능은 세포손상에 의해 촉진되는 apoptosis를 억제하는 작용과 관련이 있는 것으로 생각된다.

이에 저자는 遠志가 PC-12 cell의 apoptosis에 미치는 효과를 연구하였다. 먼저 遠志물추출물의 세포독성을 검사하기 위해서 세포 생존율 측정을 위한 MTT assay를 하였다. 그리고 세포보호 효과를 관찰하고자 4-Hydroxynonenal (4-HNE)을 주입하여 손상된 PC-12 cell의 세포 생존율을 측정하였다. 또한 apoptosis에 관여하는 대표적인 인자인 TNF- $\alpha$ , caspase-3, Bax 및 Bcl-2 단백질의 발현을 western blot으로 관찰한 바 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양

본 실험에 사용한 PC-12 세포(rat adrenal pheochromocytoma cell)는 신경세포의 특성을 나타내며 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다. 세포의 배양을 위해 10% horse serum과 5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 2% NaHCO<sub>3</sub>가 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하였으며 37°C의 온도와 5% CO<sub>2</sub>가 포함된 공기가 공급되는 CO<sub>2</sub> incubator에서 세포를 배양하였다.

### 2. 기기 및 시약

#### 1) 기기

본 실험을 위해 사용된 기기로는 Centrifuge(Gyrozen, Korea), CO<sub>2</sub> Incubator(Nuaire, USA), Clean Bench(Nuaire, USA), Gel Doc XR System(Bio-Rad, USA), Microplate Reader(Dynex, USA), Water Purification(High-Q, USA), Freezing dryer(Eyela, Japan), Balance(Mettler, Switzerland), Spectrophotometer(Implen, Germany), Sonicator (Sonics, USA), Automatic X-RAY Film Processor(JPI, Korea), Auto clave(sam woo, Korea) 등이 있다.

#### 2) 시약

본 실험에 사용된 시약으로는 4-Hydroxy Nonenal (Cayman, USA), Trzma Base(Sigma, USA), RPMI Medium 1640(Gibco, USA), Horse Serum(Gibco, USA), MTT(Sigma, USA), Fetal Bovine Serum(Gibco, USA), Dimethyl Sulfoxide(Amresco, USA), Sodium Chloride(Sigma, USA), Sodium Bicarbonate(Sigma, USA) 등을 구입하여 사용하였다.

### 3. 한약물의 제조

본 실험에 사용한 遠志(Polygalae Radix, PR)는 (주)유니허브에서 구입하였다. 遠志 50g에 삼차증류수 500ml를 가하여 환류추출기에서 2시간 동안 100°C로 전탕하고, 여과(Advantec No 2 5 $\mu$ m, Japan)한 액을 rotary evaporator로 감압 농축

한 이후 동결건조 처리하였다. 遠志는 10.5g의 추출물을 얻어서 수율은 21% 이었다.

### 4. 세포 생존율 측정(MTT assay)

1) PC-12 cell 에서 遠志물추출물의 세포 생존율 측정  
遠志물추출물의 PC-12 세포 생존율을 측정하기 위해서 96 well plate에 각 well당  $2 \times 10^4$  개/mL를 성장 배지에 seeding하고 24시간 이후에 serum-free RPMI 1640 배지로 갈아주고 遠志물추출물을 처리하지 않은 정상군(Normal)과 遠志물추출물을 각각 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, 100  $\mu$ g, 200  $\mu$ g 및 400  $\mu$ g/mL의 농도로 24시간 처리한 실험군으로 나누었다. MTT 용액(stock concentration : 5 mg/mL)를 96 well에 15 $\mu$ l 씩 넣고 37°C incubator에서 2시간 동안 배양시켰다. 그 후 media를 제거하고 DMSO 100 $\mu$ l를 넣은 이후 70°C incubator에서 10분간 녹여서 ELISA reader를 사용하여 흡광도 570nm에서 세포의 생존율을 측정하였다.

2) 4-HNE로 자극된 PC-12 cell에서 遠志물추출물의 세포 생존율 측정

4-HNE로 자극된 遠志물추출물의 PC-12 세포 생존율을 측정하기 위해서 96 well plate에 각 well당  $4 \times 10^4$  개/mL를 성장 배지에 seeding하고 24시간 후에 serum-free RPMI 1640 배지로 갈아주었다. 그룹은 6개 군으로, 정상군과 4-HNE 35  $\mu$ M을 처리한 대조군(Control), 遠志물추출물을 각각 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, 100  $\mu$ g 및 200  $\mu$ g/mL을 24시간 처리한 이후 4-HNE를 35  $\mu$ M의 농도로 24시간 동안 처리하여 실험을 진행하였다. 4-HNE로 자극된 PC-12 cell에서 遠志물추출물의 세포 생존율 측정을 위해서 MTT Assay를 이용하였다.

### 5. Western Blot Analysis

세포의 사멸과 증식에 관련된 여러 가지 단백질의 발현량을 확인하고자 western blot을 실시하였다. 세포는 차가운 PBS(pH 7.4)로 2번 씻어낸 후 원심분리기를 이용하여 1000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 그리고 세포안정화를 위해서 세포분해용액(iNtRON Biotechnology, Korea)을 넣은 후 초음파 분쇄기로 세포를 깨서 균질화하고 다시 원심분리기를 이용하여 20분 동안 12,000 rpm으로 원심 분리하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad의 protein assay dye reagent (Bio-Rad, USA)를 사용하여 흡광도로 측정하였다. 정량한 단백질을 Mini-PROTEAN® TGXTM Gel(Bio-Rad, USA)에 loading하여 분리한 다음 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, USA)으로 이동시켰다. 1차 항체로 mouse actin antibody(1:15,000; Millipore, USA), rabbit TNF- $\alpha$  antibody(1:1000; CST, USA), rabbit Caspase-3 antibody (1:2000; CST, USA), rabbit Bax antibody(1:1000; CST, USA)와 rabbit Bcl-2 antibody(1:1000; CST, USA)를 사용하였다. 2차 항체로는 TNF- $\alpha$ , Caspase-3, Bax, Bcl-2용 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (CST, USA)를 사용하였다. Nitrocellulose membrane으로

단백질 이동은 4℃ 냉장고 안에서 실시하였고 나머지 모든 실험은 실온에서 시행하였다. 단백질 밴드 검출은 ECL detection Reagent (Amersham, UK)를 사용하여 발색시켰다. 각 단백질의 발현을 비교하기 위해서 발색된 band의 밀도는 Gel Documentation (Bio-Rad, USA)의 Quantity One Analysis Software (Bio-Rad)로 측정을 하였다.

## 6. 통계처리

실험결과에 대한 분석은 Graphpad Prism(USA)으로 Student's *t*-test를 사용하였다. 모든 통계적 유의성 검정은  $P < 0.05$ 로 평가하였다. 실험 결과는 평균±평균의 표준오차 [means±standard error of the mean(SEM)]로 나타내었다.

# 결 과

## 1. 遠志물추출물이 세포 생존율에 미치는 효과

遠志물추출물이 PC-12 cell에 독성이 있는가를 관찰하고자 세포에 遠志물추출물을 처리하고 세포의 생존율을 측정하였다. 정상군의 세포 생존율을 100%로 하였다.

遠志물추출물 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  주입군(PR25)에서 PC-12 cell 생존율은  $129.5 \pm 7.60\%$ 이고 遠志물추출물 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  주입군(PR50)에서 PC-12 cell 생존율은  $134.0 \pm 9.54\%$ 이었다. 遠志물추출물 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  주입군(PR100)의 PC-12 cell 생존율은  $137.8 \pm 10.42\%$ 이며, 遠志물추출물 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  주입군(PR200)의 PC-12 cell 생존율은  $106.8 \pm 12.80\%$ 로 대조군에 비해 증가하였으나 모두 유의성은 없었다.

遠志물추출물 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  주입군(PR400)의 PC-12 cell 생존율은  $70.50 \pm 9.61\%$ 로 대조군에 비해 감소를 나타내었으나 유의성은 없었다.

이처럼 遠志물추출물 25  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}$  및 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 세포독성이 없었기 때문에 실험농도로 선택하였다(Fig. 1).

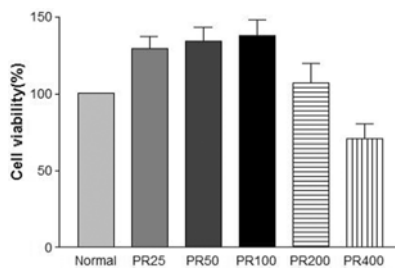


Fig 1. Effect of Polygalae Radix water extract(PR) on the cell viability. Normal ; only media-treated group. PR25 ; 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PR-treated group. PR50 ; 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PR-treated group. PR100 ; 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PR-treated group. PR200 ; 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PR-treated group. PR400 ; 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PR-treated group. Data are represented by mean±SEM (n=4 in each group). Statistical significances are based on comparison to the Normal group.

## 2. 遠志물추출물이 4-HNE 손상에 대한 세포보호 효과

遠志물추출물이 4-HNE 손상에 의한 PC-12 cell에 미치는

효과를 관찰하고자 세포에 遠志물추출물을 처리하고 4-HNE를 주입한 다음 세포의 OD(광학밀도)를 측정하였다. 정상군의 세포 OD를  $1.029 \pm 0.036\text{nm}$ 으로 하였으며 4-HNE만 투여한 대조군의 PC-12 cell OD는  $0.604 \pm 0.026\text{nm}$ 이었다.

遠志물추출물 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 4-HNE를 주입한 군(PR25)의 PC-12 cell OD는  $0.679 \pm 0.013\text{nm}$ 이었고, 遠志물추출물 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 4-HNE를 주입한 군(PR50)의 PC-12 cell OD는  $0.673 \pm 0.029\text{nm}$ 이었으며, 遠志물추출물 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 4-HNE를 주입한 군(PR100)의 PC-12 cell OD는  $0.682 \pm 0.029\text{nm}$ 으로 세 군 모두 대조군에 비해 증가를 나타내었으나 遠志물추출물 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 4-HNE를 주입한 군(PR25)의 PC-12 cell에서만 유의성을 나타내었다.

반면에 遠志물추출물 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 4-HNE를 주입한 군(PR200)의 PC-12 cell OD는  $0.449 \pm 0.053\text{nm}$ 으로 대조군에 비해 감소를 나타내었다.

이처럼 遠志물추출물 25  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$  및 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 4-HNE의 세포독성으로부터 세포보호 효과가 있었기 때문에 실험농도로 선택하였다(Fig. 2).

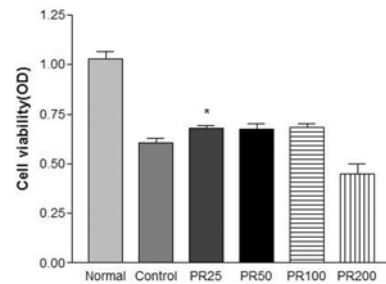


Fig 2. Effect of Polygalae Radix water extract(PR) on the cell viability with 4-HNE. Normal ; only media-treated group. Control ; 35  $\mu\text{M}$  4-HNE-treated group. PR25 ; 35  $\mu\text{M}$  4-HNE and 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PR-treated group. PR50 ; 35  $\mu\text{M}$  4-HNE and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PR-treated group. PR100 ; 35  $\mu\text{M}$  4-HNE and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PR-treated group. PR200 ; 35  $\mu\text{M}$  4-HNE and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PR-treated group. Data are represented by mean±SEM (n=4 in each group). Statistical significances are based on comparison to the Control group (\*,  $p < 0.05$ ).

## 3. 遠志물추출물이 TNF- $\alpha$ 단백질 발현에 미치는 효과

遠志물추출물이 death receptor pathway에서 apoptosis를 촉진하는 인자(proapoptosis)인 TNF- $\alpha$ 에 미치는 효과를 관찰하고자 세포에 遠志물추출물을 처리하고 4-HNE를 주입한 다음 세포의 TNF- $\alpha$  단백질 발현량을 측정하였다. 정상군의 TNF- $\alpha$  단백질 발현량을 100%로 하였으며, 4-HNE만 투여한 대조군의 TNF- $\alpha$  단백질 발현량은  $215.7 \pm 28.01\%$ 이었다.

遠志물추출물 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 4-HNE를 주입한 군(PR25)에서 TNF- $\alpha$  단백질 발현량은  $147.7 \pm 14.44\%$ 이고, 遠志물추출물 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 4-HNE를 주입한 군(PR50)에서 TNF- $\alpha$  단백질 발현량은  $121.3 \pm 15.86\%$ 이었으며, 遠志물추출물 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 4-HNE를 주입한 군(PR100)에서 TNF- $\alpha$  단백질 발현량은  $206.3 \pm 36.56\%$ 로 대조군에 비해 모두 감소를 하였으나 遠志물추출물 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 4-HNE를 주입한 군(PR50)에서만 유의성을 나타내었다(Fig. 3).

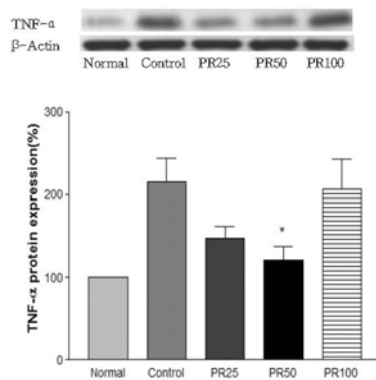


Fig 3. Effect of Polygalae Radix water extract(PR) on TNF- $\alpha$  expression, Normal ; only media-treated group. Control ; 35  $\mu$ M 4-HNE-treated group. PR25 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 25  $\mu$ g/mL PR-treated group. PR50 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 50  $\mu$ g/mL PR-treated group. PR100 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 100  $\mu$ g/mL PR-treated group. Data are represented by mean $\pm$ SEM (n=3 in each group). Statistical significances are based on comparison to the Control group (\*,  $p$ <0.05).

#### 4. 遠志물추출물이 Caspase-3 단백질 발현에 미치는 효과

遠志물추출물이 death receptor pathway에서 apoptosis를 촉진하는 인자(proapoptosis)인 Caspase-3에 미치는 효과를 관찰하고자 세포에 遠志물추출물을 처리하고 4-HNE를 주입한 다음 세포의 Caspase-3 단백질 발현량을 측정하였다. 정상군의 Caspase-3 단백질 발현량을 100%로 하였으며, 4-HNE만 투여한 대조군의 Caspase-3 단백질 발현량은 237.0 $\pm$ 25.03%이었다.

遠志물추출물 25  $\mu$ g/mL과 4-HNE를 주입한 군(PR25)에서 Caspase-3 단백질 발현량은 149.7 $\pm$ 3.84%이고 遠志물추출물 50  $\mu$ g/mL과 4-HNE를 주입한 군(PR50)에서 Caspase-3 단백질 발현량은 137.0 $\pm$ 20.55%로 대조군에 비해 모두 유의한 감소를 하였다.

遠志물추출물 100  $\mu$ g/mL과 4-HNE를 주입한 군(PR100)에서 Caspase-3 단백질 발현량은 249.3 $\pm$ 27.24%로 대조군에 비해 증가하였다(Fig. 4).

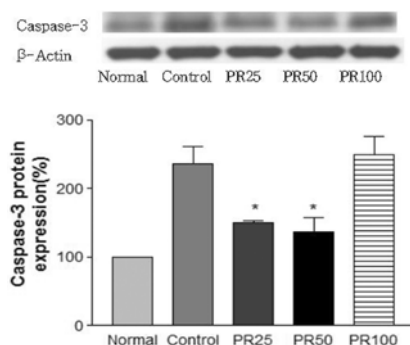


Fig 4. Effect of Polygalae Radix water extract(PR) on Caspase-3 expression, Normal ; only media-treated group. Control ; 35  $\mu$ M 4-HNE-treated group. PR25 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 25  $\mu$ g/mL PR-treated group. PR50 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 50  $\mu$ g/mL PR-treated group. PR100 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 100  $\mu$ g/mL PR-treated group. Data are represented by mean $\pm$ SEM (n=3 in each group). Statistical significances are based on comparison to the Control group (\*,  $p$ <0.05).

#### 5. 遠志물추출물이 Bax 단백질 발현에 미치는 효과

遠志물추출물이 mitochondrial pathway에서 apoptosis를 촉진하는 인자(proapoptosis)인 Bax에 미치는 효과를 관찰하고자 세포에 遠志물추출물을 처리하고 4-HNE를 주입한 다음 세포의 Bax 단백질 발현량을 측정하였다. 정상군의 Bax 단백질 발현량을 100%로 하였으며, 4-HNE만 투여한 대조군의 Bax 단백질 발현량은 118.30 $\pm$ 17.13%이었다.

遠志물추출물 25  $\mu$ g/mL과 4-HNE를 주입한 군(PR25)에서 Bax 단백질 발현량은 98.33 $\pm$ 5.55%이고, 遠志물추출물 50  $\mu$ g/mL과 4-HNE를 주입한 군(PR50)에서 Bax 단백질 발현량은 86.33 $\pm$ 8.21%이며, 遠志물추출물 100  $\mu$ g/mL과 4-HNE를 주입한 군(PR100)에서 Bax 단백질 발현량은 62.00 $\pm$ 16.26%로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5).

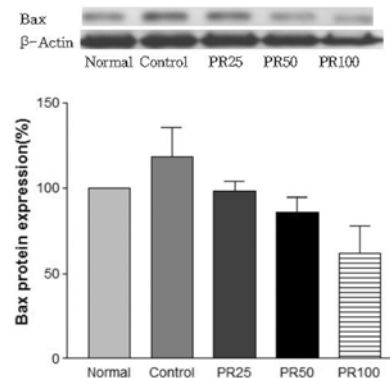


Fig 5. Effect of Polygalae Radix water extract(PR) on Bax expression, Normal ; only media-treated group. Control ; 35  $\mu$ M 4-HNE-treated group. PR25 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 25  $\mu$ g/mL PR-treated group. PR50 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 50  $\mu$ g/mL PR-treated group. PR100 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 100  $\mu$ g/mL PR-treated group. Data are represented by mean $\pm$ SEM (n=3 in each group). Statistical significances are based on comparison to the Control group.

#### 6. 遠志물추출물이 Bcl-2 단백질 발현에 미치는 효과

遠志물추출물이 mitochondrial pathway에서 apoptosis를 억제하는 인자(antiapoptosis)인 Bcl-2에 미치는 영향을 관찰하고자 세포에 遠志물추출물을 처리하고 4-HNE를 주입한 다음 세포의 Bcl-2 단백질 발현량을 측정하였다. 정상군의 Bcl-2 단백질 발현량을 100%로 하였으며, 4-HNE만 투여한 대조군의 Bcl-2 단백질 발현량은 43.06 $\pm$ 6.17%이었다.

遠志물추출물 25  $\mu$ g/mL과 4-HNE를 주입한 군(PR25)에서 Bcl-2 단백질 발현량은 71.91 $\pm$ 5.60%이고, 遠志물추출물 50  $\mu$ g/mL과 4-HNE를 주입한 군(PR50)에서 Bcl-2 단백질 발현량은 45.81 $\pm$ 5.61%이었으며, 遠志물추출물 100  $\mu$ g/mL과 4-HNE를 주입한 군(PR100)에서 Bcl-2 단백질 발현량은 82.69 $\pm$ 2.39%로 대조군에 비해 모두 증가를 하였으나 遠志물추출물 25  $\mu$ g/mL과 4-HNE를 주입한 실험군(PR25)과 遠志물추출물 100  $\mu$ g/mL과 4-HNE를 주입한 실험군(PR100)

에서만 유의성을 나타내었다(Fig. 6).

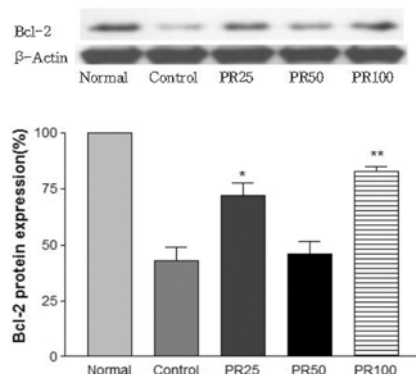


그림 7

Fig 6. Effect of Polygalae Radix water extract(PR) on Bcl-2 expression. Normal ; only media-treated group. Control ; 35  $\mu$ M 4-HNE-treated group. PR25 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 25  $\mu$ g/mL PR-treated group. PR50 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 50  $\mu$ g/mL PR-treated group. PR100 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 100  $\mu$ g/mL PR-treated group. Data are represented by mean $\pm$ SEM (n=3 in each group). Statistical significances are based on comparison to the Control group (\*,  $p$ <0.05; \*\*,  $p$ <0.01).

## 고찰

遠志는 心神不安, 失眠多夢, 健忘驚悸에 寧心安神, 祛痰開竅하는 작용이 있어<sup>12)</sup> 불면증, 신경쇠약, 건망증, 우울증, 심계항진과 관련된 불안감, 동요감, 방향감각상실, 치매, 기억상실 등의 신경질환을 치료하는데 다용되며<sup>13)</sup> 신경세포 보호 효과가 있다고 실험적으로 보고되었다<sup>14)</sup>. 遠志에 대한 이러한 효능은 세포손상에 의해 촉진되는 apoptosis를 억제하는 작용과 관련이 있는 것으로 생각된다.

이에 저자는 遠志물추출물이 신경세포손상에 의한 apoptosis에 어떤 영향을 미치는 가를 연구하기 위해 먼저 PC-12 cell에 대한 遠志물추출물의 세포독성 검사와 산화 스트레스를 일으키는 4-HNE에 대한 세포보호 효과를 관찰하고자 MTT assay를 하였다. 또한 apoptosis에 관여하는 TNF- $\alpha$ , caspase-3, Bax 및 Bcl-2 단백질의 발현량을 관찰하고자 western blot을 실시하였다.

遠志물추출물이 PC-12 cell에서 세포 생존율에 미치는 효과를 관찰한 결과, 遠志물추출물 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, 100  $\mu$ g 및 200  $\mu$ g/mL의 농도에서 세포독성이 없었다.

4-HNE는 지질과산화에 의해 생성되는 aldehyde 중 하나로 독성이 강한 화합물로 만성신부전, 당뇨, 동맥경화, 파킨슨 씨 질병, 헌팅턴병 등과 같은 질병의 원인물질로 작용한다<sup>15)</sup>. 또 4-HNE는 아미노산 잔기의 변형을 일으켜 단백질의 산화 스트레스와 관련되어 apoptosis의 유발인자로 작용하여 apoptosis의 실행에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>16)</sup>.

遠志물추출물이 4-HNE의 세포독성으로부터 세포보호 효과를 관찰한 결과, 遠志물추출물 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g 및 100  $\mu$ g/mL에서 대조군에 비해서 증가를 나타내었으나 25  $\mu$ g/mL에서만 유의성이 있었다.

TNF- $\alpha$ 는 림프구나 대식세포와 같은 백혈구에서 분비되는 사이토카인의 일종이다. 이 TNF- $\alpha$ 가 세포막에 존재하는

death receptor의 일종인 TNFR와 합쳐지면서 caspase-3를 활성화시켜 apoptosis가 시작된다<sup>17)</sup>. 이러한 TNF- $\alpha$ 는 종양 세포에 신호를 주어 apoptosis를 유도하며, 대식세포에 작용하여 대식세포를 활성화시켜 염증반응을 유도하는 염증반응의 조절에 관여하는 단백질이기도 하다<sup>18)</sup>.

遠志물추출물이 TNF- $\alpha$  단백질 발현에 미치는 효과를 관찰한 결과, 遠志물추출물 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g 및 100  $\mu$ g/mL 실험군 모두 대조군에 비해서 감소하였으나 50  $\mu$ g/mL에서만 유의성이 있었다.

Caspase는 단백질 분해효소로서 세포에서 핵과 미토콘드리아의 외막에 불활성 상태인 proenzyme으로 존재하다가<sup>19)</sup> apoptosis가 진행되면 활성화되면서 세포 내에 존재하는 다수의 단백질을 파괴하고 DNA를 조각내어서 세포의 기능을 완전히 정지시켜 버린다<sup>20-22)</sup>. 그 중에서 caspase-3는 apoptosis를 유발시키는 중요한 인자로<sup>23)</sup> caspase-3가 활성화되면 게놈의 안정성 유지나 DNA의 복구에 중요한 역할을 하는 PARP 단백질을 분해하여 기능을 상실시킨다<sup>24)</sup>.

遠志물추출물이 caspase-3 단백질 발현에 미치는 효과를 관찰한 결과, 遠志물추출물 25  $\mu$ g과 50  $\mu$ g/mL에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다.

Bcl-2 family 단백질은 내재적 경로인 mitochondrial pathway에서 막 투과성을 조절하는 단백질로<sup>25)</sup>, 기능과 아미노산 배열의 유사성에 따라서 Bcl-2로 대표되는 anti-apoptotic 단백질, Bax로 대표되는 pro-apoptotic 단백질 그리고 Bid/Bim, Bik 및 Bad로 대표되는 BH3 sub-family 단백질로 나눈다<sup>26)</sup>. 평소 Bcl-2는 Bid/Bim이라는 BH3 sub-family와 결합되어 있고 Bax, Bak는 미토콘드리아 외막에 홀로 존재하다가 세포사멸 신호가 들어오면 Bik나 Bad가 Bcl-2와 결합하면서 붙어 있던 Bid/Bim은 떨어져 나와 Bax 등과 결합한다. 그러면 Bax는 형태 변화가 일어나면서 미토콘드리아 막을 탈분극화시켜 투과성 조절구멍(permeability transition pore)을 열어서 cytochrome C, Apaf-1, AIF 등과 같이 apoptosis에 작용하는 물질들을 밖으로 유출시킨다<sup>27-29)</sup>.

반면에 Bcl-2는 미토콘드리아 막의 탈분극화를 억제하고 막의 산화적 인산화를 증가시켜 미토콘드리아의 투과성 조절구멍을 억제하여 미토콘드리아 내에 존재하는 cytochrome C 등의 유출을 억제한다<sup>30,31)</sup>. 이처럼 Bcl-2와 Bax는 Bcl-2 family 단백질의 구성원들이지만 서로 상호적으로 관계하면서 apoptosis를 조절한다<sup>32,33)</sup>.

遠志물추출물이 pro-apoptosis 인자인 Bax 단백질 발현에 미치는 효과를 관찰한 결과, 遠志물추출물 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g 및 100  $\mu$ g/mL 실험군 모두 대조군에 비해 감소를 나타내었으나 유의성은 없었다.

遠志물추출물이 anti-apoptosis 인자인 Bcl-2 단백질 발현에 미치는 효과를 관찰한 결과, 遠志물추출물 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g 및 100  $\mu$ g/mL 실험군 모두 대조군에 비해 증가를 나타내었으나 25  $\mu$ g과 100  $\mu$ g/mL에서만 유의성이 있었다.

이상의 결과, 遠志물추출물은 pro-apoptosis 인자인 TNF- $\alpha$ , Caspase-3 및 Bax 단백질량의 증가를 억제하고 anti-apoptosis 인자인 Bcl-2 단백질량의 감소를 방지함으로써 apoptosis를 억제하는 것으로 생각된다.

## 결론

본 연구에서는 遠志물추출물이 apoptosis에 미치는 효과를 관찰하였다. 遠志물추출물의 세포독성에 대한 검사와 산화 스트레스를 일으키는 4-HNE에 대한 遠志물추출물의 세포보호 효과를 관찰하고자 MTT assay를 실시하였다. 또한 apoptosis에 관여하는 인자인 TNF- $\alpha$ , Caspase-3, Bax 및 Bcl-2 단백질의 발현을 관찰하고자 western blot을 실시한 결과 다음과 같다.

1. 遠志물추출물 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, 100  $\mu$ g 및 200  $\mu$ g에서 PC-12 cell에 대한 세포 독성이 없었다.
2. 遠志물추출물 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g 및 100  $\mu$ g에서 4-HNE의 세포독성으로부터 세포보호 효과가 있었다.
3. 遠志물추출물 50  $\mu$ g에서만 TNF- $\alpha$  단백질 발현량이 유의한 감소를 나타내었다.
4. 遠志물추출물 25  $\mu$ g과 50  $\mu$ g에서 Caspase-3 단백질 발현량이 유의한 감소를 나타내었다.
5. 遠志물추출물 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g 및 100  $\mu$ g에서 Bax 단백질 발현량이 감소를 보였으나 유의성은 없었다.
6. 遠志물추출물 25  $\mu$ g과 100  $\mu$ g에서 Bcl-2 단백질 발현량이 유의한 증가를 나타내었다.

이러한 결과들로 보아 遠志물추출물은 세포손상에 의한 apoptosis를 억제하는 작용이 있는 것으로 생각된다.

## References

1. Lee CH, Chung MC, Lee HJ, Kho YH. An apoptosis regulator isolated from *Petasites japonicum*. *Kor J Food Sci Technol*. 2000 ; 32(2) : 448-53.
2. Susan E. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathol*. 2007 ; 35(4) : 495-516.
3. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet*. 2009 ; 43 : 95-118.
4. Sayers TJ. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 ; 60(8) : 1173-80.
5. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999 ; 13(15) : 1899-911.
6. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Géliinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006 ; 10(1) : 51-64.
7. Lee DS, Choi HG, Li B, Kim KS, Kim SA, Chon SK, Rho JM, Kim KM, Han JH, Jeong GS, Kim YC. Neuroprotective effect of the acid hydrolysis fraction of the roots of *Polygala tenuifolia*. *Korean J Orient Physiol Pathol* 2011 ; 25(4) : 628-34.
8. Lee SB, Seong NS, Lee YJ. A study on the Protective Effects of *Polygalae Radix* on Neurotoxicity Induced by N-methyl-D-aspartic acid. *Kor J Herbology*. 2005 ; 20(2) : 115-25.
9. Cheong MH, Lee SR, Yoo HS, Jeong JW, Kim GY, Kim WJ, Jung IC, Choi YH. Anti-inflammatory effects of *Polygala tenuifolia* root through inhibition of NF- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells. *J Ethnopharmacol*. 2011 ; 137(3) : 1402-8.
10. Naito R, Tohda C. Characterization of anti-neurodegenerative effects of *Polygala tenuifolia* in Abeta(25-35)-treated cortical neurons. *Biol Pharm Bull*. 2006 ; 29(9) : 1892-6.
11. Xu SP, Yang YY, Xue D, Liu JX, Liu XM, Fan TP, Pan RL, Li PT. Cognitive-enhancing effects of polygala saponin hydrolysate in  $\alpha\beta$ (25-35)-induced amnesic mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011 ; 10 : 1-12.
12. Kim HC. *Herbal Pharmacology*. Seoul : Jipmoondang. 2001 : 379-81.
13. Liu P, Hu Y, Guo DH, Wang DX, Tu HH, Ma L, Xie TT, Kong LY. Potential antidepressant properties of *Radix Polygalae*(Yuan Zhi). *Phytomedicine*. 2010 ; 17(10) : 794-9.
14. Ban JY, Lee HJ, Lee SB, Lee YJ, Seong NS, Song KS, Bae KW, Seong YH. Methanol extract of *Polygalae radix* protects excitotoxicity in cultured neuronal cells. *Korean J Medicinal Crop Sci*. 2003 ; 11(4) : 298-305.
15. Jürgens G, Chen Q, Esterbauer H, Mair S, Ledinski G, Dinges HP. Immunostaining of human autopsy aortas with antibodies apolipoprotein B an apoprotein (a). *Arterioscler Thromb*. 1993 ; 13(11) : 1689-99.
16. Kim JH, Yu YS, Cho CS, KIM KW. Blockade of angiotensin II attenuates VEGF-mediated blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009 ; 29(3) : 621-8.
17. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006 ; 25(34) : 4798-811.
18. Stankiewicz W1, Dabrowski MP, Chcialowski A, Plusa T. Cellular and cytokine immunoregulation in patients with chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Mediators Inflamm*. 2002 ; 11(5) : 307-12.
19. Rupinder SK, Gurpreet AK, Manjeet S. Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol*. 2007 ; 46(6) :

- 383-93.
20. Widmann C, Gibson S, Johnson GL. Caspase-dependent Cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J Biol Chem*. 1998 ; 273(12) : 7141-7.
21. Vegran F, Boidot R, Oudin C, Riedinger JM, Lizard-Nacol S. Implication of alternative splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance. *Bull Cancer*. 2005 ; 92(3) : 219-26.
22. An B, Dou QP. Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res*. 1996 ; 56(3) : 438-42.
23. Oh SH, Lim SC. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006 ; 212(3) : 212-23.
24. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. 1994 ; 371(6495) : 346-7.
25. Yoshihide T, Shigeomi S. Bcl-2 family: Life-or-death switch. *febs letters*. 2000 ; 466(1) : 6-10.
26. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 ; 9(1) : 47-59.
27. Jacotot E, Costantini P, Laboureau E, Zamzami N, Susin SA, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 ; 887 : 18-30.
28. Li Z, Xu X, Huang Y, Ding L, Wang Z, Yu G, Xu D, Li W, Tong D. Swainsonine activates mitochondria-mediated apoptotic pathway in human lung cancer A549 cells and retards the growth of lung cancer xenografts. *Int J Biol Sci*. 2012 ; 8(3) : 394-405.
29. Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and therapy. *J Pathol*. 1999 ; 187(1) : 127-37.
30. Stephen WF. Insights into programmed cell through structural biology. *Cell*. 2000 ; 103(2) : 273-82.
31. Michels J, Kepp O, Senovilla L, Lissa D, Castedo M, Kroemer G, Galluzzi L. Functions of BCL-X L at the Interface between Cell Death and Metabolism. *Int J Cell Biol*. 2013 ; 2013 : 705294.
32. Deveraux QL, Schendel SL, Reed JC. Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Cardiol Clin*. 2001 ; 19(1) : 57-74.
33. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med*. 2003 ; 7(3) : 249-57.