

Attenuation of the Corticosterone-induced Antiproliferative Effect on Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Using Hot-water Extract from *Liriope muscari*

Jong Kyu Lee^{1,2}, Sang-Bo Kim¹, Yong Bae Seo^{1,2} and Gun-Do Kim^{1*}

¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

²Institute of Marine Life Science, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

Received January 2, 2018 / Revised May 8, 2018 / Accepted May 18, 2018

Elevated levels of cortisol caused by chronic stress may lead to neuron damage in the hippocampus by activating the glucocorticoid receptors (GRs). In cortisol-deficient animals, corticosterone is known to function as a stress hormone. In humans however, corticosterone is considered a precursor of aldosterone and a glucocorticoid with similar properties to cortisol. Recently, many studies have been conducted on the role of cortisol and other synthetic glucocorticoids like dexamethasone in humans, but the exact function of corticosterone is unknown. This study examined the viability of human neuroblastoma SH-SY5Y cells treated with various concentrations of corticosterone for 24 and 48 hr via MTT assay. The MTT-assay results showed that corticosterone had an antiproliferation effect on SH-SY5Y cells at higher concentrations (500 and 1,000 μ M), while in lower concentrations (100 μ M), it showed no antiproliferation effect. Cytotoxicity analysis of extracts from three medicinal crops (*Liriope muscari*, *Schisandra chinensis*, and *Wolfiporia extensa*) revealed that they all possessed deleterious effects on SH-SY5Y cells depending on dosage. However, it was observed that, at a concentration of 500 μ g/ml, *Liriope muscari* attenuated the corticosterone-induced antiproliferation on SY-SH5Y cells and restored cell growth after 48 hours of treatment. The study examined the synergistic effect of six mixtures each containing 500 μ g/ml of *Liriope* and various concentrations of *Schisandra* (50 or 100 μ g/ml) and *Wolfiporia* (10, 30, and 50 μ g/ml). The results showed minor growth-restoration activity but less than that of *Liriope muscari* only, suggesting that *Schisandra* and *Wolfiporia* had no additive or synergistic effects.

Key words : Cell cycle arrest, corticosterone, cytotoxicity, proliferation, stress

서론

인체는 외부 혹은 내부의 다양한 환경적 생물학적 변화나 다가올 변화에 적절한 반응을 위해서 관련 기관들의 활동을 조절한다. 일시적 스트레스 상황에서 glucocorticoids, catecholamine 등과 같은 호르몬들은 일반적으로 스트레스 반응에 관련된 세포들로 하여금 반응에 필요한 에너지원이 제공될 수 있도록 대사의 변화를 유도하며, 반응 세포의 종류에 따라 특이적인 반응을 일으키기도 한다[7, 21]. 주요 3대 stress hormone으로 epinephrine, norepinephrine, cortisol이 알려져 있다[21]. Catecholamine인 epinephrine과 norepinephrine은 sympathoadrenal system (SAM axis)의 조절 하에 adrenal medulla에서 생성, 분비되며 fight-or-flight response와 같이

비교적 짧고 빠른 반응을 매개한다[7]. 한편, glucocorticoid인 cortisol은 hypothalamic - pituitary - adrenal axis (HPA axis) 경로를 따라 adrenal cortex에서의 생성 분비가 조절되며, 비교적 느린 반응에 관여한다[1]. 스트레스에 반응한 인체 기관들은 스트레스 종결 후 정상적인 상태로 되돌아가며 항상성 (homeostasis)을 유지한다. 그러나 이러한 스트레스 상태가 장기화 될 경우, 항상성을 유지하지 못하게 됨으로써 많은 부작용이 발생한다[15]. 특히 장기간 glucocorticoid에 노출될 경우, brain에도 나쁜 영향을 초래할 수 있다[22].

인간의 경우, glucocorticoid인 cortisol과 corticosterone이 부신에서 생성되어 혈액으로 분비된다. 이중 cortisol은 인간의 주요 스트레스 호르몬으로 여겨지고 있다. 한편, 설치류의 경우는 corticosteroid 합성 경로 중 17 α -hydroxylase의 결핍으로 인하여 cortisol이 합성되지 않기 때문에 corticosterone이 스트레스 호르몬의 역할을 하는 것으로 알려져 있다[17]. Cortisol 또는 합성 glucocorticoid의 하나인 dexamethasone의 기능이나 현상에 대한 연구는 인간을 대상으로는 많이 이루어진 반면, corticosterone에 대한 연구는 cortisol을 생성하지 않는 동물들을 대상으로 많이 이루어졌다. 인간의 경우, corticosterone은 glucocorticoid receptor (GR)와의 결합력이

*Corresponding author

Tel : +82-51-629-5618, Fax : +82-51-629-5619

E-mail : gundokim@pknu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

cortisol과 비슷하기 때문에 cortisol과 비슷한 효과를 나타낼 것으로 여겨지고 있으나, 주요 스트레스 호르몬인 cortisol에 비해 혈액 내 양이 낮고 단순히 aldosterone의 전구물질로 여겨져 왔기 때문에 상대적으로 관심을 받지 못했다. 하지만, 최근 인간의 경우 cortisol이 있음에도 corticosterone을 합성 분비하고 있기 때문에 cortisol과는 차별화된 corticosterone만의 역할이 제기되었다[16]. *In vitro* 실험에서, glucocorticoid가 세포에 미치는 현상은 처리 농도, 배양 조건, 사용한 세포의 종류에 따라 크게 세포 증식 억제와 세포 사멸이 있으며, 세포 사멸과는 상반되게 세포 사멸 억제 또한 보고되고 있어[3, 8, 26], glucocorticoid는 다 기능적 효과를 가지고 있음을 보여준다.

본 연구는 neuronal function과 differentiation 연구에 많이 사용되어 온 *in vitro* model 세포 주인 인간의 neuroblastoma SH-SY5Y 세포에 corticosterone이 미치는 영향을 조사하고, 약용으로 사용되고 있는 맥문동(*Liriope muscari*), 오미자(*Schisandra chinensis*), 복신(*Wolfiporia extensa*)의 개별 열수 추출물 혹은 이들의 혼합물이 corticosterone에 의해 유도된 SH-SY5Y 세포 주의 변화에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

재료 및 방법

실험 재료

SH-SY5Y 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), Penicillin과 Streptomycin은 Corning (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. Corticosterone은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 맥문동, 오미자, 복신 열수 추출물은 소재 별로 따로 제조하였다. 건조된 소재 100 g씩을 갈아 가루로 만들고 증류수 900 ml씩 첨가한 후 121°C에서 15분간 가열하고, 원심 분리를 통하여 고형물을 제거한 후 남은 잔여 액을 동결 건조하였다.

세포 배양

사람의 신경모세포종(neuroblastoma) SH-SY5Y 세포는 10% fetal bovine serum (FBS) 및 1%의 penicillin과 streptomycin 이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포 독성 실험

세포 독성을 알아보기 위하여 MTT assay 법을 바탕으로 cell viability를 측정하였다. 세포는 flask에 접종 후 70-80% confluence에 도달할 때 trypsin을 처리하여 모은 후, 새 배지를 첨가하고 96 well plate에 분배하였고 필요에 따라 여러 농도의 corticosterone 혹은 추출물을 첨가한 후 24시간 혹은

48시간 동안 배양하였다. 각 시간대 별로 배양 후 배지를 제거하고 0.5 mg/ml의 MTT가 포함된 새 배지로 교체한 후, 37°C에서 약 2시간 동안 추가로 배양하였다. 배지를 제거하고 형성된 formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성은 corticosterone, 복신, 오미자, 맥문동 열수 추출물 개개 별로 여러 농도에서 조사하였다.

통계 처리

통계 처리는 GraphPad prism 6 software를 사용하였다. 실험결과는 3 반복에 대한 평균(mean) ± 표준편차(SD)로 나타냈고, 자료의 유의성 분석은 one-way ANOVA를 한 후, Dunnett's multiple comparisons test를 이용하여 *p*<0.05 수준에서 검증하였다.

결 과

Corticosterone이 SH-SY5Y 세포 증식에 미치는 영향

Corticosterone이 SH-SY5Y 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 100, 500, 1,000 µM 농도로 처리하고 24시간과 48시간 배양 후 MTT assay 방법을 이용하여 cell viability를 조사하였다(Fig. 1). Corticosterone을 처리하지 않은 음성 대조군의 경우 기준 시점인 0시간(100%)에 비해 48시간에서 viability 증가(137%)를 보였다. 100 µM의 농도의 corticosterone은 48시간에서 0시간 대비 140%의 viability를 보여 음성 대조

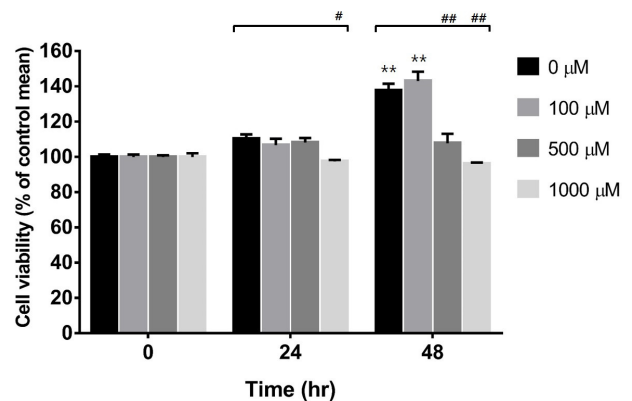


Fig. 1. Reduction of cell viability induced by corticosterone in SH-SY5Y neuroblastoma cells. SH-SY5Y cells were treated with various concentrations of corticosterone (100, 500, and 1,000 µM) for 24 and 48 hr. The control-cultured cells were incubated with culture medium for 24 and 48 hr. Cell viability was measured using an MTT assay. The results are expressed as the mean ± SD of three independent experiments. An ANOVA was performed for statistical analysis. **p*<0.05; ***p*<0.01 compared with control of 0 hr. #*p*<0.05 compared with control of 24 hr. ##*p*<0.01 compared with control of 48 hr.

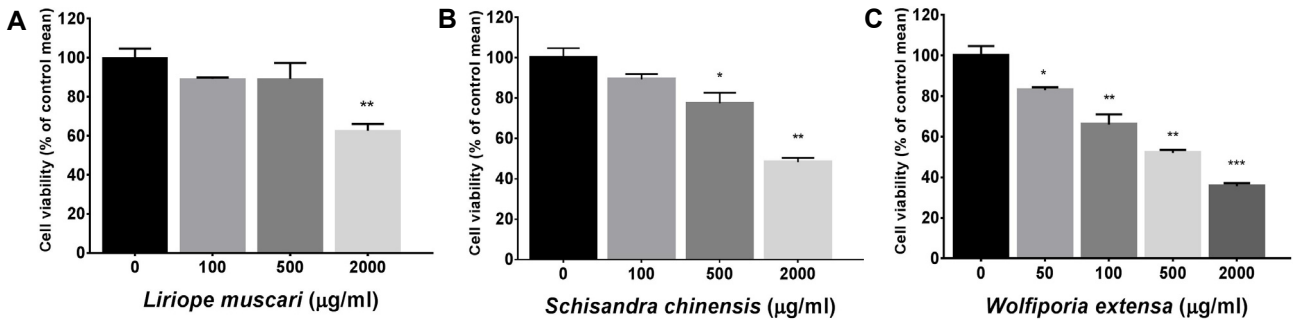


Fig. 2. Cytotoxicity effect of each hot-water extract on SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were treated with various concentrations of each extract from *Liriope muscari* (A), *Schisandra chinensis* (B), and *Wolfiporia extensa* (C) for 48 hr. Cell viability was measured using an MTT assay. The control-cultured cells were incubated with culture medium for 48 hr. The results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. An ANOVA was performed for statistical analysis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with control.

군(137%)과 유사한 값을 보였다. 한편, 48시간에서 500 μ M과 1,000 μ M 농도의 경우 0시간 대비 각각 106%와 97%의 viability로 조사되었다.

맥문동, 오미자, 복신 열수 추출물 개별 세포 독성

한방 소재로 쓰이고 있는 맥문동, 오미자, 복신 열수 추출물이 corticosterone에 의해 유도되는 SH-SY5Y 세포 성장 억제에 미치는 영향을 알아보기 전에, 소재 별로 자체 세포 독성을 먼저 조사하였다. 개별 소재를 열수추출법으로 추출 후 동결건조한 분말을 대상으로 최소 50 μ g/ml에서 최대 2,000 μ g/ml의 농도로 처리한 후 48시간 시점에서 MTT assay를 통하여 viability를 조사하였다(Fig. 2). 세 시료 모두 농도가 높아질수록 더 높은 세포 독성을 나타내었다. 맥문동과 오미자에 비해 복신이 상대적으로 높은 세포 독성을 보였다. 맥문동은 100 μ g/ml과 500 μ g/ml의 농도에서 대조군 대비 89%의 viability를 보였고, 2,000 μ g/ml에선 62%로 확인되었다. 오미자는 100 μ g/ml에서 89%, 500 μ g/ml에서 77%, 2,000 μ g/ml의 농도에서 48%의 viability를 나타내었다. 복신의 경우 50 μ g/ml에서 82%, 100 μ g/ml에서 65%, 500 μ g/ml에서 52%, 2,000 μ g/ml에서 35%의 viability로 조사되었다

Corticosterone에 의해 유도된 세포 성장 억제에 개별 소재가 미치는 영향

Corticosterone에 의해 유도되는 SH-SY5Y 세포 성장 억제에 맥문동, 오미자, 복신 열수 추출물이 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. Corticosterone을 첨가 했을 때, 48시간 동안 SH-SY5Y 세포의 성장을 억제하는 농도인 500과 1,000 μ M 중 낮은 농도인 500 μ M의 농도를 사용하였다. 개별 소재의 농도는 앞선 실험에서 개별 소재가 조사된 농도 중 세포 독성이 가장 낮은 농도를 사용하였다. 맥문동의 경우는 100 μ g/ml과 500 μ g/ml에서 비슷한 세포 독성을 보였기 때문에, 높은 농도인 500 μ g/ml 농도를 선택하였고, 오미자는 100 μ g/ml, 복신

은 50 μ g/ml의 농도가 사용되었다. Corticosterone과 개별 소재를 함께 첨가 하고 48시간 배양한 후 MTT assay를 통하여 viability를 조사하였다(Fig. 3). 500 μ M 농도의 corticosterone만을 첨가한 양성 대조군은 음성 대조군 대비 낮은 viability가 예상되는데, 실험 결과, 음성 대조군(100%) 대비 80%의 viability로 나타났다. 한편, corticosterone과 함께 개별 소재가 첨가 되었을 때, 세포 증식 억제를 완화하는 효과가 있다면, 양성 대조군(80%) 보다 높은 viability가 나올 것으로 기대되는데, 맥문동의 경우 98%의 viability로 조사되어 양성 대조군 보다 높은 값을 보였으며 음성 대조군 수준의 값을 나타내었

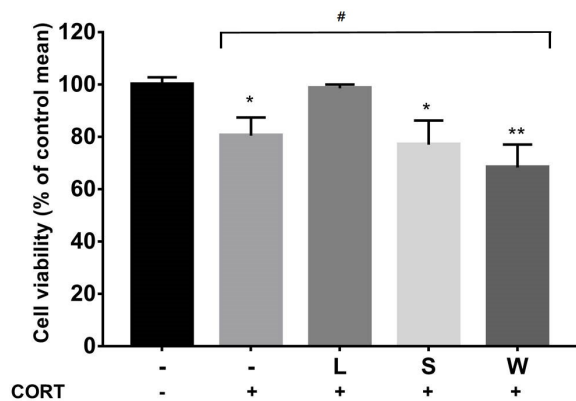


Fig. 3. Antiproliferative effects of each hot-water extract on corticosterone-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. Cells were treated with 500 μ M corticosterone (CORT) in the presence of each extract from *Liriope muscari* (L, 500 μ g/ml), *Schisandra chinensis* (S, 100 μ g/ml), and *Wolfiporia extensa* (W, 50 μ g/ml) for 48 hr. Cell viability was measured using an MTT assay. The control-cultured cells were incubated with culture medium for 48 hr. Data are expressed as the percentage of values in untreated control cultures. Each value indicates a mean \pm SD ($n=3$). An ANOVA was performed for statistical analysis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared with control.

Table 1. The final concentrations of each extract for combined six mixtures (µg/ml)

Mixture	<i>Liriope muscari</i>	<i>Schisandra chinensis</i>	<i>Wolfiporia extensa</i>
1	500	100	50
2	500	100	30
3	500	100	10
4	500	50	50
5	500	50	30
6	500	50	10

다. 반면, 오미자와 복신은 각각 77%와 68%의 viability를 보여 음성 대조군 보다 조금 낮은 값을 보였다.

Corticosterone에 의해 유도된 세포 성장 억제에 개별 소재의 혼합물이 미치는 영향

개별 소재의 경우, 맥문동은 corticosterone에 의해 유도된 세포 증식 억제를 대부분 완화하였고, 오미자와 복신의 경우는 그렇지 않았기 때문에 이 세 소재를 혼합하여 함께 처리했을 때 세포 증식 억제 완화 효과가 어떻게 달라지는지 알아 보았다. 세포 증식 억제 완화 효과를 보였던 맥문동의 경우 500 µg/ml의 농도로 고정하고, 오미자와 복신은 세포 독성이 미비한 것으로 조사된 농도 이하에서 3가지로 농도를 달리하여 총 6가지 혼합물을 제조하였다(Table 1). SH-SY5Y 세포에 500 µM 농도로 corticosterone을 처리하여 SH-SY5Y 세포의 증식 억제를 유도하였으며, 제조된 6가지 혼합물을 함께 처리하고 48시간 동안 배양한 후 MTT assay를 통하여 viability를 조사하였다(Fig. 4). 음성 대조군(100%) 대비 양성 대조군, 1번 혼합물, 2번 혼합물, 3번 혼합물, 4번 혼합물, 5번 혼합물, 6번 혼합물(86%)은 각각 72%, 86%, 105%, 82%, 81%, 84%, 86%의 viability를 나타내었다. 6가지 혼합물 모두 양성 대조군에 비해 높은 viability를 나타내었다. 2번 혼합물은 음성 대조군 수준의 값을 보였으나 나머지 혼합물은 모두 음성 대조군보다 낮은 값을 나타내었다.

고 찰

인간에게서 cortisol과 corticosterone은 모두 부신에서 생성되어 스트레스에 의해 혈액으로 분비되며 혈액 내에서 이동하는 동안 corticosteroid-binding globulin (CBG)인 transcortin 단백질과 결합해 있다[14]. Transcortin과 결합하지 않은 cortisol은 혈액 내 전체 cortisol의 10% 미만이며 이들이 호르몬 활성을 나타낸다. 목적 세포의 세포막을 통과하면 GR과 결합하게 되고 결합한 GR은 핵 안으로 이동하여 다양한 종류의 유전자의 발현을 증가시키거나 억제한다. GR은 거의 모든 세포에서 발현되며, corticosterone과 cortisol은 GR과의 결합력이 비슷한 것으로 알려져 있으며, 국소적 항염증제로 사용되

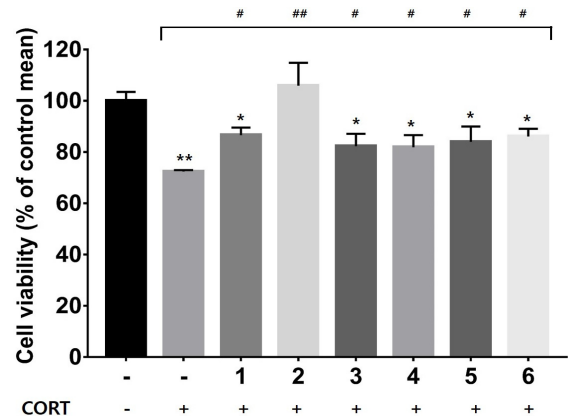


Fig. 4. Antiproliferative effects of mixtures on corticosterone-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. Cells were treated with 500 µM corticosterone in the presence of mixtures containing various concentrations of each extract for 48 hr (Table 1). Cell viability was measured using an MTT assay. The control-cultured cells were incubated with culture medium for 48 hr. Data are expressed as the percentage of values in untreated control cultures. Each value indicates a mean ± SD (n=3). An ANOVA was performed for statistical analysis. *p<0.05; **p<0.01 compared with control. #p<0.05; ##p<0.01 compared with corticosterone-only-treated control.

기도 하는 합성 glucocorticoid인 dexamethasone은 cortisol에 비해 GR과의 결합력이 더 높은 것으로 알려져 있다[12].

Glucocorticoid가 세포에 대한 효과는 대상 세포의 종류, 처리시간, 처리 농도에 따라 다양한데, 크게 효과가 없거나, 세포 증식 억제 혹은 세포 사멸을 일으킨다[19, 22, 23]. Dexamethasone의 경우 다양한 종류의 신경 세포의 세포 사멸을 유도한다고 알려져 있다[9]. SH-SY5Y 세포에 대해서도 dexamethasone이 세포 증식 억제[6], 세포 분화 감소[27], apoptosis [11, 26]를 유도한다고 보고되었다. Dexamethasone의 세포 증식 억제는 GR의 antagonist인 RU-486에 의해 나타나지 않았으므로, dexamethasone의 세포 증식 억제는 GR이 관여하는 것으로 보인다[13].

Glucocorticoid에 의하여 세포 증식 억제가 유도되는 기작은 실험에 사용된 세포의 종류에 따라 몇 가지가 알려져 있다. Fibroblast의 경우 dexamethasone이 cyclin kinase inhibitor인 p21^{Cip1}의 발현 양을 증가시켜 G1 phase arrest가 일어난다는 보고가 있으며[20], lymphocyte의 경우 dexamethasone 혹은 cortisol이 IL-2와 leukotriene B₄ (LTB₄)의 생성을 억제한다는 보고가 있었다[8]. Crochemore 등은 HT-22 세포를 통한 연구에서 dexamethasone이 tumor suppressor인 p53 단백질의 발현 양을 증가시키진 않지만, 대신 핵막 안으로 이동하는 것을 증가시키며, apoptosis를 일으키지 않고 세포 증식을 억제한다고 보고하였다[5]. 한편, dexamethasone에 의한 세포 사멸 기작을 살펴보면, dexamethasone이 활성산소의 생산을 증가

시키고, 세포 내 calcium을 증가시키며, calpain 활성 억제 단백질인 calpastatin을 감소시키면, calpain이 활성화되고 결과적으로 caspase-3이 활성화되어 세포 사멸이 유도되며[25], 이 경우 melatonin을 세포에 선 처리 하면 melatonin의 antioxidant activity를 통하여 SH-SY5Y 세포 사멸이 억제된다고 보고되었다[24, 25]. 또한, dexamethasone이 aminergic neurotransmitter를 분해하는 효소인 monoamine oxidase (MAO) gene의 발현이나 효소의 활성을 증가시키며[28], 이로 인하여 hydrogen peroxide (H₂O₂)가 생성되어 세포 사멸이 유도되며 [10, 18], 이 경우 MO30, rasagiline 같은 MAO inhibitor가 SH-SY5Y 세포 사멸을 방지한다고 보고되었다[11, 26]. Vitamin의 일종인 folic acid도 SH-SY5Y 세포에 대하여 neuroprotective 효과가 있으며, 이 경우는 PI3K/Akt signaling, CaMKII, PKA와 관련이 있다고 보고되었다[2].

본 실험 결과에서 나타난 것처럼, 100 µM 농도의 corticosterone은 음성 대조군과 마찬가지로 24시간에는 viability가 많이 증가 하지 않았으나, 48시간에는 증가된 것이 관찰되었다. 하지만, 500 µM과 1,000 µM 농도에선 24시간과 48시간에서 viability의 증가는 관찰되지 않아 처리 전과 큰 차이를 보이지 않았다. 음성 대조군은 48시간 동안 세포의 증식에 의하여 viability가 증가한 것으로 여겨진다. 한편, 500 µM과 1,000 µM 농도의 corticosterone을 처리 했을 때 48시간에서 보인 viability와 처리 전의 viability가 유사한 것으로 나타나 48시간 동안 세포 증식이 일어나지 않은 결과로 여겨진다. 10 µM과 100 µM의 농도의 dexamethasone이 SH-SY5Y 세포에 대하여 세포 증식 억제 효과를 보인다는 보고가 있다[13]. 본 실험의 결과에선 100 µM 농도의 corticosterone은 세포 증식을 억제하지 않는 것으로 관찰되었다. 세포 배양액의 종류와 사용된 세포의 종류에 차이가 있기는 하나, 500 µM 또는 1,000 µM과 같은 높은 농도의 dexamethasone은 세포 사멸을 일으키는 양상을 보이는데 반해, 500 µM 또는 1,000 µM 농도의 corticosterone은 세포 증식 억제 효과를 보였지만 세포 사멸 같은 cell damage는 보이지 않았다. 상당히 높은 농도의 corticosterone은 dexamethasone과 달리 세포 사멸 경로를 활성화하지 않는 것으로 보인다. 이 두 glucocorticoid가 농도에 따른 반응의 차이는 dexamethasone과 corticosterone의 GR과의 결합력 차이에 기인하는 것으로 추정된다.

맥문동, 오미자, 복신 열수추출물이 corticosterone에 의해 유도된 SH-SY5Y 세포 증식 억제 완화 효과가 있는지 조사한 결과 맥문동이 효과가 있는 것으로 관찰되고 오미자와 복신은 효과가 없는 것으로 나타났다. 복신의 경우는 음성 대조군보다 낮은 viability를 보였는데, 아마도, corticosterone에 의한 세포 성장 억제와 복신의 세포 독성이 중첩되어 나타난 결과로 보인다. Dexamethasone이 세포 증식을 억제할 경우 dexamethasone에 의해 활성화형 ERK1/2가 감소되는데, antidepressant로 쓰이는 imipramine을 첨가하면 활성화형 ERK1/2가

감소되는 것을 막아주어 세포 증식 억제를 개선한다는 보고가 있다[13]. 하지만, 맥문동이 이러한 antidepressant 기능성 물질을 함유하고 있는지에 대한 아직 알려진 바가 없다. 오미자의 경우 schizandrin A와 같은 lignan이 많이 들어 있다고 알려져 있다. 오미자의 lignan은 antioxidant 효과를 비롯한 많은 유용한 효능을 보이며, 강장제(adaptogen)의 효능도 알려져 있다[4]. 오미자 열수 추출물이 corticosterone에 의해 유도된 SH-SY5Y 세포의 증식 억제가 완화되지 않는 것으로 보아 lignan에 의한 cell cycle progression에는 작용하지 않는 것으로 보인다.

오미자와 복신이 세포 증식 억제 완화에 효과가 없었지만, 맥문동과 혼합되었을 경우 세포 증식 억제를 완화하는 효능에 대하여 시너지 효과가 있는지 조사하였다. 이미 500 µM 농도의 맥문동이 세포 증식 억제를 음성 대조군 수준으로 완화하였기 때문에, 오미자와 복신을 다른 비율로 추가 한 혼합물이 추가적인 시너지 효과를 보인다면, 100% 이상의 효과가 있을 것으로 기대된다. 한편, 혼합물 제조에 사용한 오미자와 복신의 농도는 개별 적으론 약한 세포 독성을 보이는 농도 이하이긴 하지만, 세 시료를 혼합할 경우는 전체 세포 독성 또한 증가할 수도 있다. 이 경우, 100% 가까운 효과가 나타나지 않을 가능성도 있다. MTT assay를 통한 viability조사 결과는 혼합물 대부분 양성 대조군에 비해 viability가 높은 것으로 나타났지만, 2번 혼합물을 제외하고 모두 음성 대조군 수준에 미치지 못하였다. 100 µg/ml 농도의 맥문동만을 처리했을 때 음성 대조군 수준으로 viability가 회복된 것을 감안하면 오미자나 복신의 추가에 따른 시너지는 나타나지 않았고, 오미자와 복신의 첨가로 인한 혼합물의 세포 독성의 증가로 맥문동의 효과도 감소한 것으로 보인다. 대부분 혼합물들은 그 효과가 모두 비슷하게 나타났는데, 실험에 사용된 오미자와 복신의 농도 차이 범위에선 증가하는 세포 독성의 세기에서 큰 차이가 없는 것으로 사료된다. Dexamethasone에 의한 세포 사멸 기작의 주요 요인이 활성 산소의 과잉 생산에 기인한다고 보면, 세포 사멸이 일어날 수 있는 요인이 복합적으로 작용할 때 antioxidant 기능이 있는 lignan을 함유한 오미자의 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

한편, 혼합물 중 특이하게도 2번 혼합물의 경우는 오히려 음성 대조군 수준의 viability를 보여 상대적으로 다른 혼합물에 비해 세포 증식 억제 완화 효과가 높은 것으로 나타났다. 음성 대조군에 비해 약간 높은 viability를 보이긴 하나, 통계적으로 뚜렷한 차이를 보인다고 할 수 없기 때문에, 세포 증식 억제 완화를 넘어 세포 증식이 유도되었다고 보기는 힘들다. 하지만, 다른 혼합물의 경우에서 보듯이 오미자와 복신의 첨가로 2번 혼합물이 다른 혼합물과 비슷한 수준의 세포 독성 증가가 있었다면, 다른 혼합물과 비슷한 효과가 나타나야 하지만 그렇지 않았다. 이는 혼합에 의한 시너지가 증가한 세포 독성을 상쇄하고 있음을 의미한다. 맥문동, 오미자, 복신 열수

추출물에 다양한 성분이 포함되어 있기 때문에 어떤 성분들이 서로 영향을 미쳤는지 추측하기 힘들다. 또한, 알 수 없는 실험적 오류도 배제하기 어렵다. 2번 혼합물의 특이한 결과에도 불구하고, 다른 혼합물의 대부분 음성 대조군 수준의 회복을 얻지 못했기 때문에, 오미자와 복신 혼합에 의한 시너지는 전반적으로 기대하기 어려워 보인다. 복신은 세포 독성이 높아, 더 높은 농도에서의 효과를 검증하기 어려운 것을 제외하고, 만약 corticosterone에 의해 유도되는 세포 증식 억제와 더불어 세포 사멸이 유도될 수 있는 다른 요인이 있다면, 맥문동과 오미자의 혼합물은 세포 증식 억제 완화와 세포 사멸 억제에 대하여 시너지 효과를 기대해 볼 수 있을 것으로 사료된다.

세포가 계속해서 증식하기 위해서 지속적인 증식 신호가 필요하다. 음성 대조군의 경우에서 계속해서 관찰된 결과를 보아 본 실험에 사용된 배지 내에는 적어도 48시간까지 SH-SY5Y 세포의 증식을 유도하는 mitogen같은 신호 물질이 존재하며, SH-SY5Y 세포는 이 배지에서 48시간 동안 지속적으로 성장하고 있다. 한편, 이러한 증식 신호 물질에 의해 지속적으로 세포 증식이 활성화 되더라도, 여러 다른 연구자들의 실험과 본 실험의 결과를 통하여 dexamethasone 또는 corticosterone 같은 스테로이드성 호르몬은 SH-SY5Y 세포의 증식이 진행되지 않도록 할 수 있다. 앞에서 언급한 것처럼 fibroblast, lymphocyte, HT-22 세포에 dexamethasone을 처리했을 경우 세포 증식 억제 기작에 대해 일부 알려져 있지만, 아직까지 corticosterone에 의해 SH-SY5Y 세포의 증식 억제가 유도되는 기작이나 맥문동이 corticosterone에 의해 유도된 SH-SY5Y 세포 증식 억제를 완화시키는 효과에 관한 보고는 없다. 본 실험의 결과는 corticosterone의 세포 성장 억제 기작과 맥문동의 완화 효과의 원인 물질 및 기작에 대한 추가적인 연구에 중요한 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

요약하면 corticosterone을 처리했을 때, SH-SY5Y 세포의 반응은 처리 48시간까지 세포 성장이 억제되었으며, 이는 100 μ M 농도에서 나타나지 않았으나 500 μ M 이상의 농도에서 관찰되었다. 맥문동, 오미자, 복신 열수 추출물은 모두 농도가 높아질수록 높은 세포 독성을 보였고 복신이 다른 두 물질에 비해 상대적으로 보다 높은 세포 독성을 보였다. 소재 별로 세포 독성이 미비한 것으로 판단되는 농도를 첨가 하였을 때, 500 μ M 농도의 corticosterone에 의해 유도된 SH-SY5Y 세포 증식 억제가 맥문동은 음성 대조군 수준으로 회복되었으나, 복신과 오미자는 그 효과가 미비하였다. 개별 소재를 혼합한 대부분의 혼합물의 경우 세포 증식 억제가 완화되긴 했으나, 음성 대조군 수준으로 회복되지는 않았다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 경제협력권산업 육성사업으로 수행된 연구결과입니다.

(과제번호, R0005795; 과제명, 약용작물을 이용한 스트레스 해소 기능성 음료의 개발 및 상용화)

References

1. Aguilera, G. 2011. HPA axis responsiveness to stress: Implications for healthy aging. *Exp. Gerontol.* **46**, 90-95.
2. Budni, J., Romero, A., Molz, S., Martín-de-Saavedra, M. D., Egea, J., Del Barrio, L., Tasca, C. I., Rodrigues, A. L. and López, M. G. 2011. Neurotoxicity induced by dexamethasone in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line can be prevented by folic acid. *Neuroscience* **190**, 346-353.
3. Chang, L. C., Madsen, S. A., Toelboell, T., Weber, P. S. and Burton, J. L. 2004. Effects of glucocorticoids on Fas gene expression in bovine blood neutrophils. *J. Endocrinol.* **183**, 569-583.
4. Chun, J. N., Cho, M., So, I. and Jeon, J. H. 2014. The protective effects of Schisandra chinensis fruit extract and its lignans against cardiovascular disease: A review of the molecular mechanisms. *Fitoterapia* **97**, 224-233.
5. Crochemore, C., Michaelidis, T. M., Fischer, D., Loeffler, J. P. and Almeida, O. F. 2002. Enhancement of p53 activity and inhibition of neural cell proliferation by glucocorticoid receptor activation. *FASEB J.* **16**, 761-770.
6. Glick, R. D., Medary, I., Aronson, D. C., Scotto, K. W., Swendeman, S. L. and La Quaglia, M. P. 2000. The effects of serum depletion and dexamethasone on growth and differentiation of human neuroblastoma cell lines. *J. Pediatr. Surg.* **35**, 465-472.
7. Goldstein, D. S. 2010. Adrenal responses to stress. *Cell. Mol. Neurobiol.* **30**, 1433-1440.
8. Goodwin, J. S., Atluru, D., Sierakowski, S. and Lianos, E. A. 1986. Mechanism of action of glucocorticosteroids. Inhibition of T cell proliferation and interleukin 2 production by hydrocortisone is reversed by leukotriene B₄. *J. Clin. Invest.* **77**, 1244-1250.
9. Haynes, L. E., Griffiths, M. R., Hyde, R. E., Barber, D. J. and Mitchell, I. J. 2001. Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: Implications for mood disorders. *Neuroscience* **104**, 57-69.
10. Johnson, S., Williams, A. N., Johnson, C. and Ou, X. M. 2007. The effects of antidepressant drug on ethanol-induced cell death. *Drug Discov. Ther.* **1**, 130-135.
11. Johnson, S., Tazik, S., Lu, D., Johnson, C., Youdim, M. B., Wang, J., Rajkowska, G. and Ou, X. M. 2010. The new inhibitor of monoamine oxidase, M30, has a neuroprotective effect against dexamethasone-induced brain cell apoptosis. *Front. Neurosci.* **4**, 180.
12. von Langen, J., Fritzemeier, K. H., Diekmann, S. and Hillisch, A. 2005. Molecular basis of the interaction specificity between the human glucocorticoid receptor and its endogenous steroid ligand cortisol. *Chembiochem* **6**, 1110-1118.
13. Leskiewicz, M., Jantas, D., Regulska, M., Kaczanowska, J., Basta-Kaim, A., Budziszewska, B., Kubera, M. and Lason,

- W. 2013. Antidepressants attenuate the dexamethasone-induced decrease in viability and proliferation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells: A involvement of extracellular regulated kinase (ERK1/2). *Neurochem. Int.* **63**, 354-362.
14. Lin, H. Y., Muller, Y. A. and Hammond, G. L. 2010. Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. *Mol. Cell. Endocrinol.* **316**, 3-12.
15. McEwen, B. S. 2008. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur. J. Pharmacol.* **583**, 174-185.
16. Morris, D. J. 2015. Why do humans have two glucocorticoids: A question of intestinal fortitude. *Steroids* **102**, 32-38.
17. New, M. I., Seaman, M. P. and Peterson, R. E. 1969. A method for the simultaneous determination of the secretion rates of cortisol, 11-desoxycortisol, corticosterone, 11-desoxycorticosterone and aldosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **29**, 514-522.
18. Ou, X. M., Chen, K. and Shih, J. C. 2006. Glucocorticoid and androgen activation of monoamine oxidase A is regulated differently by R1 and Sp1. *J. Biol. Chem.* **281**, 21512-21525.
19. Pratt, W. B. 1978. The Mechanism of glucocorticoid effects in fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **71**, 24-35.
20. Ramalingam, A., Hirai, A. and Thompson, E. A. 1997. Glucocorticoid inhibition of fibroblast proliferation and regulation of the cyclin kinase inhibitor p21Cip1. *Mol. Endocrinol.* **11**, 577-586.
21. Ranabir, S. and Reetu, K. 2011. Stress and hormones. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **15**, 18-22.
22. Sapolsky, R. M. 1996. Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: The current state of confusion. *Stress* **1**, 1-19.
23. Schmidt, S., Rainer, J., Ploner, C., Presul, E., Riml, S. and Kofler, R. 2004. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* **11**, S45-S55.
24. Suwanjang, W., Abramov, A. Y., Charnkgaew, K., Govitrapong, P. and Chetsawang, B. 2016. Melatonin prevents cytosolic calcium overload, mitochondrial damage and cell death due to toxically high doses of dexamethasone-induced oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem. Int.* **97**, 34-41.
25. Suwanjang, W., Abramov, A. Y., Govitrapong, P. and Chetsawang, B. 2013. Melatonin attenuates dexamethasone toxicity-induced oxidative stress, calpain and caspase activation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **138**, 116-122.
26. Tazik, S., Johnson, S., Lu, D., Johnson, C., Youdim, M. B., Stockmeier, C. A. and Ou, X. M. 2009. Comparative neuroprotective effects of rasagiline and amindoan with selegiline on dexamethasone-induced brain cell apoptosis. *Neurotox. Res.* **15**, 284-290.
27. Ward, G. R., Franklin, S. O., Gerald, T. M., Dempsey, K. T., Clodfelter, D. E., Krissinger, D. J., Patel, K. M., Vrana, K. E. and Howlett, A. C. 2007. Glucocorticoids plus opioids up-regulate genes that influence neuronal function. *Cell. Mol. Neurobiol.* **27**, 651-660.
28. Youdim, M. B., Banerjee, D. K., Kelner, K., Offutt, L. and Pollard, H. B. 1989. Steroid regulation of monoamine oxidase activity in the adrenal medulla. *FASEB J.* **3**, 1753-1759.

초록 : Corticosterone에 의해 유도된 인간의 신경모세포종 SH-SY5Y 세포 증식 억제를 완화시키는 맥문동 열수 추출물의 효과에 관한 연구

이종규^{1,2} · 김상보¹ · 서용배^{1,2} · 김군도^{1*}

(¹부경대학교 자연과학대학 미생물학과, ²부경대학교 해양생명과학연구소)

만성적 스트레스가 있는 상황에서, 과잉 생산된 cortisol은 glucocorticoid receptor (GR)를 활성화시킴으로써 해마(hippocampus)에 있는 신경 세포에 손상을 줄 수 있다. Cortisol을 생성하지 못하는 동물들의 경우, corticosterone이 스트레스 호르몬의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 한편, 인간의 경우, corticosterone은 aldosterone의 전구물질 이거나 cortisol과 비슷한 특성을 가지는 하나의 glucocorticoid로만 여겨져 왔다. 최근 인간을 대상으로 cortisol과 dexamethasone과 같은 합성 glucocorticoid의 기능에 관한 연구가 많이 이루어져 왔으나, corticosterone의 정확한 기능에 대하여 많이 알려져 있지 않다. 본 연구에서 corticosterone을 여러 농도로 SH-SY5Y 세포에 처리한 후 24시간과 48시간 때 viability를 조사한 결과, 높은 농도(500 μ M과 1,000 μ M)에서 SH-SY5Y 세포의 성장 억제가 관찰된 반면, 낮은 농도(100 μ M)에선 그 효과가 나타나지 않았다. 맥문동, 오미자, 복신 열수 추출물에 대한 세포 독성을 실시한 결과, 세 시료 모두 농도가 높아질수록 높은 세포 독성을 보였다. 한편, 500 μ g/ml의 맥문동은 corticosterone에 의해 유도된 세포 성장 억제를 완화시켜 세포 성장을 회복시키는 효과를 보였다. 마지막으로, 맥문동 500 μ g/ml에 오미자와 복신의 농도를 달리하여 제조한 여러 혼합물의 시너지 효과를 알아본 결과, 대부분 혼합물이 약간의 효과를 보이긴 했으나, 음성 대조군 수준만큼 회복되지는 않았다.