

과산화수소 자극으로 활성화된 C6 성상교세포에 대한 맥문동추출물의 조절 효능 연구

박기호^{1#}, 강석용^{1,2}, 정효원^{1,2}, 박용기^{1,2*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 동국대학교 한방신약개발센터

A Study on the Effect of Liriopsis tuber water extract on Hydrogen Peroxide-stimulated C6 Astrocyte Cells

Ki Ho Park^{1#}, Seok Yong Kang^{1,2}, Hyo Won Jung^{1,2}, Yong-Ki Park^{1,2*}

1 : Department of Herbology, college of Korean Medicine, Dongguk University,
2 : Korean Medicine R&D Center, Dongguk University

ABSTRACT

Objective : To identify the effects of the water extract of *Liriopsis platyphylla* tuber (Liriopsis tuber, LT) on the activation of astrocytes, we investigated the regulatory effects of LT extract on H₂O₂-induced oxidative damage in C6 rat astrocytes.

Methods : LT extract was extracted with boiling water. C6 cell line were treated with LT extract at 1, 2, and 3 mg/ml or without for 30 min and then stimulated with H₂O₂ at 5 μm for 24 hr. The cell viability was measured by MTT assay. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), phospho-STAT3 (pSTAT3), cyclooxygenase (COX-2), Nuclear factor-κB (NF-κB), superoxide dismutase 2 (SOD2), heme oxygenase-1 (HO-1), catalase, Akt, phospho-Akt (p-Akt) phosphoinositide 3-kinases (PI3K), and protein kinase C alpha (PKCα) proteins were determined by Western blot, respectively. GFAP expression was also observed with immunocytochemistry under a fluorescence microscope.

Results : LT extract induced cell proliferation in H₂O₂-stimulated C6 cells. LT extract significantly inhibited the expression of GFAP, NF-κB and COX-2 and increased the expression of HO-1 and the phosphorylation of STAT3 in H₂O₂-stimulated C6 cells. LT extract also significantly increased the phosphorylation of Akt and decreased the expression of PKCα in a dose-dependent manner in H₂O₂-stimulated C6 cells.

Conclusions : LT extract can regulate H₂O₂-induced activation of astrocytes through inhibiting the expression of NF-κB, COX-2 and regulating Akt / HO-1, STAT3 or PKCα signaling pathway.

Key words : Liriopsis tuber, *Liriopsis platyphylla*, C6 astrocytes, oxidative damage, STAT3, Akt, HO-1, PKCα

I. 서 론

맥문동(麥門冬, *Liriopsis tuber*)은 맥문동(*Liriopsis platyphylla* Wang et Tang) 혹은 소엽맥문동(*Ophiopogon*

japonicus Ker-Gawle)의 덩이뿌리로서, 그 기미가 甘微苦, 微寒하여 甘寒清潤하는 것으로 潤肺清心, 養胃清熱, 生津止渴 등의 효능을 나타내어 口渴, 咯血, 心煩, 不眠, 心腹結氣, 傷中傷飽, 腸燥便秘, 五勞七傷 등에 적용하였다¹⁾. 현대의 연구

*Corresponding author : Yong-Ki Park, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongdaero 123, Gyeongju, 38066, South Korea.

· Tel : +82-54-770-2661 · Fax : +82-54-770-2647 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

#First author : Ki Ho Park, Department of Herbology, college of Korean Medicine Dongguk University, Dongdaero 123, Gyeongju, 38066, South Korea.

· Tel : +82-54-770-2647 · Fax : +82-54-770-2647 · E-mail : cbg012@naver.com

· Received : 11 June 2020 · Revised : 07 July 2020 · Accepted : 25 July 2020

에서 맥문동은 항산화²⁾, 항염증³⁾ 및 면역 조절⁴⁾, 변비 개선 효과^{5,6)} 등의 효능을 나타낼 뿐만 아니라 당뇨 개선 효과⁷⁻⁹⁾, B형 간염에서의 항바이러스 효과¹⁰⁾, 산화스트레스에 의한 신경 세포 사멸의 억제 효과¹¹⁾ 및 신경성장인자 유도 효과^{12,13)} 등을 나타내었으며, 특히 신경성장인자와 관련된 작용은 신경세포 뿐만이 아닌 정상교세포(astrocytes)에 대해서도 나타나는 것이 확인되었으나¹³⁾ 맥문동이 정상교세포에 미치는 효과에 대한 구체적인 기전에 대한 연구는 확인할 수 없었다.

정상교세포는 신경 세포(neuronal cell), 미세아교세포(microglia) 등과 함께 신경조직을 이루는 세포로서 신경조직의 구조를 지지하고, 신경세포의 발생, 신경 대사의 조절 및 기능 안정화와 시냅스의 생성, 신호조절 및 변형 등에 관여하며, 교세포 신경전달을 통해 신경조직을 이루는 세포 사이의 연락을 증개, 조절하는 기능을 한다^{14,15)}. 또한 뇌혈관장벽(Brain-Blood Barrier: BBB)을 구성하여 신경 세포를 독성 물질로부터 보호할 뿐만 아니라 뇌 혈류량의 조절에도 관여한다^{14,16)}. 또한 정상교세포는 주변 환경의 변화에 반응하여 칼슘 이온 신호를 활성화하는데, 해당 신호 전달 체계의 역할은 신경세포들의 조화로운 발화를 유도하여 뇌의 고차원적인 기능 발현에 관여하는 것으로 추측되고 있다^{15,17)}.

정상교세포는 병리학적으로 신경 조직의 허혈손상 및 척수의 부상과 같은 물리적 손상, 특정 정신질환 및 알츠하이머 병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 다발성 경화증 등의 퇴행성 질환을 포함한 다양한 신경질환에서 활성화되어, 각종 염증 및 신경 사멸, 혹은 신경보호작용을 일으키는 것으로 관측되어 이들 질환들의 치료에 있어 중요한 대상이 되고 있다¹⁸⁾. 본 연구진은 이전 연구를 통해 맥문동 추출물이 혈관성 치매 모델 랫드의 해마에서 정상교세포의 활성을 감소시키고 BDNF와 같은 신경보호인자의 분비를 증가시키는 것을 확인한 바 있다¹⁹⁾.

따라서 본 연구에서는 맥문동 추출물이 정상교세포의 활성 조절에 어떤 영향을 주는지 그 효과와 기전을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 맥문동(*Liriope platyphylla* Wang et Tang, 한국산)은 광명당제약(울산, 한국)으로부터 표준약재를 구입한 뒤 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 정선하여 추출물 제조에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약으로는 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), penicillin/streptomycin(Corning, NY, USA), Fetal bovin serum (FBS)(Merck Millipore, Temecula, CA, USA), EZ-Cytox (DoGenBio Co., Ltd, Korea), Anti-GFAP(Santa Cruz, Dallas, MA, USA), Anti-Akt, phospho-Akt(R&D System Inc., MN, USA), COX-2(Cayman Chemical, MI, USA), Anti-NF- κ B, STAT-3, phospho-STAT3, PKC α , HO-1, SOD, Catalase(Cell signaling,

Danvers, MA, USA), β -actin(Sigma-Aldrich, MO, USA), goat-anti-mouse, goat-anti-rabbit(Bio-rad, CA, USA), radioimmunoprecipitation assay(RIPA: Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 등이 있으며, 형광현미경(LEICA, Wetzler, Germany), Microtiter plate reader (ASYS, Austria), 약재추출기(Daihan scientific, Korea), 회전식감압농축기(Eyela Co., Ltd, Japan), 동결건조기(Ilshin Lab Co., Ltd, Korea), 자동광광장치(ChemiDoc; Biorad, USA) 등의 기기를 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 맥문동추출물 제조

맥문동추출물(Liriope tuber water extract, LT-W)은 맥문동 200 g에 정수된 물 2L를 넣고 95°C에서 3시간동안 1차 추출한 후 같은 비율로 2차 추출을 실시하였다. 추출물은 1호 와트만 거름종이(Whatman paper filter No.1)로 거르고, 회전식 감압농축기를 이용하여 농축한 후 동결건조기를 이용하여 건조시켰다. 이때 수율은 88.63%였다. 맥문동추출물은 냉장 보관하면서 실험 직전 생리식염수에 적정 농도로 완전 용해시킨 후 세포실험을 위한 약물로 사용하였다.

2) 세포배양

실험에 사용된 세포는 랫드의 정상교세포(rat brain glial cell line)인 C6 세포로 ATCC사(CCL-107™, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 함유된 DMEM을 배양액으로 하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 약 60%의 세포가 성장하였을 때 맥문동추출물(1.0, 2.0, 3.0 mg/ml)을 전 처리한 30분 후 산화적 스트레스를 주기 위하여 H₂O₂를 5 μ m/ml의 농도로 처리하였다.

3) 세포독성평가

C6 세포에서 LT-W의 독성 농도를 평가하기 위해 EZ-Cytox assay를 수행하였다. 즉, C6 cell(2 × 10⁴ cells/well)을 24-well culture plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 하루 동안 배양한 후 맥문동추출물을 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 또한 LT-W를 1, 2, 3 mg/ml 처리하여 30분 간 배양한 후 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 H₂O₂를 5.0 μ m/ml의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 여기에 각 well 당 EZ-Cytox 용액을 10 μ l 씩 넣어 2시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도하였다. 이후 발색정도를 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성정도는 세포만 배양한 대조군에서의 100% 생존도를 기준으로 상대적인 세포생존도(cell viability)를 계산하였다.

4) Western Blot

C6 세포에서 발현되는 염증단백질(NF- κ B, COX-2), 항산화효소 단백질(HO-1, Catalase, SOD), 정상세포 활성 단백질(GFAP) 및 신호 조절 단백질(STAT3, Akt, PKC α)에

대한 맥문동추출물(LT-W)의 조절 효과를 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 즉, C6 세포를 60 mm culture dish에서 하룻밤 배양한 다음 서로 다른 농도의 LT-W(1.0, 2.0, 3.0 mg/ml)을 전 처리한 30분 후 산화적 스트레스를 주기 위하여 H_2O_2 를 5 μ m/ml의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양해주었다. 각 세포를 수거하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 RIPA buffer를 넣고 homogenizer를 이용하여 마쇄한 후 4°C, 14,000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하였다. 상청액을 수집하여 Bradford's assay(Bio-rad) 용액으로 단백질의 농도를 측정 후 30 μ g 단백질을 SDS-PAGE 분리하였다. 이를 nitrocellulose membrane에 transfer한 후 5% skim milk에 담겨 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 여기에 5% skim milk에 희석한 각 단백질의 1차 항체와 4°C에서 하룻밤 반응시켰으며, 1x TBST buffer(Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20, pH 7.5)를 이용하여 15분씩 3회 세척한 후 HRP-conjugated 2차 항체와 실온에서 3시간 반응시켰다. 이를 다시 1x TBST로 3회 세척한 후 ECL 용액으로 염색하고 자동감광장치(Bio-Rad ChemiDoc)를 이용해서 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 각 단백질의 밴드를 Image J program(NIH, USA)을 이용하여 β -actin의 발현 정도와 비교한 발현 비율로 계산하여 histogram으로 나타내었다.

5) 면역세포화학염색(Immunocytochemistry, ICC)

C6 세포에서 astrocyte의 가장 특징적인 지표인 GFAP 발현에 대한 맥문동추출물(LT-W)의 효과를 확인하기 위해 면역세포화학염색(ICC)을 수행하였다. 즉, C6 세포를 Thermanox plastic cover slips(Nunc™, Thermo Fisher Scientific)에 분주하여 맥문동추출물을 전 처리하고, H_2O_2 로 산화스트레스를 유발하여 배양하였다. 각 세포를 1× PBS로 세척한 후, 4% paraformaldehyde 용액을 넣어 10분 고정시키고, 이를 1× PBS로 3회 세척하였다. 고정된 세포에 0.5% Triton X-100

이 포함된 1× PBS(PBS-T)를 이용하여 20분간 반응시키고 1× PBS로 3회 세척한 후 5% BSA 용액에서 1시간동안 반응시켰다. 이를 다시 1× PBS로 3회 세척한 후 GFAP antibody(Santa Cruz)와 함께 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 반응이 끝난 세포는 1× PBS로 3회 세척한 후 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG와 함께 1시간 실온에서 반응시키고 DAPI로 세포 핵을 염색한 후 mounting 용액을 이용하여 봉입한 후 형광현미경(Leica DM2500)으로 관찰하였다.

6) 통계분석

실험결과는 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용해 histogram으로 나타내었고 유의성을 one-way ANOVA와 Turkey's test를 통해 검정하여 95% confidence interval 이상인 경우를 유의성 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 세포증식 유도에 대한 효과

C6 성상교세포에서 맥문동추출물(LT-W)의 독성을 평가한 결과, LT-W을 5 mg/ml 농도까지 처리하였을 때 세포 생존도에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(그림 1A). 또한 산화적 손상에 따른 세포생존도 감소에 대한 맥문동추출물의 억제 효과를 확인하기 위해 H_2O_2 처리 후 맥문동추출물을 처리하여 세포 증식유도 효과를 조사하였다. 그 결과, 맥문동추출물은 H_2O_2 처리 후 감소되는 세포 생존도를 처리 농도에 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다(그림 1B). 특히 맥문동추출물의 1, 2, 3 mg/ml 처리 농도에서 H_2O_2 처리군에 비해 유의적인($p < 0.001$, respectively) 증가를 나타내어 이후 실험에서는 이 농도 범위에서 맥문동추출물의 효능을 평가하였다.

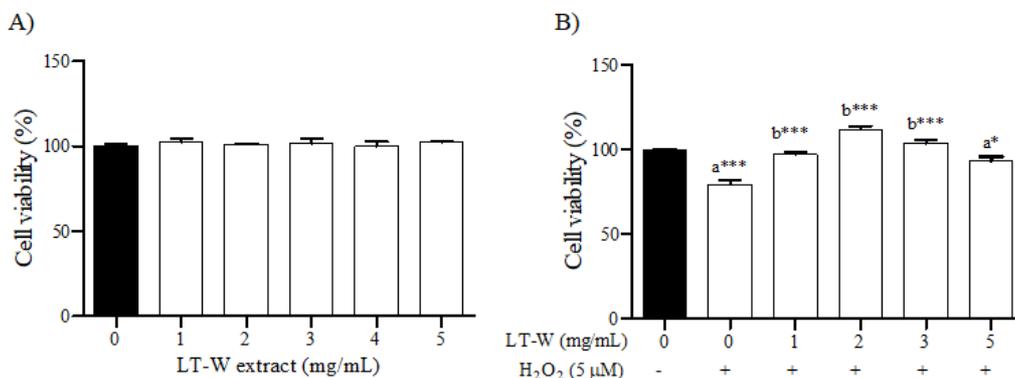


Figure 1. Effects of LT-W extract on cell viability in C6 astrocytes.

(A) Cells were treated with LT-W extract at different concentrations for 24 hr and (B) were treated with LT-W extract or without and then stimulated with H_2O_2 at 5 μ m for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Data was presented as mean \pm SD of three independent experiments. $p < 0.05$ and $p < 0.001$ vs. normal (a) or H_2O_2 -stimulated group (b).

2. 활성조절 단백질 발현에 대한 효과

산화적 손상을 받은 성상교세포 활성화에 대한 맥문동추출물(LT-W)의 조절 효과를 평가하기 위해 C6 세포에서의 성상

교세포 활성화 단백질인 GFAP의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, H_2O_2 처리 후 C6 세포 활성화에 따른 GFAP의 발현이 정상세포에 비해 유의적으로($p < 0.01$) 증가하였으며, 이는

맥문동추출물의 처리 농도에 의존적으로, 또한 H₂O₂ 처리군에 비해 유의적으로($p < 0.05$ for 1 mg/ml, $p < 0.05$ for 1 mg/ml, $p < 0.01$ for 3 mg/ml) 감소하는 것으로 나타났다(그림 2A). 또한 GFAP의 발현을 세포 염색을 통해 확인한 결과, H₂O₂에

의한 산화적 손상으로 GFAP-발현 세포들이 증가하였고, 이는 맥문동추출물 3 mg/ml을 처리한 후 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(그림 2B).

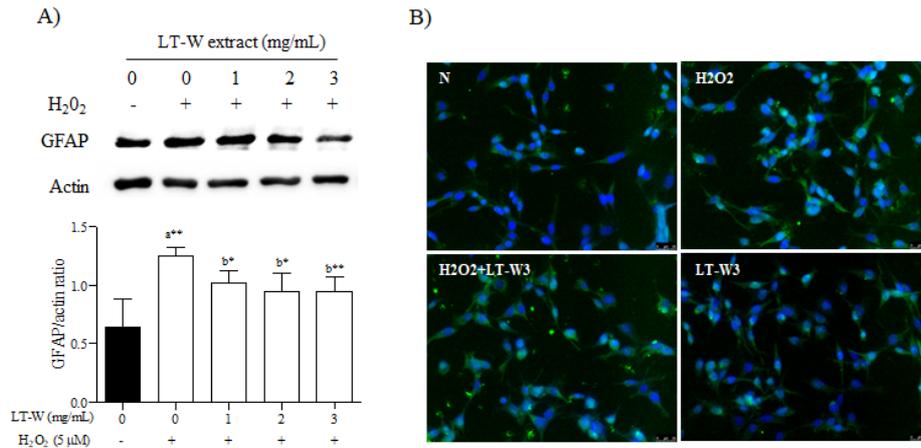


Figure 2. Effects of LT-W extract on GFAP expression in C6 astrocytes.

(A) Cells were treated with LT-W extract at 1, 2, and 3 mg/ml for 30 min and then stimulated with H₂O₂ at 5 μ M for 24 hr. The expression of GFAP was measured by Western blot, respectively. The histogram was calculated the ratio of GFAP expression per actin with mean \pm SD of three independent experiments. $p < 0.05$ and $p < 0.01$ vs. normal (a) or H₂O₂-stimulated group (b). (B) Cells were stained with anti-GFAP antibody and observed under fluorescence microscope (original magnification = x200). Green color is GFAP-positive cells.

3. 성상교세포 활성화 및 염증 단백질 발현에 대한 효과

GFAP의 발현에 관여하는 인자로서 STAT3²⁰⁾의 활성화 및 NF- κ B²¹⁾의 발현 변화를 조사한 결과, H₂O₂처리에 의해 STAT3의 인산화 단백질(p-STAT3)의 발현이 정상군에 비해 유의적으로 증가하였으며($p < 0.01$), 이러한 증가는 맥문동추출물(LT-W)의 처리 후 더욱 유의적인 증가($p < 0.05$ for 1 mg/ml, $p < 0.05$ for 3 mg/ml)를 나타낸 반면(그림 3A) NF- κ B의 발현은 대조군에 비해 유의하게 감소($p < 0.05$ for 3 mg/ml)하였다(그림 3B). 따라서 맥문동추출물이 산화적 손상에 따른 성상교세포 활성화를 조절하는 것에 STAT3의 활성화 및 NF- κ B/GFAP 기전 제어가 관여된 것을 알 수 있었다.

산화적 스트레스가 유발된 성상교세포에서의 염증반응 유발에 대한 맥문동추출물의 조절 효과를 확인하기 위해 NF- κ B에 의해 증가하는 염증단백질인 COX-2의 발현 변화를 Western blot 방법으로 조사하였다. 그 결과, COX-2의 발현은 맥문동추출물 처리에 의해 감소하였으며, 특히 2 mg/ml($p < 0.01$)과 3 mg/ml($p < 0.05$) 처리군에서 대조군에 비해 유의적인 감소를 나타내었다(그림 3C). 따라서 성상교세포에서 맥문동추출물은 산화적 손상에 따른 염증단백질 발현을 감소시킴으로써 염증 반응을 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

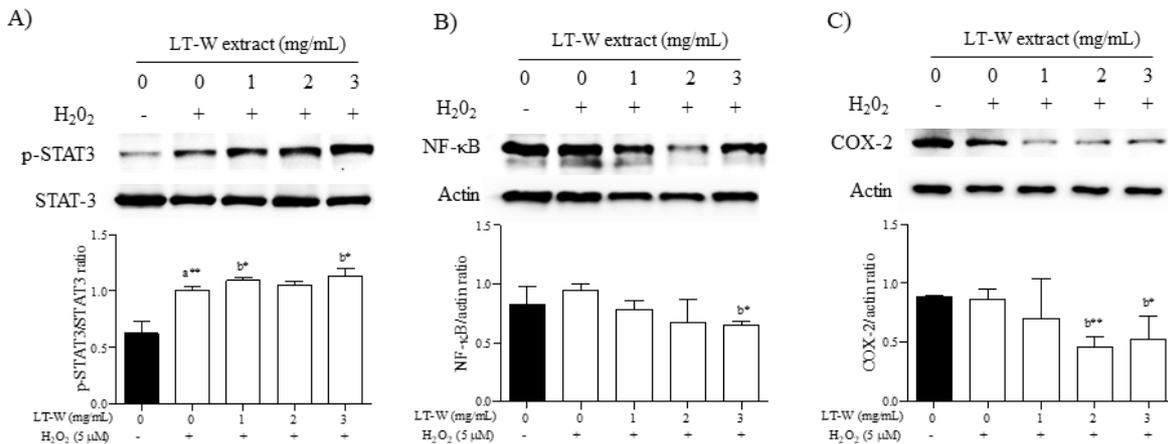


Figure 3. Effects of LT-W extract on STAT3, NF- κ B and COX-2 expression in C6 astrocytes.

Cells were treated with LT-W extract at 1, 2, and 3 mg/ml for 30 min and then stimulated with H₂O₂ at 5 μ M for 24 hr. The expression of STAT3 (total and phospho-forms) (A), NF- κ B (B) and COX-2 (C) was measured by Western blot, respectively. The histogram was calculated the ratio of each target expression per actin or phospho-form with mean \pm SD of three independent experiments. $p < 0.05$ and $p < 0.01$ vs. normal (a) or H₂O₂-stimulated group (b).

4. 항산화 효소 단백질 발현에 대한 효과

산화적 스트레스가 유발된 성상교세포에서의 항산화효소 단백질 발현에 대한 맥문동추출물(LT-W)의 조절 효과를 확인하기 위해 SOD2, HO-1, catalase의 발현 변화를 Western blot 방법으로 조사하였다. 그 결과, SOD2의 발현은 맥문동추출물 처리에 의해 증가하는 경향은 나타났으나 유의적인 결과가 나타나지는 않았으며(그림 4A), HO-1의 발현은 H₂O₂

처리에 의해 정상군에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 증가하였고, 이는 맥문동추출물 3 mg/ml($p < 0.05$) 처리군에서 유의적으로 더욱 증가하였다(그림 4B).

한편 catalase의 발현은 맥문동추출물 처리에 따라 감소하는 경향을 나타내었으나 유의하지는 않았다(그림 4C). 따라서 성상교세포에서 맥문동추출물은 산화적 손상에 따라 항산화 단백질, 특히 HO-1의 발현을 증가시킴으로써 산화스트레스를 조절함을 알 수 있었다.

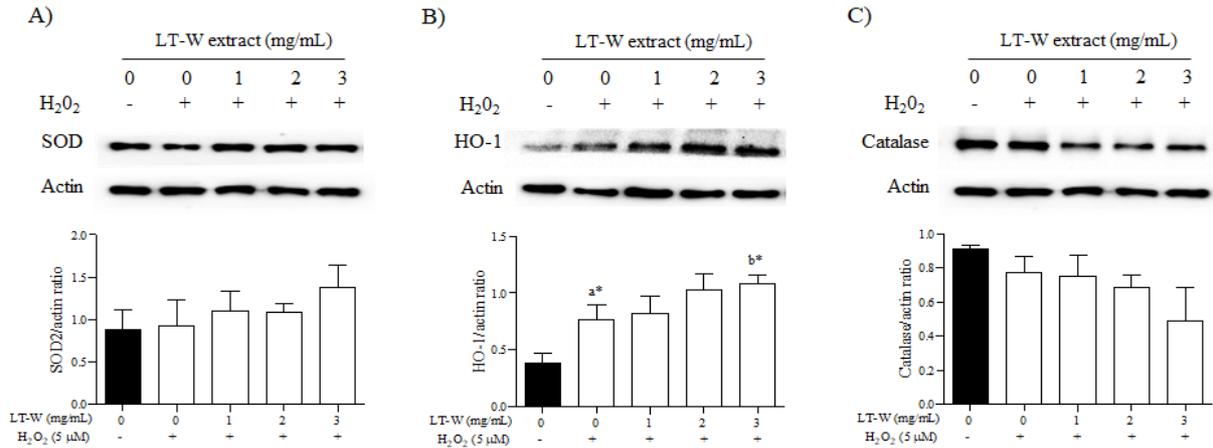


Figure 4. Effects of LT-W extract on SOD, HO-1 and catalase expression in C6 astrocytes.

Cells were treated with LT-W extract at 1, 2, and 3 mg/ml for 30 min and then stimulated with H₂O₂ at 5 μM for 24 hr. The expression of SOD (A), HO-1 (B) and catalase (C) was measured by Western blot, respectively. The histogram was calculated the ratio of each target expression per actin with mean ± SD of three independent experiments. $p < 0.05$ vs. normal (a) or H₂O₂-stimulated group (b).

5. Akt/PI3K/PKCα 기전 조절에 대한 효과

HO-1은 STAT3²²⁾, NF-κB²³⁾ 등의 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있으므로 LT-W가 나타내는 성상교세포 활성 억제 효과의 근거가 될 수 있을 것으로 생각되었다. 이에 나아가, 성상교세포 활성 조절 인자로서 HO-1에 대한 LT-W의 조절 효과를 확인하기 위해 HO-1의 상위 신호전달분자인 PI3K 및 Akt²⁴⁾, PKCα²⁵⁾ 발현 변화를 Western blot 방법으로 조사하였다. 그 결과, Akt의 인산화는 LT-W 처리에 의해 증가하였으며 특히

3 mg/ml 처리군에서 대조군에 비해 유의적인($p < 0.01$) 증가를 나타내었다(그림 5A). 또한 PKCα의 발현은 정상군에 비해 대조군에서 유의적인($p < 0.01$) 증가를 나타내었고, 이는 LT-W에 의해 감소하였으며 특히 2 mg/ml 농도에서 유의적인($p < 0.05$) 감소를 나타내었다(그림 5C). 한편 PI3K 발현은 맥문동추출물 처리에 의해 감소하는 경향을 나타내었으나 유의적인 결과는 얻지 못하였다(그림 5B). 따라서 맥문동추출물은 성상교세포에서 Akt 및 PKCα 기전의 조절을 통해 활성을 조절할 수 있는 것으로 나타났다.

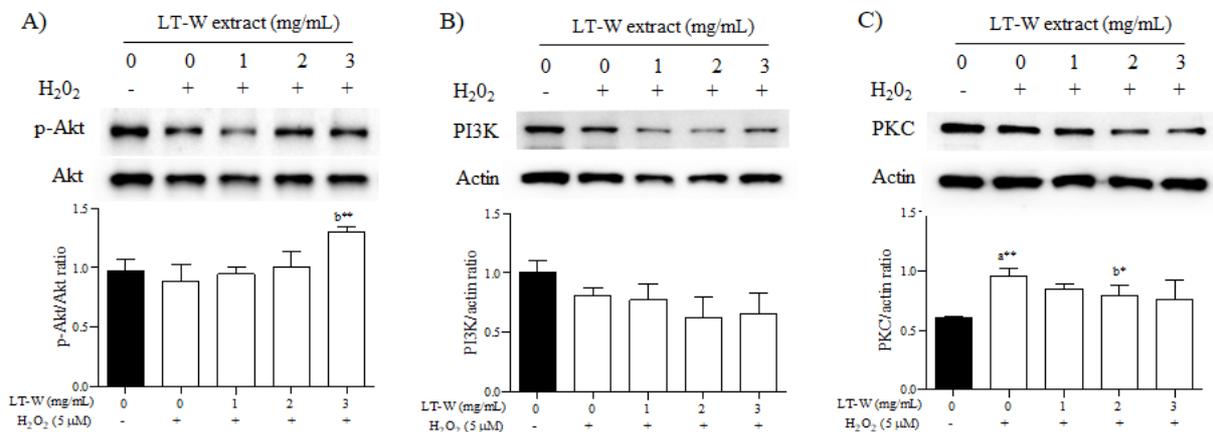


Figure 5. Effects of LT-W extract on Akt, PI3K and PKC expression in C6 astrocytes.

Cells were treated with LT-W extract at 1, 2, and 3 mg/ml for 30 min and then stimulated with H₂O₂ at 5 μM for 24 hr. The expression of Akt and p-Akt (A), PI3K (B) and PKC (C) was measured by Western blot, respectively. The histogram was calculated the ratio of each target expression per actin with mean ± SD of three independent experiments. $p < 0.01$ and $p < 0.05$ vs. normal (a) or H₂O₂-stimulated group (b).

IV. 고찰

맥문동은 일반적으로 면역 반응의 조절 등에 관여하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다³⁾. 성상교세포는 미세아교세포 등과 함께 신경 조직에서의 면역 반응에 중요한 역할을 담당하고 있으므로²⁶⁾, 맥문동 추출물의 효과가 성상교세포에 작용할 것으로 예상되었다. 이에 과산화수소 자극으로 산화스트레스가 유발된 C6 성상교세포에서 맥문동추출물이 세포증식에 미치는 효과를 확인한 결과, 맥문동추출물(LT-W)은 처리 농도에 의존적으로 과산화수소에 의해 감소된 세포 생존도를 증가시켰으며 특히 2 mg/ml의 농도에서 대조군에 비해 유의적인 세포증식 유도 효과를 나타내었다. 이를 통해 과산화수소에 의한 산화적 손상으로부터 맥문동추출물이 성상교세포를 보호할 수 있음을 알 수 있었다. 예비 연구를 통해 C6 성상교세포에서 과산화수소의 다양한 농도(1, 5, 10, 20, 50 μ m) 처리는 농도에 의존적인 세포 생존을 감소를 나타내었으며, 5 μ m 농도에서 맥문동추출물에 의한 세포증식 유도효과가 가장 유의적인 것으로 나타나서 본 연구에서는 5 μ m 농도를 산화적 손상을 유도하기 위한 적정 농도로 설정하였다.

GFAP는 성상교세포의 골격단백질로서 성상교세포 활성화의 지표이기도 하므로²¹⁾, 본 연구에서는 맥문동추출물의 성상교세포 활성화 조절효과를 확인하기 위해 GFAP의 발현 변화를 확인하였다. 과산화수소 처리로 활성이 증가된 C6 성상교세포에서는 GFAP가 증가하며, 이는 맥문동추출물에 의해 농도 의존적으로 감소하였다. 맥문동 추출물에 의한 세포 보호 효과가 2 mg/ml의 농도에서 가장 크게 나타난 것과 달리 성상교세포의 활성 억제 효과는 농도 의존적으로 나타났는데, 이는 맥문동 추출물에 의한 성상교세포의 활성화 억제 효과가 산화스트레스에 의한 세포손상에 대한 억제 효과와는 별개임을 시사한다. 이에 맥문동추출물의 세포생존을 증가에 대한 기전으로서 항염증 및 항산화 작용을 확인해보기 위해 다양한 염증 단백질과 항산화효소 단백질의 발현을 확인해보았다.

성상교세포의 활성화 양상은 크게 NF- κ B의 활성을 중심으로 하는 A1 형태와 STAT3의 활성을 중심으로 하는 A2 형태로 나뉘며, A1 형태에서는 NF- κ B의 활성과 함께 염증매개인자의 발현이 증가하고 A2 형태에서는 STAT3의 활성과 함께 각종 성장인자의 발현이 증가한다²⁷⁾. 한편 산화스트레스 환경에서 COX-2는 NF- κ B의 활성에 직접적 영향을 받으며 그 자체로도 염증 반응에 관여하는 대표적 인자이다²⁸⁾. 이에 본 연구에서 STAT3, NF- κ B, COX-2의 활성 및 발현량을 조사한 결과, 맥문동 추출물은 과산화수소 자극으로 활성화된 C6 성상교세포에서 STAT3의 인산화 발현을 증가시켰으며, 염증 단백질인 COX-2와 NF- κ B의 발현은 농도 의존적인 감소를 나타내었다. 이를 통해 맥문동 추출물이 성상교세포의 활성화 양상을 조절하여, 신경성장인자의 발현 증가¹⁹⁾에 직접적으로 영향을 미침으로써 맥문동 추출물의 신경 보호 효과가 나타날 수 있음을 알 수 있었다.

또한 맥문동추출물은 항산화효소인 SOD와 HO-1의 발현을 처리 농도에 의존적으로 증가시켰다. 이러한 결과는 맥문동추출물이 성상교세포에서 과산화수소에 의한 염증반응 유발과 산화적 손상을 억제시켜줄 수 있음을 의미한다.

항산화효소 중 HO-1은 p-STAT3과 NF- κ B의 핵 이동을

각각 억제하여 단백질 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다^{22,23)}. 본 연구의 항산화효소 단백질 발현 변화에서 맥문동추출물은 특히 HO-1의 발현을 농도에 의존적으로 증가시켰는데, 이는 맥문동추출물이 HO-1의 발현 증가에 직접적으로 관여하여 성상교세포의 활성을 전반적으로 억제함을 시사한다.

이를 종합해볼 때, 맥문동추출물에 의한 세포생존률 변화 양상은 저농도(1~2 mg/ml)에서는 STAT3의 활성을 촉진하고 PI3K/Akt/HO-1 경로를 활성화하여 NF- κ B/COX-2의 활성을 억제하는 것으로서 세포생존률이 증가하지만, 고농도(3 mg/ml)에서는 STAT3의 활성까지 HO-1에 의해 억제되면서 전체적인 세포활성이 감소하는 것으로서 세포생존률이 다시 소폭 감소하는 것으로 생각된다.

한편 HO-1은 ERK²⁹⁾, PI3K/Akt(PKB)²⁴⁾, PKC α ²⁵⁾ 등의 신호 활성화에 따라 발현이 증가하는 것으로 보고된 바 있다. 그러나 ERK는 NF- κ B 경로에 의존하여 증가한다고 알려져 있으므로³⁰⁾ 본 연구에서는 PI3K, Akt, PKC α 등의 HO-1 증가 기전에 대한 맥문동추출물의 조절효과를 조사하였다. 그 결과 p-Akt/Akt의 비율이 농도에 비례하여 유의적으로 상승하였으며, 이는 맥문동추출물에 의한 HO-1의 증가가 Akt/Nrf2/HO-1 경로 활성화에 의해 유도됨을 알 수 있었다. 이는 기존 연구에서 맥문동 추출물이 Akt 경로를 활성화시킨다는 보고와 일치한다⁹⁾. 또한 HO-1의 항바이러스 기전³¹⁾을 감안할 때 맥문동 추출물의 B형 간염에 대한 활성 또한 HO-1의 발현 증가에 따른 것으로 생각된다. 즉 맥문동 추출물은 산화스트레스 환경에서 Akt / HO-1 경로를 활성화시키는 것을 통해 성상교세포 활성화 기전인 STAT3 및 NF- κ B 경로를 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

한편 PKC α 는 NF- κ B 활성화를 촉진하는 것으로 알려져 있다³²⁾. 본 연구에서는 C6 성상교세포에서 PKC α 의 발현이 과산화수소 처리에 의해 증가하며, 이는 맥문동추출물 처리에 의해 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 맥문동추출물이 PKC α 의 활성을 감소시킴으로써 NF- κ B의 활성도 억제할 수 있다고 보여진다.

결론적으로 맥문동 추출물은 과산화수소 처리로 산화적 스트레스가 유발되었을 때 성상교세포에서의 활성화 유도를 Akt/HO-1의 경로 활성 증가를 통해 조절할 수 있으며, 성상교세포의 활성 방향을 STAT3 기전의 활성 증가와 PKC/NF- κ B 기전 억제를 통해 조절할 수 있음을 알 수 있었다.

V. 결론

본 연구에서 C6 성상교세포 활성화에 대한 맥문동 물 추출물의 조절 효과 및 기전을 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 맥문동추출물은 C6 성상교세포에서 과산화수소로 유도된 세포 생존도 감소를 억제하고 세포증식을 유도하였다.
2. 맥문동 물 추출물은 STAT3의 활성화를 유도하여 NF- κ B와 COX-2의 발현을 억제하고 이는 성상교세포의 활성 방향 조절 및 신경 보호 기전과 연관이 있다.

3. 맥문동 물 추출물은 Akt/HO-1 경로의 활성을 유도하며 이는 STAT3과 NF- κ B 경로의 활성을 억제하여 성상교세포의 활성 억제 및 세포생존률의 변화에 관여한다.
4. 맥문동 물 추출물은 PKC α 의 활성을 감소시키는 것으로 NF- κ B의 활성을 억제한다.

결론적으로 맥문동 물 추출물은 성상교세포의 활성을 여러 방면에서 조절함으로써 뇌 신경보호에도 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 동국대학교에서 지원을 받아 수행된 기초연구이며 이에 감사드립니다.

References

1. Kim JH, Joo YS. A Literature Review on the Effectiveness of Liriopsis tuber and Asparagi Radix. Kor J Herbol. 1994 ; 9(1) : 127-41.
2. Ku G, Lee HI, Kim SJ, Shin MR, Lee AR, Park HJ, Roh SS, Seo YB. Effects of Steaming Process on Liriopsis Tuber to Antioxidant Activities and Hyperlipidemia Induced Rats. Kor J Herbol. 2018 ; 33(5) : 89-103
3. Kim HK, Lee JY, Han HS, Kim YJ, Kim HJ, Kim YS, Kim HM, Ko SG, An HJ, Lee YJ, Park W. Immunomodulatory Effects of *Liriope Platyphylla* Water Extract on Lipopolysaccharide-Activated Mouse Macrophage. Nutrients. 2012 ; 4(12) : 1887-97.
4. Lee YC, Lee JC, Seo YB, Kook YB. Liriopsis tuber inhibit OVA-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. J Ethnopharmacol. 2005 ; 101(1-3) : 144-52.
5. Kim JE, Lee YJ, Kwak MH, Ko J, Hong JT, Hwang DY. Aqueous extracts of *Liriope platyphylla* induced significant laxative effects on loperamide-induced constipation of SD rats. BMC Complement Altern Med. 2013 ; 13 : 333.
6. Kim HJ, Park SY, KIM DG, Park SH, Lee H, Hwang DY, Jung MH, Kim BJ. Effects of the roots of *Liriope Platyphylla* Wang Et tang on gastrointestinal motility function. J Ethnopharmacol. 2016 ; 184 : 144-53.
7. Kim JH, Kim JE, Lee YK, Nam SH, Her YK, Jee SW, Kim SG, Park DJ, Choi YW, Hwang DY. The Extracts from *Liriope platyphylla* Significantly Stimulated Insulin Secretion in the HIT-T15 Pancreatic Cell Line. J Life Sci. 2010 ; 20(7) : 1027-33.
8. Kim JE, Hwang IS, Choi SI, Lee HR, Lee YJ, Goo JS, Lee HS, Son HJ, Jang MJ, Lee SH, Kang BC, Hwang DY. Aqueous extract of *Liriope platyphylla*, a traditional Chinese medicine, significantly inhibits abdominal fat accumulation and improves glucose regulation in OLETF type II diabetes model rats. Lab Anim Res. 2012 ; 28(3) : 181-91.
9. Choi SB, Wha JD, Park S. The insulin sensitizing effect of homoisoflavone-enriched fraction in *Liriope platyphylla* Wang et Tang via PI3-kinase pathway. Life Sci. 2004 ; 75(22) : 2653-64.
10. Huang TJ, Tsai YC, Chiang SY, Wang GJ, Kuo YC, Chang YC, Wu YY, Wu YC. Anti-viral effect of a compound isolated from *Liriope platyphylla* against hepatitis B virus in vitro. Virus Res. 2014 ; 192 : 16-24.
11. Park HR, Lee H, Jeon JW, Cho WK, Ma JY. Neuroprotective effects of *Liriope platyphylla* extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. BMC Complement Altern Med. 2015 ; 15 : 171.
12. Nam SH, Choi SI, Goo JS, Kim JE, Lee YK, Hwang IS, Lee HR, Lee YJ, Lee HG, Choi YW, Hwang DY. LP-M, a Novel Butanol-Extracts Isolated from *Liriope platyphylla*, could Induce the Neuronal Cell Survival and Neuritic Outgrowth in Hippocampus of Mice through Akt/ERK Activation on NGF Signal Pathway. J Life Sci. 2011 ; 21(9) : 1234-43.
13. Choi SI, Park JH, Her YK, Lee YK, Kim JE, Nam SH, Goo JS, Jang MJ, Lee HS, Son HJ, Lee CY, Hwang DY. Effects of Water Extract of *Liriope platyphylla* on the mRNA Expression and Protein Secretion of Nerve Growth Factors. Korean J Medicinal Crop Sci. 2010 ; 18(5) : 291-7.
14. Liu Z, Chopp M. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. Prog Neurobiol. 2016 ; 144 : 103-20.
15. Vasile F, Dossi E, Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. Brain Struct Funct. 2017 ; 222(5) : 2017-29.
16. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. Nature. 2010 ; 468(7321) : 232-43.
17. Guerra-Gomes S, Sousa N, Pinto L, Oliveira JF. Functional Roles of Astrocyte Calcium Elevations: From Synapses to Behavior. Front Cell Neurosci. 2018 ; 11 : 427.
18. Colangelo AM, Alberghina L, Papa M. Astroglialosis as a therapeutic target for neurodegenerative

- diseases. *Neurosci Lett*. 2014 ; 565 : 59–64.
19. Park KH. Neuroprotective Effect and Mechanisms of *Liriopsis platyphyllae* Tuber in Cerebral Ischemia Model Rat. Dongguk University. 2013.
 20. Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV. STAT3 is a Critical Regulator of Astroglial Scar Formation after Spinal Cord Injury. *J Neurosci*. 2008 ; 28(28) : 7231–43.
 21. Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res*. 1999 ; 32(5) : 619–31.
 22. Elguero B, Gueron G, Giudice J, Toscani MA, De Luca P, Zalazar F, Coluccio-Leskow F, Meiss R, Navone N, De Siervi A, Vazquez E. Unveiling the Association of STAT3 and HO-1 in Prostate Cancer: Role beyond Heme Degradation. *Neoplasia*. 2012 ; 14(11) : 1043–56.
 23. Yang YC, Lii CK, Wei YL, Li CC, Lu CY, Liu KL, Chen HW. Docosahexaenoic Acid Inhibition of Inflammation Is Partially via Cross-Talk Between Nrf2/heme Oxygenase 1 and IKK/NF- κ B Pathways. *J Nutr Biochem*. 2013 ; 24(1) : 204–12.
 24. Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, De Galarreta CM, Cuadrado A. Regulation of Heme oxygenase-1 Expression Through the Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Pathway and the Nrf2 Transcription Factor in Response to the Antioxidant Phytochemical Carnosol. *J Biol Chem*. 2004 ; 279(10) : 8919–29.
 25. Bloom DA, Jaiswal AK. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by Protein Kinase C in Response to Antioxidants Leads to the Release of Nrf2 from INrf2, but Is Not Required for Nrf2 Stabilization/Accumulation in the Nucleus and Transcriptional Activation of Antioxidant Response Element-mediated NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase-1 Gene Expression. *J Biol Chem*. 2003 ; 278(45) : 44675–82.
 26. Dokalis N, Prinz M. Astrocytic NF- κ B Brings the Best and Worst Out of Microglia. *EMBO J*. 2018 ; 37(16) : e100130.
 27. Li K, Li J, Zheng J, Qin S. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Disease. *Aging Dis*. 2019 ; 10(3) : 664–75.
 28. Fitzpatrick SF, Tambuwala MM, Bruning U, Schaible B, Scholz CC, Byrne A, O'Connor A, Gallagher WM, Lenihan CR, Garvey JF, Howell K, Fallon PG, Cummins EP, Taylor CT. An Intact Canonical NF- κ B Pathway Is Required for Inflammatory Gene Expression in Response to Hypoxia. *J Immunol*. 2011 ; 186(2) : 1091–6.
 29. Zipper LM, Mulcahy RT. Erk Activation Is Required for Nrf2 Nuclear Localization during Pyrrolidine Dithiocarbamate Induction of Glutamate Cysteine Ligase Modulatory Gene Expression in HepG2 Cells. *Toxicol Sci*. 2003 ; 73(1) : 124–34.
 30. Sticozzi C, Belmonte G, Meini A, Carbotti P, Grasso G, Palmi M. IL-1 β Induces GFAP Expression in Vitro and in Vivo and Protects Neurons From Traumatic Injury-Associated Apoptosis in Rat Brain Striatum via NF κ B/Ca²⁺-calmodulin/ERK Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *Neuroscience*. 2013 ; 252 : 367–83.
 31. Espinoza JA, González PA, Kalergis AM. Modulation of Antiviral Immunity by Heme Oxygenase-1. *Am J Pathol*. 2017 ; 187(3) : 487–93.
 32. Zheng J, Kong C, Yang X, Cui X, Lin X, Zhang Z. Protein kinase C- α (PKC α) modulates cell apoptosis by stimulating nuclear translocation of NF- κ B p65 in urothelial cell carcinoma of the bladder. *BMC Cancer*. 2017 ; 17(1) : 432.