동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 20. No. 2, 2009

H_2O_2로 유도된 산화적 스트레스에 대한 壯元丸加減方의 PC 12 cell 에서의 항산화 효과

박용훈*, 손일홍*, 이상원† , 임정현, 김태헌, 류영수, 강형원
원광대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실, 원광대학교 산본병원 인암뇌신경센타*
국립원예특작과학원†

Antioxidant Effects of *Gagam-Jangwon-hwan(jiajianzhuangyuanwan)* on Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in PC 12 Cell Lines

Yong-Hoon Park*, Il-Hong Son*, Sang-Won Lee† ,
Jung-hyun Lim, Tae-Heon Kim, Yeoung-Su Lyu, Hyung-Won Kang
Dept. of neuropsychiatry, college of Oriental Medicine, Wonkwang University
IN AM NeuroScience Research Center, Sanbon Medical Center, Wonkwang University*
National Institute of Horticultural and Herbal Science†

Abstract

Objectives :
Antioxidant effects of *Gagam-Jangwonhwan*(LMK01 and 02) water extract against H_2O_2-induced oxidative damage and cell death were investigated in rat pheochromocytoma line PC 12.

Methods :
The cells were treated with LMK01 and 02 water extract and H_2O_2, oxidative damage-inducing materials for 24 h. The cellular viability was assessed by WST-1 assay, oxidative damages of the cells by 8-OHdG quantitation, apoptosis by Hoechst 33342 staining assay and activity of antioxidant enzymes by catalase and glutathione peroxidase assay.

Results :
1. LMK01 and LMK02 water extracts improved significantly cell viability in H_2O_2-treated groups than H_2O_2-alone treated cells
2. LMK02 suppressed significantly oxidative damage in H_2O_2-treated groups than H_2O_2-alone treated cells but LMK01 didn't. Meanwhile, difference of oxidative damages in conditions treated with LMK01 or LMK02 was not significant,

투고일 : 5/10 수정일 : 6/8 채택일 : 6/12
교신저자 : 강형원, 전북 익산시 신룡동 344-2 원광대학교 한의과대학 신경정신과교실
Tel : 031-390-2762, E-mail : dskhw@wonkwang.ac.kr

3. The H_2O_2 induced-apoptosis in PC 12 cell lines was inhibited effectively by LMK01 and LMK02, and especially the features of apoptosis were obviously reduced in LMK02-treated cells.
4. LMK01 and LMK02 increased significantly activities of both catalase and glutathione peroxidase than those of H_2O_2-alone treated group and moreover, LMK02 showed significantly higher activities than those of LMK01.

Conclusions :
As shown, LMK01 and LMK02 suppressed H_2O_2-induced oxidative damage and cell death in PC 12 cell effectively. And they increased activity of major antioxidant enzymes in PC 12 cell line. Therefore, this study suggests the possibility of clinical usage over oxidative stress-induced neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease.

Key Words :
Gagam-Jangwon-hwan(jiajianzhuangyuanwan), Oxidative stress, Antioxidant, Anti-Alzheimer

Ⅰ. 서 론

생물체는 물질의 대사와 에너지 생산을 위하여 필수적으로 산소가 이용되고 있으며 정상적으로는 물과 이산화탄소로 배출된다. 그러나 이중 일부 23%의 산소가 불완전하게 전자를 흡수하려는 반응과정에서 세포의 파괴 작용을 초래하는데, 이를 활성산소(free radical, oxygen radical)라고 한다[1,2].

정상세포는 활성산소 생성 크기와 속도, 그리고 활성산소 제거 속도를 정밀하게 균형 잡으므로써 항상성을 유지한다. 그러므로 산화적 스트레스는 세포의 항산화 능력을 초과하는 활성산소 과잉생성의 산물로 정의 될 수 있다.

Superoxide와 hydroxyl free radical은 세포, 미토콘드리아, 핵, 소포체의 세포막들에서 과산화작용을 촉진하는데 이것은 Ca^{2+}에 대한 세포의 투과성을 높인다. 세포내의 높아진 칼슘이온 농도는 미토콘드리아에 손상을 주고, 아미노산은 산화되고 퇴화된다. 세포핵과 미토콘드리아 DNA는 산화되어 DNA 나선파손 등의 DNA손상을 초래하게 된다[3].

특히 뇌는 대사를 위한 산소 이용률이 높고 과산화지질의 함량도 높은 반면에 활성산소에 대한 산화방지 효소계나 저분자의 산화방지제가 타 조직에 비해 상대적으로 적은 관계로 유해활성산소나 라디칼에 의한 산화적 손상에 대하여 매우 약하기 때문에 신경세포의 사멸유도로 인한 치매 등과 같은 퇴행성 신경질환과 관련이 깊은 것으로 최근 여러 연구를 통해 보고되어지고 있다[4,5].

따라서, 이러한 퇴행성 뇌신경질환을 치료하기위한 항산화제 개발이 石斛[6], 紅蔘[7], 鬱金[8], 釣鉤藤[9] 등의 단미제와 四物湯[10], 石菖蒲遠志散[11] 등의 복합처방을 통해 연구가 활발히 진행되어왔다.

壯元丸은 『東醫寶鑑・神門』[12]에서 "建忘 … 宜服壯元丸", "補心生血 寧神定志 且臺閣勤政 勞心燈窓 讀書辛苦 幷健忘怔忡不寐 及不善記而多忘者 服之能日誦千言 胸藏萬卷"이라 하여 여러 醫家들에 의해 健忘에 활용되던 처방으

로서, 중금속위험이 있는 朱砂를 제거한 壯元丸去朱砂(LMK01)과 紅蔘, 白茯苓 등의 7가지로 구성된 補腎益氣醒腦 효능의 壯元丸加減方(LMK02)을 선용하여 본 실험에 사용하였다. 특히 LMK02는 강 등[13]과 김 등[14]에 의해 품질 규격화와 해마 세포주 및 치매 형질전환 초파리 모델에서의 유효성을 확인한 바 있으나, 산화적 스트레스를 통한 기전 및 항산화효과를 LMK01과 비교한 연구는 없었다.

이에 저자는 壯元丸加減方인 LMK01과 LMK02가 H_2O_2 유발 산화독성에 의한 PC-12 세포주에서 WST-1 assay를 통한 세포생존율, 8-OHdG에 의한 산화 스트레스 손상정도, 그리고 Hoechst 33342 staining assay에 의한 세포자사 억제정도, 항산화효소인 catalase과 glutathion peroxidase의 활성도를 측정하여, 항산화능력 활성화를 통한 신경세포 보호효과를 비교 조사하여 효능을 확인하였기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시약

PC12 세포(rat pheochromocytoma cell line) 배양에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovine serum(FBS), antibiotic-antimycotic, trypsin (Gibco, USA)이며, 그 외에 Hydrogen Peroxide(Sigma, USA), WST-1 assay 시약 (Roche, Germany), Hoechst33342 dye(Sigma, USA), catalase assay ELISA kit(Calbiochem, USA), glutathione assay ELISA kit(Cayman, USA)를 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 CO2 incubator(VS-9108 MS, vision scientific Co.), UV spectrophotomer(Biotek Synergy 2 Multi-Detection Microplate Reader), fluorescence spectrophotometer(LS55, PerkinElmer), fluorescence microscope(BX51 , Olympus) 등을 사용하였다.

2) 사용약제

본 실험에 사용한 LMK01(LMK02)의 처방에 사용된 약재는 유일제약(주)에서 최상품으로 인정된 약재를 엄선하여 한풍제약(유)에서 다음과 같은 제조공정을 걸쳐 얻은 건조엑스 100.8 g(95 g)를 사용 전 -80℃에 보관하여 3차 증류수로 1 mg/mL 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

(1) LMK01(LMK02) 단미 총 336 g(312 g)를 정선하여 파쇄 후 2mesh의 체를 통과하는 크기로 하여
(2) 추출기에 넣은 다음
(3) 정제수(약전) 약 2.7 L(2.5 L) 가량 넣고
(4) 95-100℃에서 3시간 가온 추출한 후
(5) 25 ㎛ 필터를 사용하여 여과하고 여액을 농축기를 이용하여 50-60℃에서 감압 농축한다.
(6) 한약 잔류물에 (3)-(6) 과정을 1회 반복하여 농축액을 전부 합한다.
(7) 합한 농축액을 건조기에 넣고 60℃ 이하에서 건조한다.
(8) 건조물을 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분말화 한다
(9) 건조엑스 100.8 g(95 g)를 얻는다[수득률 약 30%(30.4%)].

2. 연구방법

1) PC12 cell 배양

한국 세포주 은행으로부터 분양 받은 PC12 cell을 사용하였다. 세포 배양은 RPMI-1640 배지에 10% heat inactivated FBS와 1% antibiotic-antimycotic을 첨가하여 95% O_2, 5% CO_2, 37℃ incubator에서 배양하였다. media는 2일에 한 번씩 갈아주었다.

2) 신경세포 생존율 측정(WST-1 assay)

PC12 cell을 96well plate 한 well 당 2x104 농도로 분주하여 95% O_2, 5% CO_2 37℃ incubator에서 배양하였다. 24 시간 후에 LMK01, LMK02를 5 ug/ml, 25 ug/ml, 125 ug/ml 농도로 전처리하고 2 시간 후에 70 uM H_2O_2를 투여하였다. 약물 처리 후 24시간 뒤에 WST-1을 처리하여 37℃ incubator에서 2시간 반응 시킨 후, Microplate Reader 로 파장 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 세포DNA 손상 측정

세포내 DNA의 산화적 손상의 지표로 8-OHdG 농도를 정량하였는데, 상품화된 ELISA 키트(항8-OHdG 모노클론항체로 clone N45.1 항체를 사용하는 competitive enzyme-linked immunosorbent assay, JalCA, Haruoka, Fukuroi, Shizuoka, Japan)를 사용하여 세포에서 DNA를 추출한 후 측정하였다. 간략한 실험방법은 다음과 같다.

8-OHdG가 미리 코팅된 microtiter plate에 시료와 표준시료를 부가하고, 제공되는 적절한 농도의 항8-OHdG 모노클론 항체와 37℃에서 1시간 동안 반응시킨다. 항 8-OHdG 모노클론 항체는 시료에 들어있는 8-OHdG와 plate에 코팅된 8-OHdG와 경쟁적으로 반응한다. 따라서 시료에 들어있는 8-OHdG의 농도가 높을수록 plate에 코팅된 8-OHdG와의 결합은 저해된다. 결합하지 못한 시료와 항체를 제거하고 세척하여 8-OHdG에 결합한 항체들만 남겨놓았다. HRP가 결합된 이차항체를 37℃에서 1시간 동안 결합시킨 다음 미 부착 이차항체를 세척해서 제거하였다. Plate에 기질용액을 가해 발색시킨 후, 인산을 가해 반응을 종료시키고, 450 nm 에서 흡광도를 측정했다.

4) Hoechst 33342 염색을 이용한 세포사멸 관찰

조건 배양한 세포를 냉장 phosphate buffered saline(PBS)에 2회 세척하고, acetic acid/MeOH(1/3) 용액을 가한 후 실온에서 10분간 고정한다. 이 용액을 버리고 공기 중에 10분간 건조시킨 후, 암조건, 실온에서 Hoechst 33342 4 μg/mL의 농도로 PBS 용액에 희석하여 30분간 처리한 후, 이 용액을 제거하였다. 조심스럽게 증류수로 3번 세척하고, mounting 액을 가한 후에 형광현미경으로 핵분절 및 응축 등 세포사멸의 특징적 소견을 확인하였다.

5) Catalase 활성 측정

Catalase 의 활성도는 Calbiochem 사의 Catalase assay kit를 사용하여 정량하였다.

구체적인 실험방법은 제공된 절차에 따라 수행하였고, 효소의 활성도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Catalase 활성도} = \frac{\text{시료의 농도(uM)}}{\text{20 분}} \times \text{시료의 희석배율} = \text{nmol/min/ml}$$

6) Glutathione Peroxidase 활성 측정

Glutathione Peroxidase 의 활성도는 Cayman 사의 Glutathione Peroxidase assay kit 를 사용하여 정량하였다. 구체적인 실험방법은 제공된 절차에 따라 수행하였고, 효소의 활성도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{흡광도차 } \Delta A340/\text{min} = \frac{A340(T2) - A340(T1)}{T2 - T1} \qquad \text{T: time (min)}$$

$$\text{Glutathione Peroxidase 활성도} = \frac{\Delta A340/\text{min}}{0.00373\text{uM}-1} \times \frac{0.19\text{ml}}{0.02\text{ml}} \times \text{시료의 희석배율} = \text{nmol/min/ml}$$

여기서, NADPH extinction coefficient (assay) : 0.00373uM-1

3. 통계 처리

본 실험에서 얻어진 측정치는 평균±표준편차로 표시하였다.

실험결과의 분석은 ANOVA를 이용하여 Duncan's multiple range test 에 의해서 사후검정하였으며, * 를 $p<0.05$ 에서, ** 를$p<0.01$ 에서 유의한 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. H_2O_2 로 유발된 독성에 대한 LMK01, 0_2의 신경세포 PC 12의 생존율에 미치는 효과

PC 12 세포주에 대해 H_2O_2를 처리하여 산화적 손상을 유도하고, 다양한 농도의 LMK01 과 LMK02의 보호효과를 확인하기 위하여 세포배양액에 WST-1 시약을 직접 부가하여 세포 생존율을 측정하였다(Fig. 1).

LMK02 5ug/ml 농도에 24시간 동안 처리 결과가 LMK01를 처리한 경우의 세포의 생존율과 유의적인 차이를 보이기 시작했다.

그 이상의 농도에서는 세포생존율에서 완만한 증가의 경향을 보였다(Fig. 1). 농도가 증가할 경우에서도 LMK01과 LMK02 의 생존율의 차이는 유의미했으며, LMK02가 보다 큰 생존율이 유지됐다.

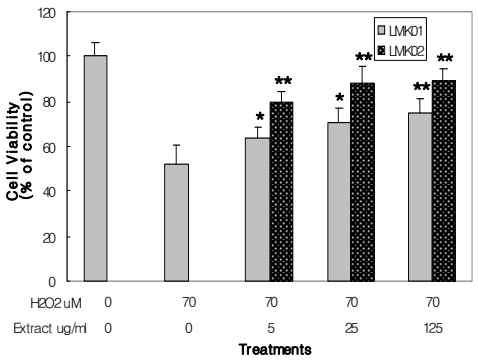


Fig. 1. Cell viability test were performed at 24 hr after treatments with LMK01 and LMK02.

LMK01 and LMK02 prevented in a dose dependent manner H_2O_2-induced cell death from the concentration of 5 ug/ml. Results presented in bar graph are mean±S.D. of three experiments. *$p<0.05$ and **$p<0.01$ when compared with H_2O_2 alone treated cells.

2. H_2O_2 에 의해 유발된 산화적 손상

PC12 세포주에 H_2O_2 를 6시간 처리하여 산화적 손상을 유도하였다.

정상세포의 경우를 100%로 하였으며, LMK01과 LMK02의 비교농도를 25 ug/ml 로

하여 처리하였다.

이 약물의 농도는 세포생존율을 정체상태로 진입하게 하는 농도이다.

각 조건간의 손상정도를 비교하였다(Fig. 2). LMK01과 LMK02 조건에서의 손상된 8-OHdG 량은 각각 134.3±6.5% 와 122.9±9.2% 로서, H_2O_2만 처리한 대조군(147%)와 비교시, LMK01는 유의미적인 산화적 손상 억제를 보여주지 않았으나, LMK02 와 대조군간의 비교 시 산화적 손상 억제에서 통계적인 유의성을 보여주었다. 그러나 LMK02 와 LMK01의 조건 간에는 통계적 유의성을 보이지는 않았다.

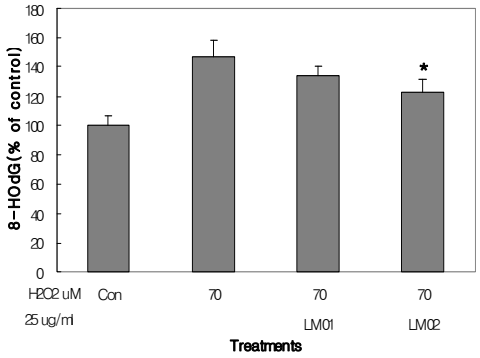


Fig. 2. Inhibitory effects of LMK01 and LMK02 on DNA oxidation(8-OHdG) caused by H_2O_2 treatment in PC12 cells.

Cells were treated with 70 uM of H_2O_2 at 2h after pretreatment of 25 ug/ml of LMK01 and LMK02 and incubated for 6h. All values were compared with control (100%). Data represent the mean ± S.D. (n = 3). Significantly different from the value of H_2O_2 alone treated group (*p < 0.05).

3. Apoptosis 를 통한 세포사망의 변화

세포자사를 통한 세포사망을 확인하기 위해 Hoechst 33342 염색을 시행하였다. H_2O_2를 처리하였을 때 핵의 크기가 작아지는 응축과정과 세포의 진한 염색비율이 정상군(control) 에 비해 크게 증가하여, 손상된 세포들이 세포자사과정을 거치고 있음을 확인하였다.

이 조건에 LMK01과 LMK02 를 25 ug/ml 로 하여 처리하였을 때, 세포핵의 응축과정과 염색정도가 H_2O_2만을 처리한 조건에 비해 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

특히 LMK02에서 세포자사의 특징이 뚜렷히 감소함을 관찰하였다.

이는 H_2O_2 에 의한 신경세포자사가 LMK02에 의해 억제되는 결과와 세포생존율의 결과와 큰 상관관계를 보여주었다.

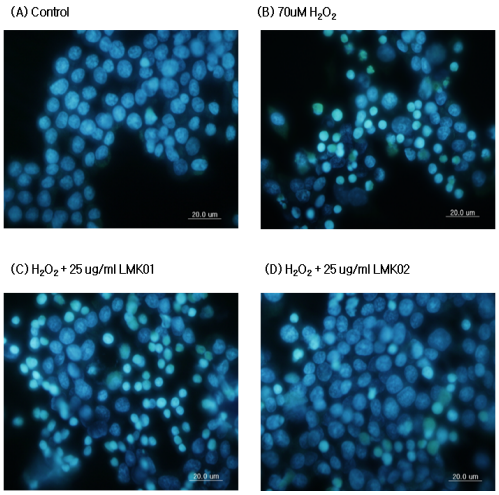


Fig. 3. LMK01 and LMK02 prevented apoptosis induced by H_2O_2 (70uM) in PC 12 cells.

Representative images were taken from the following four experimental conditions. Hoechst 33342 staining to visualize nuclear condensation, observed under the fluorescence microscope (magnification x1000). After exposed to H_2O_2(70 uM) , the PC 12 cells underwent apoptosis. The apoptotic cells demonstrated partially condensed nuclei without fragmentation(deep staining and small size nuclei). LMK01 and LMK02 were added to the medium 2h prior to the H_2O_2 treatment.(A) Control; (B) H_2O_2(70 uM) (C) added LMK01 (25 ug/ml) (D) added LMK02 (25 ug/ml).

4. Catalase 활성 변화

각 조건간의 항산화효소인 catalase의 활성을 측정한 결과, 정상군에 비하여 H_2O_2를 처리한 대조군이 낮게 나타났다.

그러나 LMK01과 LMK02 25 ug/ml를 각각

부가한 조건에서는 catalase의 활성이 대조군에 비해 유의미하게 증가하였으며, 특히, LMK02를 처리한 조건에서, catalase의 활성이 175.6±13.1% 로서 96.0±9.0% 인 LMK01 조건에 비하여 약 2배 정도로 유의미하게 증가하였다.

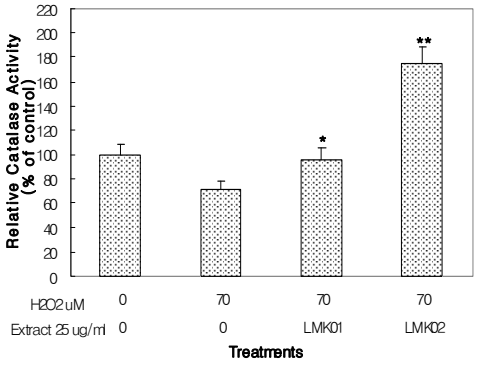


Fig. 4. Effect of LMK01 and LMK02 on catalase activity in H_2O_2-treated PC 12 cells.

Cells were treated with 70uM of H_2O_2 at 2h after pretreatment of 25ug/ml of LMK01 and LMK02 and incubated for 6h. Significantly different from the value of H_2O_2 alone treated group (*p < 0.05 and ** p < 0.01). Values are mean±S.D. (n = 3).

4. Glutathione Peroxidase (GPx) 활성 변화

각 조건간의 glutathione peroxidase 의 활성을 비교 시, 앞에서 언급한 catalase 의 활성변화와 매우 유사한 유형을 보였다.

즉, H_2O_2만을 처리한 대조군은 63.1±7.3% 로서 작은 활성을 보였으나, 같은 조건에 LMK01 과 LMK02 25 ug/ml 를 각각 부가한 조건에서는 활성이 각각 118.9±10.5% 와 194.1±16.8% 로서 glutathione peroxidase 의 활성이 유의미하게 증가하였으며, 더욱이, LMK02 부가조건의 경우에는 LMK01 조건에 비하여도 유의미하게 증가하였다.

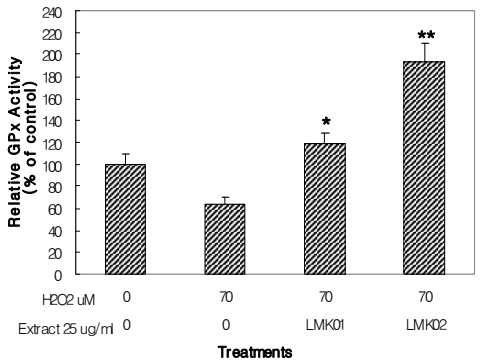


Fig. 5. Effect of LMK01 and LMK02 on glutathione peroxidase (GPx) activity in H_2O_2-treated PC 12 cells.

Cells were treated with 70uM of H_2O_2 at 2h after pretreatment of 25ug/ml of LMK01 and LMK02 and incubated for 6h. Significantly different from the value of H_2O_2 alone treated group (*p < 0.05 and ** p < 0.01). Values are mean±S.D. (n = 3).

Ⅳ. 고 찰

최근 노화를 비롯한 신경퇴행성질환, 심혈관계 질환, 암 등 각종 성인병 질환의 주된 원인이 활성산소에 기인한다는 것이 인정됨에 따라 활성산소를 조절할 수 있는 항산화제의 개발과 연구에 더 많은 과심이 집중되고 있다[15].

Superoxide anion radical, hydroxy radical, singlet oxygen 및 H_2O_2 등의 활성산소는 산화력이 매우 강하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화 스트레스를 유발하게 되며, 이러한 산화 스트레스는 지질과산화를 유도하고 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 암을 비롯한 다양한 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다[16].

H_2O_2와 같은 활성산소종은 단순히 호흡과정에서 생성되는 부산물로 여겨져 왔으나 최근에 이르러 활성산소종은 외부자극에 의하여 세포

막에 존재하는 수용체를 통하여 일시적으로 생성되며, 세포내 활성산소의 증가는 세포의 사멸과 관계가 있으며 특히, glutamate는 세포내 ROS를 형성함으로써 신경세포사멸을 초래하는 것으로 보고되고 있다[17,18].

산화적 손상으로 인한 신경세포의 상해는 활성산소가 신경세포의 주요 구성물질인 지질, 단백질 및 핵산의 산화적 손상을 초래하고 결국 치명적인 세포자사 또는 괴사를 유도한다[19,20]. 특히 이러한 산화적 스트레스는 APP(Amyloid precursor protein)에 의해 H_2O_2를 매개로 하여 신경세포의 세포자사를 야기하고, Aβ로 인한 알츠하이머병과도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다[21].

따라서 한의학 전통약물에서 이러한 항산화 효과를 가진 치료약물을 개발하기위한 연구들이 진행되어왔는데, 특히 기억력저하에 다용하는 壯元丸[22] 원방, 壯元丸去朱砂加靈芝[23] 등이 CT105 및 APP로 처리된 세포주에서 신경세포 보호효과를 확인한 바가 있고 紅蔘, 白茯苓를 가미한 7가지 조성물인 LMK02가 Aβ oligomer에 의해 해마세포주인 H19-7에서 항산화효과를 통한 항치매효과를 보고한 연구가 있다[13]. 하지만, oxidative stress 유발 손상에 대한 壯元丸加減方 즉, LMK01과 LMK02의 항산화효과를 비교 연구한 경우는 보고된 바가 없다.

壯元丸은 龔廷賢이 著術한 『萬病回春』[24]에서 "專補心生血 寧神定志 淸火化痰 臺閣勤政勞心… 幷健忘怔忡不寐 及不善記 而多忘者 服之能日誦千言"이라 처음으로 언급한 처방으로, 『東醫寶鑑』[12]에서는 "建忘 … 宜服壯元丸", "補心生血 寧神定志 且臺閣勤政 勞心燈窓 讀書辛苦 幷健忘怔忡不寐 及不善記而多忘者 服之能日誦千言 胸藏萬卷"이라 하여 이후 醫家들에 의해 활용되어 왔으며 養血安神理脾하는 方으로 心血不足 氣鬱生痰, 脾氣不舒에 활용하는 處方이다. 處方의 구성은 石菖蒲, 遠志, 酸棗仁은 開竅安神하는 작용을 하며, 麥門冬은 補心淸熱하고, 白茯神 栢子仁은 寧心安神하고, 生地黃, 玄蔘은 養陰生津止渴, 龍眼肉, 當歸는 補血和血하며, 人蔘은 補脾益氣 生津 寧神益智한다.

따라서 본 연구에서는 PC 12 세포에 H_2O_2를 처리하여 세포독성을 유도한 후 항산화제 성분을 포함하고 있는 LMK01과 02 수추출물이 세포독성으로부터 신경세포를 보호할 수 있는 지를 확인하기 위해, WST-1 assay 통한 세포생존율, 8-OHdG에 의한 산화 스트레스 손상정도, 그리고 Hoechst 33342 staining assay에 의한 세포자사 억제정도, 항산화효소들인 catalase과 glutathione peroxidase의 활성도를 측정하였다.

H_2O_2를 처리하여 산화적 손상에 의한 세포사망을 유도하고, 여기에 LMK01과 LMK02 처리를 하여 세포자사에 대한 억제효과를 기대했다. 먼저 세포생존율에 대해 LMK01과 LMK02 각 조건의 효과를 평가했을 때, LMK01에 비하여 LMK02의 세포생존율 향상효과가 뚜렷이 크게 나타났다. 이는 7가지로 구성된 LMK02가 壯元丸에서 가감한 특정약재가 세포자사 억제에 더 많은 기여한 것으로 사료되어, 이에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

세포내 산화 스트레스의 정도를 평가하기 위해서, 현재 사용되는 여러 표지자 중에서 8-OHdG를 표지자로 사용하였다. 산화적 손상 과정에서 자유라디칼이 많이 발생하고, 이들이 세포의 여러 생체분자를 손상시킨다고 알려져 있다. 이중에서 DNA의 손상은 세포의 생존에 직결됨으로, 이 지표의 의미는 매우 크다 하겠다. H_2O_2만 처리한 대조군(147%)과 비교시 LMK01는 산화적 손상이 감소하는 경향을 보였으나 통계학적으로 유의적이지는 않았다. 그러나 LMK02 조건(123%)은 H_2O_2만 처리한 대조군(147%)에서 통계적인 유의성을 보여주었다. 이 의미는 아마도 LMK02 내에 포함된 특정약물에 의한 항산화효과가 더 크게 기여하는 것으

로 판단된다. 그런데, 산화적 손상억제는 세포의 정상적인 기능을 유지시키는데 기여하는 바가 크므로, LMK02 조건의 세포생존율이 높은 이유도 큰 항산화력에 있는 것으로 판단된다 (Fig. 1).

다음으로는, 세포사망의 유형에 대한 분석을 실시하였다. 광학현미경에 의한 세포변화를 관찰시세포자사 유형이 관찰되었으므로, 세포자사를 확인하기 위해 Hoechst 33342 염색을 실시하였다. LMK02 조건에서 세포핵 응축이 억제되었고, 염색되는 정도도 크게 감소하여, LMK02 조건이 세포자사를 가장 강하게 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이 결과로부터 LMK02 조건은 우수한 항산화효과 뿐 아니라 세포자사 경로를 보다 효과적으로 억제시킬 가능성도 예상된다.

다음으로는, 세포내의 항산화 시스템들 중에서 항산화 작용에 주요한 기여를 하는 효소들인 catalase와 glutathione peroxidase의 활성을 평가하였다.

각 조건들을 분석하여 비교하였을 때, catalase 와 glutathione peroxidase 의 활성은 유사한 경향을 보였다. 이들 조건들 중에서 LMK02 조건이 두 효소의 활성을 가장 크게 높였다. 이 결과들은 산화적 손상에 대한 결과들 (Fig. 2)과 상관관계를 보여주었다. 즉, LMK01과 LMK02 조건에 의하여 항산화 역할에 참여한 효소들의 활성이 증대됨에 따라 ROS(reactive oxygen species)들에 대한 처리능력이 향상되어, 산화적 손상을 억제할 수 있게 되었음이 본 연구를 통해 명확히 규명되었다. 물론 LMK01과 LMK02 조건 각각에 포함된 사포닌계열의 항산화성분들 자체가 산화적 손상을 억제하는데 부분적 기여했음은 충분히 생각할 수 있다.

이상의 결과에서와 같이, 壯元丸加減方 *(Gagam-Jangwon-hwan)*인 LMK01과 LMK02의 水抽出物이 H_2O_2 유도된 PC-12 신경세포주에서 세포생존율을 증가시키고, 세포내 산화적 스트레스 정도와 세포자사를 억제하며, 항산화 작용에 기여하는 catalase와 glutathione peroxidase의 활성을 증가시키는 것으로 나타났고, 특히 장원환거주사인 LMK01보다 LMK02 처방에서 보다 나은 효과가 있는 것으로 나타나, 추후 가감약물에 대한 비교실험을 통해 보다 유효한 약물탐색이 뒤따라야할 것으로 사료된다.

V. 결 론

신경세포주 PC-12세포주에 H_2O_2 처리에 의한 신경세포 손상 및 사멸에 대해 壯元丸加減方 *(Gagam-Jangwon-hwan)*인 LMK01과 LMK02의 水抽出物을 처리하였는 바, 신경세포 손상 및 사멸에 대한 보호기능은 항산화 효능을 통해 이루어짐을 규명하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. H_2O_2에 의한 세포독성에 의한 세포생존율 감소를 LMK01과 02는 유의성있게 회복시켰고, 특히, 농도가 증가할수록 LMK02가 LMK01보다 큰 생존율을 유지했다.

2. 세포내 산화적 스트레스 정도를 8-OHdG로 평가한 결과, LMK01, 02 간의 유의한 차이는 나타나지 않았으나 LMK02는 대조군에 비해 유의미한 산화적 손상 억제를 보여주었다.

3. LMK01과 02는 H_2O_2에 의해 발생하는 세포자사(apoptpsis)를 효과적으로 억제시켰고, 특히, 세포자사의 특징이 LMK02에 의해 더

뚜렷이 감소되었다.

4. LMK01과 02는 항산화 효소인 catalase와 glutathione peroxidase의 활성을 증가시켰고, 특히, LMK02가 LMK01에 비해 더 유의미하게 증가하였다.

이와 같이 본 연구는 LMK01과 LMK02가 H_2O_2 유도에 의한 PC 12 신경세포주의 손상과 자사를 효과적으로 억제하고, 항산화효소들의 활성을 크게 높이는 것을 밝혔다. 따라서 산화스트레스가 주요원인으로 밝혀진 치매 등과 같은 신경퇴행성질환에 임상적 활용시 유용할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임.(과제고유번호 : B070030)

참 고 문 헌

1. 김안근, 차은정. 산화적 스트레스상태에서 B16F10 Murine Melanoma 세포의 항산화효소 활성에 대한 흑축 추출물의 효과. 대한약학회지. 2004;48(1):93-8.
2. Branen, A. S. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. Journal of the American Oil Chemists' Society. 1975;52(2):59-63.
3. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000;408:239-47.
4. PF Good, P Werner, A Hsu, CW Olanow, DP Perl. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. Am. J. Patho. 1996:149,21-28.
5. Smith, Mark A. Hirai, Keisuke. Hsiao, Karen. Pappolla, Miguel A. Harris, Peggy L. R. Siedlak, Sandra L. Tabaton, Massimo. Perry, George. Amyloid-[beta] Deposition in Alzheimer Transgenic Mice Is Associated with Oxidative Stress. Journal of Neurochemistry. 1998;70(5):2212-5.
6. 윤미영, 김주영, 황지환, 차미란, 이미라, 조경진, 박해룡. 석곡 MeOH 추출물이 H2O2에 의한 신경세포 보호효과에 미치는 영향. 한국응용생명화학회. 2007;50(1):63-7.
7. 성금수, 전철, 권용훈, 김경현, 장재철. 홍삼추출물 투여가 생쥐간에서 항산화 효소 활성과 지질과산화에 미치는 효과. 고려인삼학회지. 2000;24(1):29-34.
8. 강우석, 김정한, 박은주, 윤광로. 울금 에탄올 추출물의 항산화 활성 비교. 한국식품과학회지. 1998;30(2):266-71.
9. 강형원, 박진성, 유영수. 釣鉤藤이 산소자유기에 의하여 손상된 培養脊髓感覺神經節細胞에 미치는 영향에 관한 연구. 동의신경정신과학회지. 2000;11(1):1-18.
10. 박종운, 한상혁, 김도환, 문병순. H2O2에 의한 배양심근세포고사에 미치는 四物湯의 방어효과. 대한한의학회지. 2001;22(4):58-68.
11. 임준모. 이민구, 윤종민, 이인, 문병순. 산화적 손상에 의한 Neuro 2A 치매모델에서 石菖蒲遠志散의 방어효과. 대한한의학회지. 2005;26(1):161-73.
12 許俊. 東醫寶鑑. 서울:法仁文化社. 1999:189-91.
13. 강형원, 김상태, 손형진, 한평림, 조형권, 이

영재, 류영수. LMK02의 품질규격화와 Aβ 올리고머에 의해 유도된 흰쥐해마 H19-7세포주에 미치는 항치매효과. 동의생리병리학회지. 2009;23(2):397-404.
14. 김상태, 강형원, 한평림, 조형권, 김태헌, 류영수, 손형진. 壯元丸加減方인 LMK02가 아밀로이드 前驅蛋白質으로 形質轉換된 초파리에 미치는 효과. 동의신경정신과학회지. 2008;19(2):151-63.
15. Ames BN. Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(17):7915-22.
16. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. Science. 1983;221:1256-64.
17. MF Beal. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. The FASEB J. 1992;6:3338-44.
18. Choi DW. Excitotoxic cell death. J. Neurobiol. 1992;23:1261-76 .
19. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress. glutamete. and neurodegenerative disoders. Science. 1993;262:689-95.
20. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. Free Radic Biol Med. 1997;23:134-47.
21. Schippling S, Kontush A, Arlt S, Buhmann C, Sturenbug HJ, Mann U, Muller-Thomsen T, Beisiegel U. Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. Free Radic Biol Med. 2000;28:351-60.
22. 김건진, 정대규. 장원단이 CT105와 Aβ로 유발된 치매병태모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2006;17(2):91-122.
23. 강형원, 김상태, 이종화, 김태헌, 손형진, 한평림, 류영수. 壯元丸加減方 水抽出物이 아밀로이드 전구단백질으로 유도된 생쥐의 신경아세포주에서의 항치매 효과. 동의신경정신과학회지. 2007;18(2):13-24.
24. 龔廷賢. 增補萬病回春. 서울:一中社. 1994:229-30.