

H₂O₂로 유발된 Neuro2A 신경세포고사에 대한 줄풀의 억제 효과

박원형 · 차윤엽*

상지대학교 한의과대학 한방재활의학과

Inhibition Effect of *Zizania latifolia* on Apoptosis Induced by H₂O₂ in Neuro2A Cell

Won Hyung Park, Yun Yeop Cha*

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, Collage of Oriental Medicine, Sangji University

The purpose of this study was to examine the inhibition effect of *Zizania latifolia* that has been used heart disease, Diabetes Mellitus and Skin disease for a long time on apoptosis induced by H₂O₂ in Neuro2A cell. Neuro2A cells were cultivated in RPMI(GibcoBRL) with 5% FBS and treated with H₂O₂ and *Zizania latifolia*. We measured the cell viability and analyzed DNA fragmentation. Activity of PARP, Cytochrome C, caspase-9, caspase-3, p53, p21, Bax and Bcl-2 in the cell was examined by using western blot. The cell viability in *Zizania latifolia* treatment (60ug/ml<) decreased significantly compared with that of none treatment. (P<0.001) *Zizania latifolia* increased cell viability about twice as much as that being injury by H₂O₂. (*Zizania Latifolia* 20ug/ml, H₂O₂ 200uM, P<0.001) DNA fragmentation developed by H₂O₂, but was not developed in *Zizania latifolia* treatment. PARP, Cytochrome C, caspase-9 and caspase-3 activated all by H₂O₂ but were not activated in *Zizania latifolia* treatment.. P53, P21 and Bax activated by H₂O₂, and Bcl-2 got into inactivation. But the opposite results appeared in *Zizania latifolia* treatment. In conclusion, these results suggest that *Zizania latifolia* inhibit the development of DNA fragmentation and apoptosis by H₂O₂ and the antioxidant action of *Zizania latifolia* is effective. More researches about effect of *Zizania latifolia* are considered to need.

Key words : *Zizania latifolia*, H₂O₂, Neuro2A cell, Apoptosis

서 론

인체 내의 각 장기와 조직 및 세포는 에너지를 공급받기 위해 끊임없이 산화작용이 일어나는데 이 과정 중에 상당량의 유리가 생성되며 이것은 생체내의 제거기작에 의하여 대부분이 소멸되나 생성과 소멸의 균형이 깨어질 때 생체 내에서 각종 질환이 일어난다^{1,2)}. 인체의 신진대사 과정 중 부산물로 생성되는 활성산소(Oxygen free radicals) 중에서 H₂O₂(Hydrogen peroxide)는 O₂(superoxide), OH(hydroxy radical) 등을 포함하는 활성 산소종(reactive oxygen species)의 하나로 심혈관계나 노화 등 각종 질환의 발병인자로 인식되고 있다^{3,4)}. 이런 활성 산소종으로부터

자신을 보호하기 위하여 인체는 유해산소제거효소(SOD), 카탈라아제(CAT) 등의 방어 시스템에 의하여 활성 산소 소거 기능을 하며 이들 항산화효소들은 O₂, H₂O₂ 그리고 OH 등의 독성을 해소 또는 약화시킴으로써 그 기능을 나타낸다. 또한 황록색 식물의 섭취를 통해 식물체내 다양한 항산화 물질이 활성 산소종을 소거 또는 발생을 억제시키거나 생성물로서의 연쇄반응을 차단하는 역할을 한다^{5,6)}. 최근에는 이런 황록색 식물뿐만 아니라 한약 또는 한약재를 이용한 정⁷⁾, 김⁸⁾ 등의 항산화제 개발 및 연구가 진행되고 있으며 항산화제와 노화를 연계하여 심혈관계 질환 및 항암 관련 논문이 많이 보고되고 있다.

본 연구에 사용된 줄풀(*Zizania latifolia*)은 물가에 나는 여러해살이 풀로서⁹⁾ 한의학에서는 그 뿌리를 菰根, 열매를 菰米라 하여 消滯이나 利尿劑로 사용하였으며¹⁰⁾ 민간에서는 고혈압, 관절염, 변비, 피부병 등에 이용하거나¹¹⁾ 흉년이 들었을 때 식량으로 쓰기도 하였다⁹⁾.

* 교신저자 : 차윤엽, 강원도 원주시 우산동 660 상지대학교 부속한방병원

· E-mail : omdcha@sangji.ac.kr, · Tel : 033-741-9260

· 접수 : 2005/05/27 · 수정 : 2005/06/30 · 채택 : 2005/07/18

이에 저자는 노화 및 각종 질환의 발병인자로 인식되는 H₂O₂를 Neuro2A 신경 세포에 투여하여 산화적 손상을 유도하고 줄풀 뿌리 추출물을 처리한 후 세포생존율, DNA fragmentation 및 세포고사에 관련된 PARP, Cytochrome C, caspase-3, caspase-9 및 p53, p21, Bax, Bcl-2를 western blot을 통한 활성분석을 하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 줄풀(*Zizania latifolia*)은 경기도 가평군 청평호 일대에서 직접 채취한 것이다. 5월에 채취한 줄풀 뿌리를 바람이 잘 통하는 그늘에서 2주 동안 건조하여 사용하였다.

2. 줄풀 추출물

줄풀의 뿌리 부분 20g을 증류수 100ml에 넣고 끓인 후 식물물 부분만 여과시켜 -50℃에서 얼려 cryostate 상태로 건조시킨 후 PBS에 녹여 사용하였다.

3. Neuro2A 신경세포주 배양

Neuro2A 신경세포주를 한국세포주은행에서 구입하여 RPMI (GibcoBRL)에 5% FBS와 Fungizone을 첨가하여 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다.

4. 줄풀의 농도에 따른 Neuro2A 세포생존율 측정

24-well culture plate에 각 well 당 2×10⁵ cells를 넣어 배양한 후 줄풀 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 더 배양하였다. 24시간이 지난 후 세포배양액을 제거하고 PBS로 두 번 washing 한 후 0.5% crystal violet(in 20% methanol)을 300μl/well로 첨가하여 상온에서 5분간 방치한 다음 tap water로 재빨리 세척한 후 건조시켰다. 다음 1% SDS를 100μl 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 570nm (reference 450nm)에서 흡광도를 측정하였다. 전 과정을 각각 4회 반복하였다.

5. H₂O₂ 처리물과 H₂O₂ 처리물에 줄풀 추출물을 첨가한 후의 세포생존율 측정

4번 실험에서 줄풀 추출물 처리 시 줄풀 대신 H₂O₂ 200uM 처리를 한 것과 H₂O₂ 200uM에 줄풀 5ug/ml와 20ug/ml를 각각 첨가 처리한 후 10시간 배양 후 똑같은 방법으로 흡광도를 측정하였다. 각각 4회 반복하였다.

6. 세포고사 확인을 위한 DNA fragmentation 분석

처리한 배양세포를 얼음으로 차게 한 PBS로 한번 세척한 후 세포 침전물을 700μl의 lysis buffer (20mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, 0.5 % Triton X-100)로 현탁시키고, 얼음에서 45분간 항온 시키면서 가끔씩 침전된 세포를 현탁시켜 세포의 lysis를 용이하게 하였다. 파쇄된 세포를 4℃에서 13,000 x g로 20분간 원심분리하여 세포질 부분을 회수하였다. 이 세포질 용액을

phenol/chloroform으로 두 번 extraction하여 단백질을 제거하고 세포질내로 유출된 DNA와 RNA를 sodium acetate/isopropanol로 침전시켰다. 침전된 핵산을 40μl의 TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA)로 용해시키고, 200μg/ml의 농도가 되게 DNase-free RNase를 넣고 37℃에서 1시간 항온시켰다. RNA가 제거된 DNA 용액을 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, DNA를 ethidium bromide로 염색한 후 UV light하에서 사진을 찍어 가시화하였다.

7. Western blot을 이용한 PARP, Cytochrome C, caspase-3, caspase-9 및 p53, p21, Bax, Bcl-2의 활성분석

1) 단백질 추출

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1×10⁷의 세포 당 lysis buffer (10 mM Tris · HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% SDS) 100μl로 현탁시켜 얼음 위에서 한 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. 14,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겨 다음 실험을 수행하였다.

2) 단백질 농도 측정

단백질 정량은 Bicinchoninic Acid(BCA, Sigma, USA) 용액을 이용하여 bovine serum albumin(BSA, Sigma, USA)을 표준 곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA(1μg/μl)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, 16μg/μl에 BCA 용액 100μl를 첨가하여 20분간 37℃에서 방치한 다음 흡광도 540 nm에서 측정하여 표준 곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2μl와 BCA 용액 100μl를 섞은 뒤 20분간 37℃에서 방치한 후 540nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

3) 전기영동 및 Western blot

추출한 단백질 100μg을 Cytochrome C, caspase-9, 3와 p53, p21, Bax, Bcl-2 및 actin을 확인하기 위하여 15% SDS-polyacrylamide gel에, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 10% SDS-poly acrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% milk을 함유한 PBS-Tween (0.01%)에서 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. 이 membrane을 PARP (PharMingen, USA), Cytochrome C (PharMingen, USA), caspase-9 (PharMingen, USA), caspase-3 (PharMingen, USA), p53 (Santa Cruz, USA), p21 (Santa Cruz, USA), Bax (Santa Cruz, USA), Bcl-2 (Santa Cruz, USA), Actin (Santa Cruz, USA)의 항체를 사용하여 1시간동안 상온에서 shaking하면서 hybridization 시키고 난 후 PBS-Tween 20으로 세척하고, membrane을 horse -radish peroxidase로 conjugated 된 antimouse IgG 또는 antirabbit IgG로 다시 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. Membrane을 PBS-Tween으로 네 번 세척한 후 chemiluminescence 시약(DuPont, NEM)으로 반응시킨 후 Fuji X-ray film으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

8. 통계분석을 통한 유의성 검정

모든 결과는 대조군의 평균값을 100%로 환산한 기준으로 평균값±표준편차로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학

적 유의성 검정은 one-way ANOVA 검정을 적용하였으며, P 값이 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 줄풀의 농도에 따른 Neuro2A 신경세포생존율

줄풀의 농도에 따른 Neuro2A 신경세포의 생존율을 알아보기 위하여 용량 의존적으로 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 줄풀 추출물 40ug/ml 이하에서는 약 90% 이상의 생존율을 보이나 60ug/ml에서는 약 64%, 80ug/ml에서는 약 36%의 생존율을 보여($P < 0.001$) 60ug/ml 이상의 농도에서 줄풀에 의한 Neuro2A 신경세포 상해작용이 있었다(Fig. 1).

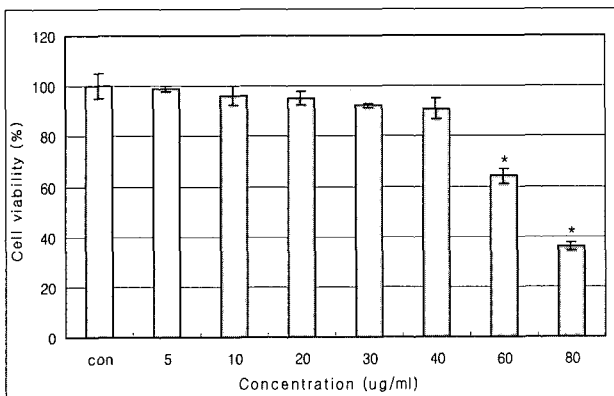


Fig. 1. Effect of Zizania latifolia on cell viability in Neuro2A cell were RPMI(GibcoBRL) with 5% FBS for 24 hours after initial time of Zizania latifolia treatment. * $p < 0.001$ compared with control

2. H₂O₂로 유발된 세포 상해에 대한 줄풀 추출물의 보호효과

Neuro2A 신경 세포에 H₂O₂ 200uM을 처리 한 후 10시간이 경과하면 37.34±2.54%의 세포생존율을 보여 약 60%이상의 세포 독성을 관찰할 수 있었다. ($P < 0.001$) 줄풀 5ug/ml와 20ug/ml 를 H₂O₂ 200uM과 동시에 처리하였을 경우, 줄풀의 농도가 5ug/ml에서는 59.51±0.49%, 20ug/ml 에서는 74.68±0.78%의 생존율을 각각 나타내어($P < 0.001$) H₂O₂ 200uM 처리군 대비 약 1.59배, 2배의 세포생존율 증가를 보였다(Fig. 2).

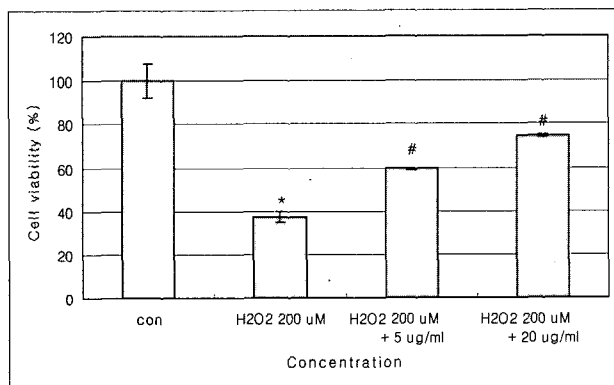


Fig. 2. The protective effects of Zizania latifolia on injury induced by H₂O₂. Cell were treated for 10 hours with Zizania latifolia (5ug/ml, 20ug/ml) and H₂O₂ 200uM. * $p < 0.001$ compared with control. # $p < 0.001$ compared with H₂O₂ 200uM

3. H₂O₂ 및 줄풀 추출물 첨가에 의한 DNA fragmentation

H₂O₂에 의한 세포고사를 확인하기 위하여 DNA fragmentation 현상을 조사하였다. H₂O₂ 200uM을 처리했을 DNA fragmentation이 일어났으나 줄풀을 첨가하여 처리한 경우는 5ug/ml, 20ug/ml 각각의 경우 모두 DNA fragmentation 현상이 억제되었다(Fig. 3).

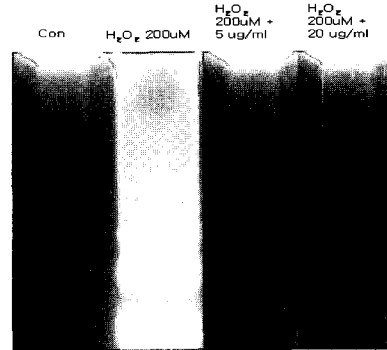


Fig. 3. Analysis of DNA fragmentation in the Neuro2A cell after H₂O₂ 200uM, H₂O₂ 200uM and Zizania latifolia 5ug/ml, H₂O₂ 200uM and Zizania latifolia 20ug/ml treatment. DNA fragmentation increase in H₂O₂ 200uM treatment.

4. H₂O₂ 및 줄풀 추출물 첨가에 의한 PARP, Cytochrome C, caspase-3, caspase-9의 활성화분석

DNA fragmentation 현상이 일어나기 위해서는 세포고사 과정에서 PARP, Cytochrome C, caspase-9 및 caspase-3가 활성화된다. H₂O₂ 200uM을 처리한 경우 모두 활성화가 일어났으나 줄풀을 처리한 경우는 5ug/ml, 20ug/ml 각각의 경우 모두 활성화가 억제되었다(Fig. 4).

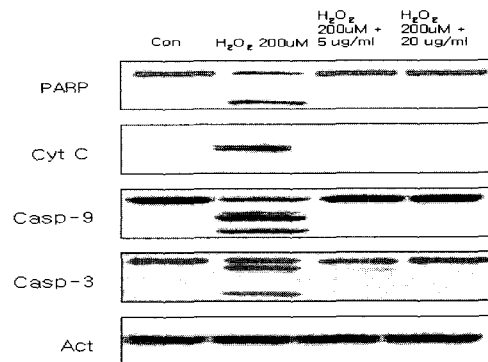


Fig. 4. Western blot analysis of PARP, Cytochrome C, caspase-9 and caspase-3 in the Neuro2A cell after H₂O₂ 200uM, H₂O₂ 200uM and Zizania latifolia 5ug/ml, H₂O₂ 200uM and Zizania latifolia 20ug/ml treatment. Actin was used as a loading control.

5. H₂O₂ 및 줄풀 추출물 첨가에 의한 p53, p21, Bax, Bcl-2의 활성화 분석

세포고사 과정에서 p53, p21, Bax는 활성화 되며 Bcl-2는 활성이 억제된다. H₂O₂ 200uM을 처리한 경우 p53, p21, Bax는 활성화되고 Bcl-2는 활성이 억제되었으나 줄풀을 처리한 경우는 5ug/ml, 20ug/ml 각각의 경우 모두 p53, p21, Bax는 활성화가 억제, Bcl-2는 활성화가 일어났다(Fig. 5).

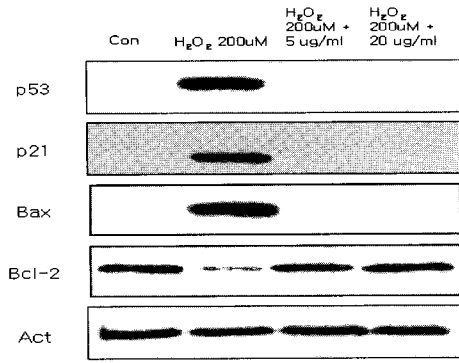


Fig. 5. Western blot analysis of p53, p21, Bax and Bcl-2 in the Neuro2A cell after H₂O₂ 200uM, H₂O₂ 200uM and Zizania latifolia 5ug/ml, H₂O₂ 200uM and Zizania latifolia 20ug/ml treatment. Actin was used as a loading control.

고찰

노화는 생명체의 성장과 동시에 진행되는 피할 수 없는 생화학적 반응으로 주요 원인으로는 DNA설, 내분비설, 화학반응설, 면역설 등이 있으나 가장 널리 알려지고 또한 각광을 받는 이론은 유리기(Free radical)에 의한 노화 촉진설이다^{12,13}. 최근에는 Free radical에 의한 지질과 단백질 및 DNA의 산화적 손상이 노화현상과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다¹⁴. 세포막에 있는 다중불포화 지방산은 free radical의 연쇄반응에 의해 쉽게 산화되는데, 이러한 지질의 과산화는 O₂⁻(superoxide anion)와 OH(hydroxyl radical) 같은 free radical이나 1O₂(singlet oxygen)에 의해 일어난다. 그 중 superoxide anion, hydroxyl radical 등의 반응성이 큰 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS)은 DNA와 반응하여 이를 손상시켜 압과 돌연변이를 유발하고, 지질과산화물을 일으켜 세포의 노화를 촉진하는 동시에 유해물질을 생성시키고 염증을 촉진하는 등 여러 가지 질병의 원인이 된다^{15,16}.

한편 활성 산소종은 세포고사(Apoptosis)의 과정에서 중요한 요소로 작용되어 지는데¹⁷ 세포고사란 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상인 계획된 세포죽음을 말한다¹⁸. 일반적으로 세포 고사 기전은 caspase라 불리는 단백질 분해 효소에 의해 세포 내 단백질이 분해되면서 신호가 전달되는데, 자극에 의해 미토콘드리아 막에 존재하는 Cytochrom C가 세포질 밖으로 방출되어 Apaf-1, caspase-9, dATP와 결합하여 caspase-9를 활성화시키고 이렇게 활성화된 caspase-9는 caspase-3를 활성화시켜 세포고사를 유도하는 것으로 보고되고 있다¹⁹. 최종적으로 활성화된 caspase-3는 poly (ADP-ribose) polymerase(PARP)를 활성화시켜 DNA fragmentation과 핵의 응축을 유도하면서 세포고사를 일으키는 것으로 알려져 있다²⁰. 이 외에 종양억제 유전자로 알려진 p53이나 p21, Bax 그리고 Bcl-2와 같은 유전자가 세포고사와 연관성을 가지고 있다. p53은 종양억제유전자 중의 하나로 세포분화 과정 중 손상 받은 DNA를 세포주기의 하나인 G1기에서 치유하여 정상세포로 만든 후에 S기로 넘어가게 하는데 만약 치유가 되지 않으면 능동적 사망기전인 세포고사(apoptosis)라는 과정을 거쳐 손상된 DNA가 증식되지 않도록 미리 제거하는 기능을 한다. 그리고 이 과정에서

p21 단백질이 관여하는데 p53에 의해 활성화된 p21 단백질이 cdk2-cyclin E, cdk4- cyclinD 복합체와 결합하여 이를 불활성화시켜 세포주기가 G1에서 S기로 넘어가는 것을 막는다고 한다^{21,22}. p21 유전자는 세포가 독성 물질(toxins)이나 방사선(radiation) 등에 의해 손상을 입을 경우 세포의 성장을 중단시키는 일종의 제동 장치 역할을 하는 유전자에 해당하며, 그 작용으로 손상을 입은 세포가 정상 상태로 복구 될 수 있는 시간적 여유를 확보하게 되는 것이다²³. Bcl-2와 Bax는 모두 Bcl-2 family에 속하는 유전자로 Bcl-2는 세포고사시 발생하는 Cytochrom C의 세포질 방출을 억제하여 세포의 수명을 연장시키고 세포의 자연사를 억제하며²⁴, Bax는 Bcl-2와 heterodimer를 형성하고 있어 상호간에 서로의 기능을 억제하는데, Bax가 Bcl-2로부터 분리되면 직접적 혹은 Bcl-2의 다른 작용기전을 억제하는 간접적인 경로로 세포고사를 촉진하는 것으로 알려져 있다²⁵.

줄풀은 못이나 도랑, 강가의 얇은 물속에서 무리지어 자라는 벼과에 속하는 여러해살이 풀이다. 크기가 크며 굵은 뿌리줄기가 땅속을 뻗으며²⁶, 한 자리에서 여러 대의 굵은 줄기가 곧게 서서 높이가 2m에 달하며 몸집은 밋밋하고 푸르다. 길이가 1m, 너비가 2~3cm 정도 되는 길고 뾰뾰한 잎이 줄기와 평행해서 곧게 서며 좁은 피침꼴이며, 6월에서 8월 사이에 보라빛의 푸른 꽃이 줄기 끝에서 30~50cm의 크기로 핀다. 우리나라에서는 황해도와 강원도 이남의 지역과 제주도에 분포한다⁹.

《中藥大辭典》¹⁰에서는 줄풀을 菘, 蔞草, 菘蔞草 등으로 부르며 뿌리줄기 및 뿌리, 열매를 약용으로 쓴다고 하였다. 그 뿌리줄기 및 뿌리를 菘根 또는 菘蔞根이라고 하며 《本草綱目》²⁷에는 “甘, 大寒, 無毒. 腸胃痼熱, 消渴, 止小便利. 搗汁飲之. 燒灰, 和鷄子白, 塗火燒瘡. 小兒風瘡, 毒蛇傷嘴”, 《東醫寶鑑》²⁸에서는 “性大寒味甘無毒. 主腸胃痼熱, 止消渴, 除目黃, 利大小便, 主熱痢, 療酒渣面赤, 然滑中, 不可多食”, 《醫學入門》²⁹에는 “味甘, 大寒. 無毒. 主腸胃痼熱煩渴, 止小便利, 去胸中浮熱風, 利五臟邪氣, 酒齧面赤, 白癩, 瘰癧大瘡, 除目黃, 止熱痢”이라하여 그 맛이 달고性は 차가워 消渴과 解毒, 黃疸 및 利尿劑 등으로 사용하였다. 그 외 湯火傷으로 瘡이 되지 않은 경우나 독사에게 물렸을 경우 菘根을 태운 재를 사용하여 바르거나 붓하기도 하였고 暑熱로 인한 腹痛에 달여서 먹기도 하였다¹⁰. 《本草衍義》³⁰에서는 “彼人收之, 合粟爲粥, 食之甚濟饑”이라 하여 구황식품으로 이용하기도 하였다. 또한 줄의 열매를 菘米라 하는데 그 효능은 菘根과 비슷하여 心臟病, 利尿, 갈증해소 등에 사용한다고 하였고⁹ 서양에서는 줄풀 열매를 Wild Rice, 곧 야생쌀이라 부른다³¹. 全草 또한 같은 목적으로 사용되며 잎과 열매 모두 단백질, 지방유, 회분 등을 함유하고 있다³².

이외에 류마티스 관절염, 고혈압, 변비 그리고 당뇨에 줄풀을 가루내어 만든 줄풀산이나 달인 물인 줄풀탕 등으로 치료한 예가 있으며¹¹ 줄풀의 뿌리가 오염된 물을 정화시키는 것에 착안하여 농약중독이나 식중독, 화학약품 중독 같은 갖가지 중독에 줄풀 뿌리를 달이거나 생즙으로 마셔 효과를 보았다고 한다. 그리고 면역력 증진을 위해 줄풀을 차로 끓여 늘 마시면 노화를 막고 젊음을 유지할 수 있다고 하였다³¹. 하지만 이러한 줄풀의 효

능과 기능이 단지 古書나 경험에서만 인식되어 왔고 기존의 연구 또한 수생식물로서의 기능인 수중 정화^{33,34)}나 줄풀 유전자 이입으로 인한 싹에 있어서의 DNA 전사 변이³⁵⁾ 등에만 초점을 두어 이루어져 왔다. 그러나 같은 벼과에 속하는 야생벼에 대한 항산화 실험³⁶⁾에 의하면 야생벼 대부분이 항산화 효과가 있음을 알 수 있는데 이에 저자는 줄풀 또한 비슷한 효과가 있을 것이라 생각하여 줄풀 기능성 연구의 일환으로 Neuro2A 신경세포에 대한 항산화효과 및 산화로 발생된 세포고사에 대한 줄풀(뿌리)의 억제기능을 살펴보았다.

먼저 Neuro2A 신경세포에 대한 줄풀의 독성을 알아보기 위하여 5ug/ml에서 80ug/ml까지 다양한 농도의 줄풀 추출물을 신경세포에 처리하여 그 생존율을 알아보았다. 줄풀을 처리하지 않은 대조군의 생존율 100%를 기준으로 40ug/ml 이하에서는 약 90% 이상의 생존율을 보이나 60ug/ml 이상에서는 약 64% 이하의 유의성 있는 생존율 감소를 보여 60ug/ml 이상에서는 줄풀 자체도 신경세포에 대한 독성이 있음을 알 수 있다(Fig. 1). 그리하여 본 실험에서는 비교적 독성이 없는 5ug/ml와 20ug/ml 농도로 실험을 진행하였다. 항산화 효과를 알아보기 위하여 활성산소종의 하나인 H₂O₂를 이용하였는데, H₂O₂(Hydrogen peroxide)는 O₂⁻(superoxide), OH[·] (hydroxy radical) 등을 포함하며 심혈관계나 노화 등 각종 질환의 발병인자로 인식되고 있으며³⁴⁾, 기존의 항산화 관련 논문 중에서 박³⁷⁾, 안³⁸⁾ 등이 H₂O₂를 이용하여 세포에 대한 항산화 효과 및 세포고사에 대한 실험을 하였다. 본 실험에서도 H₂O₂를 산화제로 이용하여 신경세포에 대한 상해를 일으켰으며, 상해된 세포에 줄풀을 농도별(5ug/ml, 20ug/ml)로 처리하여 생존율을 살펴보았다. 그 결과 H₂O₂ 200uM로 인해 감소된 세포생존율(37.34±2.54%)이 H₂O₂ 200uM와 줄풀 5ug/ml, 20ug/ml을 같이 처리했을 경우 각각 59.51±0.49%, 74.68±0.78%의 생존율을 나타내어 약 1.59배, 2배의 유의성 있는 생존율 증가를 보였다(Fig. 2). 그 외에도 H₂O₂로 유발된 세포고사에 대한 줄풀의 억제효과를 알아보기 위해 DNA fragmentation 및 세포고사와 관련된 단백질 및 유전자 검사를 실시하였다. H₂O₂ 200uM로 DNA fragmentation이 일어나면서 UV light하에서 찍은 사진 필름 상에서 절편화된 사다리꼴의 형태가 나타났으나, 줄풀을 동시에 처리한 것에는 5ug/ml, 20ug/ml 모두 DNA 분절화가 일어나지 않음을 알 수 있다(Fig. 3). 그리고 여러 단백질 혼합물로부터 특정 단백질의 존재여부를 밝혀내는 western blot을 이용하여 세포고사시 활성화되는 효소 및 단백질을 분석하였다. 자극에 의해 미토콘드리아 막에서 세포질로 유출되는 Cytochrome C와 단백질 분해 효소인 caspase-9, caspase-3 그리고 세포고사 최종 단계인 PARP가 H₂O₂ 200uM에 의해 모두 활성화 되었으나 줄풀을 첨가 처리한 것에는 활성화가 일어나지 않았다(Fig. 4). 그 외 세포고사와 관련된 p53, p21, Bax 유전자도 H₂O₂ 200uM 단독 처리시 활성화가 야기되었으며 억제작용기전에 속하는 Bcl-2는 억제되었다(Fig. 5). 줄풀 첨가 처리한 경우는 반대의 현상을 보여 결과적으로 H₂O₂에 의한 세포고사가 줄풀에 의해 억제됨을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 줄풀 추출물이 H₂O₂에 의해 유발된 신경세

포고사를 억제하여 산화손상에 대한 세포 보호 기능이 있음을 알 수 있으며, 이는 줄풀이 항산화제로서의 역할을 할 수 있다고 사료된다. 앞으로 줄풀의 성분 분석 및 각종 질병에 대한 유효성 검사를 통해 약재 및 항산화제로 응용 할 수 있는 추가적인 실험 및 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

H₂O₂로 유발된 Neuro2A 신경세포 상해에 대한 줄풀 추출물(뿌리)의 보호효과를 알아보기 위해 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

줄풀의 농도에 따른 Neuro2A 신경 세포 생존율은 40ug/ml 이하에서는 약 90% 이상이었으나 60ug/ml 이상에서 약 64% 이하의 생존율을 보여 60ug/ml 이상의 농도에서 줄풀에 의한 Neuro2A 신경세포 상해작용이 있었다. H₂O₂ 200uM로 처리한 Neuro2A 신경세포의 생존율은 37.34±2.54%이지만, 줄풀 5ug/ml와 20ug/ml를 첨가 처리한 경우는 각각 59.51±0.49%, 74.68±0.78%의 생존율을 나타내어 유의성 있는 생존율 증가를 보였다. 세포고사시 발생하는 DNA fragmentation는 H₂O₂ 200uM을 처리했을 경우는 일어났으나 줄풀을 첨가하여 처리한 경우는 5ug/ml, 20ug/ml 각각의 경우 모두 억제되었다. 세포고사시 발현되는 PARP, Cytochrome C, caspase-9 및 caspase-3가 H₂O₂ 200uM을 처리한 경우 모두 활성화가 일어났으나 줄풀을 처리한 경우는 5ug/ml, 20ug/ml 각각의 경우 모두 활성화가 억제되었다. 세포고사시 p53, p21, Bax는 활성화 되며 Bcl-2는 활성이 억제되는데 H₂O₂ 200uM을 처리한 경우 p53, p21, Bax는 활성화되고 Bcl-2는 활성이 억제되었으나 줄풀을 처리한 경우는 5ug/ml, 20ug/ml 각각의 경우 모두 p53, p21, Bax는 활성화가 억제, Bcl-2는 활성화가 일어났다.

이상으로 줄풀 뿌리가 H₂O₂로 유도된 세포상해와 고사에 대해서 보호, 억제하는 효과가 있었다. 향후 줄풀의 효능에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Cutler, R.G. Antioxidants, aging and longevity. *Free Radicals in Biology*, Academic Press. 6, 371-424, 1988.
2. Feher, J., Cosmos, G., Vereckei, A. The free radical theory of aging. *Free Radicals Reactions in Medicine*. Berlin, Springer-Verlag. pp 57-59, 1987.
3. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In *free radicals in biology and medicine*. 2nd Ed. Oxford, Clarendon Press. pp 22-31, 1989.
4. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Protection against oxidants in biological systems : the superoxide theory of oxygen toxicity. In *free radicals in biology and medicine*. 2nd Ed. Oxford, Clarendon Press. pp 86-89, 1989.

5. Hertog, M.G. Hollman, P.C. Potential health effects of the dietary flavonoid quercetin. *Eur J Clin Nutr* 50(2):63-66, 1996.
6. Benavente-Garcisa, O., J. C. Marrin, F.R. Ortuno, A. Rio. Uses and properties of citrus flavonoids, *J. Agric. Food Chem* 45, 4505-4515, 1997.
7. 정성제, 이진희, 송효남, 성낙술, 이승은, 백남인. 약용 식물 추출물의 항산화 활성 검색. *한국응용생명화학회지* 47(1):135-140, 2004.
8. 김은영, 백인희, 김정현, 김성란, 류미라. 항산화활성을 나타내는 약용식물 소재 탐색. *한국식품과학회지* 36(2):333-338, 2004.
9. 尹國炳, 張俊根. 몸에 좋은 山野草. 서울, 石橋出版社. p 410, 1989.
10. 中藥大辭典. 서울, 醫聖堂. p 2052, 1994.
11. 동식, 김근하, 김영호, 최승문. 고려치료경험 내과편. 의학과 학술관사. p 71, 76, 114, 122, 132, 166, 345, 386, 1996.
12. Pryor, W. A. Free radical in biology. Involvement of radical reaction in aging and carcinogenesis in medicinal chemistry. Elsevier, Amsterdam. pp 331-361, 1997.
13. Simon, R.H., Scogging, C.M., Patterson, D. Hydrogen peroxide cause the fatal injury to human fibroblast exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem* 266, 7181-7186, 1981.
14. Bokov, A., Chaudhuri, A., Richardson, A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Aging Dev* 125(10-11):811-826, 2004.
15. Harman, D. Free radical theory of aging. *Mutation Res* 275(3-6):257-266, 1992.
16. Husain, S.R., Cillard, J., Cillard, P. Hydroxy radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26(9):2489-2491, 1987.
17. Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29(3-4):323-333, 2000.
18. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-257, 1972.
19. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4):479-489, 1997.
20. Soldani, C., Scovassi, A.I. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis. an update. *Apoptosis* 7(4):321-328, 2002.
21. Bert, T., Kenneth, W.K. P53 function and dysfunction. *Cell* 70, 523-526, 1995.
22. Lane, D.P. A death in the life of P53. *Nature* 362(6423):849-852, 1993.
23. 안원근. 노화과정에 있어서 P21 유전자의 역할. 생화학분자생물학뉴스. *한국생화학분자생물학회지* 23(2):80-81, 2003.
24. Yang, E., Korsmeyer, S.K. Molecular thanatos: A discourse on the bcl-2 family and cell death. *Blood* 88(2):386-401, 1996.
25. Oltvai, Z., Milliman, C., Korsmeyer, S. J. bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death. *Cell* 74(4):609-619, 1993.
26. 고경식. 가을에 꽃 피는 야생식물. 서울, 일진사. p 56, 2004.
27. 李時珍. 本草綱目. 北京, 人民衛生出版社. p 1366, 1982.
28. 許浚. 對譯 東醫寶鑑. 서울, 법인문화사. p 1956, 1999.
29. 李梴. 編注 醫學入門. 서울, 醫聖堂. p 331, 1994.
30. 寇宗奭. 本草衍義. 서울, 醫聖堂. p 74, 1994.
31. 최진규. 약이 되는 우리풀·꽃·나무2. 서울, 한문화. p 141-147, 2003.
32. 과학·백과사전출판사 편. 약초의 성분과 이용. 서울, 일월서각. p 652, 1994.
33. 김복영, 김규식, 박영대. 축산폐수의 오염물질제거를 위한 수초선발이용연구. *한국환경농학회지* 7(2):111-116, 1988.
34. 김하송, 임병선. 농경지 배출수의 수질개선을 위한 수생식물의 정화능과 활용방안에 관한 연구. *환경관리학회지* 4(2):1-8, 1988.
35. Liu, Z., Wang, Y., Shen, Y., Guo, W., Hao, S., Liu, B. Extensive alterations in DNA methylation and transcription in rice caused by introgression from *Zizania latifolia*. *Plant Mol Biol* 54(4):571-582, 2004.
36. Ryu, S.N., Park, S.Z., Kim, H.Y. Antioxidant Activity in Rice Cultivar, Wild Rice, and Barley. *Korean J. Crop Sci* 47(1):54-61, 2002.
37. 박상원, 송춘호. 瓦松藥液이 腎臟細胞에서 H₂O₂에 의한 細胞死亡 및 DNA 損傷에 미치는 影響. *대한침구학회지* 18(1):88-99, 2001.
38. 안성훈, 구성태, 김선영, 김경식, 손인철. H₂O₂로 유발된 뇌신경세포 상해에 대한 구진의 보호효과. *대한침구학회지* 21(3):29-41, 2004.