

고장초의 부위별(뿌리, 줄기, 전초) Neuro2A 신경세포고사에 대한 억제 효과 비교 연구

차윤엽*

삼지대학교 한의과대학 한방재활의학과

Comparative Study on the Inhibition Effect on Apoptosis in Neuro2A Cell on the Region of Zizania Latifolia(Radix, Rhizoma, Herba)

Yun-Yeop Cha*

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

To prevent human body injury from oxidative stress, antioxidants are very important and many research about antioxidants are generally being conducted. Hydrogen peroxide(H₂O₂) that is one of vitality oxygen species has been seen that cause various diseases, DNA damage and gene change. We have already known that the inhibition effect of Zizania latifolia Radix, Rhizoma on apoptosis induced by H₂O₂ in Neuro2A cell. And the purpose of this study was that we made a comparative study on the inhibition effect of apoptosis in Neuro2A cell on the region of Zizania latifolia(Radix, Rhizoma, Herba). Neuro2A cells were cultivated in RPMI(GibcoBRL) with 5% FBS and treated with H₂O₂ and Zizania latifolia(Radix, Rhizoma, Herba). Separately 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 results obtained were as Follows: The cell viability in all of Zizania latifolia (Radix, Rhizoma, Herba) treatment (60ug/ml<) decreased significantly compared with that of none treatment(P<0.001). Zizania latifolia Radix increased cell viability was most effective of three regions. But we had no significant difference among three regions. All of Zizania latifolia (Radix, Rhizoma, Herba) increased cell viability about twice as much as that being injury by H₂O₂(Zizania Latifolia (Radix, Rhizoma, Herba) 20ug/ml, H₂O₂ 200uM, P<0.001). DNA fragmentation developed by H₂O₂, but was not developed in all of Zizania latifolia (Radix, Rhizoma, Herba) treatment. PARP, Cytochrome C, caspase-9 and caspase-3 activated all by H₂O₂ but were not activated in all of Zizania latifolia (Radix, Rhizoma, Herba) treatment. P53, P21 and Bax activated by H₂O₂, and Bcl-2 got into inactivation. But the opposite results appeared in all of Zizania latifolia (Radix, Rhizoma, Herba) treatment. In conclusion, these results suggest that all of Zizania latifolia (Radix, Rhizoma, Herba) inhibit the development of DNA fragmentation and apoptosis by H₂O₂ and the antioxidant action of all of Zizania latifolia (Radix, Rhizoma, Herba) is effective.

Key words : Zizania latifolia, Neuro2A cell, apoptosis

서론

노화는 대부분 생리적인 과정중의 하나로 인식되어지고 있다. 그래서 노화란 '나이가 증가함에 따라 나타나는 보편성의 생물학적인 자연현상으로서 점차적인 장부의 消痿와 變質이 노쇠

와 더불어 진행성으로 나타나는 현상으로 간주한다¹⁾. 노화에 대해서는 최근 많은 과학자들이 주장하는 바가 있지만 치료의 개념에 있어서는 활성산소설이라는 일련의 이론으로 모아지고 있다. 즉, 활성산소에 의한 손상이 노화와 수명결정에 중요하다고 생각하게 된 것이다²⁾. 활성 산소 중에서 H₂O₂는 O₂(superoxide), OH(hydroxy radical) 등을 포함하는 종의 하나로 심혈관계나 노화 등 각종 질환의 발병인자로 인식되고 있다^{3,4)}. 이런 활성 산소 종으로 부터 자신을 보호하기 위하여 인체는 유해산소제거효소(SOD), 카탈라아제(CAT) 등의 방어 시스템에 의하여 활성 산소

* 교신저자 : 차윤엽, 강원도 원주시 우산동 660 삼지대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2006/06/07 · 수정 : 2006/07/07 · 채택 : 2006/07/31

소거 기능을 하며 이들 항산화효소들은 O_2 , H_2O_2 그리고 OH 등의 독성을 해소 또는 약화시킴으로써 그 기능을 나타낸다^{5,6}.

본 연구에 사용된 고장초(*Zizania latifolia*)는 물가에 나는 여러 해 살이 풀로서⁷ 한의학에서는 그 뿌리를 菰根, 열매를 菰米라 하여 消渴이나 利尿劑로 사용하였으며⁸ 민간에서는 고혈압, 관절염, 변비, 피부병 등에 이용하거나⁹ 흥년이 들었을 때 식량으로 쓰기도 하였다⁸. 또한 최근에 나온 박¹⁰, 차¹¹ 등의 논문에 의하면 고장초 뿌리 및 줄기의 Neuro2A 신경세포고사에 대한 억제 효과에 관하여 유의성 있는 결과가 있다고 하여 이에 저자는 고장초의 전초를 사용해서 Neuro2A 신경 세포에 H_2O_2 를 투여하여 산화적 손상을 유도하고 고장초 전초 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 하였으며, 또한 고장초의 뿌리, 줄기, 전초의 효과를 비교해 본 결과 다음의 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

경기도 가평군 청평호 일대에서 5월에 직접 채취한 고장초(*Zizania latifolia*)의 뿌리, 줄기, 전초로서 바람이 잘 통하는 그늘에서 2주 동안 건조하여 사용하였다.

2. 고장초 뿌리, 줄기, 전초 추출물

고장초의 뿌리, 줄기, 전초 부분 각각 20g을 증류수 100ml에 넣고 끓인 후 식혀 물 부분만 여과시켜 $-50^{\circ}C$ 에서 얼려 cryostate 상태로 건조시킨 후 PBS에 녹여 사용하였다.

3. Neuro2A 신경세포주 배양

Neuro2A 신경세포주를 한국세포주은행에서 구입하여 RPMI (GibcoBRL)에 5% FBS와 Fungizone을 첨가하여 $37^{\circ}C$, 5% CO_2 에서 배양하였다.

4. 고장초 뿌리, 줄기, 전초의 농도에 따른 Neuro2A 세포생존율 측정

24-well culture plate에 각 well 당 2×10^5 cells를 넣어 배양한 후 고장초 뿌리, 줄기, 전초 추출물을 각각 농도별로 처리하여 24시간 더 배양하였다. 24시간이 지난 후 세포배양액을 제거하고 PBS로 두 번 washing 한 후 0.5% crystal violet(in 20% methanol)을 $300 \mu l$ /well로 첨가하여 상온에서 5분간 방치한 다음 tap water로 재빨리 세척한 후 건조시켰다. 다음 1% SDS를 $100 \mu l$ 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 570nm (reference 450nm)에서 흡광도를 측정하였다. 전 과정을 각각 4회 반복하였다.

5. H_2O_2 처리물과 H_2O_2 처리물에 고장초 뿌리, 줄기, 전초 추출물을 첨가한 후의 세포생존율 측정

4번 실험에서 고장초 뿌리, 줄기, 전초 추출물 처리 시 고장

초 대신 H_2O_2 200uM 처리를 한 것과 H_2O_2 200uM에 고장초 뿌리, 줄기, 전초를 각각 5ug/ml와 20ug/ml를 첨가 처리한 후 10시간 배양 후 똑같은 방법으로 흡광도를 측정하였으며 이를 각각 4회 반복하였다.

6. 세포고사 확인을 위한 DNA fragmentation 분석

처리한 배양세포를 얼음으로 차게 한 PBS로 한번 세척한 후 세포 침전물을 $700 \mu l$ 의 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 $4^{\circ}C$ 에서 $13,000 \times g$ 로 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 $40 \mu l$ 의 TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA)로 용해시키고, $200 \mu g/ml$ 의 농도가 되게 DNase-free RNase를 넣고 $37^{\circ}C$ 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 1×10^7 의 세포 당 lysis buffer (10 mM Tris · HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% SDS) $100 \mu l$ 로 현탁시켜 얼음 위에서 한 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. $14,000 \text{ rpm}$ 에서 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 표준곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA($1 \mu g/\mu l$)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, $16 \mu g/\mu l$ 에 BCA 용액 $100 \mu l$ 를 첨가하여 20분간 $37^{\circ}C$ 에서 방치한 다음 흡광도 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 $2 \mu l$ 와 BCA 용액 $100 \mu l$ 를 섞은 뒤 20분간 $37^{\circ}C$ 에서 방치한 후 540nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

3) 전기영동 및 Western blot

추출한 단백질 $100 \mu g$ 을 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

결과는 대조군의 평균값을 100%로 환산한 기준으로 평균값 ±표준편차를 구하여 그 평균값을 기재하였다. 검정은 one-way ANOVA 검정을 통하여 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성을 알아보고, P값이 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 하였다.

실험결과

1. 고장초 뿌리, 줄기, 전초의 농도에 따른 Neuro2A 신경세포 생존율

고장초 뿌리, 줄기, 전초의 농도에 따른 Neuro2A 신경세포의 생존율을 알아보기 위하여 용량 의존적으로 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 고장초 전초 추출물 40ug/ml에서 89.46%의 생존율을 보였으며, 60ug/ml에서는 뿌리, 줄기, 전초가 각각 63.95%, 58.20%, 74.87%의 생존율을 보였으며, 80ug/ml에서는 각각 39.19, 30.56, 51.04%의 생존율을 보여(P<0.001) 60ug/ml 이상의 농도에서 고장초 뿌리, 줄기, 전초에 의한 Neuro2A 신경세포 상해작용이 있었다(Table 1).

Table 1. Effect of Zizania latifolia (Radix, Rhizoma, Herba) on cell viability in Neuro2A cell

concentration (ug/ml)	cell viability(%)		
	Radix	Rhizoma	Herba
0	100	100	100
5	99.04	99.65	99.90
10	96.22	97.66	94.42
20	94.99	94.31	90.71
30	92.08	93.65	90.56
40	90.76	90.52	89.46
60	63.95*	58.20*	74.87*
80	39.19*	30.56*	51.04*

* p<0.001 compared with control

2. H₂O₂로 유발된 세포 상해에 대한 고장초 뿌리, 줄기, 전초 추출물의 보호효과

Neuro2A 신경 세포에 H₂O₂ 200uM을 처리 한 후 10시간이 경과하면 37.33%의 세포생존율을 보여 약 60%이상의 세포 독성을 관찰할 수 있었다(P<0.001). 고장초의 뿌리, 줄기, 전초를 각각 5ug/ml와 20ug/ml를 H₂O₂ 200uM과 동시에 처리하였을 경우, 농도 5ug/ml에서는 각각 59.51%, 56.84%, 58.52%였으며, 농도 20ug/ml에서는 각각 74.68%, 71.90%, 72.66%의 생존율을 각각 나타내어(P<0.001) H₂O₂ 200uM 처리군 대비 농도별로 약 1.5배, 2배의 세포생존율 증가를 보였다(Table 2).

Table 2. The protective effects of Zizania latifolia Rhizoma on injury induced by H₂O₂.

concentration(ug/ml)	cell viability(%)		
	Radix	Rhizoma	Herba
0	100	100	100
H ₂ O ₂ 200uM	37.33*	37.33*	37.33*
5ug/ml + H ₂ O ₂ 200uM	59.51 [#]	56.84 [#]	58.52 [#]
20ug/ml + H ₂ O ₂ 200uM	74.68 [#]	71.90 [#]	72.66 [#]

* p<0.001 compared with control, # p<0.001 compared with H₂O₂ 200uM

3. H₂O₂ 및 고장초 뿌리, 줄기, 전초 추출물 첨가에 의한 DNA fragmentation

H₂O₂에 의한 세포고사를 확인하기 위하여 DNA fragmentation 현상을 조사하였다. H₂O₂ 200uM을 처리했을 DNA fragmentation이 일어났으나 고장초 뿌리, 줄기, 전초를 첨가하여 처리한 경우는 5ug/ml, 20ug/ml 각각의 경우 모두 DNA fragmentation 현상이 억제되었다(Fig. 1).

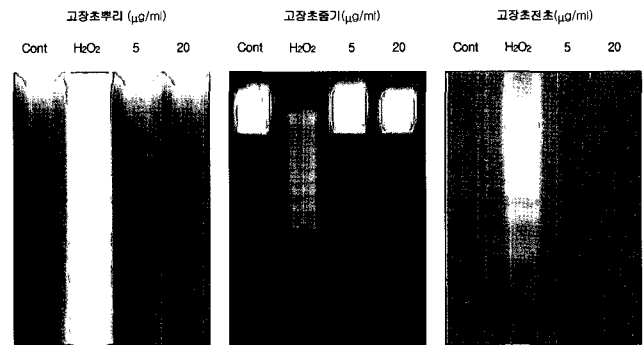


Fig. 1. Analysis of DNA fragmentation in the Neuro2A cell after H₂O₂ 200uM, H₂O₂ 200uM and Zizania latifolia (Radix, Rhizoma, Herba) 5ug/ml, H₂O₂ 200uM and Zizania latifolia (Radix, Rhizoma, Herba) 20ug/ml treatment. DNA fragmentation increase in H₂O₂ 200uM treatment.

4. H₂O₂ 및 고장초 뿌리, 줄기, 전초 추출물 첨가에 의한 PARP, Cytochrome C, caspase-3, caspase-9의 활성분석 비교

DNA fragmentation 현상이 일어나기 위해서는 세포고사 과정에서 PARP, Cytochrome C, caspase-9 및 caspase-3가 활성화된다. H₂O₂ 200uM을 처리한 경우 모두 활성화가 일어났으나 고장초 뿌리, 줄기, 전초를 처리한 경우는 5ug/ml, 20ug/ml 각각의 경우 모두 활성화가 억제되었다(Fig. 2).

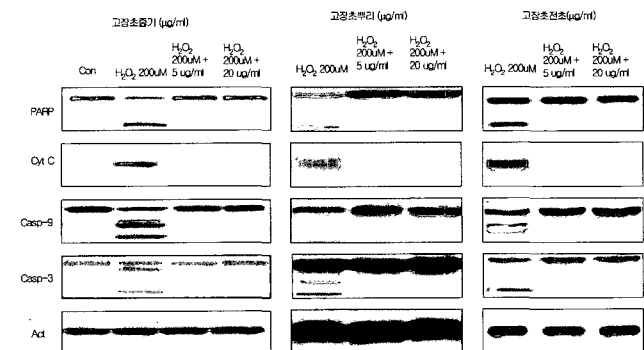


Fig. 2. Western blot analysis of PARP, Cytochrome C, caspase-9 and caspase-3 in the Neuro2A cell after H₂O₂ 200uM, H₂O₂ 200uM and Zizania latifolia(Radix, Rhizoma, Herba) 5ug/ml, H₂O₂ 200uM and Zizania latifolia(Radix, Rhizoma, Herba) 20ug/ml treatment. Actin was used as a loading control.

5. H₂O₂ 및 고장초 뿌리, 줄기, 전초 추출물 첨가에 의한 p53, p21, Bax, Bcl-2의 활성분석 비교

세포고사 과정에서 p53, p21, Bax는 활성화 되며 Bcl-2는 활성이 억제된다. H₂O₂ 200uM을 처리한 경우 p53, p21, Bax는 활성화되고 Bcl-2는 활성이 억제되었으나 고장초 뿌리, 줄기, 전초를 처리한 경우는 5ug/ml, 20ug/ml 각각의 경우 모두 p53, p21, Bax는 활성화가 억제, Bcl-2는 활성화가 일어났다(Fig. 3).

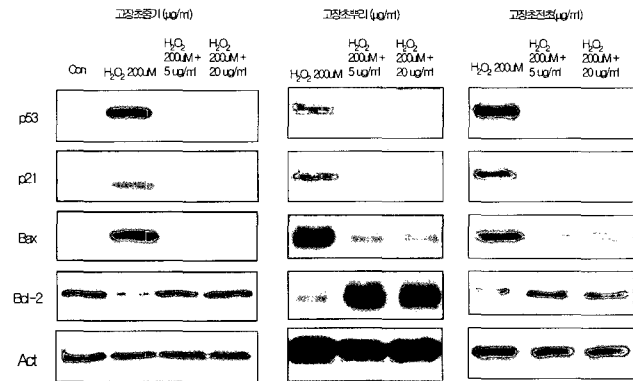


Fig. 3. Western blot analysis of p53, p21, Bax and Bcl-2 in the Neuro2A cell after H₂O₂ 200uM, H₂O₂ 200uM and Zizania latifolia (Radix, Rhizoma, Herba) 5ug/ml, H₂O₂ 200uM and Zizania latifolia (Radix, Rhizoma, Herba) 20ug/ml treatment. Actin was used as a loading control.

고찰

고장초(이명으로 줄풀이라함)는 우리나라에서는 황해도와 강원도 이남의 지역과 제주도에 분포하며, 못이나 도랑, 강가의 얇은 물속에서 무리지어 자라는 벼과에 속하는 여러해살이 풀이다. 크기가 크며 굵은 뿌리줄기가 땅속을 뺏으며, 한 자리에서 여러대의 굵은 줄기가 곧게 서서 높이가 2m에 달하며 몸집은 밋밋하고 푸르다. 길이가 1m, 너비가 2-3cm 정도 되는 길고 뺏뺏한 잎이 줄기와 평행해서 곧게 서며 좁은 피침꼴이며, 6월에서 8월 사이에 보라빛의 푸른 꽃이 줄기 끝에서 30~50cm의 크기로 핀다^{7,12}.

최근에 북한, 일본 및 세계 여러 나라에서 고장초에 대한 연구가 있어왔는데, 북한에서는 류마티스 관절염, 고혈압, 변비 그리고 당뇨에 고장초를 가루 내어 만든 줄풀산이나 달인 물인 줄풀탕 등으로 치료한 예가 있으며¹³, 일본에서는 '고갱'¹⁴이라 하여 고장초의 열매를 간장과 신장의 기능을 정상화시키는 데에 사용하였으며, 서양에서는 고장초 열매를 Wild Rice, 곧 야생쌀이라 하여 건강식품으로 사용하고 있다¹⁵. 국내에서도 고장초 뿌리 및 줄기에 대한 연구로 박¹⁰, 차¹¹ 등이 세포고사를 억제하는 작용이 있다고 발표한 바가 있다.

《中藥大辭典》⁸)에서는 고장초를 菰, 蔣草, 菰蔣草 등으로 부르며 뿌리줄기 및 뿌리, 열매를 약용으로 쓴다고 하였다. 그 뿌리줄기 및 뿌리를 菰根 또는 菰蔣根이라고 하며 《本草綱目》¹⁶에는 “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, 毒蛇傷嚙”, 《東醫寶鑑》¹⁷에서는 “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, 療酒瘡面赤, 然滑中, 不可多食”, 《醫學入門》¹⁸)에는 “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, 酒皴面赤, 白癩, 療瘡大瘡, 除目黃, 止熱痢”이라 하였으며 《中國中藥資源志要》¹⁹)에는 “甘. 寒. 清熱解毒 用于黃疸, 小便淋痛不利”라 하여 그 맛이 달고 性은 차가워 消渴과 解毒, 黃疸 및 利尿劑 등으로 사용하였다. 《本草衍義》²⁰)에서는 “彼人收之, 合粟爲粥, 食之甚濟饑”이라 하여 구황식품으로 이용하기도 하였다. 또한 줄의 열매를 菰米라 하는데 그 효능은 菰根과 비슷하여 心臟病, 利尿, 갈증해소 등에 사용한다고 하였다⁸.

그러나 같은 벼과에 속하는 야생벼에 대한 항산화 실험³⁷) 등은 많이 있었으며, 이미 박¹¹, 차 등에 의하면 고장초 뿌리 및 줄기는 항산화효과 및 세포고사 억제작용이 있다고 발표하였다. 이에 저자는 뿌리나 줄기를 나누지 않고 고장초의 전초를 사용하면 효과가 어떠한 지 또 이 세 부분의 효능 비교를 통하여 좀 더 나은 사용방법을 제시하기 위하여 이 실험을 하게 되었다.

먼저 Neuro2A 신경세포에 대한 고장초 뿌리, 줄기, 전초의 독성을 알아보기 위하여 5ug/ml에서 80ug/ml까지의 농도로 고장초 뿌리, 줄기, 전초 추출물을 신경세포 처리하여 생존율을 살펴보았다. 대조군의 생존율 100%를 기준으로 뿌리와 줄기의 40ug/ml 이하에서는 약 90% 이상의 생존율을 보이나 전초는 89.46%로 생존율이 조금 더 낮았다. 이들간의 유의성은 없었다. 60ug/ml에서는 부위별로 각각 약 58%, 64%, 75%, 80ug/ml에서는 부위별 각각 약 31%, 39%, 51%의 생존율을 보여(P<0.001) 60ug/ml 이상의 농도에서 고장초 뿌리, 줄기, 전초에 의한 Neuro2A 신경세포 상해작용이 있었다라고 판단할 수 있다(Table 1). 그리하여 본 실험에서는 고장초의 뿌리, 줄기, 전초를 각각 비교적 독성이 없는 5ug/ml와 20ug/ml 농도로 실험을 하였다.

항산화 효과는 활성 산소종의 하나인 H₂O₂를 이용하였는데, H₂O₂(Hydrogen peroxide)는 O₂(superoxide), OH (hydroxy radical) 등을 포함하며 심혈관계나 노화 등 각종 질환의 발병인자로 인식되고 있으며^{4,5}, 본 실험에서도 H₂O₂를 산화제로 이용하여 신경세포에 대한 상해를 일으켜, 상해된 세포에 고장초의 뿌리, 줄기, 전초를 농도별(5ug/ml, 20ug/ml)로 처리하여 생존율을 살펴보았다. 그 결과 Neuro2A 신경 세포에 H₂O₂ 200uM을 처리 한 후 10시간이 경과하면서 37.33%의 세포생존율을 보여 약 60%이상의 세포 독성율을 관찰할 수 있었다. (P<0.001) 고장초 뿌리, 줄기, 전초를 각각 5ug/ml와 20ug/ml를 H₂O₂ 200uM과 동시에 처리하였을 경우, 농도가 5ug/ml에서는 각각 56.84%, 59.51%, 58.52% 였으며, 농도가 20ug/ml에서는 71.90%, 74.68%, 72.66%의 생존율을 각각 나타내어(P<0.001) H₂O₂ 200uM 처리군 대비 뿌리, 줄기, 전초가 모두 약 1.5배, 2배의 세포생존율 증가를 보였다(Table 2). 그 중에서도 뿌리의 세포생존율 증가가 가장 높았으나 유의적인 차이는 없었다.

그 외에도 세포고사에 대한 고장초의 뿌리, 줄기, 전초의 억제효과를 알아보기 위해 DNA fragmentation 및 세포고사와 관련된 단백질 및 유전자 검사를 실시하였다.

H₂O₂ 200uM로 DNA fragmentation이 일어나면서 UV light 하에서 찍은 사진 필름 상에서 절편화된 사다리꼴의 형태가 나타났으나, 고장초 뿌리, 줄기, 전초를 동시에 처리한 것에는

5ug/ml, 20ug/ml 모두 DNA 분절화가 일어나지 않음을 알 수 있다(Fig. 1). 그리고 여러 단백질 혼합물로부터 특정 단백질의 존재여부를 밝혀내는 western blot을 이용하여 세포고사시 활성화 되는 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 고장초 뿌리, 줄기, 전초를 첨가 처리한 것에는 활성화가 일어나지 않았다. 그 외 세포고사와 관련된 p53, p21, Bax 유전자도 H₂O₂ 200uM 단독 처리시 활성화가 야기되었으며 억제작용기전에 속하는 Bcl-2는 억제되었다. 고장초 뿌리, 줄기, 전초 첨가 처리한 경우는 모두 반대의 현상을 보여 결과적으로 H₂O₂에 의한 세포고사가 고장초 뿌리, 줄기, 전초에 의해 억제됨을 알 수 있었다.

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 유도한다³⁶⁾. 이렇게 활성화된 caspase-3는 poly (ADP-ribose) polymerase(PARP)를 활성화시켜 DNA fragmentation과 핵의 응축을 유도하면서 세포고사를 일으킨다³⁹⁾.

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^{25,26)}. p21 유전자는 세포가 독성 물질(toxins)이나 방사선(radiation) 등에 의해 손상을 입을 경우 세포의 생장을 중단시키는 일종의 제동 장치 역할을 하는 유전자에 해당하며, 그 작용으로 손상을 입은 세포가 정상 상태로 복구 될 수 있는 시간적 여유를 확보하게 되는 것이다²⁷⁾. Bcl-2와 Bax는 모두 Bcl-2 family에 속하는 유전자로 Bcl-2는 세포고사시 발생하는 Cytochrom C의 세포질 방출을 억제하여 세포의 수명을 연장시키고 세포의 자연사를 억제하며²⁸⁾, 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 있다²⁹⁾.

이상의 결과에서 고장초의 뿌리, 줄기, 전초 추출물 모두가 H₂O₂에 의해 유발된 신경세포고사를 억제하여 세포 보호 기능이 있음을 알 수 있다. 그 중에서도 뿌리의 효능이 가장 높은 것으로 나왔으나 이들 간의 유의성은 없으므로 부위별로 상관없이 모두 항산화제로서의 역할을 할 수 있다고 생각되며 향후 추가적인 실험 및 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

H₂O₂로 유발된 신경세포 상해에 대한 고장초의 보호효과를 부위별로 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다

고장초 추출물 40 ug/ml이하에서의 농도에서는 10% 미만까지 세포독성을 나타냈고, 그 이상에서의 농도에서는 30-40% 이상 세포독성이 높게 나타내었다(뿌리, 줄기, 전초 모두의 경우). H₂O₂를 200 uM를 사용하여 세포사를 일으킨 다음 고장초의 뿌리, 줄기, 전초 5 ug/ml과 20 ug/ml를 첨가하여 실행한 결과 H₂O₂는 생존율이 37.33%인데 반하여 고장초의 경우는 5 ug/ml는 부위별로 56-60%, 20 ug/ml는 부위별로 71-75%의 생존율을 보여 H₂O₂에 대한 세포 보호 효과가 있었다. 그 중에서도 고장초 뿌리의 경우가 가장 효과가 뛰어났으나, 다른 부위와의 유의성 있는 차이는 없었다. DNA 절편화를 실시한 결과 H₂O₂를 처리한 경우 절편화가 일어났으나 고장초의 뿌리, 줄기, 전초를 처리한 경우 절편화가 일어남을 억제 하였다. 세포사 과정에서 PARP, Cytochrome C, caspase-9 및 caspase-3가 활성화된다. H₂O₂를 처리한 경우 모두 활성화가 일어났으나 고장초의 뿌리, 줄기, 전초를 처리한 경우 모두 활성화가 일어남을 억제 하였다. 세포사가 일어나기 위하여서는 p21과 p53이 증가하며 미토콘드리아에 존재하는 Bax가 세포질로 방출이 일어나며 Bcl-2는 점차적으로 감소하게 된다. H₂O₂를 처리한 경우 이와 같은 현상이 일어났으며, 고장초의 뿌리, 줄기, 전초를 처리함으로써 억제 되었다.

결과적으로 고장초의 뿌리, 줄기, 전초 처리할 경우 모두 H₂O₂에 의한 세포사를 억제할 수 있음을 알 수 있으며, 이들 부위 간 효능은 서로 유의성 있는 차이가 없었다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

1. 두호경 편저. 동의신계학. 서울, 동양의학연구원. pp 1327-1329, 1993.
2. Cohen, G. The generation of hydroxyl radicals in biological system. Photobiol. 28, 669-675, 1978.
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.L., P.C.H. Hollman. Potential health effects of the dietary flavonid 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. 尹國炳, 張俊根. 몸에 좋은 山野草. 서울, 石橋出版社. p 410, 1989.
 8. 中藥大辭典. 서울, 醫聖堂. p 2052, 1994.
 9. 동식, 김근하, 김영호, 최승문. 고려치료경험 내과편. 의학과 학술판사. p 71, 76, 114, 122, 132, 166, 345, 386, 1996.
 10. 박원형. H₂O₂로 유발된 Neuro2A 신경세포고사에 대한 줄풀 (*Zizania latifolia*)의 억제 효과. 상지대학교 석사학위논문. 2005.
 11. 차윤엽. 줄풀 줄기의 Neuro2A 신경세포고사에 대한 억제 효과. 동의생리병리학회지 20(1):149-155, 2006.
 12. 고경식. 가을에 꽃 피는 야생식물. 서울, 일진사. p 56, 2004.
 13. 동식, 김근하, 김영호, 최승문. 고려치료경험 내과편. 의학과 학술판사. p 71, 76, 114, 122, 132, 166, 345, 386, 1996.
 14. <http://www.allfull.co.kr>. 2004년 6월 12일.
 15. 최진규. 약이 되는 우리풀·꽃·나무2. 서울, 한문화. pp 141-147, 2003.
 16. 李時珍. 本草綱目. 北京, 人民衛生出版社. p 1366, 1982.
 17. 許浚. 對譯 東醫寶鑑. 서울, 법인문화사. p 1956, 1999.
 18. 李梴. 編注 醫學入門. 서울, 醫聖堂. p 331, 1994.
 19. 中國藥材公司編著. 中國中藥資源志要. 北京, 科學出版社. p 1460, 1994.
 20. 寇宗奭. 本草衍義. 서울, 醫聖堂. p 74, 1994.
 21. Su-Noh Ryu, Sun-Zik Park, Hong-Yeol Kim. Antioxidant Activity in Rice Cultivar, Wild Rice, and Barley. *Korean J. Crop Sci.* 47(1):54-61, 2002.
 22. 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.
 23. Soldani, C., Scovassi, A.I. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis. an update. *Apoptosis.* 7(4):321-328, 2002.
 24. Bert T, Kenneth WK. P53 function and dysfunction. *Cell.* 70, 523-526, 1995.
 25. Lane, D.P. A death in the life of P53. *Nature.* 362(6423): 849-852, 1993.
 26. 안원근. 노화과정에 있어서 P21 유전자의 역할. 생화학분자 생물학뉴스. 한국생화학분자생물학회. 23(2):80-81, 2003.
 27. Yang, E., Korsmeyer, S.K. Molecular thanatos: A discourse on the bcl-2 family and cell death. *Blood.* 88(2):386-401, 1996.
 28. 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.