

베타아밀로이드로 유도된 신경세포사멸에 대한 地黃 및 地黃食醋의 보호효과

송호인 · 김광중*

대구한의대학교 한의과대학 생리학교실

Protective Effects of Rehmannia Glutinosa Extract and Rehmannia Glutinosa Vinegar against b-amyloid-induced Neuronal Cell Death

Hyo In Song, Kwang Joong Kim*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Alzheimer's disease, a representative neurodegenerative disorder, is characterized by the presence of senile plaques and neurofibrillary tangles accompanied by neuronal damages. b-Amyloid peptide is considered to be responsible for the formation of senile plaques that accumulate in the brains of patients with Alzheimer's disease. There has been compelling evidence supporting that b-amyloid-induced cytotoxicity is mediated through generation of reactive oxygen species. In this study, we have investigated the possible protective effect of Rehmannia glutinosa against b-amyloid-induced oxidative cell death in cultured human neuroblastoma SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells treated with b-amyloid underwent apoptotic death as determined by morphological features and positive in situ terminal end-labeling (TUNEL staining). Rehmannia glutinosa water extract, wine, and vinegar pretreatments attenuated b-amyloid-induced cytotoxicity and apoptosis. Rehmannia glutinosa vinegar exhibited maximum protective effect by increasing the expression of anti-apoptotic protein, Bcl-2. In addition to oxidative stress, b-amyloid-treatment caused nitrosative stress via marked increase in the levels of nitric oxide, which was effectively blocked by Rehmannia glutinosa. To further explore the possible molecular mechanisms underlying the protective effect of Rehmannia glutinosa, we assessed the mRNA expression of cellular antioxidant enzymes. Treatment of Rehmannia glutinosa vinegar led to up-regulation of heme oxygenase-1 and catalase. These results suggest that Rehmannia glutinosa could modulate oxidative neuronal cell death caused by b-amyloid and may have preventive or therapeutic potential in the management of Alzheimer's disease. Particularly, Rehmannia glutinosa vinegar can augment cellular antioxidant capacity, there by exhibiting higher neuroprotective potential.

Key words : Alzheimer's disease, apoptosis, b-amyloid, oxidative stress, Rehmannia glutinosa

서 론

알츠하이머병 (Alzheimer's disease: AD)은 대표적인 만성 퇴행성 뇌질환으로 병리학적으로는 대뇌피질이나 해마 (hippocampus)에 생기는 뇌 위축 및 신경원섬유농축체 (neurofibrillary tangle)의 생성과 노인반 (senile plaque)의 축적

이 전형적인 지표로 나타난다¹⁾. 베타아밀로이드 (b-amyloid: Ab)는 이러한 노인반을 구성하는 주성분으로 알츠하이머병의 중요한 원인으로 추정되고 있으며, 활성산소종 (reactive oxygen species: ROS)을 생성하여 산화적 손상 유발함으로써 신경세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다^{2,3)}. 이러한 알츠하이머병을 한의학적으로는 기억의 상실에 따른 현상으로 보아 腎과 연계된 精과의 연계로 설명하고 있다. 腎과 연계된 精이 내경에서 “五穀之津液 和合而爲膏 內滲入于骨空 補益腦髓”로 뇌수와 밀접한 연계를 가지고 있어 精이 정신기능 특히 기억의 물질적 혹은 음적 기초가 된다고 보고 치료방향을 설정하고 있다^{4,7)}. 이에 반해 현

* 교신저자 : 김광중, 대구시 수성구 상동 대구한의대학교 한의과대학
· E-mail : kwangj@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2238
· 접수 : 2007/01/05 · 수정 : 2007/01/22 · 채택 : 2007/02/08

대과학적으로는 산화적 손상이 치매에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있기 때문에, 항산화 작용을 갖는 다양한 천연소재 물질에 대한 다각적인 연구 접근이 이루어지고 있다^{8,11)}. 이에 따라 최근, 한약재제로부터 치매예방 및 치료 물질 개발에 관심이 집중되고 있으며, 은행, 울금, 원지, 오수유 등에서 그 가능성을 보이고 있다^{12-16,18,19)}. 작용기전에 기반을 둔 접근방법으로 아세틸린 분해효소인 acetylcholine esterase (AChE)의 억제, 뇌혈류 개선, 베타아밀로이드 생성 억제, 항산화 및 항염증 작용 등의 측면에서 관심이 모아지고 있다. 은행잎 (*Ginkgo biloba* L.)은 1960년부터 혈류순환과 관련된 질환에 사용되어 왔으며, 은행잎 추출물인 EGb 761은 뇌혈류를 개선시키며, 혈액순환을 촉진시키며, 기억 및 인지능을 향상시키는 것으로 보고 되어져 왔다. 특히, EGb는 강력한 항산화능 및 항염증 효과를 가짐으로 베타아밀로이드, 과산화수소, nitric oxide (NO)가 매개하는 신경세포 사멸에 대하여 보호효과 나타내었다¹²⁾. 울금 (*Curcuma longa*)에는 대표적인 항산화, 항염증 성분인 curcumin이 존재하며, 이는 세포배양 모델에서 베타아밀로이드로 유도된 apoptosis를 억제하고, 실험동물 모델에서 산화적 스트레스 및 염증반응을 감소시켰다^{13,14)}. 특히, 대표적 항산화 효소의 heme oxygenase-1 (HO-1)의 발현을 현저히 증가시키는 것으로 보고되고 있다¹⁵⁾. 원지 (*Polygala tenuifolia*)는 안정작용, 기억력 증강, 신경염, 불면증 등의 치료에 사용되어져 왔으며, scopolamine으로 유도된 기억력 손상 모델에서 AChE를 억제함으로써 인지능력을 향상시켰으며, 베타아밀로이드로 유도된 세포사멸에 대하여 보호효과를 나타내었다^{16,18)}. 특히 활성성분인 tenuigen은 amyloid precursor protein (APP)로부터 비정상적으로 과량의 베타아밀로이드가 생성되는 과정을 억제하였다¹⁹⁾. 오수유 (*Evodiae Fructus*)는 AChE의 활성을 억제하며 scopolamine으로 유도된 기억력 손상을 시켰으며, 이는 활성성분인 dehydroevodiamine hydrochloride (DHED)에 의해 매개되는 것으로 생각 되어진다¹⁶⁾. DHED는 AChE의 활성을 억제할 뿐 아니라, APP 분해효소인 b-secretase에 의해 잘려진 C단 단백질의 생성을 억제하여 신경세포에 사멸에 대해 보호효과를 보였다¹⁶⁾.

그러나 본 연구에서는 한의학적 관점에 더욱 의미를 두어 음적 기반인 精을 補養하는 기본약물인 지황을 중심으로 한 재료를 실험재료로 사용하였다. 실험재료로 사용되는 지황, 지황주, 지황식초 중 지황은 한약재이며, 지황주, 지황식초는 지황에 대한 제형변화를 꾀하여 만들어진 식품이다. 이 중 지황과 지황주는 정신을 안정시키는 養精하는 효능이 보다 구체적으로 운용되는 형태로 몸이 가뻐지고 늙지 않는다는 효능을 가지고 동의보감에 나오는 修身養生藥 중에 하나이다¹⁷⁾. 또한 지황식초는 요즈음 한약을 발효시켜 나온 효소와 농축시킨 한약의 결합으로 기존 한약의 효과는 그대로 유지하면서 효소의 작용이 더해져 효과가 더해진다는 발효한약의 대두에 발 맞추고 식초가 항산화 효과로 노화현상에 도움된다는 일반적인 효능보고를 감안하여 지황을 발효시켜 식초로 만든 식품으로 새롭게 설정한 것이다.

그러므로 본 연구에서는 알츠하이머병의 치료와 예방에 생지황, 지황주 및 지황식초가 미치는 효과를 알기 위하여 신경세포 독성실험에 널리 활용되고 있는 SH-SY5Y neuroblastoma 세

포주를 사용하여, 베타아밀로이드로 유도되는 신경세포 사멸에 대한 생지황, 지황주 및 지황식초의 보호효과를 다각적으로 비교 검토하고, 그 작용기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시약 및 기기

실험에 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 항생제, trypsin, 혈청은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였으며, MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], scopolamine, anti-actin antibody는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 베타아밀로이드 (Ab25-35)는 Bachem Inc. (Torrance, CA, USA) 제품을 사용하였으며, 탈이온수에 1 mM 농도로 녹여 -20°C에 보관하였으며, 시약처리하기 직전에 녹여 실험에 사용하였다. anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-cPARP antibody는 Santa Cruz (San Diego, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxidase는 Zymed에서 구입하여 사용하였다. Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Molecular Probe Inc. (Eugene, OR, USA) 제품을 사용하였다.

2) 시료의 제조

생지황을 수동분쇄기를 이용하여 분쇄한 후 10%의 농도로 90°C 물로 5시간 추출하여 상층액을 모았다. 이를 여과하여 감압농축기 (EYELA Co., Japan)로 농축한 후 동결건조기 (EYELA Co. Japan)로 건조하여 지황 동결건조물 (Rehmannia glutinosa water extract: RGWE)을 얻은 후 지황주 (Rehmannia glutinosa wine: RGW)와 지황식초 (Rehmannia glutinosa vinegar: RGV)를 제조하였다.

3) 세포배양

Human neuroblastoma cell line인 SH-SY5Y세포를 10% fetal bovine serum 이 첨가된 DMEM/F12 90% 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂-95% 대기상태에서 배양하였다. SK-N-SH 세포와 astrocyte cell line인 C6 glioma cell은 10% fetal bovine serum, 90% DMEM 배지에서 SH-SY5Y와 동일한 조건으로 배양하였다. 항생제로는 페니실린지 및 스트렙토마이신 (penicillin G sodium, streptomycin sulfate, 100 mg/L each, Invitrogen)을 사용하였다.

4) 실험동물

실험동물로는 체중 200g 전후의 Sprague-Dawley 웅성 랫트 (효창사이언스, 대전)를 일주일간 실험환경에 적응시켜 사용하였다. 시험군과 대조군을 각각 5마리씩 3개의 군으로 나누었다. 적응기간 및 실험기간 동안 물과 사료를 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. 실험동물 사육실 내의 온도는 21-26°C, 습도는 40-60%로 유지하였고 낮 12시간 밤 12시간 주기로 하였다.

2. 실험방법

1) 세포생존률 측정

MTT dye reduction assay를 이용하여 세포 생존율을 정량

적으로 측정하였다. 세포를 48-well plate에 6×10^4 개/well의 밀도로 plating한 다음 이튿날 serum을 제거한 DMEM/F12 또는 DMEM배지에 RGWE, RGW, RGV를 정해진 농도로 녹여 전처리 한 다음, 베타아밀로이드를 가하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT solution (최종농도 1 mg/ml)을 가하고 2시간 동안 배양한 다음 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 용해시켜 570 nm에서 microplate reader (TECAN GmbH, Salzhurg, Austria)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

2) 세포사멸형태 측정

TUNEL staining (DNA fragmentation in situ)을 이용하여 아포토시스 (apoptosis)를 측정하고자 하였다. in situ detection kit은 Roche Diagnostic GmbH (Mannheim, Germany)에서 구입하였다. 세포를 4-well chamber slide에 plating 한 뒤, 지황과 베타아밀로이드를 처리하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 덜어낸 후 4% neutral buffered formalin (100 ml)을 넣어 1시간 동안 고정시켰다. 고정된 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 과산화수소 용액 (0.3% in methanol)으로 실온에서 1시간 방치하여 endogenous peroxidase를 차단한 후, 4°C에서 0.1% Triton X-100 in sodium citrate로 2분간 처리하여 세포의 투과성을 증가시켰다. TUNEL reaction mixture (terminal deoxynucleotidyl transferase; TdT, digoxigenin-11-dUTP)를 50 ml 가하고 37°C에서 1시간 동안 배양하여 label시킨 후, peroxidase-conjugated anti-goat antibody를 50 ml 가하고 37°C에서 30분 동안 추가 배양하였다. 이후 DAB solution을 50-100 ml 넣고 10분간 incubation한 후 50% glycerol로 mounting 하고 현미경으로 세포형태를 관찰하였다.

3) Bcl-2, Bax 및 cPARP의 발현 측정

지황과 베타아밀로이드를 24시간 처리 후 세포를 RIPA bufer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na_3VO_4 , protease inhibitor cocktail)로 0°C에서 20분간 lysis 시킨 다음 15,000 g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 단백질 함량을 BCA reagent로 정량을 한 뒤, 30 μg 을 12.5% SDS-PAGE에서 전기영동 하였다. 전개시킨 gel을 PVDF membrane (Gelman Sciences)에 transfer한 후 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)로 blocking 시켰다. 3% fat-free dry milk-PBS에 anti-Bcl-XL, Bax, 또는 anti-cPARP primary antibody을 overnight으로 붙이고, PBST용액으로 5분간 3회 washing 한 후 horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간 동안 붙인 다음 PBST용액으로 5분간 3회 washing 하였다. 이후 enhanced chemoluminescence (ECL) reagent (Amersham Pharmacia Biotech., Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 1분간 반응한 뒤 x-ray 필름에 노출시켰다.

4) 세포내 활성산소종 측정 정량

지용성의 DCF-DA는 세포내에 들어가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 DCF가 된다.

지황과 베타아밀로이드를 가하고 배양한 세포를 PBS로 2회 washing한 뒤 10 μM DCF-DA를 가하여 37°C에서 15분간 반응을 시킨 후 형광의 변화를 excitation 파장 485nm 및 emission 파장 535nm에서 microplate reader (TECAN GmbH, Salzhurg, Austria)를 사용하여 측정하였다.

5) Nitric oxide (NO) 생성 측정

배양세포에 지황과 베타아밀로이드를 24시간 처리한 후 배지에 생성된 NO의 양을 Griess reaction을 통해 측정하였다. 상등액을 150 μl 취하여 동량의 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine in 5% phosphoric acid)와 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 항산화효소 mRNA 발현 측정

Trizol을 사용하여 total RNA를 추출, 분리 한 다음, M-MLV reverse transcriptase를 이용하여 cDNA로 전환시켰다. 특정 DNA sequence는 다음과 같은 각각의 primer를 사용하여 PCR 반응용액으로 증폭시켰다. Heme oxygenase-1 (HO-1), 5'-ACT TTC AGA AGG TGT CC-3' (sense) and 5'-TTG AGC AGG AAG GCG GTC TTA G-3' (antisense); catalase, 5'-CCG ACG AGA TGG CAC ACT TTG ACA-3' (sense) and 5'-CGC GAG CAC GGT AGG GAC AGT TC-3' (antisense); glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 5'-AGT GTA GCC CAG GAT GCC CTT-3' (sense) and 5'-GCC AAG GTC ATC CAT GAC AAC-3' (antisense). 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 45초간 25 cycle 증폭시킨 다음 생성물을 ethidium bromide가 포함된 1.0% agarose gel에서 전기영동한 뒤 UV 현미경 하에서 촬영하였다.

7) 인산화 효소의 활성 측정

배양세포를 RIPA bufer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na_3VO_4 , protease inhibitor cocktail)로 0°C에서 20분간 lysis 시킨 다음 15,000 g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 단백질 함량을 BCA reagent로 정량을 한 뒤, 30 μg 을 12.5% SDS-PAGE에서 전기영동 하였다. 전개시킨 gel을 PVDF membrane (Gelman Sciences)에 transfer한 후 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)로 blocking 시켰다. 3% fat-free dry milk-PBS에 anti-ERK, phospho-ERK, JNK, Akt/protein kinase B, phospho-Akt를 overnight으로 붙이고, PBST용액으로 5분간 3회 washing 한 후 horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간 동안 붙인 다음 PBST용액으로 5분간 3회 washing 하였다. 이후 enhanced chemoluminescence (ECL) reagent (Amersham Pharmacia Biotech., Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 1분간 반응한 뒤 x-ray 필름에 노출시켰다.

8) 실험동물의 기억력 손상 측정

지황이 실험동물 모델에서 기억력 손상 회복효과가 있는 지 검토하기 위하여 scopolamine을 사용하였다. scopolamine은 acetylcholine receptor antagonist로 작용하여 기억력을 억제시키는 것으로 알려져 있다. scopolamine을 투여하기 7일전부터

RGWE를 400또는 800mg/kg의 용량으로 경구투여 하거나, 생리 식염수를 투여하였다. 이후 scopolamine 0.5 mg/kg을 복강으로 4일간 투여하여 기억력 손상을 유발하였으며, 매일 세 번씩 물-미로검사 (water-maze test)을 실시하였다. 물-미로검사는 플랫폼 (지름 10 cm, 높이 25 cm)이 설치된 원통의 물탱크 (지름 180 cm, 높이 50 cm)와 쥐의 움직임을 기록하는 비디오 추적장치 (video-tracking system; Ethovision, Noldus, Netherlands)를 사용하여 시행하였다. 이 때 물의 온도는 26-27℃, 물의 높이는 플랫폼 위 2 cm까지로 하였다. 실제 실험은 실험용 랫트가 플랫폼 까지 찾아가서 플랫폼에서 30초 이상 머무르면 찾아가 때까지 걸린 시간을 탈출 잠복기 (escape latency)로 하였으며, 이를 하루 3회 실시하여 나온 평균값을 평균 탈출 잠복기 (mean escape latency)로 하였다. 이 때 평균 탈출 잠복기가 90 초를 초과하는 경우에는 90 초로 동일한 값을 취하였다. 따라서 4일 조사기간 동안에 랫트 한 마리당 총 12회의 실험을 실시하였다. 아울러 랫트가 플랫폼을 정확하게 기억하는지를 확인하기 위해 쥐가 머무는 플랫폼을 제거한 후 랫트가 이 곳을 찾아와 머무는 시간 (Time Staying on PF)도 5일째 측정하였다.

3. 통계분석

데이터는 평균값 ± S.D.로 표시하였다. 통계처리는 SPSS 8.0 for windows (SPSS, Inc. USA)를 이용하여 처리하였다. p값이 0.05 이하의 경우 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다 (*p < 0.05, **p<0.01).

결 과

1. 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 독성에 대한 지황의 보호효과

실험에서 사용한 C6 glioma 세포는 정상세포 (astrocyte)로 일반적으로 신경세포를 도와주는 보호역할을 수행한다. 우선, 지황 자체가 C6 세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다양한 농도 (0, 1, 2.5, 5 mg/ml)의 생지황 추출물 (RGWE: *Rehmania glutinosa* water extract)을 C6 세포에 24시간 동안 처리하고 MTT reduction assay로 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 RGWE는 상대적으로 높은 5 mg/ml 농도까지는 80% 이상의 세포생존율을 유지하여 비교적 안전성이 높은 물질임을 알 수 있었다 (Fig. 1A). 이를 고려하여 RGWE의 농도를 1.5 mg/ml로 고정하고 30분간 전처리 한 다음 2.5, 10 mM의 베타아밀로이드 (Ab25-35)를 가하여 세포독성에 미치는 RGWE의 보호효과를 검토하였다. 그 결과 베타아밀로이드를 첨가한 경우에는 세포생존율이 약 65%로 감소하였으나 RGWE를 함께 처리한 그룹에서는 세포생존율이 80%로 회복되었다 (Fig. 1B). 이는 RGWE가 정상 세포에서 베타아밀로이드에 의한 세포독성을 감소시키는 효과가 있다는 것을 나타낸다. 한편, 베타아밀로이드에 의한 C6 세포의 형태적 변화를 위상차 현미경으로 관찰 한 결과, 베타아밀로이드 24시간 단독 처리시 세포수의 현저한 감소와 세포막의 수포화 등의 변화를 관찰하였으며, RGWE를 전처리한 실험군에서는 다

시 회복되는 것을 확인하였다.

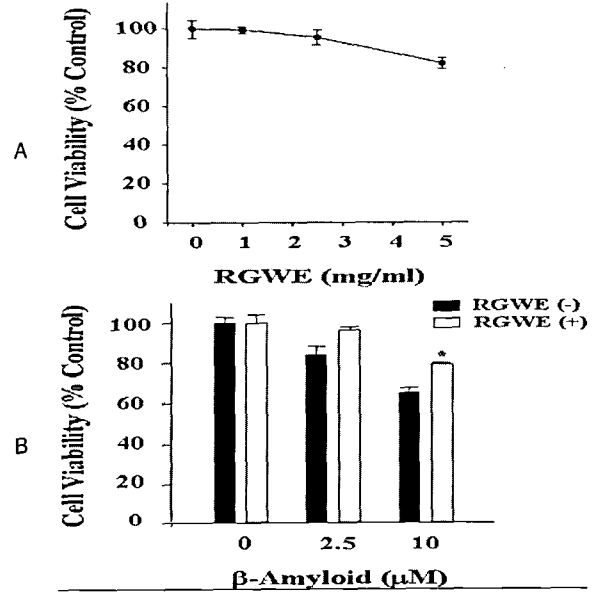


Fig. 1. 베타아밀로이드로 유도된 정상세포 독성에 대한 RGWE의 보호효과 A. C6 glioma cells were treated with various concentrations of RGWE (0, 1, 2.5, 5 mg/ml) for 24 h. B. Cells were pretreated with RGWE (1.5 mg/ml) for 30 min before exposure to b-amyloid for 24 h. Cell viability was determined by the MTT reduction assay.

신경세포에 있어 지황의 직접적인 보호효과를 검토하기 위하여 SH-SY5Y와 SK-N-SH 두 종류의 neuroblastoma 세포주를 이후 실험에서 사용하였다. 우선, 지황이 SH-SY5Y 세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다양한 농도 (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/ml)의 RGWE를 24시간 동안 처리하고 MTT reduction assay를 수행하였다. (Fig. 2A).

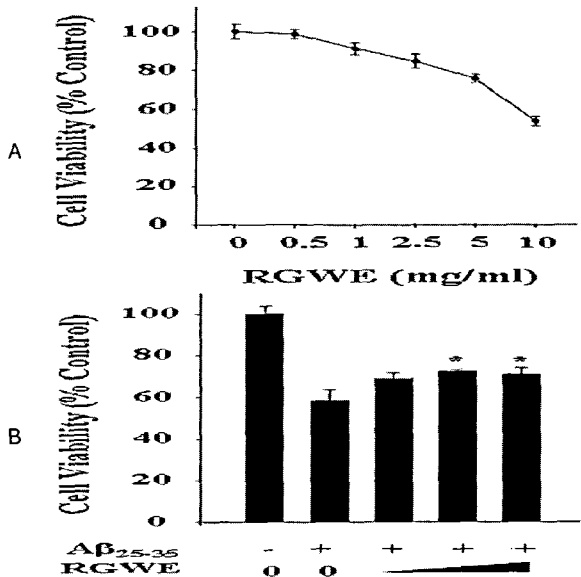


Fig. 2. 베타아밀로이드로 유도된 SH-SY5Y 세포독성에 대한 RGWE의 보호효과 A. SH-SY5Y cells were treated with various concentrations of RGWE (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/ml) for 24 h. B. Cells were pretreated with RGWE (0.25, 0.5, 1mg/ml) for 30 min before exposure to b-amyloid for 24 h. Cell viability was determined by the MTT reduction assay.

RGWE를 단일로 처리 한 경우, 1 mg/ml 이하의 농도에서 90% 이상의 생존율을 유지하였으므로 이 농도로 최고 농도로 설정하여 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 RGWE를 30분간 전처리 한 다음 10 mM의 베타아밀로이드를 가하여 24시간 배양시켜 보호효과를 검토하였다. 베타 아밀로이드로 유도된 세포독성은 RGWE을 농도별로 처리함으로써 0.5, 1에서, 15% 정도의 보호효과를 관찰 할 수 있었다 (Fig. 2B). RGWE의 신경보호 효과를 또 다른 신경 세포인 SK-N-SH 세포를 사용하여 검토한 결과, 베타아밀로이드에 의하여 감소된 세포생존율 (50%)은 RGWE (1 mg/ml)를 전처리 함으로써 현저히 증가되었다 (Fig. 3).

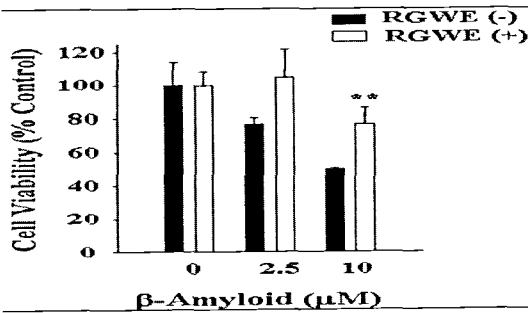


Fig. 3. 베타아밀로이드로 유도된 SK-N-SH 세포독성에 대한 RGWE의 보호효과 SK-N-SH cells were pretreated with RGWE (1 mg/ml) for 30 min before exposure to β -amyloid for 24 h. Cell viability was determined by the MTT reduction assay.

다음 실험에서는 생지황을 각각 지황주 (Rhemaniam glutinosa wine : RGW) 및 지황식초 (Rhemaniam glutinosa vinegar : RGV) 의 형태로 제조를 한 다음 각 물질이 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 독성에 미치는 효과를 MTT reduction assay로 검토하였다. 우선 RGW와 RGV를 농도별로 (1, 2.5, 7.5, 25, 50%, v/v) 단독으로 처리하여 독성을 나타내지 않는 최고의 농도를 설정하였다 (Fig. 4A, 5A).

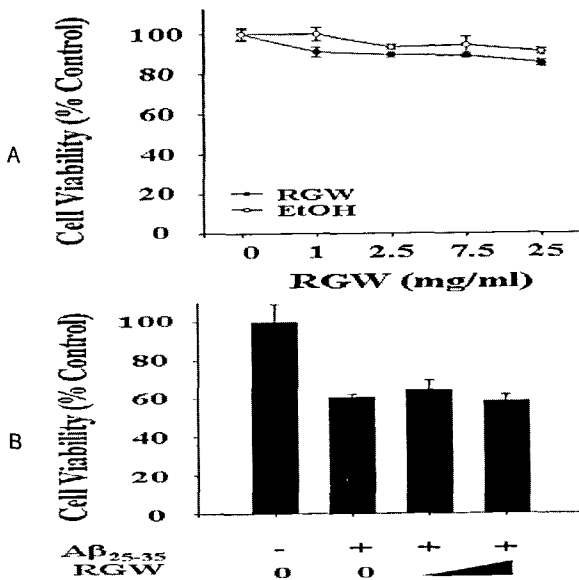


Fig. 4. 베타아밀로이드로 유도된 세포독성에 대한 RGW의 효과 A. SH-SY5Y cells were treated with various concentrations of RGW (0, 1, 2.5, 7.5, 25 % v/v) for 24 h. B. Cells were pretreated with 0.5%, 1% (v/v) RGW for 30 min before exposure to β -amyloid for 24 h. Cell viability was determined by the MTT reduction assay.

이를 바탕으로, RGW, RGV를 각각 1%, 0.5% (v/v) 농도에서 30분 동안 전처리하고 이후 베타아밀로이드와 함께 24시간 동안 배양하였다. 대조군에는 동일한 함량의 에탄올과 아세트산을 RGW와 RGV 대신 처리하였다. 베타아밀로이드로 유도된 세포독성은 RGW, RGV를 30분 단시간으로 전처리 한 경우 감소되지 않았으며 (Fig. 4B, 5B), 이는 RGW, RGV를 제조하는 과정에서 RGWE를 각각 10%, 7.3% 사용하여 절대적 함량이 낮기 때문으로 사료된다. 그러므로, 이후의 실험에서는 저농도의 RGW, RGV 성분을 장시간 전처리 한 모델을 사용하여 일련의 실험을 수행하였다. SH-SY5Y 세포를 1% RGW, 0.5% RGV 배지에서 1주일 동안 지속적으로 배양한 다음, 베타아밀로이드를 24시간 동안 처리한 경우, 베타아밀로이드를 단독으로 처리함으로써 세포생존율은 47%로 감소되었으며, 이는 RGW, RGV 처리에 의해 각각 87%, 90% (Fig. 6A)로 현저히 회복되었다. 한편, RGW와 RGV에 존재하는 에탄올과 아세트산 성분을 동일한 기간 동일한 조건으로 처리한 경우 베타아밀로이드로 인한 세포 생존률에는 큰 변화가 없었다 (Fig. 6B). 즉, RGW와 RGV의 보호효과는 각각을 녹인 용매에 의해 영향을 받지 않음을 검증 할 수 있었다.

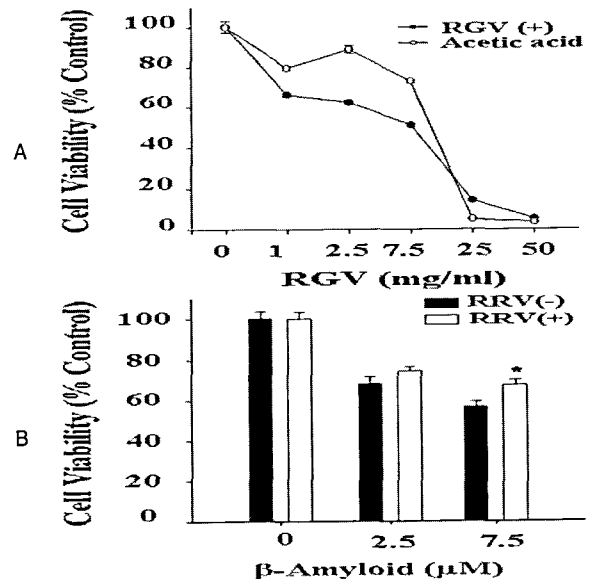


Fig. 5. 베타아밀로이드로 유도된 세포독성에 대한 RGV의 효과 A. SH-SY5Y cells were treated with various concentrations of RGV (0, 1, 2.5, 7.5, 25, 50 % v/v) for 24 h. B. Cells were pretreated with 0.5% (v/v) RGV for 30 min before exposure to β -amyloid for 24 h. Cell viability was determined by the MTT reduction assay.

2. 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 사멸에 대한 지황의 보호 효과

베타아밀로이드로 인한 세포사멸의 형태를 규명하기 위하여 아포토시스를 측정하는 대표적인 지표중의 하나인 DNA fragmentation을 in situ nick-end labeling (TUNEL staining)을 통하여 측정하였다. TUNEL staining은 아포토시스 과정에서 활성화된 endonuclease에 의해 180-200 bp 단위로 fragmentation 된 DNA를 3-OH위치에 표식된 dUTP를 결합시켜 기질을 공급하여 발색시키는 방법이다. 베타아밀로이드를 24시간 처리한 결과 TUNEL staining에 positive 한 세포의 수가 증가되었으며, 이

는 RGWE, RGW, RGV를 전처리 함으로써 효과적으로 억제되었다 (Fig. 7).

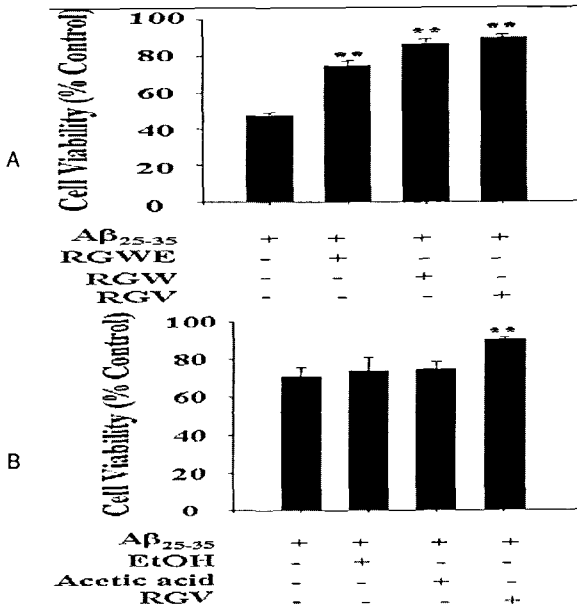


Fig. 6. 베타아밀로이드로 유도된 세포독성에 대한 RGW 및RGV의 보호효과 A. SH-SY5Y cells were pretreated with 1mg/ml RGWE, 1% (v/v) RGW or 0.5% (w/v) RGV for 7 days and incubated with b-amyloid for additional 24 h. B. Cells were treated with same concentrations of vehicles for 7 days before exposure to b-amyloid.

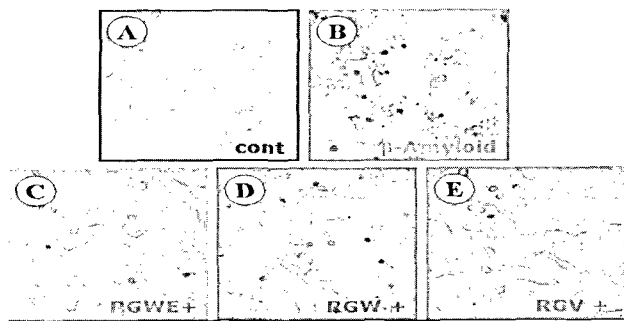


Fig. 7. 베타아밀로이드로 유도된 세포사멸에 대한 지황의 보호효과 A) Vehicle control; B) Cells were exposed to 10 mM b-amyloid for 24 h. C-F) Cells were pretreated with 1 mg/ml RGWE or 1% RGW, or 0.5% RGV for 7 days followed by exposure to b-amyloid for 24 h.

AP ₂₅₋₃₅	-	+	+	+	+
RGW (%)	-	-	1	-	-
RGV (%)	-	-	-	0.25	0.5
Bcl-2	[Western blot image]				
Bax	[Western blot image]				

Fig. 8. 세포사멸 유도 및 억제 관련 단백질 발현변화에 대한 지황의 효과 SH-SY5Y cells were incubated with 10 mM b-amyloid for 24 h in the presence or absence of indicated concentrations of RGW or RGV and harvested for Western blot analysis. Immunoblots of lysates from treated SH-SY5Y cells were probed with Bcl-2 (upper panel) and Bax (lower panel) antibodies.

한편, 이러한 아폽토시스를 조절에는 다양한 단백질과 유전자들이 관여하고 있으며, 그 중 대표적인 것이 Bcl-2 gene family

단백질 들이다. 그러므로, 이후 실험에서 SH-SY5Y 세포에 지황과 베타아밀로이드를 처리한 다음 Bcl-2와 Bax의 발현을 Western blot으로 측정하였다. SH-SY5Y 세포에 베타아밀로이드를 24시간 처리한 경우, anti-apoptotic한 기능을 갖는 Bcl-2 단백질 발현은 대조군에 비교하여 현저히 감소되었으며, 반대로 proapoptotic한 기능을 갖는 Bax의 양은 증가되었다 (Fig. 8). 한편, RGV를 전처리 한 경우 Bcl-2의 발현이 현저히 증가되었으며, 이는 RGV가 다른 형태의 지황에 비하여 높은 아폽토시스 억제 작용을 갖는 기전의 하나로 제시될 수 있다.

3. 산화적 스트레스에 대한 지황의 보호효과

지황이 베타아밀로이드로 인한 신경세포사멸에 대해 보호효과를 갖는 작용기전을 규명하기 위하여, 대표적인 활성산소종인 과산화수소를 처리하고 세포생존율을 비교측정 하였다. 과산화수소로 세포독성을 유도한 경우 300 mM에서 54%의 세포생존을 보였으며, 이는 RGW, RGV를 각각 1%, 0.5%로 처리한 경우 79%, 74%로 증가되었다 (Fig. 9). 한편, RGV의 농도를 0.5%로 고정하고, 과산화수소의 농도를 0.1, 0.3, 0.45, 0.6 mM로 처리한 다음 세포생존율을 측정한 결과 RGV가 산화적 세포사멸에 대해 보호효과를 가짐을 확인 할 수 있었다 (Fig. 9B).

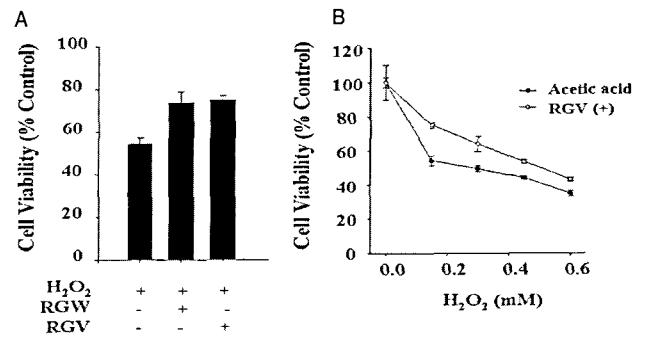


Fig. 9. 과산화수소로 유도된 세포독성에 대한 RGW 및 RGV의 보호효과 A. SH-SY5Y cells were pretreated with 1% RGW or 0.5% RGV for 7 days and incubated with 300 mM H₂O₂ for additional 24 h. B. Cells were incubated with indicated concentrations of H₂O₂ for 24 h in the presence or absence of 0.5% RGV. Cell viability was determined by the MTT reduction assay.

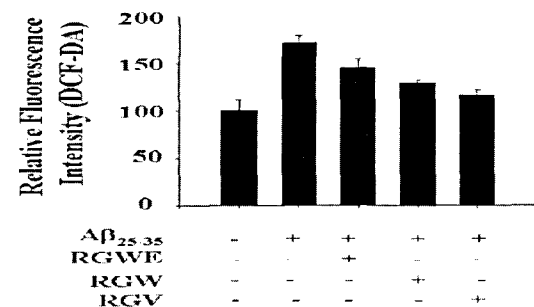


Fig. 10. 세포내 활성산소종 생성에 대한 지황의 억제 효과 Intracellular ROS levels were determined based on the DCF fluorescence, as described in the Materials and Methods. SH-SY5Y cells were pretreated with 1 mg/ml RGWE, 1% RGW or 0.5% RGV for 7 days and exposed to b-amyloid for additional 6 h.

이후 실험에서는 실질적으로, 베타아밀로이드로 유도된 세포독성에 활성산소종이 관여하는지 규명하기 위하여 세포 내 축적된 활성산소의 양을 DCF-DA dye를 사용하여 측정하였다.

DCF-DA는 세포 밖에서는 형광을 띠고 있지 않지만, 세포 내에 들어가 esterase에 의해 산화되는 경우 DCFH로 되며, peroxide와 결합하여 강한 형광물질인 DCF를 형성함으로써 형광현미경으로 관찰 가능하다. 베타아밀로이드를 처리한 경우 세포 내 강한 형광을 나타내는 세포의 수가 증가 된 것을 즉 세포 내 활성 산소종이 축적됨을 확인 할 수 있었으며, 이는 RGW, RGV를 전처리 함으로써 현저히 억제되었다 (Fig. 10).

4. 질소적 스트레스에 대한 지황의 보호효과

활성산소종 뿐만 아니라 활성질소종 (reactive nitrogen species: RNS) 또한 베타아밀로이드로 인한 신경세포 사멸에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 대표적인 활성질소종인 nitric oxide (NO)는 적절한 농도 범위 내에서는 유지되는 경우 세포의 다양한 생리적 기능을 매개하는 주요 신호전달 물질이지만, 과도하게 생성되는 경우 독성을 나타내게 된다. NO 자체로 유전자 및 단백질에 손상을 일으키며, 더욱이 활성산소종의 하나인 superoxide anion과 반응하여 산화력이 강한 peroxynitrite를 형성하는 경우 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다. NO 공여제인 SNAP를 세포에 처리한 경우 세포사멸 과정에서 나타나는 cleaved 된 형태의 PARP (cPARP) 및 proapoptotic한 Bax의 발현이 증가되었으며, 반대로 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현이 감소되었다 (Fig. 11). 한편, 이는 RGW 및 RGV를 0.01, 0.1, 1%로 전처리한 경우 농도의존적으로 대조군과 유의한 수준으로 회복되었다 (Fig. 11).

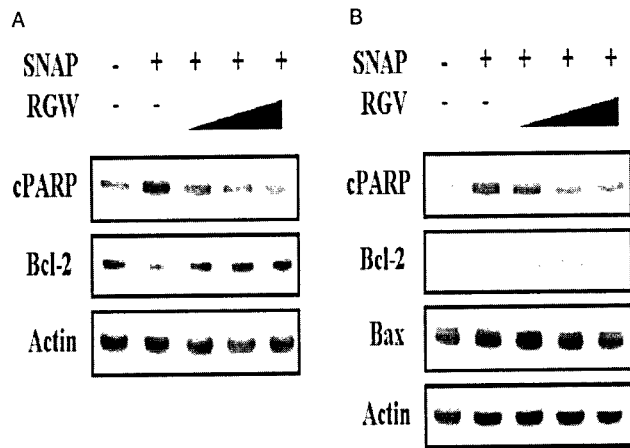


Fig. 11. SNAP로 유도된 세포사멸 지표 대한 RGW 및 RGV의 보호효과 Cells were incubated with 0.2 mM SNAP for 24 h in the presence or absence of RGW or RGV(0.01, 0.1, 1%) and harvested for Western blot analysis. Immunoblots of cell lysates were probed with anti-cPARP, anti-Bcl-2, and anti-Bax antibodies. Actin levels were measured for the confirmation of equal amount of protein loading.

이후 실험에서, 지황의 NO 생성에 미치는 효과를 검토하기 위하여 Griess assay를 수행하였다. 지황을 전처리 한 이후, 베타아밀로이드를 가하여 24시간 배양한 다음 배지에 존재하는 NO의 양을 생성된 nitrite 량으로 환산하여 측정하였다. 결과, SH-SY5Y 세포에서 NO의 생성량이 증가된 것을 확인 할 수 있었으며, 이러한 NO의 생성은 RGWE, RGW, RGV를 전처리 함으로써 억제되었다 (Fig. 12).

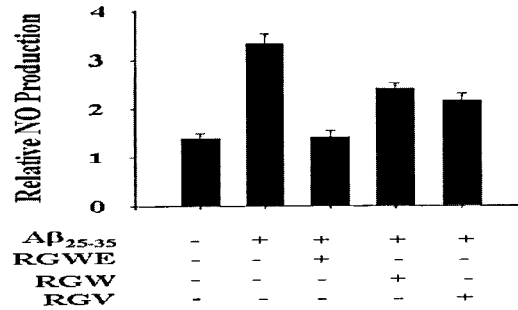


Fig. 12. NO 생성에 대한 지황의 억제 효과 효과 NO released into the medium was measured by using the Griess assay as described in the Materials and Methods. SH-SY5Y cells were pretreated with 1 mg/ml RGWE, 1% RGW or 0.5% RGV for 7 days and exposed to b-amyloid for additional 24 h.

5. 지황의 세포내 항산화능 증가 효과

지황이 항산화 보호작용을 갖는 작용기전을 규명하기 위하여 생체내에 존재하는 대표적인 항산화 효소들의 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. SH-SY5Y 세포를 RGWE, RGW, RGV이 1 mg/ml, 1%, 0.5 %로 포함된 배지에서 일주일 동안 배양한 다음 Trizol을 사용하여 RNA를 분리하고 RT-PCR을 수행하였다. RGV의 경우 RGWE, RGW와 비교하여 특히 HO-1과 catalase의 mRNA 발현을 현저히 증가시킴을 확인 할 수 있었으며 (Fig. 13), 즉 이는 RGV가 세포내 항산화 방어기전을 높게 유지하여 산화적 스트레스로 인한 세포사멸에 대하여 높은 저항성을 가짐을 나타낸다.

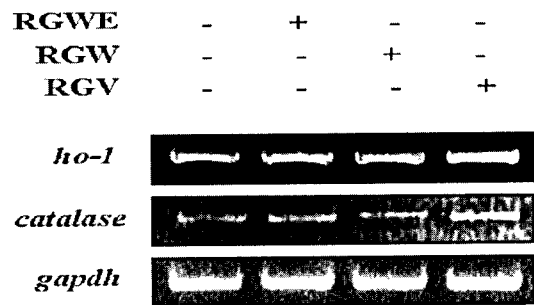


Fig. 13. 세포내 항산화 효소 발현에 대한 지황의 효과 RT-PCR showing ho-1 and catalase mRNA expression in SH-SY5Y cells exposed to 1 mg/ml RGWE, 1% RGW or 0.5% RGV for 7 days. The samples were processed as described in Materials and Methods. The gapdh level was shown to confirm equal amount of DNA loading.

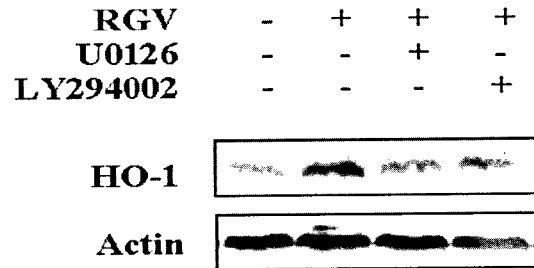


Fig. 14. 지황식초로 인한 ERK 및 Akt 활성화가 항산화 효소의 발현에 미치는 영향 SH-SY5Y cells were incubated with 0.5% RGV in the absence or presence of each inhibitor (LY294002: 25 mM; U0126: 10 mM). Protein from whole cell lysates was resolved bySDS-PAGE and analyzed by Western blot analysis using anti-HO-1 antibody. Actin levels were measured for the confirmation of equal amount of protein loading.

한편, RGV가 catalase 및 HO-1 등의 항산화 효소의 발현을

높게 유지하는 기전을 규명하기 위하여, 이를 조절 가능한 인산화 효소의 활성화를 인산화된 형태에 특징적으로 결합하는 항체를 사용하여 Western blot으로 관찰하였다. RGV를 일주일 동안 처리한 경우 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 및 Akt/protein kinase B (PKB)의 인산화가 높게 나타남을 관찰할 수 있었으며, 반대로 ERK와 Akt의 상위 인산화 효소인 MEK1/2, PI3K의 억제제인 U0216와 LY294002를 각각 전처리한 경우 HO-1의 단백질 발현이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 14). 즉, 이는 RGV의 경우 ERK 및 Akt의 활성화를 통하여 HO-1의 발현을 증가시킴으로써 항산화 방어기전을 강화함을 나타낸다.

8. 스코폴라민으로 인한 기억력 손상에 대한 지황의 효과

Scopolamine으로 기억력 손상을 유발한 단기간 실험동물 모델에서 상기 실험을 수행한 결과, 대조군의 경우 (5마리, normal) training 기간이 길어질수록 플랫폼을 찾아가는 시간이 현저히 감소되었으며, scopolamine만 복용으로 투여한 랫트 (5마리, SC)의 경우 training 기간과 관계없이 거의 플랫폼을 찾아가지 못하는 것을 확인 할 수 있었다. 이에 비하여 지황을 800 mg/kg/day로 경구 투여한 랫트 (5마리, SC + RGWE)는 실험기간인 4일간 중 마지막 날 플랫폼을 찾아가는 시간이 15% 정도 감소되었다 (Fig. 15). 하지만, 지황주 (5마리, SC + RGW), 지황식초 (5마리, SC + RGV)를 경구로 투여한 경우 현저한 기억력 향상효과를 관찰 할 수 없었으며, 이는 지황으로부터 지황주, 지황식초를 만드는 과정에서 상대적으로 생지황 함량이 낮아짐에 기인하는 것으로 사료된다. 세포배양 실험의 결과를 고려하는 경우 생지황, 지황주, 지황식초를 장기간 투여하거나, 지황주 및 지황식초의 조제 과정에서 생지황의 함량을 증가시켜 준다면 더 높은 기억력 향상 효과를 기대 할 수 있을 것이다.

결 론

본 연구에서는 신경세포 독성실험에 널리 활용되고 있는 SH-SY5Y neuroblastoma 세포주를 사용하여, 베타아밀로이드로 유도되는 신경세포 사멸에 대한 생지황, 지황주 및 지황식초의 보호효과를 다각적으로 비교 검토하고, 그 작용기전을 규명하고자 한 바 다음과 결론을 얻었다.

세포생존율을 MTT reduction assay로 측정된 결과, 베타아밀로이드를 농도별로 처리한 경우 세포독성이 유발되었으며, 이는 생지황, 지황주, 지황식초를 전처리 함으로써 억제되었다. 한편, 베타아밀로이드로 인한 세포독성은 지황식초를 전처리 한 경우 가장 효과적으로 감소되었다. 베타아밀로이드를 SH-SY5Y 세포에 처리하였을 때 아포토시스를 통한 능동적 세포사멸이 진행되었으며, 이는 생지황, 지황주, 지황식초에 의해 감소되었다. 세포사멸을 억제하는 단백질인 Bcl-2의 발현은 지황식초를 처리한 경우 가장 높게 증가되었다. 지황의 항산화 효능을 검토하기 위하여 대표적인 활성산소종인 과산화수소를 사용하여 세포독성을 유발한 경우, 생지황, 지황주, 지황식초를 전처리 함으로써 보호효과를 관찰할 수 있었다. 베타아밀로이드를 처리한 경우 대표적인 활성질소종인 nitric oxide의 생성이 증가되었으며, 이는 생지황, 지황주, 지황식초에 의해 억제되었다. 지황이 항산화 보호효과를 나타내는 작용기전을 규명하기 위하여 세포내 항산화 효소의 발현을 RT-PCR로 검토한 결과, 지황식초에 의하여 heme oxygenase-1 및 catalase의 발현이 현저히 증가됨을 확인할 수 있었다.

이상의 결과는 지황이 베타아밀로이드 처리와 같은 치매 유발 독성에 대해 뇌신경세포 사멸을 보호하는 효과가 있음을 보여주는 것으로, 향후 알츠하이머병의 예방 및 치료제로 이용될 가능성을 제시한다. 특히, 지황식초 형태로 변형시킨 경우 생체내 항산화 방어능 강화를 통하여 더 높은 뇌신경세포 보호효과를 가질 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Yankner, B.A. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16:921-932, 1996.
2. Selkoe, D.J. Amyloid b-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 271:18295-18298, 1996.
3. Behl, C. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog. Neurobiol.* 57: 301-323, 1999.
4. 대한동의생리학회편. 동의생리학. 경희대학교 출판국, pp 389-409, 1993.
5. 홍원식. 정교황제내경소문. 서울, 동양의학연구원출판부, p 92, 216, 1985.
6. 이재희. 기억과 신의 상관성에 대한 실험적 연구. 동의생리학회지 6:59-76, 1991.
7. 하태현. 신기능이 학습과 기억에 미치는 영향에 대한 실험적

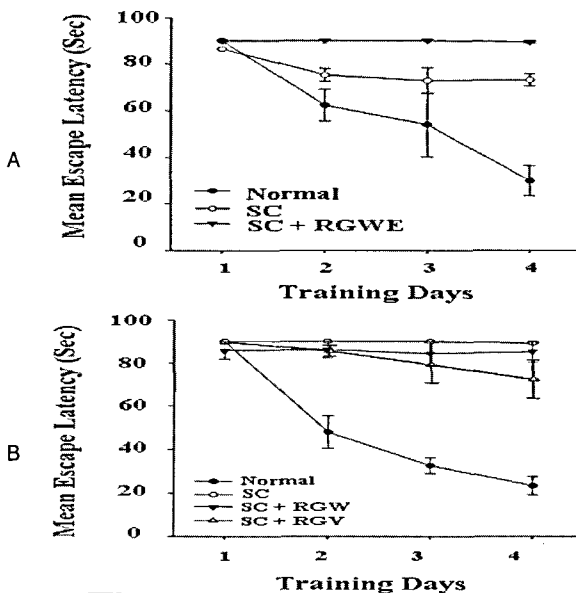


Fig. 15. Scopolamine으로 인한 기억력 손상에 미치는 지황의 효과 (Water-maze test) Mean escape latency for the visible platform task was expressed as a function of trials. Each rat was subjected to three trials per day for 4 consecutive days.

- 연구. 동의생리학회지 15:1-15, 2000.
8. Howes, M.J., Houghton, P.J. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75: 513-527, 2003.
 9. Aruoma, O.I., Bahorun, T., Jen, L.S. Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutat. Res.* 544:203-215, 2003.
 10. Steele, M., Stuchbury, G., Munch, G. The molecular basis of the prevention of Alzheimer's disease through healthy nutrition. *Exp. Gerontol.* 2006 in press.
 11. 하태열, 안지윤. 치매 예방 및 치료소재의 개발 동향. *식품기술* 16:55-63, 2003.
 12. Bastianetto, S., Quirion, R. EGb 761 is a neuroprotective agent against b-amyloid toxicity. *Cell. Mol. Biol.* 48: 693-697, 2002.
 13. Kim, D.S., Park, S.Y., Kim, J.K. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from Ab1-42 insult. *Neurosci. Lett.* 303:57-61, 2001.
 14. Lim, G.P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S.A., Cole, G.M. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci.* 21:8370-8377, 2001.
 15. Scapagnini, G., Colombrita, C., Amadio, M., D'Agata, V., Arcelli, E., Sapienza, M., Quattrone, A., Calabrese, V. Curcumin activates defensive genes and protects neurons against oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8:395-403, 2006.
 16. Park, C.H., Choi, S.H., Koo, J.W., Seo, J.H., Kim, H.S., Jeong, S.J., Suh, Y.H. Novel cognitive improving and neuroprotective activities of *Polygala tenuifolia* Willdenow extract, BT-11. *J. Neurosci. Res.* 70:484-492, 2002.
 17. 허준. 동의보감. 서울, 남산당, p 95, 147, 148, 395, 1981.
 18. Naito, R., Tohda, C. Characterization of anti-neurodegenerative effects of *Polygala tenuifolia* in Ab25-35-treated cortical neurons. *Biol. Pharm. Bull.* 29:1892-1896, 2006
 19. Jia, H., Jiang, Y., Ruan, Y., Zhang, Y., Ma, X., Zhang, J., Beyreuther, K., Tu, P., Zhang, D. Tenuigenin treatment decreases secretion of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein in cultured cells. *Neurosci. Lett.* 367:123-128, 2004.