蔓蔘의 과산화수소에 의한 SK-N-MC의 세포사에 미치는 영향

이선구*

상지대학교 한의과대학 병리학교실

Protection of *Codonopis pilosula* Extract against Cell Death of SK-N-MC Neuroblastoma Cells Treated with H_2O_2

Seon Goo Lee*

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

The purpose of this study was to identify the protective effect of *Codonopis pilosula* extract on cell death induced by H_2O_2 in SK-N-MC neuroblastoma cells. We measured the antioxidant effect by DPPH radical scavenging analysis, BSA analyssis and examined the cell viability by crystal violet and cytochrome C, Bax, Bcl-2, p53, p21 by using Western blot analysis. *Codonopis pilosula* extract scavenged DPPH radical in a dose-dependent manner and shown direct free radical scavenging effect, suggested that *Codonopis pilosula* extract have antioxidant effect in vitro. Treatment of cells with hydrogen peroxide, a reactive oxygen species, was to induce cell death and pretreatment with *Codonopis pilosula* extract attenuated the occurrence of H_2O_2-induced cell death. To elucidate the protective mechanisms of action of *Codonopis pilosula* extract, Western blot analyses for Bcl-2 and Bax expression and cytochrome c release were carried out. Pretreatment with *Codonopis pilosula* extract induced the expression of Bcl-2 and suppressed the release of cytochrome c and Bax into the cytosol, thereby arresting H_2O_2-induced apoptotic cell death. Especially p21 and p53 were decreased prior to H_2O_2 treatment. These results suggest that *Codonopis pilosula* extract is associated with the cell cycle and anti-apoptotic cell death.

Key words : *Codonopis pilosula*, SK-N-MC, DPPH, BSA, apoptosis

서 론

蔓蔘은 당삼의 뿌리를 건조한 것으로, saponin과 미량의 alkaloid, sucrose 등이 포함되어 있으며 性은 平, 無毒하고 味는 甘하고 脾經과 胃經에 귀경하며, 補中 益氣 生津의 효능으로 脾胃虛弱, 氣血兩虧, 體倦無力, 食少, 口渴, 久瀉, 脫肛에 사용하는 補氣藥이다[1].

apoptosis는 세포의 수축, 염색질의 응축과 DNA의 분해와 같은 특징을 가지며 세포를 죽음으로 이르게 하는 동적이고 계획적인 과정으로, 조직의 발생과 항상성 유지 및 손상되거나 원하지 않는 세포의 사멸에 있어서 매우 중요한 역할을 한다[2].

* 교신저자 : 이선구, 강원도 원주시 우산동 660 상지대학교 한의과대학
· E-mail : returnto@mail.sangji.ac.kr · Tel : 033-730-0664
· 접수 : 2008/03/01 · 채택 : 2008/04/10

인체의 신진대사 과정 중 부산물로 생성되는 활성산소(Oxygen free radicals)중에서 H_2O_2(Hydrogen peroxide)는 O_2(superoxide), OH^-(hydroxy radical)등을 포함하는 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)의 하나로 심혈관계나 노화 등 각종 질환의 발병인자로 인식되고 있다[3].

활성산소종은 대사 과정 중에서 생성되며, 체내의 에너지 생성, 지질이나 단백질의 대사과정 그리고 각종 염증성 반응에서 정상적으로 발생되나 항산화 체계가 약화되거나 과도한 산화적 스트레스가 가해지면 ROS의 생성이 더욱 증가되어 산화적 손상을 촉진시키며[4], ROS의 증가와 항산화효소의 고갈은 세포의 생존과 활동이 저해되어 결국 apoptosis를 촉진시킨다[5,6].

이에 본 연구에서는 補中 益氣 生津의 효능이 있는 補氣藥인 만삼을 이용하여, DPPH 소거효과, BSA를 이용한 항산화효과, SK-N-MC세포에 대한 세포생존율, Cytochome C, Bax, Bcl-2, P21, P53의 발현을 측정하고 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 만삼 추출물 및 용액의 제조

만삼 300 g을 물 3000 cc와 함께 전탕한 후 전탕액을 동결건조하여 건조 엑기스 35 g을 얻었다. 실험에 필요한 농도가 되도록 조제하여 각 실험에 사용하였다.

2) SK-N-MC 신경세포주의 세포배양

SK-N-MC 신경세포주는 한국세포주은행에서 구입하여 RPMI 1640(GibcoBRL, USA)에 5% FBS와 Fungizone를 첨가하여 37℃, 5% CO_2에서 계대 배양하였다.

2. 실험방법

1) DPPH 라디칼 소거효과

DPPH(1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 150 ㎛M 되게 각각 넣은 후 동량의 만삼 추출물을 각각 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 ㎍/㎖ 씩 혼합하였다. 그 후 30분간 실온에서 차광한 후 방치하였다. 96 well plate에 200 ㎕ 씩 3개를 넣어 540 nm에서 측정하여 흡광도를 측정하였다.

2) BSA를 이용한 항산화 효과 검증

1.5 ㎖ tube에 각 농도별 만삼 10 ㎕, H_2O_2 5 ㎕, Cu^{2+} 5 ㎕, PBS 42.5 ㎕를 섞은 후 37℃ water bath에서 2시간 동안 반응하였다. 그 후 Bovine serum albumin(BSA, Sigma, U.S.A)을 12.5 ㎕씩 첨가하고 37℃ water bath에서 2시간 동안 반응하였다. 그 후 5X Loading dye 12 ㎕를 첨가한 뒤, 12.5% SDS-PAGE를 실시하고, Comassie Blue 시약으로 Gel 염색과 탈염색을 실시 후 Gel을 Scanning (Humax, 한국)하였다.

3) SK-N-MC 신경세포주 배양과 세포생존율 측정

SK-N-MC 신경세포주를 한국세포주은행에서 구입하여 RPMI (GibcoBRL, USA)에 5% FBS와 Fungizone를 첨가하여 37℃, 5% CO_2에서 배양하였다. 세포생존율을 측정하기 위하여 24-well culture plate에 각 well 당 2×10^5 cells를 넣어 배양한 후 만삼 추출물을 각각 0 ㎍/㎖ , 5 ㎍/㎖ , 20 ㎍/㎖ , 50 ㎍/㎖ , 100 ㎍/㎖ 씩 농도로 처리하여 24시간 더 배양하였다. 24시간이 지난 후 세포배양액을 제거하고 PBS로 두 번 washing 한 후 0.5% crystal violet(in 20% methanol)을 300 ㎕/well로 첨가하여 상온에서 5분간 방치한 다음 tap water로 재빨리 세척한 후 건조시켰다. 다음 1% SDS를 100 ㎕ 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 570 nm(reference 450 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

4) Western blot 분석

(1) 단백질 추출

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1×10^7의 세포 당 lysis buffer(10 mM Tris · HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 1% SDS) 100 ㎕로 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 표준곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA(1 ㎍/㎕)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, 16 ㎍/㎕에 BCA 용액 100 ㎕를 첨가하여 20분간 37℃에서 방치한 다음 흡광도 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2 ㎕와 BCA 용액 100 ㎕을 섞은 뒤 20분간 37℃에서 방치한 후 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

(3) 전기영동 및 Western blot

추출한 단백질 50 ㎍를 Cytochome C, Bax, Bcl-2, p53, p53, Actin를 확인하기 위하여 15% SDS-polyacrylamide SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% milk을 함유한 PBS-Tween(0.01%)에서 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. 이 membrane을 cytochrome c(PharMingen, USA), Bax(Santa Cruz, USA), Bcl-2(Santa Cruz, USA), p53(Santa Cruz, USA), p21(Santa Cruz, USA), Actin(Santa Cruz, USA)의 항체를 사용하여 1시간동안 상온에서 shaking하면서 hybridization 시키고 난 후 PBS-Tween 20으로 세척하고, membrane을 horseradish peroxidase으로 conjugated된 antimouse IgG 또는 antirabbit IgG 로 다시 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. Membrane을 PBS-Tween으로 네번 세척한 후 chemiluminescence 시약(Pierce, USA)으로 반응시킨 후 Fugi X-ray film으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

실험결과

1. DPPH 라디칼 소거효과

만삼 추출물의 항산화효과를 DPPH 라디칼에 대한 소거효과를 통하여 알아보았다. 만삼 추출물을 각각 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 ㎍/㎖씩 0분, 15분, 37분, 60분을 반응시켜 본 결과 농도에 따라 각각 100, 113.2, 107.3 88, 65.4 48.3 35.9, 31.2, 32.5, 32.1, 32.9, 32.9% 나타냈다. 즉 농도에 따라 계속적으로 소거효과가 높아짐을 보여주었다(Fig. 1).

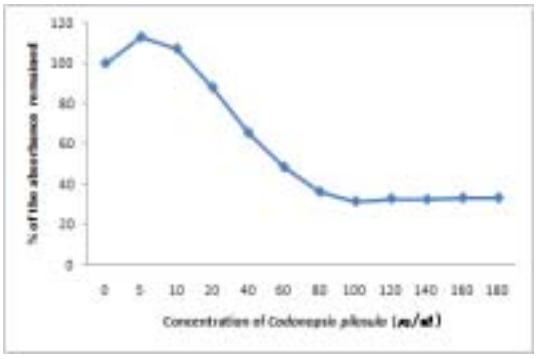

Fig. 1. Scavenging effect of *Codonopis pilosula* extract using DPPH radical.

2. BSA를 이용한 항산화 효과

Bovine Serum albumin(BSA)를 이용하여 항산화 효과를 검

증하였다. 만삼추출물의 농도를 0, 5, 20, 100 ㎍/㎖로 사용하였으며, 만삼추출물 5 ㎍/㎖에서부터 방어능이 나타났다(Fig. 2).

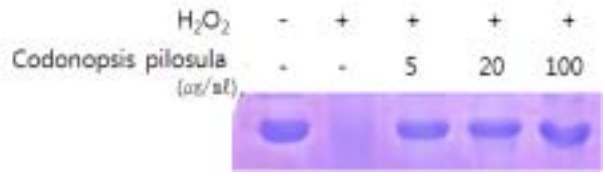

Fig. 2. Protection effects of antioxidants on BSA degradation against H_2O_2.

3. SK-N-MC 신경세포주에서의 세포보호효과

직접적으로 세포보호효과를 알아보기 위하여 과산화수소를 처리한 SK-N-MC 신경세포주에 동시에 만삼 추출물을 처리하였다. 처리한 결과 각각 0 ㎍/㎖, 5 ㎍/㎖, 20 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖에서 생존율이 100, 80.1, 81.4, 85, 64.1%로 나타났다. 과산화수소를 처리한 세포의 경우 세포사가 일어나 세포생존율이 떨어졌으나, 만삼추출물을 처리한 세포에서는 보호효과가 나타나 생존율이 높아짐을 보여주었다(Fig. 3).

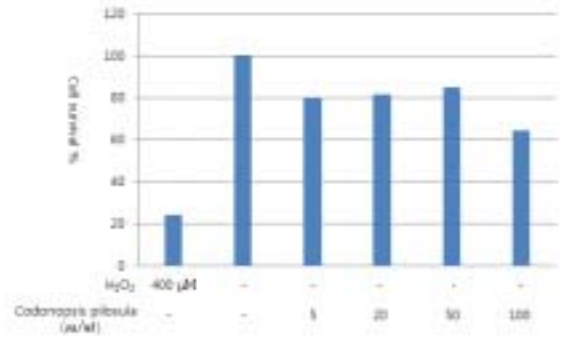

Fig. 3. The protective effect of *Codonopis pilosula* extract in SK-N-MC neuroblastoma cell.

4. Western Blot

세포사와의 관계를 알아보고자 항체를 이용한 Western blot 분석에서 과산화수소수에 의한 세포사가 일어날 때 만삼추출물을 처리하면, Cytochome C와 Bax의 발현은 억제되고, Bcl-2의 발현은 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4).

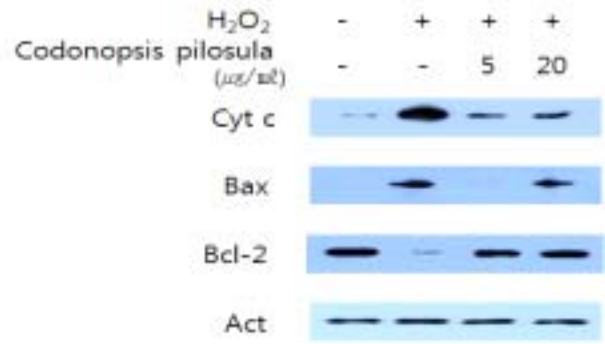

Fig. 4. The anti-apoptosis effect of *Codonopis pilosula* extract in SK-N-MC neuroblastoma cell.

또한, 세포주기에도 관여하여 p53과 p21의 발현을 감소시켰다(Fig. 5).

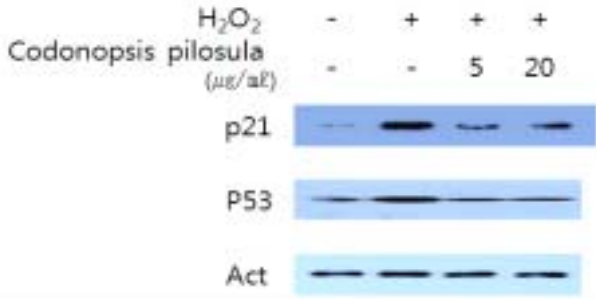

Fig. 5. The protective effect of *Codonopis pilosula* extract against H_2O_2-cell cycle arrest.

고찰 및 결론

만삼은 보기약으로, 인삼의 대용품으로 사용되는 것으로 알려져 있으며, 최근까지 약리 및 화학성분에 대한 연구가 진행[7,8]되었으나 효과 검증에 연구는 미미한 실정이다.

활성산소종은 Apoptosis 과정에서 중요한 요소로 작용되는데[9], 체내 항산화계가 산화적스트레스를 중화하지 못하면 Apoptosis가 유발되고[10], 만성질병에서도 활성산소종이 관여한다[11]. 정상적인 생리 조건하에서는 세포대사 과정에서 생성된 ROS의 수준과 내인성 항산화물의 균형이 유지되어 산화적 손상으로부터 조직을 보호하게 되나, 여러 가지 요인으로 과도한 대사 과정이 일어나게 되면, 활성산소종의 발생이 촉진되어 ROS 수준과 내인성 항산화 기전과의 균형이 무너져 ROS가 축적됨에 따라, 세포내 지질의 과산화, DNA와 단백질의 산화로 인한 조직 손상, 청력감소와 같은 퇴행성 신경질환, 면역결핍증, 동맥경화, 심장병, 고혈압, 당뇨병, AIDS, 암등을 유발하는 병리학 요인으로 알려지고 있다[12].

본 연구에서 만삼의 항산화능을 두가지 방법으로 측정하였다. DPPH법에 의하면, 만삼추출물을 여러 가지 농도로 처리하였을 때, 농도의존적으로 DPPH라디칼을 소거하는 결과를 얻었다(Fig. 1). BSA의 경우도 CU^{2+}/H_2O_2로 유발된 BSA의 degradation을 만삼 추출물이 억제하였다(Fig. 2).

Apopsosis에 작용하는 과정 중에 만삼추출물이 세포에 독성으로 작용하는지 알아보고자 직접 SK-N-MC세포에 만삼추출물을 처리하여 본 결과 대조군으로 사용된 H_2O_2의 산화적 스트레스에 비하여 독성이 적은 것으로 나타났다(Fig. 3). Apoptosis는 세포 내부에 프로그램된 신호를 따라 여러 유전자 및 단백질들의 발현과 활성이 조절되는 일련의 과정으로[13], 단백질 분해효소인 caspase가 세포내에서 분해되면서 그 자극에 의해 미토콘드리아 막에 존재하는 cytochrome c가 세포질 밖으로 방출되고 여러 가지 기전이 연속으로 일어나면서 유도되며, 종양억제 유전자로 알려진 p53, p21등도 관여된다. Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다[14,15]. 이들은 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유

리시켜 종양억제 유전자인 p53, cysteine-related protease인 caspase, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다[16,17]. 그리고 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있기 때문에 두 단백질의 상대적인 발현의 양적인 차이가 apoptosis 유발에 가장 중요한 요인으로 작용하며[18], 또한 세포고사를 유도할 때 bcl-2는 감소하고 Bax는 증가하므로 bcl-2와 bax의 ratio가 중요한 의의를 가진다고 알려져 있으며[19], bcl-2는 세포의 독성 또는 고사를 저해하는 단백질로, bax는 세포고사 또는 독성을 유도하는 단백질로 보고되고 있다[20-22]. p53은 종양억제유전자 중의 하나로, 세포분화 과정 중 손상받은 DNA를 세포주기의 하나인 G1기에서 치유하여 정상세포로 만든 후에 S기로 넘어가게 하고, 만약 치유가 되지 않으면 apoptosis를 거쳐 손상된 DNA가 증식되지 않도록 미리 제거하는 기능을 한다. 이 과정에서 p21단백질이 관여하는데 p53에 의해 불활성화된 p21 단백이 cdk2-cyclinE, cdk4-cyclinD 복합체와 결합하여 이를 불활성화시켜 세포주기가 G1에서 S기로 넘어가는 것을 막는다[23]. p21 유전자는 세포가 독성이나 방사성등에 의해 손상을 입을 경우 세포의 생장을 중단시키는 일종의 제동장치 역할을 하는 유전자에 해당된다[24].

본 연구에서는 H_2O_2로 SK-N-MC세포에 산화적 스트레스로 apoptosis를 유도하고, 만삼추출물을 처리하였을 때 Cytochrome C와 Bax의 발현을 억제하였고, Bcl-2의 발현은 증가시켜 apoptosis를 억제하였다(Fig. 4). 또한, p21와 p53의 발현을 억제시켰다(Fig. 5). 이는 만삼추출물이 산화적 스트레스에 의한 apoptosis를 방어한다는 것을 의미한다.

만삼 추출물의 SK-N-MC 신경세포주에 대한 세포보호 효과에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

DPPH 라디칼 소거효과는 만삼 추출물의 농도가 증가할수록 증가하였다. BSA를 이용한 항산화효과는 5 ㎍/㎖에서부터 나타났다. 신경세포주의 세포보호효과는 5-50 ㎍/㎖까지 있었고, 100 ㎍/㎖에서는 감소하였다. 세포사와의 관계를 western Blot으로 분석한 결과 cytochrome C와 Bax의 발현을 감소되었고, BCl-2 는 증가되었고, p53, p21는 감소되었다.

이상의 결과로 만삼추출물은 항산화능을 가지고 있으며, 과산화수소수로 처리된 SK-N-MC 신경세포주에서 세포사를 억제할 뿐만 아니라, 세포주기에도 관여하여 세포가 생존하도록 하는 세포보호효과가 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 상지대학교 2005년도 전반기 교내연구비로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학. pp 533-534, 1991.
2. wyllie, A.H. Apoptosis Br J cancer 67: 205-208, 1993.
3. 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.
4. 채창훈, 김지연, 박해준, 안응남, 김현태. 운동유발성 Apoptosis에 미치는 α-lipoic acid의 방어효과. The korean Journal of Physical Education 45(2):481-489, 2006.
5. Groswami, R., Reed, J.C. Dose ceramide play a role in neural cell apoptosis?. J. Neurosci. Res. 60: 141-149, 2000.
6. Carmody, R.J. Reactive oxygen species as mediators of photoreceptor apoptosis in vitro. Exp. Cell. Res. 248: 520-530, 1999.
7. 박종희, 권성재, 오종영. 한약 만삼의 생약학적연구. 생약학회지 36(1):21-25, 2005
8. 이인란. 만삼엑기스가 임파성백혈병 P388에 미치는 영향. 생약학회지 11(3):104-107, 1980.
9. Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. Free Radic Biol Med 29(3-4):323-333, 2000.
10. Steensberg, A., Morrow, J., Toft, A.D., Bruunsgaard, H., Pedersen, B.K. Prolonged exercise, lymphocyte apoptosis and F2-isoprostanse. Eur. J. Appl. Physiol. 87: 38-42, 2002.
11. Martin, G.M. Austad, S.N, Johnson, T.E. Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and envrionmental stresses. Nature Genet. 13: 25-34, 1996.
12. 황지영, 장혜순, 유현희, 문해닮아, 전병훈, 유용욱. 갈근으로부터 추출한 β-sitosterol이 HEI-OC1 세포의 항산화효소활성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 21(4):884-890, 2007.
13. 박혜련. 나문희. 윤용갑. 전병훈. 안원근. K562세포의 apoptosis 유도에 미치는 저근백피의 효과. 동의생리병리학회지 18(6):1728-1732, 2004.
14. Chiarugi, V., Magnelli, L., Basi, G. Apoptosis and the cell cycle. Cell. Mol. Biol. Res. 40: 603-612, 1994.
15. Nagata, S. Apoptosis by death factor. Cell 88: 355-365, 1997.
16. Hattori, T., Ookawa, N., Fujita, R., Fukuchi, K. Hetero-colorectal cancer. Acta Oncologica 39(4):495-500, 2000.
17. Tudor, G., Aguilera, A., Halverson, D.P., Laing, N.D., Sausville, E.A. Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential of Bad, Bcl-2 and Bcl-xL protein levels. Cell Death & Differentiation 7(6):574-586, 2000
18. 최영현. 최우영. 최병태. 이용태. 이원호. 비소화합물에 의한 A549 폐암세포의 증식억제에 관한 연구. 동의생리병리학회지 19(4):1050-1054, 2005.
19. Condorelli, G., Morisco, C., Stassi, G., Notte, A., Farina, F., Sgaramella, G., de Rienzo, A., Roncarati, R., Trimarco, B., Lembo, G. Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2

during left ventricular adaaptations to chronic pressure overload in the rat. Circulation 99(23):3071-3078, 1999.
20. Vander, Heiden, M.G., Thompson, C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?. Nature Cell Biology 1(8):E209-216, 1999
21. Kroemer, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. Nature Medicine 3(6):614-620, 1997.
22. Brandy, H.J., Gil-Gomez, G. Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. International Journal of Biochemical Cell Biology 30(6):647-650, 1998.
23. Lane, D.P. A death in the life of p53. Nature 362(6423): 849-852, 1993.
24. 안원근. 노화과정에 있어서 p21 유전자의 역할. 생화학분자생물학뉴스, 한국 생화학분자생물학회 23(2):80-81, 2003.