

熟地黄 추출물이 H₂O₂에 의해 유도된 ECV304 세포의 apoptosis에 미치는 영향

김인규 · 주성민 · 박진모 · 전병제 · 양현모 · 김원신¹ · 전병훈*

원광대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 원광대학교 자연과학대학 생명과학부

Protective Effect of *Rehmanniae Radix Preparata* Extract on H₂O₂-induced Apoptosis of ECV304 Cells

In Gyu Kim, Sung Min Ju, Jin Mo Park, Byung Jae Jeon, Hyun Mo Yang, Won Sin Kim¹, Byung Hun Jeon*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, 1: Division of Natural Science, College of Natural Sciences, Wonkwang University

Rehmannia Radix Preparata (RRP) used to nourish Eum and enrich blood for consumptive fever, aching, and limpness of the loins and knees, and to replenish essence for tinnitus, premature greying of beard and hair. In the present study, we studied about the protective effect of RRP on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human vascular endothelial cells. ECV304 cells were preincubated with RRP (100, 200, 300 and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 12hr and then treated with 600 μM H₂O₂ for 12hr. The protective effects of RRP on H₂O₂-induced apoptosis in ECV304 cells was determined by using MTT assay, FDA-PI staining, flow cytometric analysis, caspase-3 activity assay, ROS assay and western blot. The results of this experiment showed that RRP inhibited H₂O₂-induced apoptosis and ROS production in ECV304 cells. Moreover, RRP increased ERK activation that decreased in H₂O₂-treated ECV304 cells, and inhibited p38 and JNK activation. Furthermore, RRP increased expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in H₂O₂-treated ECV304 cells. Also, HO-1 protein expression induced by RRP was reduced by the addition of ERK inhibitor (PD98059) in H₂O₂-treated ECV304 cells. These results suggest that protective effect of RRP on H₂O₂-induced oxidative stress in ECV304 cells may be associated with increase of ERK activation and HO-1 protein, and reduction of p38 and JNK activation.

Key words : *Rehmannia Radix Preparata*, ECV304 cells, apoptosis, oxidative stress, ROS, H₂O₂, caspase-3, MAPKs, ERK, p38, JNK, HO-1

서 론

혈관을 조성하는 세포 가운데 혈관내피세포는 혈관내막의 가장 내부에 위치하여 혈관벽에 혈액성분이 침습되는 것을 보호하는 역할을 할 뿐만 아니라 혈소판의 기능을 억제하는 성분을 생산하여 혈액 응고를 방지하는 기능을 함으로써 혈액의 정상순환을 도와준다. 혈관내피세포를 손상시키는 인자는 여러 가지로 연구되고 있으며, 그 중 활성산소는 화학적인 작용을 통한 병리적인 작용으로 혈소판의 침착, 응집을 형성하고 동맥벽을 약화시켜 혈관 내막의 파열, 동맥류와 출혈 등을 일으키기도 한다. 혈관

내피세포의 손상은 결국 죽상동맥경화증의 발생을 촉진하게 되는데 뇌, 심장, 신장 및 기타 부위에서 발생한 죽상동맥경화증은 협심증, 심근경색 등의 심장질환과 뇌경색, 뇌동맥류 등 뇌혈관 질환의 중요한 요인이 된다¹⁻³⁾.

활성산소종(Reactive oxygen species : ROS)은 산소를 이용한 산화과정 중에 발생하며, 불특정 생화학적 물질들과 반응하여 세포에 상해를 주고 신호전달체계에 영향을 미쳐 심한 경우 세포 죽음을 유도하기도 한다^{4,5)}. 산화적 손상(oxidative stress)은 활성산소종의 증가와 항산화 방어시스템의 기능손상 사이에서의 불균형과 같이 정의된다⁶⁾. ROS는 일반적으로 superoxide anion(O₂⁻), hydroxyl radicals(OH), hydrogen peroxide(H₂O₂) 등과 같은 종류들이 있고, 이것들은 DNA, protein, lipid와 같은 다양한 분자들에 대해 반응할 수 있고 손상을 줄 수 있다⁷⁾.

* 교신저자 : 전병훈, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : omdjbh@wku.ac.kr · Tel : 063-850-6843

· 접수 : 2008/12/17 · 수정 : 2009/01/06 · 채택 : 2009/01/30

Heme oxygenase-1(HO-1)은 iron, carbon monoxide(CO), biliverdin의 heme을 분해하는 효소이다⁸⁾. HO는 3가지 형태로 분류되는데, HO-1은 다양한 스트레스에 의해 유도되는데 반해 HO-2, HO-3는 다수의 조직에서 발현이 된다⁹⁾. HO-1발현은 산화적 스트레스에 의해 유도되지만, 세포에 따라서 특정한 자극 없이 발현되기도 한다¹⁰⁾.

熟地黄은 지황의 뿌리를 가공한 후 썰서 햇볕에 말린 것으로 월경부조, 빈혈, 두통, 하복통 등의 병증 치료에 사용되며, 항산화 효과, 항돌연변이 효과, 간암세포 및 폐암 세포주에 대한 성장저해 효과 및 혈당 강하 효과 등이 보고되어 있다¹¹⁻¹³⁾.

본 연구에서는 혈관내피세포의 산화적 손상에 대한 熟地黄의 방어기전을 알아보기 위하여 H₂O₂에 의한 혈관내피세포의 산화적 손상을 유도하여 熟地黄의 보호 효과에 대한 기전을 규명하고자 熟地黄을 전 처리한 후 혈관내피세포에서의 H₂O₂에 의한 세포 생존율, caspase 활성, ROS생성, MAPKs활성, HO-1발현 변화를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 세포배양

ECV304 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)로 부터 분양받았고, 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin이 포함된 DMEM 배지 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada)를 사용하여 37℃와 5% CO₂ 상태에서 배양하였다.

2. 시약 및 항체

熟地黄 에탄올 추출물은 한국생명공학연구원 내 한국식물추출물 은행에서 분양받았다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid(MTT), 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA), Hydrogen peroxide(H₂O₂), Fluorescein diacetate(FDA), Propidium iodine(PI), Ribonuclease A(RNase A), Protease inhibitor cocktail은 Sigma-Aldrich Chemical(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Anti-heme oxygenase-1 항체는 Santa Cruz Biotechnology, INC.(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. Anti-cleaved caspase-3 (p20), anti-PARP, anti-ERK, anti-phospho-ERK, anti-p38, anti-phospho-p38, anti-JNK, anti-phospho-JNK 항체들은 Cell Signaling Technology INC.(Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다. N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-pNA(Ac-DEVD -pNA), PD98059은 Calbiochem(La Jolla, CA, USA)로부터 구입하였다.

3. 세포독성검사

세포생존률은 MTT 방법을 사용하여 측정하였다. MTT 검사는 미토콘드리아의 숙신산 탈수소효소에 의해 MTT가 formazan으로 환원되는 원리를 기초로 하고 있다. 세포는 1×10⁵cells/mL

로 12 well 플레이트에 12시간 배양하였다. 세포는 熟地黄 추출물을 12시간 전 처리하고 H₂O₂를 처리하였다. 12시간 배양한 세포는 배지를 제거하고 500 L의 MTT(0.5 mg/mL in PBS) 용액을 각 well에 첨가하여 37℃에서 3시간 배양하였다. 상층액을 제거하고 500 µL의 DMSO를 각 well에 첨가하여 비수용성의 보라색 formazan을 용해시켰다. Formazan의 양은 SpectraMAX 250 microplate spectrophotometer(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 570 nm에서 측정하였다. 세포생존률의 확률은 다음 방정식으로 계산하였다.

$$\frac{\text{mean OD of treated cells}}{\text{mean OD of control cells}} \times 100 = \text{viability}(\%)$$

4. FDA-PI염색

배양된 세포는 PBS에 세척하고 FDA (10 µg/mL)/PI (5 µg/mL) 염색용액에 실온에서 5분 염색하였다. 염색된 세포는 PBS로 세척하고 현광현미경으로 관찰하였다. 정상적인 세포는 green 색으로 나타나고 apoptosis 세포는 yellow/red 색으로 나타난다.

5. 유세포분석

세포를 trypsin으로 처리한 후 모두 수확하여 PBS로 세척하고, 세포는 70% 에탄올로 4℃에서 1 시간 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 세척하고 1 mL의 PI(10 µg/mL)/RNase A (100 µg/mL) 용액으로 재부유하여 37℃ 암실조건으로 1 시간 배양하였다. DNA 양은 fluorescence-activated cell sorting(FACS) Calibur(BD Biosciences, CA, USA)를 사용하여 측정하였으며, apoptosis가 나타나는 세포에서 저투배수체(hypodiploid, Sub-G1)를 PI 히스토그램으로 수치화하였다. Sub-G1 세포의 분석은 CellQuest Pro(BD Biosciences, CA, USA) 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.

6. Caspase-3 활성검사

세포는 용해 완충액 (50 mM HEPES, pH7.4, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 1 M DTT, 0.1 mM EDTA)에 부유시킨 후 얼음 위에서 20분 방치하였다. 세포 용해액은 4℃에서 10,000rpm으로 10분 원심 분리하였다. Caspase-3 활성검사는 단백질추출물 10 µL(30 µg total protein), 88 µL 반응 완충액(50 mM HEPES, pH7.4, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol) 그리고 2 µL fluorogenic Ac-DEVD-pNA(200 µM final concentration)를 혼합하여 37℃에서 1 시간 배양하였다. Caspase-3의 효소 촉매 반응으로 방출된 p-nitroanilide는 SpectraMAX 250 microplate spectrophotometer로 405 nm에서 측정하였다. Caspase-3활성도는 다음 방정식으로 계산하였다.

$$\frac{\text{mean OD of treated cells}}{\text{mean OD of control cells}} \times 100 = \text{activity}(\%)$$

7. ROS생성 검사

ROS는 2,7'-Dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) fluorescence assay에 의해 측정하였다. 세포는 PBS에 두 번 세척하고, 20 μM DCFH-DA/PBS 용액에서 37°C에서 30분 배양하였다. fluorescence intensity는 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 524 nm에서 측정하였다. ROS생성량은 아래 방정식과 같이 측정하였다.

$$\frac{\text{mean OD of treated cells}}{\text{mean OD of control cells}} \times 100 = \text{production(\%)}$$

8. Western blot analysis

세포는 얼음 냉장된 PBS로 세척하고 1% protease inhibitor 혼합액이 포함된 얼음 냉장 용해 완충액(50mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM sodium vanadate)으로 부유 시킨 후 얼음 위에서 30분 용해하였다. 세포용해액들은 4°C에서 14,000×g 로 20분 원심 분리 하였고, 단백질 농도는 Bradford 검사법을 이용하여 측정하였다. 총 30 μg의 단백질 샘플을 SDS-PAGE 젤로 분리하였고 40V에서 3 시간 nitrocellulose 막 위로 단백질을 전이시켰다. 단백질이 전이된 막은 5% BSA가 포함된 Tris-buffered saline+Tween-20(20 mM Tris-HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 차단시킨 후, 1차 항체를 결합시켰다. 면역 활성화는 peroxidase가 붙어있는 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체를 사용하여 SuperSignal West Pico Chemiluminescent(Pierce, Rockford, IL, USA)에 의해 탐지하였다.

9. 통계처리

모든 데이터의 결과는 마이크로소프트 오피스 엑셀(EXCEL) 2003 프로그램을 통하여 통계처리 하여 mean±standard deviation(SD)로 기록하였다.

결 과

1. ECV304세포의 H₂O₂에 대한 세포독성 효과

ECV304 세포의 H₂O₂에 대한 세포독성의 효과를 조사하기 위해 H₂O₂를 일정한 간격으로 농도를 증가시켜 100~1000 μM로 12 시간 처리하였다. 세포생존율은 MTT assay로 측정하였다. H₂O₂는 농도 의존적으로 ECV304 세포의 생존율을 감소시켰다.(Fig. 1) H₂O₂의 IC₅₀값은 약 600 μM이었다.

2. ECV304 세포에서 H₂O₂의 세포손상에 대한 熟地黃 추출물의 보호효과

H₂O₂에 의해 유도된 ECV304 세포의 세포손상에 대한 熟地黃 추출물의 보호효과는 세포생존율측정, 세포형태변화관찰, 유세포분석을 통하여 조사하였다. ECV304 세포에 100, 200, 300, 400 μg/mL의 농도로 熟地黃 추출물을 12시간 동안 전 처리한 후, 600 μM H₂O₂와 함께 12시간 배양하였다. 熟地黃 추출물은 농도 의존적으로 H₂O₂에 의해 감소된 세포생존율을 증가시켰다

(Fig. 2A.) 熟地黃 추출물은 400 μg/mL 농도에서 H₂O₂에 의해 감소된 세포생존율을 약 23% 증가시켰다. FDA-PI 염색을 이용한 세포형태변화 관찰에서도 熟地黃 추출물은 H₂O₂에 의해 증가된 yellow/red색의 apoptosis 세포를 농도 의존적으로 감소시켰다 (Fig. 2B). 유세포분석을 통한 apoptosis 세포를 정량적으로 측정하였다. 熟地黃 추출물은 H₂O₂에 의해 유도된 apoptosis 세포를 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 2C). 100 μg/mL 熟地黃 추출물 처리군은 H₂O₂ 단독처리에 의해 증가된 apoptosis 세포 (29.00%)를 28.85%, 200 μg/mL 熟地黃 추출물 처리군은 22.05%, 300 μg/mL 熟地黃 추출물 처리군은 16.30%, 400 μg/mL 熟地黃 추출물 처리군은 10.08%로 감소시켰다.

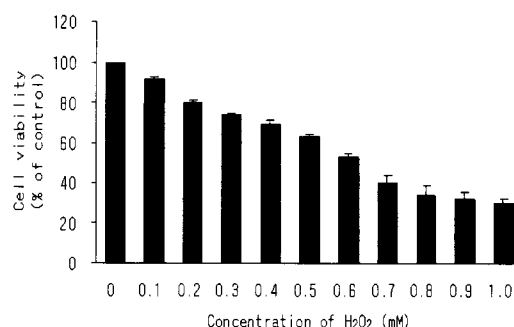
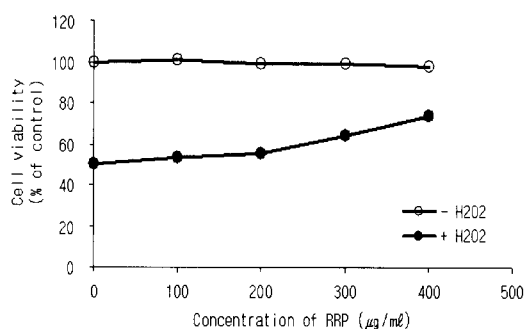
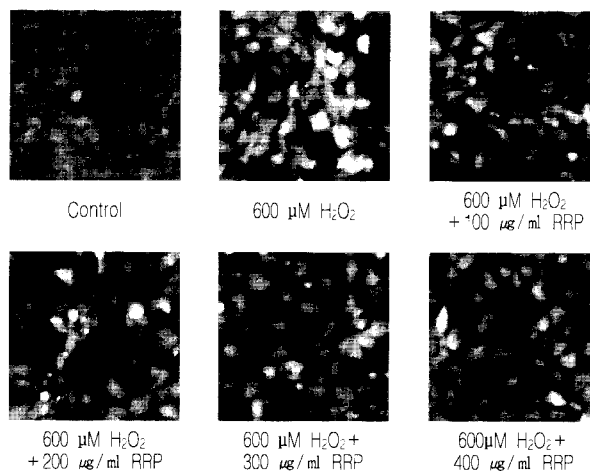


Fig. 1. Effect H₂O₂ on cytotoxicity in ECV304 cells. The cells were treated with various concentrations of H₂O₂ for 12 hrs and the cells were tested for viability by MTT assay. Values are means ± SD, N = 3.

A



B



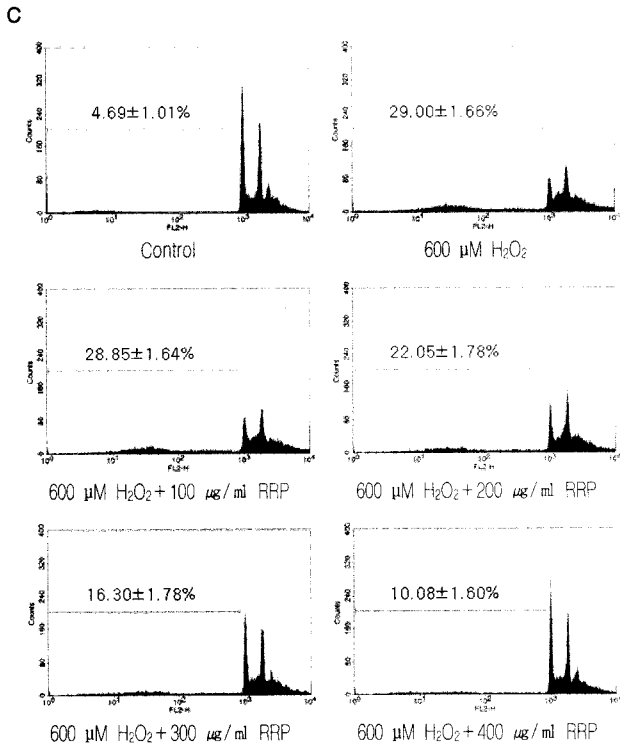


Fig. 2. Effect of RRP on H₂O₂-induced apoptosis in ECV304 cells. The cells were preincubated with 100, 200, 300 and 400 μg/ml of RRP for 12 h, and then treated with or without 600 μM H₂O₂ for 12 h. A: cell viability was determined by MTT assay. Values are means ± SD, N = 3. B: The cells were stained with FDA-PI and observed under a fluorescence microscope (Apoptotic bodies stained yellow/red). C: The cells were fixed and stained with PI and the DNA content was analyzed by flow cytometry.

3. ECV304세포에서 H₂O₂의 caspase-3 활성화와 PARP절편에 대한 熟地黄 추출물의 억제효과

Caspase family는 apoptosis 과정에서 중요한 역할을 수행하고 있다. 그 중 caspase-3는 apoptosis에 대한 중요한 세포의 수행자이다. ECV304 세포에서 H₂O₂에 의한 caspase-3의 활성화증가에 대한 熟地黄 추출물의 억제효과를 조사하였다. 熟地黄 추출물은 농도 의존적으로 H₂O₂에 의해 증가된 caspase-3의 활성을 감소시켰다(Fig. 3A). 熟地黄 추출물은 H₂O₂에 의해 증가된 caspase-3의 활성을 H₂O₂ 단독처리군(593.58%)과 비교하여 100 μg/mL 熟地黄 추출물 처리군은 587.35%, 200 μg/mL 熟地黄 추출물 처리군은 444.33%, 300 μg/mL 熟地黄 추출물 처리군은 388.27%, 400 μg/mL 熟地黄 추출물 처리군은 265.15%로 감소하였다. 熟地黄 추출물의 caspase-3활성 억제효과를 재검증하기 위해 caspase-3의 활성형인 p20과 그것에 의해 절단되는 다수의 단백질 중의 하나인 PARP의 절편을 조사하였다. H₂O₂에 의해 증가된 caspase-3 (p20)는 caspase-3활성과 동일하게 熟地黄 추출물의 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3B). H₂O₂에 의해 증가된 89kDa의 PARP절편 또한 caspase-3 (p20)의 감소와 동일하게 감소하였다.

4. ECV304 세포에서 MAPKs의 활성화에 대한 熟地黄 추출물의 효과

MAPKs 신호전달기전은 apoptosis의 조절에서 중요한 역할을 수행하고 있다. ECV304 세포의 apoptosis에서 MAPKs와 관련하여 H₂O₂에 대한 ERK, p38, JNK의 활성화와 관련하여 熟地黄 추

출물의 효과를 조사하였다. H₂O₂ 단독처리군에서 ERK 활성화와 JNK 활성화는 감소하였으며, p38활성은 아무런 변화가 없었다. 그러나 熟地黄 추출물 처리에 의해 ERK 활성화는 농도 의존적으로 크게 증가하였다. JNK 활성화와 p38 활성화는 400 μg/mL 熟地黄 추출물에서 약간 감소하였다(Fig. 4).

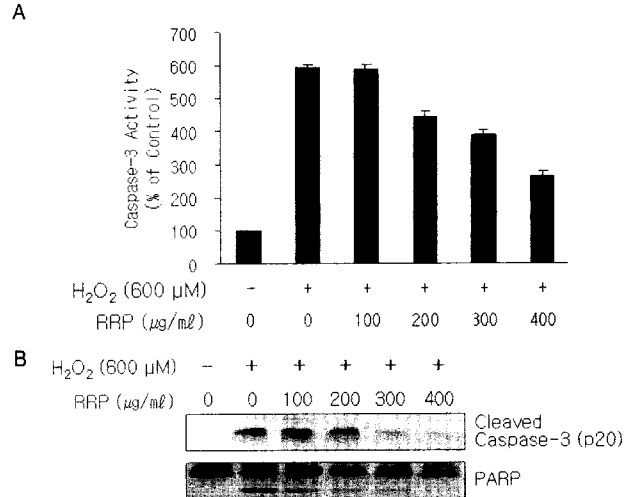


Fig. 3. Effect of RRP on activation of caspase-3 and proteolytic cleavage of PARP in H₂O₂-treated ECV304 cells. A: Caspase-3 activity was measured with AC-DEVD-pNA. The activation was measured as the increase in activity (%) with respect to control cells (100%). Value are means ± SD, N = 3. B: Who's cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis with anti-cleaved caspase-3 (p20) and anti-PARP antibody.

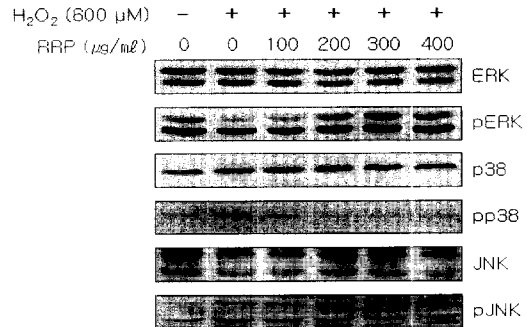


Fig. 4. Effects of RRP on activation of ERK, p38 and JNK in H₂O₂-treated ECV304 cells. The cells were preincubated with 100, 200, 300 and 400 μg/ml of RRP for 2 h, and then treated with or without 600 μM H₂O₂ for 3 h. Cells were lysed, and the supernatants were subjected to Western blot analysis using anti-ERK, anti-phospho-ERK, anti-p38, anti-phospho-p38, anti-JNK and anti-phospho-JNK antibodies.

5. ECV304 세포에서 H₂O₂의 ROS 생성에 대한 熟地黄 추출물의 효과

熟地黄 추출물이 ECV304세포에서 H₂O₂에 의한 ROS 생성에 미치는 효과를 조사하기 위해 DCFH-DA법을 사용하였다. ROS 생성은 세포 내부의 DCF fluorescent의 생성량을 형광분광분석기를 이용하여 측정하였다. H₂O₂ 단독처리군에서 ROS생성은 약 531.17% 증가하였는데, 熟地黄 추출물 처리에 의해 100 μg/mL처리는 522.00%, 200 μg/mL처리는 488.95%, 300 μg/mL처리는 400.02%, 400 μg/mL처리는 294.32%로 H₂O₂에 의해 증가된 ROS생성이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 5).

고 찰

인체에서 혈관은 온 몸에 혈액을 운반하여 산소 및 각종 영양분을 공급하며 호르몬 등을 통한 신호 전달의 역할을 담당한다. 정상적인 한 개체 성인의 경우 혈관 길이를 모두 합친다면 약 13만 km에 이르러 지구를 세 번이나 감을 수 있을 정도의 길이가 되어 생명 유지를 위하여 쉬지 않고 혈액을 공급한다. 그러므로 인체의 기능 저하 및 손상은 혈액 순환을 담당하는 혈관의 상태에 의하여 좌우된다고 볼 수 있다¹⁴⁾.

산화적 손상은 노화와 관련된 만성 질환 중에서도 증양의 생식, 혈관내 지방 축적, 진성 당뇨병과 노화 등 다양한 병리학적 질병을 유발한다. 특히, 활성산소종은 일반적으로 생체 내 구성요소들과 반응하여 세포 손상에 중요한 역할을 한다. 세포내 활성산소종의 증가는 혈관내피세포 손상을 초래하고 산화된 저밀도 지방 단백질의 활동은 활성산소종의 증가와 관련이 있다고 알려져 최근에는 활성산소종이 혈관계에 미치는 영향에 대한 연구가 지속되고 있으며, apoptosis와 관련된 많은 연구가 진행 중이다¹⁵⁻¹⁷⁾.

Apoptosis는 프로그램된 세포사멸로 알려져 있고 그에 따른 신호전달기전의 활성화와 세포증식과 세포사멸사이의 균형을 유지하는데 중요한 역할을 수행하는 선택적이고 생리적인 과정이다^{18,19)}. Apoptosis는 necrosis와는 다르게 세포의 독특한 형태적 및 생화학적 특징이 유전자 활성화에 의하여 조절받는다²⁰⁾. 세포가 심각한 상해를 입었을 경우 나타나는 necrosis는 세포막의 파괴, 세포의 팽창, 용해를 동반한다. 그러나 apoptosis는 빠른 세포탈수 현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상 (blebbing), 세포질 내의 칼슘 농도의 증가, 염색체의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절, transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 아포토시스 소포체 (apoptotic body)의 형성을 동반한다²⁰⁾.

熟地黃 추출물은 H₂O₂에 의한 산화적 손상에 의한 apoptosis에 대하여 효과적으로 ECV304 세포를 보호하였다. 熟地黃 추출물은 H₂O₂에 의해 감소된 세포생존율을 증가시켰고, FDA-PI 염색을 통한 세포형태 관찰과 유세포 분석에서는 apoptosis 세포를 감소시켰다. H₂O₂에 의해 증가된 아포토시스의 최종 실행 단백질인 caspase-3의 활성화와 caspase-3 (p20) 및 PARP 절편도 熟地黃 추출물에 의해 감소하였다.

熟地黃 추출물의 항산화효과는 H₂O₂에 의해 생성된 ROS의 생성억제를 통하여 확인되었다. 이 전 연구에서 熟地黃 추출물은 in vitro cell-free system에서 hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide radical에 대한 소거능을 가지고 있다고 보고되었다²¹⁾. 熟地黃은 대표적인 補血藥으로 현삼과의 다년생 초본인 지황의 근경을 가공한 것으로²²⁾, 지황의 문헌적 효시는 《神農本草經》이다²³⁾. 여기에서 生地黃과 乾地黃으로 구분하여 설명하였고, 숙지황에 대한 언급은 《本草圖經》에 처음 제시되었다²⁴⁾. “二月 八月 採根 蒸三日 令爛暴乾 謂之熟地黃 陰乾者 謂之生地黃” 이라하여 생지황, 건지황, 숙지황의 구별이 이루어지게 되었다. 지황은 《神農本草經》에 “主折跌 絕筋 傷中 逐瘀血 填骨髓 長肌肉 作渴 除寒熱積聚 除痺”라고는 언급된 이후, 《名醫別

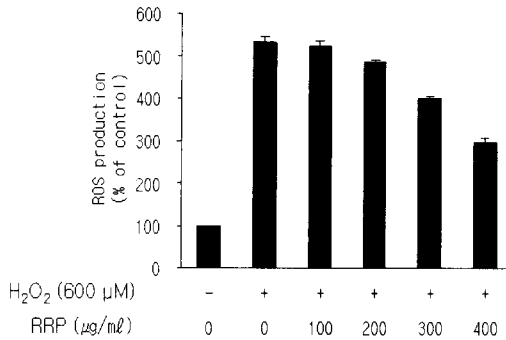


Fig. 5. Effect of RRP on H₂O₂ induced-ECV304 cells ROS formation. The cells were pretreated with various doses of RRP for 12 h prior to 600 μM H₂O₂ induction for 12 h. ROS were determined by DCFH-DA fluorescence assay. Value are means ± SD, N = 3.

6. ECV304 세포에서 HO-1 단백질 발현에 熟地黃 추출물의 효과
HO-1 단백질은 항산화효과에 중요한 역할을 수행하고 있다. H₂O₂ 처리된 ECV304 세포에서 熟地黃 추출물이 HO-1 발현 유도에 미치는 효과를 조사하였다. HO-1 단백질의 발현은 H₂O₂에 의해 유도되었다(Fig. 6). 그러나 熟地黃 추출물을 처리하였을 경우 HO-1 발현은 농도 의존적으로 크게 증가하였다.

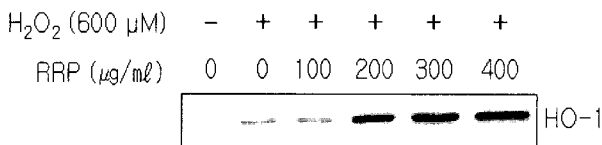


Fig. 6. Effect of RRP on HO-1 protein expression in H₂O₂ treated-ECV304 cells. The cells were preincubated with RRP for 12 h, and then treated with or without H₂O₂ for 12 h. Expression of HO-1 protein determined by Western blot analysis with an anti-HO-1 antibody.

7. ECV304 세포에서 ERK 활성이 熟地黃 추출물의 HO-1 단백질 발현에 미치는 효과

앞 선 결과에서 H₂O₂가 처리된 ECV304 세포에서 ERK 활성화와 HO-1 단백질 발현은 熟地黃 추출물에 의해 모두 증가하였다. 熟地黃 추출물에 의한 ERK활성 증가가 HO-1 단백질 발현증가에 미치는 효과를 조사하였다. ECV304 세포는 H₂O₂를 처리하기 전 1시간 ERK inhibitor (PD98059)를 처리하였다. ERK inhibitor는 熟地黃 추출물에 의해 증가된 HO-1 단백질 발현을 감소시켰다(Fig. 7). 10 μM ERK inhibitor는 熟地黃 추출물에 의해 증가된 HO-1 발현을 약간 감소시켰지만, 20 μM ERK inhibitor는 HO-1 발현을 뚜렷하게 감소시켰다.

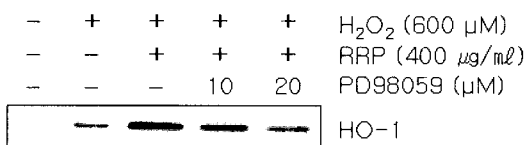


Fig. 7. Effect of ERK inhibitor on HO-1 protein expression of H₂O₂/RRP treated-ECV304 cells. The cells were preincubated with 10 and 20 μM PD98059 for 1 h, and then treated with 400 μg/ml RRP for 12 h prior to 600 μM H₂O₂ incubation for 12 h. A: Expression of HO-1 protein determined by Western blot analysis with an anti-HO-1 antibody.

錄>에서는 “主治男子五歲 七傷 女子傷中 胞瀉 下血 破惡血 瀉血 利大小腸 去胃中宿食 飽力斷絕 補五臟內傷不足 通血脈 益氣力 利耳目”라고 하여 효능 및 주치를 설명하였다²⁵⁾.

熟地黃의 주요성분으로는 sterol인 β -sitosterol, stigmatsterol, campesterol과 iridoid glycosides인 catalpol, rehmannioside, ajugol, aucubin, melittoside가 포함되어 있는 것으로 보고되었는데, 이 중 sterols과 iridoid glycosides는 유리라디칼을 제거하는 항산화제 역할이 밝혀져 있다^{26,27)}.

산화적 손상에 대한 熟地黃 추출물의 ECV304 세포의 보호 효과 기전 연구에서 熟地黃 추출물은 H₂O₂에 의해 감소된 ERK 활성을 증가시켰고, p38 활성과 JNK 활성은 약간 감소시켰다 (Fig. 5). 이 결과는 熟地黃 추출물의 세포보호효과가 ERK 활성과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다. ROS와 MAPKs는 다양한 병리학적조건에서 혈관손상을 수반한다²⁸⁾. MAPK 경로는 ROS에 의해 유도된 apoptosis에서의 신호기전이다^{29,30)}. Mitogen-activated protein kinase (MAPKs)는 세포증식, 분화, apoptosis와 같은 다양한 세포반응들의 조절에 관여하는 serine/threonin kinases이다³¹⁾. 구조적인 차이를 기본으로 하여 MAPKs는 세가지로 분류된다 (extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK/SAPK), p38 kinase)³¹⁾. ERK경로는 mitogen과 growth factor들에 의해 활성화되고 세포성장 및 생존과 분화의 조절에서 중요한 역할을 수행한다^{31,32)}. 대조적으로, JNK와 p38경로는 화학적 또는 환경적 스트레스에 대한 반응에 의해 활성화되고, 종종 apoptosis의 유도에 관련되어있다^{33,34)}.

H₂O₂를 처리한 ECV304 세포에서 熟地黃 추출물은 HO-1 단백질 발현을 크게 증가시켰다. 이 결과는 熟地黃 추출물의 H₂O₂에 대한 항산화 효과가 HO-1 단백질 발현과 관련되어 있을 것으로 사료된다. HO-1은 iron, carbon monoxide (CO), biliverdin, biliverdin에 대한 heme의 분해를 촉진시킨다. HO-1 유전자의 발현은 다양한 세포유형에서 prooxidant와 antioxidant에 의한 자극에 의해 활성화 된다³⁵⁾. HO-1에 의한 heme degradation은 산화적 스트레스, 염증반응, apoptosis, 세포증식, 신생혈관형성, 섬유화와 같은 다양한 생물학적과정을 조절한다. Heme, hyperoxia, ROS등의 산화제들은 MAPKs의 활성을 통하여 HO-1 유전자 발현을 유도한다. Antioxidant 또한 HO-1의 유도에 유익하게 작용을 한다³⁶⁻³⁸⁾. 또한 항산화효능이 있는 식품이나 약재들이 HO-1의 유도와 관계가 있는 것으로 생각되고 있다^{39,40)}.

ECV304 세포에서 熟地黃에 의해 증가된 HO-1 단백질 발현 증가는 ERK 활성 증가와 관련되어 있는 것으로 사료된다. ERK inhibitor인 PD98059는 熟地黃 추출물에 의해 증가된 HO-1 단백질 발현을 억제하였다. 이 결과는 熟地黃 추출물에 의한 HO-1 단백질 발현이 ERK 활성을 통하여 유도된다는 것을 보여주고 있다.

결론

熟地黃 추출물이 H₂O₂에 의한 apoptosis에 미치는 효과 및 기전을 분자생물학적 방법을 통하여 유의한 결과를 얻었으며, 다

음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

熟地黃 추출물은 H₂O₂에 의해 유도된 ECV304 세포의 apoptosis와 ROS 생성을 억제하였다. H₂O₂에 의한 ECV304세포의 산화적 손상에서 熟地黃 추출물은 ERK 활성을 증가시키고, p38 활성 및 JNK 활성의 감소시켜 apoptosis를 억제하였다. ECV304세포에서 H₂O₂의 산화적 손상에서 熟地黃 추출물은 HO-1 단백질의 발현을 증가시켰다. 또한 熟地黃 추출물을 처리한 상태에서 ERK 억제제를 동시에 처리하면 HO-1단백질의 발현이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면 熟地黃 추출물은 ECV304세포에서 H₂O₂의 산화적 손상으로 인한 apoptosis를 억제하였으며, ERK 활성을 통한 HO-1단백질 발현증가 기전으로 산화적 손상을 방지하는 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 원광대학교의 교비 지원에 의해 수행됨.

참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학. 서울, 고문사, pp 439-449, 1997.
2. 해리슨번역편찬위원회. HARRISON'S 내과학. 서울, 정담, pp 1189-1193, 1997.
3. 이중달. 그림으로 설명한 병리학. 서울, 고려의학, pp 221-229, 1991.
4. Chen, X.P., Xun, K.L., Wu, Q., Zhang, T.T., Shi, J.S. and Du, G.H. Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: Role of reactive oxygen species. *Vascul. Pharmacol.* 47: 1-9, 2007.
5. Tsuneki, H., Sekizaki, N., Suzuki, T., Kobayashi, S., Wada, T., Okamoto, T., Kimura, I. and Sasaoka T. Coenzyme Q(10) prevents high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 566: 1-10, 2007.
6. Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82: 291-295, 1997.
7. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95, 2002.
8. Maines, M.D. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASES J.* 2: 2557-2568, 1998.
9. Elbirt, K.K. and Bonkovsky, H.L. Heme oxygenase: Recent advances in understanding its regulation and role. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 111: 438-447, 1999.
10. Maruhashi, K., Kasahara, Y., Ohta, K., Wada, T., Ohta, K., Nakamura, N., Toma, T., Koizumi, S. and Yachie, A. Paradoxical enhancement of oxidative cell injury by

- overexpression of heme oxygenase-1 in an anchorage-dependent cell ECV304. *J. Cell. Biochem.*, 93: 552-562, 2004.
11. 부일권, 김연섭. 갈근이 뇌허혈 손상 흰쥐의 해마신경세포 손상에 미치는 영향. *대한본초학회지* 19: 77-82, 2004.
 12. 이옥희. 갈근 에탄올 추출물이 흰쥐의 항산화계에 미치는 영향. *한국영양학회지* 37: 872-880, 2004.
 13. 이정숙, 김은실, 김석환. 갈근추출물이 에탄올을 투여한 흰쥐의 지질과산화에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지* 28: 901-906, 1999.
 14. 권오길. *인체기행*. 서울, 지성사, pp 99-106, 2002.
 15. Ward, P.A. Mechanisms of endothelial cell injury. *J. Lab. Clin. Med. Review*, 118: 421-426, 1991.
 16. Berlett, B.S. and Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem. Review*, 72: 20313-20316, 1997.
 17. Yen, C.H., Hsieh, C.C., Chou, S.Y. and Lau, Y.T. 17 Beta-estradiol inhibits oxidized low density lipoprotein-induced generation of reactive oxygen species in endothelial cells. *Life Sci.* 70: 403-413, 2001.
 18. Sun, X.M., MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B.B., Green, D.R. and Cohen, G.M. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274: 5053-5060, 1999.
 19. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 94: 481-490, 1998.
 20. Cohen, J.J. Apoptosis. *Immunol.* 14: 126-130, 1993.
 21. Yu, H.H., Seo, S.J., Kim, Y.H., Park, R.K., So, H.S., Jeon, B.H., Shin, M.K., Jung, S.Y., Kim, K.Y. and You, Y.O. Protective effect of rehmannia radix preparata extract on the cisplatin-induced cytotoxicity of HEI-OC1 cells via scavenging of free radicals. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* 19: 1349-1355, 2005.
 22. 全國韓醫科大學教授共編著. 本草學. 서울, 永林社, pp 190-192, 580-581, 1991.
 23. 孫星衍·孫馮翼輯. 神農本草經. 臺北, 五洲出版社, pp 42-43, 1985.
 24. 蘇頌·尚志均輯校. 本草圖經. 合肥市, 安徽科學技術出版社, pp 80-81, 1994.
 25. 陶弘景集·尚志均點校. 名醫別錄. 北京, 人民衛生出版社, p 23, 1986.
 26. Yao, S.C., Wang, L.L. and Yeung, C.S. Pharmacology and applications of chinese materia medica. World Scientific, Hongkong, pp 461-467, 1981.
 27. Tang, W. and Eisenbrand, G. Chinese drugs of plant origin: Chemistry, pharmacology, and use in traditional modern medicine. Springer-Verlag, Berlin, pp 849-854, 1992.
 28. Farre, A.L. and Casado, S. Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction. *Hypertension* 38: 1400-1405, 2001.
 29. Ramachandiran, S., Huang, Q., Dong, J., Lau, S.S. and Monks, T.J. Mitogen-activated protein kinases contribute to reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubule epithelial cells. *Chem. Res. Toxicol.* 15: 1635-1642, 2002.
 30. Dabrowski, A., Boguslowicz, C., Dabrowska, M., Tribillo, I. and Gabryelewicz, A. Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells. *Pancreas* 21: 376-384, 2000.
 31. Wada, T. and Penninger, J.M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23: 2838-2849, 2004.
 32. Guyton, K.Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q. and Holbrook, N.J. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J. Biol. Chem.* 271: 4138-4142, 1996.
 33. Ramachandiran, S., Huang, Q., Dong, J., Lau, S.S. and Monks, T.J. Mitogen-activated protein kinases contribute to reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubule epithelial cells. *Chem. Res. Toxicol.* 15: 1635-1642, 2002.
 34. Feuerstein, G.Z. and Young, P.R. Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways. *Cardiovasc. Res.* 45: 560-569, 2000.
 35. McNally, S.J., Harrison, E.M., Ross, J.A., Garden, O.J. and Wigmore, S.J. Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *Int. J. Mol. Med.* 19: 165-172, 2007.
 36. Lee, P.J., Camhi, S.L., Chin, B.Y., Alam, J. and Choi, A.M. AP-1 and STAT mediate hyperoxia-induced gene transcription of heme oxygenase-1. *Am. J. Physiol., Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: L175-L182, 2000.
 37. Benvenisti-Zarom, L., Chen-Roetling, J. and Regan, R.F. Inhibition of the ERK/MAP kinase pathway attenuates heme oxygenase-1 expression and heme-mediated neuronal injury. *Neurosci. Lett.* 398: 230-234, 2006.
 38. Li, M.H., Cha, Y.N. and Surh, Y.J. Peroxynitrite induces HO-1 expression via PI3K/Akt-dependent activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 41: 1079-1091, 2006.
 39. Scapagnini, G., Foresti, R., Calabrese, V., Giuffrida Stella, A.M., Green, C.J. and Motterlini, R. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1

- inducers. *Mol. Pharmacol.* 61: 554-561, 2002.
40. Andreadi, C.K., Howells, L.M., Atherfold, P.A. and Manson, M.M. Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor-kappaB, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemeoxygenase-1 by dietary polyphenols. *Mol. Pharmacol.* 69: 1033-1040, 2006.