

## 산약의 Mouse embryonic fibroblast cell에 대한 자외선 손상 방어 효과

\*동국대학교 한의과대학 부인과학교실, \*\*동국대학교  
진용재\*, 성정석\*\*, 김동일\*

### ABSTRACT

#### The Protective Effects of Dioscoreae Rhizoma on the Exposure to UVA of MEF cells

Yong-Jae Jin\*, Jung-Seok Sung\*\*, Dong-Il Kim\*

\*Dept. of Ob&Gy College of Korean Medicine, \*\*Dongguk Univ.

**Purpose:** This study was to determine the protective effects of Dioscoreae Rhizoma on the Mouse Embryo Fibroblast (MEF) cells exposed to the ultraviolet rays(UVA).

**Methods:** The samples were assigned randomly to five groups; control group without any treatments, UVA group exposed only to UVA, DR group exposed only to the Dioscoreae Rhizoma, UVA-DR group exposed to UVA before being treated with the Dioscoreae Rhizoma, and DR-UVA group treated with the Dioscoreae Rhizoma before being exposed to UVA. The survival rate of cells, metabolic rate of cells, transformation of nucleus within cells, alteration of cell cycle, effects on the apoptosis, the change of the amount of protein related to cell cycle were measured in order to determine the cell protective effects of the Dioscoreae Rhizoma on each group.

**Results:** 1. DR-UVA group has more cell protective effects compared to the UVA group in all experiments, indicating that the Dioscoreae Rhizoma protects skin from UVA physically and chemically. 2. UVA-DR group shows more efficiency compared to UVA group in rapid recovery of damaged cell and leading highly damaged cells to apoptosis, preventing the expression of abnormal cells.

**Conclusions:** Dioscoreae Rhizoma has effects of protecting MEF cells from UVA, of recovering cells damaged by UVA, and of prohibiting the expression of abnormal cells.

**Key words:** Dioscoreae Rhizoma, UVA, MEF, HCT, Apoptosis, Anti-oxidant

## I. 서 론

자외선은 피부에 가장 유해한 환경 인자 중 하나로 알려져 있으며 급성적이거나 만성적인 노출을 통해 피부에 염증, 산화스트레스, DNA 손상 등을 유발하고 결과적으로 광노화나 피부암을 초래한다. 이러한 손상과정에서 자외선은 세포 내에서 생화학적 반응을 일으켜 DNA 합성 저해, 돌연변이 생성과 세포 표면 표식자의 소실, 세포 독성 등과 같은 유해한 효과를 나타낸다<sup>1,2)</sup>.

최근에는 다양한 분야에서 자외선에 의한 피부손상 및 광노화를 예방하거나 치료할 수 있는 물질을 개발하려는 노력이 진행되고 있으나, 한의학에서는 한약제의 구강투여를 통하거나 복합 한약제제를 피부에 도포하여 광노화를 억제하려는 실험적 연구<sup>3-6)</sup>가 몇 차례 보고된 바 있을 뿐 이에 대한 체계적인 연구는 부족한 실정이다.

산약은 마과(Dioscoreaceae)에 속한 多年生 草本인 *Dioscorea batatas* Thunberg 또는 *Dioscorea japonica* Thunberg의 뿌리줄기를 건조하여 사용하는 약재이며 健脾, 補肺, 固腎, 益精의 효능이 있으며 脾, 肺, 腎經으로 歸經한다<sup>7-9)</sup>. 또한 扶正의 효능이 있어 인체의 정상적인 면역기능이 유지될 수 있도록 도와주며<sup>9-11)</sup>, 항산화 효과로 인해 세포를 암과 종양을 일으키는 독성으로부터 보호하는 효과가 있는 것으로 보고되고 있다<sup>12-17)</sup>.

최근 일련의 연구에서 산약(Dioscoreae Rhizoma)의 주요 약효 성분인 dioscin과 saponin의 항암작용과 항산화 작용 및 면역 증가에 관한 구체적 연구 사례<sup>12-14)</sup>가 보고되고 있어 산약의 연구 범위를

넓혀 자외선에 노출된 피부 세포에 대한 보호 효과를 연구함으로써 그동안 기초 연구에서 밝혀진 산약의 효과를 확장할 수 있는 계기를 마련할 수 있을 것이며, 자외선 이외의 다양한 유해 광선에 대한 산약의 보호 효과를 연구하는 것에도 단초가 될 것으로 생각되었다.

이에 본 연구에서는 생쥐의 배아섬유아세포(MEF)에 산약과 자외선을 노출시킨 방식에 따라 각 세포의 생존율, 대사율, 세포 내핵의 변화, 세포 주기의 변화, apoptosis의 발생을 및 Bax, Bcl-2, p53, p21, Cdk-2, Cdc25A, Cyclin A, Cyclin E 등의 농도 변화를 실험하였으며 이로부터 얻어진 결과를 논문을 통해 발표하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 추출물의 준비

산약(*D. batatas*)을 동국대학교 한방병원(한국, 일산 소재)으로부터 구입하여 정선한 후에 50g을 증류수로 2시간 중탕한 다음 추출액을 AVANTEC TOYO #2 필터로 여과하여 수불용성 성분을 버린 추출물을 동결 건조시켜 2.153g을 얻어 건조분말로 만들었다. 이 추출 분말을 PBS에 용해시키고, pH 7로 조정된 다음 0.25 um 필터를 통과시켜 멸균시킨 후 -20℃에서 보관하였다.

### 2. 세포와 세포배양

생쥐 배아섬유아세포(Mouse Embryo Fibroblast, MEF)를 아메리칸 타입 컬렉션 (American Type Culture Collection)에서 분양받았다. MEF 세포를 10% FBS

와 100 U/mL penisillin, 100 ug/mL streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) (Welgene, Korea)에서 배양하였다.

### 3. 세포 활성도 측정

세포활성도는 MTT 분석법과 Trypan blue exclusion assay로 측정하였다. MEF 세포를  $5.0 \times 10^4$  cells/mL로 96-well 배양접시에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 세포를 phenol red-free DMEM에서 380 mJ/cm<sup>2</sup> UVA (Rayonet Corp., U.S.A)에 30분 동안 노출시킨 후 추출물을 처리하여 24시간 동안 반응시키거나 추출물을 처리하지 않았다. 그런 다음 세포를 PBS (Welgene, Korea)로 2회 세척하고 MTT 용액 (5 mg/mL) 10 uL을 첨가하여 37°C 배양기에서 3시간 동안 두었다. 그런 다음 배지를 제거하고 DMSO를 200uL 첨가하였다. 그 후 10분 간 배양기에 둔 다음 microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

한편 세포 활성도를 측정하는 또 하나의 방법인 trypan blue exclusion 검사를 시행하였는데, 세포 부유액 0.1 mL에 산약 추출물을 처리하고, MTT assay와 같은 조건에서 자외선을 처리한 부유액과 처리하지 않은 부유액을 0.4% Trypan blue 용액 0.1 mL가 담겨있는 시험관으로 옮긴 후 5분 동안 세워두고 살아 있는 세포의 백분율을 현미경으로 측정하였다. 실험은 3회 반복하였다.

### 4. DAPI staining

세포를 glass chamber slide에 분주한 다음 24시간 동안 추출물에 노출시키고

30분 간 자외선과 24시간 동안 산약 추출물 처리를 하거나 하지 않았다. 그런 다음 세포를 PBS로 세척하고 4% formaldehyde로 20분 간 고정시켰다. Chamber를 PBS로 2회 세척하고 2 ug/mL DAPI를 처리하여 20분 동안 배양기에 두었다. 마지막으로 세포를 PBS로 세척하고 형광 현미경으로 세포핵을 관찰하였다.

### 5. 세포 주기 분석

세포( $1 \times 10^6$  cells/mL)를 처리하거나 처리하지 않고 24시간 동안 배양한 다음 PBS로 세척하고 매우 차가운 100% 에탄올에 고정하여 4°C에서 하룻밤 동안 두었다. 다시 세포를 PBS로 세척한 다음 PI agent (0.1% Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 50 ug/mL RNase A 및 50 ug/mL propidium iodide)를 첨가하여 반응시켰다. 형광은 FAC scan laser 유속세포측정기를 사용하여 측정하고 Becton Dickinson software(Lysis II, Cellfit)를 사용하여 분석하였다.

### 6. AnnexinV-FITC/PI assay

Annexin V-FITC / PI (propidium iodide) apoptosis detection kit를 이용하여 apoptotic cells에서 phosphatidylserine의 외전(surface exposure)을 검출함으로써 apoptosis를 정량화 하였다. 유착 세포와 부유 세포를 결합시켜 제조사의 지침에 따라 처리하고 FITC/PI 염색 후 유식세포 측정기를 사용하여 측정하였다.

### 7. Western blot analysis

세포를 채취하고 PBS로 세척한 다음 50mM Tris(pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 0.1% sodium dodecyl sulfate

(SDS), 1% Nonidet P-40, 그리고 protease inhibitors (1 ug/mL leupeptin, 1 ug/mL aprotinin, and 1 mM PMSF)로 얼음 위에서 용해시켰다. 진폭 설정 20으로 초음파 파쇄기(Ultrasonic processor)를 이용하여 5초씩 연속 5회 초음파 파쇄 후 세포를 저온에서 20000 ×g으로 30분 간 원심분리한 후 상층액의 전체 단백추출물을 Bradford Protein Assay로 측정하였다. 단백질을 lane 당 100ug으로 표준화하고 10% SDS-PAGE gel에서 분리한 다음 이동완충용액(transfer buffer; 39 mM glycine, 48 mM Tris base, 0.037% SDS, and 20% methanol)을 사용하여 PVDF membrane에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 membrane을 5% 탈지분유 용액에 담가 1시간 동안 실온에 방치하였다. 그 다음 membrane을 일차항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, U.S.A)와 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 일차항원항체반응 후, membrane을 TBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 실온에서 5분씩 3회 세척한 후 peroxidase가 결합된 이차항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, U.S.A)를 처리하여 실온에서 45분간 더 반응시켰다. membrane을 TBST로 3회 세척하고 ECL western blotting detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)를 사용하여 시각화하였다. 단백질 band의 농도를 Gel documentation system(Vilber Lourmat, Germany)으로 측정하고 Image Quant software (Amersham Biosciences)를 사용하여 정량하였다.

### 8. Chemicals

Fluorescent mounting medium (Dako Cytomation, CA)를 제외한, 4, 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI),[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide] (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO) 및 모든 화학약품은 Sigma에서 구입하였다.

## III. 결 과

### 1. MEF cell의 생존율

MEF cell의 생존율을 관찰하였을 때 산약을 단독 처리한 실험군은 대조군과 비교 시 세포의 생존율에 큰 변화는 없었으나 UVA를 단독 처리한 실험군은 대조군과 비교 시 세포 사멸율이 큰 폭으로 증가하였고 생존율은 감소하였다. 또한, UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군도 대조군에 비해 세포 사멸율이 증가하였고 생존율은 감소하였다. 한편, UVA를 단독 처리한 실험군과 UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에서는 상대적으로 후자에서 세포 사멸율은 감소하고 생존율은 증가하였다(Fig. 1).

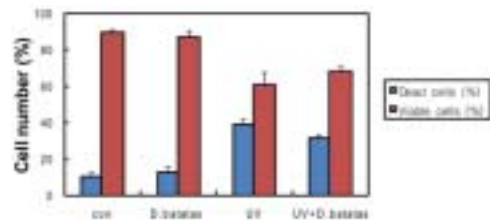


Fig. 1. Effects of *D. batatas* extracts on the viability of UVA irradiated MEF Polβ wild-type cells.

Cells were treated with 1.35 mg/mL *D. batatas* extracts for 24 h (*D. batatas*), UVA irradiation for 30 min (UV), or 1.35 mg/mL *D. batatas* extracts for 24 h after UVA irradiation for 30 min (UV + *D. batatas*), and the induction of cell death was determined by the trypan blue exclusion assay.

## 2. MEF cell의 세포 대사율

UVA를 처리하지 않은 실험군에서 산약의 농도가 증가함에 따라 세포 활성도가 증가하는 것을 볼 수 있었다. UVA를 처리한 실험군에서는 세포 활성도가 떨어지는 것을 확인할 수 있었으나 산약의 농도가 증가함에 따라 세포 활성도도 같이 증가 하였다(Fig. 2A).

UVA를 먼저 처리한 후 산약을 다양한 농도로 24시간 처리한 결과에서도 위 결과(Fig. 2A)와 비슷하게 산약의 농도가 증가함에 따라 세포 활성도가 증가하였다(Fig. 2B).

VA 처리 후 5.38 mg/ml의 고농도 산약을 처리한 실험군이 시간에 비례하여 점차적으로 세포 활성도가 증가하였으며 24시간 이후에는 산약만 처리한 실험군과 비슷한 형태로 세포 활성도가 증가하였다(Fig. 2C).

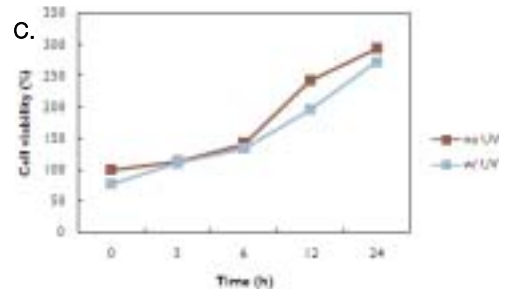
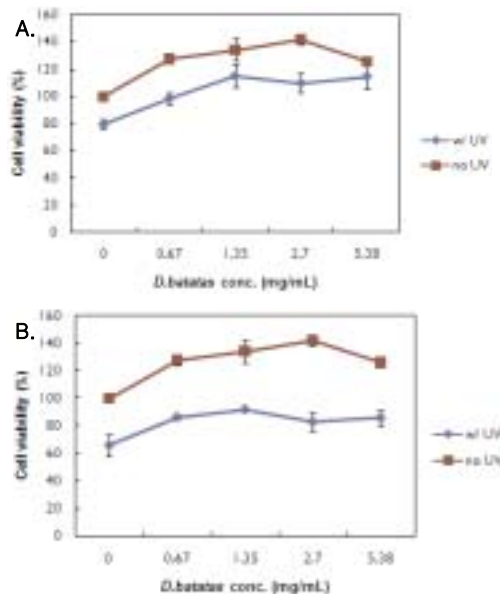


Fig. 2. Effects of *D. batatas* extracts on the viability of UVA irradiated MEF Polβ wild-type cells determined by MTT assay.

A) MEF Polβ wild-type cells were irradiated with UVA for 30 min after cells were treated with *D. batatas* extracts at the indicated concentrations for 24 h.

B) MEF Polβ wild-type cells were treated *D. batatas* extracts at the indicated concentrations for 24 h after UVA irradiation for 30 min.

C) MEF Polβ wild-type cells were treated 5.38 mg/mL *D. batatas* extract for the various times after UVA irradiation for 30 min.

## 3. MEF cell의 세포내핵의 변화

UVA를 단독 처리했을 시 심각한 핵의 응축과 DNA 분절을 볼 수 있었다. 또한, UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에서도 심각한 핵의 응축이 관찰되었다. 반면, 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군에서 대조군과 비교 시 생존한 세포수는 비슷하였지만 일부 세포에서 DNA 분절이 관찰되었다. 한편, 산약만 처리한 실험군에서 세포수의 감소와 핵의 응축과 DNA 분절이 일부 관찰되었다(Fig. 3).

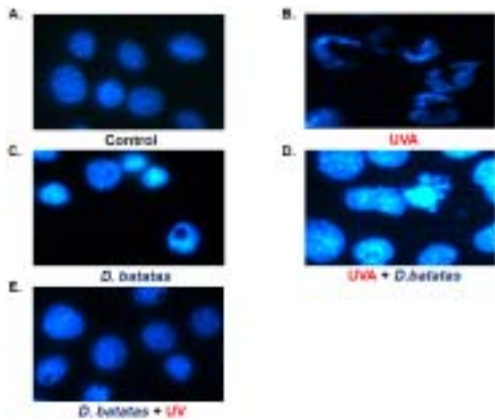


Fig. 3. Morphological changes of MEF Polβ wild-type cells induced by UVA, *D. batatas*, UVA + *D. batatas* and *D. batatas* + UVA.

A) Typical apoptotic morphological changes were detected in untreated cells

- B) UVA irradiation for 30 min
- C) 5.38 mg/mL *D. batatas* extracts for 24 h
- D) UVA pre-irradiation for 30 min and 5.38 mg/mL *D. batatas* treatment
- E) 5.38 mg/mL *D. batatas* pretreatment for 24 h and UVA irradiation for 30 min

#### 4. MEF Cell 의 세포 주기의 변화

UVA와 산약을 단독 처리한 실험군에서 대조군과 비교 시 세포주기에 큰 변화가 없었음을 관찰 하였다. 반면, UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에서는 G1기가 짧아졌고 G2기에 길어졌으며 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군에서는 G2기가 다소 길어지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

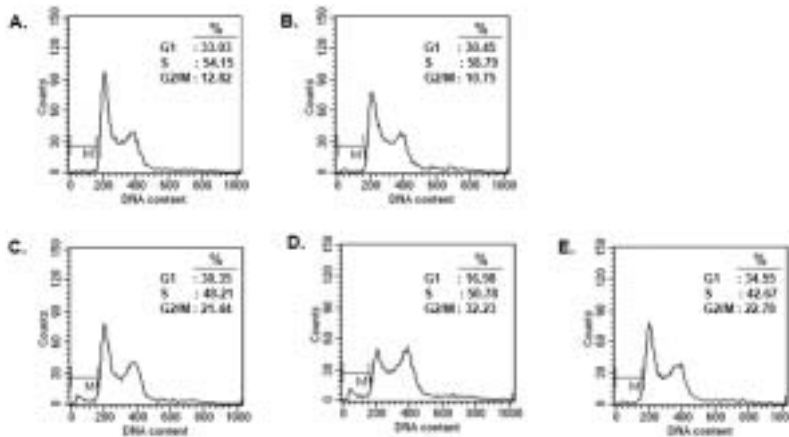


Fig. 4. Cell cycle analysis of MEF Polβ wild type cells.

- A) Untreated cells.
- B) UVA irradiation for 30 min.
- C) 5.38 mg/mL *D. batatas* extracts.
- D) Pre-irradiation with UVA for 30 min and treatment with 5.38 mg/mL *D. batatas* extracts for 24 h.
- E) pretreatment with 5.38 mg/mL *D. batatas* extracts for 24 h and then irradiation with UVA for 30 min.

#### 5. 山藥이 MEF cell의 Bax 발현에 미치는 영향

UVA와 산약을 단독 처리 했을 시 대

조군에 비해 모두 Bax의 발현량이 감소 했지만 산약을 처리했을 때의 감소폭이 더 컸다. UVA 처리 후 산약을 처리한

실험군이 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군에 비해 Bax의 발현량이 상대적으로 감소하였다(Fig. 5).

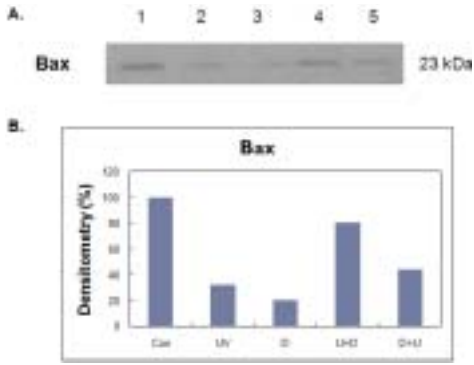


Fig. 5. Effect of *D. batatas* extracts on Bax protein in irradiated MEF Pol $\beta$  wild-type cells.

A) Cells were harvested at 24h after treatment with various conditions. Cells were then lysed, and the supernatants were subjected to western blot analysis. Aliquots of 100 ug protein extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with Bax antibody. Where : Lane 1, untreated cells; Lane 2, UVA irradiation for 30 min; Lane 3, 5.38 mg/mL *D. batatas* extracts; Lane 4, UVA irradiation + 5.38 mg/mL extracts; Lane 5, 5.38 mg/mL extracts + UVA irradiation. B) Densitometric analysis of the immunoblots based on the density of the band on the control as 100%.

### 6. 山藥이 MEF cell의 Bcl-2 발현에 미치는 영향

산약을 처리한 모든 실험군에서 Bcl-2의 발현량이 가장 증가하였고 수치도 비슷하게 나타났다. 반면, UVA 단독 처리한 실험군에서는 가장 수치가 낮았다 (Fig. 6).

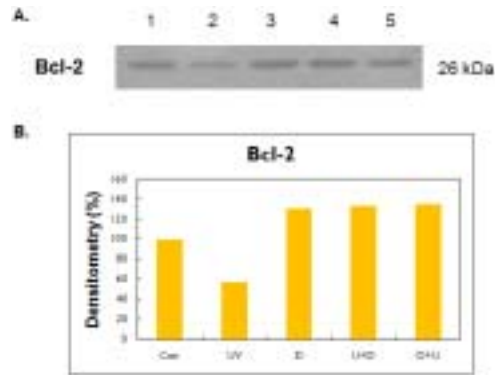


Fig. 6. Effect of *D. batatas* extracts on Bcl-2 protein in irradiated MEF Pol $\beta$  wild-type cells.

A) Cells were harvested at 24 h after treatment with various conditions. Cells were then lysed, and the supernatants were subjected to western blot analysis. Aliquots of 100 ug protein extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with Bcl-2 antibody. Where : Lane 1, untreated cells; Lane 2, UVA irradiation for 30 min; Lane 3, 5.38 mg/mL *D. batatas* extracts; Lane 4, UVA irradiation + 5.38 mg/mL extracts; Lane 5, 5.38 mg/mL extracts + UVA irradiation.

B) Densitometric analysis of the immunoblots based on the density of the band on the control as 100%.

### 7. 山藥이 MEF cell의 p53 발현에 미치는 영향

UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에서 p53의 발현량이 가장 증가하였으며 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군에서도 대조군에 비해 p53의 수치가 증가하였지만 UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에 비해 상대적으로 감소하였다. 한편, UVA와 산약을 단독 처리한 실험군에서는 대조군에 비해 큰 변화가 없었다(Fig. 7).

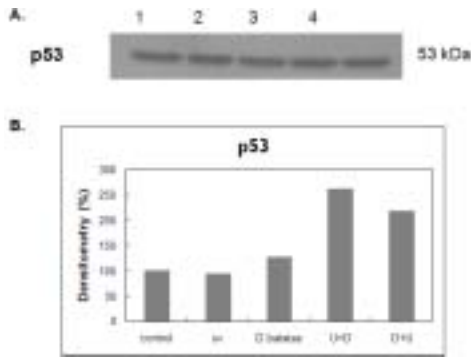


Fig. 7. Effect of *D. batatas* extracts on p53 protein in irradiated MEF Pol  $\beta$  wild-type cells.

A) Cells were harvested at 24 h after treatment with various conditions. Cells were then lysed, and the supernatants were subjected to western blot analysis. Aliquots of 100  $\mu$ g protein extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with p53 antibody. Where : Lane 1, untreated cells; Lane 2, UVA irradiation for 30 min; Lane 3, 5.38 mg/mL *D. batatas* extracts; Lane 4, UVA irradiation + 5.38 mg/mL extracts; Lane 5, 5.38 mg/mL extracts + UVA irradiation.

B) Densitometric analysis of the immunoblots based on the density of the band on the control as 100%.

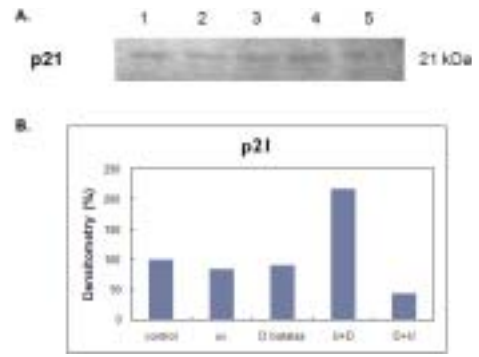


Fig. 8. Effect of *D. batatas* extracts on p21 protein in irradiated MEF Pol $\beta$  wild-type cells.

A) Cells were harvested at 24 h after treatment with various conditions. Cells were then lysed, and the supernatants were subjected to western blot analysis. Aliquots of 100  $\mu$ g protein extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with p21 antibody. Where : Lane 1, untreated cells; Lane 2, UVA irradiation for 30 min; Lane 3, 5.38 mg/mL *D. batatas* extracts; Lane 4, UVA irradiation + 5.38 mg/mL extracts; Lane 5, 5.38 mg/mL extracts + UVA irradiation.

B) Densitometric analysis of the immunoblots based on the density of the band on the control as 100%.

### 8. 山藥이 MEF cell의 p21 발현에 미치는 영향

UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에서 p21의 발현량이 가장 증가 하였다. 반면, 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군에서는 대조군과 비교 시 발현량이 감소하였고 UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에 비해서는 매우 큰 폭으로 발현량이 감소하였다. 한편, 산약과 UVA를 단독 처리한 실험군에서는 발현량에 변화가 거의 없었다(Fig. 8).

### 9. 山藥이 MEF cell의 Cdc25A 발현에 미치는 영향

UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에서 Cdc25A의 발현량이 가장 증가 하였다. 반면, 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군에서는 대조군과의 비교 시 큰 변화는 없었으나 UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에 비해 큰 폭으로 발현량이 감소하였다. 한편, 산약을 단독 처리한 실험군에서는 대조군과 비교 시 수치가 큰 폭으로 감소하였고, UVA를 단독 처리한 실험군에서는 발현량에 큰 변화가 없었다(Fig. 9).



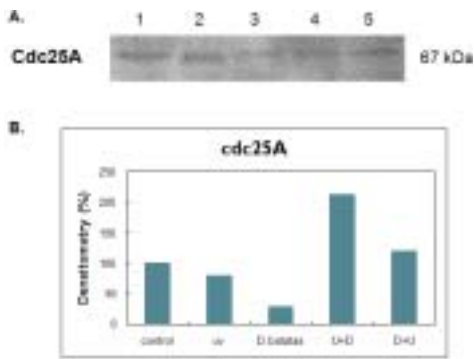


Fig. 9. Effect of *D. batatas* extracts on Cdc25A protein in irradiated MEF Pol $\beta$  wild-type cells.

A) Cells were harvested at 24 h after treatment with various conditions. Cells were then lysed, and the supernatants were subjected to western blot analysis. Aliquots of 100  $\mu$ g protein extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with cdc25A antibody. Where : Lane 1, untreated cells; Lane 2, UVA irradiation for 30 min; Lane 3, 5.38 mg/mL *D. batatas* extracts; Lane 4, UVA irradiation + 5.38 mg/mL extracts; Lane 5, 5.38 mg/mL extracts + UVA irradiation.

B) Densitometric analysis of the immunoblots based on the density of the band on the control as 100%.

#### 10. 산약이 MEF cell의 Cdk2 발현에 미치는 영향

UVA를 단독 처리한 실험군에서 Cdk2의 발현량이 가장 감소하였고 UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에서 발현량이 가장 증가하였다. 또한, 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군은 대조군에 비해 발현량이 증가하였지만 UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에 비해 발현량이 감소하였다. 반면, 산약을 단독 처리한 실험군은 대조군과 비교 시 큰 변화가 없었다(Fig. 10).

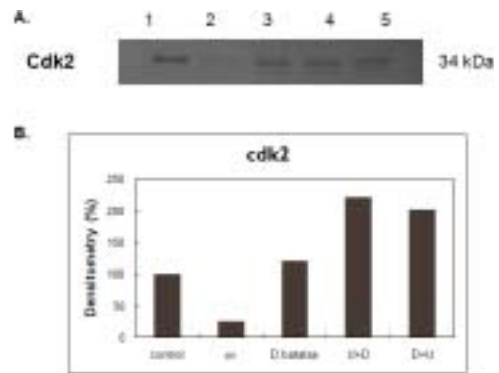


Fig. 10. Effect of *D. batatas* extracts on Cdk2 protein in irradiated MEF Pol  $\beta$  wild-type cells.

A) Cells were harvested at 24 h after treatment with various conditions. Cells were then lysed, and the supernatants were subjected to western blot analysis. Aliquots of 100  $\mu$ g protein extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with cdk2 antibody. Where : Lane 1, untreated cells; Lane 2, uv irradiation for 30 min; Lane 3, 5.38 mg/mL *D. batatas* extracts; Lane 4, uv irradiation + 5.38 mg/mL extracts; Lane 5, 5.38 mg/mL extracts + uv irradiation.

B) Densitometric analysis of the immunoblots based on the density of the band on the control as 100%.

#### 11. 산약이 MEF cell의 Cyclin A 발현에 미치는 영향

UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에서 Cyclin A의 발현량이 가장 증가하였다. 또한, 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군은 대조군과 비교시 발현량이 증가하였지만 UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에 비해 발현량이 감소하였다. 반면, UVA을 단독 처리한 실험군에서 큰 변화가 없었고 산약을 단독 처리한 실험군에서는 발현량이 소폭 증가 하였다(Fig. 11).

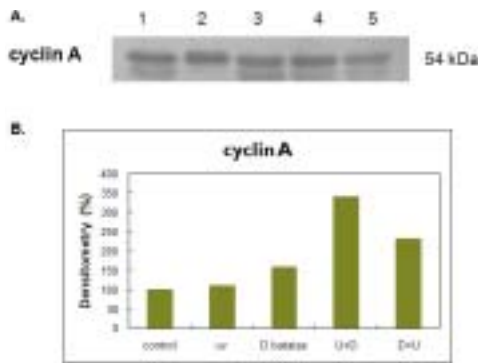


Fig. 11. Effect of *D. batatas* extracts on cyclin A protein in irradiated MEF Pol  $\beta$  wild-type cells.

A) Cells were harvested at 24 h after treatment with various conditions. Cells were then lysed, and the supernatants were subjected to western blot analysis. Aliquots of 100  $\mu$ g protein extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with cyclin A antibody. Where : Lane 1, untreated cells; Lane 2, UVA irradiation for 30 min; Lane 3, 5.38 mg/mL *D. batatas* extracts; Lane 4, UVA irradiation + 5.38 mg/mL extracts; Lane 5, 5.38 mg/mL extracts + UVA irradiation.

B) Densitometric analysis of the immunoblots based on the density of the band on the control as 100%.

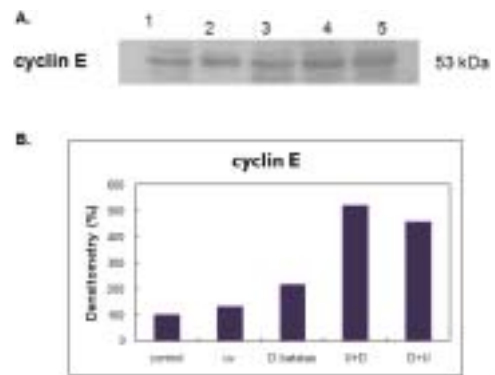


Fig. 12. Effect of *D. batatas* extracts on cyclin E protein in irradiated MEF Pol  $\beta$  wild-type cells.

A) Cells were harvested at 24 h after treatment with various conditions. Cells were then lysed, and the supernatants were subjected to western blot analysis. Aliquots of 100  $\mu$ g protein extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with Bax antibody. Where : Lane 1, untreated cells; Lane 2, uv irradiation for 30 min; Lane 3, 5.38 mg/mL *D. batatas* extracts; Lane 4, uv irradiation + 5.38 mg/mL extracts; Lane 5, 5.38 mg/mL extracts + uv irradiation.

B) Densitometric analysis of the immunoblots based on the density of the band on the control as 100%.

## 12. 山藥이 MEF cell의 Cyclin E 발현에 미치는 영향

UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에서 Cyclin E의 발현량이 가장 증가하였다. 또한, 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군은 대조군에 비해 발현량이 큰 폭으로 증가하였지만 UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에 비해서는 발현량이 감소하였다. 반면, UVA를 단독 처리한 실험군에서 큰 변화가 없었고 산약을 단독 처리한 실험군에서는 대조군에 비해 발현량이 소폭 증가 하였다(Fig. 12).

## IV. 고 찰

산약은 『神農本草經』에 “性溫味甘無毒主傷中，補虛，除寒熱邪氣，補中益氣力，長肌肉，久服耳目聰明” 이라고 수록된 이래 味甘性溫하며，補脾胃，益肺氣，強腎固精 및 止帶下의 효능이 있는 것으로 알려져 있다<sup>18)</sup>.

산약의 약용성분으로는 saponin, dioscin, mucin, allatonin, cholin, diosgenin, batatasine, amylose, tannin 등이 함유되어 있으며, 현재까지 보고된 주요 기능은 항 당뇨병, 콜레스테롤 저하작용, 항 돌연변이 작용, 항종양효과, 면역조절효과, phospholipase

A2 저해작용, 종양억제활성, 항진균성, 세포독성의 활성, 인체 백혈병암세포의 성장억제효과 등이 있다<sup>19-21)</sup>.

이러한 산약의 현대 의학적인 작용인 면역기능과 관련된 인자들을 한의학적인 측면에서 볼 때, 인체 조직기관의 외부 환경에 대한 적응력 및 病因에 대한 저항력을 正氣라 하고, 邪氣는 인체의 질병을 유발하는 각종 유해인자로 六淫, 痰飲, 瘀血 등을 말한다. 여기서 正氣란 免疫機能과 유사하며, 邪氣는 非自己的인 抗原이라 할 수 있다<sup>22)</sup>.

이러한 正氣와 邪氣에 대한 관점에서 산약은 외부의 세포독성에 대하여 인체의 정상적인 면역기능이 유지될 수 있도록 도와주는 약물로 인식할 수 있다. 반면에 과도한 자외선은 인체에 유해작용을 일으키므로 邪氣에 속하는 인자로 인식할 수 있다.

현재까지 밝혀진 연구에 의하면, 자외선은 홍반, 부종, 수포, 동통에서 광노화와 발암 현상에 이르기까지 노출의 정도와 기간, 피부의 상태에 따라 다양한 세포 독성을 유발한다<sup>23,24)</sup>.

따라서 본 연구에서는 자외선에 대한 산약의 보호 효과를 실험하기 위해 세포 증식 또는 살아있는 세포를 정확하게 측정하는 색소법인 세포의 색소 환원능력(MTT assay), 색소배제 능력(Trypan Blue 법)을 시행하였다.

Trypan Blue 법에서는 MEF cell에 산약을 처리한 군에서 세포의 생존율이 보다 더 높게 측정되었다. 하지만 세포 생존율이 두 cell에서 다르게 측정된 것으로 보아 UVA에 유해 영향을 주는 강도가 다소 다르다는 것을 알 수 있었다.

MTT assay는 세포 대사의 정도에 따

른 세포의 활성도를 측정할 수 있는 방법으로 MEF cell에 산약의 농도를 증가하면서 UVA를 노출시켰을 때 세포의 보호작용이 커짐을 알 수 있었다. 특이할 만한 점은 MEF cell에서는 UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군이 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군보다 세포 활성도가 높게 측정 되었다는 것이다. 이는 산약의 효능이 자외선 손상에 대한 예방효과보다는 손상에 대한 치료 효과가 더 뚜렷함을 시사하는 것으로 볼 수 있었다.

한편, UVA 조사와 산약의 처리가 세포 내핵의 형태에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 DAPI 염색법을 수행하였다. MEF cell에 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군에서 DNA 분절과 응축이 거의 없었으며, UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군은 UVA만 노출시켰을 때 보다는 적지만 DNA 분절이 관찰되었다. 또한, 산약을 단독 처리한 실험군에서도 DNA 분절이 관찰되었는데 이러한 측면에서 봤을 때 산약은 세포를 보호하는 역할도 하지만 복원되기 힘든 손상된 세포를 사멸시키는 역할도 한다는 것을 추론할 수 있었다.

UVA와 산약 처리가 MEF cell의 각 세포 주기에 어떠한 영향을 알아보는지 알아보기 위해 세포주기 분석법을 수행하였다. UVA와 산약을 단독 처리했을 시에는 대조군에 비해 세포주기에 큰 영향을 미치지 않았지만 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군에서 UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군은 달리 정상적인 세포주기로 회복된 것을 확인할 수 있었다.

Apoptosis는 세포가 과도하게 많거나

불필요하거나, 손상을 입어 회복이 불가능한 경우에 세포를 제거하는 과정으로 생명체의 세포수를 일정하게 조절함으로써 생명유지에 중요한 역할을 하는데<sup>25)</sup>, UVA에 의한 세포 손상에 대한 산약의 보호 작용을 관찰하기 위해 세포의 apoptosis를 양적으로 측정하는 annexin V-FITC를 수행 하였다.

UVA을 먼저 처리하고 산약을 처리한 실험군이 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군에 비해 apoptosis 발생율이 다소 증가 하였는데, 이는 산약이 UVA에 대한 세포 손상을 보호하는 역할을 한 것으로 보인다. 반면, 산약을 단독 처리한 실험군에서 apoptosis 발생율이 증가한 부분에 대해서는 산약이 복합체의 특성상 세포내에서 상이한 작용을 하는 것에 의한 현상으로 추측되었다.

Bax는 apoptosis를 통해 손상된 세포를 세포사멸로 촉진시키는데 관여하는 단백질이다<sup>26)</sup>. 대조군에 비해 UVA와 산약을 단독 처리한 실험군에서 Bax의 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있었는데, UVA 단독 처리 시 Bax의 발현량이 감소한 것은 의외의 결과였다. 추후에 반복적인 실험을 통해 발현량의 재확인이 필요할 것으로 보인다. 한편, UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군과 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군을 비교 시 후자의 경우 Bax의 발현량이 감소 것을 확인할 수 있었는데, 이를 통해 산약이 UVA에 손상을 입은 세포의 경우에는 apoptosis를 통해 소거하고, 사전 투여를 통해서 자외선에 의한 세포 손상을 보호하는 효과를 동시에 가지는 것으로 추론할 수 있었다.

Bcl-2는 Bax와는 반대로 apoptosis를

억제하는데 관여하는 단백질이다<sup>26,27)</sup>. 또한 림프종과 밀접하게 관련된 유전자로서 다른 암유전자와는 달리 세포 증식에는 관여하지 않고 apoptosis의 억제기능에 관여하고 있다. 이러한 특성을 지닌 Bcl-2가 산약을 처리한 모든 실험군에서 비슷한 정도의 높은 발현량을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 이는 산약 자체가 함유한 복합체 중의 물질이 Bcl-2의 발현량을 증가시켜 anti-apoptosis에 작용하는 것으로 추측할 수 있었다.

p53은 정상세포의 세포질에 존재하는 암 억제 유전자(tumor suppressor gene)이다. 이는 DNA 손상 시 농도와 기능이 증가되고 세포질에서 세포핵으로 이동되면서 apoptosis를 유발하는 Bax, IGF-BP-3, p21, WAF1/Cipl, GADD45, mdm2 등의 유전자를 활성화시켜서 apoptosis가 일어나게 한다. 이러한 p53은 평소 그 수치가 낮지만 세포가 손상을 입는 경우 활성화 되어 그 수치가 증가하며 p21의 수치 역시 증가하는 것으로 알려져 있다<sup>28)</sup>. UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에서 p53과 p21이 가장 수치가 증가되었음을 알 수 있다. 이와 비교하여 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군에서 p53과 p21의 수치가 감소한 것을 보았을 때 산약이 UVA에 대해 정상세포를 보호하는 것을 확인할 수 있었다.

Cdc25A는 세포의 S기에 DNA 합성에 관여하여 것으로 정상 세포가 손상을 입게 되면 인산화가 된다<sup>28)</sup>. 실험에서 UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군에서 발현량이 가장 증가하다가 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군에서 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이미 UVA에 의한 세포 손상에 의해 Cdc25A의 발현량이 증

가되었으나 산약을 먼저 처리하면 그 수치가 낮아진 것으로 보아 산약이 의해 정상 세포가 보호 받은 것으로 보인다.

Cdc25A가 세포 손상에 의해 인산화가 되면 Cdk2, Cyclin E, Cyclin A를 비활성화 시켜 DNA 합성을 방해하고 세포주기 중 S기를 지연시켜서 손상된 세포의 회복에 관여한다<sup>29)</sup>. 대조군에 비해 UVA을 단독 처리한 실험군에서는 Cdk2, Cyclin E, Cyclin A의 발현량이 다소 감소하였지만 산약을 단독 처리한 실험군에서는 발현량이 증가한 것을 볼 수 있었다. 반면, UVA 처리 후 산약을 처리한 실험군과 산약 처리 후 UVA를 처리한 실험군 모두 그 발현량이 대조군에 비해 증가 하였는데, 이는 UVA에 의한 세포 손상으로 인해 발현량이 감소할 것이라는 예측과는 다른 결과를 나타냈다. 이는 산약 자체의 복합성분 중 Cdk2, Cyclin E, Cyclin A에 특이적으로 작용하는 물질이 있을 것으로 예측할 수 있는 근거가 되며 추후에 연구가 더 필요할 것으로 보였다.

다양한 실험을 통해서 산약이 UVA의 세포 손상에 대해 치유하는 작용과 손상을 사전에 보호하는 작용이 동시에 있음을 확인하였다. 또한, 자외선에 손상된 세포를 치유하는 작용 보다는 오히려 정상 세포를 자외선 손상으로 부터 보호하는 작용이 좀 더 강한 것으로 추정되었다.

이러한 일련의 결과를 통해 자외선 손상으로부터 피부를 보호하는 약물 혹은 기능성 화장품의 원료로서 산약 혹은 산약의 특정 성분을 활용할 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 실험 중 세포 주기에 관여하는 단백질이 산약에 특이적으로 반응하는 양상을 보였는데, 이는 산

약 내에서 이러한 단백질에 영향을 줄 수 있는 특정 물질이 있음을 예측하게 하는 것으로 사료되었다. 이는 추후 연구를 통해 산약의 추출물에서 유용한 신물질을 발견하는 단초를 얻은 결과로 인식된다.

## V. 결 론

산약이 UVA에 노출된 MEF cell에 미치는 영향에 대한 다양한 실험을 통해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 산약을 먼저 처리하고 UVA을 처리한 실험군이 UVA을 먼저 처리하고 산약을 처리한 실험군에 비해 세포의 생존율이 더 높은 것을 확인할 수 있었다.
2. UVA을 처리한 세포에 산약의 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 증가하였고, UVA 노출 후 가장 높은 농도의 산약을 투여한 실험군이 UVA 노출 없이 산약만 투여한 실험군과 비교 시 시간이 지남에 따라 세포 생존율이 비슷한 형태로 나타났다.
3. UVA을 단독 처리한 실험군에서 세포 내핵의 붕괴가 관찰되었으며 산약을 처리한 후 UVA을 처리한 실험군에서 보다 적은 세포 내핵의 붕괴가 관찰되었다.
4. 산약을 단독 처리했을 시 세포주기에서 G2기가 매우 빨리지는 것을 관찰할 수 있었다. 반면에, UVA을 처리한 후 산약을 처리한 실험군에서는 G2기가 대조군에 비해 느려지는 것을 확인 하였다.
5. Annexin V-FITC에서 UVA을 먼저

처리하고 산약을 처리한 실험군이 산약을 먼저 처리하고 UVA를 처리한 실험군에 비해 세포 사멸로 가는 세포수가 증가하였음을 확인 하였다.

6. 산약을 먼저 처리하고 UVA를 처리한 실험군이 UVA를 먼저 처리하고 산약을 처리한 실험군에 비해 Bax의 발현량이 감소하였다.
7. 산약을 처리한 모든 실험군에서 Bcl-2의 발현량이 대조군에 비해 높은 수치를 보였으며 UVA를 단독 처리한 실험군은 대조군에 비해 Bcl-2의 발현량이 감소하였다.
8. p53과 p21의 양이 UVA를 먼저 처리하고 산약을 처리한 실험군에서 발현량이 가장 증가 하였고 산약을 먼저 처리하고 UVA를 처리한 실험군에서는 상대적으로 감소하였다.
9. Cdc25A의 양이 UVA를 먼저 처리하고 산약을 처리한 실험군에서 발현량이 가장 증가하였고 산약을 먼저 처리하고 UVA를 처리한 실험군에서는 상대적으로 감소하였다. 또한, 산약을 단독 처리한 실험군에서는 대조군과 비교 시 수치가 감소하였으나 UVA를 단독 처리한 실험군에서는 큰 변화가 없었다.
10. Cdk2, Cyclin A, Cyclin E의 발현량이 대조군과 비교 시 모든 실험군에서 증가하였다. 한편, UVA를 먼저 처리하고 산약을 처리한 실험군이 가장 높은 수치를 보였으며 산약을 먼저 처리하고 UVA를 처리한 실험군이 상대적으로 수치가 감소하였다.

□ 투 고 일 : 2009년 7월 20일

□ 심 사 일 : 2009년 8월 3일

□ 심사완료일 : 2009년 8월 10일

## 참고문헌

1. Ulrich C et al. Comparative epidemiology and pathogenic factors for non-melanoma skin cancer in organ transplant patient. *Dermatol Surg.* 2004;30:622-7.
2. Kligman, LH. Photoaging : manifestation, prevention and treatment. *Dermatol. Clin.* 1986;4:517-28.
3. 윤재일. 자외선에 의한 피부반응. 방사선방어학회지. 1995;20(3):181-6.
4. 김진화 등. 약용식물추출물의 광보호 효과와 항염증 효과 연구. *J. Soc. Cosmet. Scientist Korea.* 2004;30(2):227-33.
5. 김선영 등. 한방비용제제(자음미단)의 Hairless mouse model에서의 피부 광노화 억제 및 섬유아세포에서의 UVA 손상 저해. *대한한의학회지.* 2002;23(3):43-53.
6. 남혜정, 김윤범. 노화와 피부노화에 대한 고찰. *대한안이비인후피부과학회지.* 2004;17(1):17-25.
7. Eun JS and Song WY. The combined effect of n-BuOH fraction of Ulmi cortex and anticancer drugs on cancer cell lines. *Korean Journal of Pharmacognoc.* 1994;25(3):144.
8. R. K. Oldham. Biological Response Modifiers. *Journal of the National Cancer Institute.* 1993;70:789.
9. Wang W et al. In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of Panax ginseng. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* 2007;59(5):589-601.
10. 최변탁 등. 虎杖根이 子宮頸部癌細胞

- (HeLa cell)의 成長抑制 및 細胞枯死에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2006;19(1):1-13.
11. 박종규 등. 沒藥이 子宮頸部癌細胞(HeLa cell)의 apoptosis에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌 2006;19(1):97-110.
  12. Vago R et al. Saponin and ricin A chain follow different intracellular routes to enter the cytosol of intoxicated cells. The FEBS Journal. 2005;72(19):4983-95.
  13. Mimaki Y et al. Steroidal saponins from *Hosta longipes* and their inhibitory activity on tumour promoter-induced phospholipid metabolism of HeLa cells. *Phytochemistry*. 1996;42(4):1065-70.
  14. 최승훈, 안규석, 최선미. 丹蔘의 抗癌活性과 apoptosis에 미치는 영향. 동의병리학회지. 2000;14(2):22-47.
  15. 김주연 등. 生地黃이 子宮頸部癌細胞(HeLa cell)에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2006;19(1):69-80.
  16. 이현희, 임은미. 子宮頸部癌細胞(HeLa cell)에 대한 天花粉의 成長抑制 및 細胞死滅效果. 대한한방부인과학회지. 2005;18(3):77-91.
  17. 홍기철 등. 三稜이 子宮頸部癌細胞(HeLa cell)의 apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2005;18(4):10-23.
  18. 최부술 등. 산약, 당귀, 대추를 이용한 고품차 개발. 한국약용작물학회지. 1998;6(3):176-80.
  19. 손호용. 연구결과보고서 : 재배마 분말(산약)의 위생성 및 안전성 제고 방안 연구. 식품의약품안전청. 2004;1-56.
  20. Choi EM, Koo SJ, Hwang JK. Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam(*Dioscorea batatas*). *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;91:1-6.
  21. Kim MJ et al. Methanol extract of *Dioscoreae Rhizoma* inhibits pro-inflammatory cytokines and mediators in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. *International Immunopharmacology*. 2004;4:1489-97.
  22. 陳士鐸. 洞天奧旨. 北京中醫古籍出版社. 1992:157.
  23. 이유신. 임상피부과학. 서울:영문각. 1998:296-7.
  24. 박수남. 피부노화와 활성산소. 서울 산업대학교 논문집. 1999;50:329-41.
  25. Kozinets GI et al. Physiological (programmed) cell death in menopoiesis. *Klin Lab Disagn*. 1997;1:35-38.
  26. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *Journal of Cell Biology*. 1994;124:1-6.
  27. Yung TM, Sato S, Satoh MS. Poly(ADP-ribose)ation as a DNA damage-induced post-translational modification regulating poly(ADP-ribose) polymerase-1-topoisomerase I interaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004 ;279(38):39686-96.
  28. Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress in Neurobiology*. 2000;62:215-49.
  29. Norris DA et al. Human keratinocytes maintain reversible anti-apoptotic defenses in vivo and in vitro. *Apoptosis*. 1997;2(2):136-48.