원지 산 가수분해 분획물의 뇌세포 보호 작용

이동성# · 최현규# · 리 빈 · 김경수 · 김순애 · 전승기 · 노정미 · 김기모 · 한종현[1] · 정길생[2] · 김윤철*

원광대학교 약학대학, 1 : 한의과대학 약리학교실, 2 : 계명대학교 약학대학

Neuroprotective Effect of the Acid Hydrolysis Fraction of the Roots of *Polygala Tenuifolia*

Dong Sung Lee#, Hyun Gyu Choi#, Bin Li, Kyung Su Kim, Soon Ai Kim, Seung Ki Chon, Jung Mi Rho, Ki Mo Kim, Jong Hyun Han[1], Gil Saeng Jeong[2], Youn Chul Kim*

College of Pharmacy, 1 : Department of Pharmacology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University
2 : College of Pharmacy, Keimyung University

The roots of *Polygala tenuifolia* Willd. is a well-known traditional medicine used as expectorant, tonic, tranquilizer in Asia including China and Korea. And also have been used to treat amnesia, neurasthenia, palpitation, insomnia, and disorientation. Glutamate-induced oxidative injury contributes to neuronal degeneration in many central nervous system (CNS) diseases, such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, epilepsy and ischemia. Inducible heme oxygenase (HO)-1 acts against oxidants that are thought to play a role in the pathogenesis of these diseases. NNMBS269, acid hydrolysis EtOAc fraction of the *P. tenuifolia* showed dominant neuroprotective effects on glutamate-induced neurotoxicity in mouse hippocampal HT22 cells while general EtOAc fraction of the *P. tenuifolia* (NNMBS268) not shown. NNMBS269 induced the expression of HO-1 protein that has been proposed to play an important cellular defense role against oxidant injury. In addition increased HO activity. In mouse hippocampal HT22 cells, NNMBS269 makes the nuclear accumulation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). In conclusion, acid hydrolysis EtOAc fraction the *P. enuifolia*. (NNMBS269) significantly protect glutamate-induced oxidative damage by induction of HO-1 via Nrf2 translocation in mouse hippocampal HT22 cells.

Key words : p*olygala tenuifolia*, heme oxygenase-1, HT22, glutamate, neuroprotective effect

서 론

원지 (*Polygala tenuifolia* Willd.)는 원지과 (Polygalaceae)에 속하며 중국동북, 화북, 산서, 협서, 내몽고 등에 자생하는 다년생 초본으로 목심 부위를 제거하고 건조한 뿌리를 사용하며 우리나라에는 북부, 중부지방에 분포한다. 가늘고 길며 구부러진 원주형 또는 원통상을 이룬 형태이고, 바깥면은 엷은 회갈색이다. 물성은 꺾어지기 쉽고 맛은 약간 아리다[1,2]. 함유 성분으로는 triterpenoid 계 saponin과 xanthone계열의 화합물들이 함유되어 있으며, 그 가운데 주로 saponin이 다량 존재한다. 중국에서는 예로부터 거담, 강장, 진정제[3]로 널리 사용하였고, 건망증, 신경쇠약, 불안, 심계항진, 불면증, 정신혼란[4,5] 또는 치매[6] 예방과 치료제로 사용되어왔다. 최근 진행된 연구들에 따르면 생쥐의 성상세포에서 항암작용의 효과 보고[7]와 원지 물 추출물의 rat에서 기억력과 이상행동에 대한 치료 효과가 보고되었다[8]. 스코폴라민이 유도하는 rat의 공간인식 능력과 수동적 회피 능력의 손상 역시 보호한다고 보고되었다[9-11].

인간을 포함한 호기성 호흡을 하는 생명체 특히 포유류에서 산소분자 (O_2)를 이용한 산화환원의 결과, 또는 항원에 대한 면역세포의 반응, 외부에서의 방사선이나 화학물질 등의 노출에 의해 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 체내 ROS의 축적과 강한 산화반응성은 항산화 시스템의 기능저하 시 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 유발한다[12]. 지금까지의 많은 연구들에 따르면 산화적 스트레스 및 ROS는 신경 세포의 파

* 교신저자 : 김윤철, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 약학대학
· E-mail : yckim@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6823
· 접수 : 2011/08/05 · 수정 : 2011/08/08 · 채택 : 2011/08/16
# Both authors contributed equally to this work

괴와 기능이상을 초래하여 알츠하이머, 파킨슨병, 뇌졸중 등의 신경 퇴행성 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다[13-15].

중추 신경계 (central nervous system, CNS)의 대표적인 흥분성 신경전달 물질인 글루타메이트는 시냅스에서 신경전달, 뉴런의 형성과 생장, 행동이나 학습 및 기억력 등에 매우 중요한 역할을 한다[16]. 하지만 이러한 생리학적인 기능에도 불구하고 글루타메이트의 독성은 신경세포에 손상을 미치거나 급성 또는 만성의 퇴행성 뇌질환을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다[17,18]. 글루타메이트가 유발하는 신경세포 손상은 크게 두 가지 요인으로 구분할 수 있는데, 글루타메이트 수용체의 과다흥분에 의한 독성과 글루타메이트 수용체의 매개 없이 산화적 스트레스를 유발하여 세포에 손상을 미치는 것이다[19,20]. 본 실험에서는 글루타메이트의 수용체가 결여되어있는 쥐의 해마유래인 HT22 세포주를 사용하여 글루타메이트 처리시 수용체 과다 흥분에 의한 독성이 아닌 산화적 스트레스로 인한 세포의 손상을 확인 할 수 있도록 하였다[21].

Heme oxygenase (HO)는 세포의 항산화 시스템에서 중요한 역할을 담당하는 단백질로서, HO 유도체들 중 유도 가능한 형태인 HO-1은 세포내의 heme을 분해하여 일산화탄소, 철, billiverdin을 만든다[22]. 이렇게 분해된 세가지 형태의 생성물들과 HO-1 그 자체는 세포손상 및 사멸의 억제, 항염증 및 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근에는 HO-1의 발현이 세포보호와 항산화 작용을 통하여 산화적 스트레스로 인한 뇌세포 손상을 억제한다는 연구 결과가 보고되었다[23].

본 연구에서는 산 가수분해를 통한 화학적 변화에 따른 생약의 생리활성 변화 비교를 살펴보고자 하였으며, 원지 EtOAc 분획물(NNMBS268)과 원지 산 가수분해 EtOAc 분획물(NNMBS269)의 뇌세포 보호효과 비교를 하고, 보호효과가 우수한 분획물의 HO-1 발현을 통한 뇌세포 보호효과 및 그 기전을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 원지는 2009년 3월 익산시 신용동 소재 대학한약국에서 구입하였으며, 형태학적 평가를 통하여 동정하였고 원지 EtOAc분획물(NNMBS268)과 원지 산 가수분해EtOAc분획물(NNMBS269)은 천연물신약 표준화 소재은행에서 분양 받아 사용하였다.

2. 시약 및 기기

DMEM 배지와 trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Gibco Laboratorie사에서 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone Laboratories사에서 구입하였다. L-glutamate, Trolox와 3′-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma사에서 구입하였다. 96-Well tissue culture plates와 기타 tissue culture dishes는 Nunc사 제품을 이용하였다. 흡광도는 BioRad사의 Microplate Reader를 이용하여 측정하였다. 각 시료의 조성 차이는 MERCK사의 TLC aluminium sheets Silica gel 60 F254를 이용하여 확인하였다.

3. 시료의 제조

원지 1 kg을 정제수로 2시간 동안 가열 환류 추출하고 여과한 여액을 감압 농축하여 원지 물 추출물 380 g을 얻었다. 원지 물 추출물에 EtOAc로 분획을 만들어 EtOAc에 녹는 분획물(NNMBS268) 31.14 g 을 얻었다. 또, 원지 물 추출물에 1 N HCl 1000 ml를 가하여 70~80℃ 에서 24시간 동안 가열 교반한 후 1 N NaOH 1000 ml를 가하여 pH7이 되도록 중화시킨다. 그 후 EtOAc로 분획을 만들고 EtOAc에 녹는 분획물(NNMBS269) 27.48 g을 얻을 수 있었다. 각 시료는 실험에 사용한 배지에 녹여서 사용하였다. NNMBS268, 269 각 시료를 2.5 mg/ml의 농도로 메탄올에 용해시켜 검액을 만들고, 10 μl 씩 TLC plate에 점적하여 $CHCl_3$: MeOH (8 : 1)의 용매 조건으로 전개시키고 이를 10% 황산 발색하여 박층크로마토그래프법으로 확인시험을 실시하였다. NNMBS269에서는 Rf 값이 각각 0.59, 0.66인 지점에서 NNMBS268에서는 보이지 않던 스팟이 확인 되었다.

4. HT22 세포배양 및 뇌 세포 보호활성 측정

생쥐 해마유래 HT22 세포주는 묵인희 교수 (서울대학교)로부터 분양하여 사용하였으며, 글루타메이트로 독성을 유발한 세포주에 대한 보호활성 측정은 정[24]등의 방법에 따라 실시하였다. HT22 세포 (2×10^5 cells/well)를 10% heat-inactivated FBS, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 μg/ml)을 함유한 DMEM 배지에 분주하고 5% CO_2 배양기 내에서 37℃ 에서 24시간 배양한 다음, 각각의 시료 용액 (25, 50, 100, 200 μg/ml)과 5 mM 글루타메이트를 처리한 후 12시간 동안 5% CO_2 배양기 내에서 배양하였으며, 세포생존율은 MTT법을 활용하여 측정하였으며, 양성대조약물로는 Trolox 50 μM를 사용하였다. 또한, 모든 실험치는 대조군에 대한 세포 보호율을 mean±S.D.로 표시하였으며, 각각 3회 반복 실험치를 이용하여 계산하였다.

5. ROS 측정

배양된 세포를 PBS로 세척한 후, 10 μM 2′,7′-dichlofluorescein diacetate (DCFDA, 35845)를 포함하는 Hank's balanced salt 용액에서 30분 동안 암실에서 반응시킨 후 세포의 형광광도 (SpectramaxGemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 측정하였다 (excitation wavelength: 490 nm; emission wavelength : 525 nm).

6. Western Blot Analysis

HT22 세포를 60 mm dish에 3×10^5 cells/well 밀도로 24시간 배양한 후 각각의 시료를 농도별로 처리하였다. HT22 세포에 RIPA buffer를 첨가한 다음, 4℃, 14,000×g 에서 25분간 원심분리하고 상등액을 튜브에 옮겼다. 단백질 정량은 BSA 단백질 실험 키트를 이용하였고 각각의 시료를 12% SDS-polyacrylamide gel에서 영동하고 nitrocellulose membrane (NC membrane)으로 전

사하였다. 전사된 NC membrane을 5% 무지방유가 포함된 신선한 blocking buffer (0.1% Tween 20 in Tris-buggered saline) 에서 blocking한 후 HO-1 antibody를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 2차 antiboby (Anti-mouse IgG)를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응한 다음, ECL 용액을 1:1로 잘 섞어서 NC membrane 위에 가하여 발광시키고 암실에서 X선 필름에 감광한 후 현상하였다. 같은 방법으로 actin antibody를 이용하여 actin을 측정한다.

7. Heme Oxygenase Activity

HO 효소 활성을 Tenhunen등의 방법[25]에 의해 다음과 같이 측정하였다. 세포로부터 얻어진 microsome에 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)와 랫의 간 cytosol에서 얻어진 biliverdin reductase를 포함하는 반응용액인 100 mM PBS, 2 mM $MgCl_2$, 3 mg의 랫의 간 cytosol, 0.8 mM NADPH, 2 mM glucose-6-phosphate, 0.2 U의 glucose-6-phosphate dehydrogenase 등을 첨가하고 기질로서 hemin을 20 μM 처리한 후 37℃에서 1시간 동안 암실에서 반응한 뒤 1 ml의 chloroform으로 반응을 종결하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 핵과 세포질 분획의 분리

HT22 세포에 protease inhibitor cocktail I 과 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 첨가한 PER-mammalian protein extraction buffer를 첨가하여 균질화하고 4℃에서 15,000×g로 원심분리 하였다. 10분간 원심분리 후 상등액을 세포질 분획으로 사용하기 위하여 -80℃에서 저장하였다. 나머지 침전물은 PBS로 세척한 후 RIPA buffer [150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl (pH 7.4), 50mM glycerophosphate, 20 mM NaF, 20 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM Na_3VO_4, protease inhibitors]를 첨가하고 4℃에서 15분간 혼합한 후 4℃, 16,000×g에서 15분간 원심분리 하였다. 이후의 과정은 앞에서 설명한 western blotting 방법을 이용하였다.

결 과

1. NNMBS268, 269의 글루타메이트로 유발한 산화적 스트레스에 대한 HT22 세포보호 및 ROS 생성 억제 효과

각각의 시료 NNMBS268, 269를 농도별 처리한 후 12시간 동안의 글루타메이트 작용의 결과, 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)이 세포독성을 나타내지 않는 농도(100~400 μg/ml)에서 원지 EtOAc분획물(NNMBS268)에서는 보여 지지 않는 유의한 세포보호 활성을 나타내었으며(Fig. 1A), 그와 동시에 강력한 활성산소종(reactive oxygen species: ROS) 소거 작용을 나타내었다(Fig. 1B). 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)의 처리 농도가 증가함에 비례하여 세포 생존율 역시 점차 증가하였으며, ROS 소거 작용의 강도 또한 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)의 처리 농도가 증가함에 따라 증가하였다(Fig. 1). 세포 생존율과 ROS 소거능 실험의 유의성 확인을 위한 양성 대조약물로는 항산화 물질로 알려진 trolox 50 μM을 사용하였다.

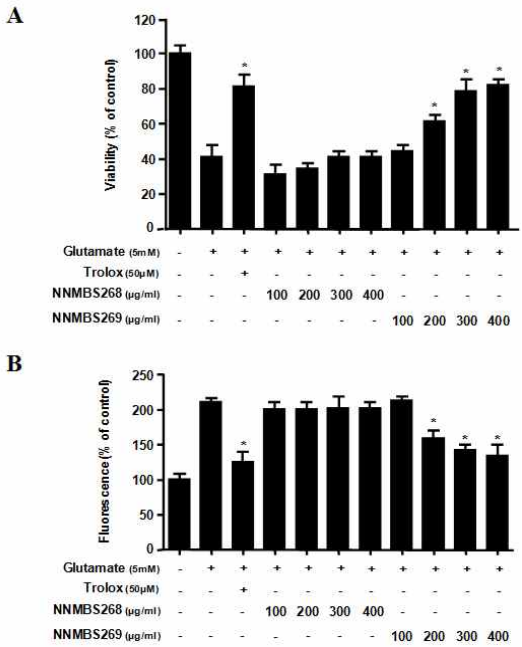

Fig. 1. Effects of NNMBS268, 269 on glutamate-induced oxidative neurotoxicity and reactive oxygen species (ROS) generation in HT22 cells. (A) Cells were treated with NNMBS268, 269 and then incubated for 12 h with glutamate (5 mM). (B) Exposure of HT22 cells to 5mM glutamate for 12 h increased ROS production. Each bar represents the mean_S.D. of three independent experiments. ＊p<0.05 vs. control.

2. NNMBS269의 HT22세포에서 Heme oxygenase(HO)-1 발현과 HO 활성 증가 효과

원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)의 Heme oxygenase(HO)-1의 발현 여부를 알아보기 위하여 농도별(100~400 μg/ml)로 12시간 동안 HT22 세포에 처리하여 그 발현 양상을 Western Blot 분석법으로 확인하였다. 100 μg/ml에서 약한 발현을 보이기 시작하면서 농도가 증가함에 따라 그 발현이 현저하게 증가하였고(Fig. 2A), HO activity 역시 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)농도에 비례하여 뚜렷하게 증가함을 보였다(Fig. 2B). 세포독성을 나타내지 않는 범위에서 가장 강한 HO-1 발현을 보였던 400 μg/ml의 농도에서 각 시간별(0~24시간)로 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)을 처리하여 HO-1의 발현 양상을 역시 Western Blot 분석법으로 확인하였다. 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)을 처리한 HT22 세포에서 6시간부터 HO-1 발현이 시작되어 18시간에서 최고 농도에 도달하여 점차 발현이 감소하는 양상을 보였다(Fig. 2C). HO activity 역시 18시간까지 시간에 비례하여 점차 증가하였고 18시간 이후에서는 감소하였다(Fig. 2D). HO-1의 발현과 HO activity 측정 실험에 양성 대조약물로 HO-1 발현 유도물질인 CoPP 20 μM을 사용하였다.

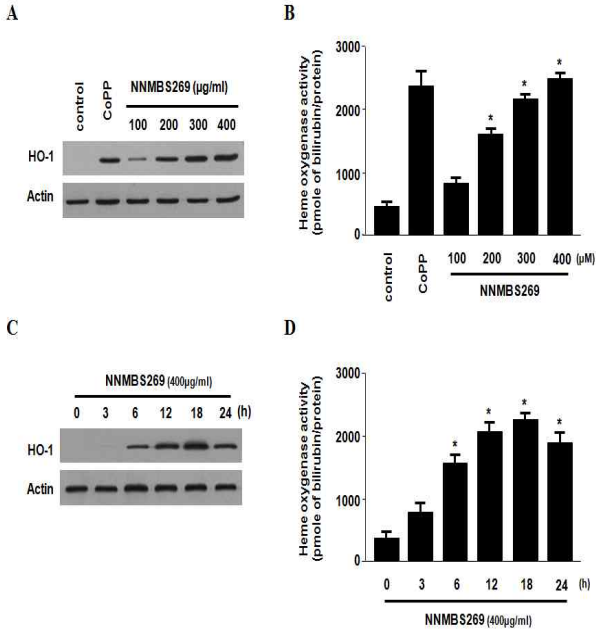

Fig. 2. Effects of NNMBS269 on heme oxygenase(HO)-1 expression and activity in HT22 cells. (A) Cells were incubated with NNMBS269 for 12 h. (B) HO activity was determined via bilirubin formation at 12 h after treatment with various concentrations of NNMBS269. (C) Cells were incubated with 400 μM of NNMBS269 for indicated periods. Expression of HO-1 was determined by Western blot analysis, and representative blots of three independent experiments are shown. (D) HT22 cells were treated with 400 μM of NNMBS269, and HO activity was measured at the indicated time points. Each bar represents the mean_S.D. of three independent experiments. ＊p<0.05 vs. control.

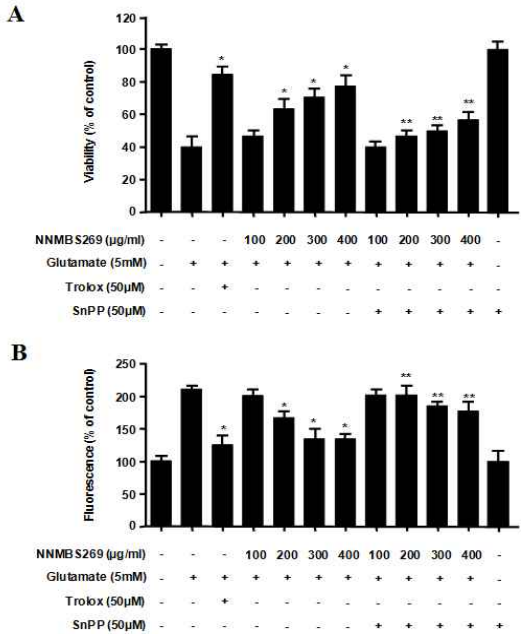

Fig. 3. Effects of HO-1 induction by NNMBS269 on glutamate-induced oxidative neurotoxicity and ROS generation. (A) Cells were treated with various concentrations of NNMBS269, 50 μM SnPP and then exposed to glutamate (5mM) for 12 h. (B) Exposure of HT22 cells to 5mM glutamate for 12 h increased ROS production. Each bar represents the mean_S.D. of three independent experiments. ＊p<0.05 vs. glutamate (5mM), ＊p<0.05 vs. same treatment plus SnPP.

3. NNMBS269의 HO-1 발현에 의한 HT22 세포보호 및 ROS 생성 억제 효과

HO-1 활성 억제제인 SnPP를 사용하여 세포생존율 및 ROS 생성 억제 실험을 진행하였다. 세포생존율 실험과 동일한 농도(100~400 μg/ml)로 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)을 처리하고 SnPP를 함께 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 실험을 진행하였다. SnPP를 처리하지 않은 군은 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)의 농도 증가에 비례하여 세포생존율이 증가하였고 ROS 소거 작용의 강도 역시 증가하였으나, SnPP를 함께 처리한 군에서는 세포생존율이 현저하게 감소하였고 ROS 소거 작용의 강도 역시 뚜렷한 감소를 보였다(Fig. 3). 함께 처리한 SnPP 50 μM 자체는 세포생존에 큰 영향을 미치지 않았다.

4. NNMBS269에 의한 핵 내로의 Nrf2 전사 여부

원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)에 의한 Nrf2의 전사 여부를 확인하기 위하여 400 μg/ml 농도의 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)을 시간별(0~1.5시간)로 처리하고 Western Blot 분석법을 사용하여 세포질과 핵 내의 Nrf2 양을 정량적으로 확인하였다. 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269) 처리 후 시간이 경과함에 따라 세포질 내의 Nrf2의 양은 점차 감소하는 반면, 핵 내부의 Nrf2는 세포질 내와는 반비례적으로 증가하는 양상을 보이는 것으로 보아 Nrf2의 세포질로부터 핵 내로의 전사가 이루어졌음을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

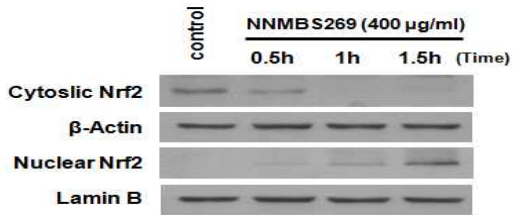

Fig. 4. Effects of NNMBS269 on nuclear translocation of Nrf2. Cells were treated with 400 μM of NNMBS269 for 0.5, 1, and 1.5 h. The nuclei were fractionated from the cytosol using PER-Mammalian Protein Extraction buffer as described in Materials and Methods. Nrf2 protein was detected by Western blot analysis, and representative blots of three independent experiments are shown.

고 찰

알츠하이머 증후군, 파킨슨 증후군, 헌팅턴 증후군과 같은 중추신경계 퇴행성 뇌 질환은 개개인의 정상적인 사고와 그에 따른 행동양상을 어렵게 함으로써 인간이 인간다운 생활을 영위하는데 크나큰 장애를 주고 있다. 이와 같은 중추신경계 퇴행성 뇌 질환의 주요한 요인 중의 하나가 산화적 스트레스이며, 특히 글루타메이트는 중추신경계에서 산화적 스트레스를 유발하는 물질로 알려져 있다[26,27]. 본 연구에서는 글루타메이트로 산화적 손상을 유발시킨 생쥐 해마 유래 세포인 HT22를 이용하여 원지 EtOAc분획물(NNMBS268)과 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)이 갖는 뇌세포 보호효과와 항산화 효과를 측정하였고 그 보호 기전을 연구하였다. 특히 산 가수분해를 통한 화학적 변화에 따른 원지 분획물의 생리활성 변화 비교를 살펴보고자 하였다. 산 가수분해를 하지 않은 원지 EtOAc분획물

(NNMBS268)과 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)의 함유 성분의 비교 실험을 위하여 실시한 박층크로마토그래프법 확인시험에서NNMBS268, 269 각 시료를 2.5 mg/ml의 농도로 메탄올에 용해시켜 검액을 만들고, 10 µl 씩 TLC plate에 점적하여 $CHCl_3$: MeOH (8 : 1)의 용매 조건으로 전개시키고 이를 10% 황산 발색한 결과, NNMBS269에서는 Rf 값이 각각 0.59, 0.66인 지점에서 NNMBS268에서는 보이지 않던 스팟이 확인 되었다. 이로 인해, 산 가수분해를 통해서 함유 성분이 달라짐을 확인 할 수 있었다. 각각의 시료 NNMBS268, 269를 농도별 처리한 후 12시간 동안의 글루타메이트 작용의 결과, 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)이 세포독성을 나타내지 않는 농도(100~400 µg/ml)에서 원지 EtOAc분획물(NNMBS268)에서는 보여 지지 않는 유의한 세포보호 활성을 나타내었으며(Fig. 1A), 그와 동시에 강력한 활성산소종(reactive oxygen species: ROS) 소거 작용을 나타내었다(Fig. 1B). 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)의 처리 농도가 증가함에 비례하여 세포 생존율 역시 점차 증가하였으며, ROS 소거 작용의 강도 또한 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)의 처리 농도가 증가함에 따라 증가하였다(Fig. 1).

원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)의 세포보호 효과가 산화적 스트레스로부터의 뇌세포 보호 기전에 관여하는 중요한 단백질인 Heme oxygenase(HO)-1의 발현에 기인하는 것이 아닌지 알아보기 위하여 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)을 농도별(100~400 µg/ml)로 12시간 동안 HT22 세포에 처리하여 확인하였다. 100 µg/ml에서 약한 발현을 보이기 시작하면서 농도가 증가함에 따라 그 발현이 현저하게 증가하였고(Fig. 2A), HO activity 역시 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)농도에 비례하여 뚜렷하게 증가함을 보였다(Fig. 2B). 세포독성을 나타내지 않는 범위에서 가장 강한 HO-1 발현을 보였던 400 µg/ml의 농도에서 각 시간별(0~24시간)로 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)을 처리하여 HO-1의 발현 양상을 확인하였다. 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)을 처리한 HT22 세포에서 6시간부터 HO-1 발현이 시작되어 18시간에서 최고 농도에 도달하여 점차 발현이 감소하는 양상을 보였다(Fig. 2C). HO activity 역시 18시간까지 시간에 비례하여 점차 증가하였고 18시간 이후에서는 감소하였다(Fig. 2D).

원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)의 뇌세포 보호 효과와 ROS 소거 작용이 HO-1의 발현유도와 직접적인 관련이 있는지를 확인하기 위하여, HO-1 활성 억제제인 SnPP를 사용하여 세포생존율 실험을 진행하였다. 세포생존율 실험과 동일한 농도(100~400 µg/ml)로 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)을 처리하고 SnPP를 함께 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 실험을 진행하였다. SnPP를 처리하지 않은 군은 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)의 농도 증가에 비례하여 세포생존율이 증가하였고 ROS 소거 작용의 강도 역시 증가하였으나, SnPP를 함께 처리한 군에서는 세포생존율이 현저하게 감소하였고 ROS 소거 작용의 강도 역시 뚜렷한 감소를 보였다(Fig. 3). 함께 처리한 SnPP 50 µM 자체는 세포생존에 큰 영향을 미치지 않았다. 이 같은 결과를 통해 HO-1 단백질 발현이 클루타메이트로 유도된 산화적 스트레스에 대한 세포보호 효과와 ROS 소거 작용에 관여함을 확인하였다.

한편, HO-1과 같은 제 2상대사 효소의 발현에 의한 해독작용의 메커니즘 중에서 nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)의 세포질에서 핵 내로의 전사가 매우 중요한 인자로 작용한다고 알려져 있다[28,29]. 전사인자인 Nrf2는 다양한 해독작용 유전자와 항산화 유전자의 발현을 조절한다. 세포질 내에서 Keap1 단백질에 의해 억제되어있던 Nrf2는 외부의 자극이나 산화적 스트레스에 의해서 Keap1 단백질에서 떨어져 나오게 되고, 핵 내로의 전사가 이루어진다. 핵 내로 전사된 Nrf2는 small Maf 단백질과 이합체를 형성하여 antioxidant response element (ARE)에 결합해 항산화 유전자의 발현과 단백질 생성을 유도함으로써 산화적 스트레스에 대한 생체 방어기전을 활성화 시킨다[28-30]. 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)에 의한 Nrf2의 전사 여부를 확인하기 위하여 400 µg/ml 농도의 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)을 시간별(0~1.5시간)로 처리하고 Western Blot 분석법을 사용하여 세포질과 핵 내의 Nrf2 양을 정량적으로 확인하였다. 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269) 처리 후 시간이 경과함에 따라 세포질 내의 Nrf2의 양은 점차 감소하는 반면, 핵 내부의 Nrf2는 세포질 내와는 반비례적으로 증가하는 양상을 보이는 것으로 보아 Nrf2의 세포질로부터 핵 내로의 전사가 이루어졌음을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

따라서 본 연구를 통해 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)은 마우스 해마 유래 HT22 세포에서 Nrf2를 핵 내로 전사하고 이를 통하여 HO-1 단백질 발현을 함으로써 글루타메이트에 의한 산화적 독성으로부터 보호활성을 나타낸다는 사실을 확인하였으며, 이와 같은 결과를 바탕으로 향후 산 가수분해를 통한 화학적 변화에 따른 함유 성분 차이에 관한 추가적 연구와 활성물질 분리 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)의 뇌세포 보호 효과와 그 보호 기전을 탐색하였으며, 그 결과 NNMBS269의 생쥐 해마 유래 세포인 HT22에서 글루타메이트로 유발한 세포 독성에 대하여 유의한 세포보호 활성을 보여주었다. 세포보호 활성은 전사인자인 Nrf2의 세포질에서 핵 내로의 전사에 의한 항산화 유전자의 발현과 관련이 있으며 특히 HO-1의 발현을 통해서 이뤄짐을 확인 하였다. 이와 같은 결과는 퇴행성 뇌질환 치료 및 예방 선도물질 개발 연구의 기초적 연구로 판단되며, 향후 원지 산 가수분해 EtOAc분획물(NNMBS269)의 추가적인 뇌세포보호 기전 연구와 활성물질의 분리 동정 연구를 추가적으로 진행해야 될 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 중점연구소 지원 연구비

(J03203)에 의해 이루어 졌으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 생약학교재편찬위원회. 생약학. 동명사, 서울, pp 218-220, 2007.
2. 한국 약용식물학 연구회. 종합약용식물학. 학창사, 서울, p 219, 2001.
3. Huang, K.C. The Pharmacology of Chinese Herbs. CRC Press, Boca Raton, FL. 1993.
4. Chang, H.M., But, P. Pharmacology and Applications of Chinese Material Medica, Word Scientific Publishing, Singapore. 1: 551-553, 1986.
5. Bensky, D. and Gamble, A. Chinese Herbal Medicine Materia Medica (Revised Edition), Eastland Press, Seattle. pp 404-405, 1993.
6. Jiangshu New Medicinal College Dictionary of Chinese Drugs. Shanghai Scientific Technologic Publisher, Shanghai. 1997.
7. Kim, H.M., Lee, E.H., Na, H.J., Lee, S.B., Shin, T.Y., Lyu, Y.S., Kim, N.S., Nomura, S. Effect of Polygala tenuifolia root extract on the tumor necrosis factor: secretion from mouse astrocytes. J Ethnopharmacol. 61: 201-208, 1998.
8. Chen, Y.L., Hsieh, C., Wu, P.H., Lin, J.G. Effect of Polygala tenuifolia root on behavioral disorders by lesioning nucleus basalis magnocellularis in rat. J Ethnopharmacol. 5: 47-55, 2004.
9. Sun, X.L., Ito, H., Masuoka, T., Kamei, C., Hatano, T. Effect of Polygala tenuifolia root extract on scopolamine-induced impairment of rat spatial cognition in an eight-arm radial maze task. Biol. Pharm. Bull. 30: 1727-1731, 2007.
10. Egashira, N., Yuzurihara, M., Hattori, N., Sakakibara, I., Ishige, A. Ninjin-yoei-to (Ren-Shen-Yang-Rong-Tang) and Polygalae radix improves scopolamine-induced impairment of passive avoidance response in mice. Phytomedicine. 10: 467-473, 2003.
11. 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.
12. Coyle, J.T. and Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. Science. 262: 689-695, 1993.
13. Satoh, T., Enokido, Y., Kubo, K., Yamada, M. and Hatanaka, H. Oxygen toxicity induces apoptosis in neuronal cells. Cell Mol. Neurobiol. 18: 649-666, 1999.
14. Satoh, T., Okamoto, S., Cui, J., Watanabe, Y., Furuta, K., Suzuki, M., Tohyama, K. and Lipton, S.A. Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophillic] phase II inducers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 768-773, 2006.
15. Satoh, T. and Lipton, S.A. Redox regulation of neuronal survival mediated by electrophilic compounds. Trends Neurosci. 30: 37-45, 2007.
16. Alibright, T.D., Jessel, T.M., Kandel, E.R. and Poster, M.I. Neural science: a century of progress and the mysteries that remain. Cell. 18: 209-216, 2000.
17. Siesjö, B.K. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1: 155-185, 1981.
18. Greenamyre, J.T., Penney, J.B., Young, A.B., D'Amato, C.J. and Hicks, S.P. Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's disease. Science. 4693:1496-1469, 1985.
19. Choi, D.W. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. Neuron. 1: 623-634, 1988.
20. Lipton, S.A. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. Nat. Rev. Neurosci. 8: 803-808, 2007.
21. Rössler, O.G., Bauer, I., Chung, H.Y. and Thiel, G. Glutamate-induced cell death of immortalized murine hippocampal neurons: neuroprotective activity of heme oxygenase-1, heat shock protein 70, and sodium selenite. Neurosci. Lett. 362: 253-257, 2004.
22. Lee, M.S., Lee, J., Kwon, D.Y. and Kim, M.S. Ondamtanggamibang protects neurons from oxidative stress with induction of heme oxygenase-1. J. Ethnopharmacol. 108: 294-298, 2006.
23. Choi, B.M., Kim, H.J., Oh, G.S., Pae, H.O., Oh, H.C., Jeong, S.J., Kwon, T.O., Kim, Y.M. and Chung, H.T. 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose protects rat neuronal cells (Neuro 2A) from hydrogen peroxide-mediated cell death via the induction of heme oxygenase-1. Neurosci. Lett. 328: 185-189, 2002.
24. Jeong, G.S., Li, B., Lee, D.S., Byun, E., Kang, D.K., Lee, H.S. and Kim, Y.C. Cytoprotective constituents of Alipinia katsumadai seeds against glutamate-induced oxidative injury in HT22 cells. Nat. Prod. Sci. 13: 268-272, 2007.
25. Tenhunen, R., Marver, H.S. and Schmid, R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. J. Lab. Clin. Med. 75: 410-421, 1970.
26. Tan, S., Schubert, D. and Maher, P. Oxytosis: a novel form of programmed cell death. Curr. Top. Med. Chem. 1: 497-506, 2001.
27. Rössler, O.G., Bauer, I., Chung, H.Y. and Thiel, G. Glutamate-induced cell death of immortalized murine hippocampal neurons: neuroprotective activity of heme oxygenase-1, heat shock protein 70, and sodium selenite.

Neurosci Lett. 362: 253-257, 2004.
28. Abraham, N.G. and Kappas, A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. Pharmacol. Rev. 60: 79-127, 2008.
29. Bellezza, I., Mierla, A.L. and Minelli, A. Nrf2 and NF-κB and their concerted modulation in cancer pathogenesis and progression. Cancers. 2: 483-497, 2010.
30. Motohashi, H. and Yamamoto, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. Trends Mol Med. 10: 549-557, 2010.