

백작약 에탄올 추출물이 mouse embryonic fibroblast cells에 미치는 항산화 효과

*동국대학교 바이오시스템대학 생명과학과, **동국대학교 한의과대학 부인과학교실
윤희정**, 고은비*, 최민선**, 김동일**, 성정석*

ABSTRACT

Antioxidant Effect of *Paeonia Japonica* Extracts on Mouse Embryonic Fibroblast Cells

Hee-Jung Yoon**, Eun-Bi Go*, Min-Sun Choi**
Dong-Il Kim**, Jung-Suk Sung*

*Dept. of Life Science, College of Life Science, Dong-Guk University

**Dept. of Ob&Gy, College of Oriental Medicine, Dong-Guk University

Objectives: *Paeonia japonica* has been widely used for gynecopathy and analgesic effects in Korean Traditional Medicine. The aim of the present study is to determine the antioxidant effect of *Paeonia japonica* extracts(PJE) by using mouse embryonic fibroblast cells(MEF cells).

Methods: We evaluated Radical Scavenging Activity of PJE by the DPPH assay. Protective effect of the PJE on the hydrogen peroxide(H₂O₂) induced oxidative damage of MEF cells was analyzed by the MTT assay. The Morphological changes of MEF cells induced by *P. japonica*, H₂O₂ and *P. japonica*+H₂O₂ was evaluated by DAPI staining. And effect of PJE on the rate of apoptosis in MEF cells was measured using flow cytometry with Annexin V-FITC and PI double staining.

Results: We observed that PJE contain significant DPPH radical scavenging activity. Cell viability of oxidative damaged cells treated with various concentrations of H₂O₂ was increased by treatment with PJE. Flow cytometric analysis of the cells treated with H₂O₂ in the absence or presence of PJE showed that the crumbled G1 peak was accumulated by the treatment with H₂O₂ alone, but restored by addition of PJE. Portion of cells that undergo apoptosis mediated by oxidative stress was decreased by treatment of PJE. The nuclear fragmentation occurred in the oxidative damaged MEF cells was also decreased by PJE treatment.

Conclusions: Taken together, our results suggest that PJE exhibits significant antioxidant activity and functions to inhibit cell death mediated by oxidative damage induced apoptotic pathways.

Key Words: *Paeonia japonica* extracts(PJE), Mouse embryonic fibroblast cells (MEF cells), Antioxidant Effect, Radical Scavenging Activity, Apoptosis

“본 연구는 농림수산식품부의 지원으로 이루어졌음.”

“This work is supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry for Agriculture, Korea (iPET-20090042)”

I. 서 론

활성산소에 의한 산화적 스트레스는 생식내분비 관련 질환의 유발 인자로서와 함께 노화 및 각종 성인병 유발 인자로 주목 받고 있다. 생체 내에서 과도하게 생성된 유해 산소를 소거시킴으로써 노화를 억제하고 질병을 예방하고자 하는 다양한 연구들이 수행되어 왔다¹⁾.

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 난자의 성숙으로부터 수정, 배아 발달과 임신까지 다양하게 생리적 진행에 관여하고²⁾ 세포의 성숙과 발생과정을 저해하며 불임을 유발하기도 한다³⁾.

현대 의학의 발전에 따라 많은 질병에 대한 효과적인 의약품들이 개발되고 있으나 가장 폭넓게 사용되는 BHT, BHA 등의 인공합성 항산화제의 경우 발암성과 지속적인 사용에 따른 부작용이 대두되어 사용에 제한이 생겼다. 따라서 이를 천연물로 대체하기 위한 많은 연구가 이루어지고 있으며, 그 일환으로 생약재를 이용한 항산화제의 개발도 활발히 추진되고 있다^{1,4,5)}.

白芍藥(*Paeonia japonica*)은 미나리아재비과에 속한 多年生 草本인 작약(*Paeonia lactiflora* PALL.)의 뿌리를 건조하여 사용하는 약제로 한의학적으로 養血柔肝, 緩中止痛, 斂陰收汗하는 효능이 있는 補血劑로 분류하며⁶⁾ 각종 통증을 풀고 생리불순, 생리통, 대하, 가슴, 옆구리와 배 아픈 증상, 팔다리의 경련과 통증 등에 효과가 있는 것으로 보고된다⁷⁾.

1960년대에 백작약의 주요성분인 paeoniflorin이 분리된 이후 항산화 효과가 밝혀지면서^{8,9)} 이에 대한 다양한 연구가 진행되었

고 중추신경계 억제, 평활근 이완, 항혈전, 항염증, 항스트레스, 항경련 효과¹⁰⁾와 간독성 보호 효과¹¹⁾, 항암 및 면역기능 촉진 효과^{10,12)} 등이 보고되고 있는데, 특히 백작약이 세포내 손상과 DNA의 산화적 손상, 세포막의 주요성분인 지질의 과산화 억제에 뛰어난 것으로 나타났다^{4,5)}.

본 연구에서는 천연물인 백작약의 에탄올추출물을 생체 조직의 기원세포가 될 수 있는 fibroblast cell에 직접 투여하여 항산화 활성을 규명하고 이후 난임을 중심으로 한 부인과 및 산과 분야 임상 적용 가능성의 이론적 근거를 확보하고자 하였다. 이에 mouse embryonic fibroblast cells(MEF cells)를 이용하여 일련의 연구를 진행하였으며, 그 결과를 이 논문을 통해 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 추출물의 제조

본 실험에 사용한 백작약(*Paeonia japonica*)은 음니허브(서울, 한국)를 통하여 구입하여 정선하여 사용하였다. [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide] (MTT), 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), dimethylsulfoxide(DMSO) 및 모든 화학 약품은 Sigma(USA)에서 구입하였다.

에탄올 추출물은 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 둥근 플라스크에 시료의 10 배에 해당하는 70% ethanol을 넣고 80℃의 수욕 상에서 3시간 동안 추출한 후 추출액을 여과하였다.

여과된 추출액을 감압 농축하여 동결

건조기(freeze dryer, Ilshin Lab Co., LTD, Korea)로 동결건조하여 시료로 사용하였다.

2) 세포와 세포배양

실험에 사용된 세포주는 쥐 배아 섬유아세포(Mouse embryonic fibroblast cells : MEF cells)로 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, USA)에서 분양 받았다. MEF cells는 10% FBS와 1×penicillin/streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)(PAA, Austria)에서 배양하였다. 배양 시 온도는 37℃를 유지하고 5% CO₂와 95% 공기를 공급하였다.

2. 실험방법

1) 세포 활성도 측정(MTT assay)

세포 활성도는 MTT 분석법으로 측정하였다. 배양한 MEF cells를 4.0×10³ cells/well 씩 96well에 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 각 well에 200 µL씩 시료를 처리하여 CO₂ incubator에 24시간 동안 배양한다. MTT 용액(5 mg/mL) 10 µL를 각각의 well에 처리하여 3시간 동안 배양한다. MTT를 suction한 후 DMSO를 200 µL 처리하고 10분 동안 shaking 후, O.D 값을 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 이용해 570 nm에서 측정하였다.

2) DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)에 의해 생성된 free radical 소거능을 측정하는 방법으로 각 well당 80% EtOH에 녹인 200 µM DPPH 용액 100 µL와 시료 100 µL를 넣어 총 200 µL가 되게 한다. 30분간 빛을 차단하여 반응시킨 후, 492 nm에서 흡광도를 측정한다. 소거능은

다음 수식에 의거하여 계산 측정하였다.

$$\text{DPPH 소거능(\%)} = [1 - \{(492\text{nm.sample} - 492\text{nm.blank} - 492\text{nm.standard}) / 492\text{nm.control}\}] \times 100$$

3) 세포 주기 분석

대조군 및 실험군 세포를 24시간 동안 배양한 다음, PBS로 세척하고 -20 °C에 탄올에 고정하여 -20 °C에서 하룻밤 동안 두었다. 다시 PBS로 세척한 다음, PI agent(0.1% Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 50 µg/mL RNase A 그리고 50 µg/mL propidium iodide)를 첨가하여 반응시켰다. 형광은 FAC scan laser 유속세포측정기를 사용하여 측정하고, Becton Dickinson software(Lysis II, Cellfit)를 사용하여 분석하였다.

4) 세포 형태 분석(DAPI staining)

MEF cells를 glass chamber slide에 배양한 후 백작약 추출물을 처리하고 24시간 동안 CO₂ incubation하였다. PBS로 2회 세척한 후, 4 % formaldehyde를 넣고 20분간 고정시켰다. 0.5 M glycine을 넣고 5분씩 3번 세척한 후, PBS를 제거하고 chamber를 말렸다. 2 µg/mL DAPI와 PBS를 넣고 20분 동안 배양한 후, chamber 유리를 뜯어내었다. DAKO® Fluorescent mounting medium을 각 칸마다 한 방울씩 떨어뜨리고 cover glass로 덮은 후 형광현미경으로 세포핵을 관찰하였다.

5) Annexin V-FITC/PI assay

Annexin V-FITC/PI(propidium iodide) apoptosis detection kit을 이용하여 apoptotic cell에서 phosphatidylserine의 외(surface exposure)을 검출함으로써 세포 자멸사를 정량화하였다. 대조군 및 실험군 세포를 100 mm 배양접시에 분주한 다음 24시간 동안 배양하고, 유착 세포와 부

유 세포를 결합시켜 제조사의 지침에 따라 처리하고 FITC/PI 염색 후 유식세포 측정기를 사용하여 측정하였다.

6) Statistical analysis

실험 결과는 Mean±SEM 값으로 나타내었으며, 본 실험에서 얻은 결과를 one-way ANOVA Tukey's test(GraphPad Prism)로 분석하여 p값을 구하였다.

III. 결 과

1. 백작약 처리 농도에 따른 MEF cells의 생존율

백작약 추출물의 안전성을 확인하기 위해 MEF cells에 백작약 추출물을 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL로 제조하여 처리한 후, MTT assay를 이용하여 세포 활성도를 측정하였다. 그 결과 낮은 농도에서는 세포 생존율이 감소하였지만 농도가 높아질수록 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 백작약 추출물의 농도가 높아질수록 세포를 보호하는 효과가 있고, 그 중에서도 5 mg/mL의 농도에서 가장 높은 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 1).

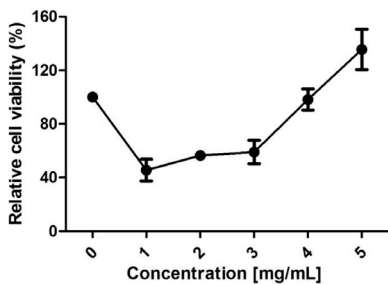


Fig. 1. Effect of *Paeonia japonica* Extracts (PJE) on Mouse Embryonic Fibroblast Cells(MEF cells).

MEF cells were cultured in DMEM containing 10% FBS and penicillin-streptomycin. Various concentration(0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL) of PJE

was treated on MEF cells and incubated in humidified 5% CO₂ incubator for 24 h in 37 °C. The absorbance was read at wavelength of 570 nm. All test were performed in triplicate, and values are means ± SEM (n=3).

2. MTT assay를 통한 백작약의 항산화 효과 측정

H₂O₂ 농도에 따른 MEF cells 활성도를 측정하여 농도 의존적으로 세포활성도가 감소하는 것을 확인한 후, 500 μM 농도로 H₂O₂를 처리하고 다양한 농도의 백작약 추출물을 처리한 결과, H₂O₂ 500 μM만 처리한 대조군의 세포 생존율은 30% 수준으로 떨어졌으며, 백작약 추출물과 H₂O₂를 동시에 처리하였을 때, 백작약 추출물의 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 세포의 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 5 mg/mL의 농도에서 세포 생존율이 약 130%에 이르는 것을 통해 백작약 추출물의 높은 항산화력을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

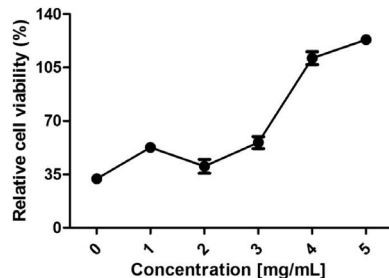


Fig. 2. Protective Effect of PJE on the H₂O₂ Induced Oxidative Damage of MEF Cells.

MEF wild-type cells were treated with various concentration(0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml) of 70% PJE on the H₂O₂ (500 μM) induced oxidative damage of MEF Cells for 24 h. The viability of MEF cells was determined by the MTT assay. All test were performed in triplicate, and values are means ± SEM (n=3).

H₂O₂ 농도(200, 400, 600, 800 μM)에 따른 MEF cells 활성도를 측정하여 농

도 의존적으로 세포활성도가 감소하는 것을 확인한 후, H₂O₂의 4가지 농도(200, 400, 600, 800 μM)에 의해 산화적 스트레스를 받은 세포에 백작약 추출물을 처리 하였을 경우 세포 활성도에 미치는 영향을 확인하기 위해 H₂O₂ 4가지 농도와 백작약 추출물 5 mg/mL을 동시처리 하였다. 그 결과 H₂O₂만을 처리한 실험보다 H₂O₂와 백작약 추출물을 동시 처리한 실험에서의 세포 생존율이 눈에 띄게 높아진 것을 볼 수 있다. 특히, H₂O₂의 농도와 상관없이 세포 생존율을 약 80% 이상으로 보호하는 것을 통해 백작약 추출물의 뛰어난 항산화 효과를 확인할 수 있다(Fig. 3).

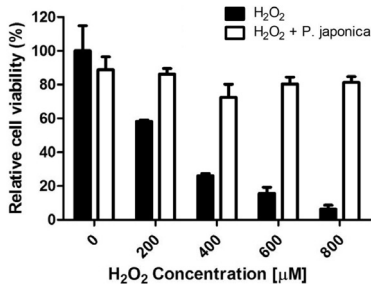


Fig. 3. Protective Effect of PJE on the H₂O₂ Induced Oxidative Damage of MEF Cells.

MEF wild-type cells were treated for 24 h with various concentration(0, 200, 400, 600, 800 μM) of H₂O₂ in the presence of PJE(5 mg/mL). The viability of MEF cells was determined by the MTT assay. All test were performed in triplicate, and values are means ± SEM (n=3).

3. DPPH assay를 통한 백작약의 항산화 효과 측정

DPPH 소거 활성능의 분석을 통하여 대조군으로 사용한 BHT와 백작약을 다양한 농도로 처리하여 비교한 결과, 백작약은 모든 농도에서 높은 라디칼 소거 활성을 보였다(Fig. 4).

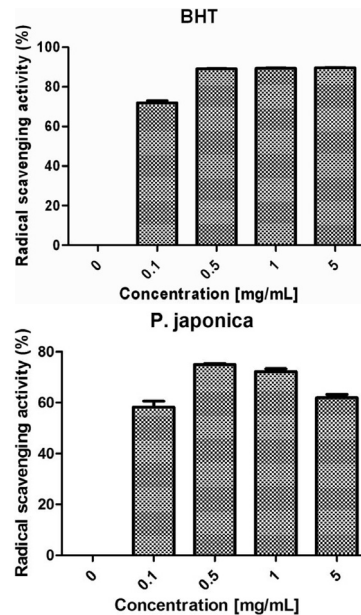


Fig. 4. Radical Scavenging Activity of PJE. DPPH radical scavenging activity was expressed by the percentage of control. PJE and BHT were added at four different concentrations of 0.1, 0.5, 1, 5 mg/mL. In this assay, BHT was used as standard antioxidant. All test were performed in triplicate, and values are means ± SEM (n=3).

4. MEF cells의 세포주기 변화

H₂O₂ 및 백작약 추출물 처리가 MEF cells의 각 세포 주기에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 cell cycle analysis를 수행하였다. 백작약 추출물 처리군은 대조군과 비슷한 세포주기를 보였고, 이를 통해 백작약 추출물이 MEF cells의 세포주기에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다. H₂O₂ 처리군에서는 G0/G1기의 세포 주기 pattern에 큰 변화가 생김으로써 대조군과는 확연히 다른 세포주기를 확인하였다. 또한 sub-G1기의 cell 양이 많아진 것을 통해 apoptotic cell 수가 증가한 것을 볼 수 있다. H₂O₂와 백작약 추출물을 동시 처리한 군은 대조군과 비슷하게 cell cycle을 복구시킨 것을 확

인 할 수 있으며 sub-G1기가 감소한 것을 통해 apoptotic cell 수가 H₂O₂ 단독처리군 보다 감소한 것을 알 수 있다. 이를 통해

백작약 추출물이 H₂O₂에 의한 산화적 스트레스를 세포주기 상에서 어느 정도 복구시키는 효과를 확인하였다(Fig. 5).

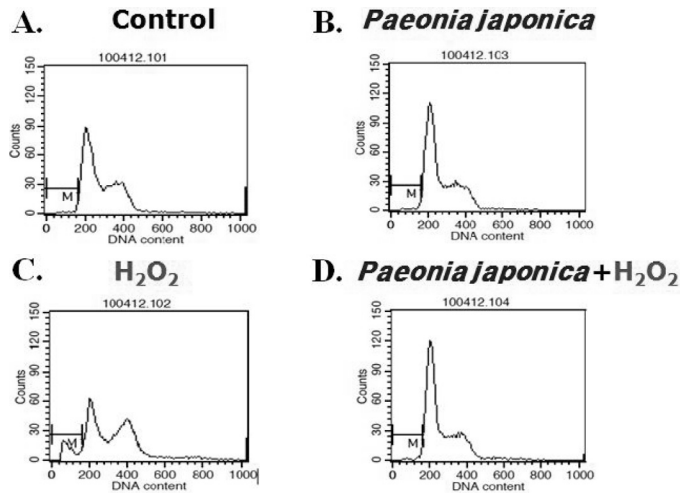


Fig. 5. Effect of PJE Treatment on Cell Cycle Progression in Oxidative Damaged MEF Cells.

Cells were treated for 24 h with PBS as control (A), 5 mg/mL of PJE (B), 500 μ M H₂O₂ (C), and 5 mg/mL of PJE with 500 μ M H₂O₂ (D). The cell cycle was analyzed using flow cytometry with PI staining.

5. MEF cells의 세포내핵의 변화

H₂O₂와 백작약 추출물의 처리가 MEF 세포의 형태에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하기 위하여 DAPI 염색법을 수행하였다. 백작약 추출물 처리군에서는 대조군과 유사한 형태를 보인 반면, H₂O₂ 처리군에서는 대조군에 비해 DNA 손상과 세포질 응축이 일어난 것을 확인할 수 있다. H₂O₂와 백작약을 동시에 처리하였을 시, 핵이나 세포질 응축이 일어난 정도가 H₂O₂ 처리군에 비해 감소한 것을 볼 수 있다(Fig. 6).

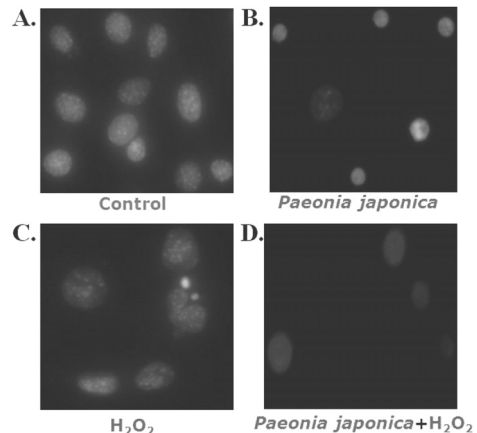


Fig. 6. The Morphological Changes of MEF Cells Induced by PJE, H₂O₂ and PJE + H₂O₂.

Typical apoptotic morphological changes were detected in 0 (A), 5 mg/mL PJE (B), 500 μ M H₂O₂ (C), and 5 mg/mL PJE + 500 μ M H₂O₂ (D) treated MEF cells. Cells were stained with DAPI and visualized by fluorescent microscope (\times 200 magnification).

6. MEF cells의 apoptosis의 발생률

백작약 추출물과 H₂O₂의 apoptosis를 알아보기 위해 FITC/PI double staining을 이용해 apoptosis assay를 수행한 결과, 대조군과 비교하여 백작약 추출물의 apoptosis cell 수는 별 차이가 없었지만, H₂O₂ 처리군에서는 apoptosis를 일으킨

세포가 많이 늘어난 것을 확인 할 수 있다. 백작약 추출물과 H₂O₂ 동시 처리하였을 때, H₂O₂ 처리군보다 apoptosis가 확연하게 줄어든 것을 확인 할 수 있다. 이를 통해 백작약 추출물이 산화적 스트레스로 인한 apoptosis를 억제시키는 것을 알 수 있다(Fig. 7).

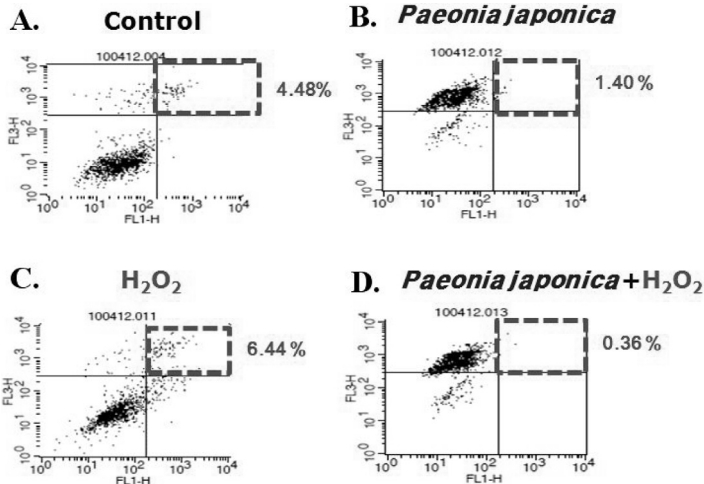


Fig. 7. Effect of PJE Treatment on the Rate of Apoptosis in MEF Cells. MEF cells were treated with control (A), 5 mg/mL PJE (B), 500 μ M H₂O₂ (C), and co-treated with of 5 mg/mL PJE and 500 μ M H₂O₂ (D) for 24 h. The rate of apoptosis was measured using flow cytometry with Annexin V-FITC and PI double staining.

IV. 고찰

백작약(*Paeonia japonica*)은 미나리아재비과에 속한 多年生 草本인 작약(*Paeonia lactiflora* PALL.)의 뿌리를 건조하여 사용하는 약재로 뿌리에는 paeoniflorin, paeonol, paeonin, 안식향산, 정유, 지방유, tannin, 당, 전분, 점액질, 단백질을 함유한다⁶⁾. 한의학적으로 補血劑에 속하며 味는 苦酸하고 養血柔肝, 緩中止痛, 斂陰收汗의 효능이 있으며⁶⁾, 각종 통증을 풀고 생리 불순, 생리통, 대하, 가슴, 옆구리와 배

아픈 증상, 팔다리의 경련과 통증 등에 효과가 있는 것으로 보고되었다⁷⁾.

백작약의 효능과 관련하여 Egger 등에 의해 paeoniflorin의 항염증 작용 및 스트레스성 케양 예방효과가 보고된 바 있고⁴⁾, 중추신경계 억제, 평활근 이완, 항혈전, 항염증, 항스트레스, 항경련 효과¹⁰⁾와 간독성 보호 효과¹¹⁾, 항암 및 면역기능 촉진 효과^{10,12)} 등이 보고되었다. 특히 백작약이 세포내 손상과 DNA의 산화적 손상, 세포막의 주요성분인 지질의 과산화 억제에 뛰어난 것으로 나타났다^{4,5)}.

백작약이 포함된 대표적인 처방인 四

物湯은 調血과 補血 등의 작용이 뛰어나며 부인과 제반증상의 기본 처방으로서 각종 월경 관련 질환과 난소기능 저하와 관련된 질환 등에 다양하게 활용된다¹³⁻²⁰. 또한 當歸芍藥散은 주로 태동불안, 임신복통, 산후현훈, 월경불순 등에 응용하고²¹, 그 외 감초와 함께 구성된 芍藥甘草湯은 복직근 이상 긴장 등으로 인한 근육통에 응용한다⁵.

여성의 생식내분비 기능의 감퇴에 대한 관심은 항노화적 측면은 물론 난임과 임신 손실의 임상적 중요성에 의한다. 이러한 생식내분비 기능의 감퇴는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 산화적 스트레스가 주된 인자로 작용한다²².

Superoxide radical($-O_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical($-OH$)과 같은 활성산소종은 인간을 포함하여 산소를 이용하여 에너지를 얻는 모든 생명체에서 여러 세포내 대사과정의 부산물로 필연적으로 생성되며, 생체에 산화적 손상을 일으키는 주된 인자가 된다^{2,3,23}. 그러나 이러한 활성산소종의 작용은 유해한 측면만 있는 것이 아니어서 생체 내에서는 산화제의 공격과 항산화제의 방어가 조화를 이루면서 항상성을 유지한다^{24,25}.

또한 ROS는 난자의 성숙으로부터 수정, 배아발달과 임신까지 다양하게 생리적 진행에 관여하고 세포의 성숙과 발생 과정을 저해한다. 따라서 불임의 원인이 되며, 체외수정 시술의 결과, 조기분만, 태아성장장애, 자간전증, 기형아 출산, 절박유산, 습관성 유산과 배아발달 등에 영향을 준다는 연구 결과가 보고되었다^{2,3}.

특히 난소의 노화에 따른 가임력 저하와 관련하여 산화적 스트레스에 의한 손

상²²에 대해 주목하고 있다.

한편 현대 의학의 발전에 따라 많은 질병에 대한 효과적인 의약품들이 개발되고 있으나 가장 폭넓게 사용되는 BHT, BHA 등의 인공합성 항산화제의 발암성과 지속적인 사용에 따른 부작용이 대두되어 소비자들의 기피현상이 높아지면서 이를 천연물로 대체하기 위한 많은 연구가 이루어지고 있으며, 그 일환으로 한약을 이용한 항산화제의 개발도 활발히 추진되고 있다^{1,4,5}.

한약의 항산화 효과를 이용하여 난임 혹은 임신손상을 예방하는 효과와 관련된 기초 연구를 수행한 것으로는 八味地黃丸이 남성관련 생식세포의 항산화에 미치는 영향²⁶, 산약의 MEF cells에 대한 항산화효과에 관한 연구² 등이 있었다.

Liu 등²⁷은 상용되고 있는 항산화제인 N-acetyl-L-cysteine(NAC)가 산화적 스트레스에 의한 Telomere의 단축을 막고 활성을 높이는 작용을 통해 ROS에 의해 유발되는 손상을 막아 난모세포의 노화를 억제하는 효과가 있다고 하였다.

이러한 연구 결과를 참조할 때 생식내분비계에 활용하는 한약 중에서 항산화활성을 가진 약물을 찾아낸다면 난소 노화 과정에 작용하는 ROS로 유발되는 손상을 막아 생식세포의 노화를 억제함으로써 난임의 예방과 치료에 유효한 치료를 발견할 수 있을 것으로 생각하였다.

이에 본 연구에서는 사전 실험을 통해 주요 부인과 활용 처방의 구성약물들의 항산화활성과 관련된 선별 조사를 마친 다음 그 유효성이 뛰어난 백작약을 선정하여 MEF cells를 사용하여 추출물의

항산화효과를 검증하였다.

백작약 추출물의 항산화 효과를 측정하기 위해 먼저 free radical 소거능을 DPPH assay를 통해서 확인하였다. 대표적 항산화제인 BHT와 백작약 추출물의 DPPH 소거능을 비교하여 항산화 효과를 검증하고자 하였다. 그 결과 백작약 추출물의 모든 농도에서 높은 radical 소거 활성을 관찰 할 수 있었다.

백작약 추출물의 정상세포에 대한 독성을 알아보기 위해 다양한 농도의 백작약 추출물(1, 2, 3, 4, 5 mg/mL)을 MEF cells에 처리한 결과, 저농도에서는 세포 생존율이 감소하였지만 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 5 mg/mL에서는 대조군보다 오히려 세포 생존율이 증가함을 보여주어 세포를 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

백작약 추출물을 산화적 스트레스를 인위적으로 유발시키는 H_2O_2 와 복합처리 시, 백작약 추출물의 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 산화적 스트레스로부터 MEF cells를 보호하였고, 특히 5 mg/mL의 농도에서는 세포 생존율이 약 130%에 다다른 것을 볼 수 있다. 이에 H_2O_2 농도별 백작약 추출물의 antioxidant effect를 알아보기 위해 앞선 결과에서 cell viability가 가장 높게 나타난 5 mg/mL를 H_2O_2 의 여러 농도별로 복합 처리하였더니, 그 결과 H_2O_2 농도와 상관없이 백작약 추출물이 H_2O_2 에 의해 유발된 산화적 스트레스로부터의 손상을 일정 수준 이상으로 복구시켜주는 것을 확인할 수 있었다.

Cell cycle에 백작약 추출물과 산화적 스트레스가 어떠한 영향을 미치는지 알

아보기 위하여 cell cycle analysis를 수행하였다. 백작약 추출물만 처리하였을 때, cell cycle에 큰 영향을 미치지 않았지만, H_2O_2 처리 시에는 G0/G1기의 cell cycle pattern에 큰 변화가 관찰되었다. 백작약 추출물과 H_2O_2 복합 처리 시에는 cell cycle이 정상 수준으로 회복되는 것을 볼 수 있었다. 또한 백작약 추출물을 H_2O_2 와 복합처리 해 줌으로써 산화적 스트레스로 인해 apoptosis가 일어난 cell을 감소시키는 결과를 확인하였다.

여성의 생식에 있어 ROS에 의한 산화적 스트레스는 난소의 노화를 촉진시켜 난자의 질적 저하로 인한 생식능 저하를 초래하며 수정, 배아발달, 세포의 성숙과 발생 과정에 관여하여 결과적으로 난임과 불임의 원인이 된다^{2,3,28)}. 따라서 본 연구에서는 부인과 처방에 다용되는 백작약의 에탄올 추출물에 대한 항산화 효과에 대해서 알아보고 부인과 및 산과 분야에 대한 임상적용 가능성의 이론적 근거를 찾고자 하였다. 그 결과 백작약은 기존의 인공합성 항산화제보다 안전하고 뛰어난 효능을 가지는 항산화제로서 이용될 가치가 있으며, 단독 혹은 다른 약물과 함께 각종 한방부인과학 영역의 질환에 활용할 수 있을 것으로 사료되었다.

V. 결 론

백작약이 MEF cells의 생존율, 세포 내 핵의 변화, 세포 주기의 변화, apoptosis의 발생률에 미치는 영향을 규명하는 일련의 실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 백작약의 free radical 소거능을 DPPH assay를 통해 관찰한 결과 모든 농도에서 높은 radical 소거능을 갖는 것을 확인할 수 있었다.
2. MTT assay를 통한 산화적 손상 방어 능력 확인 실험을 통해 농도가 증가함에 따라 항산화 능력이 증가함을 관찰할 수 있었다. 특히 H₂O₂의 처리 농도와 상관없이 모든 농도에서 높은 세포 보호 효과를 보였다.
3. DAPI staining을 통해 백작약이 산화적 손상으로부터 MEF cells 내핵을 보호하는 효과가 있음을 관찰하였다.
4. 세포주기분석에서 백작약은 산화적 손상을 받은 MEF cells의 G0/G1기의 cell cycle pattern을 정상수준으로 회복시키는 것을 확인하였다.
5. Annexin V-FITC/PI assay에서 백작약이 산화적 손상을 받은 MEF cells에 대한 apoptosis 발생률을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다.

□ 투 고 일 : 2012년 04월 27일

□ 심 사 일 : 2012년 05월 11일

□ 게재확정일 : 2012년 05월 15일

참고문헌

1. 정일윤 등. 백작약 열수추출물의 산화적 스트레스 억제효과 및 유효성분 동정. 한국식품영양과학회지. 2003;32(5):739-40.
2. 성준호 山藥의 Mouse Embryonic Fibroblast Cell에 대한 항산화효과에 관한 연구. 동국대학교 대학원. 2008.
3. 나원흠 등. 생쥐 착상전 배아에서 산화적 스트레스에 의한 ATF4 유전자의 발현과 존재 부위, 발생과 생식. 2006; 10(2):105-13.
4. 오현 등. 방사선 장애에 대한 백작약의 방호효과. 방사선방어학회지. 2002;27(3):181-8.
5. 박순기 등. 백작약 추출물이 항산화활성, LDL 산화 억제 및 혈전 용해에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2009; 30(2):88-103.
6. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학. 서울:영림사. 2000:581.
7. 김현석. 신선 채소류를 위한 천연 식품 보존제의 개발. 동국대학교 대학원. 2011.
8. 김진. 백작약, 어성초, 참취에 의한 마우스 면역반응능의 항진효과. 숙명여자대학교 대학원. 2003.
9. 권미화. Hairless 마우스에서 백작약 추출물이 피부노화 억제에 미치는 영향. 계명대학교 대학원. 2008.
10. 이금홍 등. 보혈 약재인 당귀, 지황, 백작약, 하수오의 면역 촉진 효과 비교 분석. 동의생리병리학회지. 2006; 20(6):1507-15.
11. 김인덕 등. LPS로 유도된 급성 간독성에 대한 백작약 추출물의 보호 효과. 한국식품위생안전성학회지. 2008;23(3):222-6.
12. 박혜란 등. 백작약 조다당분획에 의한 대식세포 활성화를 통한 암세포 증식억제. 한국식품영양과학회지. 2003; 32(1):149-54.
13. 조정훈, 이경섭, 송병기. 생쥐의 體外受精(IVF) 各段階에 對한 四物湯의 效果. 대한한방부인과학회지. 2000;13(1):94-111.
14. 신헌태. 사물탕 투여가 임신 랫드의 모체 및 태자에 미치는 영향 : 유해

- 금속(As, Cd, Pb, Hg)과 양-반응관계를 중심으로. 상지대학교 대학원. 2009.
15. 윤희정, 이경섭, 송병기. 四物湯의 婦人科의 運用에 대한 文獻的 考察. 대한한방부인과학회지. 1997;10(2):15-34.
 16. 전성진. 사물탕 용량별 투여가 랫드의 모체와 태자에 미치는 영향. 상지대학교 대학원. 2009.
 17. 이기태 등. 四物湯이 손상된 말초신경섬유 재생에 미치는 효과에 대한 사전 연구. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2005;14(2):107-12.
 18. 안희덕. 四物湯의 抗癌劑 副作用 抑制에 關한 實驗的 研究. 동의병리학회지. 1995;9(2):341-59.
 19. 정영섭. 卵巢切除한 흰쥐의 고지혈증에 미치는 加味事物湯의 영향. 동의대학교 대학원. 2002.
 20. 이창수, 양재하, 강효신. 益母草와 四物湯加益母草가 卵巢를 摘出한 雌性白鼠의 호르몬에 미치는 影響. 제한동의학술원 논문집. 1995;1(1):80-93.
 21. 최재영, 윤상협, 이원철. 흰쥐의 중대 뇌동맥 폐쇄 후 當歸芍藥散 투여가 여성호르몬 및 뇌위축에 미치는 영향. 동서의학연구소 논문집. 1998:179-94.
 22. Lim J, Luderer U. Oxidative Damage Increases and Antioxidant Gene Expression Decreases with Aging in the Mouse Ovary. *Biology of Reproduction*. 2011;84(4):775-82.
 23. 박선동, 문진영. 시호사물탕 메탄올 추출물의 항산화 활성. 대한본초학회지. 2001;16(1):29-40.
 24. 김태운. Secreted-superoxide dismutase (s-SOD) 유전자가 과발현된 형질 전환 마우스 개발과 생체 피부 면역 및 보호 체계에 미치는 영향성 연구. 가톨릭대학교. 2003.
 25. 강경아 등. 산화적 스트레스에 대한 생약추출물의 항산화활성 검색. 생약학회지 2005;36(3):159-63.
 26. 최진호. 팔미지황환이 남성관련 생식세포의 항산화에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2010.
 27. Liu J et al. Delay in oocyte aging in mice by the antioxidant N-acetyl-L-cysteine(NAC). *Hum Reprod*. 2012 May;27(5):1411-20.
 28. 이보연. 난소의 노화. 대한폐경학회지. 1999;5(2):129-34.