

산화스트레스로 인한 C6 Glioma Cell Apoptosis에 대한 길경의 세포보호효과

조재준 · 신민구 · 김의수 · 이영수 · 신용진¹ · 전상윤*

동신대학교 한의과대학 내과학교실, 1: 원광대학교 한의과대학 내과학교실

Cytoprotective Effects of Platycodon grandiflorus (Jacq.) A.DC on C6 Glioma Cell Apoptosis by Oxidative Stress

Jae Joon Jo, Min Gu Shin, Eui Su Kim, Young Su Lee, Yong Jin Shin¹, Sang Yun Jeon*

Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, DongShin University.

1: Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, WonKwang University

This study is designed to investigate cytoprotective effects of Platycodon grandiflorus (Jacq.) A.DC on C6 glioma cell apoptosis by oxidative stress. Experimental C6 glioma cells were classified into four groups as follows: normal group, PGE group, chemical groups, PGE+chemical groups. Oxidative stress that caused by chemicals in the C6 glioma cell, check the impact to Chemical group was administered normal group. Apoptotic effect protecting in order to observe the chemical group was administered PGE. We to observe effects of PGE on SOD inhibition, total glutathione production in C6 glioma cells were administered PGE. In case of administration PGE, apoptosis induced by Paraquat was significantly decreased. In case of administration PGE, apoptosis induced by SNP was significantly decreased. In case of administration PGE, apoptosis induced by H₂O₂ was significantly decreased. In case of administration PGE, apoptosis induced by Rotenone was decreased, but the statistical significance was not. In case of administration PGE, SOD inhibition activities significantly decreased. In case of administration PGE, Total glutathione did not affect the content. These results suggest that PGE is able to treat a disease caused by oxidative stress and prevent a aging. These results suggest that PGE is a disease caused by oxidative stress and aging, the prevention and treatment of food shall be able to be applied.

Key words : Platycodon grandiflorus (Jacq.) A.DC, C6 glioma cell, Oxidative stress, Apoptosis

서 론

65세 이상 노인 인구가 증가하면서 노화와 각종 성인병의 원인이 되고 있는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 관심이 높아지고 있다. 생체 내 정상 세포대사 과정이나 여러 환경오염 및 화학물질의 노출 등에 의해 생성된 superoxide anion radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals 등은 체내에서 세포막 손상, DNA 변성, 지질 산화, 단백질 분해 등을 초래

* To whom correspondence should be addressed at : Sang Yun Jeon,

Dong Shin Oriental Medicine Hospital, 377-12, Wolsan-dong, Nam-gu, Gwangju, Korea

· E-mail : damiano@hanmail.net, · Tel : 062-350-7207

· Received : 2014/06/16 · Revised : 2014/08/09 · Accepted : 2014/08/12

하여 뇌혈관 질환, 암 및 심혈관계 질환 등과 같은 만성질환의 발생 위험성을 증가시키고 있다^{1,3)}. 이러한 활성산소종에 대한 방어 기작으로 생물들은 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소체계를 가지고 있는데, 효소적 방어기작에서 superoxide dismutase는 superoxide anion radical을 과산화수소(H₂O₂)로 변환시키고, 생성된 H₂O₂는 catalase에 의해 물과 산소 분자로 분해된다⁴⁾. 생체 내에서 일어나는 이러한 반응을 제어하기 위해 생리 활성 소재를 개발하기 위한 여러 연구가 많이 이루어지고 있다^{5,6)}.

길경은 한국, 중국 및 일본 등지에 널리 자생하는 다년생 초본인 초롱꽃목 초롱꽃과(Campanulaceae)에 속한 여러해살이풀인 도라지(Platycodon grandiflorus (Jacq.) A.DC.)의 뿌리를 건조한 것으로 性은 평하고 味는 苦辛하며 效能은 宣肺解表, 利氣散

結, 祛痰平喘, 排膿消癰, 利咽, 宣肺利水이다⁷⁾. 또한 동물실험에서 진해, 거담작용⁸⁾, 혈당강화작용⁹⁾, 콜레스테롤 대사 개선작용¹⁰⁾, 항암효과¹¹⁾ 등이 있는 것으로 밝혀져 있으며, 길경이 배합되어 있는 한약 처방은 동의보감에 287건, 방약합편에 49건이 수록될 정도로 다양한 약리작용을 갖고 있다¹²⁾. 하지만 아직까지 신경교종세포인 C6 glioma cell의 산화스트레스에 대한 보호효과에 대한 실험적 연구는 없었다.

이에 저자는 C6 glioma cell에 각종 산화적인 스트레스를 유발하고 이에 대한 길경 추출물의 세포사멸 방지효과 및 SOD활성과 Total glutathione 함량을 관찰한 결과 유의성을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

세포주는 흰쥐에서 발생한 종양을 배양시킨 신경교세포주인 C6 glioma cell을 사용하였으며, 전문배양회사인 한국세포주은행에서 동결 상태로 구입하여 사용하였다.

2) 약재

본 실험에서 사용한 길경(*P. grandiflorus*의 건조한 뿌리)은 동신대학교 부속 광주한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 제조

길경 100 g을 증류수 1,500 cc에 넣고 전기약탕기(대웅, 한국)로 2시간 동안 전탕하여 얻어진 추출액을 거즈로 거른 다음, 원심분리기(eppendorf, Germany)를 이용하여 5,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 찌꺼기를 버리고 상층액을 얻은 후 감압 농축기(EYELA, Japan)를 이용하여 100 ml로 감압 농축한 다음, 동결 건조하여 최종적으로 39.9 g의 시료를 얻었으며 이를 증류수에 희석하여 농도별로 투여하였다.

2) 세포 배양

C6 glioma cell을 배양하기 위해 RPMI 배지에 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)과 항생제 (Antibiotic antimycotic)를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂의 배양기를 사용하여 배양하였고, 이들 세포가 T-75 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 PBS (인산완충액, Phosphate buffered saline)로 가볍게 세척한 다음 Trypsin-EDTA (Sigma, USA)을 처리한 후, 37°C에서 5분간 방치하였다가 채집하였고 평균 2.5일에 1회씩 계대 배양을 시행하였다.

3) 세포 증식 측정

농도별 길경 투여에 따른 C6 glioma cell의 증식율은 MTT assay¹³⁾를 통해 측정하였다. C6 glioma cell을 96 well plate에 5×10³ cell/well의 농도로 분주하여 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 24시간 동안 pre-incubation시킨 후 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml의 농도로 약물을 처리하여 24시간 배양하였다. 이후

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide를 처리하여 4시간을 배양하고 각 well에 생성된 formazan 결정을 DMSO를 첨가하여 녹이고, Microplate Reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 산화스트레스에 의한 세포 사멸 보호효과 측정

산화스트레스에 의한 세포 사멸 보호효과를 관찰하기 위하여 C6 glioma cell에 500 µg/ml의 길경추출액(PGE)을 전처리하고, paraquat, SNP, rotenone, hydrogen peroxide (H₂O₂)로 산화스트레스를 유발하여 길경의 세포 사멸 방지 효과를 관찰하였다. 이를 위해 먼저 C6 세포주를 96-well plate에 well 당 1×10⁴개씩 분주한 후, 37°C, 5% CO₂가 지속적으로 공급되는 환경에서 4시간동안 방치하여 부착을 시행하고 세포의 부착을 끝낸 후, 길경을 처리하고 동일한 환경에서 24시간 동안 방치하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 100mM의 paraquat, 1mM의 rotenone, 1mM의 sodium nitroprusside (SNP) 그리고, 0.5mM의 과산화수소 (hydrogen peroxide, H₂O₂)를 각각 처리하고 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 4시간 동안 배양시킨 후, 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan결정을 녹인 후 Microplate Reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 540 nm에서 광도를 측정하였다.

5) 실험군 설정

실험군 설정은 다음 Table 1과 같다.

Table 1. Classification of each Groups

Group	Explanation	
Normal군	C6 glioma cell에 37°C, 5% CO ₂ 가 지속적으로 공급되는 환경에서 4시간동안 방치한 군	
PGE군	Normal군에 500 µg/ml의 길경 추출액을 처리하고 동일 환경에서 24시간동안 방치한 군	
Chemical군	Paraquat군	Normal군에 100mM의 paraquat을 처리하고 동일환경에서 4시간동안 배양시킨군
	SNP군	Normal군에 1mM의 SNP를 처리하고 동일환경에서 4시간동안 배양시킨군
	Rotenone군	Normal군에 1mM의 rotenone을 처리하고 동일환경에서 4시간동안 배양시킨군
	H2O2군	Normal군에 0.5mM의 H2O2를 처리하고 동일환경에서 4시간동안 배양시킨군
PGE군+Chemical군	PGE군+Paraquat군	PGE군에 100mM의 paraquat을 처리하고 동일환경에서 4시간동안 배양시킨군
	PGE군+SNP군	PGE군에 1mM의 SNP를 처리하고 동일환경에서 4시간동안 배양시킨군
	PGE군+Rotenone군	PGE군에 1mM의 rotenone을 처리하고 동일환경에서 4시간동안 배양시킨군
	PGE군+H2O2군	PGE군에 0.5mM의 H2O2를 처리하고 동일환경에서 4시간동안 배양시킨군

6) SOD 활성 측정

SOD 활성 측정을 위해서 SOD assay kit (Dojindo, Japan)을 이용하였다. 이를 위해 100 mm dish에 각각 1×10⁶ 개의 세포를 분주하고 37°C, 5% CO₂를 유지하며 24시간 동안 pre-incubation 시키고 500 µg/ml 농도의 약물을 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간의 배양이 끝나면 세포를 수집한 다음 -20°C에서 20분간 냉동 후 항온 수조를 이용하여 37°C에서 10분간 방치하기를 2회 반복 하여 세포를 파쇄하며 세포 파쇄가 끝난 후에는 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 기질로 사용한다.

측정 과정은 kit 제조사(Dojindo)에서 제공한 manual에 따라 진행하였으며 측정된 Optical density (OD) 값으로부터 SOD 활성도를 계산하였으며 공식은 아래와 같다.

$$\text{SOD activity (inhibition rate \%)} = \frac{(\text{Ablank1}-\text{Ablank3})-(\text{Asample}-\text{Ablank2})}{(\text{Ablank1}-\text{Ablank3})} \times 100$$

Ablank1: slope of enzyme blank, Ablank2: slope of sample blank, Ablank3: slope of blank, Asample: slope of Samples

7) Total glutathione 함량 측정

Total glutathione 함량 측정을 위해서 Total glutathione Quantification Kit (Dojindo, Japan)을 이용하였다. SOD 활성 측정과 동일한 방법으로 기질을 제조한 다음, Pseudo-end point method를 이용하여 glutathione 함량을 측정하였으며, 측정 과정은 kit 제조사에서 제시한 메뉴얼에 따라 진행하였으며 내용은 아래와 같다.

$$\text{Total glutathione} = (\text{O.D.sample} - \text{O.D.blank})$$

3. 통계처리

통계처리는 통계프로그램 IBM SPSS Statistics 21을 활용하였으며, group이 3개 이상인 것은 one-way ANOVA 후 유의한 경우 사후검정은 Tukey 방법을 시행하였고 2개 군간의 평균비교는 independent sample t-test를 사용하였으며, p-value가 0.05 미만인 경우에만 유의하다고 인정하였다.

결 과

1. 세포 증식율에 미치는 영향

PGE 투여가 C6 glioma cell의 증식율에 미치는 영향을 살펴 보기 위하여 C6 glioma cell에 농도별로 투여하고 24시간 후, 세포 증식율을 측정한 결과 250 µg/ml 이상 95.95%로 기저치보다 유의하게 감소하였다(Fig. 1).

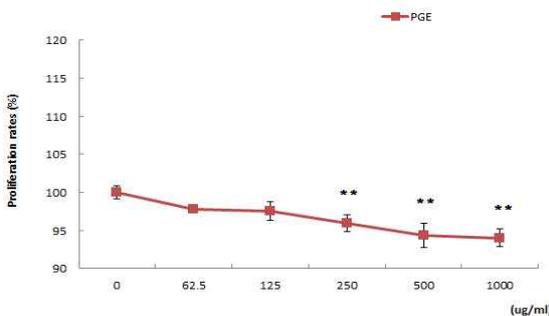


Fig. 1. Effects of PGE on proliferation rates of C6 glioma cells in vitro. C6 Cells were attached 96-well plate, and added PGE as indicated concentrations respectively. After 24 hr incubation, proliferation rates were measured using MTT methods. Result are presented as mean±SE. ** : Statistically significance compared with 0 µg/ml group (** ; P<0.01).

2. 산화스트레스에 의한 세포 사멸

Paraquat, SNP, rotenone, hydrogen peroxide에 의한 산화

스트레스가 C6 glioma cell에 미치는 영향을 확인하기 위하여 아무런 처치를 하지 않은 군을 normal 군으로 설정하고, Paraquat 100mM, SNP 1mM, rotenone 1mM, H₂O₂ 0.5 mM 을 투여한 후 이를 비교해 볼 결과 아래와 같이 산화스트레스에 의해 C6 glioma cell이 유의하게 감소되었다(Fig. 2).

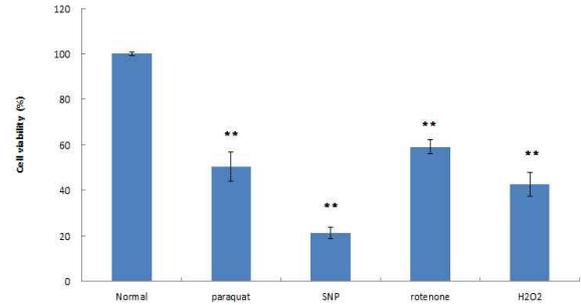


Fig. 2. Decrease of C6 glioma cells on oxidative stress induced by various chemicals. Normal : non-treated group ** : Statistically significance compared with Normal (** ; P<0.01).

3. Paraquat에 의해 발생한 세포사멸 방지효과

PGE 투여가 paraquat의 산화스트레스에서 발생한 C6 glioma cell의 사멸을 방지하는 효과를 관찰한 결과 PGE+Paraquat군은 73.54%로 Paraquat군 50.47%보다 유의한 세포 사멸 보호 효과가 관찰되었다(Fig. 3).

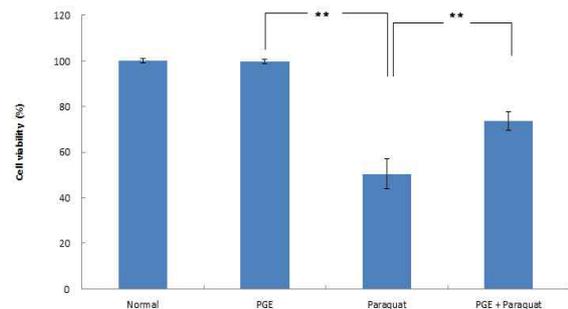


Fig. 3. Protective effects of PGE on oxidative stress induced by paraquat in C6 glioma cells. C6 Cells were attached 96-well plate, and added 500 µg/ml of PGE for 24 hr. After 24 hr incubation, indicated concentration of paraquat was treated for 4 hr. ; Normal : non-treated ; PGE : only PGE treated ; Paraquat : only paraquat treated ; PGE + Paraquat : PGE pre-treated then paraquat treated. ; ** : Statistical significance between groups (** ; P<0.01).

4. SNP에 의해 발생한 세포사멸 방지효과

PGE 투여가 SNP의 산화스트레스에서 발생한 C6 glioma cell의 사멸을 방지하는 효과를 관찰한 결과 PGE+SNP군은 33.52%로 SNP군 21.17%보다 유의한 세포 사멸 보호 효과가 관찰되었다(Fig. 4)

5. Rotenone에 의해 발생한 세포사멸의 방지효과

PGE 투여가 rotenone의 산화스트레스에서 발생한 C6 glioma cell의 사멸을 방지하는 효과를 관찰한 결과

PGE+Rotenone군은 67.42%로 Rotenone군 59.02% 보다 세포사멸 효과가 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 5).

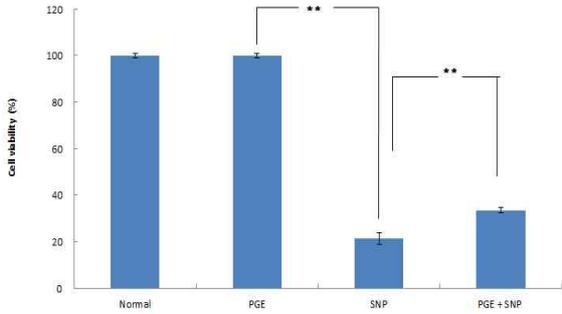


Fig. 4. Protective effects of PGE on oxidative stress induced by SNP in C6 glioma cells. SNP : only paraquat treated ; PGE + SNP : PGE pre-treated then SNP treated. ; ** : Statistical significance between groups (** ; P<0.01).

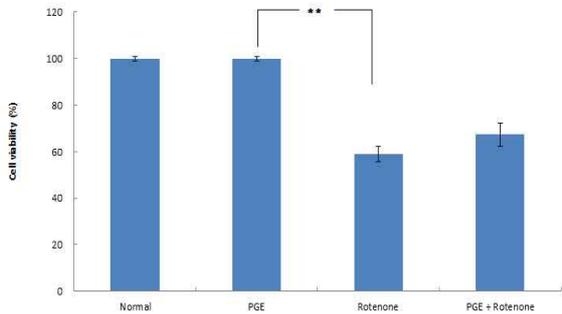


Fig. 5. Protective effects of PGE on oxidative stress induced by rotenone in C6 glioma cells. Rotenone : only rotenone treated ; PGE + Rotenone : PGE pre-treated then rotenone treated. ;** : Statistical significance between groups (** ; P<0.01).

6. Hydrogen peroxide에 의해 발생한 세포사멸의 방지효과

PGE 투여가 H₂O₂의 산화스트레스에서 발생한 C6 glioma cell의 사멸을 방지하는 효과를 관찰한 결과 PGE+H₂O₂군은 60.90%로H₂O₂군 42.61%보다 유의한 세포 사멸 보호 효과가 관찰되었다(Fig. 6).

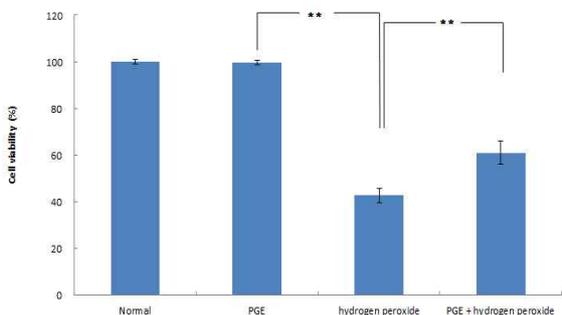


Fig. 6. Protective effects of PGE on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in C6 glioma cells. H₂O₂ : only H₂O₂ treated ; PGE + hydrogen peroxid : PGE pre-treated thenhydrogen peroxid treated. ; ** : Statistical significance between groups (** ; P<0.01).

7. SOD 활성에 미치는 영향

C6 glioma cell에 500 μg/ml의 PGE를 처치한 후, SOD 활성도를 측정된 결과 SOD 저해 활성도가 96.74%로 유의하게 감소되었다(Fig. 7).

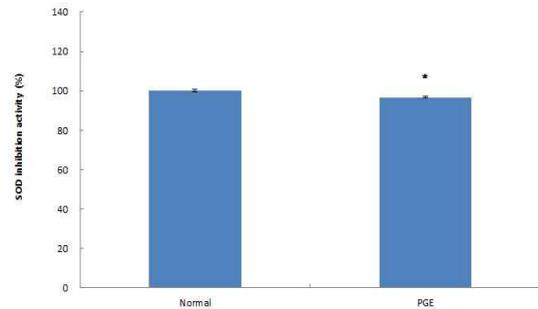


Fig. 7. Effects of PGE on SOD inhibition activities in C6 glioma cells. C6 Cells were attached 100 mm plate, and added 500 μg/ml of PGE for 24 hr.* : Statistical significance between groups (* ; P<0.05).

8. Total glutathione 함량에 미치는 영향

PGE 투여가 Total glutathione 함량에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 C6세포에 500 μg/ml의 PGE를 처치한 후, Total glutathione 함량을 측정된 결과 67.08%로 나타나 유의성은 없었다(Fig. 8).

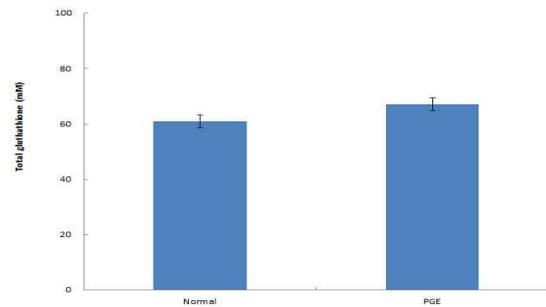


Fig. 8. Effects of PGE on production levels of total glutathione in C6 glioma cells.

고 찰

현대과학 및 의학의 발달로 인간의 평균수명이 증가하면서 2013년 우리나라는 총인구에서 65세 이상 고령자가 차지하는 비율은 12.2%로 1970년 3.1%에서 지속적으로 증가하여 2030년 24.3%, 2050년 37.4% 수준에 이를 것으로 전망되며 특히, 85세 이상 초고령인구 비율은 2013년 0.9%에서 2030년 2.5%, 2050년 7.7%로 크게 증가할 것으로 전망된다⁴⁾. 인간의 수명이 연장되기는 하였지만 이러한 수명의 연장은 위생의 개선과 생활환경의 변화로 이루어진 결과이며 전적으로 노화의 방지 혹은 예방에 의한 결과라고 보기는 힘들다. 서구 의학적 관점에서도 생물학적 기능이 스트레스나 기타 요인에 치명적인 영향을 받는 것이 사실이나 노인의 기능 소실을 유발하는 결정적 요인은 질병자체라

고 생각하고 있다. 따라서 건강한 노인은 같은 연령대의 다른 사람보다 활동적인 생활이 가능하며 현대의 65세의 노인들은 과거 조상들 보다 훨씬 건강한 상태에 있다¹⁵⁾.

활성산소종은 생체 내 대사과정의 부산물로 지속적으로 생성되며, 생체는 이러한 활성산소종의 독성을 방어하기 위하여 항산화물질 및 항산화효소계로 구성된 항산화방어 시스템을 지니고 있다. 그러나 활성산소종이 과다하게 생성되거나, 항산화방어 시스템이 정상적으로 작동하지 못할 경우, 활성산소종은 생체내 단백질, 지질, low-density lipoprotein 및 DNA 등의 산화적 손상을 야기하게 된다^{16,17)}. 활성산소종에 대한 관심이 높아지고 항산화에 대한 관심이 높아지는 가운데 최근 길경을 20년 이상 장기 재배하는 방법이 개발됨에 따라 20년근 이상의 길경에 대한 각종 연구들도 활발히 진행되고 있다¹⁸⁾.

길경은 宣肺解表, 利氣散結, 祛痰平喘, 排膿消癰, 利咽, 宣肺利水的 효능이 있어서 咳嗽痰多 胸悶不暢, 氣喘, 肺癰, 咽喉失音, 水腫등을 치료한다⁷⁾.

길경의 함유성분으로는 inulin 및 fructooligosaccharide 등 탄수화물이 전체추출물의 95% 이상을 차지하고 있으며 이 외에 platycodigenin, polygalacic acid 등 oleanane계 triterpene 을 aglycone으로 한 200 여종의 사포닌 종들이 1-4%정도 함유되어 있다고 알려져 있으며 이들 사포닌 성분들은 길경 추출물이 보여주는 다양한 약리활성의 활성성분으로 주목받고 있다¹⁹⁾. 길경 및 길경의 사포닌의 약리효능으로는 알레르기성 염증반응 억제 효과에 의한 喘息억제²⁰⁾, cytokines 발현억제에 의한 면역조절효과²¹⁾, 전자공여 작용에 의한 항산화효과¹⁹⁾ 등이 있다.

길경에 대한 한의학에서의 연구로는 형태의 연구²²⁾, 폐암세포의 성장억제 기전 연구²³⁾, 면역활성 및 항암에 미치는 영향 연구²⁴⁾, 혈중지질성분의 변화에 대한 연구²⁵⁾, 천식억제에 대한 연구²⁶⁾ 등으로 다양하게 보고되고 있다. 하지만 신경교세포주인 C6 glioma cell의 보호효과 및 산화스트레스 억제에 대한 실험적 연구는 없었다. 이에 저자는 길경 추출물(PGE)이 C6 glioma cell에 유의한 영향을 미칠 것으로 생각되어 C6 glioma cell의 보호효과를 살펴보기 위하여 C6 glioma cell의 증식율, 산화스트레스에 의한 세포사멸 방지효과 및 SOD활성과 Total glutathione 함량을 살펴보았다.

뇌 조직은 크게 신경세포(neuron)과 교세포(glial cell)로 구성되어 있으며 그 비율은 대략 5:5 정도라 할 수 있다. 교세포는 다시 성상세포(astrocyte), 미세 교세포(microglial cell) 등으로 나뉘게 된다. 교세포들은 신경세포의 활성물질을 조절하거나 각종 면역 반응에 관여하는 세포들로, 특히 C6 glioma cell은 교세포를 기원으로 하는 세포주로 교세포의 특성을 연구하는 각종 연구에 사용되고 있다²⁷⁻²⁹⁾.

본 연구에서 PGE 투여로 인한 C6 glioma cell의 증식률은 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 유의한 수준의 증식을 감소를 나타냈다(Fig. 1)

이는 길경의 排膿消癰 효능 때문으로 보여지는데 이에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

C6 glioma cell에 대하여 산화스트레스를 유발한다고 알려져 있는 4가지 chemical의 처치에 의해 발생하는 세포 사멸에 미

치는 영향을 살펴보았다. 먼저 Paraquat는 그라목손(Gramoxone)으로 알려져 있는 강력한 제초제로 실험실에서 주로 각종 중독 작용, 산화스트레스에 의한 세포 손상을 일으키는 자극원으로 사용된다^{30,31)}. 다음으로 생체 내에서 NO(nitric oxide)를 발생시켜 산화스트레스를 유발하는 SNP(sodium nitro-prusside)³²⁾, H₂O₂³³⁾를 사용, 마지막으로 농약, 살충제 용도로 사용되며, 생체 내의 각종 세포에 산화적 손상을 통하여 apoptosis를 유발하는 Rotenone^{34,35)}을 사용하였다.

실험결과 상기 4가지 chemical은 모두 C6 glioma cell의 생존율을 유의한 수준으로 감소시켰다(Fig. 2)

C6 glioma cell에 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 길경의 항산화 효과를 보기 위해 PGE를 전처치하고, paraquat, SNP, rotenone, H₂O₂으로 산화스트레스를 유발하여 PGE의 세포 사멸 방지 효과를 관찰해 본 결과 PGE+paraquat군은 73.54%로 paraquat군 50.47%에 비하여 유의성 있는 증가를 나타냈고(Fig. 3), PGE+SNP군은 33.52%로 SNP군 21.17%에 비하여 유의성 있는 증가를 나타냈고(Fig. 4), PGE+rotenone군은 67.42%로 rotenone군 59.02%에 비하여 증가를 하였으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 5).

PGE+H₂O₂군은 60.90%로 H₂O₂군 42.61%에 비하여 유의성 있는 증가를 나타냈다(Fig. 6).

이러한 결과로 미루어 보아 PGE는 paraquat, SNP, H₂O₂에 유의한 세포 사멸 보호 효과가 관찰되었다.

생체 내에서 가장 대표적 항산화 효소인 SOD(superoxide dismutase)는 세포에 해로운 H₂O₂로 전환시키는 반응에 관여하는 효소이며³⁶⁾, 30KDa 이상의 분자량을 가진 단백질 물질로 세포막을 통과하지 못 한다³⁷⁾. 본 연구의 결과에서 PGE군에서 96.74%로 SOD 저해 활성도가 유의성 있게 감소하였다(Fig. 7).

Glutathione은 대표적인 항산화제로 free radical과 peroxide와 같은 활성산소종으로 부터 세포를 보호해 주는 역할을 한다²⁹⁾. Glutathione은 대부분 환원형으로 존재하며, 활성산소종에 의하여 산화되면서 항산화 활성을 발휘하게 된다³⁸⁾. 산화된 Glutathione은 glutathione reductase에 의하여 다시 환원형으로 돌아간다³⁹⁾. 본 연구에서는 PGE는 67.08%로 total glutathione 함량에 특별한 영향을 미치지 않았다(Fig. 8). 추후 PGE의 항산화 관련 연구를 통하여 재확인함과 동시에 명확한 기전을 밝혀야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과들을 종합해 보면, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 PGE는 Paraquat, SNP, H₂O₂의 산화스트레스에 의한 세포 사멸을 유의한 수준으로 방지하였고, 또한 유의한 수준으로 SOD활성을 증가시킬 수 있었다. 이를 토대로 앞으로 산화스트레스에 의해 유발되는 질병들의 예방과 치료 및 노화에 응용 될 수 있으리라 보여지며, 향후 그 작용기전에 대한 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결론

길경이 C6 glioma cell의 산화스트레스에 대한 세포사멸 보호효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

PGE군에 Paraquat, SNP, H₂O₂을 처리한 결과 세포 사멸이 유의하게 감소하였고, Rotenone을 처리한 결과 세포 사멸이 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었다.

PGE군에 SOD 저해활성도가 유의성 있게 감소하였으나, total glutathione 함량에 특별한 영향을 미치지 않았다.

References

- Biesalski, H.K. Free radical theory of aging. *Curr. Opin. Clin. Nutr* 5: 5-10, 2002.
- Oh, H.M., Kim, M.K. Effect of dried leaf powders, water, and ethanol extracts of persimmon and green tea leaves on lipid metabolism and antioxidative capacity in 12-month-old rats. *Korean J. Nutr* 34: 285-298, 2001.
- Kim, S.K., Lee, H.J., Kim, M.K. Effect of water and ethanol extracts of persimmon leaf and green tea different conditions on lipid metabolism and antioxidative capacity in 12-month-old rats. *Korean J. Nutr* 34: 499-512, 2001.
- Halliwel, B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of nutrition* 16: 33-50, 1996.
- 강창호, 광대영, 소재성, 길경, 황기와 오미자 혼합추출물의 NO 억제활성과 Hyaluronidase 억제활성 효과. *한국식품영양과학회지* 42(6):844-850, 2013.
- 황초룡, 오승희, 김현영, 이상훈, 황인국, 신유수, 등. 열처리 온도에 따른 더덕과 도라지의 화학성분과 항산화활성. *한국식품영양과학회지* 40(6):798-803, 2011.
- 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. *본초학*. 서울, 영림사, pp 496-497, 2011.
- 정희재, 정승기, 이형구, 정 욱. 행인과 길경이 Asthma model의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향. *대한한방내과학회* 21(1):31-38, 2000.
- 성낙주, 이수정, 신정혜, 이일숙, 정영철. 도라지 추출액이 Alloxan 유발 당뇨병 흰쥐의 혈당 및 지질성분에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지* 25(6):986-992, 1996.
- 변부형, 서부일. 길경분말이 고지방식으로 유도된 비만 흰쥐 혈청중의 간효소 활성도에 미치는 영향. *대한본초학회지* 18(4):135-139, 2003.
- 박봉규, 감철우, 허태을, 박동을. 길경 수용액 추출물에 의한 NCI-H460 인체 폐암세포의 p53 및 pRB의 발현에 미치는 영향. *대한동의생리학회* 20(6):1530-1537, 2006.
- Lee, J.Y., Hwang, W.I., Lim, S.T. Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from Platycodon Grandiflorum A. De Candolle roots. *J Ethnopharmacol*. 93: 409-415, 2004.
- Guyton. *의학생리관(제10판)*. 서울. 정답사. pp 170-175, 2002.
- 통계청 사회통계기획과. 2013 고령자 통계. pp 1-2, 2013.
- 배정규, 안택원. 보폐원탕이 노화쥐의 간장과 폐장 세포의 항노화 및 항산화능에 미치는 영향. *사상체질의학회지* 20(3):164-175, 2008.
- Farber, J.L. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. *Environmental Health Perspectives* 102: 17-24, 1994.
- Gurpreet, K., Sarwar, A., Zoobi, J., Kaleem, J., Mohammad, A. Evaluation of antioxidant activity of Cassia siamea flowers. *Journal of Ethnopharmacology*. 108: 340-348, 2006.
- Shon, M.Y., Seo, J.K., Kin, H.J., Sung, N.J. Chemical compositions and physiological activities of Platycodon grandiflorum. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 717-720, 2001.
- 손미예, 서종권, 김행자, 성낙주. 장생도라지의 화학성분과 생리활성. *한국식품영양과학회지* 30(4):717-720, 2001.
- 김성수. 길경에 의한 알레르기 천식 효과에 대한 연구. *본초학회지* 19(2):61-70, 2004.
- 박상현, 정희재, 정승기, 이형구. 마행감식탕과 길경이 인간기관지 상피세포의 Cytokines에 미치는 영향. *경희의학* 17(2):230-241, 2001.
- 이화정, 최문일, 유주봉, 김자영, 강경식, 신철근, 등. 길경의 내외부형태 연구. *대한한의방제학회* 14(1):74-81, 2006.
- 강락원, 이재훈, 감철우, 최병태, 최영현, 박동일. 길경 수용액 추출물에 의한 인체 폐암세포의 성장억제 기전. *동의생리병리학회지* 17(1):183-189, 2003.
- 이지영, 이진무, 이창훈, 조정훈, 장준복, 이경섭. 길경이 면역활성 및 항암에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지* 23(4):10-19, 2010.
- 진철용, 변부형, 박지하, 이은숙, 최해윤, 이병욱, 등. 길경이 고지방식으로 유발된 비만흰쥐의 체중 및 혈청중지질성분의 변화에 미치는 영향. *대한본초학회지* 17(2):19-28, 2002.
- 박치영, 김영일, 홍권의. 길경약침의 천식억제 및 면역조절효과에 대한 실험적 연구. *대한침구학회지* 22(6):61-74, 2005.
- Norenberg, M.D. *Immunology of the nervous system*. Oxford University press, New York. pp 173-199, 1997.
- 성정훈, 최동희, 김동훈, 전보권, 최상현. 고려인삼에 의한 신경면역 및 염증반응 조절: 백삼사포닌에 의한 교세포에서의 TNF- α , IL-1 β 및 NO 생성증가. *고려인삼학회지* 28(2):120-126, 2004.
- 김인애, 진은정, 조은정, 손시환, 이철영. C6 Rat Glioma cell에서 리튬에 의한 성장 억제와 Insulin-like Growth Factor system Components의 발현과의 관계. *한국동물자원과학회지* 46(4):563-570, 2004.
- Wills, B.K., Ahs, S., Maloney, G.E., Rhee, J., Brand, R., Sekosan, M. The effect of amifostine, a cytoprotective agent, on paraquat toxicity in mice. *J Med Toxicol* 3(1):1-6, 2007.
- Krasowska, A., Sigler, K. Cell-protective and antioxidant activity of two groups of synthetic amphiphilic compounds-phenolics and amine N-oxides. *Folia Microbiol (Praha)* 52(6):585-592, 2007.
- Mullens, W., Abrahams, Z., Francis, G.S., Skouri, H.N., Starling, R.C., Young, J.B., et al. Sodium nitroprusside for advanced low-output heart failure. *J Am Coll Cardiol*.

- 52(3):200-207, 2008.
33. 안성훈, 구성태, 김선영, 김경식, 손인철. H₂O₂로 유발된 뇌신경세포 상해에 대한 구진의 보호효과. *대한침구학회지* 21(3):29-41, 2004.
34. Molina-Jiménez, M.F., Sánchez-Reus, M.I., Andres, D., Cascales, M., Benedi, J. Neuroprotective effect of fraxetin and myricetin against rotenone-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Brain Res* 1009(1-2):9-16, 2004.
35. Zhang, J.G., Nicholls-Grzemeski, F.A., Tirmenstein, M.A., Fariss, M.W. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. *Chem Biol Interact* 138(3):267-284, 2001.
36. Corpas, F.J. The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physiol* 47(7):984-994, 2006.
37. Corpas, F.J., Barroso, J.B., del Río, L.A. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* 6(4):145-150, 2001.
38. Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 66(8):1499-503, 2003.
39. Pastore, A., Piemonte, F., Locatelli, M., Lo Russo, A., Gaeta, L.M., Tozzi, G., et al. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clin. Chem.* 47(8):1467-1469, 2003.