



Original Article / 원저

## 인체 신경세포에서 淸腦明神丸의 산화적 스트레스에 대한 세포보호 효과

피국현, 황원덕\*

동의대학교 한의과대학 내과학교실

### Neuroprotective Effects of Cheongnoemyeongsin-hwan against Hydrogen Peroxide-induced DNA Damage and Apoptosis in Human Neuronal-Derived SH-SY5Y Cells

Guk Hyun Pi, Won Deuk Hwang\*

Department of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine,  
Dong-Eui University

#### ABSTRACT

**Objectives** : Oxidative stress due to excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS) is one of the risk factors for the development of several chronic diseases, including neurodegenerative diseases.

**Methods** : In the present study, we investigated the protective effects of cheongnoemyeongsin-hwan (CNMSH) against oxidative stress-induced cellular damage and elucidated the underlying mechanisms in neuronal-derived SH-SY5Y cells.

**Results** : Our results revealed that treatment with CNMSH prior to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) exposure significantly increased the SH-SY5Y cell viability, indicating that the exposure of the SH-SY5Y cells to CNMSH conferred a protective effect against oxidative stress. CNMSH also effectively attenuated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced comet tail formation, and decreased the phosphorylation levels of the histone  $\gamma$ H2AX, as well as the number of apoptotic bodies and Annexin V-positive cells. In addition, CNMSH exhibited scavenging activity against intracellular ROS generation and

restored the mitochondria membrane potential (MMP) loss that were induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suggesting that CNMSH prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and cell apoptosis. Moreover, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhanced the cleavage of caspase-3 and degradation of poly (ADP-ribose)-polymerase, a typical substrate protein of activated caspase-3, as well as DNA fragmentation; however, these events were almost totally reversed by pretreatment with CNMSH. Furthermore, CNMSH increased the levels of heme oxygenase-1 (HO-1), which is a potent antioxidant enzyme, associated with the induction of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). According to our data, CNMSH is able to protect SH-SY5Y cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis throughout blocking cellular damage related to oxidative stress through a mechanism that would affect ROS elimination and activating Nrf2/HO-1 signaling pathway.

**Conclusions** : Therefore, we believed that CNMSH may potentially serve as an agent for the treatment and prevention of neurodegenerative diseases caused by oxidative stress.

**Key Words** : Cheongnoemyeongsin-hwan(CNMSH), Oxidative stress, reactive oxygen species, neurodegenerative diseases

## I. 서론

최근 고령노인 인구의 증가에 따른 신경계 질환의 발병률이 급속히 증가되고 있다. 특히 Alzheimer 병, Parkinson 병, Huntington 무도병 및 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis) 등은 노인의 삶의 질을 악화시키는 대표적인 신경퇴행성 장애질환(neurodegenerative disorder)이다<sup>1</sup>. 신경퇴화(neurodegeneration)는 신경세포의 손상을 특징적으로 동반하는데, 예를 들어 Parkinson 병은 가장 일반적인 신경 퇴행성 운동장애(neurodegenerative movement disorder)로써 60세 이상 인구의 1%가 이 질환을 앓고 있으며, 점진적인 신경세포의 죽음에 의한 소실이 그 원인이다<sup>2,3</sup>.

비록 신경 퇴행성 장애 질환의 원인이 명확하게 규명된 것은 아니지만, 최근 많은 연구들에서 활성 산소종(reactive oxygen substances, 이하 ROS)의 생성 증가로 대별되는 산화적 스트레스(oxidative stress)가 가장 중요한 신경독성 요인으로 인식되고 있다. 그러므로 산화 방지 전략(antioxidant strategy)은 급성 및 만성적 신경 퇴행성 장애 질환의 예방과 치료에 매우 중요한 접근 방법으로 대두되고 있다<sup>4,5</sup>. 따라서 신경세포에서 산화적 스트레스를 경감시키고 신경 퇴행성 장애 질환을 보호할 수 있는 항산화제의 발굴이 절실히 요구되고 있다. ROS는 정상 세포의 호흡과정에서 발생하는 미토콘드리아 부산물로서 하나 또는 그 이상의 배우자가 없

는 산소 원자를 함유하는 고반응 분자들의 집단이다<sup>6,7</sup>. 산화적 스트레스는 ROS의 생성과 항산화적 방어(antioxidant defenses) 능력 사이의 불균형에서 비롯된다. 비록 ROS가 정상 세포의 기능 수행을 위한 중요한 신호 분자로서 작용을 하지만, 비정상적으로 증가된 ROS는 세포기관의 기능 장애를 유발하며, 단백질, 지질 및 핵산 등과 같은 세포 내 거대분자들의 손상을 일으킴으로서 세포 죽음을 야기하는 원인 인자로 작용한다<sup>8,9</sup>. 산화적 스트레스에 의한 신경세포의 죽음은 산화적 스트레스의 종류와 정도에 따라 necrosis 또는 apoptosis로 구분된다<sup>4,10</sup>.

한편 heme oxygenase-1 (이하 HO-1)은 산화적 손상으로 세포 보호효과를 가지는 효소로 heme의 산화를 유도하여 biliverdin, free iron 및 carbon monoxide로 분해시키며, biliverdin은 biliverdin reductase에 의해서 bilirubin으로 변환되는데 이러한 HO-1의 직접적 또는 대사산물에 의해 ROS를 소거하여 항산화 효과를 가지는 것으로 알려져 있다<sup>11,12</sup>. 그리고 HO-1의 전사활성을 조절하는 대표적인 유전자는 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (이하 Nrf2)로서 산화적 스트레스에서 세포를 보호하는 강력한 조절자로 작용한다<sup>13,14</sup>. 일반적인 상황에서 Nrf2는 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)라 불리는 Nrf2 억제 단백질과 결합된 채로 세포질에 존재한다. 그러나 산화적 스트레스나 항산화반응 유도신호에 의하여 Keap1과 해리되면서 핵내로 이동하여 antioxidant response element (ARE)를 가진 유전자들의 promoter에 결합함으로써 HO-1을

\*Corresponding author : Won Deuk Hwang, Department of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.

Tel : +82-51-850-8625, Fax : +82-51-853-4036, E-mail : wdhwang@deu.ac.kr

• Recieved : February 6, 2017 / Revised : February 17, 2017 / Accepted : February 18, 2017



포함하는 다양한 phase II 효소들의 전사활성을 촉진하여 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 반응을 매개한다<sup>15,16,17</sup>. 특히 HO-1의 발현은 Alzheimer 병, Parkinson 병 및 다발성 경화증과 같은 신경 퇴행성 질환 환자의 조직에서 증가되어 있는데, 이는 아마도 진행 중인 세포 손상에 대한 내재적 신경보호반응을 반영하는 것으로 추측된다<sup>18,19</sup>. 따라서 Nrf2의 활성화에 의한 HO-1의 발현 증대는 산화적 스트레스로부터 야기되는 다양한 환경에서 세포를 보호할 수 있는 대안으로 제시되고 있다.

청뇌명신환(淸腦明神丸)은 기억력증진과 치매예방을 목적으로 개발된 환약으로서, 元代 危亦林이 황제계 진상한 拱辰丹을 근간으로 하고 있다. 危亦林的 醫書인 『世醫得效方』에 최초로 언급된 拱辰丹은 『東醫寶鑑 雜病篇』에 虛勞에서는 타고난 원기를 든든히 하여 五藏自和, 百病不生하게 하는 목적으로 拱辰丹을 쓴다고 하였다. 본 환은 拱辰丹의 麝香, 鹿茸, 當歸 등을 주재료 하였으며, 拱辰丹의 山茱萸를 山藥으로 바꾸었고, 龍眼肉, 遠志, 人蔘, 肉桂, 附子, 沈香, 龍腦를 추가하여 구성되어져 있다. 현대인의 정신적 인과로 인한 허로와 이로 인한 기억력감퇴와 치매예방을 위해 몇 가지 약을 가미하여 저자가 임상에서 사용 중인 경험방이다.

최근 선행 연구에 의하면 청뇌명신환은 대뇌 미세아교세포(microglia)에서 염증 매개 유전자인 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS), 그리고 염증성 cytokine인 interleukin (IL)-1β의 발현을 억제함으로써 그 산물인 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), nitric oxide (NO) 및 IL-1β의 생성을 저해할 수 있는 항염증 효능이 있음이 보고된 바 있다<sup>20</sup>. 따라서 청뇌명신환이 퇴행성 뇌 질환의 중요한 원인이 되는 만성적인 신경계 염증을 억제함으로써 신경퇴행성 질환을 포함한 다양한 신경계 질환에서 보호역할을 할 것으로 기대할 수 있으나 청뇌명신환의 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호 효능에 관한 실험적인 근거는 전무한 실정이다. 이에 저자는 산화적 스트레스 유발인자인 과산화수소 (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의해 자극된 신경 유래 SH-SY5Y 세포 모델을 이용하여 청뇌명신환의 항산화 효능을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료준비

본 실험에 사용된 청뇌명신환(淸腦明神丸, CheongNoi MyungShinHwan, CNMSH)은 人蔘(Ginseng Radix Alba), 當歸(Angelicae Gigantis Radix) 山藥(Dioscoreae Rhizoma)과 龍眼肉(Longan Arillus)을 각 24 g, 肉桂(Cinnamomi Cortex) 12 g, 遠志(Polygalae Radix) 6 g, 麝香(Moschus)과 沈香(Aquilariae Lignum) 각 1 g, 龍腦(Borneolum, 중국) 0.2 g, 이상을 세말한 후, 여기에 鹿茸(cornus cervi parvum) 24 g과 附子(Aconiti Lateralis Radix Preparata) 6 g을 5 시간 정도 끓인 膠 24g을 추가한 후, 꿀 160 g으로 구성된 총 300.2g의 환약을 4g 씩 오자대 크기로 75개를 만들고, 이를 금박으로 제조한 후, 그 중 무작위로 5환을 선정하였다. 이를 멸균된 3차 증류수를 이용하여 분쇄하여 용해시켜 100 mg/ml의 농도로 만든 다음 0.2 μm 필터로 여과 후 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

### 2. 세포배양

본 실험에 사용된 신경 유래 SH-SY5Y 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분양 받았으며, 세포의 배양을 위해 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 및 1%의 penicillin/streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지를 사용하였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 매 48시간마다 0.05% trypsin/ethylene-diaminetetracetic acid (EDTA)를 이용하여 세포를 부유시킨 후 적정수의 세포를 유지하였다.

### 3. MTT assay에 의한 세포 증식 변화 조사

청뇌명신환 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 따른 SH-SY5Y 세포의 증식 변화 정도를 확인하기 위하여 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하였다. 이를 위하여 세포 배양용 6 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml로 SH-SY5Y 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후 적정 농도의 청뇌명신환 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 단독 또는 복합 처리하였다. 24시간 배양 후, 배지를 제거하고 MTT (Sigma-Aldrich

Chemical Co.)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200  $\mu$ l 씩 분주하고 37°C에서 3시간 동안 다시 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 1 ml 씩 분주하여 각 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200  $\mu$ l 씩 옮겨서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4. Comet assay (Single-cell gel electrophoresis)

산화적 DNA 손상의 정도를 측정하는 방법으로 comet assay를 위하여, 준비된 세포들을 37°C 조건에서 0.5%의 low melting agarose와 혼합하고, 1%의 normal melting agarose (NMA)로 coating된 microscopic slide에 도말하였다. Slide위의 agarose가 고형화된 후, 4°C 조건에서 lysis 용액[2.5 M NaCl, 100 mM Na-EDTA, 10 mM Tris, 1% Trion X-100, and 10% DMSO, pH 10]에 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 slide를 300 mM NaOH와 10 mM Na-EDTA (pH 13)가 함유된 buffer가 채워진 전기영동 장치에 노출시켰다. 약 40 분후, negatively charged된 DNA를 agarose gel에서 양극으로 이동할 수 있도록 25°C에서 20분간 300 mA, 25 V로 전기영동을 실시하였다. 반응이 끝난 slide를 neutralizing buffer (0.4 M Tris, pH 7.5)로 25°C에서 5분 간격으로 3회 수세하고 20  $\mu$ g/ml 농도의 propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액으로 염색을 하였다. 염색 후, 형광 현미경(fluorescence microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 DNA 손상의 여부를 관찰하였다<sup>21</sup>.

#### 5. Western blot analysis에 의한 특정 단백질 발현 변화의 분석

준비된 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet-P40 (NP-40), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4°C에서 1시간 이상 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액에 있는 단백질을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에

따라 정량 한 다음 동량의 Laemli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 혼합하여 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다. 이를 다시 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시키고 분리된 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk를 1시간 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 적정 1차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 over night 반응시킨 다음 PBS-T (PBS with Tween 20)로 세척하고 1차 항체에 맞는 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현 변화를 분석하였다. 본 실험에서 단백질 분석을 위하여 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. 및 Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. (Table 1) Immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse 및 anti-rabbit 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.에서 구입하였다.

**Table 1.** Antibodies used in the present study

| Antibody         | Origin            | Company                        |
|------------------|-------------------|--------------------------------|
| p- $\gamma$ H2AX | mouse monoclonal  | Cell Signaling Technology Inc. |
| $\gamma$ H2AX    | mouse monoclonal  | Cell Signaling Technology Inc. |
| Caspase-3        | rabbit polyclonal | Santa Cruz Biotechnology Inc.  |
| PARP             | rabbit polyclonal | Cell Signaling Technology Inc. |
| Nrf2             | mouse monoclonal  | Santa Cruz Biotechnology Inc.  |
| HO-1             | mouse monoclonal  | Santa Cruz Biotechnology Inc.  |
| Actin            | rabbit polyclonal | Santa Cruz Biotechnology Inc.  |

#### 6. DAPI staining에 의한 apoptosis 유발의 확인

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 따른 SH-SY5Y 세포의 apoptosis 유발 여부의 확인 및 청뇌명신환의 보호 효과 확인을 위하여



apoptosis가 유발되었을 경우 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하였다. 이를 위하여 24시간 동안 적정 농도의 청뇌명신환 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 처리된 배지에서 배양된 세포를 모아 fixing solution (3.7% formaldehyde in PBS)을 상온에서 10분 동안 처리하였다. 고정이 끝난 후 slide glass에 세포를 부착시키고 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 2.5 µg/ml 농도의 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액으로 15분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 형광 현미경을 이용하여 400배의 배율로 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

## 7. Annexin V-Fluorescein Isothiocyanate (FITC)

### 염색에 의한 apoptosis의 정량적 측정

SH-SY5Y 세포에서 apoptosis 유발의 정량적 분석을 위해 준비된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이들 세포를 PBS를 이용하여 2~3회 정도 세척하고 10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl 및 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>가 포함된 annexin V binding buffer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 부유시킨 다음 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC, Becton Dickinson) 및 PI를 처리하여 암실에서 15분 동안 반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리하고 flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 적용시켜 apoptosis가 유발된 세포(V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>)를 형광반응에 따라 분석하였다.

## 8. Mitochondrial membrane potential (MMP, Δψ<sub>m</sub>)의 분석

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 따른 SH-SY5Y 세포의 미토콘드리아 기능 손상 및 청뇌명신환의 보호 효과 확인을 위한 MMP 값 변화 정도를 측정하기 위하여 준비된 세포들에 10µM의 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3'-tetraethylimidocarbocyanine iodide (JC-1, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액을 처리하여 20분 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 상층액을 제거하고 PBS를 첨가하여 세포를 부유시킨 다음 flow cytometer에 적용시켜 MMP의 변화를 측정하였다.

## 9. ROS 생성 변화 측정

세포 내 ROS 생성 변화를 확인하기 위하여 SH-SY5Y 세포에 100 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 단독으로 처리하거나, 600 µg/ml의 청뇌명신환 1 시간 전처리 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 재처리하였다. 30분후, 세포들을 모아 fluorescent probe 인 2',7'-di-chlorodihydrofluorescein di-acetate (DCF-DA, Molecular Probes, Leiden, Netherlands) 10 µM로 20분간 염색하였다. 반응이 끝난 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 PBS를 첨가하여 세포를 부유시킨 다음 단일세포로 분리하였다. 이렇게 준비된 세포를 flow cytometer에 적용시켜 ROS 값의 변화를 분석하였다.

## 10. DNA 분절화 분석

Apoptosis 유발의 또 다른 증거를 제시하기 위하여 DNA 분절화 현상의 분석을 실시하였다. 상기와 유사한 조건에서 배양된 세포들을 모은 다음 lysis buffer [5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.5% TritonX-100]를 첨가하여 상온에서 1 시간 동안 처리한 다음 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 proteinase K solution (Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 처리하여 50°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 동량의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol 혼합 용액(25 : 24 : 1, Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 첨가하고 30분간 회전 교반시킨 다음 원심 분리하여 다시 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액에 isopropanol (Sigma-Aldrich Chemical Co.)과 5 M NaCl을 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 원심 분리시켜 DNA pellet을 추출하였다. 추출된 DNA pellet에 RNase A가 포함된 TE buffer 및 6X gel loading dye (Bioneer, Daejeon, Korea)를 첨가하고 1.5% agarose gel을 이용하여 50 V로 전기영동 시킨 후 ethidium bromide (EtBr, Sigma-Aldrich Chemical Co.)로 염색하여 DNA 단편화 현상을 확인하였다.

## 11. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error (SD)로 기록하였고, OriginLab Version 9.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA)의 one way analysis of variance를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

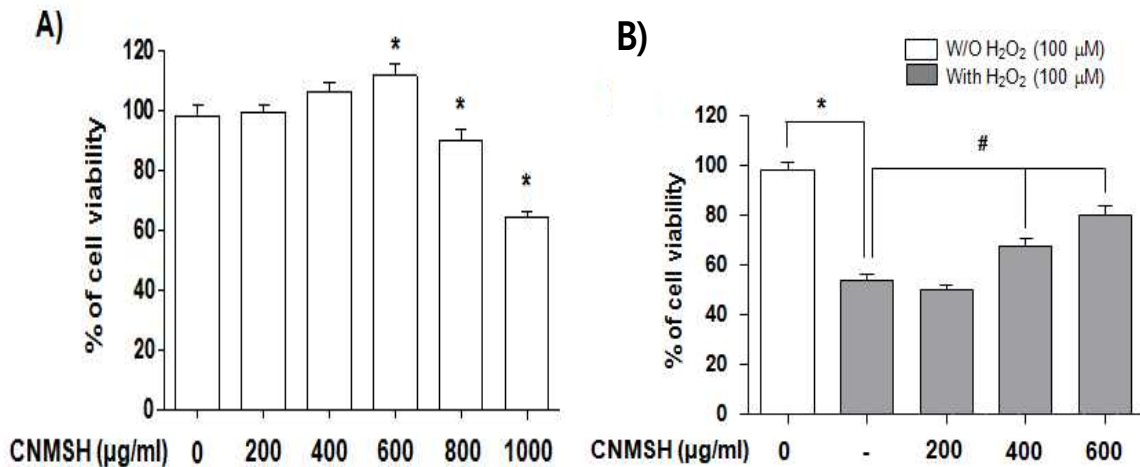
### III. 결과

#### 1. SH-SY5Y 세포의 증식에 미치는 청뇌명신환의 영향

SH-SY5Y 신경세포에서 청뇌명신환의 항산화 효능을 조사하기 위한 처리 농도 범위를 설정하기 위해 24 시간 동안 다양한 농도의 청뇌명신환을 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포 생존도를 조사하였다. Figure 1A에서 보이는 바와 같이, 청뇌명신환을 200~1000  $\mu$ g/ml 범위 내에서 처리하였을 경우, 600  $\mu$ g/ml 처리 농도까지는 세포독성을 보이지 않았고, 오히려 SH-SY5Y 세포의 증식을 부분적으로 향상시켰다. 그러나 800  $\mu$ g/ml 이상 농도의 청뇌명신환을 처리하였을 경우, 세포의 증식이 억제되었다. 따라서 항산화 효능 검증에 위한 청뇌명신환의 처리 농도는 600  $\mu$ g/ml 이하로 선정하였다.

#### 2. 산화적 스트레스에 의한 청뇌명신환의 SH-SY5Y 세포 보호 효과

SH-SY5Y 세포에 산화적 스트레스를 유발하기 위하여  $H_2O_2$ 를 처리하였으며, 선행 연구에 준하여 약 45% 정도의 증식 억제 효과를 가지는 100  $\mu$ M을 24 시간 처리하였다(Figure 1B). 청뇌명신환이 이러한 산화적 스트레스에 의해 억제된 세포 증식의 회복 능력을 가지는지의 여부를 조사하기 위하여 100  $\mu$ M의  $H_2O_2$ 를 처리하기 1시간 전에 세포독성을 보이지 않았던 범위의 농도(200~600  $\mu$ g/ml)를 처리한 후 24시간 추가 배양하고 MTT assay를 실시하였다. Figure 1B에 나타낸 바와 같이, 청뇌명신환을 전처리하였을 경우, 처리 농도의 증가에 따라  $H_2O_2$  처리에 의한 세포증식 억제 현상이 유의적으로 차단되었음을 확인하였다. 이는 청뇌명신환이 산화적 스트레스에 대한 SH-SY5Y 세포의 세포 보호 효과를 가지고 있음을 의미하는 것이다.



**Figure 1.** Effects of CNMSH on  $H_2O_2$ -induced growth inhibition in SH-SY5Y cells. Cells were treated with various concentrations (200~1000  $\mu$ g/ml) of CNMSH for 24 h (A) or pretreated with the indicated concentrations (200~600  $\mu$ g/ml) of CNMSH for 1 h and then incubated with or without 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  for 24 h (B). Cell viability was assessed using an MTT reduction assay. The results are the mean  $\pm$  SD values obtained in three independent experiments (\*,  $P < 0.05$  compared with control group; #,  $P < 0.05$  compared with  $H_2O_2$ -treated group).

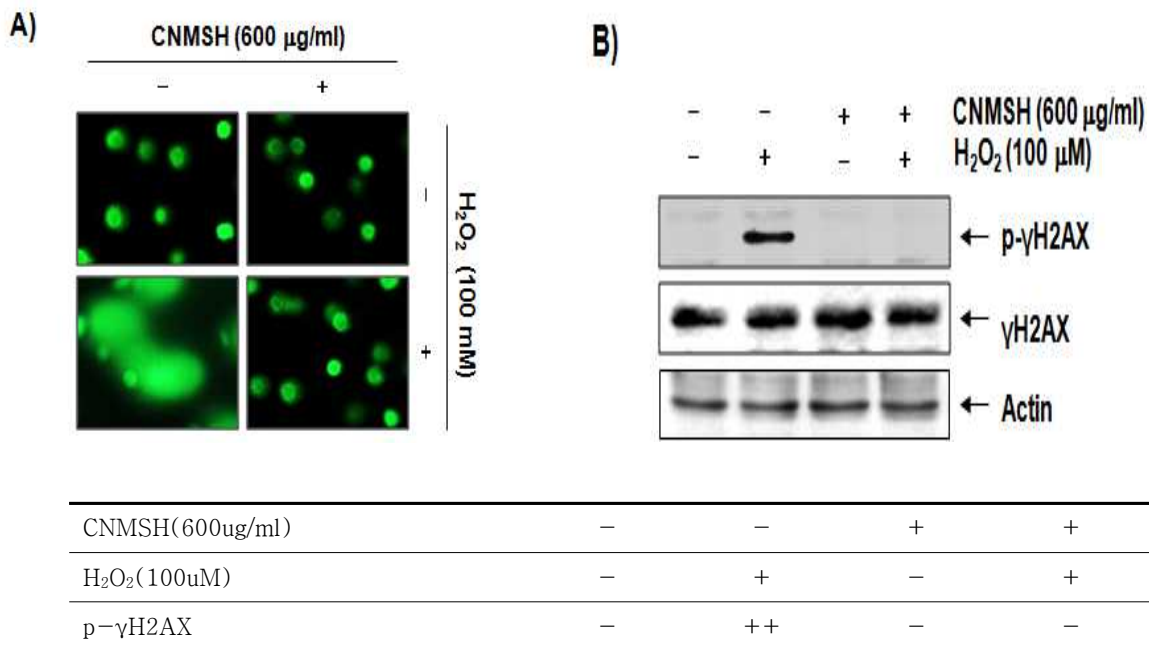
#### 3. 산화적 스트레스에 의한 SH-SY5Y 세포 DNA 손상에 미치는 청뇌명신환의 영향

청뇌명신환에 의한 SH-SY5Y 세포의 산화적 스트레스에 의한 보호 효과가 DNA 손상 차단효과와 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 Comet assay 및 Western blot analysis를 실시하였다. 이를 위하여 SH-SY5Y

세포에 100  $\mu$ M의  $H_2O_2$ 를 처리하기 1시간 전에 600  $\mu$ g/ml의 청뇌명신환을 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 먼저 Figure 2A에 나타낸 바와 같이,  $H_2O_2$ 만을 단독 처리하였을 경우 DNA 손상을 의미하는 tail moment의 생성<sup>21,22</sup>이 매우 증가되었다. 그러나 청뇌명신환 단독 처리군에서는 이러한 현상이 관찰되지 않았으며, 오히려

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 tail moment의 생성을 거의 완벽하게 차단시켰다. 이는 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상을 차단시켰음을 의미하며, 이를 재확인하기 위한  $\gamma$ H2AX 단백질의 인산화(p- $\gamma$ H2AX) 여부에 미치는 청뇌명신환의 영향을 조사하였다.  $\gamma$ H2AX 단백질은 DNA 이중 나선이 산화적 스트레스에 의하여 절단되었을 경우 인산화형의 발현이 증가하기 때문에 Comet assay와 함께 DNA 손상 여부를 확인할 수 있는 대표적인 biomarker 이다<sup>23</sup>. Figure 2A와 동일한 조건에서 배양된 세포의 단백질을 분리하여 Western blot analysis를 실시한 결

과는 Figure 2B에 제시하였으며, 결과에서 알 수 있듯이 SH-SY5Y 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 단독 처리하였을 경우  $\gamma$ H2AX 단백질의 인산화가 매우 증가되어 DNA 이중 나선의 절단이 매우 광범위하게 발생하였음을 알 수 있었다. 그러나 인산화된  $\gamma$ H2AX의 발현은 청뇌명신환이 선처리된 조건에서 배양된 SH-SY5Y 세포에서는 관찰되지 않았으며, 청뇌명신환 단독 처리군에서도  $\gamma$ H2AX의 인산화는 관찰되지 않았다. 이는 청뇌명신환이 산화적 스트레스에 의한 DNA 이중 나선의 절단을 효과적으로 차단하였음을 의미하는 것이다.



**Figure 2.** Protection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage by CNMSH in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were pretreated with 600 µg/ml CNMSH for 1 h and then incubated with or without 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. (A) To detect cellular DNA damage, the comet assay was performed and representative pictures of the comets were taken using a fluorescence microscope (original magnification, 200×). (B) The cells were lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with specific antibodies against  $\gamma$ H2AX and p- $\gamma$ H2AX, and the proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

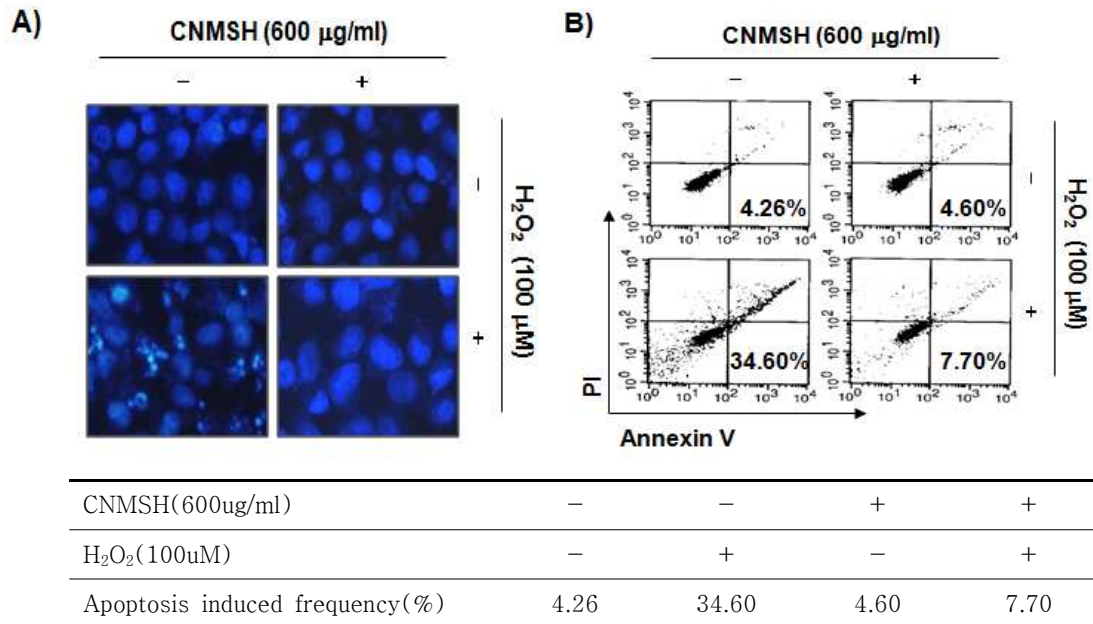
#### 4. 산화적 스트레스에 의한 SH-SY5Y 세포 apoptosis 유발에 미치는 청뇌명신환의 영향

산화적 스트레스는 DNA 손상을 야기 시킴으로서 세포의 죽음을 유발하는 것으로 잘 알려져 있으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 산화적 스트레스에 의한 세포의 죽음은 프로그래밍된 세포 사멸의 일종인 apoptosis 과정을

통하여 일어난다고 알려져 있다<sup>24</sup>. 따라서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 DNA 손상 및 세포 증식 억제가 apoptosis 과정을 통하여 유발하는지를 확인하고, 이러한 과정을 청뇌명신환이 억제할 수 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 apoptosis가 일어났을 경우 관찰되는 대표적인 현상 중의 하나인 핵 내 chromatin의 응축에 따른

apoptotic body의 형성 및 flow cytometry analysis에 의한 apoptosis 유발에 대한 정량적 비교를 실시하였다. 먼저 DAPI 용액에 의한 SH-SY5Y 세포 핵의 형태적 변화 관찰 결과에 의하면, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군에서는 전형적인 apoptosis 유발 과정에서 관찰되는 형태적 변화가 동반되었음을 알 수 있었고, 이러한 apoptosis 유발을 대변하는 핵의 형태적 변화가 청뇌명신환의 전 처리군에서는 거의 관찰되지 않았다(Figure 3A). 이러한 청뇌명신환의 apoptosis 억제 효능을 정량적으로 분석하기 위하여 annexin V-FITC/PI 염색을 이용한 flow cytometry 분석을 실시한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 처리된 배지에서 24 시간 동안 배양된 SH-SY5Y 세포에서는

약 34.60%에 해당되는 세포에서 apoptosis가 유발되었음을 확인하였다. 아울러 청뇌명신환 단독 처리군에서의 apoptosis 유발 빈도(V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> 빈도)는 대조군의 수준(4.26%)과 유사하였으며(4.60%), 청뇌명신환이 동시 처리된 세포에서 apoptosis 유발 빈도는 7.70% 정도로 나타나 청뇌명신환이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 apoptosis 유발을 효과적으로 차단하였음을 알 수 있었다(Figure 3B). 이는 청뇌명신환이 산화적 스트레스에 의한 SH-SY5Y 세포의 apoptosis를 효율적으로 억제하였으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 DNA 손상의 차단에 따른 세포증식률 회복과 연관성이 있음을 의미하는 것이다.



**Figure 3.** Attenuation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis by CNMSH in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were pretreated with 600 μg/ml CNMSH for 1 h and then stimulated with or without 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. (A) The cells were fixed and stained with DAPI solution. After 15 min incubation at room temperature, stained nuclei were observed using a fluorescence microscope (original magnification, 400x). (B) The cells were stained with FITC-conjugated Annexin-V and PI for flow cytometry analysis. The percentages of apoptotic cells were determined by counting the percentage of Annexin V-positive cells. Each point represents the mean of two independent experiments.

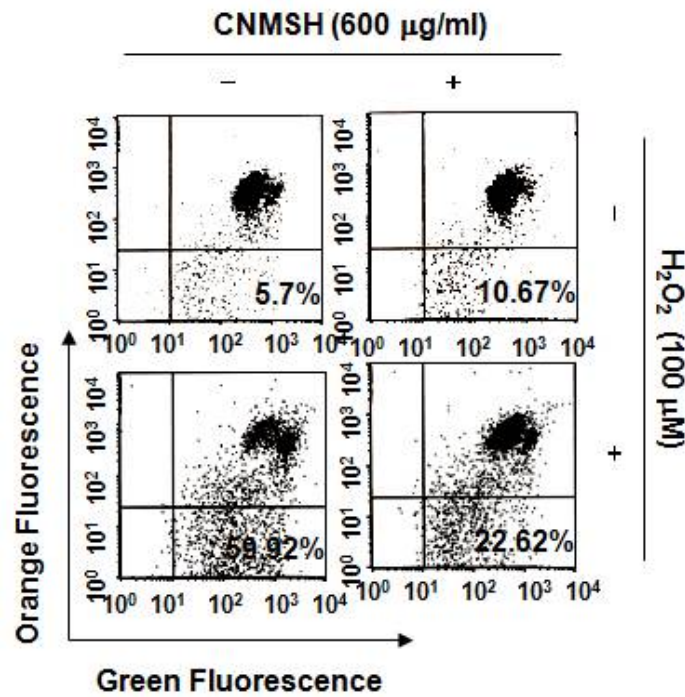
**5. 산화적 스트레스에 의한 SH-SY5Y 세포의 미토콘드리아 기능 손상에 미치는 청뇌명신환의 영향**  
세포 내 소기관 중, 미토콘드리아는 산화적 손상에 노출될 경우, 손상된 세포의 제거 목적으로 apoptosis

를 유발하며, 이는 미토콘드리아의 기능 손상과 연계성을 가진다<sup>25,26</sup>. 따라서 이상에서 확인된 청뇌명신환의 산화적 스트레스에 의한 apoptosis 차단 효과가 미토콘드리아 기능 손상의 회복에 따른 것인지의 여부를



조사하였다. 이를 위하여 미토콘드리아 기능 손상에 따른 apoptosis 유발 과정에 동반되는 MMP의 소실 정도를 JC-1 염색에 의한 flow cytometry 분석을 통하여 조사하였다. Figure 4의 결과에서 알 수 있듯이, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군에서 MMP 소실 정도는 약 58.92% 정도로 관찰되었으며, 청뇌명신환이 전처리된 SH-SY5Y

세포에서는 22.62%로 나타나 MMP의 소실을 효과적으로 억제하였음을 확인하였다. 이는 청뇌명신환이 산화적 스트레스에 의한 SH-SY5Y 세포의 apoptosis 억제 효능이 미토콘드리아 기능 손상의 방어와 연관이 있음을 의미하는 결과이다.



|                                       |     |       |       |       |
|---------------------------------------|-----|-------|-------|-------|
| CNMSH(600ug/ml)                       | -   | -     | +     | +     |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100uM) | -   | +     | -     | +     |
| MMP in degree of extinction(%)        | 5.7 | 58.92 | 10.67 | 22.62 |

**Figure 4.** Inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mitochondrial dysfunction by CNMSH in SH-SY5Y cells. Cells were pretreated with 600 µg/ml CNMSH for 1 h and then stimulated with or without 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. The values of MMP were evaluated using a flow cytometer. The data represent the average of two independent experiments.

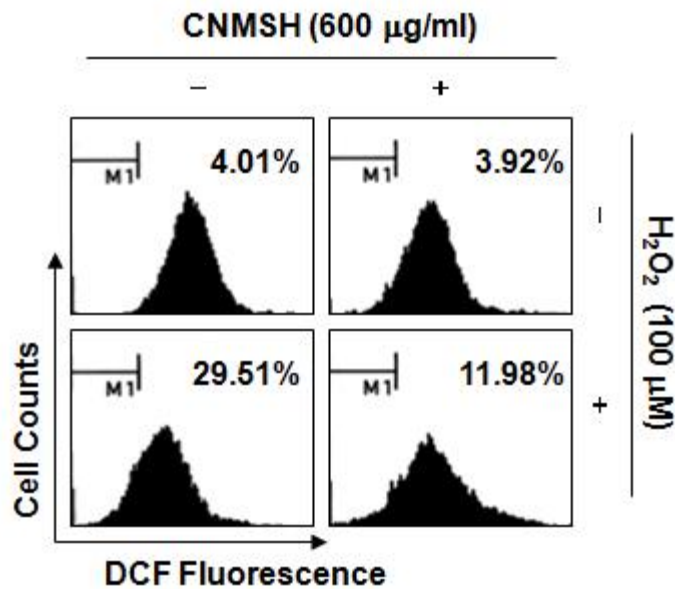
### 6. 산화적 스트레스에 의한 SH-SY5Y 세포의 ROS 생성에 미치는 청뇌명신환의 영향

전술한 결과에서 청뇌명신환이 산화적 스트레스에 노출된 SH-SY5Y 세포의 apoptosis 유발 억제 효과가 미토콘드리아 기능 보호와 연관성이 있는 것으로 확인되었기에, 이러한 현상이 청뇌명신환의 ROS 생성 직접 차단에 의한 것인지를 여부를 조사하였다. 이를

위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 ROS의 생성 차단 여부를 DCF-DA 염색을 통한 flow cytometry 분석을 통하여 조사하였다. Figure 5에 나타낸 바와 같이, 100 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 30분 동안 처리된 SH-SY5Y 세포에서 ROS의 생성이 정상배지에서 배양된 세포에 비하여 약 7.4배 증가되었음을 알 수 있었다. 그러나 청뇌명신환이 전처리된 조건에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 처리된 세포에서는

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군에 비하여 약 60% 정도의 ROS 생성 억제 효능을 나타내었다. 따라서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 청뇌명신환의 미토콘드리아 기능 보호에 따른 apoptosis

유발 억제는 ROS 생성의 차단과 연관성이 있음을 알 수 있었다.



|                                       |      |       |      |       |
|---------------------------------------|------|-------|------|-------|
| CNMSH(600ug/ml)                       | -    | -     | +    | +     |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100uM) | -    | +     | -    | +     |
| Creation inhibition in ROS(%)         | 4.01 | 29.51 | 3.92 | 11.98 |

**Figure 5.** Effects of CNMSH on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced ROS generation in SH-SY5Y cells. Cells were pretreated with 600 µg/ml CNMSH for 1 h and then stimulated with or without 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min. The cells were incubated at 37°C in the dark for 20 min with culture medium containing 10 µM DCF-DA to monitor ROS production. ROS generation was measured by flow cytometry. The data represent the average of two independent experiments.

### 7. 산화적 스트레스에 의한 SH-SY5Y 세포의 caspase-3 활성에 미치는 청뇌명신환의 영향

SH-SY5Y 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 산화적 스트레스에 의한 ROS의 생성과 동반된 apoptosis의 유발은 일반적으로 미토콘드리아 기능 손상과 연계된 intrinsic apoptosis 경로를 통하여 이루어진다<sup>27,28</sup>. Intrinsic apoptosis 경로의 활성을 통한 apoptosis의 유도를 위해서는 MMP의 소실과 동반된 intrinsic apoptosis 경로의 initiator caspase에 해당되는 caspase-9의 활성에 의한 effector caspase인 caspase-3 또는 caspase-7의 활성이 증가되어야 한다<sup>29,30</sup>. 따라서 청뇌명신환의 신경세포 보호 효과가 이러한 caspase cas

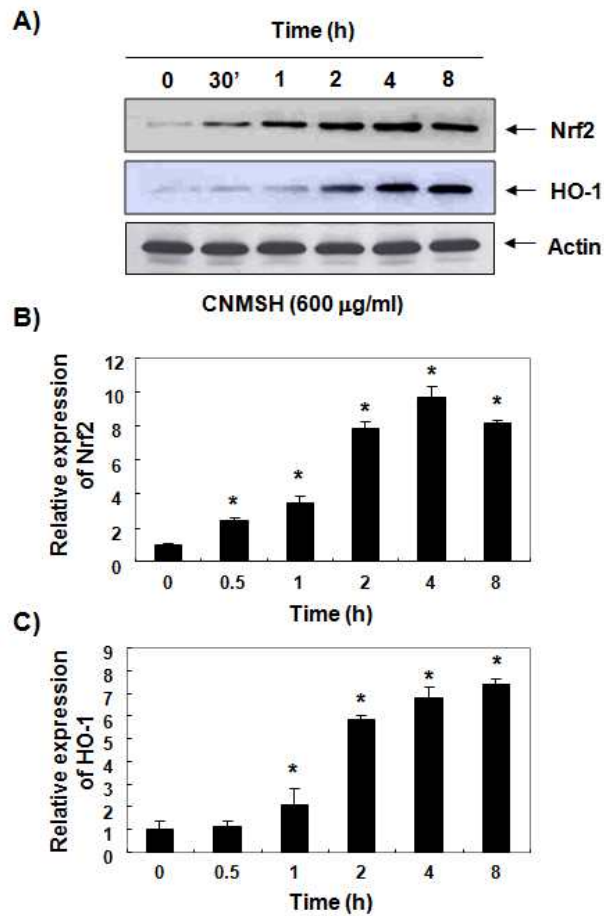
cade의 경로 차단에 의한 것인지의 여부를 조사하기 위하여 대표적인 effector caspase인 caspase-3의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Figure 6A에 나타난 바와 같이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 단독 처리된 배지에서 배양된 SH-SY5Y 세포의 경우 비활성인 pro-caspase-3의 발현이 감소되면서 active-caspase-3의 발현이 증가되었다. 그러나 청뇌명신환이 전처리된 배지에서 배양된 SH-SY5Y 세포의 경우의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 증가한 active-caspase-3의 발현의 청뇌명신환 처리농도의 증가에 따라 감소되었으며, pro-caspase-3의 발현도 정상 배지에서 배양된 세포수준으로 회복되었음을 알 수 있었다.



### 9. SH-SY5Y 세포에서 Nrf2 및 HO-1의 발현에 미치는 청뇌명신환의 영향

최근 많은 선행연구들에서 Nrf2/HO-1 신호 경로의 활성화는 세포내 산화적 스트레스 제거와 세포 방어 기작으로 중요한 역할을 하고 있음이 알려져 왔으며, 이 신호계의 활성화 유도를 위한 신규 물질의 발굴은 산화적 퇴행성 질환뿐 만 아니라 암을 포함한 다양한 질환의 예방과 치료에 유용하게 적용될 수 있다<sup>11,16,19,35</sup>. 따라서 청뇌명신환의 산화적 스트레스 억제 효능과 Nrf2/HO-1 신호계의 연관성을 조사하기 위하여 청뇌명신환이 첨가된 배지에서 배양된 SH-SY5Y 세포의 단백질을 분리하여 Nrf2 및 HO-1의 발현 증가 여부

를 조사하였다. Figure 7에 제시된 Western blot 분석의 결과에서 알 수 있듯이 청뇌명신환 처리 30분 이내에 Nrf2의 발현이 증가되기 시작하였으며, 4시간 경과 후 최고 높은 발현 경향성을 보였다. 그리고 HO-1의 경우는 청뇌명신환 처리 2시간부터 급격한 발현의 증가를 보였으며, 이러한 두 단백질의 발현에 대한 시간적 차이는 아마도 Nrf2 발현 증가가 HO-1의 전사활성을 촉진하였을 것으로 추측된다. 이러한 청뇌명신환 처리에 따른 Nrf2/HO-1 신호계의 활성화는 산화적 스트레스에 대한 SH-SY5Y 세포의 방어시스템으로 그 역할을 하였을 것으로 추정된다.



**Figure 7.** Induction of Nrf2 and HO-1 expression by CNMESH in SH-SY5Y cells. Cells were incubated with 600 µg/ml of CNMESH for the indicated periods. (A) Total cellular proteins were separated on SDS-polyacrylamide gels and then transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the specified antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control of total cellular and nuclear proteins. (B and C) The relative expression of Nrf2 (B) and HO-1 (C) represent the average densitometric analyses as compared with actin.



#### IV. 고찰

최근 고령화에 따른 급속한 증가 추세를 보이는 신경 퇴행성 장애 질환의 예방 및 치료를 위한 한약 복합 처방전 개발의 일환으로 신경세포 모델을 이용하여 청뇌명신환의 항산화 효능을 평가하였다. 본 연구에 사용된 청뇌명신환은 동의대학교 부속 한방병원 신계내과에서 기억력 증진 및 치매 예방을 위한 목적으로 개발된 환약이다. 청뇌명신환은 元代 危亦林이 황제께 진상한 拱辰丹을 근간으로 하여 麝香, 鹿茸, 當歸 등을 주제로 하였으며, 拱辰丹의 山茱萸를 山藥으로 바꾸었고, 본방에 人蔘, 肉桂, 附子, 龍眼肉, 遠志, 沈香, 龍腦를 추가하여 구성된 처방이다. 처방의 구성원리를 살펴보면 개별약재의 효능에서 山茱萸는 性味가 酸, 微溫하여 補益肝腎. 澁精, 斂汗하는 효력과 正氣, 津液을 收斂하는 의미가 강하고 山藥은 性이 溫無毒하고 味는 苦甘하여 脾腎經에 歸經하여 補脾益胃, 燥濕 和中하는 효능이 있어, 脾胃氣弱, 不思飲食, 倦怠少氣, 泄瀉, 痰飲 등을 치료하는데 현대인들의 위장운동의 부담을 덜어 주기 위하여 山茱萸를 山藥으로 바꾸었다. 人蔘, 肉桂, 附子は 전신 기능 활성화를 목적으로 추가하였으며, 龍眼肉, 遠志, 沈香, 龍腦 등은 뇌의 기능을 활성화하여 정신적인 스트레스로 생긴 기억력감퇴 및 치매예방을 목적으로 추가하였다. 선행연구에 의하면 청뇌명신환은 그람음성세균 표층의 peptide glycan을 둘러싸는 외막의 중요 구성성분인 지질다당류(lipopolysaccharide)에 의해 활성화된 BV2 미세아교세포에서 증가된 염증성 매개인자(PGE<sub>2</sub> 및 NO) 및 사이토카인(IL-1β)의 억제효과를 나타낸 바 있다<sup>20</sup>. 이는 세포 내 주요 신호 전달체인 nuclear factor-κB (NF-κB), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 및 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 신호계의 조절을 통하여 이루어지고 있음을 보고한 바 있다. 이러한 항염증 효과는 퇴행성 뇌 질환의 중요한 원인이 되는 만성적인 신경계 염증을 억제함으로써 다양한 신경계 질환에서 신경보호역할을 할 것으로 기대되었다. 따라서 본 연구에서는 청뇌명신환의 신경 퇴행성 장애 질환극복을 위한 신경보호 효과에 대한 추가적인 자료를 제시하기 위하여 산화적 스트레스로부터 신경세포의 보호 효능 여부를 조사하였다. 이를 위하여 SH-SY5Y 신경세포를 대상으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였다. 본

연구의 결과에 의하면 청뇌명신환은 세포독성을 보이는 않는 범위의 농도 조건에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의하여 억제되었던 SH-SY5Y 세포의 증식을 유의적으로 회복시켰으며, 이는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 유도된 DNA 손상과 apoptosis 억제에 의한 것임을 알 수 있었다. 아울러 청뇌명신환은 SH-SY5Y 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리에 의해 증가된 ROS의 생성을 억제하였으며, 이는 미토콘드리아 기능 활성을 회복과 연관성이 있었다.

이미 잘 알려진 바와 같이 신경세포에서 과다한 ROS의 생성은 신경세포의 죽음을 유발함으로써 대뇌 기능 장애를 촉진시켜 신경 퇴행성 장애 질환의 개시와 진행에 직접적인 영향을 미친다. 그러나 정상적인 생리학적 조건에서 신경세포를 포함한 대부분의 세포는 superoxide dismutase, catalase, thioredoxin reductase 및 glutathione reductase 등과 같은 내생적 산화 방지제 시스템(endogenous antioxidant system)에 포함되어 있는 다양한 항산화 효소들의 기본적인 활성에 의하여 산화적 스트레스로부터 보호받을 수 있다<sup>36,37</sup>. 그러나 이러한 시스템의 항산화적 용량이 초과할 경우나 이 시스템이 손상을 받았을 경우에는 ROS에 의한 산화적 스트레스가 유발될 것이다. ROS의 축적은 핵산의 손상, 단백질의 산화적 변성, 세포막 지질의 과산화 등과 함께 염증성 사이토카인의 방출을 촉진시켜 조직에 손상을 일으키고 세포의 죽음을 유도한다<sup>8,9</sup>. 본 연구에서는 산화적 스트레스에 의하여 일어난 SH-SY5Y 세포의 DNA 손상에 미치는 청뇌명신환 영향을 조사하기 위하여 먼저 단일 세포 전기영동법(single cell gel electrophoresis)인 Comet assay를 실시하였다. Comet assay는 DNA 손상을 야기하는 어떤 약물 처리나 조건에서 세포가 손상되면 DNA 가닥이 절단되어 파편이 떨어져 나오는 정도를 전기영동을 이용하여 감지하는 방법이다. 핵을 중심으로 손상된 DNA를 의미하는 파편의 양이 많을수록 DNA의 손상(tail moment)이 큰 것임을 시각적으로 쉽게 알 수 있는 방법이다<sup>22,21</sup>. Figure 2A의 결과에서 알 수 있듯이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 단독 처리된 SH-SY5Y 세포에서는 DNA의 손상을 의미하는 tail moment의 길이가 현저하게 증가하였음을 알 수 있었으며, 이러한 현상이 정상 배지 또는 청뇌명신환을 단독으로 처리한 배지에서 배양된 SH-SY5Y 세포에서는 관찰되지 않았다. 그러나 청뇌명신환을 전처리한 후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 노출시킨 SH-SY5Y 세포에서는 tail moment의 길이가 현저

하게 줄어들어 대조군 수준과 거의 유사하였다. 또한 단백질 발현 수준에서 DNA 손상을 검출할 수 있는 방법 중의 하나가 히스톤 단백질의 하나인  $\gamma$ H2AX 단백질 중 139번째 아미노산인 serine의 인산화 여부이다.  $\gamma$ H2AX의 인산화는 DNA 이중 나선 절단(DNA double strand breaks)과 동반되어 나타나는 현상으로 DNA 손상 여부를 간접적으로 감지할 수 있는 방법이다<sup>23</sup>. 본 연구의 결과에 의하면  $H_2O_2$ 가 단독 처리된 SH-SY5Y 세포에  $\gamma$ H2AX 단백질 전체에 대한 발현 변화는 없었으나 인산화된 단백질 band가 매우 증가하였으며(Figure 2B), 정상 배지 또는 청뇌명신환을 단독으로 처리한 배지에서 인산화된  $\gamma$ H2AX의 발현이 검출되지 않았다. 그러나  $H_2O_2$ 와 청뇌명신환이 동시에 처리된 조건에서 배양된 세포에서도  $\gamma$ H2AX 단백질의 인산화가 검출되지 않았다. 이러한 현상은 Comet assay에서 관찰된 결과인 산화적 스트레스로부터의 DNA 손상을 청뇌명신환이 차단하였다는 결과와 잘 일치되었다. 따라서 Figure 1B에서 관찰된 청뇌명신환의 산화적 스트레스에 의한 SH-SY5Y 세포 증식의 억제 차단 효과는 DNA 손상 보호 효과에 따른 결과임을 알 수 있었다.

일반적으로 산화적 스트레스에 의한 세포의 죽음은 necrosis 또는 apoptosis 유도에 의하여 일어날 수 있지만<sup>4,10</sup>,  $H_2O_2$ 와 같은 산화적 스트레스에 의한 세포의 죽음은 일반적으로 apoptosis 과정을 경유하는 경우가 대부분이다<sup>24</sup>. Apoptosis에 의한 세포의 죽음은 세포의 위축(cell shrinkage)이나 DNA 응축(DNA condensation)과 같은 형태적 변화의 동반을 특징적으로 가지고 있으며, 이러한 현상은 염색체 DNA (chromosomal DNA)의 분해를 유발하여 궁극적으로 세포의 죽음을 유도한다. 청뇌명신환의 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상의 차단에 따른 세포증식율의 회복이 apoptosis 유발 억제와 연관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 핵 DNA에 특이적으로 염색되는 형광물질인 DAPI 용액을 이용한 형광 현미경적 세포 형태 비교를 실시하였다. 이를 위하여  $H_2O_2$ 와 청뇌명신환의 단독 또는 복합 처리된 배지에서 배양된 세포들을 대상으로 핵의 형태적 변화를 조사한 결과,  $H_2O_2$ 가 단독으로 처리된 배지에서 배양된 SH-SY5Y 세포에서는 apoptosis 유발을 의미하는 DNA 응축에 따른 apoptotic body의 형성이 매우 증가하였음을 알 수 있었으나, 청뇌명신환이 동시에 처리된 조직에서 배양된 세포에서는 정상

배지 및 청뇌명신환 단독 처리된 배지에서 배양된 세포에서와 같이 이러한 형태적 변형이 관찰되지 않았다(Figure 3A). 따라서 apoptosis 유발 억제에 대한 정량적 평가를 실시하기 위하여 동일 조건에서 배양된 세포들을 대상으로 annexin V-FITC와 PI 동시 염색을 실시하여 flow cytometry 분석을 실시하였다. Figure 3B의 결과에서 알 수 있듯이,  $H_2O_2$ 가 단독으로 처리된 SH-SY5Y 세포에서의 apoptosis 유발 빈도는 정상 배지에서 배양된 세포에 비해 8배 이상 증가되었으나, 청뇌명신환의 복합 처리군에서는 apoptosis가 유발된 세포의 빈도가 현저하게 감소되어, DAPI 염색에 의한 결과를 잘 뒷받침하여 주고 있음을 알 수 있었다. 따라서 청뇌명신환의 산화적 스트레스 보호 효과는 DNA 손상 차단에 따른 apoptosis 유도 억제에 의하여 나타난 현상임을 알 수 있었다.

한편 apoptosis의 유도 기전에 대한 다양한 분류가 시도되고 있으나, 일반적으로 세포막에 존재하는 death receptor (이하 DR)와 해당 DR 특이적 death legend와의 결합으로 개시되는 DR-mediated extrinsic apoptosis 경로와 mitochondria를 중심으로 apoptosis가 활성화되는 mitochondria-mediated intrinsic apoptosis 경로로 대별된다<sup>38,39</sup>. 또한 apoptosis 유발에 핵심적으로 관여하는 cystein-containing aspartate-specific protease family에 속하는 caspase protease는 initiator caspase와 effector caspase로 분류된다<sup>40,41</sup>. 그중 caspase-8은 DR과 death legend와의 결합에 따른 extrinsic apoptosis 경로의 시작과 동시에 활성이 증대되며<sup>38,42</sup>, caspase-9는 mitochondria 막전위 변화에 따른 apoptosis 유도 인자들에 의하여 활성화된다<sup>29,30</sup>. 따라서 caspase-8과 -9의 활성 증가는 extrinsic 및 intrinsic apoptosis 경로의 활성을 대별해 줄 수 있는 효소로 활용될 수 있다. 이러한 initiator caspase의 활성 증가는 caspase-3 및 -7과 같은 effector caspase의 활성을 유도하여 apoptosis의 완결을 위한 다양한 기질 단백질의 분해를 촉진하는 caspase cascade를 형성한다<sup>31</sup>. 따라서  $H_2O_2$  처리에 따른 SH-SY5Y 세포의 apoptosis 유발에는 mitochondria에서 ROS 생성의 증가가 원인이 되는 intrinsic apoptosis 경로가 관여할 것으로 기대되어 mitochondria 막전위 변화를 조사하였다. Figure 4에서 나타난 결과에서 알 수 있듯이  $H_2O_2$ 가 단독으로 처리된 SH-SY5Y 세포에서 MMP



소실의 정도가 정상 배지에서 배양된 세포의 비하여 10배 이상 증가되었으나, 청뇌명신환의 복합 처리군에서는 현저하게 감소되었다. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의하여 증가된 ROS의 생성이 청뇌명신환에 의하여 매우 감소되었다(Figure 5). 이러한 결과는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 처리된 SH-SY5Y 세포에서 ROS생성에 의한 미토콘드리아 기능 소실을 청뇌명신환이 차단함으로써 intrinsic apoptosis 경로 활성을 억제하여 세포의 생존을 증대시킨 것으로 해석할 수 있다.

아울러 ROS의 생성 증가에 따른 intrinsic apoptosis 경로가 활성화될 경우, caspase cascade의 경로를 통하여 caspase-3/-7과 같은 effector caspase가 활성화되면, PARP와 같은 표적 기질 단백질의 분해와 DNA의 분절화를 유도하여 apoptosis를 완결시킨다<sup>31,32</sup>. 특히 PARP는 정상세포의 DNA 수복이나 유전자 안정성 유지에 중요한 역할을 하며, apoptosis 유발시 caspase-3에 의해 분해가 일어나면 이러한 회복 기능이 상실되며 DNA 분절화와 함께 apoptosis가 일어난 세포에서 관찰이 된다<sup>43</sup>. Figure 6에 제시한 결과에서 알 수 있듯이 청뇌명신환은 SH-SY5Y 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 유도된 caspase-3의 활성을 억제하였을 뿐만 아니라 PARP의 단편화 및 DNA 분절화를 효과적으로 차단하였다. 이는 산화적 스트레스에 의한 SH-SY5Y 세포의 intrinsic apoptosis 유도 활성 경로<sup>27,28</sup>를 청뇌명신환이 억제함으로써 세포사멸로부터 보호 효과가 있음을 보여주는 결과이다.

한편 혈색소(hemoglobin) 한 분자는 heme 네 분자와 globin 한 분자로 구성되어 있는데, HO는 heme의 분해에 관여하는 효소이다. 즉 HO는 heme의 이화작용(catabolism) 속도 결정단계에 작용하는 효소로서, 반응산물로 carbon, monoxide (CO), biliverdin 및 free ion (Fe<sup>2+</sup>)을 생성한다<sup>44</sup>. Heme은 다양한 활성 산소종의 생성을 증가<sup>45,46</sup>시키는 반면 HO는 heme를 분해시켜 그들의 산화적 능력을 감소시키며, 특히 분해 산물인 biliverdin은 biliverdin reductase에 의해 bilirubin으로 전환되어 활성 산소종을 제거시키는 강력한 항산화능을 가진다<sup>18,19,47</sup>. 현재까지 HO는 3가지의 서로 다른 유전자에 의하여 발현이 조절되는 이형체(HO-1, HO-2 및 HO-3)로 구성되어 있으며, 특히 HO-1은 유도성 이형체로서 신경 조직 및 다양한 세포에서 강력한 항산화 효능을 보임으로서 다양한 산화적 스트레스에서 세포를 보호하는 생체방어기능 핵심

효소로 작용을 한다<sup>48,49</sup>. HO-1 유전자 발현은 다양한 전사인자들에 의해 조절되고 있으며, 그 중에 가장 대표적 전사인자가 Nrf2이며, Nrf2는 산화-환원 감수성 전사인자(redox-sensitive transcription factor)로써 다양한 항산화효소 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다<sup>14,15</sup>. Nrf2는 보통 세포질 내에서 Keap1과 복합체를 이루고 있지만, Nrf2의 활성 신호에 의하여 Keap1과 분리되어 핵 속으로 이동하여 해당 유전자 promoter의 ARE 자리에 결합한다. 이러한 신호는 HO-1 이외에도 NAD(P)H:quinone oxidoreductase, glutathione S transferase,  $\gamma$ -glutamate cystein ligase 등과 같은 다양한 항산화 효소들의 전사 활성을 증가시킨다. 따라서 Nrf2의 활성화를 통한 HO-1 발현 증대는 세포내 항산화방어를 위한 중요한 신호 기전으로 인식되어지고 있다<sup>13,16</sup>. 본 연구에서 관찰된 청뇌명신환의 산화적 스트레스에 대한 강력한 방어 작용이 이러한 Nrf2/HO-1 신호 전달계의 활성화와 연관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 청뇌명신환이 처리된 SH-SY5Y 세포를 대상으로 Nrf2 및 HO-1의 발현 정도를 조사한 결과, 청뇌명신환은 HO-1의 발현 뿐만 아니라 Nrf2의 발현도 매우 촉진시켰음을 확인할 수 있었다(Figure 7). 특히 두 단백질의 발현의 시간적 차이를 비교할 경우, Nrf2의 발현이 우선적으로 유도되었으며, 뒤이어 HO-1의 발현이 증가되어 Nrf2의 존재적 HO-1 발현의 증가 가능성이 매우 높을 것으로 추정된다. 아울러 청뇌명신환의 항산화 효능은 아마도 Nrf2/HO-1 신호 경로의 활성화가 최소한 관여할 것으로 생각되며 이에 관한 후속 연구가 이루어져야 할 것이다.

## V. 결론

이상의 연구결과를 요약해 보면 청뇌명신환은 산화적 스트레스에 의한 SH-SY5Y 신경세포에서의 ROS 생성을 차단함으로써 이와 연계된 미토콘드리아의 기능 손상을 억제하였음을 알 수 있었으며, 이러한 항산화 효능이 미토콘드리아가 매개된 intrinsic apoptosis를 효과적으로 차단하였음을 의미한다. 아울러 청뇌명신환에 의한 Nrf2/HO-1 신호계의 활성화는 청뇌명신환 자체가 신경세포의 내재적 항산화 시스템을 강화시켜 산화적 스트레스로부터 세포를 보호할 것으로 추정된다. 따라서 청뇌명신환의 신경세포에 대한 항산화

효능은 퇴행성 뇌질환의 중요한 원인이 되는 만성적인 산화적 스트레스를 억제함으로써 신경 퇴행성 장애 질환을 포함한 다양한 신경계 질환의 예방 또는 개선 효과가 있을 것으로 기대된다.

## References

1. Coppedè F. The potential of epigenetic therapies in neurodegenerative diseases. *Front Genet* 2014; 5: 220.
2. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5: 525-535.
3. Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 2004; 10: S2-9.
4. Calabrese V, Cornelius C, Mancuso C, Lentile R, Stella AM, Butterfield DA. Redox homeostasis and cellular stress response in aging and neurodegeneration. *Methods Mol Biol* 2010; 610: 285-308.
5. Ghosh N, Ghosh R, Mandal SC. Antioxidant protection: A promising therapeutic intervention in neurodegenerative disease. *Free Radic Res* 2011; 45: 888-905.
6. Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Curr Med Chem* 2010; 17: 3262-3288.
7. Guerra-Araiza C, Álvarez-Mejía AL, Sánchez-Torres S, Farfan-García E, Mondragón-Lozano R, Pinto-Almazán R, Salgado-Ceballos H. Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. *Free Radic Res* 2013; 47: 451-462.
8. Wang CH, Wu SB, Wu YT, Wei YH. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 2013; 238: 450-460.
9. Wu YT, Wu SB, Lee WY, Wei YH. Mitochondrial respiratory dysfunction-elicited oxidative stress and posttranslational protein modification in mitochondrial diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1201: 147-156.
10. Rego AC, Oliveira CR. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 2003; 28: 1563-1574.
11. Saso L, Firuzi O. Pharmacological applications of antioxidants: lights and shadows. *Curr Drug Targets* 2014; 15: 1177-1199.
12. Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 41: 251-260.
13. Zhang Y and Gordon GB: A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 885-893.
14. Kaspar JW, Niture SK and Jaiswal AK: Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 1304-1309.
15. Niture SK, Khatri R and Jaiswal AK: Regulation of Nrf2 - an update. *Free Radic Biol Med* 2014; 66: 36-44.
16. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med* 2008; 74: 1526-1539.
17. Qaisiya M, Coda Zabetta CD, Bellarosa C, Tiribelli C. Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation *via* Nrf2 pathway. Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation *via* Nrf2 pathway. *Cell Signal* 2014; 26: 512-520.
18. Ambegaokar SS, Kolson DL. Heme oxygenase-1 dysregulation in the brain: implications for HIV-associated neurocognitive disorders. *Curr HIV Res* 2014; 12: 174-188.
19. Jazwa A, Cuadrado A. Targeting heme oxygenase-1 for neuroprotection and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets*





- 2010; 11: 1517–1531.
20. Im YK, Choi YH, Hwang WD. Anti-inflammatory effects of CheongNoiMyungShin-Hwan in microglia cells. *J Ori Neuropsychiatry* 2014; 25: 423–433.
  21. Osman AG, Mekkawy IA, Verreth J, Wuertz S, Kloas W, Kirschbaum F. Monitoring of DNA breakage in embryonic stages of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) after exposure to lead nitrate using alkaline comet assay. *Environ Toxicol* 2008; 23: 679–687.
  22. Collins AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840: 794–800.
  23. Garcia-Canton C, Anadón A, Meredith C.  $\gamma$  H2AX as a novel endpoint to detect DNA damage: applications for the assessment of the *in vitro* genotoxicity of cigarette smoke. *Toxicol In Vitro* 2012; 26: 1075–1086.
  24. Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 157–170.
  25. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 222–230.
  26. Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 2006; 5: 145–152.
  27. Tian X, Guo LP, Hu XL, Huang J, Fan YH, Ren TS, Zhao QC. Protective effects of *Arctium lappa* L. roots against hydrogen peroxide-induced cell injury and potential mechanisms in SH-SY5Y cells. *Cell Mol Neurobiol* 2015; 35: 335–344.
  28. Pan LL, Liu XH, Jia YL, Wu D, Xiong QH, Gong QH, Wang Y, Zhu YZ. A novel compound derived from danshensu inhibits apoptosis *via* upregulation of heme oxygenase-1 expression in SH-SY5Y cells. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 2861–2871.
  29. Asakura T, Ohkawa K. Chemotherapeutic agents that induce mitochondrial apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 577–590.
  30. Jourdain A, Martinou JC. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1884–1889.
  31. Duriez PJ, Shah GM. 1997. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem Cell Biol* 1997; 75: 337–349.
  32. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly (ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 517–528.
  33. Eastman A. Assays for DNA fragmentation, endonucleases, and intracellular pH and  $Ca^{2+}$  associated with apoptosis. *Methods Cell Biol* 1995; 46: 41–55.
  34. Kyprianou N, English HF, Isaacs JT. Activation of a  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -dependent endonuclease as an early event in castration-induced prostatic cell death. *Prostate* 1998; 13, 103–117.
  35. Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, Immenschuh S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 1895–1903.
  36. McEligot AJ, Yang S, Meyskens FL Jr. Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annu Rev Nutr* 2005; 25: 261–295.
  37. Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; 5: 338–349.
  38. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25: 4798–4811.
  39. Lavrik IN. Systems biology of apoptosis signaling networks. *Curr Opin Biotechnol* 2010; 21: 551–555.
  40. Fiandalo MV, Kyprianou N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp Oncol* 2012; 34: 165–175.

41. Hensley P, Mishra M, Kyprianou N. Targeting caspases in cancer therapeutics. *Biol Chem* 2013; 394, 831-843.
42. Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 2000; 256: 58-66.
43. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselbrong S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998; 254, 439-459.
44. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med* 1970; 75: 410-421.
45. Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 290-302.
46. Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Droge W, Schmitz ML. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene* 1999; 18: 747-757.
47. Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16093-16098.
48. Chen J. Heme oxygenase in neuroprotection: from mechanisms to therapeutic implications. *Rev Neurosci* 2014; 25: 269-280.
49. Elbirt KK, Bonkovsky HL. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111: 438-447.