

## 산화 스트레스에 대한 진심유생환(오자연종환 가감방) 추출물의 세포 독성 보호 효과에 관한 연구

정유진 · 홍상훈 · 진명호\*

동의대학교 한의과대학 한방내과학교실

### Study of the Cytotoxic Protective Effects of *Jinsimyusaeng-hwan* (Modified *Ojayeonjong-hwan*) Against Oxidative Stress

Yujin Jung, Sanghoon Hong, Myungho Jin\*

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

#### Abstract

**Objectives :** This study was conducted to evaluate the cytotoxic protective effects of *Jinsimyusaeng-hwan* (Modified *Ojayeonjong-hwan*) against oxidative stress.

**Methods :** 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) radical scavenging activity and ferric reducing ability of plasma (FRAP) method were used to estimate the antioxidant activity of *Jinsimyusaeng-hwan*. C2C12 myoblasts were used to reevaluate the antioxidant effects. And apoptosis analysis, mitochondrial membrane potential analysis, measurement of intracellular reactive oxygen species levels were conducted to investigate antioxidant activity of *Jinsimyusaeng-hwan*.

**Results :** In comparison of DPPH free radical and ABTS cationic radical scavenging activity, it increased as the concentration of water extracts of *Jinsimyusaeng-hwan* (WEJ) and 70% ethanol extracts of *Jinsimyusaeng-hwan* (EEJ) increased. In the results of comparing the total phenol content and reducing power using the FRAP method, extracts with high total phenol content also showed high reducing power. In comparison of the protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in C2C12 myoblasts, WEJ had no significant effect, but the EEJ inhibited H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated cytotoxicity in a concentration-dependent manner. The cytotoxic protective effect of EEJ against oxidative stress in C2C12 myoblasts was correlated with their inhibitory effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis and cell cycle arrest. In H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated C2C12 myoblasts, the apoptosis inhibitory effects of EEJ were associated with suppression of mitochondrial dysfunction and DNA damage. The protective effect of EEJ against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in C2C12 myoblasts were directly related to the inhibition of ROS generation.

**Conclusion :** *Jinsimyusaeng-hwan* extracts have cytotoxic protective effects against oxidative stress, and it was better in 70% ethanol extract than in water extract.

**Key words :** *Jinsimyusaeng-hwan*, *Ojayeonjong-hwan*, Antioxidant, C2C12 myoblasts, Apoptosis, ROS

• 접수 : 2024년 6월 26일 • 수정접수 : 2024년 8월 6일 • 채택 : 2024년 8월 12일

• 이 논문은 2022학년도 동의대학교 대학원 한의학 박사학위 최종 논문임

\*교신저자 : 진명호, 부산시 부산진구 양정로 62 동의대학교부속한방병원

전화 : 051-850-8630, 팩스 : 051-867-5162, 전자우편 : jinmh@deu.ac.kr

## I. 서론

산화적 스트레스(oxidative stress)는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)과 같은 산화종(oxidizing species)의 세포 내 수준과 항산화 활성(antioxidant activity) 사이의 불균형으로 정의된다<sup>1)</sup>. 지속적인 산화적 스트레스는 DNA 수준과 단백질 수준에서 산화적 변형 또는 지질 과산화 손상을 일으켜 세포의 구조와 기능에 해로운 결과를 초래한다<sup>2)3)</sup>. 특히, ROS는 주로 미토콘드리아(mitochondria)에서 생성이 되며, ROS 축적은 미토콘드리아 기능 장애에 기여할 수 있다. ROS의 과잉 생산은 미토콘드리아 막의 투과성 변화에 따른 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)를 감소시킨다. 이로 인하여 미토콘드리아의 내막과 외막 사이에 존재하는 cytochrome c와 같은 세포사멸 촉진 인자들이 세포질로 방출되고 caspase cascade가 활성화되어 미토콘드리아-매개 세포사멸(mitochondria-mediated apoptosis)을 유도한다<sup>4)5)</sup>. 아울러 미토콘드리아의 기능 손상은 과도한 더 많은 ROS의 생산을 유발하며 세포사멸사의 가속화로 이어진다<sup>6)</sup>. 많은 선행 연구에서 산화적 스트레스 하에서 자유 라디칼(free radical)에 의한 다양한 세포 및 조직의 손상이 암, 당뇨병, 심혈관 질환, 염증성 장 질환, 알츠하이머 등을 포함한 다양한 질병의 발병 기전으로 확인되고 있다<sup>7)8)9)10)11)</sup>. 따라서 항산화 효능이 있는 성분이나 추출물의 발견 및 연관 기전 연구는 질병의 예방과 치료에서 아주 중요한 분야이다.

전통적으로 다양한 질환의 예방과 치료에 사용되어 온 복합 처방전 및 한약재 추출물의 약리학적 효능이 항산화 활성과 밀접한 관련성이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>12)13)14)</sup>. 오자연종환(五子衍宗丸, Ojajeonjong-hwan, OJYJH)은 명나라 시대의 장시철(張時徹)이 저술한 《攝生衆妙方》에 처음 수록된 처방으로 枸杞子, 菟絲子, 覆盆子, 車前子, 五味子の 5가지 약재로 구성되어 있고, 補肝腎陰 助補腎陽 添精補髓 疎利腎氣 등의 효능이 있어 腎陰 및 腎陽의 부족으로 인한 陰損陽虛, 陽痿早泄, 男子無嗣 등에 활용되었다<sup>15)16)17)</sup>. 관련 국내 연구로 生殖 관련으로는 남성 생식 세포 GC-1 cell에 미치는 효과 연구<sup>18)</sup>, 안드로젠 수용체 발현에 대한 효과<sup>19)</sup>, 배

뇨근 과활동성에 대한 효과<sup>20)</sup>의 논문을 확인할 수 있고, 항산화 또는 항노화 작용 관련으로 오자연종환의 성분인 Gomisin-A의 항염효과에 관한 연구<sup>21)</sup>, 노화유발 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향<sup>22)</sup> 등의 연구가 이루어져 왔으나 많지 않고, 더불어 오자연종환의 5가지 기본약재에서 菟絲子 대신 決明子를 이용한 五子 추출물이 leyding 세포 내 테스토스테론 합성에 미치는 영향에 관한 연구<sup>23)</sup>와, 車前子대신 女貞子를 넣은 처방이 발기부전을 유도한 흰쥐의 성기능 개선에 미치는 영향에 관한 연구<sup>17)</sup> 등 5가지 약재에서 가감, 응용하여 효능을 연구한 논문들을 확인할 수 있었다.

본 연구는 노화 예방을 위해 임상에서 많이 활용되는 오자연종환을 기준 처방으로 삼고, 임상 경험에서 일부 나타나는 소화기 부작용을 줄여주는 健脾補胃하는 약재 중에 항산화 효능을 증가시키는 약재를 가미하여 진심유생환(오자연종환 가감방)을 구성하였다. 진심유생환에 대한 항산화 활성을 cell-free 시스템에서 비교하기 위하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 및 2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 라디칼 소거 활성능과 ferric reducing ability of plasma (FRAP) 활성 측정법을 이용하였다. 이를 기초로 in vitro 세포 실험계에서 항산화 활성 효능을 재평가하기 위해서는 C2C12 근아세포를 이용하였으며, C2C12 세포에 산화적 스트레스를 모방하기 위해서는 과산화수소(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 사용하였다. 또한 Annexin V-fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) 염색을 통한 apoptosis 분석, 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP, Δψm) 분석, 세포 내 ROS 수준 측정 등을 통해 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 각 처방전 추출물 제조

본 실험에서 사용된 구성 한약재들은 OO대학교 부속 한방병원에서 구입하였으며, 구성 한약재 및 비율은 Table 1에 제시하였다. 진심유생환의 열수 추출물을 얻기 위해 한약재 100 g 당 1L의 증류수를 가하여 3시간 동안 열수 추출하였다. 그리고 진심유생환의 에탄올 추출물을 얻기 위해 약재 100 g 당 2L의 70% 에탄올을 가하여

Table 1. Composition of Jinsimyusaeng-hwan used in the present study

한약명	생약명(Herb name)	원산지	부위	용량(단위: g)
枸杞子	<i>Lycci Fructus</i>	중국	果實	90
菟絲子	<i>Cuscutae Semen</i>	중국	種子	70
女貞子	<i>Ligustri Fructus</i>	중국	果實	70
覆盆子	<i>Rubi Fructus</i>	한국	果實	50
楮實子	<i>Broussonetiae Fructus</i>	중국	果實	50
車前子	<i>Planaginis Semen</i>	중국	種子	30
萊菔子	<i>Raphani Semen</i>	인도	種子	30
山査	<i>Crataegii Fructus</i>	중국	果實	30
五味子	<i>Maximowicziae Fructus</i>	한국	果實	10
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	한국	果實	10
총량				440

초음파추출(ultra-sonification extraction)로 추출물을 제조하였다. 이를 위하여 추출 용기에 한약재와 70% 에탄올을 혼합한 후 초음파 수조(Power sonic 405, SJ BioLab, Anyang, Republic of Korea) 바닥에 닿지 않도록 하여 40 KHz 초음파를 가하여 2시간 동안 추출하였다. 진심유생환 추출물은 여과지(Whatman No. 3 filter paper, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과한 다음 용매를 감압회전농축기(Eyela, A-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하였다. 농축된 추출물은 동결건조기(FD8508, Ilshin Co., Seoul, Republic of Korea)에서 동결 건조하여 분말화하였다. 추출물의 수율은 건조중량을 기준으로 환산하였다. 이후 열수 추출물(water extract of *Jinsimyusaeng-hwan*, WEJ)은 멸균된 증류수에, 에탄올 추출물(ethanol extract of *Jinsimyusaeng-hwan*, EEJ)은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA)에 200 mg/ml의 농도로 녹였으며 사용 전까지 -20℃에서 보관하였으며, 실험방법에 따라 적절하게 희석하여 사용하였다.

## 2. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성 측정

DPPH 라디칼에 대한 추출물의 소거 활성을 측정하기 위해, 메탄올에 용해시킨 0.4 mM의 DPPH (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액 150 µl와 다양한 농도 (0.15625 ~ 20 mg/ml)로 희석해 둔 각각의 진심유생환 추출물 100 µl를 첨가하고 37℃에서 암소에서 반응시

켰다. 30분 후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 518 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 trolox (Sigma-Aldrich Chemical Co.), 음성대조군으로는 0.4 mM DPPH 용액에 추출물 대신 메탄올을 첨가하여 사용하였다. 반응물에 대한 흡광도 결과는 음성대조군에 대한 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성도를 백분율로 나타냈으며, 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = (1 - \text{O.D. of sample} / \text{O.D. of negative control}) \times 100$$

## 3. 2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

에탄올에 용해시킨 7 mM의 ABTS (Sigma-Aldrich Chemical Co.)와 2.45 mM의 potassium persulfate (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 1:1 (v/v)의 비율로 혼합하여 암소에서 24시간 동안 반응시켜 ABTS 양이온 라디칼을 형성시켰다. 그 후, 실험 직전에 ABTS 용액의 흡광도가 734 nm에서 0.7~0.8이 되도록 희석하여 사용하였다. 그리고 0.15625~20 mg/ml의 다양한 농도의 추출물 10 µl와 희석한 ABTS 용액 190 µl를 혼합하여 6분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 trolox, 음성대조군으로는 희석한 ABTS 용액

을 사용하였으며 다음의 식에 따라 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성을 계산하였다.

$$\text{ABTS radical cation scavenging activity (\%)} = (1 - \text{O.D. of sample} / \text{O.D. of negative control}) \times 100$$

#### 4. 총 페놀성 화합물 함량 측정

적정 실험 농도로 희석한 각 추출물 50  $\mu\text{l}$ 에 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 ml을 첨가하고 2분 동안 상온에 반응시켰다. 그 후 Folin-Ciocalteu (50%, v/v, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 시약 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 혼합하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 사용하여 표준곡선을 작성하였고 추출물의 페놀성 화합물 함량은 mg gallic acid equivalents (GAE)/g of sample dry weight (DW)로 나타내었다.

#### 5. FRAP 활성 측정

추출물의 환원력을 측정하기 위해, 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 10 mM 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 및 20 mM  $\text{FeCl}_3$ 를 각각 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시켜 FRAP 시약을 제조하였다. 240  $\mu\text{l}$ 의 FRAP 시약에 각각의 추출물을 10  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 혼합한 후 상온에서 5분간 반응시키고 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 사용하여 표준 곡선을 작성하였으며, 환원력은 mg GAE/g of sample DW로 나타내었다.

#### 6. 세포 배양

본 실험을 위해 사용한 C2C12 근아세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였다. C2C12 세포의 배양을 위하여, Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Welgene Inc., Daegu, Republic of Korea)에 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene Inc.), 1% penicillin-streptomycin (Welgene Inc.)을 첨가하여 사용하였으며, 37°C

및 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 배양하였다.

#### 7. 세포 생존율 측정

세포의 생존율을 측정하기 위하여 C2C12 세포를 6 well-plate에  $1.5 \times 10^4$  cells/well의 농도로 seeding 하고 24시간 동안 부착 및 배양하였다. 그 후 적정 농도의 추출물들을 1시간 전처리하였고 500  $\mu\text{M}$  농도의  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 24시간 동안 처리하였다. CCK 8 용액(Abcam Inc., Cambridge, MA, USA)은 배지의 10%에 해당하는 용량으로 각 well에 처리하고 1시간 동안 반응시킨 후 반응액을 96-well plate로 옮겨 microplate reader를 이용하여 460 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 대조군을 기준(100%)으로 하여, 처리군의 상대적인 백분율을 나타내었다. 아울러 동일 조건에서 배양된 세포들의 형태 변화는 도립현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하였다.

#### 8. 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 형광 염색

C2C12 세포에 각각의 추출물과  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 24시간 동안 처리한 후, 세포를 4% formaldehyde로 상온에서 10분 동안 고정시켰다. C2C12 세포를 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하고 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 로 희석한 DAPI 용액(Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 처리하여 암소에서 10분 동안 염색하였다. 그 후, 세포를 PBS로 세척 및 건조 후 mounting 용액과 cover glass로 덮었다. DAPI로 염색된 세포의 핵은 형광현미경(EVOS FL Auto 2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 관찰하였다.

#### 9. 세포 주기 측정

C2C12 세포에 각 처방전 추출물 및  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리하고 24시간 뒤, 세포를 수집하였다. 수집한 세포는 BD Cycletest™ Plus kit (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)의 trypsin 용액과 trypsin inhibitor/ribonuclease A 용액을 넣고 각각 10분 동안 상온에서 반응시키고 마지막으로 PI 용액을 넣고 4°C, 암소에서 10분 동안 반응시켰다. 그리고 반응시킨 세포는 flow cyto-

meter (Accuri C6 flow cytometer, BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다. 세포사멸의 정량적 평가를 위하여 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도를 측정하였다.

#### 10. Annexin V-fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) 염색을 통한 apoptosis 분석

세포사멸 유도의 또 다른 정량적 분석을 위하여 상기에서 언급한 동일한 조건에서 배양된 세포를 수집하여 FITC Annexin V apoptosis detection kit (BD Biosciences)를 이용하여 제조사의 권장 방법에 따라 flow cytometer를 이용하여 분석하였다. 이를 위하여, 수집된 세포에 kt에 제공된 binding buffer를 혼합하고 FITC-annexin V 및 PI 용액을 첨가하여 20분 동안 염색하였다. 염색된 세포에서 발하는 형광 강도를 측정하기 위해 flow cytometer를 이용하였으며, 세포사멸이 유도된 세포는 annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> 및 annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> 세포의 비율을 산출하였다. 이는 Apoptosis 초기에 annexin V에 염색이 되고, apoptosis 후기 단계로 가면 PI에 의해 핵이 염색되는 원리를 이용하여 apoptosis 초기 세포와 후기세포 비율을 산출하여 전체적인 apoptosis 비율을 보고자 함이다.

#### 11. 총 단백질 분리 및 Western blot 분석

산화적 스트레스에 대한 진심유생환 추출물의 보호 효과에 관여하는 유전자들의 발현 변화를 단백질 수준에서 평가하였다. 이를 위하여 다양한 처리 조건에서 배양된 세포를 수집하여, lysis buffer [250 mM NaCl, 25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, pH 8.0), 1% NP-40, 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, 5 mM dithiothreitol 및 protease inhibitor cocktail]를 첨가하고 30분 동안 4°C에서 반응시켰다. 반응액을 14,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 총 단백질이 포함되어 있는 상층액을 수집하였다. 상층액을 대상으로 단백질 정량 시약(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하여 595 nm에서 microplate reader로 단백질 농도를 측정하였다. 각 샘플 당 3 µg/µl의 농도로 단백질을 정량하고 Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories)와 1:1 (v/v)로 혼합한

후 95°C에서 5-10분 동안 가열하고 사용하기 전까지는 -20°C에서 보관하였다. 분리한 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하고 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane은 5% skim milk와 1시간 동안 상온에서 반응시킴으로써 비특이적 반응을 차단하였고, 이후 적정 농도로 희석한 1차 항체와 2차 항체를 차례로 적용시킨 후 enhanced chemiluminescence detection kit (ECL, Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 단백질의 발현을 시각화하였고 이미지 분석 장비(Fusion Solo S system, Vilber Loumat, Collégien, France)를 이용하여 분석하였다. 본 연구에 사용된 항체 정보는 Table 2에 제시하였다.

#### 12. MMP ( $\Delta\psi_m$ ) 분석

5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1)은 선택적으로 미토콘드리아를 염색하며, MMP가 감소함에 따라 적색 형광에서 녹색 형광으로 가역적으로 색이 변할 수 있어 MMP를 측정하기 위하여 대표적으로 사용되고 있다. C2C12 세포에 진심유생환 추출물 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하고 24시간 뒤, 세포를 수집하였다. 수집한 세포는 5 µg/ml의 JC-1 (Sigma-Aldrich Chemical Co.)으로 상온에서 20분 동안 염색하였다. 그 후 PBS로 세포를 다시 세척하고 MMP의 변화를 flow cytometer를 이용하여 분석하였다.

#### 13. 세포 내 활성산소종(ROS) 수준 측정

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 진심유생환 추출물의 단독 또는 동시 처리에 따른 세포 내 ROS 수준의 변화를 측정하기 위해 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하였다. 각 처방전 추출물 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 10 µM의 DCF-DA를 첨가하여 20분 동안 37°C에서 염색하였다. 그런 다음, 세포를 수집하여 flow cytometer 및 형광현미경을 이용하여 세포 내 ROS 수준의 변화를 측정 및 관찰하였다.

#### 14. 통계 분석

실험 결과는 평균(mean) ± 표준편차(standard devi-

ation, SD)로 나타냈으며, 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하였다. 다중 비교를 위한 일원 분산 분석(ANOVA)과 Tukey의 사후 검정을 실시하여  $p < 0.05$  수준에서 통계적 유의성 여부를 검증하였다.

### III. 결과

#### 1. 진심유생한 열수 및 에탄올 추출물의 수율 비교

본 연구에서 사용한 WEJ, EEJ의 생리활성을 비교하기 위해 얻은 각 추출물의 수율은 추출물 조제에 사용한 원료 중량에 대한 추출물의 추출액을 농축 및 동결건조하여 얻은 건물 중량을 백분율로 나타낸 값이다. WEJ, EEJ의 수율은 각각 30.0%와 19.7%이었다.

#### 2. 진심유생한 열수 및 에탄올 추출물의 DPPH 자유 라디칼 소거 활성 비교

추출물의 항산화능을 비교하기 위해 DPPH 자유 라디칼 소거 활성을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 WEJ, EEJ의 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 5 mg/ml의 농도의 WEJ, EEJ에서 양성대조군인 trolox (100  $\mu$ g/ml)보다 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 한편, 가장 높은 농도에서의 DPPH 자유 라디칼 소거 활성은 EEJ가 108.0%로 EEJ가 WEJ보다 높게 나타났다.

#### 3. 진심유생한 열수 및 에탄올 추출물의 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성 비교

다음은 ABTS를 이용한 항산화능을 평가하였으며, ABTS 양이온 라디칼 소거 활성은 WEJ, EEJ의 농도 의존적으로 증가하였다. 그리고 WEJ는 2.5 mg/ml 이상, EEJ는 5 mg/ml 이상의 농도에서 양성대조군으로 사용한 100  $\mu$ g/ml의 trolox 보다 높은 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성을 나타냈으며, EEJ의 가장 높은 농도에서 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성은 93.6%로 나타났다.

#### 4. 진심유생한 열수 및 에탄올 추출물의 총 페놀 함량 및 환원력 비교

WEJ, EEJ의 총 페놀 함량을 비교하기 위해 gallic acid를 표준물질로 하여 작성한 표준 곡선을 이용하였으며, 그 결과 WEJ가  $154.85 \pm 0.37$  mg GAE/g으로 EEJ  $120.63 \pm 4.65$  mg GAE/g보다 높은 환원력을 나타냈다. 아울러 FRAP 활성 측정을 통한 환원력을 측정 한 결과도 마찬가지로 gallic acid를 표준물질로 하여 작성한 표준 곡선을 이용하여 나타냈다. WEJ가  $142.50 \pm 3.31$  mg GAE/g로 EEJ  $104.81 \pm 1.19$  mg GAE/g보다 높은 환원력을 나타냈다. 이상의 결과에서 알 수 있듯이 WEJ, EEJ의 총 페놀 함량과 FRAP법을 이용한 환원력을 비교해 보면 총 페놀 함량이 높은 추출물이 환원력 또한 높게 나타났음을 확인할 수 있었다.

#### 5. C2C12 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스에 대한 WEJ의 영향

산화적 스트레스에 대한 WEJ의 보호 효과를 확인하기 위해 세포 독성을 조사하였다. C2C12 근아세포에 WEJ를 0.1 mg/ml에서부터 1 mg/ml까지의 다양한 농도로 처리한 후 24시간 뒤 CCK8 방법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 0.8 mg/ml 이하의 농도에서는 유의적인 세포 독성을 나타내지 않았다(Figure 1A). 따라서 세포보호 효과를 확인하기 위한 WEJ의 처리농도는 세포 독성을 나타내지 않은 농도인 0.8 mg/ml을 최고 농도로 선정하여 이후 실험을 진행하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산화적 스트레스는 세포 내 산화적 손상을 유발하여 세포 사멸에 따른 세포 생존율 감소를 초래한다. 아울러 산화적 스트레스를 유도하기 위한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 따른 세포 생존율 결과는 0.5 mM 이상의 농도에서부터 유의적으로 감소하였다(Figure 1B). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 0.5 mM 농도로 처리한 세포 생존율이  $63.7 \pm 4.8\%$ 로 나타난 결과를 바탕으로 산화적 스트레스에 대한 세포보호 효과를 확인하기 위한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리농도는 0.5 mM로 설정하였다. 그 결과, 0.2, 0.4 그리고 0.8 mg/ml의 WEJ를 전처리한 군의 세포 생존율은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 처리한 군의 세포 생존율과 비교하여 유의적인 차이가 나타나지 않아 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 세포 독성에 대해 보호 효과를 나타내지 않았음을 확인할 수 있었다(Figure 1C).

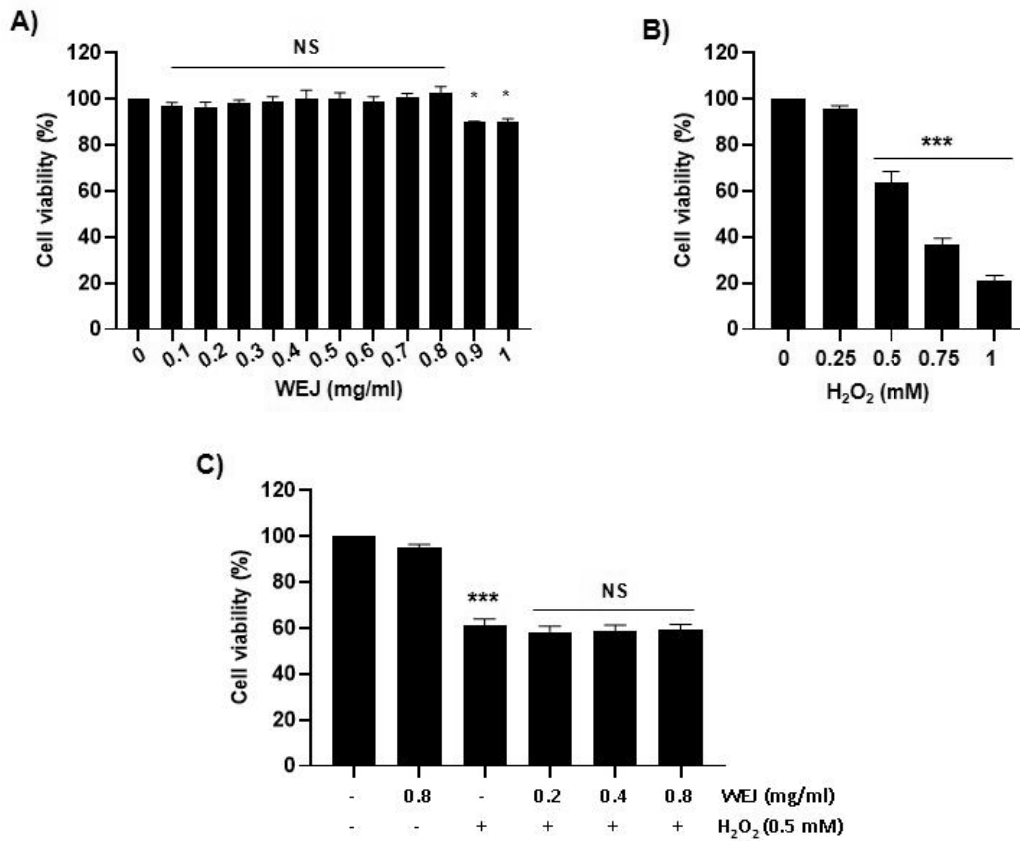


Figure 1. (A) Effect of WEJ on the cell viability in C2C12 myoblasts. (B, C) Effect of WEJ on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – induced cytotoxicity in C2C12 myoblasts. (B) Cells were treated with indicated concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or WEJ alone for 24 h or pretreated with or without WEJ for 1 h before 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation for 24 h. Cell viability was analyzed using CCK8 assay. Data indicated the mean ± S.D. (*n* = 3). \*\* *p* < 0.01 and \*\*\* *p* < 0.001, compared with untreated control cells.

## 6. C2C12 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스에 대한 EEJ의 영향

산화적 스트레스에 대한 EEJ의 보호효과를 확인하기 위한 실험 조건 설정을 위해 EEJ가 C2C12 세포에 미치는 영향을 조사하였다. EEJ는 0.7 mg/ml 이상의 농도

에서 유의적으로 세포 생존율이 감소하였다(Figure 2A). 따라서 이후 실험은 EEJ의 최대 농도 0.6 mg/ml로 설정하였다. Figure 2B에 나타난 바와 같이, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 감소한 세포 생존율은 0.2 mg/ml의 EEJ에 의해서는 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 0.4 및 0.6 mg/ml의 EEJ에 의해서는 대조군 대비 각각 76.1% 및 81.4%

Table 2. Antibodies used in the present study

Antibody	Origin	Catalog no.	Company
DR4	mouse monoclonal	sc-32255	Santa Cruz Biotechnology
DR5	rabbit polyclonal	sc-7192	Santa Cruz Biotechnology
Caspase-3	mouse monoclonal	sc-56053	Santa Cruz Biotechnology
p-γH2A.X	rabbit polyclonal	#9718	Cell Signaling Technology
β-actin	mouse monoclonal	sc-8432	Santa Cruz Biotechnology
Bax	rabbit polyclonal	CL647-50599	ProteinTech Group
Bcl-2	mouse monoclonal	BS1511	BioWorld

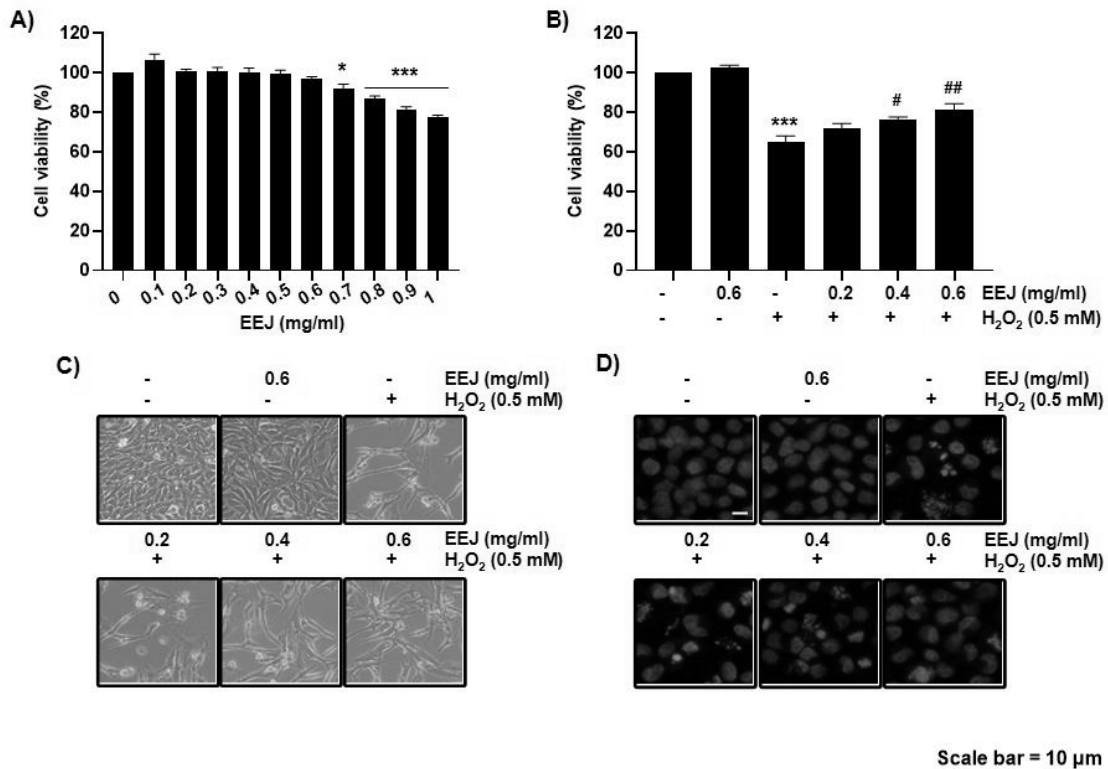


Figure 2. Effect of EEJ on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in C2C12 myoblasts. Cells were treated with the indicated concentrations of EEJ or 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h or pretreated with or without EEG for 1 h before 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation for 24 h. (A and B) Cell viability was analyzed using the CCK 8 assay. Data indicated the mean ± S.D. (n=3). \**p* < 0.05 and \*\*\**p* < 0.001, compared with untreated control cells; #*p* < 0.05 and ##*p* < 0.01, compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells. (C) The morphology of the cells was visualized under an inverted-phase contrast microscope (× 400). (D) The DAPI-stained nuclei were observed using a fluorescence microscope (Scale bar = 10 μm). (C and D) Representative images were presented.

로 나타나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포 생존율 감소를 차단하였음을 확인하였다. 추가적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 세포 밀집도 감소 및 염색질의 응축 현상 모두 EEJ에 의해 회복되었음을 관찰하였다(Figure 2C와 2D). 따라서 EEJ의 전처리에 의해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산화적 손상에 대한 보호 효과를 나타내는 것으로 보인다.

### 7. C2C12 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포 주기의 변화에 미치는 EEJ의 영향

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산화적 스트레스에 따른 세포 주기의 변화를 관찰하기 위해 flow cytometry 분석을 이용하였다. Figure 3과 Table 3에 제시하였듯이 G2/M 및 sub-G1의 세포의 빈도가 유의적으로 증가한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와는 달리 EEJ를 전처리한 군에서는 농도 의존적으로 G2/M 기에 분포되어있는 세포의 빈도가 감소하였고, 게다가

EEJ의 저농도인 0.2 mg/ml에서부터 sub-G1의 세포 빈도가 유의적으로 감소하였다.

### 8. C2C12 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도되는 apoptosis에 미치는 EEJ의 영향

산화적 스트레스를 유발하기 위해 사용한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 따른 apoptosis의 유도에 대해 EEJ가 C2C12 세포를 보호할 수 있는지를 살펴보았다. 그 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 증가한 apoptosis는 EEJ의 농도 의존적으로 감소하였다(Figure 4). 세포 주기 분석에서 sub-G1의 결과와 마찬가지로 EEJ의 0.2 mg/ml의 농도에서부터 유의적으로 감소하였다. 아울러 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 단독으로 처리한 군에서는 DR4와 5, 그리고 cleaved caspase-3의 발현이 증가되었으며, EEJ (0.6 mg/ml)를 전처리한 군



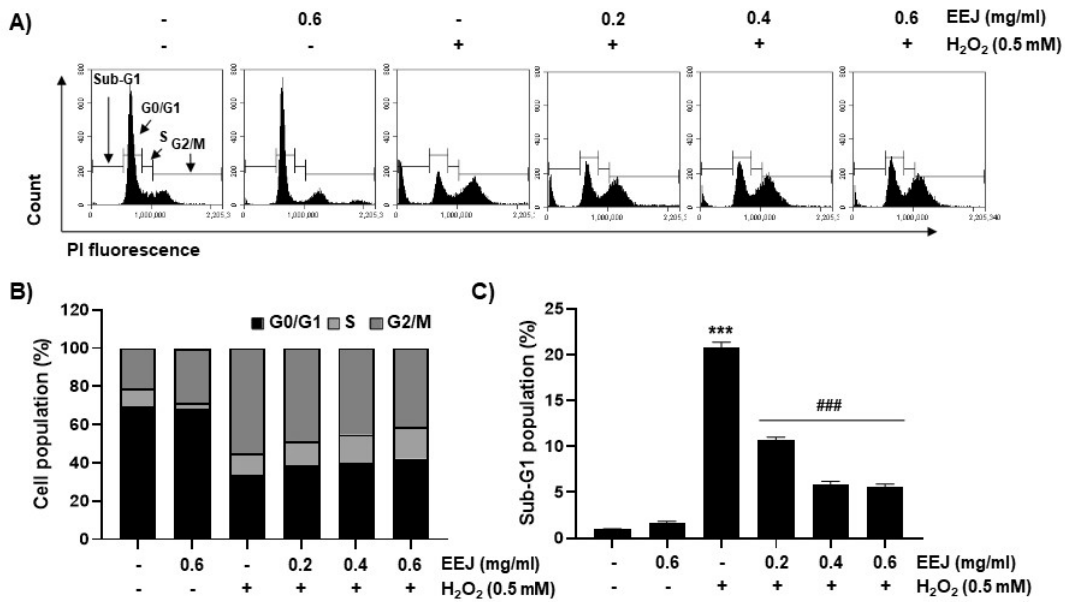


Figure 3. Effect of EEJ on changes in cell cycle distribution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated C2C12 myoblasts. Cells were treated with or without the indicated concentrations of EEJ for 1 h before treatment with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. After staining the cells with PI solution, flow cytometry analysis was performed. (A) Representative histograms of flow cytometry were presented. (B) The average percentages of cells in each phase of the cell cycle, except for cells belonging to the sub-G1 phase, were displayed. (C) The frequencies of cells belong to the sub-G1 phase were calculated. The results were expressed as the mean  $\pm$  SD obtained from three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$ , compared with untreated control cells; ### $p < 0.001$ , compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells.

에서는 감소되었음을 관찰하였다(Figure 5). 추가적으로 DNA 손상에 따른 p- $\gamma$ H2A.X의 발현도 EEJ의 전처리에 의해 감소하였다. 그러므로 C2C12 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 apoptosis는 EEJ의 전처리에 의해 억제되었음을 확인한 이상의 결과를 바탕으로 EEJ가 산화적 스트레스로부터 C2C12 세포를 효과적으로 보호할 수 있다는 것을 의미한다.

### 9. C2C12 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 미토콘드리아 기능 손상에 대한 EEJ의 영향

산화적 스트레스에 의해 유도된 MMP ( $\Delta\psi_m$ ) 손실

에 대한 EEJ의 영향을 조사하기 위해 JC-1 염색을 통한 flow cytometry 분석을 사용하였다. Figure 6A와 6B에 나타난 결과를 살펴보면, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 MMP ( $\Delta\psi_m$ ) 손실을 나타내는 JC-1 monomer의 형태가 유의적으로 증가하였고 EEJ의 농도 의존적으로 감소하였음을 확인하였다. 게다가, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 변화한 Bax 및 Bcl-2의 발현 변화는 EEJ의 전처리에 의해 대조군 수준으로 회복되었음을 관찰하였다(Figure 6C). 따라서 산화적 스트레스 조건에서 유도된 미토콘드리아 기능 손상과 그와 관련된 단백질의 발현 변화는 EEJ에 의해 회복한 이상의 결과를 바탕으로 EEJ의 C2C12 보호 효과는 미토콘드리아 기능 손상 차단과 관련되어 있음을 제

Table 3. Effect of EEJ on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced changes of cell cycle distribution in C2C12 myoblasts.

Group	G0/G1 (%)	S (%)	G2 /M (%)
Control	69.0 $\pm$ 0.3	9.5 $\pm$ 0.4	21.6 $\pm$ 0.6
EEJ (0.6 mg/ml)	68.5 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 0.1	28.4 $\pm$ 0.6
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.5 mM)	34.6 $\pm$ 1.3	11.3 $\pm$ 0.1	54.1 $\pm$ 1.4
EEJ (0.2 mg/ml) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.5 mM)	38.5 $\pm$ 0.2	11.7 $\pm$ 1.2	49.9 $\pm$ 1.4
EEJ (0.4 mg/ml) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.5 mM)	39.7 $\pm$ 0.2	13.7 $\pm$ 1.8	46.7 $\pm$ 2.1
EEJ (0.6 mg/ml) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.5 mM)	41.5 $\pm$ 0.9	16.5 $\pm$ 0.1	42.1 $\pm$ 1.1

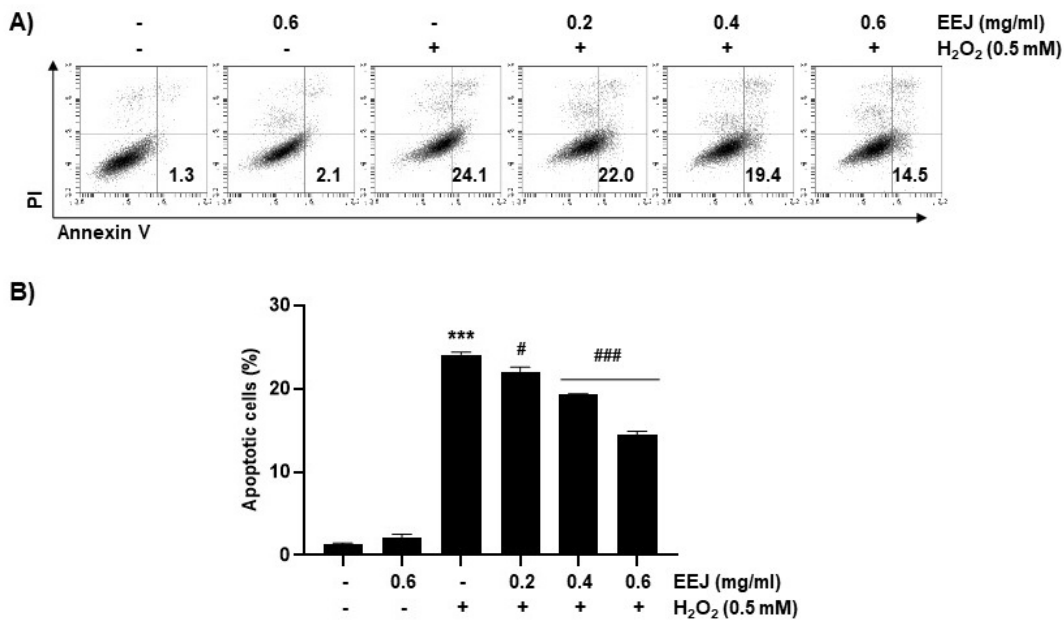


Figure 4. Inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis by EEJ in C2C12 myoblasts. Cells were treated with or without the indicated concentrations of EEJ for 1 h before treatment with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. (A) After staining with annexin V-FITC and PI, representative profiles by the results of flow cytometry were presented. (B) The percentage of apoptotic cells was determined by expressing the numbers of annexin V+ cells as a percentage of all cells. Data indicated the mean ± S.D. (n=3). \*\*\* p < 0.001, compared with untreated control cells; # p < 0.05 and ### p < 0.001 compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells.

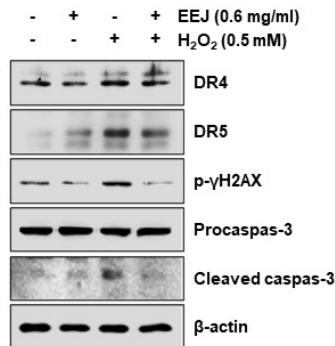


Figure 5. Effects of EEJ on the expression levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis-related proteins in C2C12 myoblasts. Cells were treated with or without the 0.6 mg/ml EEJ for 1 h before treatment with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. Total protein was isolated from cells, and the equal amounts of proteins were separated using SDS-polyacrylamide gels. Then, the separated protein according to molecular weight was transferred onto the membranes. The membranes were reacted with the anti-DR 4 and 5, anti-caspase-3, anti-p-γH2A.X, and visualized using an ECL detection system. β-actin was used as an internal control.

시할 수 있다.

### 10. C2C12 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 ROS 수준 증가에 대한 EEJ의 영향

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 C2C12 세포의 세포사멸 유도가 EEJ에

억제되는 효과가 ROS 생성 차단에 의한 것인지 확인하기 위해 세포를 DCF-DA로 염색한 후 flow cytometry와 형광현미경을 이용하였다. Figure 7A와 7B에 나타낸 바와 같이, C2C12 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 군에서는 ROS 수준이 19.0%로 증가하였으며, EEJ의 전처리에 의해서는 유의적으로 감소하였다. 즉, EEJ는 저농도인 0.2

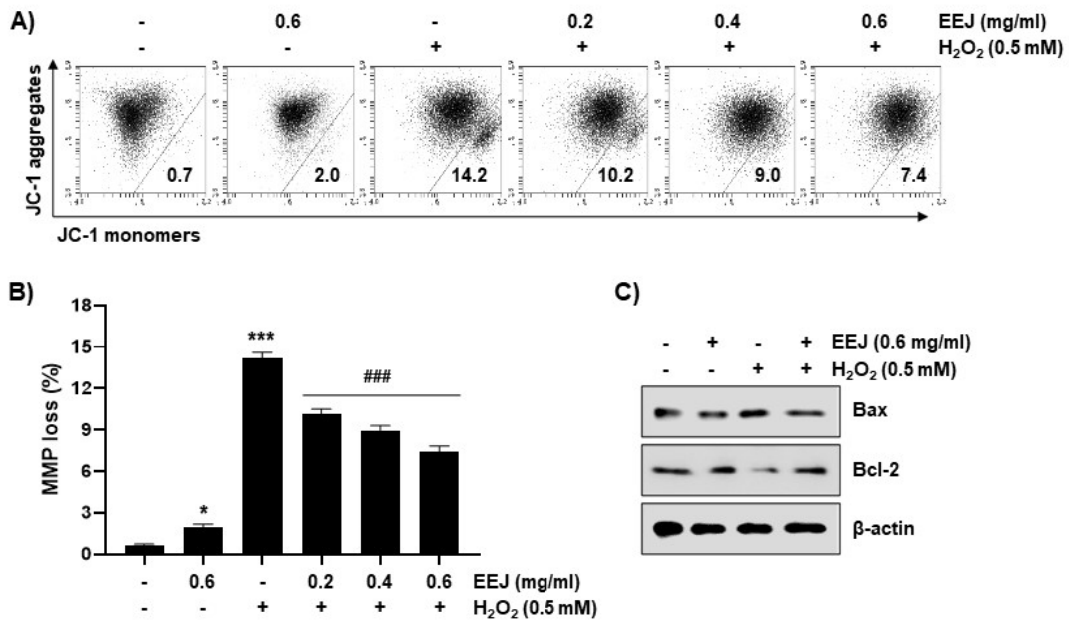


Figure 6. Inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mitochondrial dysfunction by EEJ in C2C12 myoblasts. Cells were treated with or without the indicated concentrations of EEJ and exposed to 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. MMP was measured by flow cytometry after JC-1 staining. (A) Representative profiles of flow cytometry were shown. (B) Ratios of JC-1 aggregates to monomers were expressed. Data indicated the mean ± S.D. (n = 3). \*\*\**p* < 0.001, compared with untreated control cells; ###*p* < 0.001 compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells. (C) The expressions of Bax and Bcl-2 were evaluated by immunoblotting using the indicated antibodies.

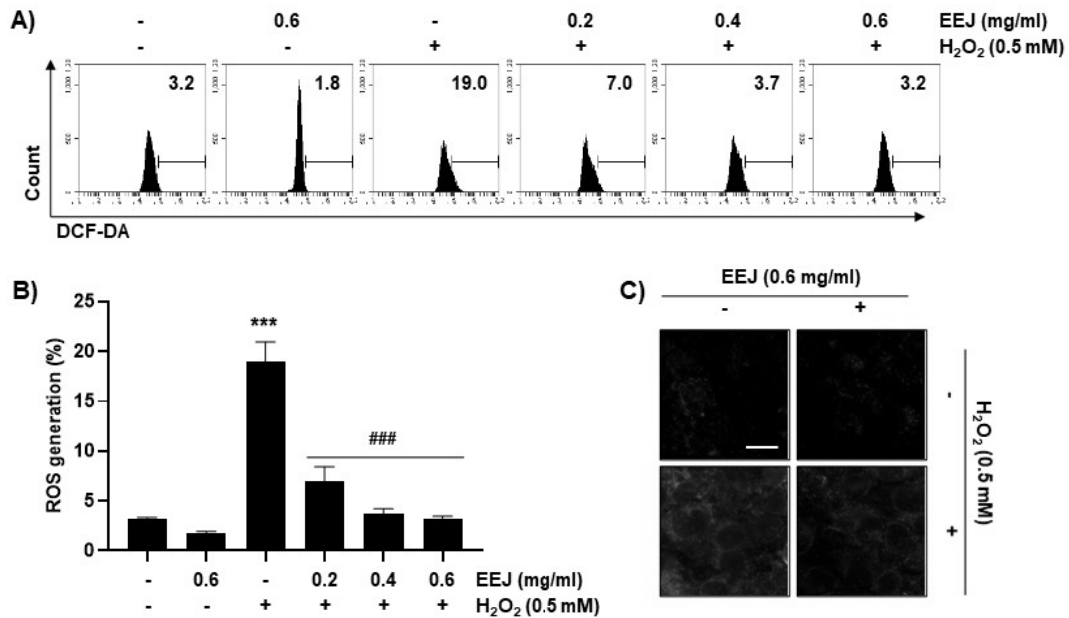


Figure 7. Inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced ROS generation by EEJ in C2C12 myoblasts. Cells were treated with or without the indicated concentrations of EEJ and exposed to 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. (A) ROS levels were measured by flow cytometry after DCF-DA staining. (B) The fluorescences of DFC-DA were observed using a fluorescence microscope (Scale bar = 10 μm).

mg/ml에서부터 고농도인 0.6 mg/ml까지 각각 7.0%, 3.7% 및 3.2% 정도로 나타났다. 또한, DCF-DA의 형광 발광을 형광현미경을 통해 조사한 결과에서도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 형광 발광이 증가하였으며, EEJ의 전처리에 의해서는 감소하였음을 관찰하였다(Figure 7C). 그러므로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 따른 산화적 스트레스에 대한 EEJ의 세포사멸 억제 효과는 ROS 차단과 관련이 있음을 시사한다.

#### IV. 고 찰

활성산소종(ROS)은 일반적인 산소에 비하여 화학적인 반응성이 높은 산소를 가지는 분자로<sup>24)</sup>, 적절한 ROS는 정상적인 세포 기능을 유지하기 위한 분자로 작용하지만, 스트레스나 음주, 흡연, 자외선 및 유해 화학물질 노출 등의 요인은 산화와 항산화 사이의 균형 장애나 체내 산화-환원 조절 장애를 유발하게 되고, 이 과정에서 과도하게 생성된 ROS가 산화적 스트레스를 유발한다<sup>25)26)27)</sup>. 또한, 과도한 ROS의 축적은 미토콘드리아에 직접적으로 영향을 미쳐 미토콘드리아 막 전위 (mitochondrial membranepotential, MMP,  $\Delta\psi_m$ )를 감소시킴으로서 ATP 생산을 억제할 뿐 만 아니라 cytochrome c가 미토콘드리아 내 막간 공간에서 세포질로 방출됨으로서 apoptosis를 유발하는 중심적인 역할을 하며, 조절 T 세포의 apoptosis를 통하여 염증 반응을 유발하는 것으로 알려져 있고<sup>28)29)</sup>, 지속적인 산화적 스트레스는 조직에 비가역적인 변화를 유도하여 노화를 촉진 시키고, 암, 치매, 관절염, 자가면역질환 등의 여러 가지 질환을 유발한다<sup>30)31)</sup>. 그러나 다양한 세포 내 신호 분자와 항산화 효소 시스템은 산화적 스트레스에 대응하여 세포 내 산화 환원 균형을 유지하는 중요한 역할을 한다. 따라서 ROS 유도 산화적 스트레스의 완화나 제어를 위한 항산화제의 사용은 다양한 질환의 예방과 치료에 있어 꼭 필요하다<sup>48)49)</sup>.

오자연중환은 枸杞子, 菟絲子, 覆盆子, 車前子, 五味子の 5가지 약재로 구성되어 있고, 填精補髓, 益腎扶陽하여 腎氣虧虛로 인한 陽痿, 夢遺滑精, 尿液混濁, 腰酸背痛, 尿頻 등에 쓰이며, 항피로, 성기능 향상, 항노화 등의 약리작용이 있다<sup>32)</sup>. 오자연중환에 대해 국내 연구에서는 남성 생식 세포 GC-1 cell에 미치는 효과<sup>19)</sup>, 안드로겐 수용체 발현에 대한 효과<sup>20)</sup>, 배노근 과활동성에

대한 효과<sup>21)</sup>, 항산화 또는 항노화와 관련하여 오자연중환 성분인 Gomisins-A의 항염효과<sup>22)</sup>, 노화유발 흰쥐에 대한 항산화 효과<sup>23)</sup> 등이 알려져 있지만 많지 않고, 오자연중환의 5가지 기본약재에서 가감, 응용하여 효능을 연구한 논문들<sup>24)25)</sup>이 있다.

오자연중환을 구성하는 약재들은 대부분 肝과 腎으로 귀경하고, 精과 腎을 기르는 효능이 있으며, 이는 항산화와 항노화 작용 및 각종 질병의 치료와 연관이 된다. 枸杞子가 포함된 복합 초임계유체 추출물(黃漆나무, 山茱萸, 枸杞子) 관련 연구에서는 피부섬유아세포에서 DDPH radical scavenging activity와 SOD-like activity가 농도 의존적으로 증가하여 항산화 및 항노화 효능이 있음을 입증함으로써 이를 이용한 피부 개선에 도움이 되는 기능성 화장품 등에 응용할 수 있음을 제시하기도 하였고<sup>50)</sup>, 枸杞子 분획물을 당뇨 유발 쥐에게 투여 후 혈당 저하, 지질 대사 개선, 항산화 작용, 당 대사 활성이 있음을 확인한 논문<sup>51)</sup>, 枸杞子 추출물의 항산화력 및 Angiotensin converting enzyme (ACE) 저해를 통한 항고혈압 효과에 관한 연구<sup>52)</sup> 등이 있다. 菟絲子와 관련된 연구로는 菟絲子 추출물이 항산화 효과에 의하여 ketoconazole의 투여로 나타나는 흰쥐의 고환 독성을 제거하여 성기능을 회복시킴을 확인한 논문<sup>53)</sup>, 항산화 작용과 항암작용이 알려진 菟絲子 추출물의 유방암 세포주인 MCF-7 세포 사멸에 관련된 유전자를 조절하여 유방암 세포의 세포 사멸을 촉진하는 것을 확인한 연구<sup>54)</sup>가 있고, 覆盆子의 항산화 효과 및 광독성 억제 활성을 확인한 연구<sup>55)</sup>, 覆盆子가 남성생식세포 중 Sertoli cell에 대하여 항산화효과를 가지며, 산화 작용에 의한 남성불임의 치료에 응용할 수 있다는 연구<sup>56)</sup>가 있다. 또한 車前子가 포함된 복합추출물(한인진, 울금, 차전자)의 항산화 및 항이상지질혈증 효과를 확인하여 향후 이상지질혈증, 죽상동맥경화증 및 심·뇌혈관 질환에 사용 가능성을 보여준 연구<sup>57)</sup>, 중속 五味子の 우수한 항산화, 항염증, 간보호효과를 확인하고, 알코올성 간손상 예방 및 치료에 적용 가능성을 본 연구<sup>58)</sup> 등이 있다.

본 연구에서는 오자연중환 기본 구성에 항산화, 항노화, 항염증 작용을 가지는 5가지 약재를 추가하였다. 약재 선별의 첫 번째 기준으로는 오자연중환 기본방 약재의 귀경을 살펴보았을 때, 오자연중환은 비교적 肝, 腎 등의 下焦의 귀경에 비중이 더 있으므로 脾胃의 中焦 작용을 조금 더 보완하고, 上焦 관련 작용도 같이 기대할

수 있는 약제들에 중점을 두었으며, 두 번째로 현대 약리적으로 항산화 작용이 높으며 이와 더불어 기타 혈관 또는 내분비 질환 관련 효과를 기대할 수 있는 약제들을 선별하였고, 마지막으로 오자연중환 기본방의 약제 성질은 대부분 주 하며, 溫, 寒의 성질을 가진 약제가 각각 1개씩으로 구성되어 어느 한쪽으로 치우치지 않는 것의 특성을 고려하여 추가 5가지의 약제 또한 유사하게 구성되는 것을 고려하였다. 이러한 기준으로 女貞子, 楮實子, 萊菔子, 山查, 山茱萸의 5가지 약제를 선정하였다.

女貞子は 凉하고 苦甘하며, 肝, 腎에 귀경하며, 滋補 肝腎 强健筋骨 明目 乌发하는 작용이 있으며<sup>33)</sup>, 항산화 작용과 관련하여 산소 free radical 및 활성산소 제거 및 항산화 효소 능력향상 등이 있으며, 면역기능을 증강하며 NO 및 IL-1β의 방출을 현저하게 억제하는 작용이 있다<sup>34)35)</sup>. 楮實子は 性寒하고 味甘하며, 肝, 脾, 腎에 귀경하고 補腎清肝 明目 하는 효능이 있고<sup>33)</sup>, 실험 동물에 楮實子 추출물을 투여하였을 때 투여기간과 용량의존적으로 nitric oxide synthase 활성을 증가하며<sup>36)</sup>, 스트렙토조토신(Streptozotocin, STZ)으로 유도한 당뇨 마우스 모델에서 楮實子 에탄올 추출물이 췌장의 β세포에서 산화 스트레스를 억제함으로써 보호효과를 가지고 있음을 입증하기도 하였다<sup>37)</sup>. 萊菔子は 平하고 辛甘하여 胃, 肺에 귀경하며 消食化痰 下氣定喘 하는 효능이 있고<sup>33)</sup>, 항염증, 항산화 효과와 신경보호작용 및 이상지질혈증 개선 효과가 있음이 입증되기도 하였다<sup>38)39)40)</sup>. 山查는 微溫하며 甘酸하고, 肝, 脾, 胃에 귀경하고, 消食健胃 行氣散瘀 하는 효능이 있으며<sup>33)</sup>, 지방 세포의 분해 작용 뿐 아니라, 혈청 및 간의 지질 농도 개선, 트롬빈 저해 활성작용 등의 효능이 있고<sup>41)42)</sup>, 항산화 작용과 관련하여 항산화 효소를 활성화 하고, 지질과산화의 산물을 억제하는 작용이 있다<sup>43)</sup>. 마지막으로 山茱萸는 微溫, 酸澁하며, 肝, 腎으로 귀경하며, 補益肝腎 澀精固脫 斂汗 收澁補助하는 작용이 있는 補 陰陽의 要藥으로<sup>33)</sup>, caffeic acid, gallic acid, chlorogenic acid와 같은 phenolic acid 성분과 山茱萸의 대표적인 활성 성분으로 알려진 lognin 항산화 활성을 나타내는 주요 성분임이 확인되었으며<sup>44)</sup>, 이와 같은 항산화 효과 뿐 아니라 organic acids, iridoid glycosides, saponin 등의 성분이 함유되어 免疫을 조절 및 증강하고, 造血(hematopoiesis)을 촉진하고, 혈액지질을 낮추며, 혈당을 감소시키거나 항 고혈당능 등의 내분비 조절작용이

있으며, 항 죽상 동맥경화 작용, 항암효과, 潤腸通便의 작용과 더불어 노화 방지 등의 다양한 효능이 있다<sup>45)</sup>.

본 연구에서 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성능과 FRAP 활성의 측정법을 이용하여 진심유생환 추출물의 항산화 활성을 조사하였다. 결과에 의하면 WEJ, EEJ 모두 농도의 증가에 따라 DPPH 자유 라디칼 소거 활성능이 증가하였으며, 5 mg/ml의 농도 이상에서는 WEJ보다 EEJ의 DPPH 라디칼 소거 활성능이 우수하였다. 이 결과를 토대로, ABTS를 이용한 각 추출물의 항산화능을 평가하였다. 결과에 따르면 ABTS를 이용한 항산화능 평가에서는 10 mg/ml의 농도 이상에서 WEJ에 비하여 EEJ가 상대적으로 우수한 항산화능을 보여주었다. 한편, 페놀 복합물(phenolic compound)은 phenolic hydroxyl기를 가지고 있어 자유 라디칼을 소거하는 중요한 역할을 하여 대표적인 항산화 물질로 알려져 있다<sup>46)</sup>. 따라서 총 페놀 함량 분석은 항산화 활성을 평가하는 간접적인 지표가 될 수 있지만<sup>47)</sup>, 본 연구의 결과에서는 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성 결과 각 추출물의 총 페놀 함량과는 큰 유의성을 찾기는 어려웠다. 그러나 FRAP 활성 측정을 통한 환원력을 조사한 결과에서는 총 페놀 함량의 증가에 따라 환원력이 우수함을 알 수 있었다.

이상의 결과를 바탕으로 *in vitro* 세포 모델 수준에서 각 추출물의 항산화력에 대한 비교하기 위하여 C2C12 근아세포를 이용하였다. 본 연구의 CCK8 분석 결과에 의하면, 0.5 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 노출된 C2C12 근아세포는 약 60% 전후의 세포 생존율을 보였으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 C2C12 근아세포의 생존율 감소는 세포주기 진행의 G2/M 기에서의 정지에 의한 세포사멸과 직접적인 연관성이 있음을 알 수 있었다.

또한 WEJ는 0.8 mg/ml 처리 농도까지 C2C12 근아세포에서 유의적인 세포 독성을 나타내지 않았지만, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포 생존율의 보호에는 유의적인 효능을 보여주지 못하였다. EEJ는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 처리된 C2C12 근아세포에서 관찰되는 세포 생존율의 저하, 세포사멸의 유도 및 세포주기 정지를 모두 유의적으로 억제하였다. EEJ가 존재하는 조건에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 미토콘드리아의 기능 손상과 연계된 ROS의 생성을 유의적으로 억제되었으며, 세포사멸 조절 유단백질의 발현 변화와 DNA 손상 마크 단백질의 증가 또한 감소하였다.

세포사멸과 관련된 연구의 결과에 의하면 EEJ는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의하여 증가된 DR4 및 DR5의 발현 증가를 억

제시했으며, 이는 EEJ가 외인적 경로의 활성화에 따른 세포사멸을 차단할 수 있음을 의미하는 결과이며, 이는 DNA 손상 차단과도 관련이 있었다. 아울러 EEJ가 존재하는 조건에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 증가된 활성형 caspase-3의 발현을 감소시켜, 세포사멸의 가장 큰 특징 중의 하나인 caspase cascade의 활성을 억제할 수 있음을 보여주었다. 또한 EEJ는 MMP의 소실을 유의적으로 차단하여 미토콘드리아의 항상성을 유지시켰음을 알 수 있으며, 이는 ROS 생성의 차단에 의한 결과로 해석될 수 있다.

한편 EEJ는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Bax 단백질의 발현을 감소시킨 반면, 억제된 Bcl-2 단백질의 발현은 다소 회복시켰으며, 이러한 효과는 EEJ가 존재하는 조건에서 더욱 높게 나타났다. 따라서 C2C12 근아세포에서 EEO와 EEJ에 의한 Bax/Bcl-2의 상대적 발현 감소가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포사멸 차단에 결정적인 역할을 한 것으로 추정되는 이는 ROS 생성 의존적인 것으로 추정된다.

이상의 결과를 종합해 보면 진심유생환의 추출물은 산화 스트레스에 대한 세포 독성 보호 효과를 가지지만, 열수 추출물보다는 에탄올 추출물에서 더 우수함을 알 수 있었고, 진심유생환 에탄올 추출물에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 세포 독성의 보호 효과는 ROS의 생성 차단에 의한 항산화 활성화에 의한 것임을 보여주었다.

본 연구를 토대로 진심유생환 처방은 산화 스트레스에 대한 세포 독성 보호 효과가 입증되었다. 산화적 스트레스와 연관된 다양한 질환의 예방과 치료에 효과적으로 활용될 수 있기를 바라며, 향후 항산화 작용에 대한 한의학적 연구에 중요한 토대가 될 수 있기를 기대한다.

## V. 결론

본 연구에서는 오자연중환의 복용으로 인한 부작용을 줄이고, 효능은 높이기 위해 저실자, 여정자, 산수유, 산사, 나복자를 추가하여 진심유생환을 창방하였다. 이에 진심유생환 추출물의 항산화 및 세포 독성 보호 효과에 대한 다음과 같은 결과를 도출하였다.

1. DPPH 자유 라디칼 소거 활성 비교에서 WEJ, EEJ의 농도가 증가함에 따라 증가하였고, 5 mg/ml의 농도의 WEJ, EEJ에서 양성대조군인 trolox (100 µg/ml)보다 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나

타내었다.

2. ABTS 양이온 라디칼 소거 활성 비교에서 WEJ, EEJ의 농도가 증가함에 따라 증가하였고, WEJ는 2.5 mg/ml 이상, EEJ는 5 mg/ml 이상의 농도에서 양성대조군으로 사용한 100 µg/ml의 trolox 보다 높은 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성을 나타내었다.
3. 총 페놀 함량과 FRAP법을 이용한 환원력 비교 결과 총 페놀 함량이 높은 추출물이 환원력 또한 높게 나타났다.
4. C2C12 근아세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스에 대한 보호 효과 비교에서 진심유생환 열수 추출물은 유의적인 효과가 없었지만, 70% 에탄올 추출물은 처리농도 의존적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포 독성을 억제하였다.
5. C2C12 근아세포에서 산화적 스트레스에 대한 진심유생환 70% 에탄올 추출물의 세포 독성 보호 효과는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포사멸 유도 및 세포주기 정지의 억제와 연관성이 있었다.
6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 처리된 C2C12 근아세포에서 진심유생환의 70% 에탄올 추출물의 세포사멸 억제 효과는 미토콘리아 및 DNA 손상의 억제와 연관성이 있었다.
7. 이러한 C2C12 근아세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스 보호 효과는 ROS 생성에 억제와 직접적인 연관성이 있었으며, 특히 진심유생환 70% 에탄올 추출물이 우수한 항산화력이 보여주었다.

결론적으로 진심유생환은 산화적 스트레스에 대한 보호 잠재력을 보여주었고, 아울러 C2C12 근아세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스에 대한 보호 효과는 열수 추출물보다 에탄올 추출물에서 우수하였다.

## 참고문헌

1. AM Dosunmu-Ogunbi, KC Wood, EM Novelli, AC Straub. Decoding the role of SOD2 in sickle cell disease. *Blood Adv.* 2019;3(17):2679-87.
2. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(12):1673-706.

3. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(7):1957-97.
4. Brillo V, Chieragato L, Leanza L, Muccioli S, Costa R. Mitochondrial dynamics, ROS, and cell signaling: A blended overview. *Life*. 2021; 11(4):332.
5. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma M. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell. Physiol Biochem*. 2017;44(2): 532-3.
6. Benhar M. Oxidants, antioxidants and thiol redox switches in the control of regulated cell death pathways. *Antioxidants*. 2020;9(4):309.
7. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2015;6(3):456-80.
8. Butterfield DA, Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2019;20(3): 148-60.
9. Pignatelli P, Menichelli D, Pastori D, Violi F. Oxidative stress and cardiovascular disease: New insights. *Kardiologia Polska*. 2018;76(4): 713-22.
10. Klaunig JE. Oxidative stress and cancer. *Curr Pharm Des*. 2018; 24(40):4771-8.
11. Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1-18.
12. Muhammad F, Liu Y, Zhou Y, Yang H, Li H. Antioxidative role of Traditional Chinese Medicine in Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol*. 2021;25:114821.
13. Lim S, Jeong I, Cho J, Shin C, Kim KI, Shim BS, et al. The Natural products targeting on allergic rhinitis: From traditional medicine to modern drug discovery. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(10):1524.
14. Chen H, He Y, Chen S, Qi S, Shen J. Therapeutic targets of oxidative/nitrosative stress and neuroinflammation in ischemic stroke: Applications for natural product efficacy with omics and systemic biology. *Pharmacol Res*. 2020;158:104877.
15. Chen XZ Compile. Two hundred prescriptions for prolonging life, Beijing, China traditional Chinese Medicine Press; 1991. p. 168.
16. Li L, Wang TS. Study on the History and Modern Pharmacology of Wuzi Yanzong Pills. *Clinical journal of traditional chinese medicine*. 2018;30(4):608-611.
17. An TG, Jeong JC. Effects of Ojawan on the ethanol-induced erectile dysfunction in rats. *Korean J. Orient. Int. Med*. 2005;26(3): 605-14.
18. Chang MS, Lee HC, Lee SH, Park SK. Study of Ojayeonjonghwan on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in male reproductive GC-1 germ cell lines. *J. of The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study* 2021;29(1):1-8.
19. Choi SW. Effect of Korean herbal formula (modified Ojayeonjonghwan) on androgen receptor expression in an aging rat model of late onset hypogonadism. *Dept. of Clinical Medicine Graduate School, The Catholic university, Korea* 2021.
20. Bae SR. Effects of a combination of herbal extracts (modified Ojayeonjonghwan (Wuzi Yanzong Wan)) on partial urethral obstruction-induced detrusor overactivity in Rats : Impact on the nitric oxide pathway and oxidative stress. *Dept. of Philosophy in Medical Science Graduate School, The Catholic University, Seoul, Korea* 2019.
21. Kim KY. Anti-inflammatory effects of Ojayeonjonghwan and its component, *Gomisin-A*. *Dept. of Oriental Medical Science Graduate school, Kyung Hee University, Seoul, Korea*

- 2010.
22. Kim KH, Ding GX, Kim KH, Ko SG. Effect of Ojayeonjonghwan(五子衍宗丸) on antioxidant capacity in D-galactose induced aging rats. *Kor. J. Oriental Medical Society* 2005;9(1): 49-63.
  23. Kim GY, Lee HG, Kim EJ. Effects of extracts from Oja on testosterone synthesis in leydig cells. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2015; 29(5):403-8.
  24. Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. Super-oxide Ion : Generation and Chemical Implications. *Chem. Rev.* 2016;116(5):3029-85.
  25. Alan MR, WangY, Shah J, Gordon S, Fager M, Butter PP, et al. Proton beam radiation induces DNA damage and cell apoptosis in glioma stem cells through reactive oxygen species. *Sci. Rep.* 2015;5:13961.
  26. Patwardhan J, Bhatt P. Flavonoids derived from *Abelmoschus esculentus* attenuates UV-B induced cell damage in human dermal fibroblasts through Nrf2-ARE pathway. *Pharmacogn. Mag.* 2016;12(suppl.2):S129-138.
  27. Treberg JR, Braun K, Selseleh P. Mitochondria can act as energy-sensing regulators of hydrogen peroxide availability. *Redox Biol.* 2019; 20:483-8.
  28. Angelova PR, Abramov AY. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. *Free Radic. Biol Med.* 2016;100: 81-5.
  29. Gill T, Levine AD. Mitochondria-derived hydrogen peroxide selectively enhances T cell receptor-initiated signal transduction. *J. Biol. Chem.* 2013;288(36):26246-55.
  30. Grune T. Oxidative stress, aging and the proteasomal system. *Biogerontology.* 2000;1(1): 31-40.
  31. Ramos-Tovar E, Muriel P. Free radicals, anti-oxidants, nuclear factor-E2-related factor-2 and liver damage. *J. Appl. Toxicol.* 2020;40 (1):151-168.
  32. Sun XB, Xu HB. Mordern pharmacology and clinic of chinese traditional medical formulae. Tianjin, Tianjin science & technology translation & publishing Co., LTD; 2004. p. 610-611.
  33. Dept. of Herbal Phrmacology at College of Oriental Medicine Co edited. Herbal Pharmacology, Seoul, Yonglim publishing company; 2011. p. 411-412, 415-416, 659-660, 666-669.
  34. Wang XJ, Zuo YM, Wang DX, Zhu Q. Progress in anti-inflammatory action of active ingredient of Chinese drugs mediated by NO. *Immunological Journal.* 2015;31(5):435-40.
  35. Wang YY, Wang FL, Mao ZW, Zhang H, Lyu X, Huang LL, et al. Advances in research on active ingredients and mechanism of action of traditional chinese medicine with anti-aging effects. *Journal of liaoning universitiy of TCM.* 2021;21(5):142-7.
  36. Kang JJ, Jeong JC, Shin US. Protective effects of extract of *Brousson etiae fructus* on the nitrite level and the nitric oxide synthase activity in corpus cavernosum of streptozotocin-induced diabetic rat. *Jounral of Korean Oriental Medicine.* 1998;19(2):112-24.
  37. Kim HJ. *Broussonetia kazinoki* Siebold fruit extract attenuates  $\beta$  cell toxicity in streptozotocin-induced diabetic mice. *Major in Life Pharmacy Dept. of Pharmacy Graduate School, Gachon University, Korea* 2020.
  38. Yang CY, He L. Neuroprotective effects of sinapine on PC12 cells apoptosis induced by sodium dithionite. *Chinese J of Natural Medicines.* 2008;6(3):205-9.
  39. Matth B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J of Agricultural and Food Chemistry.* 2002;50(12): 3444-52.
  40. Cha JY. Inhibition of gene associated with dyslipidemia and antioxidative effect of artemisia iwayomogi, Curcumae Radix and Raphani Semen (ACR) on HepG2 cell model Dept.



- of Korean medicine Graduate School, Daejeon University, Korea 2017.
41. Duan YS, Kim MA, Seong JH, Cung HS, Kim HS. Antioxidative activities of various solvent extracts from haw (Crataegus pinnatifida Bunge). *Korean J Food Preserv.* 2014;21(10): 246–53.
  42. Duan YS, Kim MA, Seong JH, Cung HS, Kim HS. Antioxidative activities of various solvent extracts from haw (Crataegus pinnatifida Bunge). *Korean J Food Preserv.* 2014;21(10): 246–53.
  43. Chen HY. Study on anti-aging activity and mechanism of Hawthorn flavanol. *Dept. of Chinese medicine Graduate School, Hebei Agricultural University, China*, 2013.
  44. Im DY, Lee KI. Antioxidative activity and active compound analysis of the extract and fractions of Corni Fructus. *Kor. J. Pharmacogn.* 2017;48(3):208–12.
  45. Cui C. Study on the comparison of chemical constituents of Cornus officinalis before and after fermentation. *Dept. of Chinese Medicine Graduate school, Shandong University, China* 2012.
  46. Farjadmand F, Karimpour-Razkenari E, Nabavi SM, Ardekani MRS, Saeedi M. Plant polyphenols: Natural and potent UV-protective agents for the prevention and treatment of skin disorders. *Mini Rev Med Chem.* 2021; 21:576–85.
  47. Perea-Domínguez XP, Hernández-Gastelum LZ, Olivas-Olguin HR, Espinosa-Alonso LG, Valdez-Morales M, Medina-Godoy S. Phenolic composition of tomato varieties and an industrial tomato by-product: free, conjugated and bound phenolics and antioxidant activity. *J Food Sci Technol.* 2018;55(9):3453–61.
  48. Mosca N, Petrillo S, Bortolani S, Monforte M, Ricci E, Piemonte F, Tasca G. Redox homeostasis in muscular dystrophies. *Cells.* 2021; 10:1364.
  49. Moulin M, Ferreiro A. Muscle redox disturbances and oxidative stress as pathomechanisms and therapeutic targets in earlyonset myopathies. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;64:213–23.
  50. Shin DC, Kim GC, Song SY, Kim HJ, Yang JC, Kim BA. Antioxidant and antiaging activities of complex supercritical fluid extracts from Dendropanax morbifera, Corni fructus and Lycii Fructus. *Kor. J. Herbology.* 2013; 28(6):95–100.
  51. Kim OK. Antidiabetic and Antioxidative Effect of Lycii fructus in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Kor. J. Pharmacogn.* 2009;40 (20):128–36.
  52. Cho YJ, Chun SS, Cha WS, Park JH, Lee KH, Kim JH, Kwon HJ, Yoon SJ. Antioxidative and Antihypertensive Effects of Lycii fructus Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2005; 34(9):1308–13.
  53. Kim SH, Choi JW. Protective Effects of Water Extract from Cuscutae Semen on Ketocozazole-Induced Oxidative Stress in Testicular Damage Male Rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2011;25(3):417–24.
  54. Kim JH, Jung EH, Yoo DY. Effects of Cuscutae Semen Water Extract on Apoptosis of MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *J Korean Obstet Gynecol.* 2014;27(2):12–22.
  55. Lee IS, Kim YM, Kim HT. The Effects of Anti-Oxidant and Phototoxic Inhibitory Activity of Rubus coreanus Fruits. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2015;28 (1):1–10.
  56. Kim YJ, Chang MS, Park SK. Antioxidant Effect of Rubi Fructus on TM4 Sertoli Cells. *Herbal Formula Science.* 2018;26(2):103–11.
  57. Jung ES, Cho HK, Kim YS, Yoo HR, Seol IC. Antioxidant and Anti-dyslipidemic Effect of Artemisiae iwayomogii Herba, Curcuma longae Radix, and Plantaginis Semen Complex Extract (ACP) on HepG2 Cells. *Physiol & Pathol*

*Korean Med.* 2018;32(1):13-23.  
58. Choo BK, Chung KH, Seo YB, Roh SS.  
Antioxidant, Antiinflammation Id Hepatop-

rotective activity of Schizandrae Fructus pro-  
cessed with differentiated steaming number.  
*Kor. J. Herbology.* 2013;28(2):83-92.