Effect of *Polygala radix* Hot Water Extract on Biological Activity in PC12 Cells

Hyang Nam and Moon-Moo Kim*

Department of Chemistry, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received July 29, 2013 / Revised August 26, 2013 / Accepted August 27, 2013

The root of *Polygala radix* has been widely known as an oriental traditional medicinal stuff that improves memory. However, its mechanism of action remains unclear. In this study, the effect of *Polygala radix* hot water extracts (PRHWE) on cognitive function related to the activity of acetylcholinesterase (AChE) derived from neural cells (PC12) in addition to antioxidant activity was examined both in a cell-free system and live cells. First, in the study on cell viability using an MTT assay, PRHWE did not exhibit any cell toxicity at 0.1% (w/v) or below. It also was observed that PRHWE increased the scavenging activity of DPPH radical, hydrogen peroxide and superoxide, reducing power in a dose-dependent manner. In particular, PRHWE had a protective effect on DNA oxidation induced by hydroxyl radicals. Additionally, it inhibited the production of inducible nitric oxide in neuronal cells. Furthermore, the AChE activity decreased with increasing concentrations. In addition, PRHWE increased the expression level of SOD-1 and NOS-2 in PC12 cells. Moreover, the transcriptional activities of p53 and NF- κ B were reduced in the presence of PRHWE in an experiment using a reporter gene assay. Therefore, these results prove that PRHE has antioxidative and protective effects on neuronal cells, suggesting that it may have great potential as a therapeutic agent for human health.

Key words : *Polygala radix*, antioxidant, PC12, acetylcholinesterase, nitric oxide

서 론

현대사회는 도시화, 공업화로 인한 환경오염과 과다한 스트레스와 음주 및 흡연으로 인하여 항산화 물질의 요구량이 증가되고 있다. 항산화 물질은 생체 내에서 생성되는 활성산소 및 이에 의해 유도되는 지질과산화 반응을 억제하며 고혈압, 협심증, 당뇨병과 같은 성인병을 예방해 주며 나아가 발암 및 노화를 억제하는 생리활성 물질로서 크게 각광을 받고 있다 [17]. 또한 최근 암 예방(chemoprevention)을 위한 물질의 항산화 효과에 대한 실험들이 방대하게 이루어지고 있다[4]. 국외에서는 주로 정제된 단일 성분에 대한 연구가 많이 진행되는 반면 국내에서는 에탄을 추출물이나 열수 추출물 등을 농축한 분획에서 항산화 활성을 많이 연구하고 있다[32]. 현재 보고된 대표적 항산화 물질로는 ascorbic acid, tocopherol과 같은 비타민류[3], caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid와 같은 페놀산류, catechine과 같은 탄닌류, quercetin, kampferol과 같은 플라보노이드류[18] 그리고 카로티노이드류와 같은 물질들이다. 생체 내에서는 산화제의 공격과 항산화제의 방어

가 조화를 이루면서 세포는 항상성을 유지하면서 살아가고 있다. 하지만 이러한 조화가 불균형을 이루어 활성 산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)이 너무 많이 생성되거나 항산화 시스템의 기능이 저하되는 상황에서 세포는 ROS에 의해 유해작용을 받는데 이를 “산화적 스트레스(oxidative stress)”라고 한다[33]. 이러한 활성산소종으로는 O_2^- (superoxide anion), $\cdot OH$ (hydroxyl radical), H_2O_2 (hydrogenperoxide)이 있으며, 지질 과산화 (ROOH)나 free radical ($ROO\cdot$, $RO\cdot$) 등의 과산화지질도 ROS에 포함된다[38]. 활성 산소종과 그 유도체는 생체 내에서 많은 분자, 단백질, DNA 등을 공격하여 세포의 노화, 변형을 초래하며, 더 나아가서는 암을 유발 시키게 된다[22]. 활성산소에 의해서 DNA, RNA 효소 및 세포막을 손상시켜 세포들이 죽음으로써 성인병, 암, 등 여러가지 질병을 일으키고 병적인 노화를 가속화 시킨다[10]. 한편, 생체 조직들은 활성산소 독성에 대항하여 방어기전을 가지고 있는데 그 효과를 반감시키거나 제거하는 능력을 가지고 있으며 항산화제 영양물을 섭취함으로써 농도를 낮추거나 지연시키는 효과를 가진다. 현재 국내에서는 천연물에 대한 항산화 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들어 약용으로 이용되고 있는 홍삼[31], 어성초[14], 갈근[9], 흑마늘[21, 30] 등에 대한 연구와 식용 채소류로 흔히 이용되는 다시마[11]나 미역[16], 김을 포함한 최근부터 대두되고 있는 강황의 주성분인 curcumin [1]과 동의보감에 등록된 원지 등을 들 수 있다. 이러한 천연물 중 원지(*Polygala radix*, PR)는 원지과(polygalaceae)에 속하는 다년생 초본으로서 우리나라를 비롯하여 중국 등에서 서식하고

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1511, Fax : +82-51-890-2620

E-mail : mmkim@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

있는데, 오래 전부터 원지는 신경안정 및 항 정신병 효과를 가진 천연약물로 사용 되어 왔다[23]. 원지는 원지과에 속한 다년생 초본인 원지의 뿌리를 건조한 약재로 널리 알려진 인삼의 주요한 성분이다[2]. 원지의 다양한 생물학적 효능이 밝혀져 있으나, 인지능과 관련된 효능은 현재까지도 명백하지 않다. 그러므로 본 연구에서는 원지추출물의 항산화 효과를 조사하기 위하여 동맥협착증에서 과생된 신경세포의 일종인 PC12 (pheochromocytoma) 갈색종 세포를 배양하여 acetylcholinesterase (AChE)가 얼마나 억제되는지에 대한 것과 PC12 세포에서 효과적인 농도로 세포에 처리하여 nitric oxide를 분비시키는지 원지추출물의 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시료의 제조

본 실험에 사용한 원지는 흐르는 물에 깨끗이 세척한 다음 자연 건조한 후, 수 차례 물로 세척하여 세척·건조된 상기 원지를 각각 증류수와 1:10의 중량 %비로 혼합하여 진탕기로 80℃에서 3 시간 동안 진탕하여 2회 반복하여 열수 추출하였고, 얻어진 용액을 합하여 회전 진공 농축하여 용매를 증발시켜 추출물을 얻었다. 상기 추출물을 여과한 후, 여과된 여액을 동결건조하여 분말 형태의 원지 열수추출물을 얻는다. 분말 형태의 원지 열수추출물을 시험농도로 희석하여 본 연구에 사용하였다.

세포배양

세포배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA, penicillin / streptomycin / amphotericin (각각 10,000 U/ml, 10,000 µg/ml 및 2,500 µg/ml), fetal bovine serum (FBS) 시약은 Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, Scotland)로 부터 구입하였다. PC12 세포는 American Type of Culture Collection (Manassas, VA, USA)로 부터 제공받았다. 원지, MTT reagent, gelatin, agarose와 spermidine 기타 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였다.

MTT assay

Hansen [13]의 방법에 따라 PC12 세포에 대한 PRHWE의 세포독성을 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 측정하였다.

DPPH radical assay

Brand-Williams [5] 실험방법을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 원지의 소거능력을 측정하였다. 시험농도의 PRHWE를 DPPH 용액을 가하여 10 분 동안 잘 혼합한 다음, 실온에서 20 분 동안 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 함량은 시료 첨

가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

Hydrogen Peroxide Scavenging Assay

Choi 등[6]의 실험방법을 변형하여 Hydrogen peroxide에 대한 소거활성을 측정하였다. 80 µl의 원지, 20 µl의 10 mM hydrogen peroxide 및 100 µl의 0.01 M 인산완충용액(pH 5.0)을 37℃에서 5 분 동안 반응시켰다. 그 후, 15 µl의 1.25 mM ABTS 및 30 µl의 peroxidase 37℃에서 10 분 동안 반응시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 PRHWE의 항산화 활성은 시료 첨가 전후의 흡광도 비를 % 값으로 환산하였다.

환원력 assay

Oyaizu [26]의 방법에 따라 측정하였다. 시료 1 ml에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 ml씩 차례로 가하여 교반한 후 50℃의 수욕상에서 20 분 동안 반응시켰다. 여기에 10% TCA (trichloroacetic acid)용액을 1 ml 가하여 13,500×g에서 15 분 동안 원심분리하여 상등액 1 ml에 증류수 및 ferric chloride 각 1 ml을 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 환원력은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하였다.

Hydroxyl radical assay

Chung 등[37]의 실험방법을 변형하여 hydroxyl radical을 측정하였다. 50 µl의 10 mM FeSO₄와 50 µl의 10 mM H₂O₂를 이용한 Fenton 반응으로 hydroxyl radical을 발생시켰다. 발생된 radical을 25 µl의 10 mM EDTA, 25 µl의 10 mM 2-deoxyribose, 150 µl의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)의 존재 하에서 시험농도의 원지와 반응시킨 다음 37℃에서 4 시간 동안 반응시켰다. 여기에 250 µl의 2.8% TCA (trichloroacetic acid) 및 250 µl의 1% TBA (thiobarbituric acid)를 첨가한 후에 100℃로 가열하였다. 그 후 상온에서 식힌 다음 1,000×g에서 5 분 동안 원심분리 하였다. 회수한 상등액은 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며 PRHWE의 항산화 활성은 시료 첨가 전후의 흡광도 비를 % 값으로 환산하였다.

Superoxide anion 라디칼 소거능 측정

Superoxide anion 라디칼 소거능은 각 시료 용액 0.1 ml과 0.1M potassium phosphate buffer (pH7.5) 0.6 ml에 0.4 mM xanthine과 0.24 mM nitro bluetetrazolium (NBT)를 녹인 기질액 1 ml를 첨가하고 xanthineoxidase (0.049 U/ml) 1 ml를 가하여 37℃에서 20 분간 반응시킨 후 1 N-HCl 1 ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 superoxide anion radical의 양을 560 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

Hydroxyl radical에 의한 DNA 손상을 전기영동법으로 분석

Genomic DNA는 약간 변형된 표준 과정에 따라 PC12 세포

로부터 추출하였다[29]. Fenton 반응에 의하여 발생된 hydroxyl radical에 노출된 DNA 산화 는 기존에 실험된 방법에 따라 수행되었다[24]. 먼저 100 μ l의 DNA 용액에 시험농도의 PRHWE, 200 μ M FeSO₄, 1 mM H₂O₂ 및 50 μ g/ml genomic DNA를 첨가하였다. 반응 혼합물을 30 분 동안 상온에서 반응시킨 후 10 mM EDTA를 첨가하여 반응을 종결시킨다. 1 μ g의 DNA를 포함하는 20 μ l의 반응혼합물을 1% agarose gel에서 100 V로 30 분 동안 전기영동 하였다. Gel은 1 mg/ml ethidium bromide로 염색하여 물로 세척하여 UV로 LAS3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

Nitric oxide 측정

NO 측정은 cell의 상층액에서의 nitric oxide (NO)의 생성량을 nitrite and nitrate로서 측정을 하였다. Nitrite에 대한 nitrate로 환원된 후의 안전한 형태인 griess reagent (Sigma, USA)를 사용하였으며, 24 well plate에 PC12 세포를 confluence가 80% 일 때, PBS로 2 번 washing한 후에 모든 well에 다 무혈청 배지를 넣어서 12 시간 이상 배양하였다. 48 시간 후에 시료를 100 μ g/ml의 농도로 처리하여 실험하였다. NO 생성량은 시간별로 상층액을 모아 griess reagent로 10 분간 차광시켜 반응시킨 후에 540 nm에서 흡광도로 측정하였다. 저해율(%)=(1-시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도)×100

Acetylcholinesterase (AChE) 활성 측정

PC12 세포로부터 분리한 AChE (25 mU/ml) 50 μ l을 반응효소로, 0.1 M의 인산나트륨 완충액(pH 8.0)에 녹인 1 mM의 아세틸 콜린 요오드화물을 기질로 하였고, 발색 시약은 39.6 mg의 5,5'-thio-bis (2-nitrobenzoate) 및 15 mg의 탄산수소나트륨을 0.1 M 인산나트륨 완충액(pH 7.0) 10 ml에 용해하여 제조하였다. 효소반응은 다음과 같이 전개하였다. 2 ml의 0.1 M 인산나트륨 완충액(pH 8.0)에 원지의 열수추출물의 혼합물(최종 반응용액에서 농도가 1 mg/ml 가 되도록 제조), 200 μ l의 10 mM DTNB 용액 및 100 μ l 의 효소(0.03 U)를 가하고 37°C에서 10 분간 전 유지시킨 다음, 기질 200 μ l를 가해 3 분간 반응시킨 후, 분광광도계로 412 nm 에서 흡광도 값을 측정하였다. AChE의 활성은 시료 첨가 전후의 흡광도 비율 % 값으로 환산하였다.

Western blot analysis

PC12 세포에 용출 완충용액(50 mM Tris - HCl, pH 7.5, 0.4% Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 80 μ g/ml leupeptin, 3 mM NaF and 1 mM DTT)을 첨가하여 4°C에서 30 분 동안 처리하였다. 10 μ g의 세포용출액을 10% Tris - HCl gel에서 전기영동 후 단백질을 전기적으로 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 그 다음 10% skim milk를 nitrocellulose membrane에

전 처리하고 목적 단백질에 대한 1차 항체(anti-SOD-1, anti-NOS-2, anti-NF- κ B-p50, anti-p53, anti-p-p53, anti-beta-actin)를 처리한 다음 2차 항체를 처리 후, chemiluminescent ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 목적단 단백질을 검출하였다. Western blot의 band는 LAS3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

Transfection and reporter gene assay

PC12세포를 6well plate에 분주하고 37°C에서 배양하였다. 세포가 약 70-80%의 증식했을때, 혈청이 함유되지 않은 DMEM 배지로 세척하고 5 시간 동안 혈청 및 항생물질 없이 DMEM로 배양하였다. 이어 세포를 Lipofectamine 시약(Invitrogen, USA)으로 well 당 DNA 총량을 조절한 p53 및 NF- κ B promoter가 삽입된 pGL3 reporter vector (p53-pro-Luc 및 NF- κ B-pro-Luc) 1 μ g 및 DNA를 300 ng 혹은 HSIR2 expression vector 함유 DNA 혼합물로 transfection 시켰다. 72 시간 배양한 후, 세포를 용리시키고, luminometer (Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 luciferase 활성을 측정하였다. Well당 transfection 된 세포수의 차이를 보정하기 위하여, 기질로서 α -nitrophenylbeta-galactopyranoside를 사용하여 β -galactosidase 활성을 모니터링 하였다. 데이터를 "평균±표준편차(n=3)"로 나타내었다. 얻어진 Student's t-test를 이용한 대조군과 비교하여 통계적으로 분석하였다.

통계처리

각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 그 결과를 얻어 각각의 시료농도에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료 농도군에 대한 유의차 검정은 대조군과 비교하여 Student's test 한 후 $p < 0.05$ 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

결 과

세포성장 에 대한 원지 열수 추출물의 효과

PRHWE가 PC12 세포에 독성을 미치지 않는 농도를 결정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 PRHWE는 대조군과 비교하여 0.1% 이하의 농도에서 13.6%의 세포 생존력이 증가하였다. 그 이상의 농도에서는 급격히 생존율이 저하하였다. 따라서 PRHWE는 0.1% 이하의 범위에서는 세포독성이 없는 것으로 판단되어 이 농도 이하에서 실험을 수행하였다.

원지 열수 추출물의 DPPH, hydrogen peroxide, reducing power 및 hydroxyl radical에 대한 항산화 효능

생체에서 산화적 스트레스와 관련되어 있는 DPPH, hydrogen peroxide, hydroxyl radical과 같은 활성산소종에 대한

Fig. 1. Effect of PRHWE on cell viability of PC12 cell line. PC12 cells were treated with PRHWE at the indicated concentration and cell viability was determined by MTT assay after 24 hr. Data are given as means of values $\pm$ SD from three independent experiments.

PRHWE의 소거능력 및 환원력에 대하여 조사하였다. DPPH radical 소거법은 DPPH radical이 항산화 물질로 인해 환원되면, 자색이 탈색되는 정도를 지표로 하여 지질 과산화의 초기 억제 정도를 예측 할 수 있다. PRHWE의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정된 결과 Fig.

2A에서 보는 바와 같이, DPPH에 대하여 PRHWE의 소거효과가 있는 것으로 나타났다. 양성 대조군은 vitamin C를 사용하였는데 같은 농도 처리군에서 80%의 소거효과를 나타내었다. 그 다음 PRHWE의 H_2O_2 소거능을 확인 하기 위하여 hydrogen peroxide scavenging assay를 수행 하였다. Fig. 2B에서 보는 바와 같이 PRHWE는 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1%로 처리하여 농도 의존적으로 소거능이 증가함을 확인 할 수 있었다. PRHWE의 환원력 측정에는 potassium ferricyanide reduction법을 사용하여 PRHWE의 금속이온을 환원시키는 환원력을 조사하기 위하여 흡광도를 측정된 결과, 양성 대조군은 10 μ g/ml의 vitamin C를 사용하였다. Vitamin C는 10 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비교하여 432%의 환원력을 나타냈으며, PRHWE는 0.00625% 이상의 농도에서 환원력이 대조군에 비하여 Fig. 2C에서 일정함을 확인했다. PRHWE는 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1%의 농도로 처리한 경우 각각의 환원력은 132%, 171%, 233%, 344%, 550%로 나타나 그 효과가 우수한 것으로 나타났다. 마지막으로 hydroxyl radical에 대한 PRHWE에 의한 항산화 효과를 조사하기 위하여 50 μ l의 10 mM $FeSO_4$ 와 50 μ l의 10 mM H_2O_2 를 이용한 Fenton 반응으로 hydroxyl radical를 발생시켰다. 친수성 항산화제인 vitamin C에 대한 억제효능을 평가한 결과, Fig. 2D에서 보여지는

Fig. 2. Scavenging activities of PRHWE on DPPH radical, hydrogen peroxide, reducing power and hydroxyl radical. (A) DPPH radical, (B) hydrogen peroxide, (C) reducing power, and (D) hydroxyl radical were evaluated in the presence of *Polygala radix*. After PRHWE at the indicated concentration was reacted with each radical, the optical density of each reaction mixture was measured at a specific wavelength with spectrophotometer. Data are given as means of values $\pm$ SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) using Student's t test.

바와 같이 250 µg/ml 농도군에서 180%의 hydroxyl radical 억제효과가 관찰되었다. PRHWE는 농도 의존적인 효과는 보여주지 않았으나 0.05% 이상의 농도에서 유의성 있는 hydroxyl radical 억제효과를 관찰 할 수 있었다.

원지 열수 추출물의 superoxide assay에 대한 항산화 효과

Xanthine이 xanthin oxidase에 의한 반응물로 superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$)이 생성된다. 이러한 $\cdot\text{O}_2^-$ 이 NBT라는 환원제에서 전자를 얻어 환원되면 색의 변화가 일어난다. 원지의 superoxide 분해 소거효과를 조사하기 위해 positive군으로 SOD를 처리하였다. SOD는 초과산화이온이 가지고 있는 자유 라디칼 음이온은 세포에 해로운 영향을 미치기 때문에 SOD는 초과산화이온을 산소와 과산화수소로 바꿔 줌으로써 독성으로부터 세포를 방어하는 역할을 한다. 산소에 노출되는 거의 모든 세포에서 이러한 SOD에 의한 항산화 방어기작이 중요하며, 일부 유산균들의 경우 다른 방어기작을 사용하는 것으로 알려져 있다. Fig. 3에서 보는 바와 같이, PRHWE는 SOD 만큼의 감소효과를 보여주고 있다.

원지 열수 추출물의 Hydroxyl radical에 의한 DNA 손상 에 대한 항산화 효과

Fenton reaction에 의해 생성되는 Hydroxyl radical에 genomic DNA가 노출되면 분해가 일어난다. PRHWE의 DNA 손상에 대한 항산화 효과를 조사하기 위하여 PC12 세포로부터 genomic DNA를 분리하여 Fenton reaction에 의하여 생성된 Hydroxyl radical에 노출시켰다. Fig. 4에서 보는 바와 같이, Fenton reaction 군과 비교시 0.1%의 원지의 농도에서 DNA 분해가 억제되어, PRHWE가 이 농도에서 hydroxyl radical에 의한 DNA의 손상을 유의성 있게 감소시킴을 확인할 수 있었다.

PC12 세포에서 원지 열수 추출물의 활성 산소종 및 NO

Fig. 3. Scavenging activity of PRHWE on superoxide anion radical. Superoxide anion radical scavenging activity of hot water extracts from PRHWE extracts. Level of significance was identified statistically (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) using Student's *t* test.

Fig. 4. Protective effect of PRHWE on DNA oxidative damage induced by hydroxyl radical. Genomic DNA purified from PC12 cells was pre-treated with for 1 hr before exposed to $\cdot\text{OH}$ using Fenton reaction. After 30 min, reaction mixture containing about 1 µg of DNA was electrophoresed on a 1% agarose gel for 30 min at 100 V and visualized by UV light after stained with 1 mg/ml ethidium bromide. Data are given as means of values $\pm$ SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (***, $p < 0.001$) using Student's *t* test.

radical 생성의 감소효과

세포 수준에서 PRHWE의 항 염증과 활성산소억제 능력을 나타내는지 확인하기 위하여, PC12 세포에 PRHWE를 처리하여 NO생성억제 효과를 확인하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, PC12 세포는 자연적으로 NO 라디칼이 생성이 되어 증가하는 것을 확인하였다.

원지 열수 추출물에서 아세틸 콜린을 분해하는 효소인 acetylcholinesterase 활성을 억제 하는 효과

PC12 세포의 세포막을 터뜨려 lysate를 추출하여 아세틸 콜린을 분해하는 효소인 acetylcholinesterase 억제 능력을 나타내는지 확인하기 위하여, PRHWE를 처리하였다. Control군에는 PC12 cell lysate 만을 처리하였고, sample군에는 PRHWE를 처리하여 5 분, 10 분, 15 분간 변화를 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이, 시간이 지남에 따라 안정적으로 증가하는 것을 확인하였다.

PC12 세포에서 SOD-1, NOS-2, NF-κB, p53 및 p-p53 단백질의 발현에 대한 원지 열수 추출물의 효과

PRHWE이 항산화 효소의 발현을 조절하는데 가장 중요한 전사인자인 NF-κB 와 널리 알려진 항산화 효소인 SOD-1,

Fig. 5. Effect of PRHWE on production of nitric oxide in PC12 cell line. Cells were pretreated with different concentrations of PRHWE. Conditioned medium was mixed with an equal amount of the Griess reagent and the absorbance, measured at 550 nm, represented the amount of NO_2^- (stable oxidation product of NO) in the medium. The values obtained were compared with those of standard concentrations of sodium nitrite dissolved in (A) Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) without FBS(Fetal bovine serum), (B) DMEM with FBS and the concentrations of nitrite in conditioned media of sample-treated cells were calculated. Data are given as means of values $\pm$ S.D. from three independent experiments (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

Fig. 6. Inhibitory effect of PRHWE on AChE activity in PC12 cell line. Nuclear lysates derived from PC12 cells were reacted with PRHWE at the indicated concentration, and AChE activity was measured after 20 min. The enzyme activity was calculated as compared to the control activity. Data are given as means of values $\pm$ SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (*, $p < 0.05$) using Student's t-test.

NOS-2, p53 및 p-p53의 단백질 발현을 조사하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이, PRHWE는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 세포 내 항산화에 중요한 역할을 한다고 알려진 SOD-1 (Superoxide dismutase-1)와 NOS-2 (Nitric oxide synthase-2), NF- κB (Nuclear Factor-KappaB)의 단백질 발현을 증가시켰다. 또한 p53 (tumor protein 53)과 p-p53 (phosphorylated p53)의 발현을 억제되는 것으로 나타났다.

Fig. 7. Effect of PRHWE on protein expressions of SOD-1, NOS-2, NF- κB , p53 and p-p53 in PC12 cell line. PC12 cells were treated with PRHWE at 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05 and 0.1%. Western blot analyses of cell lysates were performed using antibodies as indicated. The expression level of β -actin was used as a control for normalization of target proteins.

Transfection한 유전자를 luciferase로 발광시켜 Reporter gene assay를 측정

Ampicillin이 처리된 p53-pro-Luc, NF- κB -p50-pro-Luc 플라스미드 유전자에 luciferin을 산화시켜 방출하는 빛을 luminometer로 측정하여 반응의 진행 정도를 측정하였다. pro-Luc의 발광으로 유전자를 transfection하였다. 그 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이, 시간이 경과함에 따라 PRHWE에 대한 PC12 세포의 p53와 NF- κB 유전자 모두 감소했다.

고 찰

원지의 성분과 효능에 관련된 연구결과는 비교적 많지 않은

Fig. 8. Effect of PRHWE on transcriptional activities of p53 and NF-κB promoters in PC12 cells. The cells were transfected with (A) p53-promoter-luciferase and (B) NF-κB-promoter-luciferase construct and pcDNA 3.1 vector. After 72 hr transfection, cells were assayed for a SA-beta gal as described in "Experimental Procedures". Transcriptional activity of NF-κB was measured by luciferase assay as described in "Experimental Procedures". Data represent the mean±SD of at least three independent experiments. Results were statistically significant (*, $p < 0.05$) using Student's t-test.

편으로 원지의 함유성분은 polysaccharide, flavonoid, glycoside류, xanthone o-glycosides, xanthenes 등이 보고되고 있으며, 효능에 관한 연구로는 안신작용, 이노효과 및 중추억제작용, 뇌성상세포로부터 염증성 세포활성물질 분비의 억제효과, 항정신성 및 항염증 작용 등이 보고 된 바 있다[20]. 원지의 뿌리에는 polygalitol, tenuigenin, xanthone 유도체 등이 포함되어 있으며, 이들 성분은 아드레날린이나 글루카곤의 혈당 상승작용을 증대하는 세포 내 인자인 cAMP의 활성을 의미있게 억제하는 것으로 알려져 있다[12]. 또한 많은 생약들이 학습 기억능력을 높이는 작용이 있다고 알려져 있는데 이는 생약의 신경계 흥분작용, 뇌의 미세순환 개선, 뇌혈류량 증가 등과 관련된 것으로 보이며, 또 뇌 내 단백질 합성증가, 대뇌 발육촉진 등의 작용도 학습능력을 높이는 데 기여한다고 보고되고 있다[25]. 최근에는 단일약물 및 복합처방을 이용하여 뇌의 노화와 연계하여 노화를 유발하는 항산화 작용에 대한 연구를 활발하게 진행하여 왔고, 그 외에도 기억과 행동에 미치는 영향에 대한 연구와 뇌성상세포로부터 염증성 세포활성물질인 tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-1 및 항체 생성의 억제에 관한 연구가 보고 되었다[34].

따라서 본 연구에서는 두뇌의 산화적 손상과 관련하여 원지 열수 추출물의 항산화 효과를 조사하였다. PRHWE는 세포독성이 없는 농도에서 DPPH radical 소거능력, reducing power, hydroxyl radical, hydrogen peroxide의 소거효과가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 PRHWE이 산화적 스트레스로 유도된 PC12세포의 손상을 방어할 수 있으며, 이 같은 결과는 또한 PC12 세포에서 산화적 스트레스에 의하여 손상된 세포 생존율을 증가시켰다는 보고와 비교해 볼 때 일치하는 것을 수 있다[36]. *In vitro* 실험에서 PRHWE은 hydrogen peroxide의 효과가 탁월한 것으로 나타났고, nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향에서 PC12 세포에서 NO 생성이 억제되었는데 이전 연구보고와 일치하였다[27]. 현재의 연구에서 PRHWE의

효과를 보면 뇌 신경세포의 일종인 PC12 세포에서 DNA산화에 대한 보호 효과가 있어 뇌와 중추신경계에 작용할 수 있으면 기억력 향상에 도움을 줄 수 있는데 이러한 결과는 원지가 중추신경계에 작용을 하여 도파민 수용체를 매개로 하여 기억력 감퇴를 억제한다는 연구보고에 의하여 지지된다[19].

특히 원지는 효능이 서로 비슷한 약물을 함께 혼합 배합하여 상호작용을 하게 한다는 연구결과가 잘 알려져 있고, 뇌의 작용을 활발하게 하고 의식장애를 제거할 목적으로 다양한 뇌 질환에 널리 활용되고 있다[8]. 원지의 경우 기억력 증가 실험을 위한 다양한 행동실험에서 원지 열수 추출물의 경우 기억력 감퇴를 회복시키며 또한 세포사멸로부터 신경세포를 보호하며, 대조군에 비하여 기억력을 향상시킨다는 보고가 있다[28]. 최근에는 기억력과 관련된 인자 중 cAMP response element-binding protein (CREB)와 brain derived neurotrophic factor (BDNF)의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있고[7], 교감 신경계의 신경 전달 작용을 하는 부신수질에서 에피네프린과 함께 추출되는 호르몬 중 하나인 nor-epinephrine (NE), 호르몬이나 신경전달물질로서 중요한 노르 에피네프린과 에피네프린 합성체의 전구물질(precursor)인 dopamine (DA) 역시 발현 양이 증가 되는 것으로 보고 있다[15]. 쥐 신장의 골수에서 유래된 PC12 cell에서 원지에 의한 세포독성을 줄여주고 caspase-3, DNA fragmentation 등 세포 사멸과 관련된 인자를 줄여 세포생존력을 증가시켰으며, 기억력을 증가시키는 것으로 확인 되었다[35]. 항산화 효소 단백질의 발현수준에서 PRHWE는 p53의 활성화를 억제하였는데, p53이 세포의 증식 조절과 사멸 촉진 등 세포의 운명을 결정하는데 중요한 역할을 함으로 이는 뇌세포의 세포사멸을 예방할 수 있다는 것을 시사하고 있다.

또한, PRHWE는 농도에 비례하여 아세틸콜린을 분해하는 효소인 acetylcholinesterase (AChE) 효소활성을 저해하였다. AChE의 활성을 억제하는 것은 알츠하이머 치료에 있어서 가

장 중요하여, 이는 기억력 감퇴현상이 진행되는 것을 막아주어 병의 진행을 지연시키고 인지능을 증진시킨다는 점에서 큰 의미를 가지고 있다. 그러므로 향후에 원지의 유효성분을 분리, 정제 및 화학구조를 분석하고, 생체 내에서도 두뇌 인지능에 탁월한 효능을 나타내는 화합물의 구조와 작용원리를 규명하게 되면 새로운 치료 약제를 개발하기 위한 후보물질의 도출 가능성을 제시할 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 동의대학교 교내 연구비에 의해 연구되었음 (2013AA078).

References

- Ak, T. and Gulcin, I. 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact* **174**, 27-37.
- Bettio, L. E., Machado, D. G., Cunha, M. P., Capra, J. C., Missau, F. C., Santos, A. R. S., Pizzolatti, M. G. and Rodrigues, A. L. 2011. Antidepressant-like effect of extract from polygala paniculata: Involvement of the monoaminergic systems. *Pharm Biol* **49**, 1277-1285.
- Bowman, G. L., Dodge, H., Frei, B., Calabrese, C., Oken, B. S., Kaye, J. A. and Quinn, J. F. 2009. Ascorbic acid and rates of cognitive decline in alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **16**, 93-98.
- Chang, M. C., Chan, C. P., Wang, Y. J., Lee, P. H., Chen, L. I., Tsai, Y. L., Lin, B. R., Wang, Y. L. and Jeng, J. H. 2007. Induction of necrosis and apoptosis to KB cancer cells by sanguinarine is associated with reactive oxygen species production and mitochondrial membrane depolarization. *Toxicol Appl Pharm* **218**, 143-151.
- Choi, C. S., Song, E. S., Kim, J. S. and Kang, M. H. 2003. Antioxidative activities of castanea crenata Flos. methanol extracts. *Korean J Food Sci Nutr* **35**, 1216-1220.
- Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Park, S. H. and Kim, S. K. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci* **163**, 1161-1168.
- Choi, J. G., Kim, H. G., Kim, M. C., Yang, W. M., Huh, Y., Kim, Y. S. and Oh, M. S. 2011. Polygalae radix inhibits toxin-induced neuronal death in the Parkinson's disease models. *J Ethnopharmacol* **134**, 414-421.
- Choi, R. C., Jiang, Z., Xie, H. Q., Cheung, A. W., Lau, D. T., Fu, Q., Dong, T. T., Chen, J., Wang, Z. and Tsim, K. W. 2010. Anti-oxidative effects of the biennial flower of panax notoginseng against H₂O₂-induced cytotoxicity in cultured PC12 cells. *Chin Med* **5**, 1-7.
- Choi, W. H., Oh, Y. S., Kim, S. R., Ahn, J. Y. and Ha, T. Y. 2005. Antioxidative and protective effects of ulmus davidiana var. japonica extracts on glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Korean J Food Sci Technol* **37**, 479-483.
- Dastmalchi, K., Dorman, H. J. D., Vuorela, H. and Hiltunen, R. 2007. Plants as potential sources for drug development against alzheimer's disease. *Int J Biomed Pharmaceut Sci* **1**, 83-104.
- Eom, S. H., Lee, B. J. and Kim, Y. M. 2010. Effect of yeast fermentation on the antioxidant and anti-inflammatory activity of sea tangle water extract. *Fish Aquat Sci* **43**, 117-124.
- Hae, D. H., Park, Y. J. and Han, D. S. 2009. Antioxidant effect of polygalae radix extract on the glioma cells damaged by reactive oxygen species in culture. *J Appl Ori Med* **12**, 11-18.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Meth* **119**, 203-210.
- Jeong, H. R., Kwak, J. H., Kim, J. H., Choi, G. N., Jeong, C. H. and Heo, H. J. 2010. Antioxidant and neuronal cell protective effects of an extract of houttuynia cordata thunb (a culinary herb). *Korean J Food Preverv* **17**, 720-726.
- Jomova, K. and Valko, M. 2011. Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease. *Curr Pharm Des* **17**, 3460-3473.
- Kim, I. C. 2008. Antioxidative property and whitening effect of the pueraria radix, poria cocos and coptidis rhizoma. *J Korean Oil Chem Soc* **25**, 219-225.
- Kim, Y. N., Ku, K. H., Kang, S. K. and Choi, J. H. 2011. Effects of water extracts of red pepper seeds powder on antioxidative enzyme activities and oxidative damage in rats fed high-fat and high-cholesterol diets. *Korean J Food Sci Nutr* **44**, 284-291.
- Lee, J. H., Lee, B. H., Kim, C. Y. and Roh, S. S. 2010. Korean medical study of relation with chemical components and pharmacological effects. *The J Appl Orient Med* **10**, 25-33.
- Lee, S. B., Seong, N. S. and Lee, Y. J. 2005. A study on the protective effects of polygalae radix on neurotoxicity induced by N-methyl-D-aspartic acid (NMDA). *Korean J Herbol* **20**, 115-125.
- Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J. S., Jeong, H. S. and Kim, J. H. 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci* **73**, 167-179.
- Lee, S., Nam, H., Kim, M., Jang, H., Park, A., Kim, B. and Chung, K. 2010. In vitro inhibitory effect of aged black garlic extract with antioxidant activity on MMP-2 and MMP-9 related to metastasis. *Life Sci* **20**, 760-767.
- Liu, P., Hu, Y., Guo, D. H., Wang, D. X., Tu, H. H., Ma, L., Xie, T. T. and Kong, L. Y. 2010. Potential antidepressant properties of Radix Polygalae (Yuan Zhi). *Phytomedicine* **17**, 794-799.
- Masgras, I., Carrera, S., de Verdier, P. J., Brennan, P., Majid, A., Makhtar, W., Tulchinsky, E., Jones, G. D., Roninson, I. B. and Macip, S. 2012. Reactive oxygen species and mitochondrial sensitivity to oxidative stress determine induction of cancer cell death by p21. *J Biol Chem* **287**, 9845-9854.
- Milne, L., Nicotera, P., Orrenius, S. and Burkitt, M. 1993. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated

- ated DNA oxidation: pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch Biochem Biophys* **304**, 102-109.
25. Min, S. K. and Hong, C. H. 2007. Korean traditional medicines as novel drugs for neuropsychiatric disorders. *Korean J Psychopharmacol* **18**, 5-17.
 26. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. *J Sci Food Agric* **44**, 307-315.
 27. Park, E. Y., Park, S. J., Lee, J. R., Jee, S. Y., Byun, S. H. and Kim, S. C. Original articles: Cytoprotective effects of liquiritigenin, a component of licorice, against lead-induced cytotoxicity in PC-12 cells. 2007. *Korean J Herbol* **22**, 17-24.
 28. Puk-Ku, K. 2002. The radioprotective effects of bu-zhong-yi-qi-tang: a prescription of traditional chinese medicine. *Am J Chin Med* **30**, 127-137.
 29. Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL press.
 30. Shin, J., Lee, H., Kang, M., Lee, S. and Sung, N. 2010. Antioxidant activity of solvent fraction from black garlic. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **39**, 933-940.
 31. Shin, J. H., Oh, T. H., Yang, S. W., Youn, C. S., Kim, Y. H., Hwang, E. G., Kim, Y. W., Yuk, S. M., Lim, J. S. and Song, K. H. 2009. The beneficial effect of korean red ginseng on rat bladder contractility and oxidant damage following ischemia/reperfusion. *J Korean Continence Soc* **13**, 142-151.
 32. Teo, C. C., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Hew, C. S. and Ong, E. S. 2010. Pressurized hot water extraction (PHWE). *J Chromatogr A* **1217**, 2484-2494.
 33. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**, 1-40.
 34. Wenk, G. L. 2006. Neuropathologic changes in alzheimer's disease: potential targets for treatment. *J Clin Psychiatry* **67**, 3-7.
 35. Whang, W. W. 1999. The effects of sahyangsohapwon on learning and memory of AD rats using morris water maze and radial arm maze paradigm. *J Orient Neuropsychiatry* **10**, 1-15.
 36. Xue, W., Hu, J., Yuan, Y., Sun, J., Li, B., Zhang, D., Li, C. and Chen, N. 2009. Polygala saponin XXXII from *polygala tenuifolia* root improves hippocampal-dependent learning and memory. *Acta Pharmacol Sin* **30**, 1211-1219.
 37. Yang, Y. H., Jung, Y. and Chung, H. Y. 2001. Peroxynitrite and hydroxyl radical scavenging activity of dihydroxybenzaldehydes. *Life Sci* **11**, 24-28.
 38. Zhao, H. and Yang, H. 2008. Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *malus hupehensis* rehder. *Sci Hort* **116**, 442-447.

초록 : PC12 세포에서 생물학적 활성에 미치는 원지 열수 추출물의 효능

남 향 · 김문무*

(동의대학교 화학과)

원지의 뿌리는 기억력을 향상시키는 동양의 전통 약재로 널리 알려져 있다. 그러나 그 작용기전은 아직까지 해명되지 않았다. 본 연구에서는 항산화 효과 뿐만 아니라 신경 세포에서 파생된 PC12 세포의 acetylcholinesterase (AChE) 활성과 연관된 인지능에 대한 원지열수추출물(PRHWE)의 효과를 *in vitro* 및 살아 있는 세포에서 조사하였다. 먼저 MTT assay를 이용한 세포생존에 대한 연구에서 PRHWE는 0.1% 이하의 농도에서 세포독성이 없는 것으로 나타났다. PRHWE는 DPPH radical, hydrogen peroxide 및 superoxide의 소거활성과 환원력이 농도에 비례하여 증가시킨다는 것이 관찰되었다. 특히 PRHWE는 hydroxyl radical에 의하여 유발되는 DNA의 산화에 대한 보호효과를 나타내었다. 부가적으로 그것은 신경성세포에서 nitric oxide의 생성을 억제하였다. 더욱이 AChE 활성은 PRHWE의 농도에 비례하여 감소하였다. 뿐만 아니라, PRHWE는 PC12 세포에서 SOD-1과 NOS-2 발현수준을 증가시킨다는 것이 발견되었다. 더욱이 reporter gene assay를 이용한 실험에서 p53과 NF-κB의 전사 활성이 PRHWE의 존재 하에서 감소했다. 그러므로 이러한 결과들은 PRHWE가 신경성세포에서 항산화 활성 및 신경 세포 보호 효과가 있다는 것을 증명하였고, 이는 PRHWE가 사람의 건강을 위한 치료제로 큰 잠재성을 가지고 있다는 것을 시사한다.