

牧丹皮가 細胞枯死의 抑制에 미치는 影響에 關한 研究

권덕윤 · 배영춘* · 이상민 · 유관석 · 주종천 · 김경요

원광대학교 한의과대학 사상체질의학과

Studies on the Anti-apoptotic Effect of the Mūdānpí

Duck Yun Kwon, Young Chun Bae*, Sang Min Lee, Kwan Seok Yoo, Jong Cheon Joo, Kyung Yo Kim

Department of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Mūdānpí (Cortex Moutan Radicis; the root cortex of *Paeonia suffruticosa* Andrews) is an important Chinese crude drug used in many oriental prescriptions. 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose (PGG), a major component of this crude drug, has been shown to possess potent antioxidant, anti-mutagenic and anti-proliferative effects. In this study, I examined whether PGG could protect Neuro 2A cells, a kind of neuronal cell lines, from oxidative damage through the induction of HO-1 expression and HO activity. Exposure of Neuro 2A cells to PGG (10-50 μM) resulted in a concentration- and time-dependent induction of HO-1 mRNA, and protein expressions and heme oxygenase activity. PGG protected the cells from hydrogen peroxide-induced cell death. The protective effect of PGG on hydrogen peroxide-induced cell death was abrogated by zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX), a HO inhibitor. These results indicate that PGG is a potent inducer of HO-1 and HO-1 induction is responsible for the PGG-mediated cytoprotection against oxidative damage.

Key words : Mūdānpí(Cortex Moutan Radicis), anti-apoptotic effect, PGG, Neuro 2A cell

서 론

목단피(牧丹皮; Mūdānpí; Cortex Moutan Radicis ;the root cortex of *Paeonia suffruticosa* ANDR..)는 최초로 神農本草經¹⁾ 中經에 “牡丹”이라 하며 ‘味辛寒, 主寒熱, 中風痙癱, 驚癇邪氣, 除痲堅瘀血留舍腸胃, 安五臟, 療癰瘡.’이라고 기록된 이래 현재까지 本草學 등의 여러 가지 문헌²⁻⁸⁾에 인용되면서 鎮痛劑, 抗炎症劑, 血液循環障礙에 대한 치료제로 사용되고 있으며⁹⁾ 臨床에서 각종의 熱病에 의한 斑疹疾患과 吐血이나 衄血, 月經期の 發熱, 消耗性發熱, 瘀血에 의한 月經不通, 化膿性疾患의 일종인 外癰內癰 등의 疾患에 응용하고 있는 처방이다. 그리고, 목단피의 天然物化學分析을 통하여 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose (PGG)가 牧丹皮의 주요 생리활성 성분인 것으로 밝혀진 바 있다¹⁰⁾.

항산화 특성을 가지고 있는 蛋白質을 encoding하는 여러 가지 유전자들 중에서 HO-1은 스트레스 조건에서 미세하게 조절되며 중요한 생리학적 활성을 가지는 물질들을 생성하므로 중요하며, 많은 관심을 일으키고 있다¹¹⁾. HO-1 pathway는 산화성 스

트레스에 대한 조직 방어와 in vivo 상에서 염증반응의 조절에 대한 기여 및 세포의 항상성 유지에 있어 다른 중요한 효소반응 시스템과 동시에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다^{12,13)}.

그러므로 著者は 牧丹皮가 細胞枯死의 抑制에 미치는 영향과 그 기전을 규명하기 위하여 신경세포에서 HO-1 遺傳子 및 蛋白質 發顯과 HO 酵素 活性를 조사하였다. 이에 더불어 過酸化水素의 媒介에 의한 산화적 손상으로부터 신경세포의 방어에 대한 HO-1 誘發의 影響에 대하여 조사하였다.

실험재료 및 방법

1. 약재

본 實驗에서 使用된 牧丹皮는 圓光大學校 益山 韓方病院에서 購入하여 圓光大學校 韓醫科大學 本草學教室의 鑑定을 받아 使用하였다.

2. 시료제조

精選된 牧丹皮는 500.0g을 methanol 2L로 2 시간 還流抽出하여 濾過한 다음, methanol 1L를 사용하여 1 시간동안 還流抽出하였다. 처음 抽出液과 2회의 抽出液을 合하여, 이를 減壓濃縮하여 106.78g (21.36%)를 얻었다. 이 methanol 추출물(MEM: methanol extracts of Mūdānpí) 10g은 投與濃度에 따라 稀釋하

* 교신저자 : 배영춘, 광주시 남구 주원동 543-8 원광대광주한방병원

· E-mail : neulbomm@empal.com, · Tel : 062-670-6528

· 접수 : 2004/05/10 · 수정 : 2004/06/14 · 채택 : 2004/07/16

여 사용하였고, 나머지 MEM으로부터 benzoylpeaoniflorin, pentagalloylglucose(PGG), gallic acid, peaoniflorigenone 및 peanol을純粹分離하였다. 각化合物的純粹分離 및構造確認은 圓光大學校 醫藥資源 研究센터에서 遂行하였다.

3. 세포배양

쥐의 神經細胞株인 Neuro 2A 細胞는 ATCC에서 구입하여, 5% CO₂/95% air 培養基에서 熱에 의해서 非活性된 10% fetal bovine serum (Gibco 社)이 包含된 Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM, Sigma 社) 培養液으로 培養하여 實驗 目的에 따라 使用하였다.

4. 세포생존능력 측정

細胞生存能力은 MTT(Sigma 社) 分析方法을 利用하여 ELISA 分析器로 吸光度 570nm에서 測定하였다. 50 μL의 MTT 反應溶液 (0.05g MTT/50mL PBS)을 各 實驗群에 處理한 다음 4 시간 동안 培養하고, 反應하지 않은 MTT 溶液을 버리고 生存細胞에 의한 MTT 反應結果로 生成된 formazan을 Dimethylsulfoxide (DMSO)로 溶解하여 細胞生存 率을 間接的으로 計算하였다.

5. Heme Oxygenase Activity 측정

Heme oxygenase 酵素 活性를 보고된 方法에 의하여 測定하였다¹⁴⁾. 細胞로부터 分離한 microsomes와 rat liver cytosol (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, biliverdin reductase의 source)을 hemin 기질이 포함된 反應 混合物에 넣었다. 그리고 37℃에서 1시간 동안 反應시켰으며 1 mL의 chloroform을 첨가하여 反應을 終結시켰다. 抽出된 bilirubin의 량은 464 nm와 530 nm 파장에서 吸光度의 차이로 計算하였다.

6. mRNA 추출

mRNA는 細胞를 PBS로 세 번 洗滌한 後에 TRIzol (TM)(Molecular Research Center) 試藥과 製造者가 提供하는 protocol에 따라 分離하였다.

7. RT-PCR 분석법

1 mM dNTPs, 1.75 U/μL RNA 抑制酵素, 2.5 U/μL의 M-MLV 逆傳寫 酵素 (Promega 社), 25 U/μL의 올리고(dT) 프라이머, 抽出된 25 ng RNA, 5 mM MgCl₂ 및 PCR 緩衝液 (5 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3)을 含有하고, 全體 20 μL을 갖는 逆傳寫 反應 混合液을 製造한다. 以後, 製造된 逆傳寫 反應 混合液은 常溫에서 10분 동안 培養한 後 thermal cycler를 利用하여 逆傳寫 反應을 遂行한다. 逆傳寫 反應條件은 42℃에서 60분, 94℃에서 3분으로 한다. 一次 cDNA을 生成한 後 反應 튜브는 얼음에 5분 동안 放置한 後 PCR 反應에 利用한다. PCR 反應溶液은 2.5 U의 AmpliTagTM DNA polymerase (Promega 社), 센스 프라이머와 안티센스 프라이머 5 μg/μL, 逆傳寫 反應溶液 20 μL, 2 mM MgCl₂ 및 PCR 緩衝液, 最終 100 μL를 含有한다. PCR 反應은 GeneAmp PCR 시스템(Perkin Elmer 社)을 利用하여 遂

行하며, PCR 反應條件은 cycle 遂行 前에 94℃에서 5분, 60℃에서 5분 및 70℃에서 90초 前處理하고 94℃에서 變性(denaturation) 45초, 60℃에서 어닐링(annealing) 45초 및 75℃에서 擴張(extension) 90초의 cycle로하며 HO-1 cDNA에 대해서는 25 cycle 遂行하며, β-actin에 대해서는 20 cycle 遂行하였다. 마지막 cycle 은 94℃에서 45초, 60℃에서 45초, 및 72℃에서 10분간 더 反應시킨다. 약 0.05 내지 0.2 볼륨의 RT-PCR 反應產物은 1.2% 아가로스 겔에서 電氣泳動 後에 에티디움 브로마이드 (Sigma 社)로 染色하고, UV를 利用하여 核酸增幅을 確證한다. RT-PCR 分析에 使用된 프라이머는 下記와 같고 모두 고마바오텍에 合成을 依賴하여 購入하였다.

HO-1 (forward)	5'-ACTTTCAGAAGGGTCAGGTGTC-3'
HO-1 (reverse)	5'-TTGAGCAGGAAGCGGTCTTAG-3' (524 bp)
β-actin (forward)	5'-CCTTCTACAATGAGC-3'
β-actin (reverse)	5'-ACGTCACACTTCATG-3' (594 bp)

8. Western blot 분석

Western blot 分析을 다음과 같이 修行하였다. 細胞를 protease inhibitor 혼합물 (0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mg/ml aprotinin, 5 mg/ml pepstatin A 및 1 mg/ml chymostatin)이 포함된 20 mM Tris HCl buffer (pH 7.4)로 溶血시켰다. Lowry protein assay kit (P5626, Sigma)를 利用하여 蛋白質을 定量하였다. 동량의 蛋白質 試料를 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 利用하여 分離하고 Hybond enhanced chemiluminescence (ECL) nitrocellulose membrane (Amersham)으로 轉移하였다. Membrane을 5% skim milk로 blocking 하고 primary antibody (Santa Cruz Biotechnology) 및 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody를 결합시킨 다음 標識하여 目的하는 蛋白質의 發現 與否를 判定하였다.

실험결과

1. MEM이 HO(heme oxygenase)활성에 미치는 효과

먼저 MEM이 HO 活性에 미치는 效果를 조사하였다. 이를 위하여 Neuro 2A 細胞를 여러 가지 농도의 MEM으로 18 時間 刺戟하여 HO activity를 測定하였다. Neuronal heme oxygenase 活性에 대한 MEM 濃度(0-100 μg/mL)에 따른 影響을 Fig. 1에 나타내었다. MEM으로 처리된 細胞에서 HO의 증가된 活性는 對照群 細胞에서의 活性보다 有意性 있는 差異를 보였으며, 100 μg/mL 濃度에서 최고의 酵素 活性를 나타내었다. 以下 모든 實驗에서 MEM의 濃度는 100 μg/mL 로 고정하여 수행하였다.

2. MEM이 과산화수소에 의해 유도된 세포고사에 미치는 효과

MEM이 過酸化수소에 의해 誘導된 細胞枯死에 미치는 效果를 Neuro2A 세포에서 조사하였다. 이를 위하여 Neuro 2A 細胞를 過酸化수소 (200 μM)로 8 時間 刺戟한 對照群과 Neuro 2A 細胞에 다양한 濃度の MEM을 12 時間 前處理한 後에 過酸化수

素 (200 μ M)로 8 시간 刺戟한 處理群의 細胞枯死을 비교 조사하였다. 그 結果 MEM (100 μ g/mL)이 過酸化水素로 誘導된 細胞枯死을 抑制하는 것을 알게 되었다 (Table 1). MEM에 의해 HO 활성이 현저하게 증가하는 농도인 100 μ g/mL에서 對照群에 비해 細胞生存率은 影響을 받지 않았다. 200 μ M 농도의 過酸化水素로 8 시간 동안 細胞에 처리한 結果 細胞生存率이 對照群에 비하여 36 \pm 3%까지 減少하였다(Table 1). 한편, 100 μ g/mL 농도의 MEM으로 前處理한 後에 過酸化水素로 8 시간 刺戟한 處理群의 細胞의 경우 生存率은 過酸化水素로만 8 시간 刺戟한 處理群의 細胞에 비해 74 \pm 2%의 生存率을 보였다 (Table 1).

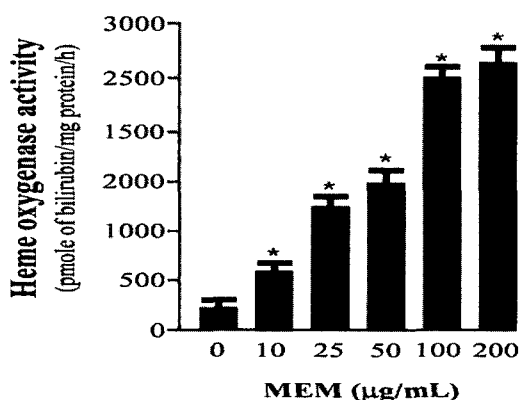


Fig. 1. Effect of MEM on heme oxygenase activity in Neuro 2A cell. *Heme oxygenase activity was measured in Neuro 2A cells at 18 h after treatment with various concentrations of MEM. In the control group, cells were incubated with medium alone. These data represent the means \pm SD of three independent experiments. *P < 0.05 vs. control. (MEM: methanol extracts of Muddanpi)

Table 1. Effects of MEM on HP induced neurotoxicity. *

Treatment	Viability (% of control)
Control	100
H ₂ O ₂	36 \pm 3
MEM + H ₂ O ₂	74 \pm 2

* Neuro 2A cells were treated with various concentrations of MEM for 12 h and then incubated for 8 h with H₂O₂ (200 μ M). Cell viability was determined by MTT assay.

3. MEM에서 순수 단일 성분의 분리

MEM에서 HO 활성을 유도하거나, 過酸化水素에 의해 誘導된 細胞枯死 과정에 대해 抑制 效果가 있을 것으로 豫想되는 5 種의 單一 成分을 分離하였다. Fig. 2는 MEM에서 分離된 單一 成分의 化學構造 및 MEM 1g當 包含된 成分의 量을 表記하였다. MEM에는 多量의 tannin성분인 PGG가 含有되어 있었다.

4. 과산화수소로 자극된 Neuro 2A 세포에서 단일 성분이 세포고사에 미치는 효과

먼저 MEM에서 分離된 5 種 單一 成分을 過酸化水素로 誘導시킨 Neuro 2A 세포의 細胞枯死 抑制 效果를 조사하였다. 이를 위하여 Neuro 2A 細胞를 過酸化水素 (200 μ M)로 8 시간 刺戟한 對照群과 Neuro 2A 細胞에 5 種의 成分을 각각 12 시간 前處理한 後에 過酸化水素 (200 μ M)로 8 시간 刺戟한 處理群의 細胞枯死을 비교 조사하였다. Table 2에서는 5 種의 成分 중에서 PGG가 가장 效果의으로 過酸化水素로 誘導된 Neuro 2A 細胞의 細胞枯死을 抑制시켰다. PGG 외에 gallic acid에서도 過酸化水素

로 誘導된 Neuro 2A 細胞의 細胞枯死 抑制 效果를 觀察할 수 있었으나, PGG보다 微弱한 抑制 效果를 보였다(Table 2).

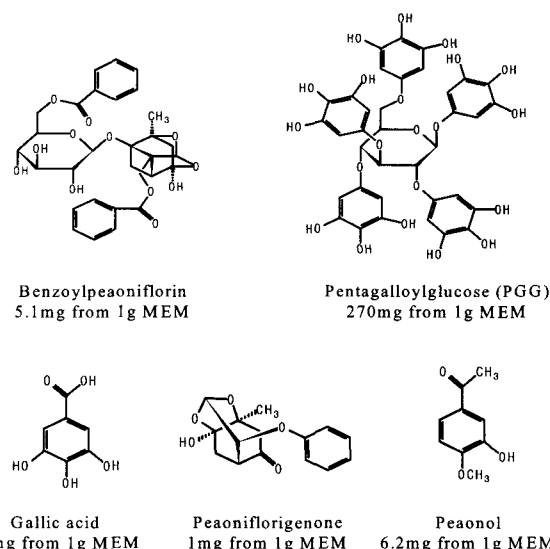


Fig. 2. Chemical structures isolated from MEM. Five molecules were isolated by using HPLC, and their chemical structures were confirmed by using H1 and C13 NMR spectra together with mass spectra.

Table 2. Effects of five compounds isolated from MEM on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity.

Treatment	Viability (% of control)
Control	100
H ₂ O ₂	35 \pm 4
+ Benzoylpeaoniflorin	37 \pm 3
+ PGG	77 \pm 4* *
+ Gallic acid	60 \pm 5* *
+ Peaoniflorigenone	33 \pm 4
+ Peaonol	40 \pm 3

* Neuro 2A cells were pre-treated for 12 h with each compound at 100 μ g/mL and then incubated for 8 h with H₂O₂ (200 μ M). Cell viability was determined by MTT assay. * *p < 0.05 vs. cells treated with H₂O₂ alone.

5. PGG 농도에 따라 HO-1 단백질 발현과 HO 효소 활성에 미치는 효과

HO-1 蛋白質 發現에 대한 PGG의 影響을 조사하기 위하여 여러 가지 濃度의 PGG를 18 시간 동안 Neuro 2A 細胞에 處理하였다. HO 酵素 活成과 HO-1 蛋白質 發現에 대한 PGG 濃度 (0-50 μ M)에 따른 影響을 Fig. 3A와 B에 나타내었다. Western blot 分析으로부터 PGG에 의한 HO-1의 濃度 依存的 誘發을 確認할 수 있었다(Fig. 3B). 또한, PGG를 18시간동안 Neuro 2A 細胞에 露出시킴으로서 HO 活性이 濃度 依存的으로 增加함을 觀察할 수 있었다(Fig. 3A). PGG 처리된 細胞에서 HO-1의 增加된 活性은 對照群 細胞에서의 活性보다 有意性 있는 差異를 보였으며, 30-50 μ M 濃度 領域에서 最高의 酵素 活性(9배 증가)을 나타내었다. Western blot 分析에서 PGG에 의해 向上된 HO 活性은 HO-1 蛋白質 水準과 直接的인 關聯이 있음을 나타내었다(Fig. 3A, B). 30 μ M 濃度의 PGG에서 최대의 HO-1 發現을 誘導하였다. 以下 모든 實驗에서 PGG의 濃度는 30 μ M 로 고정하여 수행하였다.

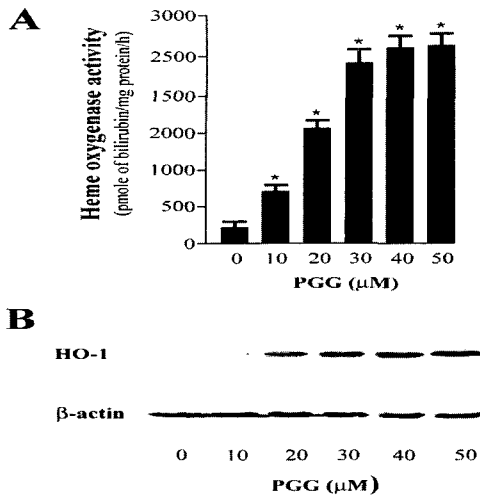


Fig. 3. Effect of PGG on HO activity and HO-1 expression in Neuro 2A cells. HO activity(A) and HO-1 protein expression(B) were measured in Neuro 2A cells at 18 h after treatment with various concentrations of PGG. In the control group, cells were incubated with medium alone. Total cellular proteins were isolated from the cells treated with PGG as above and Western blot analysis was performed using specific antibodies for HO-1 and β-actin. Each bar represents the mean ± SD of three independent experiments. *P < 0.05 vs. control.

6. PGG 처리 시간에 따라 HO-1 유전자 및 단백질 발현과 HO 효소 활성에 미치는 효과

Fig. 4B.에서 보는 것과 같이 Neuro 2A 세포에서 PGG에 의한 HO-1 발현은 시간 의존적으로 증가하였다. 30 μM PGG로 HO-1의 발현은 처리 후 6 시간이 경과한 다음에 나타나기 시작하였으며, 18 시간 정도에서 최고에 도달하였다. 이러한 효과는 Figure 4A의 HO 활성 분석에서 보여주는 것과 같이 시간 의존적으로 활성이 증가하는 것과 일치하였다. Neuro 2A 세포에서 PGG 처리 후 HO-1 mRNA의 정상상태 발현을 조사하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 30 μM PGG를 처리하고 각각 3, 6, 9, 12, 18, 24 시간 후에 전체 RNA를 분리하여 HO-1 mRNA 발현을 분석하였다(Fig. 5A). HO-1 mRNA의 발현은 시간 의존적으로 증가하였다. HO-1 mRNA 발현은 6 시간 후부터 증가하기 시작하였으며 12 시간 경과시에 최고치에 도달하였고 24 시간부터는 감소하기 시작하였다. 또한, 10-40 μM 범위에서 PGG 농도에 따라 mRNA 발현이 점차적으로 증가함으로써 Neuro 2A 세포에서 PGG에 의한 HO-1 mRNA의 발현은 농도 의존적임을 알 수 있었다(Fig. 5B). HO-1 mRNA는 10 μM에서부터 증가하기 시작하여 40 μM에서 최고값에 도달하였다.

7. 과산화수소에 의해 유도된 neurotoxicity에 대한 PGG의 효과

牡丹皮는 산화성 DNA 손상을 억제하는 효과와 hydroxy radical과 superoxide와 같은 산소자유기를 제거하는 활성이 있음이 보고되었다¹⁵⁾. 따라서 본 연구에서는 과산화수소로誘發된 세포 손상에 대한 PGG의防禦 효과를 조사하여 본 결과 PGG가 농도 의존적으로 과산화수소로誘發된 세포枯死을 억제하는 것을 알게 되었다(Fig. 6A). 다양한 농도의 PGG를 12 시간 前處理한 다음 과산화수소를 8 시간 處理한 후에 Neuro 2A 세포의 生存率을 測定하였다. PGG에 의해 HO 활성이 현저하게 증가하는

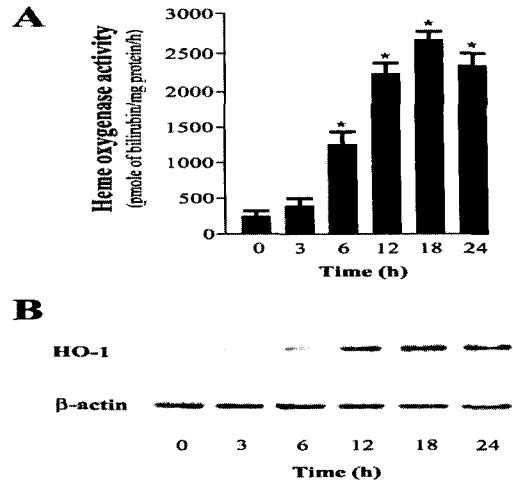


Fig. 4. Effect of PGG on HO activity and HO-1 expression in Neuro 2A cells. Neuro 2A cells were treated with 30 μM of PGG, and HO activity (A) and HO-1 protein expression (B) were measured in Neuro 2A cells at various time points indicated in the figures. In the control group, cells were incubated with medium alone. Total cellular proteins were isolated from the cells treated with PGG as above and Western blot analysis was performed using specific antibodies for HO-1 and β-actin. Each bar represents the mean ± SD of three independent experiments. *P < 0.05 vs. control.

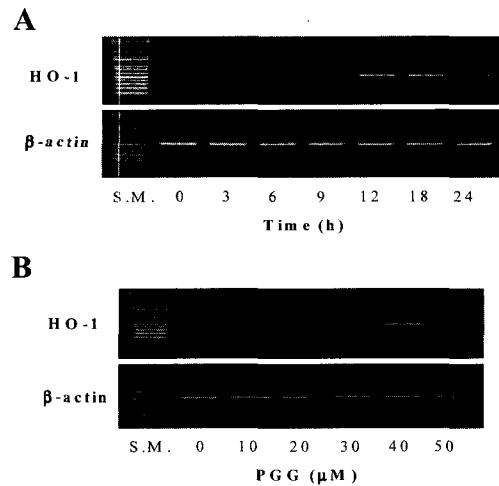


Fig. 5. Expression of HO-1 mRNA in Neuro 2A cells treated with 30 μM PGG for the indicated times (A) and with the indicated concentrations of PGG for 12 h (B). Total RNA was isolated and analyzed for HO-1 mRNA expression by RT-PCR. β-Actin was used as the loading control.

濃度인 20-50 μM 범위에서 對照群 세포와 比較하여 細胞生存率은 影響을 받지 않았다. 200 μM 濃度の 過酸化水素를 8 시간 동안 細胞에 處理한 結果 細胞生存率이 對照群 細胞에 비하여 65%가 減少하였다 (Fig. 6A). 한편, 30 μM 濃도의 PGG로 前處理한 후 過酸化水素에 露出된 細胞의 경우 生存率은 過酸化水素만 處理한 細胞에 比較하여 78%의 生存率을 보였다(Fig. 6B). 또한 특이적 HO 抑制劑인 ZnPP IX을 이용하여 PGG의 抗酸化 活性에서 HO-1의 關聯性을 再確認 하였다. 이 때에 過酸化水素로 유도된 細胞枯死에 대한 PGG의 抑制 효과가 5 μM 濃度の ZnPP IX에 의해 두드러지게 阻害되는 것을 觀察할 수 있었다. 이러한 結果는 PGG의 抗酸化 효과가 HO-1의 誘發에 의해 나타나는 것임을 分明하게 시사하는 것이다.

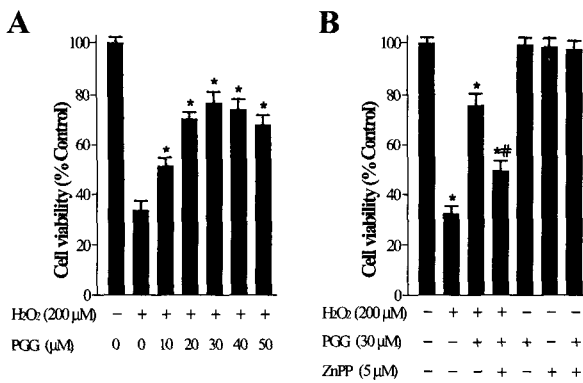


Fig. 6. Effect of PGG on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity. (A) Cells were treated with various concentrations of PGG (0-50 μM) and then incubated for 8 h with H₂O₂ (200 μM). (B) Cells were treated with 30 μM of PGG for 12 h in the presence or absence of 5 μM ZnPP IX. After this pretreatment, cells were incubated for 8 h with H₂O₂ (200 μM). After these treatments, cells were washed and viability was assessed using the MTT assay. Each bar represents the mean ± SD of three independent experiments. *P < 0.05 vs. H₂O₂; #P < 0.05 vs. H₂O₂ plus PGG.

고찰

牧丹皮는 미나리아재비과(毛茛科; Ranunculaceae)에 속한 落葉小灌木인 모란 *Paeonia suffruticosa* ANDR.(= *P. moutan* SIMS.) 및 동속 근연식물인 쯤모란 *P. suffruticosa* var. *spontanea* REHD. · 얼룩모란 *P. papaver-acea* ANDR. · 산모란 *P. szechuanica* FANG 등의 뿌리껍질로 異名은 모란(牡丹), 단피(丹皮), 모란근피(牧丹根皮)이며, 우리나라 전 地域에서 栽培하고 있으며 栽培後 3~5年 된 뿌리를 가을과 겨울에 採取하여 속의 심을 除去하고 햇볕에 말린 것을 臨床에 應用하고 있다²⁻⁵. 최초로 神農本草經¹ 中經에 “牡丹”이라하며 ‘味辛寒, 主寒熱, 中風痲痺, 驚癇邪氣, 除痰堅瘀血留舍腸胃, 安五臟, 療癰瘡.’이라고 소개된 이래 현재까지 本草學등의 여러 가지 文獻²⁻⁸에 引用되면서 韓醫學 臨床 등에 널리 應用되고 있다. 맞은 쓰면서 맵고 性質은 약간 차가운 것으로서 臨床에 應用할 때는 주로 生用하지만 血液循環을 촉진시켜 體內的 瘀血을 除去하고자 할 目的으로는 酒炒 즉, 술에 버무려 藥物이 부드러워지면 이를 볶아 사용하고 出血性 疾患에는 止血을 목적으로 炭化가 될 정도로 볶아서 사용한다¹. 그러므로 臨床에서는 各種의 熱病에 의한 斑疹질환과 吐血이나 衄血, 月經期의 發熱, 消耗性發熱, 瘀血에 의한 月經不調, 內癰外癰 등의 疾患을 치료하고 있다. 현재까지 알려진 牧丹皮의 化學成分으로는 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose (PGG), paeoniflorin, oxypaeonifloein, paeonol, paeonoside, paeonolide, benzoylpaeoniflorin 및 benzoyloxypaeoniflorin, oxypaeoniflorin, 2,3-dihydroxy-4-methoxyacetophenone, 3-hydroxy-4-methoxyacetophenone 등이 있다.^{6-8,16}

牧丹皮의 藥理作用을 살펴보면 Paeoniflorin은 中樞神經에 作用해서 鎮靜效果가 있으며, 鎮痛 및 體溫低下 效果가 있을 뿐 아니라 낮기는 하지만 抗炎效果가 있고 平滑筋에 대한 弛緩作用도 있다. 또 Paeonol도 鎮靜催眠 및 鎮痛作用이 있을 뿐 아니라

人工적으로 發熱하게한 動物에 대해 解熱作用이 있음이^{7,8} 알려졌다.

牧丹皮의 대표적 성분인 PGG는 rat serum에서 요소 질소의 농도를 감소시켰고¹⁷ bezno(a)pyrene Ames test (발암성 물질 검출 실험)에서 돌연변이 억제 활성을 보였다¹⁸. 또한, 매우 강력한 Na, K-ATPase 활성 억제효과 뿐만 아니라¹⁰, 항산화 효과도 나타내는 것으로 보고되었다¹⁹⁻²¹. 最近 몇 년 동안 여러 가지 藥理學的 및 生物學的 활성의 상승에 대한 PGG의 效能에 활발한 研究가 進行중에 있다^{22,23}. PGG는 산화성 DNA 損傷을 抑制하는 效果를 가지고 있으며, hydroxyl radical과 superoxide와 같은 酸素 radical을 除去하는 활성을 가지고 있음이 알려졌다²³.

산화성 스트레스는 알츠하이머 疾患, 파킨스 疾患 및 發作과 같은 神經退行性 疾患의 發病學에 있어서 중요한 역할을 한다. 따라서 이러한 항산화 특성들은 神經退行性 疾患들에 대한 藥物의 神經保存性 效果에 기여할 것이다. HO-1은 여러 가지 산화성 스트레스와 연관되어 있는 자극으로 유발되는 스트레스 반응 단백질이다¹⁵. 그리고 HO의 촉매 분해반응으로 heme이 분해되어 biliverdin, 일산화탄소 (carbon monoxide; CO) 및 철을 생성한다²⁴. Biliverdin은 생성 후에 biliverdin reductase에 의하여 강력한 항산화 효과를 나타내는 bilirubin으로 변환된다. 일산화탄소는 cyclic guanine monophosphate (cGMP) 레벨의 상승과 혈관확장 촉진 및 조직 perfusion 과 같은 기능을 갖는 일산화질소 (nitric oxide; NO)와 많은 유사성을 가지고 있다²⁵. HO-1 결핍 마우스는 endotoxemia²², chronic hypoxia²⁶ 혹은 cardiac xenograft (심장 이종이식)의 경우 감소된 생존율을 보이기 때문에 세포성 스트레스에 대한 반응으로 HO-1의 유발은 중요한 보존성 기전이다. bilirubin의 생리학적 농도는 과산화수소로 유발되는 내피세포의 손상을 억제시키며, 사람 혈액 plasma에서 단백질의 산화를 막아준다²⁷.

본 研究에서는 PGG의 항산화 특성이 여러 가지 스트레스성 자극에 대한 防禦效果와 관련된 heat shock protein인 HO-1의 발현을 유도할 수 있는지를 밝히고자 하였다. 먼저 牧丹皮의 MEM이 HO 활성에 미치는 效果를 조사한 결과 MEM 처리된 細胞에서 HO의 증가된 활성은 對照群 細胞에서의 활성보다 有意性 있는 差異를 보였으며, 100 μg/mL 濃度에서 최고의 酵素 활성을 나타내었다.(Fig. 1.) 牧丹皮의 MEM이 過酸化水素에 의해 誘導된 細胞枯死에 미치는 效果를 조사한 결과 200 μM 농도의 過酸化水素를 8時間 동안 細胞에 처리한 경우 細胞生存率이 對照群에 비하여 36±3%까지 감소하였고, 100 μg/mL 농도의 MEM을 前處理한 後에 過酸化水素로 8時間 刺戟한 處理群의 경우 74±2%의 生存率을 보였으며, MEM만 처리한 경우는 對照群과 比較하여 細胞生存率은 影響을 받지 않았다.(Table 1.)

이러한 牧丹皮 MEM에서 HO 활성을 유도 및 過酸化水素에 의해 誘導된 細胞枯死 抑制 效果가 있을 것으로 豫想되는 5種의 單一成分을 分離해 본 결과 多量의 타닌성분인 PGG가 含有되어 있었고, 이 각각의 단일 성분의 細胞枯死 抑制 效果를 조사한 결과 PGG 와 gallic acid가 각각 77±4%와 60±5%로 가장 效果적이었다. (Fig. 2, Table 2.) PGG 濃度(0-50 μM)에 따른 HO-1 蛋白質 發現과 HO 酵素 활성에 대한 影響을 조사한 결과에서는

30-50 μ M 농도 영역에서 최고의 HO 활성(9배 증가)을 나타내었으며, 30 μ M 농도의 PGG에서 최대의 HO-1 발현을 유도하였다(Fig. 3). PGG 처리 시간(3-24h)에 따른 HO-1 유전자 및 단백질 발현과 HO 효소 활성에 대한 영향을 조사한 결과에서는 PGG 처리 시간 의존적으로 HO 활성은 증가하였고, HO-1 mRNA의 발현은 시간 의존적으로 증가하여 12 시간 경과시에 최고치에 도달하였으며, PGG 농도에 따른 mRNA 발현은 농도 의존적으로 증가하여, 40 μ M에서 최고값에 도달하였다(Fig.4., Fig.5.)

과산화수소에 의해 유도된 neurotoxicity에 대한 PGG의 효과를 알아보기 위한 연구에서 다양한 농도의 PGG를 12 시간 전 처리한 다음 과산화수소를 8 시간 처리한 후에 Neuro 2A 세포의 생존율을 측정된 결과, PGG에 의해 HO 활성이 현저하게 증가하는 농도인 20-50 μ M 범위에서는 대조군과 비교하여 세포 생존율은 영향을 받지 않았으며, 200 μ M 농도의 과산화수소만 처리한 경우는 세포 생존율이 35%까지 감소하였다. 한편, 30 μ M 농도의 PGG로 전 처리한 후 과산화수소에 노출된 경우 78%의 생존율을 보였으며, 특이적 HO 억제제인 ZnPP IX을 이용하여 PGG의 항산화 활성에서 HO-1의 관련성을 재확인한 경우에는 과산화수소로 유도된 세포枯死에 대한 PGG의 억제 효과가 5 μ M 농도의 ZnPP IX에 의해 두드러지게沮쇄되는 것을 알 수 있었다(Fig. 6)

이상의 연구들을 통해 牡丹皮의 대표적 성분인 PGG가 신경 세포의 HO-1 유전자 및 단백질 발현과 HO 활성을 농도와 시간 의존적으로 상향 조절한다는 것을 관찰하였다. PGG를 세포에 처리하였을 경우 산화제로 매개된 세포 損傷에 대한 높은 抵抗성을 나타내는 것을 관찰하였으며, 이때에 HO-1 경로의 誘發이 관찰된 세포防禦의 원인이 되는 것으로 나타났다. 한편, 이러한 항산화 역할에 있어서 PGG가 blood brain barrier를 통과하는지 또한 腦에서 組織에 濃縮되는지는 아직 분명하게 밝혀지지 않았다. 그리고, in vivo 상에서 이 化合物이 神經退行性 疾患에 양성적인 효과를 갖는지는 아직 수행해야 할 과제로 남아있다.

여러 가지 病理學的 條件들이 산화성 스트레스와 關聯되어 있기 때문에 항산화적 治療 方法의 開發은 매우 중요하다. 따라서 이러한 항산화 활성에 근거하여 PGG는 산화적 스트레스가 關聯되어 있는 만성 진행성 疾患과 같은 병변에서 임상적으로 이용될 수 있을 것이며, 앞으로 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

결 론

本 論文은 牡丹皮의 過酸化水素로 誘導된 細胞枯死 效果를 調査하고 細胞枯死 抑制 機轉에 대하여 實驗的으로 研究한 結果는 다음과 같이 要約할 수 있었다. MEM은 Neuro 2A 細胞에서 HO 활성을 誘導하며, 過酸化水素에 의해 誘導된 細胞枯死을 抑制하였다. Neuro 2A 細胞에서 PGG (10-50 μ M)는 濃도와 時間 의존적으로 HO-1 mRNA 및 蛋白質 發現과 HO 활성을 增加시켰다. PGG를 Neuro 2A 細胞에 前處理 하였을 경우 過酸化水素로 誘導된 細胞枯死 對한 抑制 效果를 보였다. PGG에 의한 細胞枯死 抑制 效果는 HO 抑制劑인 zinc protoporphyrin IX에 의해 逆轉되었

다. 以上의 結果로 미루어 牡丹皮의 細胞枯死 抑制 效果는 牡丹皮 有效成分인 PGG가 HO-1 遺傳子 發現을 誘導함으로써 酸化性 스트레스로부터 神經細胞를 保護할 수 있음을 나타내고 있다.

참고문헌

1. 清·孫星衍, 神農本草經, 卷二, p.18, 聞名學社出版社(重), 臺灣, 1985.
2. 辛民教, 臨床本草學, pp.385-387, 圖書出版 永林社, 서울, 2002.
3. 鄭普燮·辛民教, 圖解鄉藥大事典, pp.526-527, 圖書出版 永林社, 서울, 1990.
4. 辛民教·李尙仁·安德均, 韓藥臨床應用, pp.124-126, 成輔社, 서울, 1982.
5. 식품의약품안전청, 대한약전외한약(생약)규격집, p.155-156, 한국의약품수출입협회, 2000.
6. 中國中醫藥管理局 : 中華本草, pp.663-672, 上海科學技術出版社, 上海, 1998.
7. Guo BL, Basang D, Xiao PG, Hong DY. Research on the quality of original plants and material medicine of Cortex Paeoniae. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 27, 654-657, 2002.
8. Di L, Xie H, Fan B, Mao C. Study on the extraction method and the optimum factor for Paeonia suffruticosa. Zhong Yao Cai. 21, 34-36, 1998.
9. Harada, M. and Yamahita, A., Pharmacological studies on the root bark of paeonia moutan. I. Central effects of paeonoi, Yakugaku Zasshi, 89, 1205-1211, 1969.
10. Satoh, K., Nagai, F., Ushiyama, K., Yasuda, I., Seto, T. and Kano, I., Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- α -D-glucose, a major constituent of both moutan cortex and Paeoniae radix, Biochem. Pharmacol., 53, p. 611-614, 1997.
11. Maines, M.D., The HO system: a regulator of second messenger gases, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 37, p. 517-554, 1997.
12. Foresti, R. and Motterlini, R., The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis, Free Radic. Res., 31, p. 459-475, 1999.
13. Soares, M.P., Lin, Y., Anrather, J., Csizmadia, E., Takigami, K., Sato, K., Grey, S.T., Colvin, R.B., Choi, A.M., Poss, K.D. and Bach, F.H., Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival, Nat. Med., 4, p. 1073-1077, 1998.
14. Tenhunen, R., Marver, H.S. and Schmid, R., The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin, J. Lab. Clin. Med., 75, p.410-421, 1970.
15. Keyse, S.M. and Tyrrell, R.M., HO is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86, p.99-103, 1989.

16. Oh GS, Pae HO, Choi BM, Jeong S, Oh H, Oh CS, Rho YD, Kim DH, Shin MK, Chung HT. Inhibitory effects of the root cortex of *Paeonia suffruticosa* on interleukin-8 and macrophage chemoattractant protein-1 secretions in U937 cells. *J. Ethnopharmacol.* 84, 85-89, 2003.
17. Nishizawa, N., Yamagishi, T., Nonaka, G. and Nishioka, I., Structure of gallotannins in *Paeoniae radix*, *Chem. Pharm. Bull.*, 28, p. 2850-2852, 1980.
18. Sakai, Y., Nagase, H., Ose, Y., Kito, H., Sato, T., Kawai, M. and Mizuno, M., Inhibitory action of peony root extract on the mutagenicity of benzo[a]pyrene, *Mutat. Res.*, 244, p.129-134, 1990.
19. Oh, G.S., Pae, H.O., Oh, H., Hong, S.G., Kim, I.K., Chai, K.Y., Yun, Y.G., Kwon, T.O. and Chung, H.T. In vitro anti-proliferative effect of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose on human hepatocellular carcinoma cell line, SK-HEP-1 cells, *Cancer Lett.*, 174, p.17-24, 2001.
20. Okubo, T., Nagai, F., Seto, T., Satoh, K., Ushiyama, K. and Kano, I., The inhibition of phenylhydroquinone-induced oxidative DNA cleavage by constituents of Moutan Cortex and *Paeoniae Radix*, *Biol. Pharm. Bull.*, 23, p.199-203, 2000.
21. Pan, M.H., Lin-Shiau, S.Y., Ho, C.T., Lin, J.H. and Lin, J.K., Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappaB activity by theaflavin-3,3'-digallate from black tea and other polyphenols through down-regulation of IkappaB kinase activity in macrophages, *Biochem. Pharmacol.*, 59, p.357-367, 2000.
22. Poss, K.D. and Tonegawa, S., Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, p.10925-10930, 1997.
23. Christodoulides, N., Durante, W., Kroll, M.H. and Schafer, A.I., Vascular smooth muscle cell heme oxygenases generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide, *Circulation*, 91, 2306-2309, 1995.
24. Maines, M.D., Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications, *FASEB J.* 2, 2557-2568, 1988.
25. Morita, T., Perrella, M.A., Lee, M.E. and Kourembanas, S., Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, p.1475-1479, 1995.
26. Yet, S.F., Perrella, M.A., Layne, M.D., Hsieh, C.M., Maemura, K., Kobzik, L., Wiesel, P., Christou, H., Kourembanas, S. and Lee, M.E., Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice, *J. Clin. Invest.*, 103, p.R23-29, 1995.
27. Motterlini, R., Foresti, R., Intaglietta, M. and Winslow, R.M., NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium, *Am. J. Physiol.*, 270, p.H107-114, 1996.