

安胎에 활용되는 山藥의 신경세포주에 대한 안전성 및 항산화효과에 대한 연구

*동국대학교 한의과대학 부인과학교실,

**동국대학교 이과대학 생물학교실

남주영*, 노진주*, 성준호*, 손미영**, 김미정**, 성경석**, 김동일**

ABSTRACT

Non-toxic and Anti-oxydative effect of *Dioscoreae Rhizoma* on PC12 Cell

Ju-Young Nam*, Jin-Ju Roh*, Jun-Ho Seung*, Mi-Young Son**,
Mee-Jeong Khil*, Jung-Suk Sung*, Dong-Il Kim

*Dept. of OB & GY, College of Oriental Medicine, Dongguk University
Dept. of Biology, Collge of Science, Dongguk University

Purpose : This study examined the non-toxic and the anti-oxidative effect of *Dioscoreae Rhizoma* on PC12 cells. Sanyak(*Dioscoreae Rhizoma*; chinese yam, shan yao) is well-known for its curing power for kidney, lung, spleen. Tonifies and augments the spleen and stomach. Tonifies the lung gi and augments the kidney yin. Tonifies the kidneys and also stabilizes and binds, it also binds the essence and treats spermatorrhea, frequent urination, and vaginal discharge. We are therefore interested in whether *Dioscoreae Rhizoma* is capable of causing abnormal apoptosis processes, and whether this condition can be rectified through *Dioscoreae Rhizoma* herb treatment.

Methods : We used aqueous extract to treat PC12 cells with different concentrations treated with a water or a MeOH extract of *Dioscoreae Rhizoma* (0, x10, x20, x40, x80). The MTT (3, (4, 5-dimethyl-thiazol) 2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) reduction assay was employed to quantify the differences in cell activity and viability. The Bax expression level was monitored using western-blotting techniques. The patterns of the changes in expression were scanned and analyzed.

Results : Bax and GSK-3 β promotes cell death and down-regulated during the development of the PC12 cells. This is indicated that *Dioscoreae Rhizoma* is capable of inducing apoptosis in PC12 cells. The induced cell death and significantly inhibited by *Dioscoreae Rhizoma*, which can be explained by the increase in the inhibition of Bax and GSK-3 β expression. It was also shown that *Dioscoreae Rhizoma* inhibits the release of H₂O₂ and prevents lipid peroxidation. Furthermore, the accumulation of wild type Bax protein significantly downregulated in a dose-dependent manner upon treatment with *Dioscoreae Rhizoma*.

Conclusion : In conclusion, *Dioscoreae Rhizoma* can induce apoptosis via a Bax-dependent pathway or GSK-3 β dependent pathway in PC12 cells into anti-oxidant and protective effect.

Key words : *Dioscoreae Rhizoma*; PC12 cell; Apoptosis; anti-oxidant; downregulation

I. 緒 論

조선 世宗代의 《鄉藥集成方》의 편찬은 조선과 중국의 약재 무역의 역조를 개선하고 중국산 약재와 국산 약재의 약효 동등성을 평가한 학술적·임상적·경제적 활동으로 재해석할 수 있다. 국내 자생 한약재와 국내 재배 한약재의 임상적 활용은 국민보건의 향상은 물론 경제적 효과까지 기대할 수 있는 측면이 있다.

山藥(Dioscoreae Rhizoma)은 국내에서 다량 재배되고 있는 약물로 향후 재배와 응용이 증가할 것으로 기대되는 약물이다. 山藥은 味甘性溫하며, 補脾胃, 益肺氣, 強腎固精 및 止帶下의 효능이 있다.¹⁾ 근래 부인과 임상 영역에서는 強腎固精의 효능을 이용하여 생식내분비계통의 각종 질환과 절박유산의 범주에 속하는 胎動胎漏에 安胎의 목적으로 상용하고 있다.²⁻⁴⁾ 또한 山藥은 人蔘, 黨蔘, 白朮 등과 함께 대표적인 健脾安胎 약물이며, 임상에서 胎漏 및 胎動不安에 주로 쓰이는 安奠二天湯²⁾의 구성약물로 활용될 뿐만 아니라 壽胎丸^{5,6)}과 舉元煎에 가미되어 활용되고 있다.

현대 임상 환경에서 볼 때 임신 중인 환자에게 韓藥을 투여하는 것은 매우 신중하게 접근하여야 한다. 비록 문헌 자료와 임상 실제의 경험에 따르면, 많은 한약들이 유효하고 무해하다는 것을 확인할 수 있으나 이러한 사실에 대한 실험적 연구들은 많지 않아 의료소비자들의 욕구에 충분하지 않는 측면이 있기 때문이다. 따라서 임신 중에 활용되는 여러 약물 중 사용빈도가 높고 효능이 뛰어난 山藥의 임신 중 사용에 대한 안

전성을 실험적으로 규명하는 연구를 구상하였다. 이를 직접 투여하는 방법 대신 배양된 신경세포주에 투여하여 독성유무를 판별하고, 태아의 발생과정에서 산화적 자극에 대한 山藥의 항산화작용의 방어효과가 유효할지를 보는 실험을 기획하였다.

발생과정 중에 나타날 수 있는 많은 비정상적 영향의 대부분은 신경세포의 분화 및 증식과정과 관련되어 있다. 분화 및 증식에 관련된 많은 인자에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있음에도 불구하고 韓藥과 관련된 연구는 많지 않았다.

이에 저자는 山藥의 안전성과 효능 검증을 위한 연구 과정에서 일차적으로 山藥 추출물이 가지는 발생단계에서의 안전성 유무 및 산화작용에 대한 보호효과를 확인하고자 하였다. 신경세포의 안전성(증식과 분화)에 미치는 영향과 항산화효과를 관찰하기 위하여 신경세포의 안전성 연구에 많이 사용되고 있는 세포주인 PC12 cell을 이용하여 이들의 안전성 및 항산화효과에 대한 결과를 얻었기에 이 논문을 통해 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 재료 및 추출물의 제조

규격 품목의 山藥(경북 안동 產⁷⁾)을 전문 약재상을 통해 구입한 다음 세정하여 실험에 사용하였다. 山藥 50g을 3차 증류수와 MeOH에 넣고 중탕하였다. 물 중탕은 임상적 전탕 시간에 근사한 2시간 동안 중탕하였다. MeOH 중탕은 1시간 30분 동안 중탕하였다. 각 추출물로부터 잔해를 제거하기 위해 advantec toyo filter paper #2 (Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 사용하여 여과하

였다. 미세한 입자의 pellet을 제거하기 위하여 5000rpm으로 30분씩 2번 원심분리(한일과학산업, Korea) 하였다. 그런 다음 추출액을 동결건조(동결건조기: ilshin Lab, Korea)시켰다. 동결건조 후 세포처리에 적합한 pH를 맞추기 위하여 고형분에 10x PBS (phosphate-buffered salines)와 cell and tissue culture grade water (Welgene, Korea)에 녹여 pH 7.0에 맞추었다. 얻어진 물 중탕 추출물의 total volume은 10.5 ml이며, MeOH 중탕 추출물의 total volume은 6.6 ml였다.

최종적으로 clean bench에서 pore size 0.2 μ m인 syringe filter (Nalgene, USA)로 filtering 하였다. 그런 다음 원액과 희석액(10배 dillution, 20배 dillution, 40배 dillution, 80배 dillution)의 sample을 -20°C에 보관하였다 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포주

한국세포주은행에서 분양받은 Pheochromocytoma 12 cell (PC 12 cell)을 DMEM Medium에 2×10^5 개가 되게 100mm dish에 seeding하고 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에 계속 계대 배양하였다.

2) Cell viability

MTT(tetrazolium-3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)2,5diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma)는 세포내로 흡수된 후, 미토콘드리아의 Succinate dehydrogenase에 의해 formazan을 형성하는데 이 물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하므로 세포의 생존율을 측정하는 방법으로 이용하였다.

배양한 PC 12 cell을 harvest하여 96well plate에 2.5×10^4 cell/ 200 μ l의 세

포를 seeding하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 버리고, 山藥을 농도별로 처리한 배지를 넣어주고 다시 24시간 배양하였다. 다음날 각 well의 배지를 버리고 새로운 배지 200 μ l와 MTT(2mg/ml) 50 μ l를 넣어준 후 2시간 이상 반응 시켰다. 2시간 이상 후에 각 well의 배지를 제거한 후 DMSO를 150 μ l 첨가하여 microplate mixer상에서 5분간 잘 혼합하여 보라색의 침전물을 용해시킨 후 ELISA plate reader (Molecular device, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Western blotting

(1) 단백질 준비

山藥 및 H₂O₂ 처리 후 scraper로 PC12 cell을 모으고 모은 세포를 담겨있던 배지와 함께 1000rpm에서 원심분리하여 상층액을 버린 뒤 2ml의 cold PBS로 두 번 세척하였다. 여기서 1% Triton X-100, 50mM Tris-HCl(pH8.0) 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, protease inhibitor cocktail로 조성된 lysis buffer를 200 μ l fmf 가해 10분정도 vortexing하고 10분정도 lysis한 후 4°C, 15000rpm에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리한 후 상층액만 취해서 단백질 양은 Protein assay kit(Bio-rad)를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 전기영동 및 Transfer

정량이 된 단백질에 lysis buffer와 sample buffer(60mM tris:pH6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue)를 섞어 protein 양을 같게 한 후 100°C heat block에서 5분 동안 boiling한 후, spin-down하여 시료를 모았다. 30% polyacrylamide mix와 3차 증류수, 1.5M

Tris-HCl(pH8.8), 10% SDS, 당일 제조된 10% ammonium persulfate, TEMED를 혼합하여 separating gel(12%~15%)을 만든 다음, 깨끗이 세척하여 조립된 전기영동 유리판에 용액을 부어 gel을 굳혔다. Stacking gel은 30% polyacrylamide mix와 3차 증류수, 1M tris(pH6.8), 10% SDS, 당일 제조된 10% ammonium persulfate, TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine)를 혼합하여 separating gel 위에 부어 완전한 gel을 형성하였다. 전기영동 running buffer는 tris base 30.0g, glycine 144g, SDS 10g을 1ℓ에 녹여 10× stock을 만들었다. 정량한 단백질을 10~20μl를 loading하고 100V로 약 1시간 running하였다. 전기영동된 gel은 nitrocellulose membrane에 100V 1시간동안 transfer 되었다. Transfer buffer의 조성은 1ℓ에 tris-base 3.03g glycine 14.63g, methanol 200ml으로 만들어서 4℃ 보관 후 사용하였다. Transfer된 membrane은 200mM tris-base, 1.54M NaCl, 3차 증류수, tween 20으로 조성된 TTBS(pH7.5)용액으로 세척 후 5% skim milk에 담아 4℃에 overnight하였다.

(3) Western blotting 및 ECL detection
다음날 blocking 용액 제거 후, 1차 항체(anti Bax 1:500, Santacruz Co)를 5%

skim milk로 100배 희석하여 만든 용액에 membrane을 넣어 1시간 반응시킨 후, TTBS용액으로 10분간 3회 세척하였으며, 2차 항체를 5% skim milk로 100배 희석하여 만든 용액에 membrane을 넣어 1시간 동안 반응을 유도 시켰다. 용액을 제거 후, TTBS로 10분씩 3번 세척하였다. ECL kit(Amersham,USA) 용액 A와 B를 40 : 1로 잘 섞어 membrane에 적시고 1분간 반응시킨 후 cassette에 membrane을 올려놓고 X-ray film으로 감광시켰다. 일정 시간 감광시킨 다음 develop하여 band 확인한 후 fixer에 담아 고정시켰다. 고정이 끝난 후, 흐르는 물로 깨끗이 씻어 건조 후 scanning 하여 densitometer(Bio-rad)로 각 밴드의 optical density를 측정하였다.

III. 結 果

1. 山藥의 Cell viability에 미치는 영향
山藥의 세포독성을 확인하기 위하여 추출방법을 달리한 추출액으로 각각의 배율로 MTT assay를 실시한 결과 MeOH로 stirring으로 추출한 원액(X0)을 제외한 모든 추출물에서 세포독성을 관찰할 수 없었다. 하지만 MeOH로 stirring한 원액에서의 경우 역시 세포독성이 山藥에서 유래한 것인지 확인 할 수 없었다. (Fig 1-5)

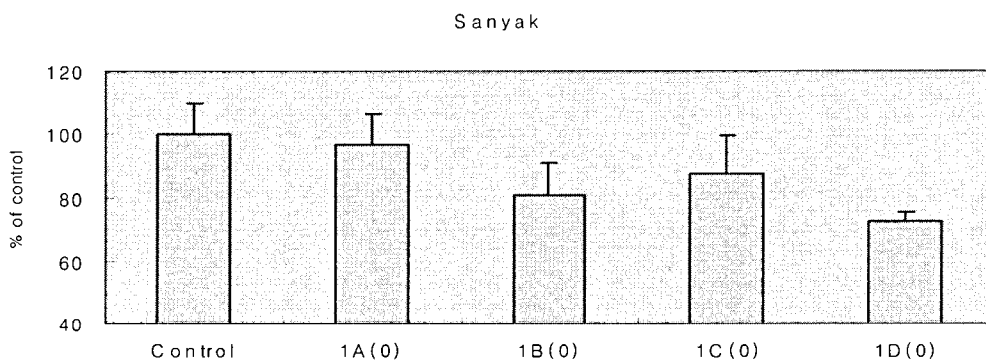


Fig 1. Compare of cytotoxicity in PC12 cell treated each extract from several methods of Sanyak. Control, 1A(0) Non diluted sanyak extract of water double boiler, 1B(0) Non diluted sanyak extract of Stiring, 1C(0) Non diluted sanyak extract of MeOH double boiler, 1D(0) Non diluted sanyak extract of MeOH Stiring.

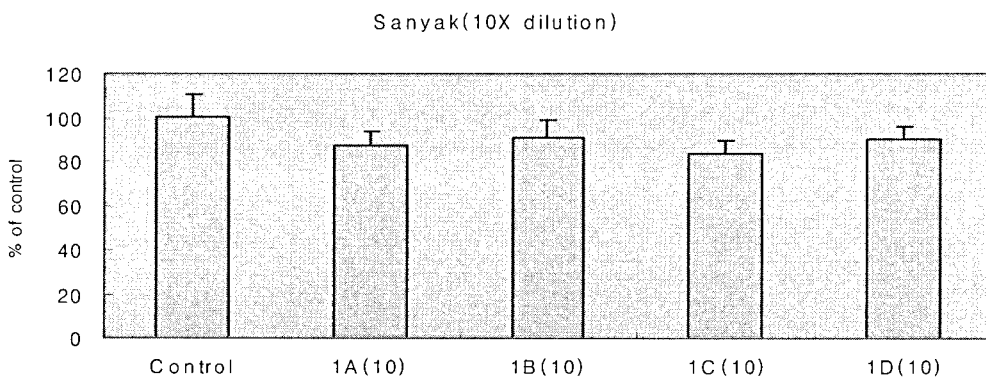


Fig 2. Compare of cytotoxicity in PC12 cell treated each extract from several methods of Sanyak. Control, 1A(10) 10X sanyak extract of water double boiler, 1B(10) 10X sanyak extract of Stiring, 1C(10) 10X sanyak extract of MeOH double boiler, 1D(10) 10X sanyak extract of MeOH Stiring.

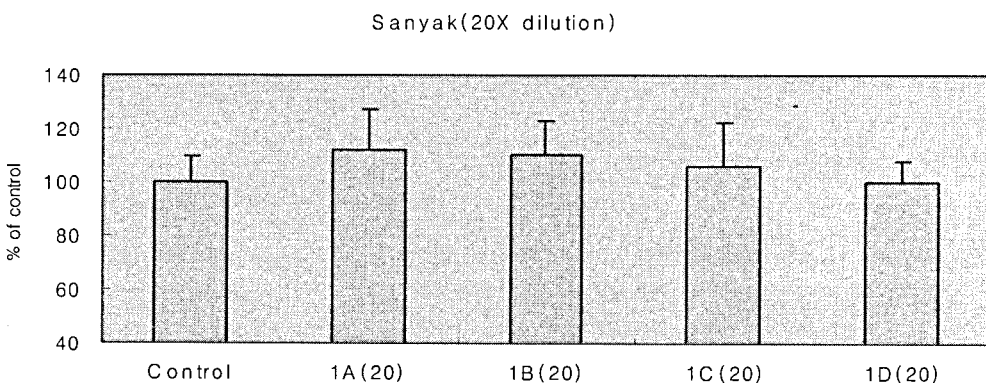


Fig 3. Compare of cytotoxicity in PC12 cell treated each extract from several methods of Sanyak. Control, 1A(20) 20X sanyak extract of water double boiler, 1B(20) 20X sanyak extract of Stiring, 1C(20) 20X sanyak extract of MeOH double boiler, 1D(20) 20X sanyak extract of MeOH Stiring.

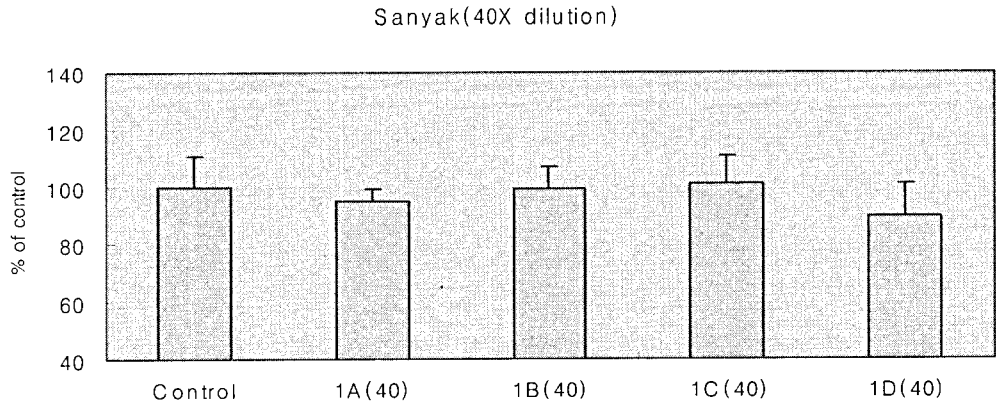


Fig 4. Compare of cytotoxicity in PC12 cell treated each extract from several methods of Sanyak. Control, 1A(40) 40X sanyak extract of water double boiler, 1B(40) 40X sanyak extract of Stiring, 1C(40) 40X sanyak extract of MeOH double boiler, 1D(40) 40X sanyak extract of MeOH Stiring.

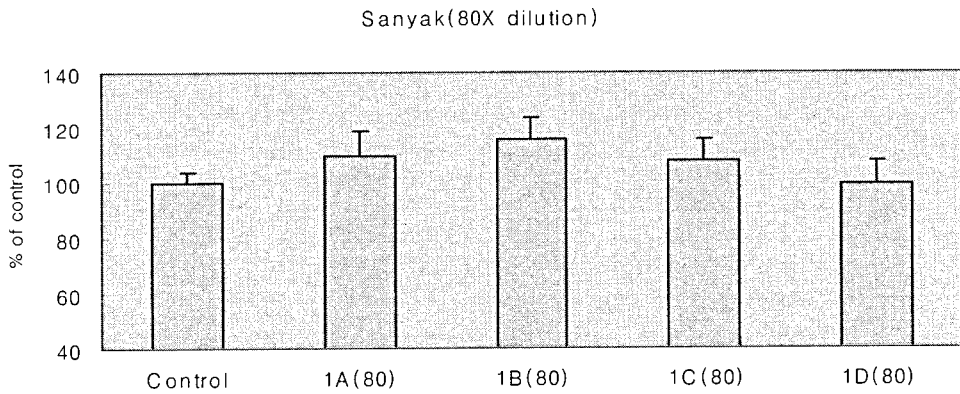


Fig 5. Compare of cytotoxicity in PC12 cell treated each extract from several methods of Sanyak. Control, 1A(80) 80X sanyak extract of water double boiler, 1B(80) 80X sanyak extract of Stiring, 1C(80) 80X sanyak extract of MeOH double boiler, 1D(80) 80X sanyak extract of MeOH Stiring.

2. 山藥이 Bax, GSK-3 β 발현에 미치는 항산화적인 영향

山藥의 항산화효과를 관찰하기 위하여 일반적 stress에서 초기 반응을 일으키는 Bax의 발현을 확인한 결과 山藥에 의한 Bax의 발현양이 감소하는 결과를 나타내고 있었으며, Bax의 발현을 유발

하기 위하여 처치된 H₂O₂의 처치 전 처치된 山藥군에서 Bax의 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 山藥만을 처치한 환경뿐 아니라, H₂O₂ 50 μ M을 山藥과 함께 투여한 환경에서도 Bax의 감소를 뚜렷이 확인할 수 있었다.

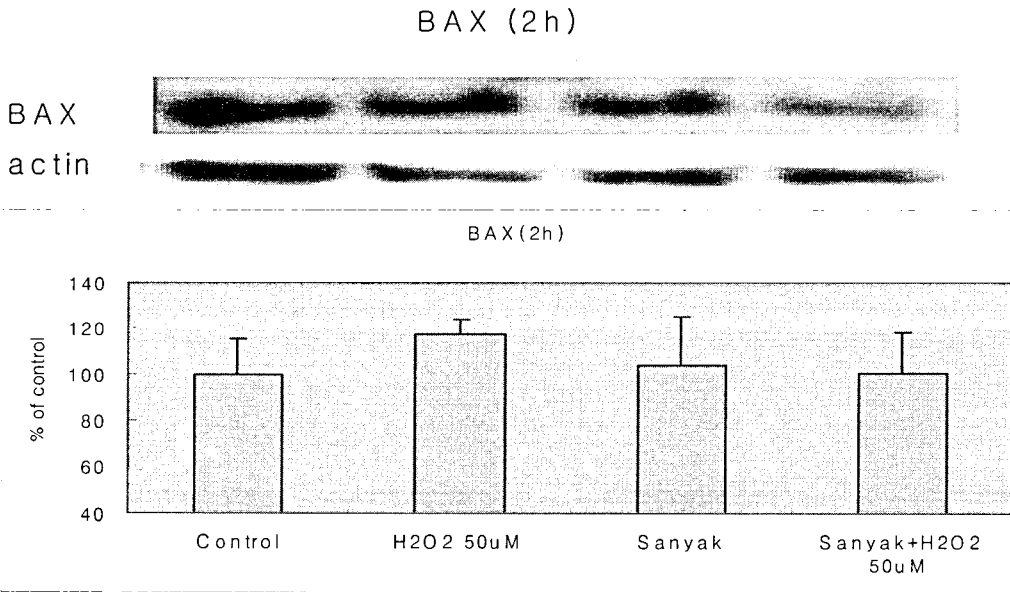


Fig.6. Expression of Bax after 2hr in Sanyak treated PC12 cell

Bax의 발현을 유발하기 위하여 처치된 H₂O₂ 50uM만 들었을 때 비교하면, 2시간 경과 후 山藥처치로 Bax의 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 山藥

만을 처치한 환경뿐 아니라, H₂O₂ 50uM을 山藥과 함께 투여한 환경에서도 Bax의 감소를 뚜렷이 확인할 수 있었다.

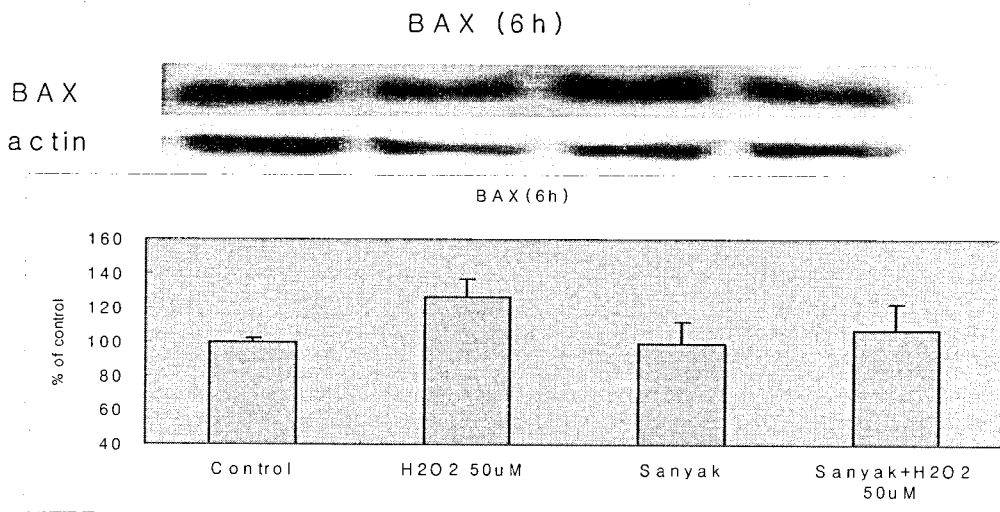


Fig.7. Expression of Bax after 6hr in Sanyak treated PC12 cell

Bax의 발현을 유발하기 위한 처치 6 시간 경과 후 山藥처치로 Bax의 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 山藥만을 처치한 환경뿐 아니라, H₂O₂ 50uM을 山藥과 함께 투여한 환경에서도 山藥만을 처치했을 때보다는 증가된 Bax의 발현이 보여지지만, H₂O₂만을 처치한 군과 비교하였을 때 Bax의 발현감소를 뚜렷이 확인할 수 있었다.

Bax의 발현양상을 확인한 후 Bax의

인산화에 관련이 있는 인자 중 하나인 GSK-3β (Glycogen Synthase Kinase-3β)의 발현을 확인하기 위하여 山藥을 2시간 및 6시간 전에 처치한 후 GSK-3β의 발현을 확인한 결과 2, 6시간 모든 군에서 GSK-3β의 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 특히 山藥 단독 및 H₂O₂와 山藥을 동시에 처치한 군에서 H₂O₂ 처치군 보다 줄어든 GSK-3β를 확인할 수 있었다.

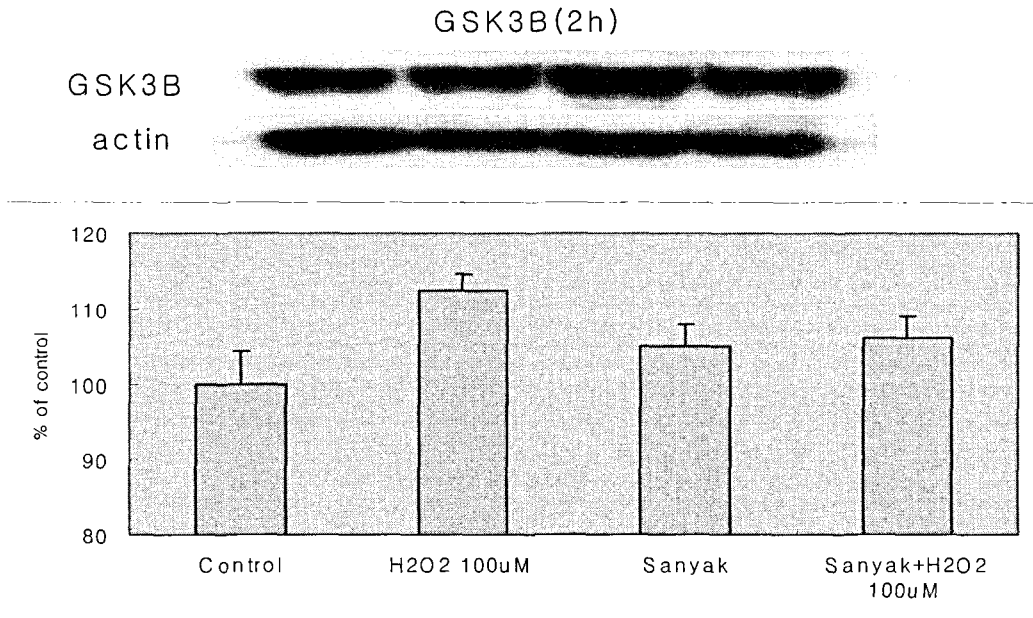


Fig.8. Expression of GSK3B after 2hr in Sanyak treated PC12 cell

山藥만을 처치한 환경과 H₂O₂ 50uM을 山藥과 함께 투여한 환경에서 2시간 경과후 GSK-3β의 감소를 확인할 수 있었다. 그런데 이 경우는 山藥만을 처치했을 때보다는 H₂O₂ 50uM을 山藥과 함께 투여한 환경에서 조금은 많은 GSK-3β가 관찰되었다.

山藥만을 처치한 환경과 H₂O₂ 50uM을 山藥과 함께 투여한 환경에서 6시간 경과후 GSK-3β의 감소를 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 山藥만을 처치했을 때와 H₂O₂ 50uM을 山藥과 함께 투여한 환경에서 모두 2시간 경과 시보다도 감소된 GSK-3β가 관찰되었다.

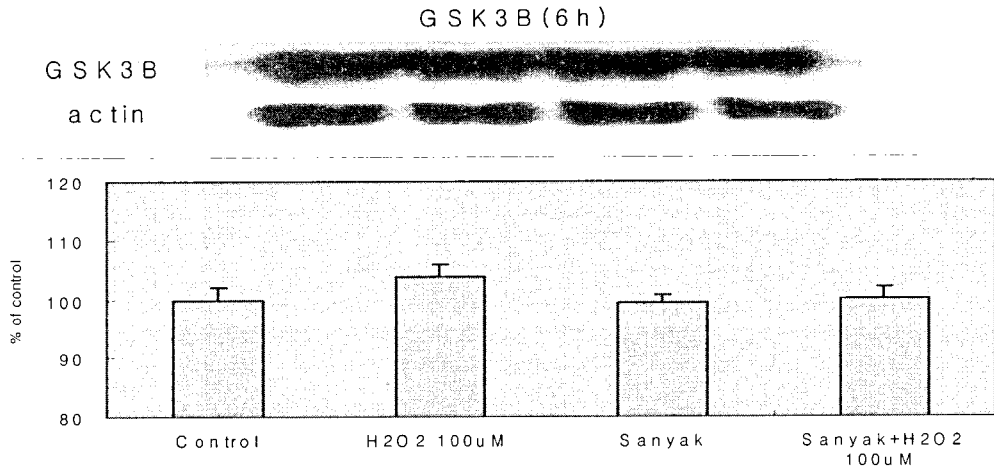


Fig.9. Expression of GSK3B after 6hr in Sanyak treated PC12 cell

IV. 考 察

山藥(Dioscoreae Rhizoma)은 마속식물의 근경의 외피를 제거하여 말린 것으로 《神農本草經·上品》에 收載되어 있는 藥物이다. 薯蕷, 山芋 등의 異名으로도 불리며, 腎, 肺, 脾로 歸經한다. 古來로부터 滋養, 強壯, 強精, 止渴, 止瀉 등에 有效하게 쓰였다.^{8,9,10)}

또한 山藥은 人蔘, 黨蔘, 白朮 등과 함께 代表적인 健脾安胎약물이다.^{1,11)} 임상에서는 胎漏 및 胎動不安 등에 사용되는 安奠二天湯^{2,4)}의 구성약물로 활용될 뿐만 아니라 滑胎의 치료 등에 사용하는 壽胎丸^{5,6)}과 舉元煎¹²⁾에 가미되어 활용되고 있다. 高谷晉¹³⁾은 氣虛腎虧型의 切迫流産에 대해 山藥을 君藥으로 하고 白朮炒, 兔絲子, 杜冲, 桑寄生, 阿膠(蛤粉炒), 熟地黄, 黨蔘, 續斷, 艾葉炭으로 구성된 藥물을 투여한 結果를 보고한 바 있다.

山藥이 포함된 처방 중 胎動胎漏, 妊娠腹痛 등 임신 중 병증에 활용하는 것

으로는 《辨症奇門》의 安奠二天湯(人蔘 熟地黄 白朮土炒 炙甘草 杜冲 枸杞子 山茱萸 山藥 白扁豆)⁴⁾, 《聖濟總錄》의 續斷丸(續斷 附子 蒲黃 乾薑 芍藥 川芎 山茱萸 白朮 肉從蓉 兔絲子 山藥 熟乾地黄), 《劉奉五婦科經驗》의 清熱安胎飲(山藥 石連子 黃芩 天黃蓮 椿根白皮 側柏炭 阿膠) 등이 있다.¹⁴⁾ 安奠二天湯은 方藥合編 增補方에도 傳青主女科方으로 인용하여 수재되어 있다.

山藥의 기원에 대하여 한국에서 마(Dioscorea batatas Decaisne), 참마(Dioscorea japonica Thunberg)로 중국에서 薯蕷(Dioscorea opposita Thunb)로 기재하여 달리 하고 있으나¹⁵⁾ 모두 山藥으로 사용하는데 문제가 없는 것으로 생각된다.¹⁶⁾ 영어명칭은 chinese yam, dioscorea 로 불리며, pharmaceutical name은 Radix Dioscoreae Oppositae로 쓰인다.

山藥은 식이 목적으로도 상용되어 독성이 없는 것으로 알려져 있다. 그러나 약용으로 대량 사용할 경우의 안전성에

대해서는 다양한 평가가 이루어져 있지 않다.

山藥의 구성성분은 dioscin¹⁷⁾, diosgenin 0.012%, batatasine 0.025%, tannin, 유리 아미노산, 점액질, choline, 전분¹⁸⁾ 16%, 당단백, vitamine C이다.¹⁹⁻²³⁾ 이외에 Allantoin²⁴⁾이 있다.

山藥(Dioscoreae Rhizoma)의 수용성 점액물질(mucilage)은 polysaccharide와 protein으로 구성되어 있는 proteoglycan으로 알려져 있다.²⁵⁾ 이는 단백질과 복합된 산성 점액성 다당류로서 뼈, 연골, 상아질, 피부, 인대 등에서 발견되며, 뼈에서는 유기성분의 15%를 점한다.

山藥의 점액 성분과 관련하여 한 등²⁵⁾은 山藥의 점액성분의 정제와 함량분석에 관한 연구를 진행한 바 있다.

山藥은 補脾肺不足 清虛熱 潤皮毛 化痰涎 固腸胃 止瀉痢 益腎強陰하는 효능^{8,9,26-28)}이 있어 脾虛泄瀉 消渴 遺精 帶下 虛損勞傷을 治^{10,29,30)}하고, 乳腺炎에 유효하였다는 임상보고¹¹⁾가 있으며, 실험적 연구로 동맥경화에 유효함을 입증한 사례가 있다.³¹⁾ 그리고, 면역조절효과³²⁾가 다른 補氣藥들과의 비교실험으로 증명되고 있고, 혈당강하작용으로 당뇨를 조절³¹⁾한다는 실험보고가 있다. 황 등³⁾에 의하면 山藥 추출물은 Estrogen 결핍성 골다공증모델에 대해 감소된 골밀도, 골회분량, 골 미량원소량 등을 증가시켰고, 혈중 osteocalcin, ALP 활성을 감소시켰으며, 노중 OH-proline 유리를 감소시킨 것으로 보아 파골세포의 기능을 억제하여 골다공증에서 촉진된 골대사를 억제하여 골밀도를 증가시킨다고 하였다. 다른 연구로 山藥의 메탄올 추출물이 류마티스 관절의 염증 반응을 억제함을 밝힌

연구³³⁾가 이루어지기도 하였다. 이러한 연구들은 山藥을 골다공증과 병합된 퇴행성 관절염이나 류마티스 관절염에 대해서도 응용할 수 있음을 시사하는 것으로 사료된다. 특히 山藥에는 내분비계통에 대한 효과^{33,34)}와 함께 간 보호 작용³⁵⁾과 간에 무독하다는 효과³⁶⁾, 조속 난소의 임신에서 山藥이 포함된 한약이 미친 영향에 대한 논문³⁷⁾도 나오고 있으니, 독성유무와는 무관하게 발생과정 중의 배아에 대한 영향은 객관적으로 검증될 필요성이 있다.

일반적으로 안전성연구에 기초적 자료는 살아있는 배아 및 태아세포를 이용한 일차세포배양법(Primary cell culture)과 세포주를 대상으로 실시되고 있다. 대뇌 신경배양법(Cortical cell culture), 중뇌 세포배양법(Midbrain cell culture) 및 별아교세포배양법(Astrocyte culture), 미세아교세포배양법(Microglia cell culture)과 같은 특정세포 배양법 등을 필요에 따라 사용되는 일차세포배양법과 배아전체를 배양하는 전배아배양법(Whole embryo culture) 등을 통하여 실시되는 경우가 있다. 이들의 문제점인 실험에 따라 동물을 사용해야 하는 단점을 해결하기 위하여 개발되어진 대체시험법으로 대표적인 신경세포주인 PC12 cell과 Neuroblastoma cell 등이 많이 사용되고 있다.^{38,39)}

발생과정 중에 나타날 수 있는 많은 비정상적 영향의 대부분은 신경세포의 분화 및 증식과정과 관련되어 있다고 알려져 있다. 신경세포는 초기 배아에서 분화하며, 증식단계를 거치는데 이 때 독성물질 등에 의해 정상적인 신경세포 분화 및 증식에 장애를 초래하며 그 결

과 여러 가지 중추신경계 결손 및 장애를 유발한다고 알려져 있다.^{38,40)}

먼저 세포수준에서 안전성과 관련하여 실시하는 가장 기초적인 연구방법은 세포생존을 측정방법을 통한 독성여부를 확인하는 것이며, 이들의 여부가 확인된 후 이들의 세포사 기전을 확인하는 방법으로 안전성의 여부를 확인한다.

대개 새로운 항암제 개발을 위한 표능 검색이나 기존에 개발된 항암제의 감수성을 알아보기 위하여 동물실험 등 생체에의 적용 단계 이전에 생체 밖에서의 약물의 증양세포 성장 억제력을 알아보는 과정을 거쳐야 한다. 세포의 증식 또는 살아있는 세포를 정확하게 측정하는 가장 직접적이고 이상적인 방법은 세포에 trypan blue등을 처리한 후 현미경과 hemocytometer를 이용하여 살아있는 세포를 세는 것이지만, 시간과 너무 많은 노력이 요구되므로 검체수가 많은 경우에는 사용할 수가 없기 때문에 세포의 살아있는 정도를 간접적으로 측정하려는 여러 가지 방법들이 개발되어 왔다. 이를 위하여 항암제의 in vitro 약효 검색법 중에서 현재 많이 사용되고 있는 Tetrazolium-based colorimetric (MTT) 검색법은 96-well plate를 사용하고 검사 결과를 ELISA reader를 이용하여 많은 시료를 간단히 빠르고 객관성 높게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 널리 사용되고 있다. MTT 검사법은 항암제의 감수성에 대한 1차 선별검사의 목적으로 많이 사용되지만, 성장인자에 대한 세포의 감수성 실험 등에도 대단히 유용하게 사용될 수 있다.^{41,42)}

본 실험에서 MTT 검사에 의한 세포의 생존율을 보았을때, 山藥의 물 중탕

추출물, 山藥의 물 stiring 추출물과 山藥의 MeOH 중탕 추출물, 山藥의 MeOH stiring 추출물의 원액 및 희석액(x10, x20, x40, x80)을 사용한 각각의 MTT assay 결과, 山藥의 MeOH stiring 추출물의 원액을 제외한 모든 추출물에서 세포독성을 관찰할 수 없었다.

유효성과 관련하여 실시하는 연구방법으로는 임상적 약물들이 가지는 일차적인 효과 이외에 일반적으로 세포사의 기전을 차단 또는 억제인자로서 작용을 하는가 하는 것을 포함하고 있으며, 이러한 세포사 억제 또는 보호효과 역시 유효성부분으로 분류되고 있다.^{43,44)}

일반적으로 독성으로 세포의 사망이 발생하면 괴사, 염증 및 세포사 중 한 경로를 통하여 세포의 사망이 이루어진다. 괴사는 빠른 시간 내에 발생하는 집단적 세포사를 말하며, 이러한 집단적 세포사의 특징은 세포막이 먼저 파괴되는 형태를 띤다. 하지만 apoptosis로 알려진 세포사는 세포내부의 여러 경로를 통하여 핵의 응축 및 붕괴를 유발하여 세포사가 이루어지는데 독성에서 관찰되는 여러 가지 세포사중 독성이 약한 물질에 의한 세포사는 주로 apoptosis를 통하여 발생한다.^{38,40,41)} 이러한 apoptosis가 진행되면 caspase-3를 활성화 시키는 사립체와 관련한 intrinsic pathway, extrinsic pathway 그리고 caspase-independent AIF(Apoptosis inducing factor) pathway의 경로로 cell death가 진행된다. 먼저 intrinsic pathway는 사립체에서 세포질로 cytochrome C가 방출되어 Afaf-1과 complex를 이루어 caspase-9을 활성화 시키고, 활성화 된 caspase-9은 결국 caspase-3를 활성화시켜 apoptosis를 유발한다.^{45,46)} Extrinsic

pathway는 Fas 또는 TNF-(Tumor necrosis factor-) membrane receptor system에 의해 활성화된 caspase-8이 caspase-3를 활성화시켜 apoptosis가 일어나는 것이다^{43,44,46)}. AIF는 사립체에서 방출되며 apoptogenic effect를 보이고⁴⁶⁾, 이는 caspase-independent 양상으로 염색 질농축(chromatin condensation)과 핵 응축(nuclear shrinkage)을 유발하여 apoptosis를 일으킨다.⁴⁷⁾ 이 중 apoptosis의 intrinsic pathway 중 Bax가 사립체의 자극을 유도하기 때문에 Bax는 일반적으로 apoptosis의 발생에서 초기에 발현되는 물질로 알려져 있다.^{39,43)} 이러한 Bax의 인산화에 관여하는 물질 중 Glycogen Synthase Kinase-3β(GSK-3β)가 존재하는데, GSK-3β는 serine/threonine protein kinase로서 포유류에서 GSK-3α와 GSK-3β, 이 2가지 isoform을 가지고 있다. 이 GSK는 β-catenin, CREB, p53, c-Myc, c-Jun, heat shock factor-1, cyclin D1, Bax, axin 등의 인산화에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 GSK-3β의 발현증가는 일반적으로 apoptosis 과정에서 관찰할 수 있으며, 이들의 증가는 apoptosis를 증가시키는 결과로 알려져 있다. 또한 GSK-3β는 insulin, Wnt, 그리고 Hedghog signal pathways 등 몇몇 신호전달과 관련이 있다는 보고가 있으며, 이 중 발생단계와 관련된 Wnt signaling에서 GSK-3β는 β-catenin과 관련이 있다고 알려져 있다.⁴⁹⁻⁵⁴⁾

인간을 포함한 호기성 호흡을 하는 생명체는 생명유지에 필요한 에너지를 만들기 위해 산소를 세포내로 받아들여 미토콘드리아 내의 산화환원 효소계 또는

외부 항원에 노출된 면역세포에 의해 그리고 외부적으로는 방사선 또는 화합물 등에 의해 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성한다. 이러한 활성 산소종으로는 O₂·, O₂, H₂O₂, HOCl를 들 수 있으며, 지질ROOH나 free radical (ROO·, RO·)등의 과산화 지질도 ROS에 포함된다. 활성 산소종과 그 유도체는 생체내에서 많은 분자, 단백질, DNA 등을 공격하여 세포의 노화, 변형을 초래하며 여러 가지 질병을 발생시키며, 더 나아가서는 암을 유발시키게 된다.⁴⁸⁾

山藥은 H₂O₂의 처치에 의해 생성된 Bax의 발현을 감소시켜줌으로써 stress에 의해 발생하는 reactive oxygen species(ROS)의 영향을 줄여주는 항산화 효과가 있는 것으로 사료된다.^{39,53)}

백혈병 및 고형종양의 치료에 사용되는 항암제인 adriamycin을 투여하여 세포독성을 유발시킨 심장근육세포(H9C2 cell)에서 生地黃의 보호효과⁵⁶⁾에 대한 연구에서 adriamycin의 세포독성 기전은 세포내에서 ROS의 생성으로 발생하기 때문에 이 ROS에 의한 세포독성은 사립체를 통하여 apoptosis를 유발하며, 결국 effector caspase 인 caspase-3의 활성화에 의하여 apoptosis가 발생된다. 이러한 기전에 생지황은 초기 apoptosis에 관여하는 Bax의 증가를 차단시키는 작용을 하며 그 작용은 bcl-2에 의한 것이라고 보고하였다.⁵⁶⁾ 또한 국소부위 뇌경색을 유발한 쥐에서 Angelica를 사용하여 뇌경색의 진행정도를 관찰한 연구에서 Angelica가 뇌경색부위를 감소시켰으며, 신경세포의 apoptosis를 현저하게 감소시킴을 확인할 수 있었는데, 그 원인은 Bax의 감소에 따른 것이라고 보고하였

다.⁵⁷⁾

본 연구에서도 山藥을 먼저 처치한 후 H₂O₂에 의해 신경세포인 PC12 cell에서 Bax 및 GSK-3β의 발현이 H₂O₂ 단독으로 처치했을 때보다 감소하는 결과를 나타냄으로써 같은 결과를 나타내고 있었다. 이상과 같은 결과에서 山藥에 의한 Bax 및 GSK-3β 억제효과는 ROS에 의한 apoptosis에 대한 항산화효과를 가질 것으로 사료된다.

따라서 전통적으로 補脾胃, 益肺氣, 強腎固精, 止帶下, 安胎 등에 사용한 山藥은 MTT assay에서 PC12 세포에 대한 독성이 없으며, 山藥에 의한 Bax 및 GSK-3β 발현억제효과는 ROS에 의한 apoptosis에 대한 항산화효과가 있을 것 이란 추측이 가능해진다. 이러한 결과는 향후 山藥의 安胎작용에 관한 추가적 연구를 통해 심화 고찰될 가치가 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

山藥의 안전성과 항산화작용에 대한 효능을 실험으로 입증하기 위하여 신경세포주 PC12 cell를 사용하여 연구를 진행하였다. 세포생존을 측정방법의 일종인 MTT assay를 이용하여 독성 유무를 확인하고, apoptosis의 초기에 확인되는 Bax를 western blot 방식으로 측정하여 세포사 기전을 확인하여 안전성의 여부를 확인하는 방법을 취하였다.

실험재료로는 山藥의 물 중탕 추출물과 MeOH 중탕 추출물의 원액 및 희석액(x10, x20, x40, x80)을 사용하였다. 이들 농도별로 처리한 배지에 PC12 cell를 배양하여 MTT를 반응시키고 흡광도를

측정하였다. 그리고 山藥 및 H₂O₂ 처리 후 Bax와 GSK-3β를 각각 넣고 반응시켜 optical density를 측정하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 山藥의 물 중탕 추출물, 山藥의 물 stiring 추출물과 山藥의 MeOH 중탕 추출물, 山藥의 MeOH stiring 추출물의 원액 및 희석액(x10, x20, x40, x80)을 사용한 각각의 MTT assay 결과, 山藥의 MeOH stiring 추출물의 원액을 제외한 모든 추출물에서 세포독성을 관찰할 수 없었다.
2. 山藥처치에 의해 apoptosis 초기에 발현되는 Bax의 감소가 현저하게 관찰되며, Bax의 발현을 유발하기 위하여 처치된 H₂O₂의 처치시 전처치된 山藥군에서도 H₂O₂ 단독으로 처치했을 때보다 Bax의 발현량이 감소되었다. 또한 GSK-3β의 발현을 확인한 결과에서도 유사한 효과가 확인되었다. 이러한 효과는 2시간 경과 후보다도 6시간 경과 후에 더욱 감소된 양상으로 발현되는 것을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 보아 山藥은 신경세포의 분화, 증식단계에 세포독성 확인결과로 보건대 안전하며, H₂O₂ 처리에서의 山藥에 의한 Bax 및 GSK-3β 발현량 감소는 apoptosis에 대한 山藥의 항산화효과를 보여준다고 할 수 있다.

- 투 고 일 : 2006년 10월 27일
- 심 사 일 : 2006년 10월 30일
- 심사완료일 : 2006년 11월 06일

參考文獻

1. 임은미. 여성본초학. 부천: 전국의학사, 2005; pp.81-83.
2. 김성란, 정진홍, 유동열. 安奠二天湯을 중심으로 한 胎漏 및 胎動不安의 文獻的 考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1998; 제7권 제1호: pp.607-624.
3. 황귀서 이대영. Estrogen 결핍성 골다공증에 미치는 山藥 추출물의 영향. 대한예방한의학회지. 2003; 제7권 제1호: pp.55-66.
4. 김성란, 정진홍, 유동열. 安奠二天湯이 卵巢摘出白鼠의 性호르몬 및 脂質代謝에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 1999; 12(2): pp.281-312
5. 최진향, 유동열. 滑胎의 治療에 使用된 壽胎丸의 效能에 對한 文獻的 考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2001; 제 10권 제1호: pp.93-108
6. 진천식, 유동열. 壽胎丸 活用に 對한 考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1997; 제5권 제2호: pp.393-407
7. 안동특산물 山藥(마)의 절편 정과개발. 농촌진흥청. 2003
8. 이상인 등. 한약임상응용. 서울: 성보사, 1986; pp.124-126, 171-178, 356-358, 395-397, 429-431.
9. 이상인. 본초학. 서울: 수서원. 1981; p.105,114,116,282,286,534.
10. 이상인 등. 본초학. 서울: 영림사, 1991; p.194,304,306,538,580,626,627.
11. 최태섭. 한국의 보약. 서울: 열린책들. 1990; pp.109-114, 181-191, 241-243.
12. 원진희, 이종덕. 擧元煎이 마우스 및 랫트의 면역반응에 미치는 영향. 원광대학교 한의학연구소 논문집. 1997; 제7권 제2호: pp.77-95.
13. 高谷晉. 先兆流産中藥保胎方法의 初步 探討. 中醫雜紙. 1985; 제 9권: p.38.
14. 柳長華. 婦科常見病實用方. 北京: 人民衛生出版社. 1997; p.516,523.
15. 도정애. 韓國産 山藥類의 生藥學的 研究. 생약학회지. 1984; 제15권 제1호: pp.30-38.
16. 조은환 등. 山藥의 품질인증 방안. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2004; 제 13권 제2호: pp.187-196.
17. 남두현 등. 山藥(Dioscorea Rhizoma) 으로부터 Dioscin의 분리분석. 생약학회지. 2006; 제37권 제1호: pp.33-36.
18. Wang shujun et al. New starches from traditional Chinese yam(Dioscorea opposita Thunb.) cultivars. Carbohydrate Research. 2006; 341(2): pp.289-293.
19. 中華本草 編纂委員會. 中華本草. 上海: 上海科學技術出版社. 1996; pp.242-245.
20. 陰健 등. 中藥現代研究與臨床應用. 北京: 學苑出版社. 1994; p.99.
21. 徐國均 등. 中國藥材學. 北京: 中國醫藥科技出版社. 1996; pp.670-672.
22. 黃泰康. 常用中藥成分與藥理手冊. 北京: 中國醫藥科技出版社. 2001; pp.389-391.
23. 조은환 등. 山藥의 품질인증 방안. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2004; 제 13권 제2호: pp.187-196.
24. 황귀서. 山藥으로부터 Allantoin의 분리 및 함량분석. 대한예방한의학회지. 2003; 제 7권 제1호: pp.133-138.
25. 한용남, 이인란, 한승혜. 山藥 粘液物質의 精製 및 含量分析에 관한 研究.

- 생약학회지. 1990; 제21권 제4호: pp.274-283.
26. 范崔生 主編. 中藥的應用. 北京: 人民衛生出版社. 1989; p.392,395.
27. 王浴生 主編. 中藥藥理與應用. 北京: 人民衛生出版社. 1983; pp.400-406, 529-532, 718-722, 767-770.
28. 羅元愷 主編. 實用中醫婦科學. 上海: 上海科學技術出版社. 1994; pp.20, 23-24.
29. 顏正華 主編. 中藥學. 中國: 人民衛生出版社. 1991; pp.528-591.
30. 唐世蓉 등. 山藥的營養成分分析. 中藥通報. 1987; 제12권 제4호: pp.36-38.
31. 안효정 등. 六味地黃湯加山藥이 Alloxan 糖尿 白鼠의 血糖 및 血清變化에 미치는 影響. 동의병리학회지. 1993; 제8권: pp.137-156.
32. 신상우 등. 대표적 補氣藥인 人蔘, 唐蔘, 黃耆, 白朮, 山藥 물추출액의 면역조절효과 비교. 동의생리병리학회지. 2004; 제 18권 제4호: pp.1140-1146.
33. Kim MJ et al. Methanol extract of Dioscoreae Rhizoma inhibits pro-inflammatory cytokines and mediators in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Int Immunoparmacol*. 2005; 5(3): p.629.
34. Noriaki Tanno et al. Identification of Endogenous Gibberellins Dormant Bulbils of Chinese Yam, *Dioscorea opposita*. *Plant physiol*. 1992; 100: pp.1823-1826
35. Shin-Chang Lee et al. The evaluation of Hepato-protective Effects of Huai-Shan-Yao(Rhizoma Dioscoreae). *The american journal of chinese Medicine*. 2002; 30(4): pp.609-616.
36. Shin-Chang Lee et al. Effects of "Chinese yam" on hepato-nephrotoxicity of actaminophen in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2002; 23(6): pp.503-508.
37. Chao SL, Huang LW, Yen HR. Pregnancy in premature ovarian failure after therapy using Chinese Medicine. *Chang Gung Med J*. 2003; 26(6), pp.449-452.
38. Deckwerth, T. L. et al. Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron*. 1996; 17(3): pp.401-411.
39. Korsmeyer, S. J. et al. Bcl-2/Bax a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Cancer Biol*. 1993; 4(6): pp.327-332.
40. Vekrelis K et al. Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Development*. 1997; 124(6): pp.1239-1249.
41. Chor S.Y. et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of herbal medicine on hepatic stellate cell. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100(1-2), pp.180-186.
42. Liao PH et al. Induction of apoptosis in human oral cancer cell lines, OC2 and TSCCa, by chingwa ysan. *Am J Chin Med*. 2005; 33(1): 21-27
43. Wallach, D. et al. Tumor necrosis

- factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: pp.331-367.
44. Rao, R. V. et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *J Biol Chem.* 2001; 276(36), pp.33869-33874.
45. Saleh, A. et al. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem.* 1999; 274(25): pp.17941-17945.
46. Graham, S. H., and J. Chen. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 107: pp.99-109.
47. Dugas E et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. 2000; 476(3): pp.118-123.
48. 강경아 등. 산화적 스트레스에 대한 생약 추출물의 항 산화활성 검색. 생약학회지. 2005; 제36권 제3호: pp.159-163.
49. Ali A et al. Glycogen synthase kinase-3: Properties, functions, and regulation. *Chem. Rev.* 2001; 101: pp.2527-2540.
50. Bhatt RV et al. Glycogen synthase kinase 3: A drug target for CNS therapies. *J. Neurochem.* 2004; 89(6): pp.1313-1317.
51. Cho JH et al. Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates tau at both primed and unprimed sites: Differential impact on microtubule binding. *J. Biol Chem.* 2003; 278(1): pp.187-193.
52. Doble BW and Woodgett JR. GSK-3 β : Tricks of the trade of a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 7): pp.1175-1186.
53. Godemann R et al. Phosphorylation of tau protein by recombinant GSK-3 β : Pronounced phosphorylation at select Ser/Thr-Pro motifs but no phosphorylation at Ser262 in the repeat domain. *FEBS Lett.* 1999; 454(1.2): pp.157-164.
54. Linseman DA et al. Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 2004; 24(44): pp.99930-1000219.
55. Chang SL et al. Chinese yam (*Dioscorea alata* cv. Tainung No.2) feeding exhibited antioxidative effects in hyperhomocysteinemia rats. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(6): pp.1720-1725.
56. Chae HJ et al. Saeng-Ji-Hwang has a protective effect on adriamycin-induced cytotoxicity in cardiac muscle cells. *Life Science.* 2005; 76(18): pp.2027-2042.
57. Yang JW et al. The effects of Chinese herb *Angelica* in focal cerebral ischemia injury in the rat. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005; 32(23): pp.209-215.
-