

葛根 추출물이 cisplatin에 의해 유도된 rat mesangial cell의 apoptosis에 미치는 영향

홍재의¹ · 신조영¹ · 주성민² · 전병훈^{2,4} · 이시형^{1,3,4,*}

1: 원광대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 2: 병리학교실, 3: 원광대학교 한의학전문대학원, 4: 한국전통의학연구소

Effects of *Puerariae Radix* extract on Cisplatin-Induced Apoptosis of Rat Mesangial Cells

Jae Eui Hong¹, Jo Young Shin¹, Sung Min Ju², Byung Hun Jeon^{2,4}, Si Hyeong Lee^{1,3,4,*}

1: Department of Internal Medicine, 2: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, 3: Professional Graduate School of Oriental Medicine, 4: Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

Puerariae radix (PR) is a popular natural herb and a traditional food in Asia, which has antithrombotic and anti-allergic properties and stimulates estrogenic activity. One of the major side effects of cisplatin is nephrotoxicity, leading to acute renal failure. Recent study has suggested a role of ROS and p53 in renal cell injury by cisplatin. We studied that protective effects of PR on cisplatin-induced apoptosis in rat mesangial cell. Rat mesangial cell was preincubated with PR (50, 100, 150 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 12 hr and then treated with 30 μM cisplatin for 24 hr. Protective effect of PR on cisplatin-induced apoptosis in ECV304 cells was determined using MTT assay, FDA-PI staining, flow cytometric analysis, caspase-3 activity assay, ROS assay and western blot. Our results showed that PR inhibited in cisplatin-induced apoptosis and ROS production in ECV304 cells. Moreover, PR reduced ERK, p38 and JNK activation that increased in cisplatin-treated rat mesangial cell. Furthermore, activation of p53 by cisplatin in rat mesangial cell was inhibited by PR treatment. These results suggest that protective effect of PR on cisplatin-induced apoptosis in rat mesangial cell may be associated with reduction of ERK, p38, JNK, p53 activation.

Key words : *Puerariae Radix*, ROS, ERK, p38, JNK

서 론

Cisplatin(cis-diamminedichloroplatinum[II])은 대부분의 세포에서 성장정지와 apoptosis를 강력하게 유도하는 물질로서 암 치료를 위한 화학요법 치료제로 사용되고 있으나¹⁾, 다양한 신호 전달경로를 활성화시켜 신세뇨관 세포의 necrosis와 apoptosis를 유도하는 신장독성 때문에 제한적으로 사용되고 있다^{2,3)}.

최근 연구에서 cisplatin에 의한 신세뇨관 세포의 apoptosis에서 p53은 cisplatin을 처리하는 동안 활성화된다고 보고되었고, 특히 p53의 약리학적 억제제인 pifithrin- α 에 의해 감소한다고 보고되었다^{4,5)}.

활성산소종(ROS)에 의한 산화적 스트레스는 다양한 병리학

적인 상태에서 신장손상과 관련되어 있다^{6,7)}. ROS는 p53 조절에 관여하는데, DNA손상을 유도하여 p53활성을 강하게 촉발시킨다⁸⁾. 특히 ROS의한 p53 인산화와 활성화는 다양한 protein kinase들의 신호전달체계를 활성화 시킨다⁹⁾. Cisplatin은 신장독성과 관련하여 산화적 스트레스를 유발하는 ROS를 생성하여 세포손상을 일으키지만^{6,9)}, 다양한 ROS scavenger는 cisplatin의 세포손상으로부터 보호효과를 가진다고 보고되었다¹⁰⁻¹³⁾.

葛根은 임상에서 급성중이염, 비염, 편도염, 숙취제거, 당뇨병, 고혈압, 관상동맥경화증, 협심증, 혈압강하, 콜레스테롤 저해 등에 이용되고 있고, 이러한 효과에 대한 연구들이 보고되어 있다^{15,16)}. 최근 논문에서 cisplatin으로 손상된 HEI-OC1 청각세포에서 free radical 소거에 의한 葛根의 보호효과가 보고되었다¹⁷⁾.

본 연구에서는 cisplatin에 의한 rat mesangial cell의 apoptosis에 대한 葛根 추출물의 보호효과를 조사하였고, 이에 따른 MAPKs 활성화와 ROS 생성 및 p53 활성화에 미치는 영향에 대

* 교신저자 : 이시형, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 익산한방병원 6내과

· E-mail : lsh@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-859-2806

· 접수 : 2010/03/16 · 수정 : 2010/04/06 · 채택 : 2010/04/13

하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 세포배양

Immortalization된 rat mesangial cells는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 분양받았고, 15% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)를 사용하여 37°C와 5% CO₂ 상태에서 배양하였다. 세포는 안정된 성장과 형태적 특성을 검증하기 위해 G418이 포함된 배지에 최소 5 회 이상 계대배양 하였고, 그 후의 세포는 15% FBS와 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin 포함된 DMEM배지에서 배양하였다. 세포는 0.25% trypsin-0.03% ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 용액을 사용하여 계대 배양하였으며, 세포는 cisplatin을 처리하기 24시간 전에 배양접시에 seeding하였다.

2. 시약 및 항체

葛根 에탄올 추출물은 21C 프론티어 연구개발사업 자생식물이용기술개발사업단 내 한국식물추출물 은행에서 분양받았다. Cisplatin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid(MTT), 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA), Fluorescein diacetate(FDA), Propidium iodine(PI), Ribonuclease A (RNase A), protease inhibitor cocktail은 Sigma-Aldrich Chemical(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-pNA (Ac-DEVD-pNA)는 Calbiochem(La Jolla, CA, USA)으로부터 구입하였다. Anti-cleaved caspase-3 (p20), anti-PARP, anti-p53, anti-phospho-p53 항체들은 Cell Signaling Technology INC.(Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다.

3. 세포독성검사

세포생존률은 MTT 방법을 사용하여 측정하였다. MTT 검사는 미토콘드리아의 숙신산 탈수소효소에 의해 MTT가 formazan으로 환원되는 원리를 기초로 하고 있다. 세포는 3×10⁴cells/ml로 12 well plate에 12시간 배양하였다. 세포는 葛根 추출물을 12시간 전 처리하고 cisplatin을 처리하였다. 24시간 배양한 세포는 배지를 제거하고 500 µl의 MTT(0.5 mg/ml in PBS) 용액을 각 well에 첨가하여 37°C에서 3시간 배양하였다. 상층액을 제거하고 500 µl의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 각 well에 첨가하여 비수용성의 보라색 formazan을 용해시켰다. Formazan의 양은 SpectraMAX 250 microplate spectrophotometer(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 570 nm에서 측정하였다. 세포생존률의 확률은 다음 방정식으로 계산하였다.

$$(\text{mean OD of treated cells}/\text{mean OD of control cells}) \times 100 = \text{viability}(\%)$$

4. FDA-PI염색

배양된 세포는 phosphate-buffred saline(PBS)에 세척하고 FDA(10 µg/ml)/PI(5 µg/ml) 염색용액에 실온에서 5분 동안 염색하였다. 염색된 세포는 PBS로 세척하고 현광현미경으로 관찰하였다. 정상적인 세포는 green색으로 나타나고 apoptosis 세포는 yellow/red 색으로 나타난다.

5. 유세포분석

세포를 trypsin 처리하여 모두 수확하여 PBS로 세척하고, 세포는 70% 에탄올로 4°C에서 1 시간 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 세척하고 1 ml의 PI(10 µg/ml)/RNase A(100 µg/ml) 용액으로 재부유하여 37°C 암실조건으로 1 시간 배양하였다. DNA 양은 fluorescence-activated cell sorting(FACS) Calibur(BD Biosciences, CA, USA)를 사용하여 측정하였으며, apoptosis가 나타나는 세포에서 저두배수체(hypodiploid, Sub-G1)를 PI 히스토그램으로 수치화하였다. Sub-G1 세포의 분획은 CellQuest Pro (BD Biosciences, CA, USA) 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.

6. Caspase-3 활성검사

세포는 용해 완충액(50 mM HEPES, pH7.4, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA)에 부유시킨 후 얼음 위에서 20분 방치하였다. 세포 용해액은 4°C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. Caspase-3 활성검사는 단백질추출물 10 µl(30 µg total protein), 88 µl 반응 완충액(50 mM HEPES, pH7.4, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol) 그리고 2 µl fluorogenic Ac-DEVD-pNA(200 µM final concentration)를 혼합하여 37°C에서 1시간 배양하였다. Caspase-3의 효소 촉매 반응으로 방출된 p-nitroanilide는 SpectraMAX 250 microplate spectrophotometer로 405 nm에서 측정하였다. Caspase-3활성도는 다음 방정식으로 계산하였다.

$$(\text{mean OD of treated cells}/\text{mean OD of control cells}) \times 100 = \text{activity}(\%)$$

7. ROS생성 검사

ROS는 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) fluorescence assay에 의해 측정하였다. 세포는 PBS에 두 번 세척하고, 20µM DCFH-DA/PBS 용액에서 37°C에서 30분 배양하였다. fluorescence intensity는 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 524 nm에서 측정하였다. ROS생성량은 아래 방정식과 같이 측정하였다.

$$(\text{mean OD of treated cells}/\text{mean OD of control cells}) \times 100 = \text{production}(\%)$$

8. Western blot analysis

세포는 얼음 냉장된 PBS로 세척하고 1% protease inhibitor 혼합액이 포함된 얼음 냉장 용해 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate,

0.1% SDS, 1 mM sodium vanadate)으로 부유 시킨 후 얼음 위에서 30분 용해하였다. 세포용해액들은 4°C에서 14,000×g 로 20분 원심분리 하였고, 단백질 농도는 Bradford 검사법을 이용하여 측정하였다. 총 30 µg의 단백질 샘플을 SDS-PAGE 젤로 분리하였고 40V에서 3시간 nitrocellulose 막 위로 단백질을 전이시켰다. 단백질이 전이된 막은 5% bovine serum albumin(BSA)가 포함된 Tris-buffered saline+Tween-20(20 mM Tris-HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 차단시킨 후, 1차 항체를 결합시켰다. 면역 활성은 peroxidase가 붙어있는 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체를 사용하여 SuperSignal West Pico Chemiluminescent(Pierce, Rockford, IL, USA)에 의해 탐지하였다.

9. 통계처리

모든 데이터의 결과는 마이크로소프트 오피스 엑셀(EXCEL) 2003 프로그램을 통하여 통계처리 하여 mean±standard deviation(SD)로 기록하였다.

결 과

1. Cisplatin에 대한 세포독성 효과

Rat mesangial cell의 cisplatin에 대한 세포독성의 효과를 조사하기위해 cisplatin을 일정한 간격으로 농도를 증가시켜 5~50 µM로 24시간 처리하였다. 세포생존율은 MTT assay로 측정하였다. Cisplatin은 농도 의존적으로 rat mesangial cell의 생존율을 감소시켰다(Fig. 1). Cisplatin의 IC50값은 약 30 µM이었다.

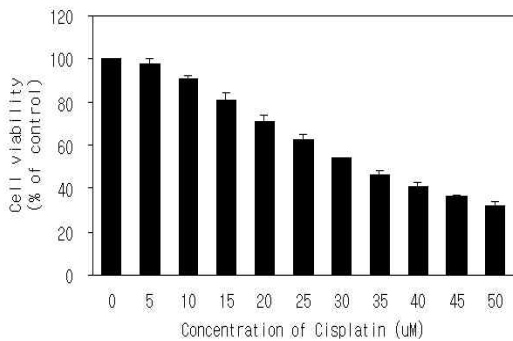


Fig. 1. Effects of cisplatin on cytotoxicity in rat mesangial cells. The cells were treated with various concentration of cisplatin for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay. Values are means ± SD, N = 3.

2. Cisplatin의 세포독성에 대한 葛根 추출물의 보호효과

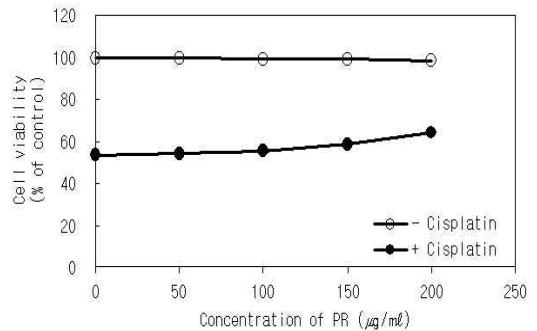
Cisplatin에 의해 유도된 rat mesangial cell의 세포손상에 대한 葛根 추출물의 보호효과는 세포생존율측정, 세포형태변화 관찰 및 유세포분석을 통하여 조사하였다. Rat mesangial cell에 50, 100, 150 및 200 µg/ml의 농도로 葛根 추출물을 12시간 전 처리한 후, 30 µM cisplatin과 함께 24시간 배양하였다.

葛根 추출물은 농도 의존적으로 cisplatin에 의해 감소된 세포생존율을 증가시켰다(Fig. 2A). 葛根 추출물 200 µg/ml 농도에서 cisplatin에 의해 감소된 세포생존율을 약 11% 증가시켰다.

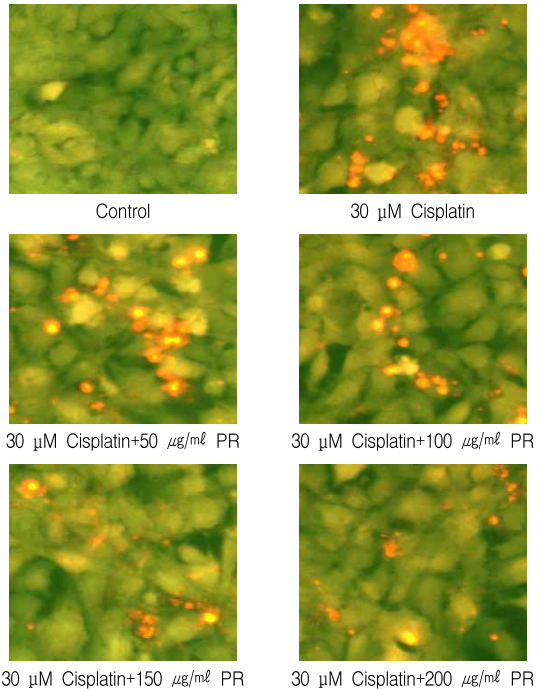
FDA-PI 염색을 이용한 세포형태변화 관찰에서도 葛根 추출물은 cisplatin에 의해 증가된 yellow/red색의 apoptosis 세포 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 2B).

유세포분석을 통한 apoptosis 세포를 정량적으로 측정하였다. 葛根 추출물은 cisplatin에 의해 유도된 apoptosis 세포(Sub-G1 peak)를 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 2C). Cisplatin 단독처리에 의해 증가된 apoptosis 세포(31.11%)를 50 µg/ml 葛根 추출물 처리군은 28.10%, 100 µg/ml 葛根 추출물 처리군은 24.18%, 150 µg/ml 葛根 추출물 처리군은 23.32%, 200 µg/ml 葛根 추출물 처리군은 19.55%로 감소시켰다.

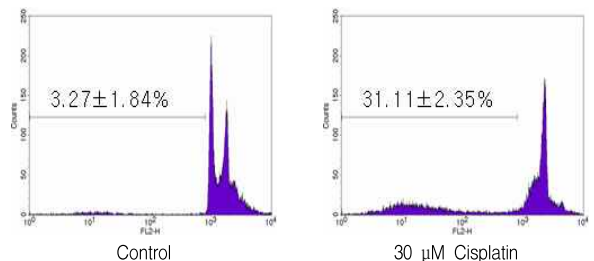
A.



B.



C.



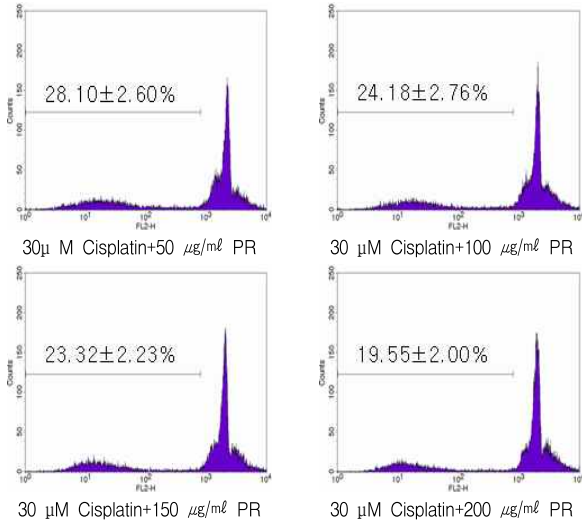


Fig. 2. Effects of PR on cisplatin-induced apoptosis in rat mesangial cells. The cells were preincubated with PR for 12 h, and then treated with or without 30 μ M cisplatin for 24 h. A: Cells viability was tested by MTT assay. Values are means \pm SD, N = 3. B: The cell morphology was stained with FDA-PI and observed under a fluorescence microscope (Apoptotic bodies stained yellow/red). C: DNA contents were analyzed by flow cytometry after PI staining.

3. Cisplatin에 의 caspase-3활성과 PARP절편에 대한 葛根 추출물의 효과

Caspase family는 apoptosis를 수행하는데 중요한 역할을 하고 있다. 그 중 caspase-3는 apoptosis에 대한 중요한 세포의 수행자이다. Rat mesangial cell에서 cisplatin에 의한 caspase-3의 활성증가에 대한 葛根 추출물의 억제효과를 조사하였다. 葛根 추출물은 농도 의존적으로 cisplatin에 의해 증가된 caspase-3의 활성을 감소시켰다(Fig. 3A). 葛根 추출물은 cisplatin에 의해 증가된 caspase-3의 활성을 cisplatin 단독처리군(958.58%)과 비교하여 50 μ g/ml 葛根 추출물 처리군은 887.35%, 100 μ g/ml 葛根 추출물 처리군은 714.33%, 150 μ g/ml 葛根 추출물 처리군은 508.27%, 200 μ g/ml 葛根 추출물 처리군은 370.15% 로 감소하였다. 葛根 추출물의 caspase-3활성 억제효과를 재검증하기 위해 caspase-3의 활성형인 p20과 그것에 의해 절단되는 다수의 단백질 중의 하나인 PARP의 절편을 조사하였다. Cisplatin에 의해 증가된 caspase-3 (p20)는 caspase-3활성과 동일하게 葛根 추출물의 농도 의존적으로 감소하였다. Cisplatin에 의해 증가된 89kDa의 PARP절편 또한 caspase-3 (p20)의 감소와 동일하게 감소하였다(Fig. 3B, 3C).

4. MAPKs의 활성화에 대한 葛根 추출물의 효과

MAPKs 신호전달기전은 apoptosis의 조절에서 중요한 역할을 수행하고 있다. Rat mesangial cell의 apoptosis에서 MAPKs와 관련하여 cisplatin에 대한 ERK, p38, JNK의 활성화에 대한 葛根 추출물의 효과를 조사하였다. Cisplatin 단독처리군에서 ERK, p38 및 JNK의 활성이 모두 증가하였다. 그러나 葛根 추출물 처리에 의해 ERK 활성은 농도 의존적으로 감소하였고, p38 활성화와 JNK의 활성은 200 μ g/ml 葛根 추출물 농도에서 크게 감소하였다(Fig. 4).

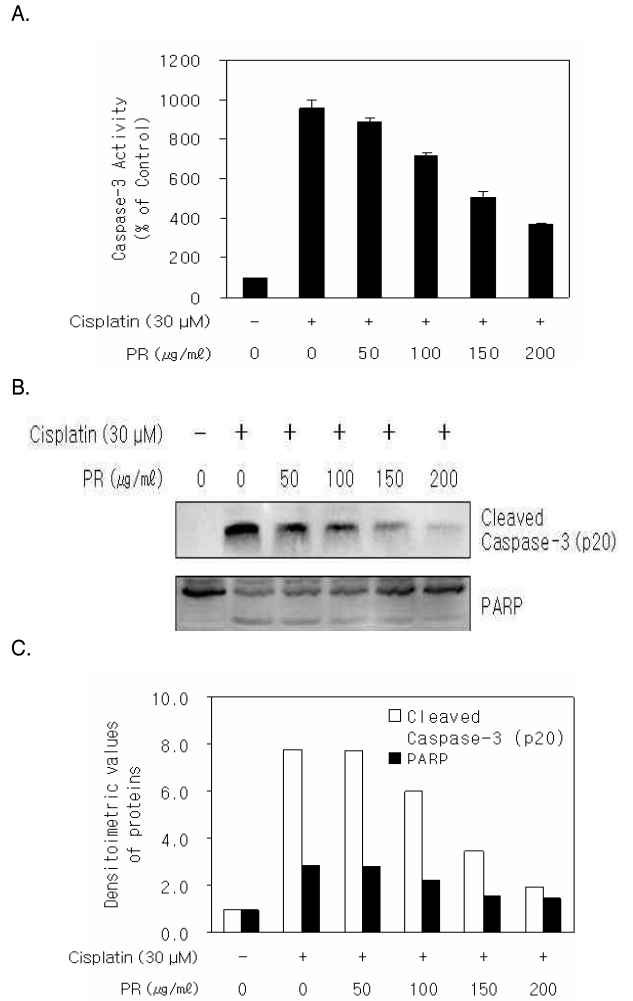
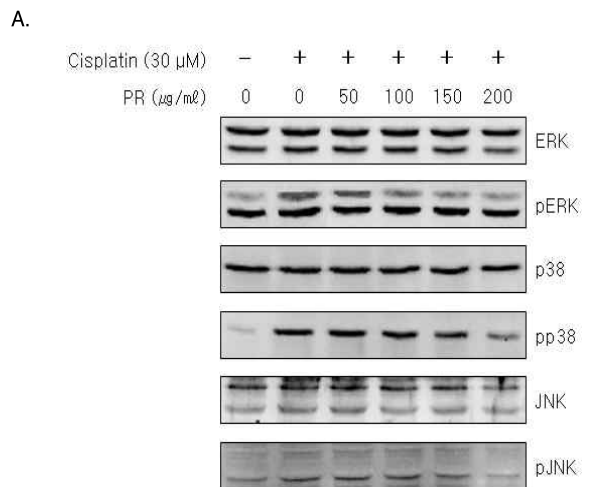


Fig. 3. Effects of PR on caspase-3 activation and PARP cleavage in cisplatin-treated rat mesangial cells. The cells were preincubated with PR for 12 h, and then treated with or without 30 μ M cisplatin for 24 h. A: The caspase-3 activity was measured as the increase in activity (%) with respect to control cells (100%). Values are means \pm SD, N = 3. B: Cleaved caspase-3 (p20) and PARP cleavage were determined by Western blot analysis using anti-cleaved caspase-3 (p20) and anti-PARP antibodies. C: Densitometric analysis of the specific bands was done using GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA).



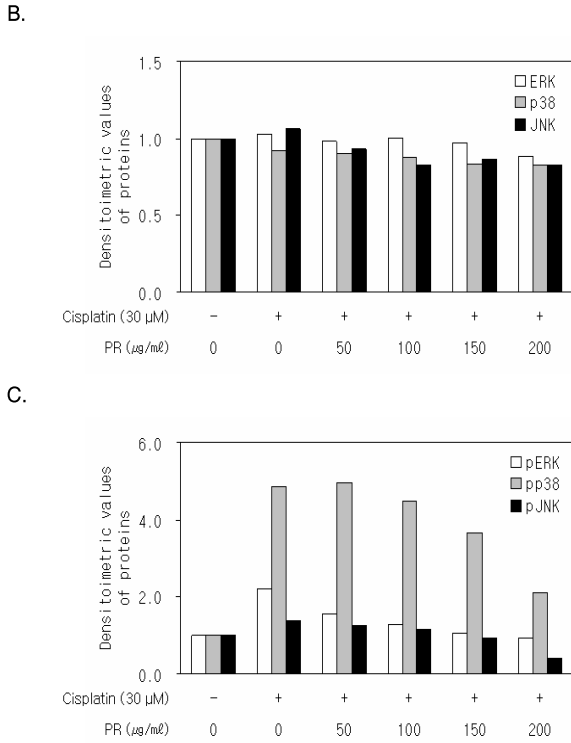


Fig. 4. Effects of PR on activation of ERK, p38 and JNK in cisplatin-treated rat mesangial cells. The cells were preincubated with PR for 12 h, and then treated with or without 30 μM cisplatin for 3 h. A: Cells were the lysed, and the supernatants were subjected to western blot Analysis using anti-ERK, anti-phospho-ERK, anti-p38, anti-phospho-p38, anti-JNK and anti-phospho-JNK antibodies. B,C: Densitometric analysis of the specific bands was done using GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA).

5. Cisplatin의 ROS 생성에 대한 葛根 추출물의 효과

葛根 추출물이 Rat mesangial cell에서 cisplatin에 의한 ROS 생성에 미치는 효과를 조사하기 위해 DCFH-DA법을 사용하였다. ROS생성은 세포 내부의 DCF fluorescent의 생성량을 형광분광분석기를 이용하여 측정하였다. Cisplatin 단독처리군에서 ROS생성은 약 1.36배 증가하였는데, 葛根 추출물 처리에 의해 50 μg/ml처리군은 1.34배, 100 μg/ml처리군은 1.31배, 150 μg/ml처리군은 1.27배, 200 μg/ml처리군은 1.22배로 cisplatin에 의해 증가된 ROS생성이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 5).

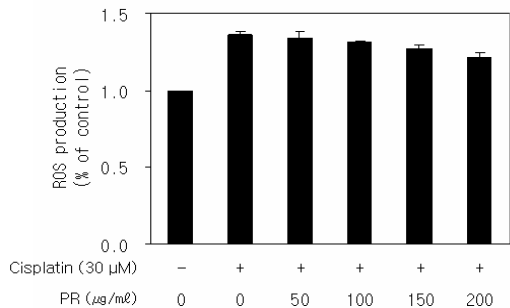


Fig. 5. Effects of PR on cisplatin-induced ROS formation in rat mesangial cells. ROS were determined by DCFH-DA fluorescence assay. Value are means ± SD, N = 3.

6. p53 단백질 발현과 활성화에 대한 葛根 추출물의 효과

ROS에 의한 산화적 스트레스는 p53 조절과 밀접한 관련이 있다. Cisplatin이 처리된 rat mesangial cell에서 葛根 추출물이 p53 단백질 발현과 그에 대한 활성화에 미치는 효과를 조사하였다. Cisplatin 단독처리군과 cisplatin/葛根 추출물 동시처리군 모두 p53 단백질 발현 상에는 아무런 변화를 주지 못하였다. 그러나 pp53은 cisplatin 단독처리군에서 크게 증가하였고 Cisplatin 처리에 의해 증가된 pp53은 葛根 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 6A, 6B).

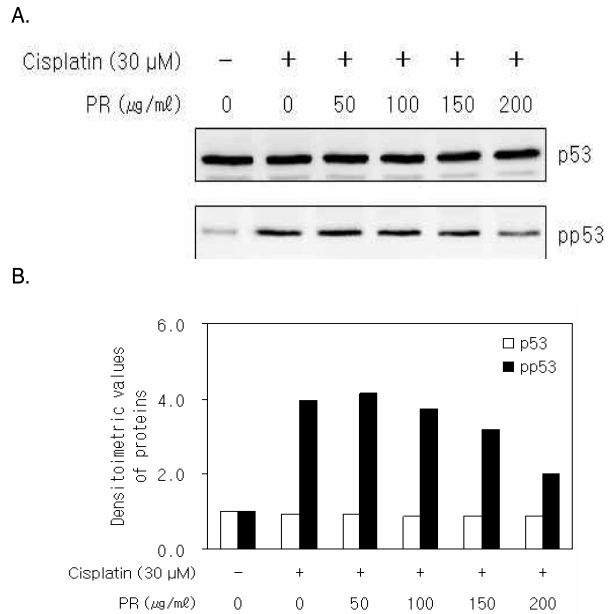


Fig. 6. Effects of PR and RRP on cisplatin-induced ROS production and p53 activation in rat mesangial cells. The cells were preincubated with PR for 12 h, and then treated with or without 30 μM cisplatin for 12 h. A: Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis with anti-p53 and anti-phospho p53 antibodies. B: Densitometric analysis of the specific bands was done using GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA).

고찰

葛根(*Radix Puerariae*)은 콩과(豆科; Leguminosae)에 속한 다년생 낙엽등본식물인 칩(Pueraria lobata (WILLD.) 및 동속근연 식물인 털칩(*P. thomsonii* BENTH.), 전분칩(*P. edulis* PAMP.), 산칩(*P. omeiensis* WANG et TANG), 가새입칩(*P. phaseoloides* (ROXB.) BENTH.) 등의 뿌리이며 異名은 乾葛, 甘葛, 葛子根, 黃葛根이라 불리며 우리나라 각 지역의 산에 자생한다^{18,19}).

葛根은 <신농본초경> 중권에 “葛根 味甘平 主消渴 身大熱 …… 解諸毒”이라고 최초로 기재 되었고²⁰, 發表解肌, 透發麻疹, 生津止渴, 升陽止瀉 등의 효능이 있어 感冒, 頭痛項強, 麻疹透發不暢, 熱病煩渴, 消渴, 濕熱瀉痢, 脾虛久瀉 등의 병증을 치료한다¹⁸).

葛根의 약리작용으로는 순환계에 대한 개선과 혈관확장, 항고혈압, 항혈소판응집, 혈당강하, 평활근의 이완, 해열, 익지(益智), 항중양, 항산소결핍, 항산화, 해독과 미약한 국소마취작용

등이 있다³³). 한의학에서의 葛根은 淸涼性 發汗劑로서 傷寒, 中風의 初, 中期의 頭痛, 口渴, 痢疾, 發熱, 無汗 등에 활용되고, 또한 설사를 멈추게 하는데 효과가 있으며, 모든 藥毒을 제거한다고 알려져 있고, 고혈압, 관상동맥경화증, 협심증, 노인성 당뇨 등에 이용하고 있으며, 혈압강하, 지방의 산화억제, 항염, 해독, 숙취제거의 효과, 항산화 및 보간 등의 활성을 연구한 여러 논문들이 보고된 바 있다²⁰⁻²⁴). 주요성분으로는 isoflavone인 perarine, puerarinxyloside, daidzein, daidzine과 β -sitosterol, stigmasterol이 포함되어 있는 것으로 보고 되어있다^{21,23,24}).

Cisplatin의 세포독성은 1차적으로 DNA의 퓨린계열 염기의 친핵성 N7부위와 상호작용에 기인하며, DNA-protein 또는 DNA-DNA interstrand 또는 intrastrand crosslink를 형성한다²⁵). DNA와 cisplatin의 상호작용에 의해 형성된 DNA 부가물은 암세포의 apoptosis를 유도한다²⁶).

Apoptosis는 프로그램된 세포사멸로 알려져 있고 그에 따른 신호전달기전의 활성화와 세포증식과 세포사멸사이의 균형을 유지하는데 중요한 역할을 수행하는 선택적이고 생리적인 과정이다²⁷⁻²⁹). Apoptosis는 necrosis와는 다르게 세포의 독특한 형태적 및 생화학적 특징이 유전자 활성화에 의하여 조절 받는다³⁰). 세포가 심각한 상해를 입었을 경우 나타나는 necrosis는 세포막의 파괴, 세포의 팽창, 용해를 동반한다. 그러나 apoptosis 현상은 빠른 세포탈수 현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상 (blebbing), 세포질 내의 칼슘 농도의 증가, 염색체의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절, transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 apoptotic body의 형성을 동반한다³⁰).

본 연구는 rat mesangial cell에서 葛根 추출물의 항산화효과 및 p53활성감소를 통한 cisplatin의 세포독성에 대한 보호효과를 연구하였다. 葛根 추출물은 cisplatin에 의한 세포독성에 대하여 효과적으로 rat mesangial cell을 보호하였다. 葛根 추출물은 cisplatin에 의해 감소된 세포생존율을 증가시켰고, FDA-PI 염색을 통한 세포형태 관찰과 유세포 분석에서는 apoptosis 세포를 감소시켰다. Cisplatin에 의해 증가된 apoptosis의 최종 실행 단백질인 caspase-3의 활성화와 caspase-3 (p20) 및 PARP 절편도 葛根 추출물에 의해 감소하였다.

Cisplatin은 apoptosis를 유도하는 MAPKs와 같은 신호전달 경로들을 활성화시킨다²⁶). MAPKs는 세포증식, 분화, apoptosis와 같은 다양한 세포반응들의 조절에 관여하는 serine/threonin kinases이다^{31,32}). ERK, JNK/SAPK 및 p38 kinase는 주요한 MAPKs subfamily이다. 각각의 MAPKs는 특정한 인산화 cascade 경로를 통하여 활성화된다. ERK 경로는 주로 mitogen과 성장인자들에 의해 활성화 되며, 세포성장 및 생존과 분화를 조절하는데 중요한 역할을 수행한다^{33,34}). 대조적으로 JNK와 p38 경로는 화학적 또는 환경적 스트레스에 대한 반응에 의해 활성화 되고 주로 apoptosis 유도에 관여한다^{34,35}).

Cisplatin에 대한 葛根 추출물의 rat mesangial cell의 보호 효과 기전 연구에서 葛根 추출물은 cisplatin에 의해 증가된 ERK 활성화, p38 활성화 및 JNK 활성을 모두 감소시켰다. 이 결과

는 葛根 추출물의 세포보호효과가 ERK, p38 및 JNK 활성화 및 직접 관련이 있을 것으로 사료된다. 이전 연구에서도 cisplatin에 의한 rat mesangial cell의 apoptosis는 ERK, p38 및 JNK 활성화 모두 관여하였다. Cisplatin에 의해 유도된 apoptosis에서 ERK 경로의 역할은 세포종류나 시약의 처리농도와 ERK 활성화 정도에 따라서 다양하게 나타났다³⁶). 즉 ERK는 apoptosis를 유도하는 신호로 작용하기도 하고, JNK나 p38의 apoptosis 유도작용을 억제하는 효과를 보이기도 한다. 또 다른 연구에서는 p38과 JNK 경로는 cisplatin으로 유도된 apoptosis에 관여하는 것으로 보고 되었다³⁷⁻⁴¹).

葛根 추출물의 항산화효과는 cisplatin에 의해 생성된 ROS의 생성억제를 통하여 확인되었다. 이전 연구에서 葛根 추출물은 in vitro cell-free system에서 hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide radical에 대한 소거능을 가지고 있다고 보고 되었다.

ROS는 급성신부전증을 유도하는 독성시약의 중요한 매개체와 같이 언급되고 있지만⁶), cisplatin에 의해 유도된 세포사멸에서 ROS의 역할은 논쟁의 여지가 남아있다. 그러나 다양한 세포 유형에서 cisplatin에 의한 apoptosis가 ROS 생성에 의해 매개되었다고 보고되었다^{3,42,43}).

암억제유전자인 p53은 DNA 손상이나 스트레스 조건에서 전사 후 변형에 의한 안정화로 인해 단백질 수준이 빠르게 증가한다⁴⁵). 이 전사 후 변형은 p53 단백질이 분해되지 않게 보호하고 이러한 p53 활성화는 세포를 세포주기정지 또는 apoptosis를 유도한다⁴⁵).

葛根 추출물은 rat mesangial cell에서 cisplatin에 의해 증가된 p53 활성을 감소시켰다. 그러나 p53 단백질 발현에는 아무런 영향을 미치지 못하였다. p53 활성화 감소는 cisplatin의 세포독성에 대한 葛根 추출물의 보호효과에 관여하였을 것으로 사료된다.

이상의 결과로 보아 葛根 추출물은 cisplatin에 의한 rat mesangial cell의 세포독성에 대하여 ERK, p38 및 JNK 활성화 억제와 ROS생성 및 p53활성 억제를 통하여 보호효과를 나타내었을 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 葛根 추출물이 cisplatin의 세포독성에 대하여 rat mesangial cell에 대한 보호효과를 나타내는지 알아보고자 하였다. 葛根 추출물이 cisplatin에 의해 유도된 rat mesangial cell의 apoptosis에 미치는 효과 및 기전을 분자생물학적 방법을 통하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 葛根 추출물은 cisplatin에 의한 세포생존율 감소를 증가시켰고, caspase-3활성과 PARP절편을 동일하게 감소시켰다. 또한 葛根 추출물은 cisplatin에 의한 ERK, p38, JNK 활성을 억제하였고, 또한 ROS 생성과 p53활성을 억제하였다. 이상의 결과로 항산화 효과 및 다양한 임상효능을 지닌 葛根 추출물이 cisplatin에 의한 rat mesangial cells 세포독성을 억제하는 효과는 MAPKs 활성화 억제와 ROS생성 및 p53활성 억제와 관련되어 있음을 확인하였다.

참고문헌

1. Timmer-Bosscha, H., Mulder, N.H., de Vries, E.G. Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance: a review. *Br J Cancer*. 66: 227-238, 1992.
2. Goldstein, R.S., Mayor, G.H. Minireview. The nephrotoxicity of cisplatin. *Life Sci*. 32: 685-690, 1983.
3. Lieberthal, W., Triaca, V., Levine, J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am. J. Physiol*. 270: 700-708, 1996.
4. Cummings, B.S., Schnellmann, R.G. Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 302: 8-17, 2002.
5. Jiang, M., Yi, X., Hsu, S., Wang, C.Y., Dong, Z. Role of p53 in cisplatin-induced tubular cell apoptosis: dependence on p53 transcriptional activity. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*. 287: 1140-1147, 2004.
6. Baliga, R., Ueda, N., Walker, P.D., Shah, S. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab. Rev*. 31: 971-997, 1999.
7. Nath, K.A., Norby, S.M. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am. J. Med*. 109: 665-678, 2000.
8. Martindale, J.L., Holbrook, N.J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell Physiol*. 192: 1-15, 2000.
9. Taguchi, T., Nazneen, A., Abid, M.R., Razzaque, M.S. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib. Nephrol*. 148: 107-121, 2005.
10. Baek, S.M., Kwon, C.H., Kim, J.H., Woo, J.S., Jung, J.S., Kim, Y.K. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J. Lab. Clin. Med*. 142: 178-186, 2003.
11. Matsushima, H., Yonemura, K., Ohishi, K., Hishida, A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J. Lab. Clin. Med*. 131: 518-526, 1998.
12. Sueishi, K., Mishima, K., Makino, K., Itoh, Y., Tsuruya, K., Hirakata, H., et al. Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Eur. J. Pharmacol*. 451: 203-208, 2002.
13. Tsuruya, K., Tokumoto, M., Ninomiya, T., Hirakawa, M., Masutani, K., Taniguchi, M., et al. Antioxidant ameliorates cisplatin-induced renal tubular cell death through inhibition of death receptor-mediated pathways. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*. 285: 208-218, 2003.
14. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. *중약대사전*. 서울, 정담, pp 33-40, 1998.
15. 조수열, 장주연, 김명주. 갈화와 갈근 열수추출물이 에탄올 투여 흰쥐의 혈청성분에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지* 30: 92-96, 2001.
16. 부일권, 김연섭. 갈근이 뇌허혈 손상 흰쥐의 해마 신경세포 손상에 미치는 영향. *대한본초학회지* 19: 77-82, 2004.
17. Yu, H.H., Seo, S.J., Moon, H.D., Park, R.K., So, H.S., Jeon, B.H., Jung, S.Y., You, Y.O. Protective effect of pueraria radix extract on the cisplatin-induced cytotoxicity of HEI-OC1 cells via scavenging of free radicals. *Kor. J. Orien. Physiol. Pathol*. 21: 462-467, 2007.
18. 신민교. *임상본초학*. 서울, 도서출판 영림사, pp 341-343, 2002.
19. *강소신의학원편. 중약대사전*. 서울, 도서출판 정담, pp 45-54, 1998.
20. 徐樹楠, 牛兵占 [共]編. *神農本草經*. 石家庄, 河北科學技術出版社, p 66, 1996.
21. *중화본초편찬위. 중화본초*. 상해, 상해과학기술출판사, pp 610-619, 2002.
22. 허 준. *동의보감*. 경남, 동의보감출판사, p 195, 467, 977, 1137, 2167, 2005.
23. Oh, M.J., Lee, K.S., Son, H.Y., Kim, S.Y. Antioxidative components of Pueraria root. *Korean J. Food Sci. Technol*. 22: 793-798, 1995.
24. Lee, J.S., Lee, K.H., Jeong, J.H. Effects of extracts of Puerariae Radix on lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 28: 218-224, 1999.
25. Eastman, A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol. Ther*. 34: 155-166, 1987.
26. Siddik, Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 22: 7265-7279, 2003.
27. Evan, G., Littlewood, T.A. Matter of life and cell death. *Science*, 281: 1317-1322, 1998.
28. Thornberry, N.A., Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science*, 281: 1312-1316, 1998.
29. Piao, W., Yoo, J., Lee, D.K., Hwang, H.J., Kim, J.H. Induction of G(2)/M phase arrest and apoptosis by a new synthetic anti-cancer agent, DW2282, in promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Biochem. Pharmacol.*, 62: 1439-1447, 2001.
30. Cohen, J.J. Apoptosis. *Immunol*. 14: 126-130, 1993.
31. Cross, T.G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N.V., Deacon, E., Salmon, M., Lord, J.M. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell Res*. 256: 34-41, 2000.
32. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev*. 22: 153-183, 2001.

33. Cobb, M.H. MAP kinase pathways. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71: 479-500, 1999.
34. Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 270: 1326-1331, 1995.
35. Davis, R.J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 103: 239-252, 2000.
36. Fan, M., Chambers, T.C. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug Resist. Updat.* 4: 253-267, 2001.
37. Sanchez-Perez, I., Murguia, J.R., Perona, R. Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene* 16: 533-540, 1998.
38. Zanke, B.W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L.A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F.F., Woodgett, J.R. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr. Biol.* 6: 606-613, 1996.
39. Sanchez-Perez, I., Perona, R. Lack of c-Jun activity increases survival to cisplatin. *FEBS Lett.* 453: 151-158, 1999.
40. Mishima, K., Baba, A., Matsuo, M., Itoh, Y., Oishi, R. Protective effect of cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 1564-1577, 2006.
41. Brozovic, A., Fritz, G., Christmann, M., Zisowsky, J., Jaehde, U., Osmak, M., Kaina, B. Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *Int. J. Cancer* 112: 974-985, 2004.
42. Ikeda, K., Kajiwar, K., Tanabe, E., Tokumaru, S., Kishida, E., Masuzawa, Y., et al. Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in chemically induced apoptosis of HL-60 cells. *Biochem. Pharmacol.* 57: 1361-1365, 1999.
43. Wang, X., Martindale, J.L., Holbrook, N.J. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275: 39435-39443, 2000.
44. Laptenko, O., Prives, C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ.* 13: 951-961, 2006.
45. Xu, Y. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ.* 10: 400-403, 2003.