

Wogonin이 polyinosinic-polycytidylic acid로 유발된 인간 신경모세포종 SH-SY5Y의 hydrogen peroxide 생성증가에 미치는 영향

박완수*

가천대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of Wogonin on Hydrogen Peroxide Production in Polyinosinic-Polycytidylic acid-induced Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells

Wan Su Park*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Gachon University

The purpose of this study is to investigate the modulatory effect of wogonin on hydrogen peroxide production in human blastoma SH-SY5Y cells induced by the synthetic analog of double-stranded RNA [polyinosinic-polycytidylic acid]. Hydrogen peroxide production was measured by dihydrorhodamine 123 (DHR) assay. Wogonin significantly inhibited the polyinosinic-polycytidylic acid (PIC)-induced production of hydrogen peroxide for 0.5, 2, 12, 18, and 24 hr incubation at the concentrations of 10, 25, and 50 μ M in SH-SY5Y ($P < 0.05$) in dose dependent manner. These results suggest that wogonin has neuroprotective property related with its inhibition of hydrogen peroxide production in PIC-induced neuronal cells.

Key words : Wogonin, Neuronal cells, DsRNA, Hydrogen peroxide, Anti-oxidative

서 론

Wogonin(5,7-Dihydroxy-8-methoxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one; Fig. 1)은 메틸레이티드 플라본(O-methylated flavone)의 일종으로 한의학에서 폐경(肺經)에 주로 작용하는 황금(黃芩; Scutellaria Radix; root of Scutellaria baicalensis) 등에 함유되어 있으며¹⁾ 과산화지질생성억제를 통한 항산화작용이 있는 것으로 보고된 바 있다²⁾. Hydrogen peroxide(H_2O_2 ; 과산화수소)는 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)에 속하며, 대식세포(大食細胞 혹은 貪食細胞; macrophage) 혹은 단핵구(單核球; monocyte)와 같은 탐식세포내에서 발생하는 경우, 포획된 감염성 이물질이나 노후세포잔존물을 파괴하고 분해하는 작용에 이용된다³⁾. 즉 세균, 진균, 바이러스, 프로토조아 등 인체의부로부터

* 교신저자 : 박완수, 성남시 수정구 복정동 가천대학교 한의과대학

· E-mail : hang198@naver.com, · Tel : 031-750-8821

· 접수 : 2012/05/03 · 수정 : 2012/08/10 · 채택 : 2012/08/14

터 침입하는 각종의 병원체를 파괴하는 역할뿐만 아니라, 체내에서 발행하는 비정상적인 기형세포와 조직, 기타 노후화된 세포들을 제거하는 역할에도 과산화수소가 관여된다⁴⁾. 그러나 체내 조직세포에서 발생하는 과도한 활성산소종은 정상세포를 손상시키는 부작용도 유발하는데, 이러한 과도한 활성산소종이 정상세포에 미치는 작용을 산화적 스트레스(oxidative stress)라고 하며 정상조직의 파괴, 비정상화 및 암세포 발생의 중요기전으로 인식되고 있다⁵⁻¹³⁾.

뇌의 구성에 있어서 중요한 부분을 차지하는 신경세포도 과도한 활성산소종이 축적되면 세포의 사멸이 유발되며, 산화적 스트레스에 의한 신경세포의 지속적인 손상 및 사멸은 뇌졸중이나 퇴행성 뇌질환과 같은 뇌손상질환의 원인으로 알려져 있다¹⁴⁾. 또한 바이러스성 뇌염과 같이 바이러스성 감염질환은 뇌손상을 유발하고 신경세포를 파괴할 수 있다⁴⁾.

Double stranded RNA(dsRNA)는 체내로 침입한 바이러스성 병원체가 증식하는 과정에서 증가·축적되어 각종의 면역증

반응을 유발하게 된다⁴⁾. 그러므로 dsRNA에 의한 신경세포의 산화적 스트레스를 방어하는 물질은 바이러스성 뇌손상질환의 악화를 방어하는 작용을 할 수 있을 것이다¹⁵⁾.

본 연구에서는 인간 신경모세포종 SH-SY5Y cell을 합성이중가닥RNA(synthetic double-stranded RNA)의 한 종류인 polyinosinic-polycytidylic acid(PIC)로 자극하여 세포내 hydrogen peroxide(하이드로젠 퍼옥사이드) 생성증가를 유발한 뒤 wogonin의 작용을 측정하는 in vitro 실험을 수행하였다.

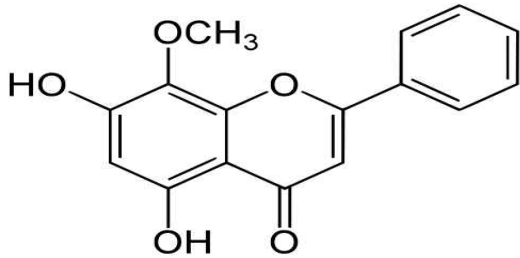


Fig. 1. Structural formula of wogonin.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 중 RPMI 1640 medium(RPMI), heat-inactivated fetal bovine serum(FBS), penicillin and streptomycin, phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)은 Gibco BRL사(Grand Island, NY, USA)에서, wogonin, PIC, dihydrorhodamine 123, dimethyl sulfoxide(DMSO) 등은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다⁴⁾. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였으며 본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator(NUAIRE, USA), clean bench(Jeiothec, Korea), research microscope(Becton dickinson, USA), centrifuge(Gyrozen, Korea), water bath(Sae Han, Korea), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), deep freezer(Gudero, Ilshin Lab, Korea), TRIAD LT spectrofluorometer(Dynex, Chantilly, VA, USA), microplate reader(Bio-Rad model 680, Hercules, CA, USA) 등이다¹¹⁻¹³⁾.

2. 방법

1) Cell line

실험에 사용된 세포주는 인간 신경모세포종(human neuroblastoma SH-SY5Y cell line)으로서 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하여 사용하였다⁴⁾.

2) 세포 배양 및 세포생존율 조사

세포의 배양은 이미 보고한 선행연구⁹⁻¹³⁾의 방법에 따라 다음과 같이 시행하였다. SH-SY5Y는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 µg/mL)이 첨가된 RPMI 배지로 배양되었다. 세포들이 75 cm² flask(Falcon, USA)에서 충분히 증식될 때까지 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을

phosphate buffered saline(PBS; Sigma, USA) 용액으로 씻어주고 새로운 배지로 갈아주었으며, 충분히 증식된 후에는 75 cm² flask 당 3 mL의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착한 후 계대 배양하는데, 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 RPMI 배양액 10 mL에 부유시킨 다음 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다⁹⁻¹³⁾. 세포생존율은 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 이용하여 조사하였다.

3) Dihydrorhodamine 123(DHR) assay

세포 내의 하이드로젠 퍼옥사이드생성은 Richardson 등¹⁶⁻¹⁹⁾의 방법을 응용, dihydrorhodamine 123(DHR) assay를 실시하여 측정하였다. DHR은 비형광이지만 세포 내에서 세포 내 hydrogen peroxide에 의하여 산화되어 녹색의 형광을 발현하는 물질인 rhodamine 123로 바뀌게 된다⁸⁾. 그러므로 여러 가지 산화적 반응을 일으키는 물질들로 인해 인간 세포 내에서 발생하는 hydrogen peroxide의 수준을 DHR assay를 이용하여 측정할 수 있으며, 이를 이용하여 본 실험에서는 세포 내 하이드로젠 퍼옥사이드생성에 대한 시료의 영향을 측정하였다⁹⁾. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주되도록 1×10⁵ cells/mL의 cell을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline 용액으로 씻어주었다⁸⁾. 시료를 처리하기 전에 우선 DHR(10 µM)이 담긴 배지를 30분간 각 well에 처리한 뒤 배지를 제거하고 다양한 농도의 시료들을 배지에 담아 각 well에 처리한 뒤 연속적인 하이드로젠 퍼옥사이드생성변화 관찰을 위하여 0.5, 2, 12, 18, 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 spectrofluorometer(TRIAD LT; excitation filter 485 nm and emission filter 535 nm)를 이용하여 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드생성량을 측정, 비교하였다^{4,13)}.

4) Nitric oxide 생성 조사

시료가 처리된 세포에서의 nitric oxide 생성은 Griess reagent assay를 실시, 조사하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주되도록 1×10⁵ cells/mL의 cell을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하여 안정화한 후, 시료를 각 well에 처리하고 24시간 배양한 후 각 well의 세포배양액을 수집하여 Griess reagent와 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용, NO 생성을 비교하였다^{12,13)}.

3. 통계처리

실험성적은 평균치 ± 표준편차(Mean ± SD)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균 차이는 Student *t*-test로 분석하여 P < 0.05일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다⁴⁾.

결 과

1. Wogonin의 30분 배양이 PIC로 유발된 SH-SY5Y의 하이드로젠 퍼옥사이드생성증가에 미치는 영향

Wogonin을 PIC과 함께 SH-SY5Y에 30분 동안 처리한 결과 wogonin이 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC에 의해 유발된 SH-SY5Y의 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드생성증가를 각각 $92.94 \pm 6.8\%$, $87.55 \pm 5.77\%$, $83.38 \pm 5.97\%$, $81.67 \pm 6.87\%$ 로 농도의존적이면서도 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 2).

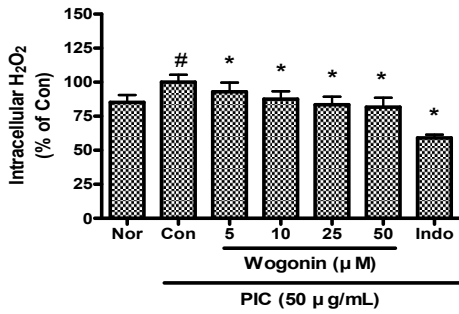


Fig. 2. Effect of Wogonin on PIC-induced production of intracellular H₂O₂ in SH-SY5Y cells for 30 min incubation. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Nor : Treatment with media only. Con : Treatment with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PIC only. Indo : Treatment with Indomethacin (0.5 μM) and PIC. # represents $P < 0.05$ compared to Nor. * represents $P < 0.05$ compared to Con.

2. Wogonin의 2시간 배양이 PIC로 유발된 SH-SY5Y의 하이드로젠 퍼옥사이드생성증가에 미치는 영향

Wogonin을 PIC와 함께 SH-SY5Y에 2시간 동안 처리한 결과 wogonin이 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC에 의해 유발된 SH-SY5Y의 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드생성증가를 각각 $96.38 \pm 2.25\%$, $91.89 \pm 4.15\%$, $88.63 \pm 4.32\%$, $87.79 \pm 4.43\%$ 로 농도의존적이면서도 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 3).

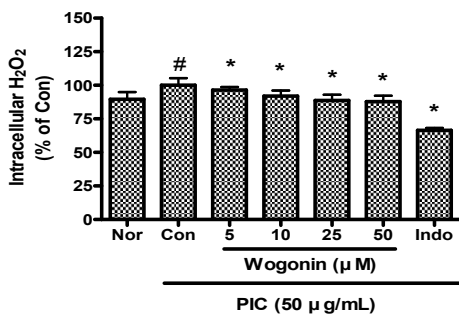


Fig. 3. Effect of Wogonin on PIC-induced production of intracellular H₂O₂ in SH-SY5Y cells for 2 hr incubation. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Nor : Treatment with media only. Con : Treatment with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PIC only. Indo : Treatment with Indomethacin (0.5 μM) and PIC. # represents $P < 0.05$ compared to Nor. * represents $P < 0.05$ compared to Con.

3. Wogonin의 12시간 배양이 PIC로 유발된 SH-SY5Y의 하이드로젠 퍼옥사이드생성증가에 미치는 영향

Wogonin을 PIC와 함께 SH-SY5Y에 12시간 동안 처리한 결과 wogonin이 10, 25, 50 μM 의 농도에서 PIC에 의해 유발된 SH-SY5Y의 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드생성증가를 각각 $92.41 \pm 3.58\%$, $89.02 \pm 3.73\%$, $88.33 \pm 2.65\%$ 로 농도의존적이면서

서도 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 4).

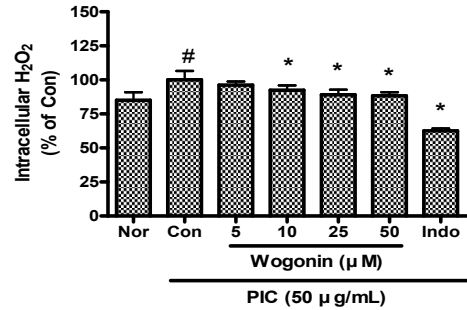


Fig. 4. Effect of Wogonin on PIC-induced production of intracellular H₂O₂ in SH-SY5Y cells for 12 hr incubation. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Nor : Treatment with media only. Con : Treatment with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PIC only. Indo : Treatment with Indomethacin (0.5 μM) and PIC. # represents $P < 0.05$ compared to Nor. * represents $P < 0.05$ compared to Con.

4. Wogonin의 18시간 배양이 PIC로 유발된 SH-SY5Y의 하이드로젠 퍼옥사이드생성증가에 미치는 영향

Wogonin을 PIC와 함께 SH-SY5Y에 18시간 동안 처리한 결과 wogonin이 10, 25, 50 μM 의 농도에서 PIC에 의해 유발된 SH-SY5Y의 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드생성증가를 각각 $92.65 \pm 3.45\%$, $88.46 \pm 3.66\%$, $87.31 \pm 2.34\%$ 로 농도의존적이면서도 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 5).

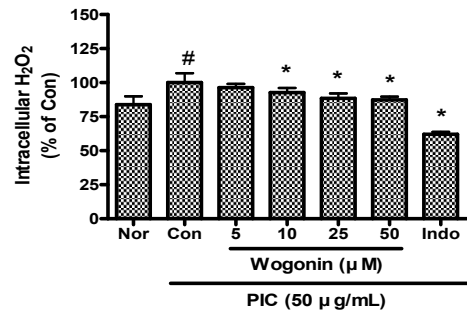


Fig. 5. Effect of Wogonin on PIC-induced production of intracellular H₂O₂ in SH-SY5Y cells for 18 hr incubation. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Nor : Treatment with media only. Con : Treatment with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PIC only. Indo : Treatment with Indomethacin (0.5 μM) and PIC. # represents $P < 0.05$ compared to Nor. * represents $P < 0.05$ compared to Con.

5. Wogonin의 24시간 배양이 PIC로 유발된 SH-SY5Y의 하이드로젠 퍼옥사이드생성증가에 미치는 영향

Wogonin을 PIC와 함께 SH-SY5Y에 24시간 동안 처리한 결과 wogonin이 10, 25, 50 μM 의 농도에서 PIC에 의해 유발된 SH-SY5Y의 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드생성증가를 각각 $92.71 \pm 3.79\%$, $88.93 \pm 3.63\%$, $88.51 \pm 2.14\%$ 로 농도의존적이면서도 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 6).

6. Wogonin과 PIC의 24시간 배양이 SH-SY5Y의 nitric oxide 생성에 미치는 영향

PIC를 단독, Wogonin과 함께 24시간동안 처리한 경우 모두 SH-SY5Y의 nitric oxide 생성에 별다른 변화가 나타나지 않았다 (Fig. 7).

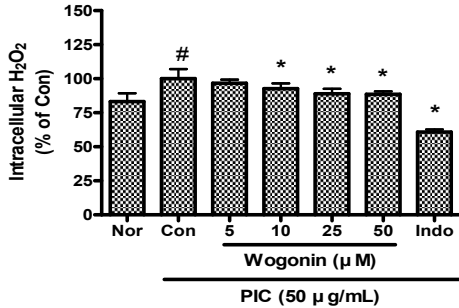


Fig. 6. Effect of Wogonin on PIC-induced production of intracellular H₂O₂ in SH-SY5Y cells for 24 hr incubation. Results are represented as mean ± SD of more than three independent experiments. Nor : Treatment with media only. Con : Treatment with 50 μg/mL of PIC only. Indo : Treatment with Indomethacin (0.5 μM) and PIC. # represents P < 0.05 compared to Nor. * represents P < 0.05 compared to Con.

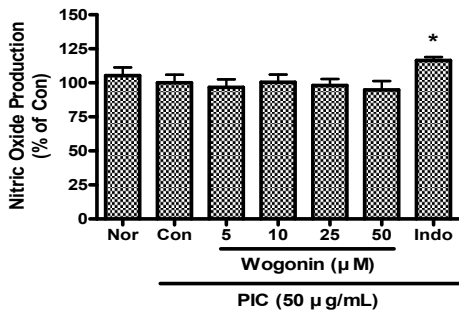


Fig. 7. Effect of Wogonin and PIC on production of nitric oxide in SH-SY5Y cells for 24 hr incubation. Results are represented as mean ± SD of more than three independent experiments. Nor : Treatment with media only. Con : Treatment with 50 μg/mL of PIC only. Indo : Treatment with Indomethacin (0.5 μM) and PIC. * represents P < 0.05 compared to Con.

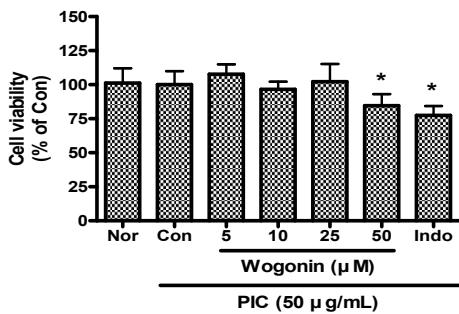


Fig. 8. Effect of Wogonin and PIC on Cell viability of SH-SY5Y cells for 24 hr incubation. Results are represented as mean ± SD of more than three independent experiments. Nor : Treatment with media only. Con : Treatment with 50 μg/mL of PIC only. Indo : Treatment with Indomethacin (0.5 μM) and PIC. * represents P < 0.05 compared to Con.

7. Wogonin과 PIC의 24시간 배양이 SH-SY5Y의 세포생존율에 미치는 영향

PIC를 단독으로 24시간동안 처리한 결과에서는 SH-SY5Y의 세포생존율을 감소시키기는 했으나 유의성은 없었으며 PIC와 Wogonin을 함께 24시간동안 처리한 결과에서는 5, 10, 25 μM의 농도에서는 유의한 변화가 없었으나, 50 μM의 농도에서는 유의한 세포생존율 감소가 나타났다(Fig. 8).

고찰

세포 내에서 발생하는 활성산소종의 일종인 hydrogen peroxide는 대식세포나 단핵구의 병원체제거작용에 있어서 중요한 역할을 담당하지만, 과도하게 생성되는 경우에 인체조직의 정상세포를 손상시키는 부작용도 유발한다³⁾. 이러한 활성산소종의 작용을 산화적 스트레스(oxidative stress)라고 하며 정상조직의 파괴, 비정상화 및 암세포 발생의 중요기전으로 설정되어 있다³⁾.

신경교세포와 함께 뇌를 구성하는 중요세포인 신경세포도 과도한 활성산소종이 축적되면 세포의 사멸이 유발되며, 산화적 스트레스에 의한 신경세포의 지속적인 손상 및 사멸은 뇌졸중이나 퇴행성 뇌질환과 같은 뇌손상질환의 핵심적 메커니즘이다¹⁴⁾. 또한 바이러스성 뇌염의 경우와 같이 체내로 침입한 병원성 바이러스들은 뇌손상을 유발하고 신경세포를 파괴할 수 있으며, 이 과정에서 바이러스의 증식에 따라 dsRNA가 체내에 증가·축적되어 각종의 면역증반응을 유발하게 되는 것이다³⁾. 그러므로 이 증가된 dsRNA에 의한 신경세포의 산화적 스트레스를 방어하는 물질에 대한 탐색을 통하여 바이러스성 뇌손상 치료제개발의 단서를 마련할 수 있을 것이다³⁾.

Wogonin(5,7-Dihydroxy-8-methoxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one)은 플라보노이드(flavonoid)의 일종으로서 청열조습약(淸熱燥濕藥) 중의 하나인 황금(黃芩; Scutellaria Radix; root of Scutellaria baicalensis) 등에 함유되어 있다¹⁾. 최근 이 등²⁾은 wogonin이 과산화지질생성억제를 통한 항산화작용이 있음과 함께 황금(黃芩)이 포함되어 있는 황연해독탕(黃連解毒湯)이 4-VO로 유발한 흰쥐뇌허혈에 대한 신경보호효과를 가지고 있음에 대해서도 보고한 바 있다. 그러나 아직까지 wogonin이 합성이중가닥RNA로 자극되어진 신경세포의 하이드로젠 퍼옥사이드생성증가에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 wogonin이 합성이중가닥RNA의 일종인 polyinosinic-polycytidylic acid로 유발된 인간신경모세포종(human neuroblastoma) SH-SY5Y의 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드생성증가에 미치는 영향을 알아보기 위하여 in vitro 실험을 수행하였으며, 참고적으로 PIC와 wogonin이 SH-SY5Y의 nitric oxide 생성과 세포생존율에 미치는 영향에 대해서도 알아보았다.

Comstock 등³⁾은 PIC가 인간기관지상피세포(16HBE14o cells)의 활성산소종 생성을 2배 이상 증가시킨다고 보고 한 바 있으나, 본 연구에서 PIC를 인간신경모세포종(SH-SY5Y)에 처리한 결과에서는 하이드로젠 퍼옥사이드 생성을 유의(P < 0.05)하게 증가시키기는 하였으나 그 수준은 1.2배 정도로서 세포의 종류마다 PIC에 의해서 유발되는 활성산소종의 생성증폭비율이 다를 수 있었다.

Wogonin을 PIC와 함께 SH-SY5Y에 30분 동안 처리한 결과 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC로 유발된 SH-SY5Y의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 농도의존적으로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 2). Wogonin을 PIC와 함께 SH-SY5Y에 2시간 동안 처리한 결과에서도 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC로 유발된 SH-SY5Y의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 농도의존적으로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰으며(Fig. 3), 12시간 동안 배양한 결과에서는 wogonin이 10, 25, 50 μM 의 농도에서 PIC로 유발된 SH-SY5Y의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 농도의존적으로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 4). Wogonin을 PIC와 함께 SH-SY5Y에 18시간 동안 처리한 결과에서는 10, 25, 50 μM 의 농도에서 PIC로 유발된 SH-SY5Y의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 농도의존적으로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰으며(Fig. 5), 24시간 동안 배양한 결과에서도 wogonin이 10, 25, 50 μM 의 농도에서 PIC로 유발된 SH-SY5Y의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 농도의존적으로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 6). 한편, PIC를 단독 혹은 Wogonin(5, 10, 25, 50 μM)과 함께 24시간동안 처리한 경우 모두 SH-SY5Y의 nitric oxide 생성에 별다른 변화가 나타나지 않았으며(Fig. 7), PIC를 단독으로 24시간동안 처리한 결과에서는 SH-SY5Y의 세포생존율을 감소시키기는 했으나 유의성은 없었으며 PIC와 Wogonin(5, 10, 25, 50 μM)을 함께 24시간동안 처리한 결과에서는 5, 10, 25 μM 의 농도에서는 유의한 변화가 없었으나, 50 μM 의 농도에서는 유의한 세포생존율 감소가 나타났다(Fig. 8). 이는 wogonin에 의한 SH-SY5Y의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성억제가 wogonin에 의한 세포독성과는 다른 기전으로 발생하는 것임을 의미한다. PIC에 의해서 유발되는 SH-SY5Y의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 wogonin이 어떠한 기전을 통해서 억제하는지에 대한 자세한 실험은 본 연구에서 이루어지지 않았다. 2008년도에 Piao 등²⁰⁾은 wogonin이 MCP-1으로 자극된 microglial cell의 nuclear factor-kappa B 활동을 억제함으로써 허혈성뇌손상부위의 염증 진행을 완화할 수 있음에 대하여 보고한 바 있다. 그러므로 향후 wogonin이 산화적 스트레스와 관련된 뇌손상질환의 염증현상에 대한 조절작용이 있는지에 대한 조사도 의미있는 것으로 판단된다.

즉, 위와 같은 실험결과는 wogonin이 PIC에 의해서 유발된 인간 신경모세포종의 하이드로젠 퍼옥사이드 과잉생성을 억제함으로써 활성산소종 과잉생성과 관련된 바이러스감염성 신경세포 사멸 및 뇌손상진행을 완화할 수 있는 신경보호제로서의 응용 가능성이 있음을 나타내는 것이다. 앞으로 wogonin의 신경보호효능에 대해 보다 심도 깊은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 wogonin이 synthetic double-stranded RNA의 일종인 polyinosinic-polycytidylic acid로 유발된 인간 신경모세포종 SH-SY5Y의 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 수행하여 다음과 같은 결

과를 얻었다.

Wogonin을 PIC와 함께 인간 신경모세포종 SH-SY5Y에 30분과 2시간 동안 처리한 결과에서는 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서, 12시간, 18시간, 24시간 동안 처리한 결과에서는 10, 25, 50 μM 의 농도에서 PIC로 유발된 SH-SY5Y의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 농도의존적으로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다.

이러한 실험결과는 wogonin이 PIC에 의해서 유발된 인간 신경모세포종의 hydrogen peroxide의 과잉생성을 억제함으로써 활성산소종 과잉생성과 관련된 바이러스감염성 뇌손상질환의 증상을 완화할 수 있는 신경손상방어제로서 개발될 가능성이 있음을 나타내는 것이다. 앞으로 wogonin의 신경손상방어효과에 대한 보다 심도 깊은 연구가 필요한 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 『기초연구사업(2011-0026019)』 및 보건복지부 한의약선도기술개발사업(B110068-1101-0000200)의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

1. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울, 영림사, p 178, 1991.
2. 이민정, 김영옥, 이강진, 유영범, 김선여, 김성수, 김호철. 황련해독탕(黃連解毒湯)의 4-VO로 유발한 흰쥐뇌허혈에 대한 신경보호효과. 대한한의학회지 23(4):161-168, 2002.
3. Comstock, A.T., Ganesan, S., Chatteraj, A., Faris, A.N., Margolis, B.L., Hershenson, M.B., Sajjan, U.S. Rhinovirus-induced barrier dysfunction in polarized airway epithelial cells is mediated by NADPH oxidase 1. J Virol. 85(13):6795-6808, 2011.
4. 이지영, 김영진, 박완수. Emodin이 polyinosinic-polycytidylic acid로 유발된 인간 신경모세포종 SH-SY5Y의 hydrogen peroxide 생성증가에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 25(6):1039-1043, 2011.
5. Sun, B., Lu, C., Zhou, G.P., Xing, C.Y. Suppression of Par-4 Protects Human Renal Proximal Tubule Cells from Apoptosis Induced by Oxidative Stress. Nephron Exp Nephrol. 117(3):e53-e61, 2010.
6. Graber, D.J., Park, P.J., Hickey, W.F., Harris, B.T. Synthetic triterpenoid CDDO derivatives modulate cytoprotective or immunological properties in astrocytes, neurons, and microglia. J Neuroimmune Pharmacol. 6(1):107-120, 2011.
7. Melillo, A.A., Bakshi, C.S., Melendez, J.A. Francisella tularensis antioxidants harness reactive oxygen species to restrict macrophage signaling and cytokine production. J Biol Chem. 285(36):27553-27560, 2010.

8. Fila, L., Musil, J. Examination of exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Cas Lek Cesk.* 149(4):173-177, 2010.
9. 박완수. 白蔘과 紅蔘이 포함된 理中湯의 마우스 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 25(1):78-83, 2011.
10. 박완수. 黃芩 물추출물이 마우스 대식세포의 hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향. *대한본초학회지* 26(1):53-58, 2011.
11. 박완수. 黃芩 물추출물이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향. *경락경혈학회지* 28(3):33-41, 2011.
12. 이지영, 박완수. 白蔘이 포함된 理中湯약침액의 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 nitric oxide 및 hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향. *경락경혈학회지* 28(1):61-69, 2011.
13. 이지영, 박완수. 紅蔘理中湯이 LPS로 유발된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 nitric oxide 및 hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 25(2):294-299, 2011.
14. 송효인, 김광중. 베타아밀로이드로 유도된 신경세포사멸에 대한 지황(地黃) 및 지황식초(地黃食醋)의 보호효과. *동의생리병리학회지* 21(1):190-198, 2007.
15. 강태훈, 채수림, 최우영, 박 찬, 남재환, 주영란, 박근영, 조해월, 김인범. 생쥐 뇌에서 일본뇌염바이러스 감염에 의한 신경세포 자멸사 연구. *Anatomy and Cell Biology.* 38(3):259-264, 2005.
16. Richardson, M.P., Ayliffe, M.J., Helbert, M., Davies, E.G. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods.* 219(1-2):187-193, 1998.
17. Jirapongsananuruk, O., Malech, H.L., Kuhns, D.B., Niemela, J.E., Brown, M.R., Anderson-Cohen, M., Fleisher, T.A. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *J Allergy Clin Immunol.* 111(2):374-379, 2003.
18. Shankaran, H., Chrisler, W.B., Sontag, R.L., Weber, T.J. Inhibition of ERK oscillations by ionizing radiation and reactive oxygen species. *Mol Carcinog.* 50(6):424-432, 2011.
19. Goodwin, A.C., Murray-Stewart, T.R., Casero, R.A. Jr. A simple assay for mammalian spermine oxidase: a polyamine catabolic enzyme implicated in drug response and disease. *Methods Mol Biol.* 720: 173-181, 2011.
20. Piao, H.Z., Choi, I.Y., Park, J.S., Kim, H.S., Cheong, J.H., Son, K.H., Jeon, S.J., Ko, K.H., Kim, W.K. Wogonin inhibits microglial cell migration via suppression of nuclear factor-kappa B activity. *Int Immunopharmacol.* 8(12):1658-1662, 2008.