

## 遠志甘草煮가 4-HNE로 유도된 Apoptosis에 미치는 영향

함미진<sup>#</sup>, 김연섭<sup>\*</sup>

가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실

### Effects of Polygalae Radix Preparata Cum Glycyrrhizae Radix on 4-HNE-induced Apoptosis in PC-12 cell

Mee-Jin Ham<sup>#</sup>, Youn-Sub Kim<sup>\*</sup>

Department of Anatomy-Pointology, College of Korean Medicine, Gachon University

#### ABSTRACT

**Objectives** : The study was designed to observe the effect of Polygalae Radix Preparata Cum Glycyrrhizae Radix on 4-Hydroxynonenal (4-HNE)-induced apoptosis in PC-12 cell.

**Methods** : A cytotoxic test on Polygalae Radix Preparata Cum Glycyrrhizae Radix (PG) was conducted and another MTT assay was conducted to observe the cytoprotective effect against 4-HNE that cause oxidative stress. In addition, in order to observe the expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3 and TNF- $\alpha$  protein involved with apoptosis, western blot was conducted.

**Results** : The groups treated with 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g and 100  $\mu$ g of PG water extract had no toxicity for PC-12 cell. The groups treated with 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g and 100  $\mu$ g of PG water extract showed a significant increase of cell survival rate in comparison with the control group injected by only 4-HNE. The groups treated with 25  $\mu$ g and 50  $\mu$ g of PG water extract showed a significant suppression on increase of Bax protein expression in the control group. The group treated with 100  $\mu$ g of PG water extract showed a significant promotion on decrease of Bcl-2 protein expression in the control group. The group treated with 50  $\mu$ g of PG water extract showed a significant suppression on increase of Caspase-3 protein expression in the control group. The group treated with 25  $\mu$ g of PG water extract showed a significant suppression on increase of TNF- $\alpha$  protein expression in the control group.

**Conclusions** : These results suggest that Polygalae Radix Preparata Cum Glycyrrhizae Radix is effective in reducing apoptosis by 4-HNE-damaged cell.

**Key words** : Polygalae Radix Preparata Cum Glycyrrhizae Radix, Apoptosis, Bax, Bcl-2, Caspase-3, TNF- $\alpha$

#### 서론

Apoptosis란 세포가 외부의 자극이나 환경 변화 등에 의해 이루어지는 계획된 세포 죽음(programmed cell death)이며 체내의 항상성을 유지하기 위한 작용이다<sup>1)</sup>. Apoptosis의 이상에 의한 질환은 대표적으로 암, 후천성면역결핍증(AIDS), 신경변성 질환에 속하는 알츠하이머병과 파킨슨씨병, 허혈성 상질환인 심근경색증과 뇌졸중 등이 있다<sup>2)</sup>.

遠志는 원지과에 속한 다년생 초본인 원지 (*polygala tenuifolia*

Willd.) 의 뿌리로<sup>3)</sup>, 寧心安神, 祛痰開竅, 消散腫痛의 작용을 하여 神昏, 驚悸, 不眠, 健忘을 치료한다<sup>4)</sup>.

遠志의 실험적 연구로 항염증 효과<sup>5)</sup>, 신경세포 보호 효과<sup>6)</sup>, 인지장애 개선 효과<sup>7)</sup> 등이 보고되었다.

遠志甘草煮는 포제법 중의 煮法에 따라 원지를 감초 달인 물에 삶은 것으로, 이 과정을 통해 遠志가 가진 독성은 완화되고 정신 안정작용이 향상<sup>8)</sup>되므로 遠志甘草煮 또한 신경 보호효과가 있을 것으로 생각된다.

이에 저자는 遠志甘草煮의 신경 보호효과를 확인하기 위해

\*Corresponding author : Youn-Sub Kim, Department of Anatomy-Pointology, College of Oriental Medicine, Gachon University  
· Tel : +82-31-750-542 · Fax : +82-31-750-5416 · E-mail : ysk5708@hanmail.net

#First author : Mee-Jin Ham, Department of Anatomy-Pointology, College of Oriental Medicine, Gachon University

· Tel : +82-31-750-5427 · Fax : +82-31-750-5416 · E-mail : omd1969@empal.com

· Received : 31 December 2015 · Revised : 25 January 2016 · Accepted : 25 January 2016

PC-12 cell의 손상에 의한 apoptosis 영향을 관찰하였다. Apoptosis를 촉진하는 4-Hydroxynonenal(4-HNE)를 투여하여 손상된 PC-12 cell의 세포 보호 효과를 측정하였다. 그리고 apoptosis에 관여하는 Bax, Bcl-2, Caspase-3 및 TNF- $\alpha$  단백질의 발현을 western blot 분석으로 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양

본 실험에 사용한 PC-12(rat adrenal pheochromocytoma cell) 세포는 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다. 세포의 배양을 위해 10% horse serum과 5% fetal bovine serum, 2% NaHCO<sub>3</sub>, 1% penicillin/streptomycin이 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하였으며 37 °C의 온도와 5% CO<sub>2</sub>가 포함된 공기가 공급되는 CO<sub>2</sub> incubator에서 세포를 배양하였다.

### 2. 기기 및 시약

#### 1) 기기

본 실험을 위해 사용된 기기는 Clean Bench(Nuaire, USA), CO<sub>2</sub> Incubator (Nuaire, USA), Microplate Reader(Dynex, USA), Spectrophotometer (Implen, Germany), Water Purification (High-Q, USA), Freezing dryer(Eyela, Japan), Autoclave(Sam woo, Korea), Balance(Mettler, Switzerland), Centrifuge (Gyrozen, Korea), Sonicator (Sonics, USA), Gel Doc XR System(Bio-Rad, USA), Automatic X-RAY Film Processor(JPI, Korea) 등이다.

#### 2) 시약

본 실험에 사용된 시약은 RPMI Medium 1640(Gibco, USA), Fetal Bovine Serum(Gibco, USA), Horse Serum(Gibco, USA), 4-Hydroxy Nonenal (Cayman, USA), MTT(Sigma, USA), Sodium Bicarbonate(Sigma, USA), Trzma Base (Sigma, USA), Sodium Chloride(Sigma, USA), Dimethyl Sulfoxide(Amresco, USA), protein assay dye reagent (Bio-Rad, USA), mouse actin antibody (Millipore, USA)와 rabbit Bax antibody (CST, USA), rabbit Bcl-2 antibody (CST, USA), rabbit Caspase-3 antibody (CST, USA), rabbit TNF- $\alpha$  antibody (CST, USA), ECL detection Reagent (Amersham, UK), horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (CST, USA), nitrocellulose membrane (Bio-Rad, USA), Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGXTM Gel(Bio-Rad, USA), Gel Documentation (Bio-Rad, USA) 등을 구입하여 사용하였다.

### 3. 약물의 제조

본 실험에 사용한 遠志甘草煮(Polygalae Radix Preparata Cum Glycyrrhizae Radix, PG)는 (주)윌니허브에서 구입하였다. 遠志甘草煮 50 g 에 물 500 ml 를 가하여 환류추출기에서 2시간 동안 전탕하고, 여과액을 rotary evaporator로 감

압 농축한 후 동결건조 하였다. 遠志甘草煮는 8 g 의 추출물을 얻어 수율은 16 % 이었다.

## 4. PC-12 cell 에서 PG의 4-HNE로 자극된 세포 생존율 측정

세포 생존율을 측정하기 위해 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay를 사용하였다. 이 방법은 세포의 미토콘드리아 내 효소인 succinate-dehydrogenase에 의해 MTT가 formazan으로 변하여 세포의 성장이 멈추거나 세포가 죽으면 formazan의 생성이 줄어들게 되는 것을 이용한 것이다. PG의 PC-12 세포 생존율을 측정하기 위해 96 well plate에 각 well당  $2 \times 10^4$  개/ml를 성장 배지에 seeding 하였다. 24시간 후 serum-free RPMI 1640 배지로 갈아주고 PG를 처리하지 않은 정상군(Normal)과 PG를 각각 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml, 400  $\mu$ g/ml의 농도로 24시간 처리한 실험군으로 나누었다. 또한 4-HNE를 투여한 실험그룹은 6개 군으로, 정상군(Normal)과 4-HNE 35  $\mu$ M 을 처리한 대조군(Control), PG를 각각 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml을 24시간 처리 후 4-HNE를 35  $\mu$ M 의 농도로 24시간 동안 처리한 4개의 실험군으로 나누어 실험을 진행하였다. MTT reagent (stock 농도 5 mg/ml)를 96 well에 15  $\mu$ l 씩 넣어 37 °C incubator에서 2시간 동안 배양시켰다. 그 후 media를 제거하고 DMSO 100  $\mu$ l 를 넣은 후 70 °C incubator에서 10분간 녹여서 ELISA reader를 이용하여 흡광도 570 nm 에서 세포의 생존율을 측정하였다.

## 5. Western blot 분석

세포는 차가운 PBS(pH 7.4)로 2번 씻어낸 후 원심분리기를 이용하여 1000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 그리고 세포분해용액(iNtRON Biotechnology, Korea)을 넣은 후 초음파 분쇄기로 세포를 균질화 하고 다시 원심분리기를 이용하여 20분 동안 12,000 rpm으로 원심 분리하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad의 protein assay dye reagent를 사용하여 흡광도로 측정하였다. 정량한 단백질을 Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup> Gel에 loading하여 분리한 다음 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 1차 항체로 mouse actin antibody (1:15,000)와 rabbit Bax antibody (1:1000), rabbit Bcl-2 antibody (1:1000), rabbit Caspase-3 antibody (1:2000), rabbit TNF- $\alpha$  antibody (1:1000) 를 사용하였다. 2차 항체로는 Bax, Bcl-2, Caspase-3, TNF- $\alpha$ 용 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody를 사용하였다. Nitrocellulose membrane으로 단백질 이동을 제외하고 모든 실험은 실온에서 시행하였으며, Nitrocellulose membrane으로 단백질 이동은 4°C 냉장고 안에서 실시하였다. 단백질 밴드 검출은 ECL detection Reagent를 사용하여 발색시켰다.

각 단백질의 발현을 비교하기 위해서 발색된 band의 밀도는 Gel Documentation의 Quantity One Analysis Software (Bio-Rad)로 측정을 하였다.

## 6. 통계처리

통계분석은 4-HNE와 4-HNE + PG 투여 group 간의 유의성 검증으로 Graphpad Prism(USA)으로 Student's *t*-test를 사용하였으며, 실험 결과는 평균 ± 평균의 표준오차[means ± standard error of the mean(SEM)]로 나타내었다. 통계적 유의성 검증은  $P < 0.05$ 로 하였다.

## 결 과

### 1. 遠志甘草煮가 세포 생존율에 미치는 영향

遠志甘草煮가 PC-12 cell에 독성이 있는가를 관찰하기 위해, 세포에 遠志甘草煮물추출물을 처리하고 세포의 생존율을 측정하였다. 정상군(Normal)의 세포 생존율을 100%로 하였다.

遠志甘草煮물추출물 25  $\mu$ g 주입군(LT25)에서 PC-12 cell 생존율은  $125.8 \pm 9.877\%$  이었고, 遠志甘草煮물추출물 50  $\mu$ g 주입군(LT50)의 PC-12 cell 생존율은  $131.0 \pm 8.972\%$  이며, 遠志甘草煮물추출물 100  $\mu$ g 주입군(LT100)의 PC-12 cell 생존율은  $135.5 \pm 8.510\%$ 로 세 실험군 모두 정상군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었다. 遠志甘草煮물추출물 200  $\mu$ g 주입군(LT200)과 400  $\mu$ g 주입군(LT400)의 PC-12 cell 생존율은 각각  $77.25 \pm 5.721\%$  와  $63.50 \pm 8.180\%$ 로 정상군에 비해 오히려 감소하였다.

이상에서와 같이 遠志甘草煮물추출물 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml 및 100  $\mu$ g/ml 실험군은 세포독성이 없었다(Fig. 1).

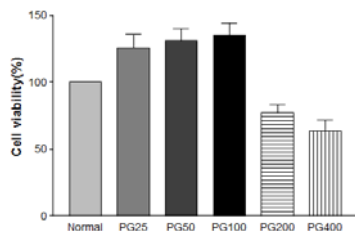


Fig 1. Effect of Polygalae Radix Preparata Cum Glycyrrhizae Radix (PG) on the cell viability. Normal ; only media-treated group, PG25 ; 25  $\mu$ g/ml PG-treated group, PG50 ; 50  $\mu$ g/ml PG-treated group, PG100 ; 100  $\mu$ g/ml PG-treated group, PG200 ; 200  $\mu$ g/ml PG-treated group, PG400 ; 400  $\mu$ g/ml PG-treated group. Data are represented by mean  $\pm$  SEM (n = 4 independent experiments).

### 2. 遠志甘草煮가 4-HNE 손상에 대한 세포보호 효과

遠志甘草煮가 4-HNE 손상에 의한 PC-12 cell에 미치는 영향을 관찰하기 위해, 세포에 遠志甘草煮물추출물을 처리한 다음 4-HNE를 주입하고 세포의 생존율을 측정하였다. 정상군(Normal)의 세포 생존율을 100%로 하였으며 4-HNE만 투여한 대조군(Control)의 PC-12 cell 생존율은  $69.42 \pm 1.718\%$  이었다.

遠志甘草煮물추출물 25  $\mu$ g과 4-HNE를 주입한 군(LT25)의 PC-12 cell 생존율은  $80.25 \pm 3.681\%$  이었고, 遠志甘草煮물추출물 50  $\mu$ g과 4-HNE를 주입한 군(LT50)의 PC-12

cell 생존율은  $79.58 \pm 2.884\%$  이었으며, 遠志甘草煮물추출물 100  $\mu$ g과 4-HNE를 주입한 군(LT100)의 PC-12 cell 생존율은  $77.39 \pm 2.455\%$ 로 세 실험군 모두 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.

遠志甘草煮물추출물 200  $\mu$ g과 4-HNE를 주입한 군(LT200)의 PC-12 cell 생존율은  $45.88 \pm 7.014\%$ 로 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 2).

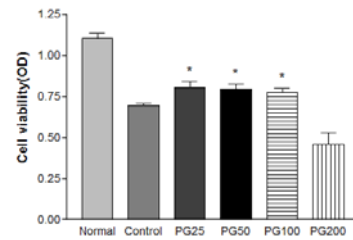


Fig 2. Effect of Polygalae Radix Preparata Cum Glycyrrhizae Radix (PG) on the cell viability with 4-HNE. Normal ; only media-treated group. Control ; 35  $\mu$ M 4-HNE-treated group, PG25 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 25  $\mu$ g/ml PG-treated group, PG50 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 50  $\mu$ g/ml PG-treated group, PG100 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 100  $\mu$ g/ml PG-treated group, PG200 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 200  $\mu$ g/ml PG-treated group. The values represented as mean  $\pm$  SEM (n = 4 independent experiments). Statistical significances are based on comparison to the Control group ( $\rho < 0.05$ ).

### 3. 遠志甘草煮가 Bax 단백질 발현에 미치는 영향

遠志甘草煮가 Bax 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포에 遠志甘草煮물추출물을 처리한 다음 4-HNE를 주입하고 세포의 Bax 단백질 발현양을 측정하였다. 정상군(Normal)의 Bax 단백질 발현양을 100%로 하였으며, 4-HNE만 투여한 대조군(Control)의 Bax 단백질 발현양은  $111.3 \pm 7.055\%$  이었다.

遠志甘草煮물추출물 25  $\mu$ g과 4-HNE를 주입한 군(LT25)에서 Bax 단백질 발현양은  $74.67 \pm 8.007\%$  이었고, 遠志甘草煮물추출물 50  $\mu$ g과 4-HNE를 주입한 군(LT50)에서 Bax 단백질 발현양은  $80.33 \pm 6.360\%$ 로 두 실험군 모두 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었다. 遠志甘草煮물추출물 100  $\mu$ g과 4-HNE를 주입한 군(LT100)에서 Bax 단백질 발현양은  $101.7 \pm 14.17\%$ 로 대조군에 비해 감소를 나타내었지만 유의성은 없었다(Fig. 3).

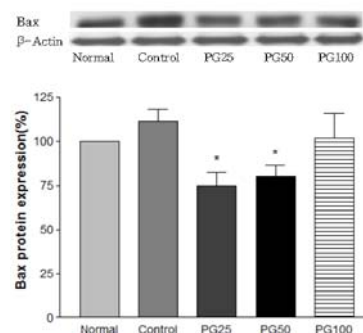


Fig 3. Effect of Polygalae Radix Preparata Cum Glycyrrhizae Radix (PG) on Bax expression. Normal ; only media-treated group. Control ; 35  $\mu$ M 4-HNE-treated group, PG25 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 25  $\mu$ g/ml PG-treated group, PG50 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 50  $\mu$ g/ml PG-treated group, PG100 ; 35  $\mu$ M 4-HNE and 100  $\mu$ g/ml PG-treated group. The values represented as mean  $\pm$  SEM (n = 4 independent experiments). Statistical significances are based on comparison to the Control group ( $\rho < 0.05$ ).

$\mu\text{g}/\text{mL}$  PG-treated group. PG100 ;  $35\ \mu\text{M}$  4-HNE and  $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$  PG-treated group. The values represented as mean  $\pm$  SEM ( $n=3$  independent experiments). Statistical significances are based on comparison to the Control group. (\*,  $p < 0.05$ ).

#### 4. 遠志甘草煮가 Bcl-2 단백질 발현에 미치는 영향

遠志甘草煮가 Bcl-2 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포에 遠志甘草煮물추출물을 처리한 다음 4-HNE를 주입하고 세포의 Bcl-2 단백질 발현양을 측정하였다. 정상군(Normal)의 Bcl-2 단백질 발현양을 100%로 하였으며, 4-HNE만 투여한 대조군(Control)의 Bcl-2 단백질 발현양은  $35.02 \pm 7.813\%$  이었다.

遠志甘草煮물추출물  $25\ \mu\text{g}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT25)에서 Bcl-2 단백질 발현양은  $49.59 \pm 10.60\%$  이었고, 遠志甘草煮물추출물  $50\ \mu\text{g}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT50)에서 Bcl-2 단백질 발현양은  $56.58 \pm 5.260\%$  이었으며, 遠志甘草煮물추출물  $100\ \mu\text{g}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT100)에서 Bcl-2 단백질 발현양은  $87.60 \pm 5.901\%$ 로 세 실험군 모두 대조군에 비해 증가했으며, 遠志甘草煮물추출물  $100\ \mu\text{g}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT100)만 유의성을 나타내었다(Fig. 4).

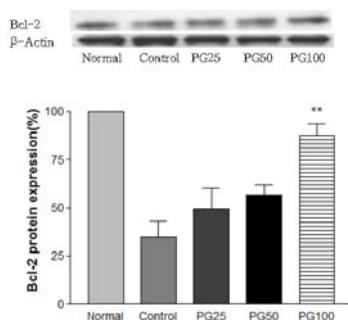


Fig 4. Effect of Polygalae Radix Preparata Cum Glycyrrhizae Radix (PG) on Bcl-2 expression. Normal ; only media-treated group. Control ;  $35\ \mu\text{M}$  4-HNE-treated group. PG25 ;  $35\ \mu\text{M}$  4-HNE and  $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$  PG-treated group. PG50 ;  $35\ \mu\text{M}$  4-HNE and  $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$  PG-treated group. PG100 ;  $35\ \mu\text{M}$  4-HNE and  $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$  PG-treated group. The values represented as mean  $\pm$  SEM ( $n=3$  independent experiments). Statistical significances are based on comparison to the Control group. (\*\*,  $p < 0.01$ ).

#### 5. 遠志甘草煮가 Caspase-3 단백질 발현에 미치는 영향

遠志甘草煮가 Caspase-3 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포에 遠志甘草煮물추출물을 처리한 다음 4-HNE를 주입하고 세포의 Caspase-3 단백질 발현양을 측정하였다. 정상군(Normal)의 Caspase-3 단백질 발현양을 100%로 하였으며, 4-HNE만 투여한 대조군(Control)의 Caspase-3 단백질 발현양은  $161.3 \pm 18.11\%$  이었다.

遠志甘草煮물추출물  $25\ \mu\text{g}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT25)에서 Caspase-3 단백질 발현양은  $123.7 \pm 14.52\%$  이었고, 遠志甘草煮물추출물  $50\ \mu\text{g}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT50)에서 Caspase-3 단백질 발현양은  $101.3 \pm 8.969\%$  이었으며, 遠志甘草煮물추출물  $100\ \mu\text{g}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT100)에서

Caspase-3 단백질 발현양은  $130.7 \pm 13.86\%$ 로 세 실험군 모두 대조군에 비해 감소했으며, 遠志甘草煮물추출물  $50\ \mu\text{g}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT50)만 유의성을 나타내었다(Fig. 5).

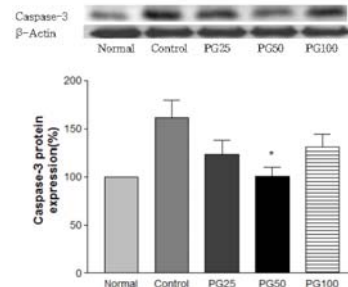


Fig 5. Effect of Polygalae Radix Preparata Cum Glycyrrhizae Radix (PG) on Caspase-3 expression. Normal ; only media-treated group. Control ;  $35\ \mu\text{M}$  4-HNE-treated group. PG25 ;  $35\ \mu\text{M}$  4-HNE and  $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$  PG-treated group. PG50 ;  $35\ \mu\text{M}$  4-HNE and  $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$  PG-treated group. PG100 ;  $35\ \mu\text{M}$  4-HNE and  $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$  PG-treated group. The values represented as mean  $\pm$  SEM ( $n=3$  independent experiments). Statistical significances are based on comparison to the Control group. (\*,  $p < 0.05$ ).

#### 6. 遠志甘草煮가 TNF-α 단백질 발현에 미치는 영향

遠志甘草煮가 TNF-α 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포에 遠志甘草煮물추출물을 처리한 다음 4-HNE를 주입하고 세포의 TNF-α 단백질 발현양을 측정하였다. 정상군(Normal)의 TNF-α 단백질 발현양을 100%로 하였으며, 4-HNE만 투여한 대조군(Control)의 TNF-α 단백질 발현양은  $151.3 \pm 8.963\%$  이었다.

遠志甘草煮물추출물  $25\ \mu\text{g}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT25)에서 TNF-α 단백질 발현양은  $107.3 \pm 11.35\%$  이었고, 遠志甘草煮물추출물  $50\ \mu\text{g}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT50)에서 TNF-α 단백질 발현양은  $100.0 \pm 16.77\%$  이었으며, 遠志甘草煮물추출물  $100\ \mu\text{g}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT100)에서 TNF-α 단백질 발현양은  $121.0 \pm 14.47\%$ 로 세 실험군 모두 대조군에 비해 감소했으며, 遠志甘草煮물추출물  $25\ \mu\text{g}$ 과 4-HNE를 주입한 군(LT25)만 유의성을 나타내었다(Fig. 6).

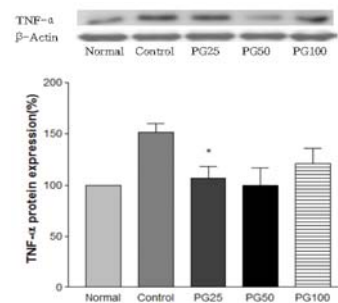


Fig 6. Effect of Polygalae Radix Preparata Cum Glycyrrhizae Radix (PG) on TNF-α expression. Normal ; only media-treated group. Control ;  $35\ \mu\text{M}$  4-HNE-treated group. PG25 ;  $35\ \mu\text{M}$  4-HNE and  $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$  PG-treated group. PG50 ;  $35\ \mu\text{M}$  4-HNE and  $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$  PG-treated group. PG100 ;  $35\ \mu\text{M}$  4-HNE and  $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$  PG-treated group. The values represented as mean  $\pm$  SEM ( $n=3$  independent experiments). Statistical significances are based on comparison to the Control group. (\*,  $p < 0.05$ ).

## 고찰

生遠志는 去痰開竅작용이 비교적 강하지만, 內服하면 쉽게 惡心嘔吐가 일어날 수 있다. 遠志甘草煮는 甘草水를 사용하여 咽喉의 점막에 대한 자극성이 완화되고 안으로는 安神益智의 효능을 증강시켜서, 주로 心神不安, 不眠, 健忘, 驚悸怔忡 등의 병증이 나타나는 경우에 많이 응용한다<sup>8,9)</sup>.

Apoptosis는 세포가 죽을 때 사전에 미리 준비된 상태에서 사망프로그램을 가동시키면서 능동적으로 죽음을 맞이한다는 개념이다. 세포의 괴사(necrosis)를 수동적인 사망이라 한다면 apoptosis는 능동적인 자연사로서 자발적인 사망 기전이다<sup>10)</sup>.

Apoptotic pathway는 death receptor pathway (extrinsic pathway)와 mitochondrial pathway (intrinsic pathway) 2가지로 대별된다. 그 중 미토콘드리아를 경유하는 apoptosis 과정은 미토콘드리아의 막의 침투성의 변화, 막 전위의 파괴, 막에 존재하는 침투막의 생성 및 세포독성에 관련된 단백질의 세포질로의 방출을 통해 caspase 활성을 촉발한다<sup>11)</sup>. 이 때, 미토콘드리아 막 침투성은 Bcl-2 family를 통하여 주로 조절된다. Bcl-2 family protein은 Bcl-2와 Bcl-XL와 같이 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic members와 Bax와 Bak 같이 apoptosis를 유도하는 pro-apoptotic members가 있다<sup>12)</sup>.

Apoptosis는 생명체에서 매우 중요한 위치를 차지하므로, 여러 가지 요인으로 인해 적절히 조절되지 못할 경우 많은 질환의 원인이 되기도 한다. 특히 apoptosis의 이상 증가에 의한 질환에 속하는 알츠하이머병, 심근경색증, 뇌졸중<sup>2)</sup> 등에 대해서는 遠志의 精神 安定과 祛痰 작용이 높아진 遠志甘草煮가 유의한 효능이 있을 것으로 판단되어 본 연구를 통해 遠志甘草煮가 세포 손상에 의한 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하였다.

遠志甘草煮에 대한 세포독성 검사를 하고 산화스트레스를 일으키는 4-HNE에 대한 세포보호 효과를 관찰하기 위해 MTT assay를 하였으며, western blot을 실시하여 Bax, Bcl-2, Caspase-3 및 TNF- $\alpha$  단백질 발현을 관찰하였다.

신경세포 독성 연구에 많이 사용되고 있는 PC-12 cell에서 遠志甘草煮의 세포 생존율을 측정할 결과 遠志甘草煮물추출물 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, 100  $\mu$ g 주입군에서 세포독성이 없었다.

4-HNE는 apoptotic 및 necrotic 세포 죽음을 유도하는 것으로 알려져 있다. 4-HNE의 이런 유도 수준은 세포 증식, 분화 및 세포주기 조절, 산화 스트레스 그리고 하루 신호 단백질과 관련된 유전자 변화에 의한 apoptosis에 영향을 미치며 PC-12 cell에서 apoptosis의 실행에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>13)</sup>.

遠志甘草煮가 4-HNE에 의한 PC-12 cell 손상에 미치는 영향을 관찰한 결과 遠志甘草煮물추출물 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, 100  $\mu$ g을 주입한 실험군에서 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내 세포보호 효과가 있었다.

Apoptosis의 intrinsic pathway에서는 주로 산화성 스트레스에 의해 비특이적 막투과성이 증가되고, 미토콘드리아 막 전위가 점진적으로 감소하는 특징적 변화가 나타난다<sup>14)</sup>. 이 때 미토콘드리아의 막간격에 존재하는 호흡연쇄 구성요소인 cytochrome c가 세포질 내로 유출되는데, pro-apoptotic group인 Bax는 세포질에서 미토콘드리아로 이동하여 cytochrome

c의 유출을 유도하고<sup>15)</sup>, 미토콘드리아에 위치한 anti-apoptotic group인 Bcl-2에 의해 유출이 억제되기도 한다<sup>16)</sup>.

遠志甘草煮가 proapoptosis 인자인 Bax에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포의 Bax 단백질 발현양을 측정할 결과 遠志甘草煮물추출물 25  $\mu$ g과 50  $\mu$ g을 주입한 실험군에서 유의한 감소를 나타내었다.

遠志甘草煮가 antiapoptosis 인자인 Bcl-2에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포의 Bcl-2 단백질 발현양을 측정할 결과 遠志甘草煮물추출물 100  $\mu$ g을 주입한 실험군은 유의한 증가를 나타내었다.

Caspase는 apoptosis에서 관찰되는 대부분의 형태학적 변화를 초래하며 일종의 행동대장과 같은 역할을 한다. intrinsic pathway에서는 미토콘드리아에서 Bcl-2 family의 조절 하에 배출된 cytochrome c가 개시자 caspase인 caspase-9을 활성화시키고 이차적으로 caspase-3와 같은 작동자 caspase를 활성화시켜 형태학적 특징을 초래한다. Extrinsic pathway에서는 TNF- $\alpha$ 와 Fas ligand 등이 사멸 신호를 받은 후 각각의 사멸 수용체와 결합하고, 그 결과로 caspase-8/10이 활성화되어 이차적으로 작동자 caspase가 활성화된다<sup>17)</sup>.

遠志甘草煮가 proapoptosis 인자인 Caspase-3에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포의 Caspase-3 단백질 발현양을 측정할 결과 遠志甘草煮물추출물 50  $\mu$ g을 주입한 실험군은 유의한 감소를 나타내었다.

TNF- $\alpha$ 는 TNFR와 결합 후 분리되어 나간 FADD가 death-inducing signaling complex (DISC) 활성을 통해 procaspase 8을 자극하고, 활성화된 caspase-8은 caspase-9를 거지거나 혹은 caspase-3/7을 연속적으로 자극하여 apoptosis를 실행한다<sup>18)</sup>.

遠志甘草煮가 proapoptosis 인자인 TNF- $\alpha$ 에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포의 TNF- $\alpha$  단백질 발현양을 측정할 결과 遠志甘草煮물추출물 25  $\mu$ g 실험군은 유의한 감소를 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 보면 遠志甘草煮는 세포 손상에 대해 apoptosis를 유도하는 Bax, Caspase-3 및 TNF- $\alpha$ 는 감소시키고, apoptosis를 억제하는 Bcl-2는 증가시킴으로써, apoptosis의 촉진을 억제하는 작용을 한다고 판단된다.

## 결론

본 연구에서는 遠志甘草煮가 apoptosis에 미치는 영향을 연구하였다. 遠志甘草煮의 세포독성 검사와 4-HNE에 대한 세포보호 효과를 관찰하였다. 또한 apoptosis에 관여하는 Bax, Bcl-2, Caspase-3 및 TNF- $\alpha$  단백질의 발현을 관찰한 결과 다음과 같다.

1. 遠志甘草煮물추출물 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml 및 100  $\mu$ g/ml를 주입한 실험군은 PC-12 cell에 대한 세포 독성이 없었으며, 4-HNE만 투여한 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내며 세포 보호 효과가 있었다.
2. Bax는 25  $\mu$ g/ml과 50  $\mu$ g/ml, Caspase-3는 50  $\mu$ g/ml, TNF- $\alpha$ 는 25  $\mu$ g/ml 遠志甘草煮물추출물을 주입한 실험

군에서 대조군에 비해 각각의 단백질 발현양이 유의한 감소를 나타냈다.

3. 遠志甘草煎물추출물 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  를 주입한 실험군에서 대조군에 비해 Bcl-2 단백질 발현양이 유의한 증가를 나타냈다.

이상의 결과들로 보아 遠志甘草煎가 세포 손상에 의한 apoptosis를 억제하는 효능이 있는 것으로 생각된다.

## References

1. Park JH, Kim SR, Song ES, Im MW, Lee BL, Lee WY. Placental apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction or preeclampsia: expression of Bcl-2, Bax and p53. *Korean J Obstet Gynecol*, 2005 ; 48 : 891-900.
2. Pyo SN, Son ES. Understanding of the molecular mechanism of apoptosis-related factors and excavation. Daejeon : Korea Institute of Science and Technology Information, 2005 : 4-10.
3. Oriental college textbooks compiled by the National Joint Council collaborated. *Herbal Medicine*, Seoul : Younglimsa, 2007 : 532-3.
4. Kang BS. *Clinical fomulation herbal medicine*, Seoul: Younglimsa, 1996 : 309-11.
5. Oh HS, Kim BW. Anti-inflammatory activity of the water extract of *Polygala tenuifolia* Willd. *Korean J Orient Int Med*, 2013 ; 34(2) : 204-14.
6. Lee HJ, Ban JY, Koh SB, Seong NS, Bae KW, Seong YH. *Polygalae radix* extract protects cultured rat granule cells against damage induced by NMDA. *Am J Chin Med*, 2004 ; 32 : 599-610.
7. Park CH, Choi SH, Koo JW, Seo JH, Kim HS, Jeong SJ, Suh YH. Novel Cognitive improving and neuroprotective activities of *Polygala tenuifolia* Willdenow extract, BT-11. *J Neurosci Res*, 2002 ; 70 : 484-92.
8. Jung KH. *Processing of herbal medicine*, Daejeon : Moonjin, 2012 : 253.
9. Kwon DR, Bu YM, Seo BI, Lee JH, Choi BY. *Herbal medicine: base of oriental medicine and clinical applications*, Seoul : Younglimsa, 2012 : 737-9.
10. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972 ; 26 : 239-57.
11. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 2001 ; 15 : 2922-33.
12. Cory S, Adams JM. The bcl-2 family: regulators of the cellular life-of-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2002 ; 2 : 647-56.
13. Sissiqui MA, Kashyap MP, Kumar V, Al-Khedhairi AA, Musarrat J, Pant AB. Protective potential of trans-resveratrol against 4-hydroxynonenal induced damage in PC-12 cells. *Toxicology in Vitro*, 2010 ; 24 : 1592-8.
14. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 1996 ; 86 : 147-57.
15. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 1997 ; 275 : 1129-32.
16. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, 1997 ; 139 : 1281-92.
17. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, 2005 ; 55 : 178-94.
18. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 2003 ; 114 : 181-90.