



Original Article / 원저

梔子の Apoptosis유발 억제효과

한영수¹, 이태희^{2*}, 김연섭^{1*}

¹가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실

²가천대학교 한의과대학 방제학교실

Inhibitory Effects of *Gardeniae Fructus* on Apoptosis induced by 4-HNE in PC-12 Cell

Yong-Soo Han¹, Tae Hee Lee^{2*}, Youn-Sub Kim^{1*}

¹Department of Anatomy-Pointology, College of Korean Medicine,
Gachon University

²Department of Formulae Pharmacology, College of Korean Medicine,
Gachon University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to observe the effects of *Gardeniae Fructus* on 4-HNE-induced apoptosis in PC-12 cell.

Methods : A MTT assay was conducted to observe the cytotoxicity of *Gardeniae Fructus* on the PC-12 cell viability and the cytoprotective effects of *Gardeniae Fructus* on PC-12 cell against oxidative stress caused by 4-HNE. And western blot was conducted to observe the expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3, TNF- α proteins which are involved in intrinsic and extrinsic apoptosis pathway.

Results : 25, 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{g/ml}$ of *Gardeniae Fructus* water extract had no cytotoxicity on PC-12 cell. 200 $\mu\text{g/ml}$ of *Gardeniae Fructus* water extract had significant cytoprotective effect on PC-12 cell against oxidative stress caused by 4-HNE.

The expression of Bax protein in 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ of *Gardeniae Fructus* was significantly decreased in PC-12 cell.

The expression of Bcl-2 protein in 200 $\mu\text{g/ml}$ of *Gardeniae Fructus* was significantly increased in PC-12 cell.

The expression of Caspase-3 protein in 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ of *Gardeniae Fructus* was significantly decreased in PC-12 cell.

The expression of TNF- α protein in 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Gardeniae Fructus was significantly decreased in PC-12 cell.

Conclusions : These results suggest that Gardeniae Fructus water extract is effective to protect PC-12 cell from 4-HNE induced apoptosis.

Key words : Gardeniae Fructus, 4-HNE, Bax, Bcl-2, Caspase-3, TNF- α .

I. 서론

Programmed Cell Death의 일종인 apoptosis는 자발적인 세포의 죽음을 유도하는 생체기작으로¹⁾, 발생 과정에서 생긴 노화되거나 각종 손상을 받은 불필요한 세포를 제거하기 위해 유전적으로 결정된 프로그램이 활성화되면서 일어나는 세포사멸의 한 형태이다²⁾.

세포가 축소되고, 세포의 원형질막에 거품 같은 수포가 형성되며, 핵 내 염색사의 응축과 핵의 분해가 일어나고, apoptosis body가 형성되는 과정을 특징으로 하는 apoptosis는 죽음 수용체 (death receptor)가 매개하는 외인적 경로와 mitochondria를 매개하는 내인적 경로, 두 가지로 구분된다³⁾.

외인적 경로는 죽음 수용체에 TNF, FAS 같은 리간드가 결합하여 일련의 과정을 통해 Cysteine-dependent aspartate directed protease (Caspase)-3를 활성화하여 apoptosis를 유도 한다⁴⁾. Mitochondria를 매개하는 내인적 경로는 Bcl-2 family protein이 관여하며⁵⁾, Bcl-2, Bcl-xL과 같은 anti-apoptotic protein과 Bax, Bad와 같은 pro-apoptotic protein의 균형을 조절하여 cytochrome c의 방출을 유도 한다⁶⁾.

이러한 외인적 경로와 내인적 경로는 공통경로인 Caspase-3 또는 Caspase-9를 활성화시켜 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)의 절단을 유도하여 apoptosis를 야기한다⁷⁾.

세포증식과 균형을 이루는 정상적인 생리과정으로서의 apoptosis는 정상적인 태아의 발달과 노화, 면역기능과 조혈계의 유지에 중요한 역할을 한다⁸⁾. 반면 부적절한 시기에 apoptosis가 진행되거나 필요한 시기에 apoptosis가 억제되는 등 조절되지 않은 apoptosis는 암이나 신경퇴행성 질환 (neurodegenerative

disorders), 자가 면역 질환 (autoimmune diseases)을 포함한 다양한 병리적 상황들과 관련되어 있다⁹⁾.

梔子は 꼭두서니과 (茜草科 : Rubiaceae)에 속한 상록관목인 치자나무 *Gardenia jasmonides* Ellis 또는 동속식물의 성숙한 과실이다. 淸熱瀉火藥으로 분류되는 梔子は 약성이 苦寒하며, 心, 肝, 肺, 胃, 三焦에 귀경한다. 瀉火除煩, 淸熱利尿, 涼血解毒하는 효능이 있어 熱病心煩, 黃疸尿赤, 血淋澀痛, 血熱吐衄, 目赤腫痛, 火毒瘡瘍 등을 치료하며 捻挫 및 打撲傷에 외치제로도 쓰인다¹⁰⁾.

약리학적으로 梔子は 산화적 스트레스에 대한 보호 기능인 항산화¹¹⁾ 외에 JNK와 NF- κ B의 발현량을 억제함으로써 항염증¹²⁾, 바이러스의 복제 및 RNA 양을 감소시킴으로써 항균¹³⁾ 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 효능이 손상된 신경세포에 대해 梔子の 보호활성 작용에 의한 것이라 생각되어 梔子が 4-Hydroxynonenal(4-HNE)에 의한 PC-12 cell의 apoptosis에 미치는 효과를 연구하였다.

이에 저자는 먼저 梔子 물 추출물의 세포독성을 검사하기 위해서 세포 생존율 측정을 위한 MTT assay를 하였다. 그리고 세포보호 효과를 관찰하고자 4-HNE (4-Hydroxynonenal)에 의해 손상된 PC-12 cell의 세포 생존율을 측정하였다. 또한 apoptosis에 관여하는 대표적인 인자인 Bax, Bcl-2 및 caspase-3 그리고 염증에 관여하는 TNF- α , 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot을 분석한 결과 유의성 있는 결과를 도출하여 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

본 실험에 사용한 PC-12(rat adrenal pheochromocytoma

*Corresponding author : Tae Hee Lee. Department of Formulae Pharmacology, College of Korean Medicine, Gachon University, 1342, Seongnam-daero, Sujeong-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 13120, Republic of Korea.

Tel: +82-31-750-5418, Fax: +82-31-750-5416, E-mail: ophm5418@gachon.ac.kr

*Corresponding author : Youn-Sub Kim. Department of Anatomy-Pointology, College of Korean Medicine, Gachon University, 1342, Seongnam-daero, Sujeong-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 13120, Republic of Korea.

Tel: +82-31-750-5420, Fax: +82-31-750-5416, E-mail: ysk5708@hanmail.net

• Received : July 3, 2018 / Revised : July 14, 2018 / Accepted : July 23, 2018

cell) 세포는 신경세포의 특성을 나타내는 세포로 한국 세포주 은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포의 배양을 위해 10 % horse serum과 5 % fetal bovine serum, 1 % penicillin/streptomycin, 2 % NaHCO_3 가 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하였으며 37 °C의 온도와 5 % CO_2 가 포함된 공기가 공급되는 CO_2 incubator에서 세포를 배양하였다.

2. 기기 및 시약

1) 기기

본 실험을 위해 사용된 기기는 Clean Bench (Nuair, Plymouth, MN, USA), CO_2 Incubator (Nuair), Microplate Reader (Dynerx, Chantilly, VA, USA), Spectrophotometer (Implen, München, Germany), Water Purification (High-Q, London, USA), Freezing dryer (Eyela, Tokyo, Japan), Auto clave (Samwoo, Gimpo, Korea), Balance (Mettler, Greifensee, Switzerland), Centrifuge (Hanil, Suwon, Korea), Sonicator (Sonics, Newtown, CT, USA), Automatic X-ray Filmprocessor (JPI, Seoul, Korea) 등이다.

2) 시약

본 실험에 사용된 시약은 RPMI Medium 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Fetal Bovine Serum (Gibco), Horse Serum (Gibco), 4-Hydroxy Nonenal (Cayman, Ann Arbor, Michigan, USA), MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Sodium Bicarbonate (Sigma-Aldrich), Trizma Base (Sigma-Aldrich), Sodium Chloride (Sigma-Aldrich), Dimethyl Sulfoxide (Amresco, Solon, OH, USA) 등을 구입하여 사용하였다.

3. 한약물의 제조

본 실험에 사용한 梔子 (*Gardeniae Fructus*, GF)는 (주)옵니허브에서 구입하였다. 梔子 50 g에 물 500 ml를 가하여 환류추출기에서 2시간 동안 전탕하고, 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조 하였다. 梔子是 15.5 g의 추출물을 얻을 수 있을 31 %였다.

4. 세포 생존율 측정

1) PC-12 cell에서 梔子の 세포 생존율 측정

세포 생존율을 측정하기 위해 MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay를 사용하였다. 이 방법은 세포의 mitochondria 내 효소인 succinate-dehydrogenase에 의해 MTT가 formazan으로 변하여 세포의 성장이 멈추거나 세포가 죽으면 formazan의 생성이 줄어들게 되는 것을 이용한 것이다. 梔子の PC-12 cell 생존율을 측정하기 위해 96-well plate에 각 well당 4×10^4 개/ml를 성장 배지에 세포를 분주하고 24시간 후에 serum-free RPMI 1640 배지로 교환해 주고 梔子を 처리하지 않은 정상군 (Normal)과 梔子を 각각 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 처리한 실험군으로 나누었다. MTT reagent (stock 농도 5 mg/ml)를 96-well에 15 μl 씩 넣어 37 °C incubator에서 2시간 동안 배양하였다. 그 후 media를 제거하고 Dimethyl Sulfoxide 100 μl 를 넣은 후 70 °C incubator에서 10분간 녹여서 ELISA reader를 이용하여 흡광도 570 nm에서 세포의 생존율을 측정하였다.

2) 4-HNE로 자극된 PC-12 cell에서 梔子の 세포 생존율 측정

4-HNE로 자극된 梔子の PC-12 세포 생존율을 측정하기 위해 96-well plate에 각 well당 4×10^4 개/ml를 성장 배지에 세포를 분주하고 24 시간 후에 serum-free RPMI 1640 배지로 교환해 주었다. 그룹은 5개 군으로, 정상군 (Normal)과 4-HNE 35 μmol 을 처리한 대조군 (Control), 梔子を 각각 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 24시간 처리 후 4-HNE를 35 μmol 의 농도로 24시간 동안 처리한 3개의 실험군으로 나누어 실험을 진행하였다. 4-HNE로 자극된 PC-12 cell에서 梔子の 세포 생존율 측정을 위해서 MTT Assay를 이용하였다.

5. Western blot 분석

PC-12 세포를 각각의 100mm dish에 5×10^6 개/ml를 분주하고 4-HNE 35 μmol 과 GP를 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 24시간 후 세포를 차가운 PBS (pH 7.4)로 2번 씻어낸 후 세포를 긁어모아 1000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 그리고 세포분해용액 (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)을 넣은 후 초음파 분쇄기로 세포를 균질화

하고 다시 원심분리기를 이용하여 20분 동안 12,000 rpm으로 원심 분리 하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad의 protein assay dye reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 흡광도로 측정하였다. 정량한 단백질을 Mini-PROTEAN® TGX™ Gel (Bio-Rad)에 loading하여 분리한 다음 nitrocellulose membrane (Bio-Rad)으로 이동시켰다. 1차 항체로 mouse actin antibody (1:15,000; Merck Millipore, Billerica, MA, USA)와 rabbit Bax antibody (1:1000; CST, Danvers, MA, USA), rabbit Bcl-2 antibody (1:1000; CST), rabbit Caspase-3 antibody (1:2000; CST), rabbit TNF- α antibody (1:1000; CST)를 사용하였다. 2차 항체로는 Bax, Bcl-2, Caspase-3, TNF- α 용 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody(CST)를 사용하였다. Nitrocellulose membrane으로 단백질 이동을 제외하고 모든 실험은 실온에서 시행하였다. Nitrocellulose membrane으로 단백질 이동은 4 °C 냉장고 안에서 실시하였다. 단백질 밴드 검출은 ECL detection Reagent (Bio-Rad)를 사용하여 발색시켰다.

각 단백질의 발현을 비교하기 위해서 발색된 band의 밀도는 Gel Documentation (Bio-Rad)의 Quantity One Analysis Software 로 측정하였다.

6. 통계처리

통계분석은 4-HNE와 4-HNE+梔子 투여 group간의 유의성검증으로 Graphpad Prism Version 3 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)으로 Student's *t*-test를 사용하였으며, 실험 결과는 평균 \pm 평균의 표준오차 [means \pm standard error of the mean(SEM)]로 나타내었다. 통계적 유의성 검증은 $P < 0.05$ 로 하였다.

III. 결과

1. 梔子が 세포 생존율에 미치는 영향

梔子が PC-12 cell에 독성이 있는가를 관찰하기 위해, 세포에 梔子 물추출물을 처리하고 세포 생존율을 측정하였다. 정상군 (Normal)의 세포 생존율을 100 %로 하였다.

梔子 물 추출물 25 μ g/ml 처리군 (GF25)에서 세포 생존율은 121.50 \pm 6.44 %이고, 梔子 물 추출물 50 μ g/ml

처리군 (GF50)의 세포 생존율은 122.60 \pm 5.88 %였다. 梔子 물 추출물 100 μ g/ml 처리군 (GF100)의 세포 생존율은 123.70 \pm 9.57 %이며, 梔子 물 추출물 200 μ g/ml 처리군 (GF200)의 세포 생존율은 129.30 \pm 7.69 %, 梔子 물 추출물 400 μ g/ml 처리군 (GF400)의 세포 생존율은 122.30 \pm 5.48 %로 세포 독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1).

2. 4-HNE 손상에 대한 梔子の 세포보호 효과

梔子 물 추출물이 4-HNE로 손상된 PC-12 cell에 미치는 효과를 관찰하고자 세포에 梔子 물 추출물을 처리 후 세포 생존율을 측정하였다. 정상군의 세포 생존율을 100 %로 했을 때 35 μ mol 4-HNE 처리한 대조군의 세포 생존율은 63.80 \pm 3.27 %였다. 35 μ mol 4-HNE와 梔子 물 추출물 25 μ g/ml 처리군 (GF25)의 세포 생존율은 71.12 \pm 1.97 %, 35 μ mol 4-HNE와 梔子 물 추출물 50 μ g/ml 처리군 (GF50)의 세포 생존율은 68.04 \pm 1.75 %, 35 μ mol 4-HNE와 梔子 물 추출물 100 μ g/ml 처리군 (GF100)의 세포 생존율은 67.80 \pm 3.18 %, 35 μ mol 4-HNE와 梔子 물 추출물 200 μ g/ml 처리군 (GF200)의 세포 생존율은 73.40 \pm 1.79 %으로, 모두 대조군에 비해 높은 생존율을 보였으나, GF200 처리군에서만 유의성을 보였다 (Fig. 2).

3. 梔子が Bax 단백질 발현에 미치는 영향

梔子 물 추출물이 내인적 경로인 mitochondrial pathway에서 apoptosis를 촉진하는 인자(pro-apoptotic protein)인 Bax에 미치는 효과를 관찰하고자 세포에 梔子 물 추출물을 처리하고 35 μ mol 4-HNE를 주입한 다음 세포의 Bax 단백질 발현량을 측정하였다. 정상군의 Bax 단백질 발현량을 100 %로 하였으며, 35 μ mol 4-HNE만 투여한 대조군의 Bax 단백질 발현량은 255.30 \pm 32.79 %였다.

梔子 물추출물 50 μ g/ml과 35 μ mol 4-HNE를 주입한 처리군 (GF50)에서 Bax 단백질 발현량은 74.75 \pm 10.47 %, 梔子 물 추출물 100 μ g/ml과 35 μ mol 4-HNE를 주입한 처리군 (GF100)에서 Bax 단백질 발현량은 90.00 \pm 23.24 %, 梔子 물추출물 200 μ g/ml과 35 μ mol 4-HNE를 주입한 처리군 (GF200)에서 Bax 단백질 발현량은 85.75 \pm 35.47 %로 대조군에 비해 유의성 있게 감소한 것으로 나타났다 (Fig. 3).

4. 梔子が Bcl-2 단백질 발현에 미치는 영향

梔子 물 추출물이 내인적 경로인 mitochondrial pathway에서 apoptosis를 억제하는 인자(anti-apoptotic protein)인 Bcl-2에 미치는 영향을 관찰하고자 세포에 梔子 물 추출물을 처리하고 35 μmol 4-HNE를 주입한 다음 세포의 Bcl-2 단백질 발현량을 측정하였다. 정상군의 Bcl-2 단백질 발현량을 100 %로 하였으며, 35 μmol 4-HNE만 투여한 대조군의 Bcl-2 단백질 발현량은 52.50 \pm 8.18 %이었다.

梔子 물 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 35 μmol 4-HNE를 주입한 처리군 (GF50)에서 Bcl-2 단백질 발현량은 76.25 \pm 6.42 %, 梔子 물 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 35 μmol 4-HNE를 주입한 처리군 (GF100)에서 Bcl-2 단백질 발현량은 74.25 \pm 9.29 %, 梔子 물 추출물 200 $\mu\text{g/ml}$ 과 35 μmol 4-HNE를 주입한 처리군 (GF200)에서 Bcl-2 단백질 발현량은 88.00 \pm 4.16 %로 대조군에 비해 증가하였으나 GF200 처리군에서만 유의성을 보였다 (Fig. 4).

5. 梔子が Caspase-3 단백질 발현에 미치는 영향

梔子 물 추출물이 외인적 경로인 death receptor pathway에서 apoptosis를 촉진하는 인자 (pro-apoptotic protein)인 Caspase-3에 미치는 효과를 관찰하고자 세포에 梔子 물 추출물을 처리하고 4-HNE를 주입한 다음 세포의 Caspase-3 단백질 발현량을 측정하였다. 정상군의 Caspase-3 단백질 발현량을 100 %로 하였으며, 35 μmol 4-HNE만 투여한 대조군의 Caspase-3 단백질 발현량은 120.80 \pm 2.75 %였다.

梔子 물 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 35 μmol 4-HNE를 주입한 처리군 (GF50)에서 Caspase-3 단백질 발현량은 82.50 \pm 19.47 %, 梔子 물 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 35 μmol 4-HNE를 주입한 처리군 (GF100)에서 Caspase-3 단백질 발현량은 90.25 \pm 6.84 %, 梔子 물 200 $\mu\text{g/ml}$ 과 35 μmol 4-HNE를 주입한 처리군 (GF200)에서 Caspase-3 단백질 발현량은 83.25 \pm 9.76 %로 대조군에 비해 감소했으며, 이 중 GF100과 GF200에서 유의성을 보였다 (Fig. 5).

6. 梔子が TNF- α 단백질 발현에 미치는 영향

梔子 물 추출물이 외인적 경로인 death receptor pathway에서 apoptosis를 촉진하는 인자 (pro-apoptotic protein)인 TNF- α 에 미치는 효과를 관찰하고자 세

포에 梔子 물 추출물을 처리하고 35 μmol 4-HNE를 주입한 다음 세포의 TNF- α 단백질 발현량을 측정하였다. 정상군의 TNF- α 단백질 발현량을 100 %로 하였으며, 35 μmol 4-HNE만 투여한 대조군의 TNF- α 단백질 발현량은 2072.00 \pm 406.70 %였다.

梔子 물 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 35 μmol 4-HNE를 주입한 처리군 (GF50)에서 TNF- α 단백질 발현량은 884.00 \pm 192.80 %, 梔子 물 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 35 μmol 4-HNE를 주입한 처리군 (GF100)에서 TNF- α 단백질 발현량은 946.30 \pm 335.80 %, 梔子 물 추출물 200 $\mu\text{g/ml}$ 과 35 μmol 4-HNE를 주입한 처리군 (GF200)에서 TNF- α 단백질 발현량은 1302.00 \pm 449.80 %로 모두 대조군에 비해 감소했으며, 이 중 GF50 처리군에서 유의성을 보였다 (Fig. 6).

IV. 고찰

꼭두서니과에 속하는 치자나무의 열매인 梔子是 瀉火除煩, 清熱利尿, 涼血解毒하는 효능이 있어 熱病心煩, 黃疸尿赤, 血淋澀痛, 血熱吐衄, 目赤腫痛, 火毒瘡瘍 등을 치료하며, 黃疸, 淋疾, 吐血, 結膜炎, 糖尿 등에 약제로 이용되고 있다^{14,15}. 중국에서는 간질환이나 염증질환에 전통적으로 쓰여져 왔으며¹⁶, 민간에서는 捻挫 및 打撲傷에 외치제로도 다용된다.

梔子の 주성분으로는 carotinoide계 성분인 crocin, crocetin, iridoid 화합물인 genipin, geniposide, geniposidic acid, flavonoid계 배당체인 gardenin, rutin, caffeic acid 유도체인 chlorogenic acid, ursolic acid, vanillic acid 등이 있다¹⁷. 이 중 crocetin은 염증매개인자인 TNF- α , IL-1 β , I-NOS 등을 매개로 하여 mRNA 발현을 억제함으로써 염증을 억제하고¹⁸, crocin은 항산화 작용을 하는 것으로 연구되었다¹⁹. Geniposide는 장내 미생물에 의해 genipin으로 전환되어 항염증, 항암 효과를 나타내며²⁰, 신경 영양성 인자인 NGF에 대한 유사활성과 신경세포에 대한 보호활성을 나타내는 것으로 보고된 바 있다²¹.

이러한 梔子の 항염, 항산화, 항암 효과가 손상된 세포에 대한 보호활성에 의한 것이라 생각되어, 梔子 물 추출물이 신경세포손상에 의한 apoptosis에 어떤 영향을 미치는가를 연구하기 위해 MTT assay 방법

으로 PC-12 cell에 대한 세포독성 검사와 산화적 스트레스를 일으키는 4-HNE에 대한 세포보호 효과를 관찰하였다. 또한 apoptosis에 관여하는 Bax, Bcl-2, Caspase-3, TNF- α 단백질 발현을 관찰하기 위해 western blot을 실시하였다.

梔子が PC-12 cell에 독성이 있는가를 관찰하기 위해 세포에 梔子 물 추출물을 처리하고 세포의 생존율을 측정한 결과, 실험한 모든 농도에서 세포독성을 보이지 않았다.

4-HNE는 산화적 스트레스로 유도된 cell-death의 주요한 매개인자로 알려져 있다²². 건강한 cell이 4-HNE의 자극을 받으면 cell 내에 caspase enzyme 이나 genomic DNA의 laddering, 또는 mitochondria에서 방출된 cytochrome c에 의해 유도된 독성기전이 촉발되면서 결국 apoptosis나 necrosis에 의한 사멸 과정을 밟는데, 이는 병리학적으로 알츠하이머, 백내장, 죽상동맥경화증, 암 같은 신경퇴행성 질병과 연관이 있다^{22,24}.

梔子 물 추출물이 4-HNE로 자극된 PC-12 cell에서 세포생존율에 어떤 효과를 보이는지 관찰한 결과, 梔子 물 추출물 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군보다 유의성 있는 생존율을 나타냈다. 이는 梔子 물 추출물이 4-HNE에 의한 독성기전으로부터 세포를 보호효과를 가지는 것으로 볼 수 있다.

Apoptosis는 많은 유전자들이 세포의 증식과 사멸을 조절하는 복잡한 분자기전을 가지고 있다. 산화적 스트레스나 세포 내 Ca^{2+} 의 증가에 의해 mitochondria의 내외막 사이에 존재하는 cytochrome c가 세포질로 분비되면 dATP apoptotic protease 활성화 인자와 결합하여 apoptosome을 형성한다. 이때 분비되는 cytochrome c는 apoptosis에 관여하는 여러 단백질 인자의 균형에 의해 조절된다. Apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic 인자로는 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w 등이 있으며, 반대로 apoptosis를 촉진하는 pro-apoptotic 인자로는 Bax, Bid, Bad, Bim, Bak 등이 존재하는 것으로 알려져 있다²⁵.

이 중 apoptosis에 직접적으로 관여하는 인자로 알려져 있는 Bax는 정상세포에서는 세포질이나 mitochondria 외막에 안정된 상태로 존재하지만, 스트레스와 같은 자극에 민감하게 반응하여 mitochondria 내로 이동하면 cytochrome c의 방출을 유도하는 것으로 보고되고 있다²⁶. 이와 반대로 Bcl-2는 Bax와 heterodimer를

형성하고 있어 상호 기능을 억제하는데, mitochondria에서 세포질로 cytochrome c가 방출되는 것을 억제하여 apoptosis를 지연시킨다. 이 Bax와 Bcl-2는 연속적으로 일어나는 apoptosis에서 Bax와 Bcl-2 단백질의 비율을 조절하여 cytochrome c의 분비가 결정하는 중요한 역할을 수행 한다^{27,28}.

梔子 물 추출물이 내인적 경로인 mitochondrial pathway에서 apoptosis를 촉진하는 pro-apoptotic protein인 Bax에 미치는 효과를 관찰한 결과, 梔子 물 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 Bax 단백질 발현량이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 이는 梔子 물 추출물이 Bax 단백질 발현량을 감소시킴으로써 세포의 apoptosis를 억제하는 효과를 보임을 시사한다.

梔子 물 추출물이 내인적 경로인 mitochondrial pathway에서 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic protein인 Bcl-2에 미치는 효과를 관찰한 결과, 梔子 물 추출물이 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 Bcl-2 단백질 발현량이 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다. 이는 梔子 물 추출물이 Bcl-2 단백질 발현량을 증가시킴으로써 세포의 apoptosis를 억제하는 효과를 보임을 시사한다.

Caspase-3는 apoptosis에서 활성화되는 단백질 분해효소로, 세포의 핵과 mitochondria의 외막에 proenzyme으로 존재하다가 활성화되면 PARP 절단을 유도하여 DNA 복구를 저해함으로써 세포의 기능을 상실 시킨다^{29,30}.

梔子 물 추출물이 외인적 경로인 death receptor pathway에서 apoptosis를 촉진하는 인자인 Caspase-3에 미치는 효과를 관찰한 결과, 梔子 물 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 Caspase-3 단백질 발현량은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

TNF- α 는 세균의 세포막에 있는 lipopolysaccharide에 의해 활성화된 백혈구에서 만들어지는 cytokine의 일종이다. TNF- α 는 염증반응에서 백혈구들이 혈관 내피세포에 부착하는 것을 촉진하고, mononuclear phagocyte가 염증반응에 필요한 cytokine을 생성하도록 활성화시킴으로써 염증반응을 촉진 한다³¹.

梔子 물 추출물이 TNF- α 에 미치는 효과를 관찰한 결과, 梔子 물 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 TNF- α 단백질 발현량이 유의성 있게 감소하였다.

이상의 결과로, 梔子 물 추출물은 apoptosis를 촉



진하는 Bax와 Caspase-3 단백질 발현량의 증가를 억제하고, apoptosis를 억제하는 Bcl-2 단백질 발현량을 증가시키며, 염증을 촉진시키는 TNF- α 단백질 발현량의 증가를 억제시켜 손상된 신경세포를 보호하는 작용을 하는 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구에서는 梔子が 신경세포인 PC-12 cell의 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하였다. 梔子の 세포 독성에 대한 검사를 하고 산화적 스트레스를 일으키는 4-HNE에 대한 세포보호 효과를 관찰하기 위해 MTT assay를 실시하였다. 또한 apoptosis에 관여하는 Bax, Bcl-2 및 Caspase-3 그리고 염증에 관여하는 TNF- α 단백질 발현을 관찰하기 위해 western blot을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 梔子 물 추출물 처리군 모두 PC-12 cell에 대한 세포 독성이 없었다.
2. 梔子 물 추출물 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 4-HNE만 투여한 대조군보다 유의성 있는 생존율을 나타냈다.
3. 梔子 물 추출물을 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 Bax 단백질 발현량이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.
4. 梔子 물 추출물 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 Bcl-2 단백질 발현량은 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다.
5. 梔子 물 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 Caspase-3 단백질 발현량은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.
6. 梔子 물 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 TNF- α 단백질 발현량이 유의성 있게 감소하였다.

이상의 결과들로 보아 梔子が 손상된 세포의 apoptosis를 억제하는 세포보호 효능이 있는 것으로 생각된다.

References

1. Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem*. 2001;2:20-9.
2. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267:

- 1456-62.
3. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25(34):4798-811.
4. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, No J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. A novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease is recruited to the CD95 (FAS/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. 1996; 85:817-27.
5. Martinou JC, Green DR. Membrane perturbations induced by the apoptotic Bax protein. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:63-7.
6. Spampanato C, De Maria S, Sarnataro M, Giordano E, Zanfardino M, Baiano S, Cartenii M, Morelli F. Simvastatin inhibits cancer cell growth by inducing apoptosis correlated to activation of Bax and down-regulation of BCL-2 gene expression. *Int J Oncol*. 2011;1273-80.
7. Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Int J Oncol*. 2003;22:15-20.
8. Lawen A. Apoptosis—an introduction. *Bioessays*. 2003;25:888-96.
9. Thompson C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267: 1456 - 62.
10. Kim IR, Kim HC, Kook YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Song HJ, Shin MK, Lee YJ, Lee YC, Lee JH, Lim KH, Cho SI, Jeong JG, Joo YS, Choi HY. *Herbalism*. Seoul : Younglimsa. 2008:207-9.
11. Yang C, Hao Z, Xi T, Can Z, Le C, Ying L, Lin J, Hong XY, Chu C. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *crocus sativus* L. A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. *Food Chem*.

- 2008;109:484-92.
12. Yang JH, Lee NH. Effects of Gardeniae Fructus on the metabolic process of antioxidant and anti-inflammation by JNK and NF- κ B. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 2016;29(2):56-64
 13. Lin YJ, Lai CC, Lai CH, Sue SC, Lin CW, Hung CH, Lin TH, Hsu WY, Huang SM, Hung YL, Tien N, Liu X, Chen CL, Tsai FJ. Inhibition of enterovirus 71 infections and viral IRES activity by Fructus gardeniae and geniposide. *Eur J Med Chem.* 2013 ; 62 : 206-13.
 14. The Korean Society of Pharmacognosy. *Natural Product Science.* Seoul : Hakchangsa. 2000:244.
 15. Kim TJ. *Korean wild grass using for drug,* Seoul : Kugil Media. 1999 : 777-8.
 16. Huh Joon. *Donguibogam.* Seoul : Namsandang. 1977:1222.
 17. Bergonzi MC, Righeschi C, Isacchi B, Bilia AR. Identification and quantification of constituents of *Gardenia jasminoides* Ellis(Zhizi) by HPLC-DAD-ESI-MS. *Food Chemistry.* 2012;134(2):1199-204.
 18. Yang RO, Tan XI, Thomas AM, Shen JI. Crocetin inhibits mRNA expression for Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 β and Inducible Nitric Oxide Synthase in hemorrhagic shock. *Journal of parenteral and enteral nutrition.* 2006;30:297 - 301.
 19. Chen Y, Zhang H, Tian X, Zhao C, Cai L, Liu Y, Jia L, Yin HX, Chen C. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L.:A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. *Food Chemistry.* 2008;109(3):484-92.
 20. Yu Y, Feng XL, Gao H, Xie ZL, Dai Y, Huang XJ, Kurihara H, Ye WC, Zhong Y, Yao XS. Chemical constituents from the fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Fitoterapia.* 2012;83(3):563-7.
 21. Yamazaki M, Chiba K, Mohri T. Neuritogenic effect of natural iridoid compounds on PC-12 cells and its possible relation to signaling protein kinase. *Biol Pharm Bull.* 1996;19:791-5.
 22. Poli G, Schaur RJ. 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life.* 2003;50:315-21.
 23. Fukuda M, Kanou F, Shimada N, Sawabe M, Saito Y, Muryama S, Hashimoto M, Maruyama N, Ishigami A. Elevated levels of 4-hydroxynonenal-histidine Michael adduct in the hippocampi of patients with Alzheimer's disease. *Biomed Res.* 2009;30:227-33.
 24. Soh Y, Heong KS, Lee LJ, Bae MA, Kim YC, Song BJ. Selective activation of the c-Jun N-terminal protein kinase pathway during 4-hydroxynonenal-induced apoptosis of PC-12 cells. *Mol Pharmacol.* 2000;58:535-41.
 25. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006;25(34):4798- 811.
 26. Suzanne Cory, Jerry M Adams. The Bcl-2 Family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer.* 2002; 2:647-56.
 27. Gruter MG. Caspases : Key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology.* 2000;10:649-55.
 28. Maria Lim, May-Ghee Lum, Tania Hansen, Xavier Roucou, Phillip Nagley. On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *Journal of Biomedical Science.* 2002;9:488-506.
 29. Oh SH, Lim SC. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;212(3):212-23.
 30. Vegran F, Boidot R, Oudin C, Riedinger JM, Lizard-Nacol S. Implication of alternative

splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance. *Bull Cancer*. 2005;92(3): 219-26.

31. Hong Ye, Celine Cande, Nicolas Stephanou, Sulin Jiang, Sundeep Gurbuxani, Nathanael Larochette, Eric Daugas, Carmen Garrido,

Guido Kroemer, Hao Wu. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nature Structural Biology*. 2002;9:680-4.

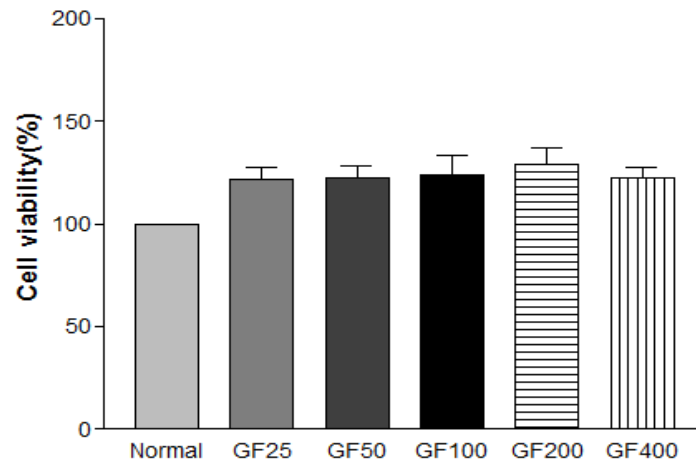


Fig. 1. Effect of *Gardeniae Fructus* (GF) on the cell viability. Normal ; only media-treated group. GF25 ; 25 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF50 ; 50 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF100 ; 100 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF200 ; 200 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF400 ; 400 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. Data are represented by mean \pm SEM (n=4 in each group).

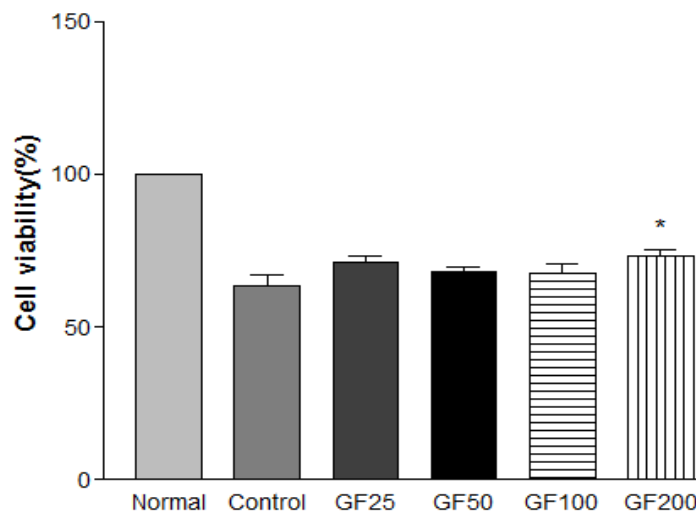


Fig. 2. Effect of *Gardeniae Fructus* on the cell viability with 4-HNE. Normal ; only media-treated group. Control ; 35 μmol 4-HNE-treated group. GF25 ; 35 μmol 4-HNE and 25 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF50 ; 35 μmol 4-HNE and 50 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF100 ; 35 μmol 4-HNE and 100 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF200 ; 35 μmol 4-HNE and 200 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. Data are represented by mean \pm SEM (n=4 in each group). Statistical significance is based on comparison to the Control group (*, p<0.05).

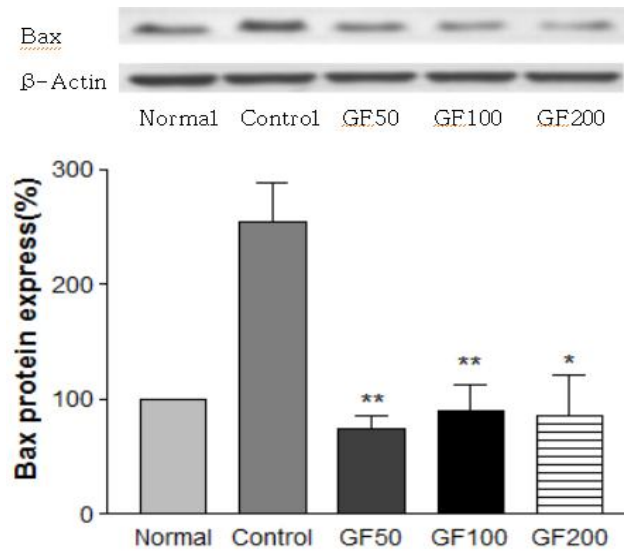


Fig. 3. Effect of *Gardeniae Fructus* on Bax expression. Normal ; only media-treated group. Control ; 35 μmol 4-HNE-treated group. GF50 ; 35 μmol 4-HNE and 50 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF100 ; 35 μmol 4-HNE and 100 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF200 ; 35 μmol 4-HNE and 200 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. Data are represented by mean \pm SEM (n=4 in each group). Statistical significance is based on comparison to the Control group (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$).

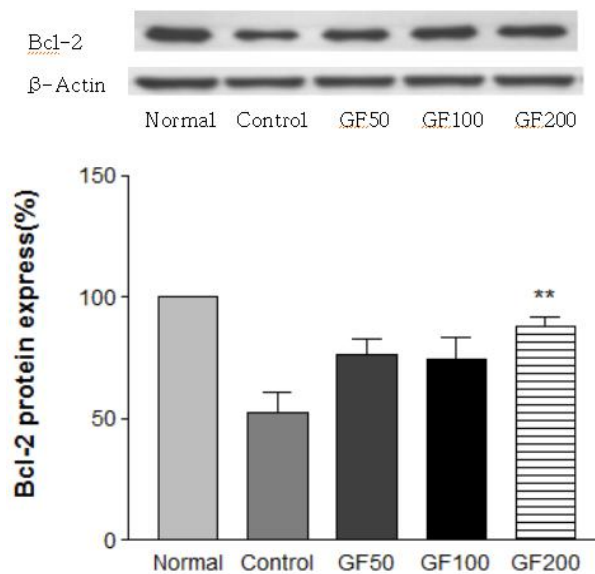


Fig. 4. Effect of *Gardeniae Fructus* on Bcl-2 expression. Normal ; only media-treated group. Control ; 35 μmol 4-HNE-treated group. GF50 ; 35 μmol 4-HNE and 50 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF100 ; 35 μmol 4-HNE and 100 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF200 ; 35 μmol 4-HNE and 200 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. Data are represented by mean \pm SEM (n=4 in each group). Statistical significance is based on comparison to the Control group (**, $p<0.01$).

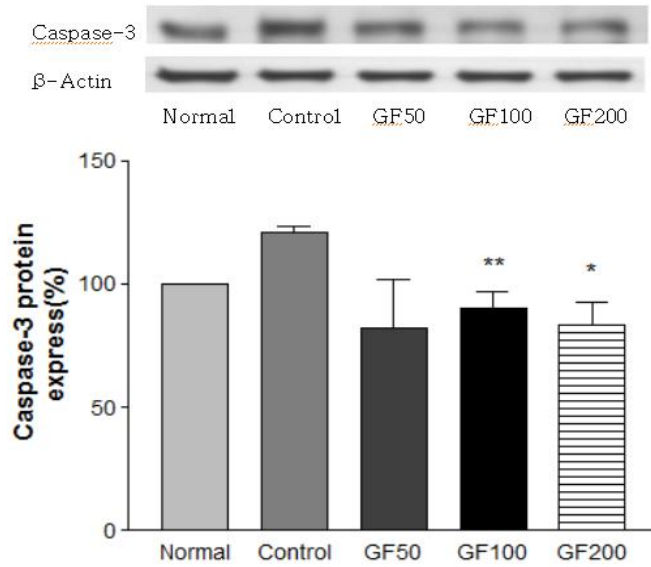


Fig. 5. Effect of *Gardeniae Fructus* on Caspase-3 expression. Normal ; only media-treated group. Control ; 35 μmol 4-HNE-treated group. GF50 ; 35 μmol 4-HNE and 50 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF100 ; 35 μmol 4-HNE and 100 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF200 ; 35 μmol 4-HNE and 200 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. Data are represented by mean \pm SEM (n=4 in each group). Statistical significance is based on comparison to the Control group (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

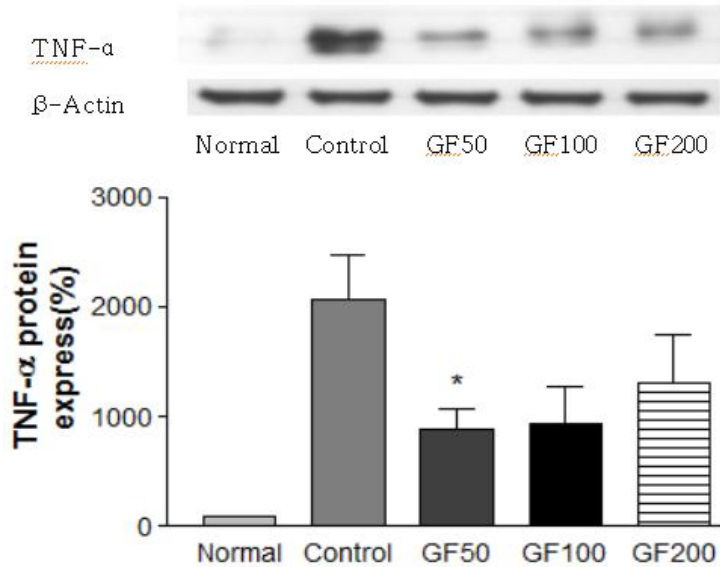


Fig. 6. Effect of *Gardeniae Fructus* on TNF- α expression. Normal ; only media-treated group. Control ; 35 μmol 4-HNE-treated group. GF50 ; 35 μmol 4-HNE and 50 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF100 ; 35 μmol 4-HNE and 100 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. GF200 ; 35 μmol 4-HNE and 200 $\mu\text{g/ml}$ GF-treated group. Data are represented by mean \pm SEM (n=4 in each group). Statistical significance is based on comparison to the Control group (*, $p < 0.05$).