

## 오미자에 의한 천왕보심단의 HT22 신경세포의 세포자멸사 증가

노경옥 대학원생, 노가은 학부생, 이기현 교수\*

동신대학교 한의과대학 한의예과

### Increased apoptosis of HT22 nerve cells of Cheonwangbosim-dan by Schisandra fruit

Kyoung OK No, Gaeun Noh, Gihyun Lee\*

College of Korean Medicine, Dongshin University

#### Abstract

We studied the effect of Cheonwangbosim-dan (CWBSD) on oxidative stress-induced apoptosis in HT22 cells. We examined the effect of CWBSD on oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutamate, or RSL3 in HT22 cells. In addition, 14 herbal medicines constituting CWBSD were also performed. The antioxidant activities of CWBSD were assessed by measuring free radical scavenging activities on ABTS and DPPH. Flow cytometry and fluorescence microscopy confirmed the increase in intracellular reactive oxygen species (ROS). As a result, There was no toxicity in HT22 cells in CWBSD (25, 50, 100 μg/ml), and antioxidant activity was confirmed in DPPH and ABTS assays. In the environment given oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutamate, RSL3), treatment with CWBSD increased intracellular ROS of HT22 cells and increased LDH release, thereby reducing cell viability. Among the 14 herbal medicines of CWBSD, Schizandrae Fructus decreased the cell viability, and 13 herbal medicines except Schizandrae Fructus had no effect. Schizandrae Fructus is thought to be toxic to HT22 cells against oxidative stress.

**Keywords:** Cheonwangbosim-dan (CWBSD), Tian Wang Bu Xin Dan, apoptosis, HT22

#### Correspondence: 이기현(Gihyun Lee)

Daejeong 4 Building, dongshin University, Naju-si, Jeonnam-do, 58245, Rep. of Korea

Tel: +82-61-330-3511, E-mail: glee@dso.ac.kr

Received 2022-10-06, revised 2022-10-28, accepted 2022-10-30, available online 2022-10-31

doi:10.22674/KHMI-10-2-1



## 서론

현재 우리나라는 2021년 전년 대비 출생아 수는 4.3% 감소<sup>1)</sup>하였고 65세 이상 고령인구는 전체인구의 16.5%, 25년에는 20.3% 증가<sup>2)</sup>할 것으로 전망하는 등 급속한 고령화 사회로 진행 중이다. 고령화에 따른 퇴행성 뇌질환(알츠하이머 증후군, 파킨슨 증후군, 헌팅턴 증후군 등) 또한 증가하고 있으며, 이의 주요 원인인 산화적 스트레스(oxidative stress)에 대한 많은 연구 결과들이 보고되고 있다<sup>3-6)</sup>.

천왕보심단(天王補心丹, CWBSD)은 중국 원대(元代) 위역림(危亦林)이 저술한 《세의득효방(世醫得效方)》<sup>7)</sup>에 처음 수록되었으며, 신지불안(神志不安), 허번실면(虛煩失眠), 수족심열(手足心熱), 구설생창(口舌生瘡) 및 몽수건망(夢遺健忘) 등의 증상을 보이는 음허혈소(陰虛血少)를 치료하는 데 사용되었다<sup>8,9)</sup>. 현대 약리학적 연구에서의 천왕보심단은 *in vitro*와 *in vivo*에서 혈관 확장<sup>10)</sup>, 혈압 강하<sup>10)</sup>, 이뇨 작용<sup>11)</sup>, 항스트레스<sup>12)</sup>, 항산화<sup>13)</sup> 및 항우울<sup>14,15)</sup> 효과 등 다양한 실험적 생리활성 연구가 진행 및 보고되었다. 특히 천왕보심단의 항치매<sup>16-18)</sup>에 대한 여러 연구 결과가 보고되었다.

HT22 세포주는 생쥐의 해마에서 유래한 세포주로서, 글루타메이트 수용체가 없다. 따라서 글루타메이트를 처리하게 되면 신경흥분 독성이 아닌 산화적 스트레스로 인하여 세포가 손상을 받는다. 이러한 이유로 산화적 스트레스로 인한 퇴행성 뇌질환 연구의 메커니즘을 밝히기 위한 *in vitro* 모델로 널리 사용되어왔다<sup>19-20)</sup>.

본 연구진은 HT22 신경세포를 이용하여 천왕보심단의 항치매 치료제로서의 가능성을 확인하고자 연구를 진행하였다. 그 결과 천왕보심단은 독성이 없으나, HT22 신경세포에 산화적 스트레스가 일어난 환경조건에서의 천왕보심단 처리는 세포에 더 많은 손상을 준다는 유의한 연구 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 본론

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 시약

본 연구에 사용된 시약 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicilin streptomycin (PS)는 Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. 세포의 생존율 및 독성을 측정하기 위해 Quanti-MAX WST-8 cell viability assay kit와 Quantit-LDHTM cytotoxicity assay kit는 Biomax Co., Ltd. (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 항산화 측정을 위해 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), potassium persulfate은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. ROS 측정을 위해 ab113851 DCFDA/H2DCFDA-Cellular Ros Assay Kit를 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. L-Glutamic acid, quercetin, RSL3, ferrostain-1는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.



2) 약재

Table 1과 같이 14종의 한약재를 주성분으로 하여 제조된 천왕보심단은 한풍제약으로부터 제공 받았다. 천왕보심단을 구성하는 14종 각 약재의 열수 추출물은 한국한의약진흥원 한의약소재은행 으로부터 분양받았다. 모든 추출물은 시료 무게 대비 3배의 용매를 넣어 3시간씩 2회, 환류추출하여 여과 후 감압하여 동결건조하였다.

Table 1. Composition of CWBSD

Herbal medicine name	Amount (mg)
Rehmannia root	500.0
Coptis rhizome	250.0
Angelica root	125.0
Liriope tuber	125.0
Thuja seed	125.0
Zizyphus seed	125.0
Schisandra fruit	125.0
Asparagus tuber	125.0
Platycodon root	62.5
Salvia miltiorrhiza root	62.5
Poria	62.5
Polygala root	62.5
Ginseng	62.5
Scrophularia root	62.5
Total	1875.0

3) 세포 배양

쥐의 해마 유래 세포주인 HT22 cell은 동신대학교 한의학과 경혈학 실험실에서 분양받아 사용 하였다. 10% FBS, 1% PS를 포함하는 DMEM 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37℃의 조건에서 배양하였 다.

4) 실험방법

(1) 세포 생존율 및 세포 독성 측정

세포 생존율 측정을 위하여 WST assay를 이용하였다. 96-well plate에 배양한 세포주를 1×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 100μl씩 분주하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 동안 배양하였다.

각 well에 천왕보심단을 농도별(0, 25, 50, 100μg/ml)로 처리하였고 14종의 약재들은 천왕보심 단 대비 각 약재들의 백분율(%)로 계산하여 처리하였다. 오미자 추출물은 농도별(0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50μg/ml)로 처리하였다. 양성대조군으로 15μM의 quercetin과 0.5μM의 ferros- tain-1를 처리하였다. 1시간 후 0.1mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10mM의 glutamate 또는 0.2μM의 RSL3을 농도별로 각 well에 처리 후 24시간 동안 추가 배양하였다. 모든 well에 10ul/well의 WST-8을 처리, 약 1시간 재배양 후 ELISA reader (Molecular devices, Sunnyval, CA, USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 아래와 같이 대조군을 기준으로 각 실험군에 대한 세포



생존율을 백분율(%)로 나타내었으며, 같은 조건에서 3회 반복한 실험 결과값을 통계 처리하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

A: absorbance of positive/negative control or sample  
B: absorbance of control (without sample)

세포독성에 의해 손상된 세포에서 세포 밖으로 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase; LDH)가 방출되는 것으로 세포 독성 평가를 하는 대표적인 방법 중 하나이다<sup>21)</sup>. 따라서 본 실험에서도 세포 독성 평가를 위하여 Quantit-LDHTM cytotoxicity assay kit를 사용하여 LDH 분비량을 분석하였다. 세포 생존율을 측정하기 위한 동일 조건, 동일 plate에서 배지의 상등액 10 $\mu$ l를 취하여 kit의 프로토콜에 따라 분석하였다. ELISA reader를 이용 450nm에서 흡광도 변화를 측정하였으며, 실험값은 LDH 분비량의 백분율(%)로 표시하였으며, 같은 조건에서 3회 반복한 실험 결과값을 통계 처리하였다.

### (2) 항산화능 측정(DPPH/ABTS 라디칼 소거능 측정)

DPPH에 대한 수소 공여 효과를 측정하는 라디칼 소거능 측정<sup>22)</sup>을 위해 96 well plate에 시료와 0.15mM의 DPPH 용액을 혼합하여 실온에서 30분 반응시킨 후, 517nm에서 DPPH의 환원에 의한 흡광도를 측정하였다. 활성비교를 위하여 비타민 C를 사용하였다. 결과값은 추출물 처리군과 대조군을 비교하여 라디칼의 소거 활성을 백분율(%)로 나타내었으며 같은 조건에서 3회 반복한 실험 결과값을 통계 처리하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity} = (1 - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

ABTS 라디칼 소거능은 Arano et al.<sup>23)</sup>과 Re et al.<sup>24)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. 7mM의 ABTS 용액에 2.45mM의 potassium persulfate 용액을 혼합하여 암 조건에서 하루 동안 반응시킨 후 734nm에서 흡광도 값이 0.7 $\pm$ 0.02가 되도록 조절하여 사용하였다. 반응시킨 ABTS 용액을 시료와 혼합하여 암 조건에서 5분간 재반응시켜 734nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성비교를 위하여 비타민 C를 사용하였다. 결과값은 추출물 처리군과 대조군을 비교하여 라디칼의 소거활성을 백분율(%)로 나타내었으며 같은 조건에서 3회 반복한 실험 결과값을 통계 처리하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity} = (1 - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

### (3) 세포 내 ROS 측정

6-well plate에 배양한 세포주를 2.5  $\times$  10<sup>4</sup> cells/ml로 2ml seeding하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 세포 생존율 분석과 동일한 방법으로 각 well에 천왕보심단과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutamate 또는 RSL3를 처리하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 2시간 배양 후 Cellular ROS Assay Kit를 이용하여 실험 후 flow cytometry를 이용해 분석하였으며 같은 조건에서 3회 반복한 실험 결과값을 통계 처리하였다. 동일 조건으로 실험 후 5시간 배양 후 형광 현미경을 이용 각 처리군에



Cellular ROS Assay Kit를 이용 염색 이미지를 촬영하였다.

(4) 통계 처리

각 시료들과 대조군으로 부터 얻은 실험 결과들은 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 각 실험 결과로 부터 ANOVA를 구한 후  $p < 0.05$  유의수준에서 Duncan's multiple range test로 유의차를 검증 하였다.

2. 결과

1) 천왕보십단의 세포독성 및 항산화 효능

천왕보십단을 농도별(0, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ )로 처리하였을 때, 천왕보십단은 HT22 신경세포에 세포독성 및 세포 손상을 유발하지 않았다(Fig.1 A). 또한 천왕보십단의 항산화 효능을 평가하고자 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성을 측정하였다. 천왕보십단 25, 50, 100, 200, 400 또는 800 $\mu\text{g/ml}$ 농도처리시 DPPH 라디칼 소거활성은 각각 2.94, 6.52, 13.05, 20.27, 36.52 또는 69.05% 관찰되었으며, ABTS 라디칼 소거활성은 각각 4.01, 6.90, 12.60, 23.95, 43.66 또는 73.62%로 관찰되었다(Fig. 1 B, C). DPPH 라디칼에 대한 시료를 첨가하지 않는 대조군의 흡광도를 1/2로 감소시키는 데 필요한 시료의 양(RC<sub>50</sub>)은 384.40 $\mu\text{g/ml}$ 로 관찰되었고, 양성대조군의 비타민 C의 RC<sub>50</sub> 값은 8.44 $\mu\text{g/ml}$ 로 관찰되었다. ABTS 라디칼에 대한 RC<sub>50</sub> 값은 429.93 $\mu\text{g/ml}$ , 비타민 C는 RC<sub>50</sub> 값은 21.77 $\mu\text{g/ml}$ 로 관찰되었다. 이는 천왕보십단의 농도가 증가함에 따라 DPPH와 ABTS 라디칼 소거농도 증가하였으므로 천왕보십단의 항산화능을 확인하였다.

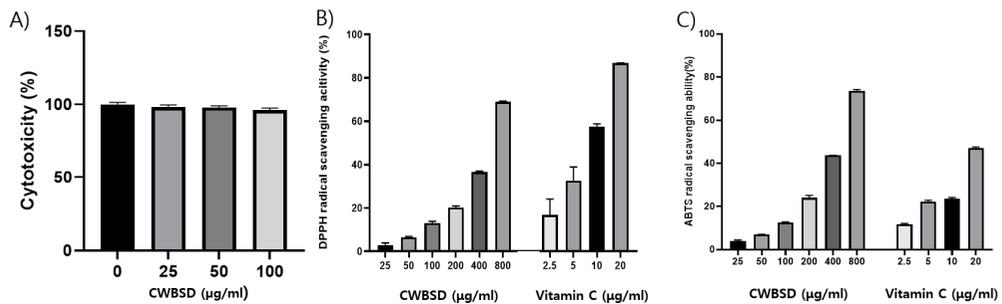


Fig. 1. The effects of CWBSD on cell viability in the HT22 cells. Cells were treated with various concentration of CWBSD for 24 hours (A). The cell viability was determined by an WST-8 assay. DPPH & ABTS radical scavenging assay for the anti-oxidant effect of CWBSD (B and C). The results are expressed as the mean±SD obtained from three independent experiments.

2) 산화스트레스에 의한 HT22 신경세포의 생존율에 미치는 천왕보십단의 영향

HT22 신경세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutamate 또는 RSL3로 산화적 스트레스를 유도하였을 때 천왕보십단이 HT22 신경세포의 생존율 및 독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 WST assay와 LDH assay 수행하였으며, 그 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 손상을 받은 HT22 신경세포의 생존율은 56.09%이며, 15 $\mu\text{M}$ 의 quercetin 처리군에서는 세포 생존율이 99.39%로 회복되었으나 천왕보십단을 농도별로 25,



50, 100 $\mu$ g/ml 처리하였을 때 생존율은 35.68%, 32.02%, 18.53%로 유의적으로 감소하였다(Fig. 2 A). Glutamate에 의해 손상 받은 HT22 신경세포는 89.21%였다. 15 $\mu$ M의 quercetin 처리군에서는 세포 생존율이 100%로 회복되었으나 천왕보심단을 농도별로 처리하였을 때 생존율은 78.65%, 70.17%, 63.09%로 유의적으로 감소하였다(Fig. 2 B). RSL3에 의해 손상받은 HT22 신경세포는 83.42%였고, 0.2 $\mu$ M의 ferrostain-1 처리군에서는 세포 생존율이 100% 이상 회복되었으나 천왕보심단을 농도별로 처리하였을 때 생존율은 57.74%, 41.65%, 29.81%로 유의적으로 감소하였다(Fig. 2 C). 이러한 세포 생존율은 LDH 분석을 통하여 재확인하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군에서 29.45%였으나 25, 50 또는 100 $\mu$ g/ml 농도의 천왕보심단 처리는 LDH 양을 각각 36.29%, 35.94%, 36.02%로 증가시켰다(Fig. 2 D). Glutamate 처리군에서 또한 14.82%였으나 천왕보심단 처리는 LDH 양을 각각 28.13%, 36.70%, 40.33% 증가시켰다(Fig. 2 E). RSL3 처리군에서도 27.25%였으나 천왕보심단 처리는 LDH 양을 각각 44.59%, 44.82%, 46.13% 증가시켰다(Fig. 2 F).

이상의 결과는 HT22 신경세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutamate 또는 RSL3에 의한 산화적 스트레스가 유발되었을 때 천왕보심단 처리는 HT22 신경세포의 손상을 증가시켰다.

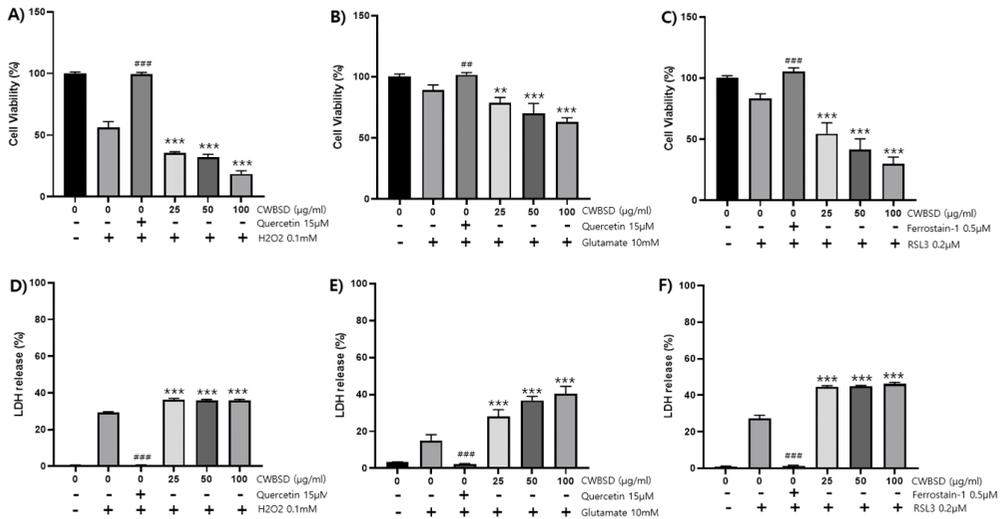


Fig. 2. The effect of CWBSD against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutamate or RSL3-induced cytotoxicity in HT22 cells. Cells were treated with CWBSD at the indicated concentrations for 1 hour. Then, they were incubated again with 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 mM glutamate and 0.2  $\mu$ M RSL3 for 24 hours. Cell viability was determined by an WST-8 assay (A, B and C). Cell damage was determined by measuring LDH release into the extracellular medium (D, E and F). The results are expressed as the mean $\pm$ SD obtained from three independent experiments (\*\*\* $P$  < 0.001, \*\* $P$  < 0.01, ## $P$  < 0.001, # $P$  < 0.01 compared with the only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutamate or RSL3-treated group.)

3) 산화스트레스에 의한 HT22 신경세포 내의 ROS 증가에 미치는 천왕보심단의 영향  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutamate 또는 RSL3에 의해 산화적 손상을 받은 HT22 신경세포에 천왕보심단 100 $\mu$ g/ml을 처리하였을 때 세포 내 ROS가 증가하였다.

DCF-DA는 세포막을 통과하여 세포 내에서 esterase에 의해 DCFH로 탈아세틸화된 뒤, 활성산



소중에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 DCF로 변환된다<sup>25)</sup>. 따라서 각 처리군의 DCFDA fluorescence emission을 비교하였다. 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하였을 때 34.66%였으나 천왕보심단 100μg/ml를 함께 처리 후 91.36%로 증가하였으며, 이는 glutamate 처리군(52.75% → 71.97%)과 RSL3 처리군(24.21% → 75.69%)에도 동일하게 증가하였다(Fig. 3 A, B). 이러한 결과는 형광 현미경으로도 관찰되었다(Fig. 3 C).

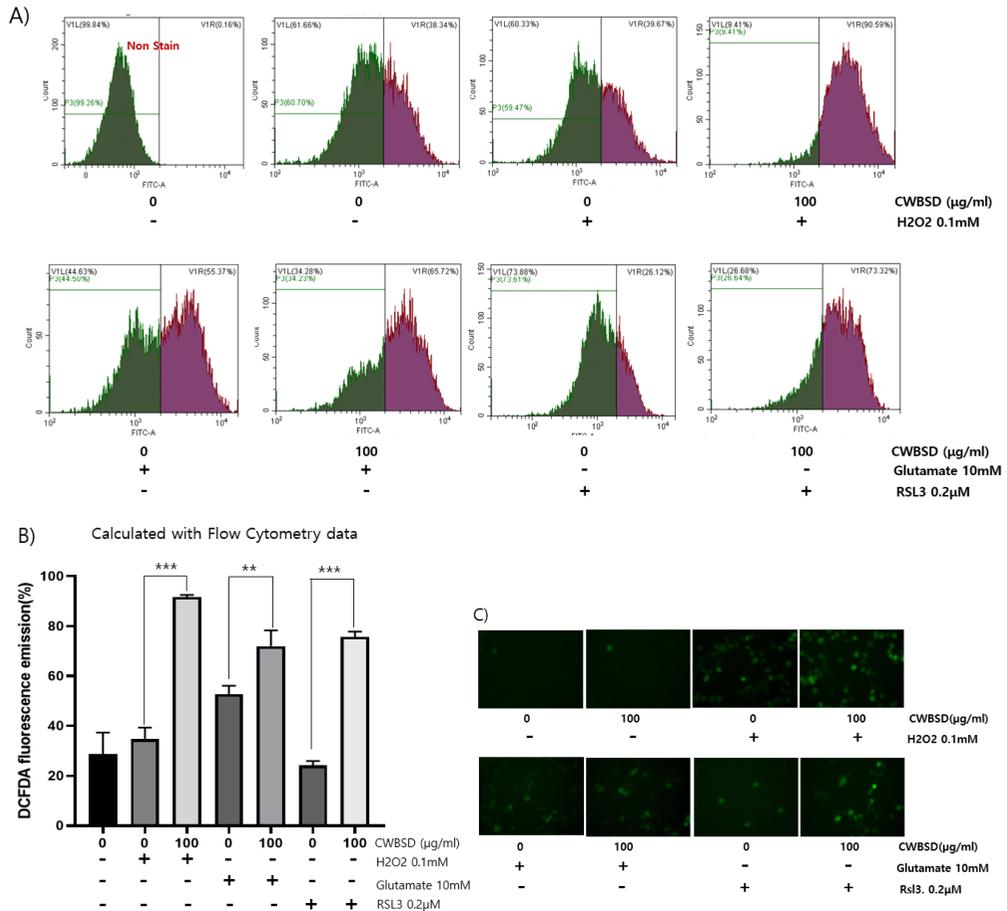


Fig. 3. Cell were incubated with 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 mM glutamate or 0.2 μM RSL3 and with CWBSD for 2 hours before ROS analysis. A) and B) data were acquired using a flow cytometry. Cell were incubated with 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 mM glutamate or 0.2 μM RSL3 and with CWBSD for 5 hours before ROS analysis (C). Fluorescent images were acquired using a fluorescent microscope. Scale bar, 75 μm. The results are expressed as the mean ± SD obtained from three independent experiments (\*\**P* < 0.001, \*\**P* < 0.01 compared between indicated groups.)

- 4) 산화스트레스에 의한 HT22 신경세포의 생존율에 미치는 14종의 천왕보심단 구성 약재들의 영향  
천왕보심단을 구성하는 14종 약재들을 이용하여 산화적 스트레스를 받은 HT22 신경세포의 세포

생존율을 확인하였다(Fig. 4). 확인 결과 RSL3에 의해 산화적 스트레스를 받은 HT22 신경세포 처리군 대비 14종의 약재 중 오미자 추출물만이 세포 생존율을 유의적으로 감소시켰다.

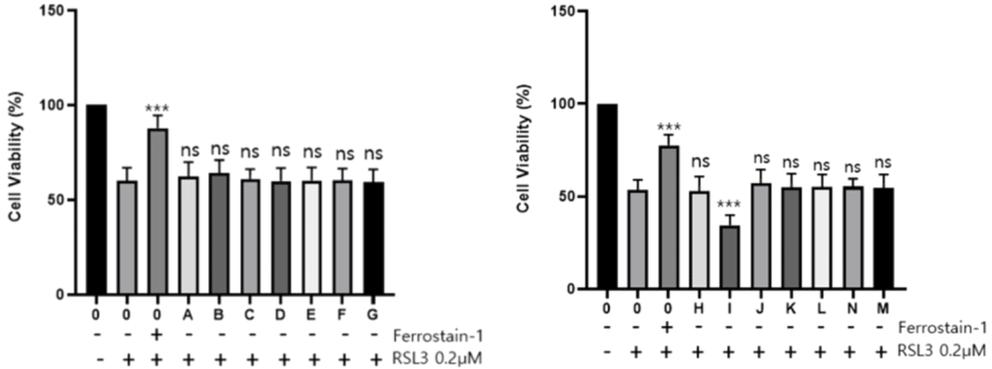


Fig. 4. The effect of the 14 components constituting CWBSD against RSL3-induced cytotoxicity in the HT22 cells. Cells were treated with ingredients at the indicated concentrations for 1 hour. They were then incubated again for 24 hours with 0.2 µM RSL3. Cell viability was measured by WST-8 assay. Results are presented as mean ± SD from three independent experiments. (\*\*\*)  $P < 0.001$ , compared with the only RSL3-treated group. The concentrations of treated ingredients is as follows. **A**: rehmannia root 27 µg/ml, **B**: platycodon root 3.3 µg/ml, **C**: salvia miltiorrhiza root 3.3 µg/ml, **D**: angelica root 6.7 µg/ml, **E**: liriopie tuber 6.7 µg/ml, **F**: thuja seed 6.7 µg/ml, **G**: poria 3.3 µg/ml, **H**: zizyphus seed 6.7 µg/ml, **I**: schisandra fruit 6.7 µg/ml, **J**: polygala root 3.3 µg/ml, **K**: ginseng 3.3 µg/ml, **L**: asparagus tuber 6.7 µg/ml, **N**: scrophularia root 3.3 µg/ml, **M**: coptis rhizome 13.3 µg/ml)

##### 5) 산화적 스트레스에 의한 HT22 신경세포의 생존율에 미치는 오미자 추출물의 영향

Fig. 5와 같이 오미자 추출물을 농도별(0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100µg/ml)로 처리하였을 때 HT22 신경세포에 세포독성 및 세포손상을 유발시키지 않았다(Fig 5. A).

HT22 신경세포에 RSL3로 산화적 스트레스를 유도하였을 때 세포의 생존율은 62.98%였으나 오미자 추출물을 농도별(3.125, 62.5, 12.5, 25, 50µg/ml)로 처리하였을 때 각각 50.26%, 50.09%, 41.81%, 38.47%, 38.38%로 유의적으로 감소하였다. 이상의 결과는 HT22 신경세포에서 RSL3에 의한 세포 손상시 오미자 추출물 처리는 HT22 신경세포의 손상을 증가시켰다.



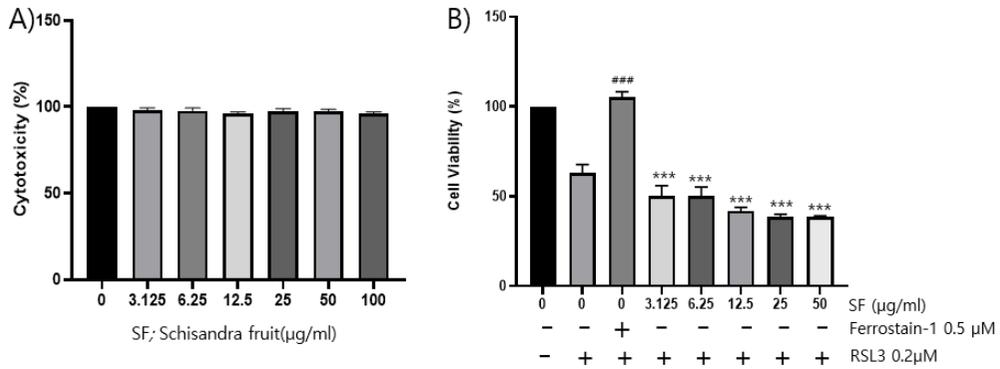


Fig. 5. The effects of SF (schisandra fruit) on cell viability in the HT22 cells. Cells were treated with various concentration of SF for 24 hours. The cell viability was determined by an WST-8 assay (A). The effect of SF against RSL3-induced cytotoxicity in HT22 cells. Cells were treated with SF at the indicated concentrations for 1 hour. Then, they were incubated again with 0.2 µM RSL3 for 24 hours. Cell viability was determined by an WST-8 assay (B). The results are expressed as the mean ± SD obtained from three independent experiments. (\*\*\*)  $P < 0.001$ , (\*\*\*)  $P < 0.001$  compared with the only RSL3-treated group.)

### 3. 고찰

천왕보심단(순심환)은 불면, 불안, 초조, 목마름, 두근거림, 숨참, 신경쇠약, 건망, 변열(가슴이 답답하고 열이 나는 증상) 등의 증상에 사용되어지는 처방이다<sup>26)</sup>. 이러한 천왕보심단은 다양한 실험적 생리활성 연구를 통해 혈관 확장<sup>10)</sup>, 혈압 강하<sup>10)</sup>, 이뇨 작용<sup>11)</sup>, 항스트레스<sup>12)</sup>, 항산화<sup>13)</sup> 또는 항우울<sup>14,15)</sup> 연구에 대해 보고되어 있다. 특히 천왕보심단의 항치매<sup>16-18)</sup>에 대한 여러 연구 결과가 보고되었다. 위 항치매 연구에서 사용된 세포는 PC-12 cell과 BV2 microglia cell이다. PC-12 cell은 흰쥐 부신수질(adrenal medulla) 갈색 세포종(pheochromocytoma)에서 유래된 세포로서, 신경세포의 기능을 해석하기 위해서 많이 사용되어지고, BV2 microglia는 뇌 염증에 관여하는 주요 면역세포로 중추신경계에서 조직 손상에 대한 초기 대응에 관여하는 세포이다. 본 연구에 사용된 HT22 세포는 생쥐의 해마에서 유래한 세포주로, 글루타메이트 수용체가 없다. 따라서 글루타메이트를 처리하면 신경흥분 독성이 아닌 산화적 스트레스로 인하여 세포가 손상을 받는다. 이러한 이유로 산화적 스트레스로 인한 퇴행성 뇌질환 연구의 메커니즘을 밝히기 위한 *in vitro* 모델로 널리 사용되어왔다<sup>19-20)</sup>.

산화적 스트레스는 체내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 많이 발생하는 것과 항산화 시스템의 기능이 저하되면서 체내의 산화계와 항산화계의 불균형으로 일어난다고 알려져 있다<sup>27)</sup>. 세포 내 활성산소의 증가는 세포의 사멸과 관계있으며, 특히 glutamate는 세포 내 ROS를 형성함으로써 신경세포 사멸을 초래하는 것으로 보고되고 있다<sup>28,29)</sup>. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 신호전달 물질(세포의 운동이나 기능조절)로 작용하기도 하지만 강한 산화력 때문에 hydroxyl radical로 전환될 수 있으며, 인체 내에서 과도하게 축적되면 산화적 스트레스를 유발하게 된다<sup>30)</sup>. 따라서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 산화적 스트레스가 유발된 조건에서 여러가지 약리활성을 모니터링하기 위해 *in vitro* 및 cellular system에서 많이 이용되고 있는 물질 중의 하나이다<sup>31)</sup>. 산화적 스트레스로 인한 신경세포 손상은 활성산소가 세포의 주요 구성물질(지질, 단백질 및 핵산 등)의 손상을 초래하고 결국 세포자살 또는 괴사를

유도한다<sup>32,33</sup>). 또한 알츠하이머병 이행과 관련된 금속(철, 구리 및 아연 등) 중에서 철은 건강한 뇌의 정상적 뇌 기능과 밀접한 관련이 있다. 하지만, 철의 축적은 초기의 알츠하이머병에 나타나고, 산화환원-활성 철의 농도 증가는 뇌의 아밀로이드- $\beta$ (A $\beta$ ) 집적과 산화적 손상을 촉발한다고 보고되었다<sup>34</sup>). 게다가, 최근 ferroptosis는 철-의존성 프로그램화 세포 사멸로 인정되었으며, 지질 기반 ROS의 누적으로 발생될 뿐만 아니라, 알츠하이머 증후군과 파킨슨 증후군 같은 질환에서 신경세포 사멸의 주요 원인으로 제안되었다<sup>35-39</sup>). 이러한 산화적 스트레스가 퇴행성 뇌질환의 주요 원인이라는 연구 결과들이 보고되고 있다<sup>40</sup>). 따라서 본 연구에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutamate, RSL3를 이용 HT22 신경세포에 산화적 스트레스를 유발하여 천왕보심단이 세포자멸사에 미치는 영향을 관찰하였다.

먼저 DPPH와 ABTS 측정을 통한 천왕보심단의 항산화능을 확인하였다. DPPH assay는 식물, 추출물 또는 단일 화합물의 항산화 효과를 측정하기 위해 널리 사용되는 방법이다<sup>41</sup>). 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 매우 빠른 속도로 hydrogen radical의 전자를 받아 환원되어 안정한 화합물인 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazine으로 전환되며 짙은 보라색이 옅어지는 특징을 가진다<sup>42</sup>). 색깔이 옅어지는 정도는 샘플의 DPPH radical 소거능이 큰 것을 의미한다<sup>43</sup>). ABTS assay는 Miller 등<sup>44</sup>) 및 RiceEvans 와 Miller<sup>45</sup>)에 의해 처음 보고된 측정법으로 ABTS 양이온에 대한 항산화제의 소거능을 측정하는 방법이다. 시료의 항산화력에 의해 ABTS 양이온이 소거되어 라디칼 특유의 색인 청색이 탈색되는데 이를 흡광도 수치로 나타내어 시료의 항산화 활성을 평가할 수 있다<sup>46</sup>). ABTS 라디칼은 DPPH 라디칼과 달리 극성 시료뿐만 아니라 비극성 시료의 항산화능 측정에 모두 사용 가능하다<sup>47</sup>). 그러므로 DPPH radical에 비해 다양한 시료의 항산화능 측정에 사용된다. Fig.1의 결과 천왕보심단의 DPPH와 ABTS 라디칼 제거를 통한 항산화 활성은 용량이 높을수록 높은 활성을 나타내었다. 이는 Seo 등<sup>48</sup>)과 같은 결과가 관찰되었다. 또한 25, 50 또는 100ug/ml의 천왕보심단은 HT22 신경세포에 처리하였을 때 독성이 없음을 확인하였다.

천왕보심단은 HT22 신경세포에 대한 독성이 없으며, 항산화능 또한 확인 되었으나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutamate 또는 RSL3를 처리하여 산화적 스트레스가 유발하였을 때 HT22 신경세포에서 천왕보심단의 농도별 처리는 농도가 높을수록 세포 내 ROS가 증가하였으며, 이로 LDH의 방출량이 증가하였다. 따라서 세포의 생존율 또한 감소하였다. ROS의 증가는 체내 고분자의 산화에 크게 기여하며, 특히 DNA의 purine과 pyrimidine 염기를 공격하여 변형시키는 것으로 알려져 생체분자에 심각한 손상을 초래할 수 있다<sup>49</sup>).

천왕보심단을 구성하는 14개의 약재 추출물을 HT22 신경세포에 처리한 결과는 Fig. 4와 같이 세포가 산화스트레스를 받는 환경에서 14종의 약재 중 오미자 추출물의 처리군에서만 더 많은 세포의 손상이 나타났다. 이에 본 연구진은 오미자의 영향을 재확인하고자 HT22 신경세포에서 오미자 추출물의 독성이 없음을 확인하였다(Fig 5. A). 또한 오미자 추출물의 농도(3.125, 6.25, 12.5, 25 및 50 $\mu$ g/ml)가 증가함에 따라 산화적 스트레스를 유발한 HT22 신경세포에서 세포 손상이 더 증가함을 확인하였다(Fig 5. B). 이처럼 오미자의 세포사멸 유도 작용은 유방암 세포인 MCF-7 세포가 사멸되었다고 보고된 바 있으며,<sup>50</sup>) 또한 오미자 메탄올 추출물 및 분획물이 인간 전립선암 세포주인 PC-3 세포의 성장을 억제하고, 특히 오미자 클로로포름 분획물의 경우 apoptosis가 유도된 세포 비율이 증가하였다고 보고된 바 있다<sup>51</sup>).



## 결론

천왕보심단의 항치매 연구들이 보고됨에 따라 본 연구진 또한 천왕보심단의 항치매 치료제로서의 가능성을 확인하고자 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutamate 및 RSL3로 산화적 스트레스가 유도된 HT22 신경세포에서 세포자멸사에 미치는 천왕보심단의 영향에 대하여 실험하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 천왕보심단 100 $\mu$ g/ml 이하 농도에서 HT22 신경세포에 독성이 없으며, DPPH와 ABTS assay에서 항산화능이 있다.
2. 하지만, 산화적 스트레스가 주어진 환경에서는 천왕보심단의 처리는 HT22 신경세포의 세포 내 ROS를 증가시키고 LDH의 방출을 증가시켜 세포 생존율을 감소시키는 독성을 나타내었다.
3. 천왕보심단 14가지 약재 중 오미자 추출물이 세포의 생존율을 감소시켰으며, 오미자를 제외한 13종의 약재는 아무런 영향을 미치지 않았다.
4. 오미자가 산화스트레스를 받은 HT22 신경세포에 독성을 나타내는 것으로 사료된다.

이상의 결과는 천왕보심단은 HT22 신경세포에 독성이 없으나, 세포의 산화적 스트레스가 주어진 환경에서 천왕보심단의 구성 약재 중 오미자에 의해 세포 손상을 일으키는 것으로 사료된다. 향후 오미자를 제외한 HT22 신경세포의 천왕보심단에 대한 추가 연구와 cellular system의 메커니즘 및 *in vivo* 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 동신대학교 학술연구비에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

1. 통계청. 2021년 출생통계. Available from: [http://kostat.go.kr/portal/korea/kor\\_nw/1/1/index.board?bmode=read&aSeq=419974](http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/1/1/index.board?bmode=read&aSeq=419974). (accessed 2022-08-24).
2. 통계청. 2021년 고령자통계. Available from: [https://kostat.go.kr/portal/korea/kor\\_nw/1/1/index.board?bmode=read&aSeq=403253](https://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/1/1/index.board?bmode=read&aSeq=403253). (accessed 2021-09-29).
3. Domenico Pratico et al. Increased 8, 12-*iso*-iPF<sub>2a</sub>-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *American Neurological Association*. 2000;48:809-12.
4. Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, Latorraca S, Naomias B, Bagnoli S, et al. Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;33:1372-9.
5. Da-Qing Jin et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of mace lignan in murine hippocampal cell line and primary culture of rat microglial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;331:1264-9.

6. Chol Seung Lim et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the methanolic extract of *Neorhodomela aculeate* in hippocampal and microglial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2006;29(6):1212-6.
7. 危亦林. 世醫得效方. 서울:의성당. 1990:217.
8. Herbal formulation Professors of Korean Medicine. Herbal formulation. Seoul:Youn glimsa. 2003:329-31.
9. 한의과대학 방제학 교수 공편저. 방제학. 서울:영림사. 1999:329-30.
10. Kim NJ, Kong YY and Chang SW. Studies on the efficacy of combined preparation of crude drugs (XXX-VII). The effects of Chunwangboshimdan on the central nervous system and cardio-vascular system. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 1988;19:208-15.
11. 김남재, 공수운, 장순옥. 天王補心丹이 중추 신경계 및 순환기계에 미치는 영향. *생약학회지*. 1988;19(3):208-15.
12. Mates JM et al. Antioxidant enzymes and human disease. *Clinical Biochemistry*. 1999;32:595.
13. Park JH, Bae CW, Jun HS, Hong SY and Park SD. Antidepressant effect of chunwan gboshimdan and its influence on monoamines. *Korean Journal of Oriental Medicine*. Prescrip. 2004;12:77-93.
14. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:217-8,229.
15. Park JH, Bae CW, Jun HS, Hong SY and Park SD. Antidepressant effect of chunwan gboshimdan and its influence on monoamines. *Korean Journal of Oriental Medicine*. Prescrip. 2004;12:77-93.
16. Lee JY, Jung IC and Lee SR. Effects of Chenwhangbosimdan (CWBD) on inhibition of impairment of learning and memory, and acetylcholinesterase in amnesia mice. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 2002;13:149-71.
17. Choi KW and Jung IC. The effects of Chenwhangbosindan (CBD) hot water extract & ultra-fine powder on the Alzheimer's disease model. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 2008;19:77-93.
18. Jung IC. Effects of Chenwhangbosim-dan and Sungimjihwang-tang on protecting microglia and inhibiting acetylcholinesterase and oxidants. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 2008;22:120-5.
19. Liu J, Li L and Suo WZ. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sciences*. 2009;84:267-71.
20. Lee YR, Park HW, Park SG, Cho SY, Myung PK, Park BC and Lee DH. Proteomic analysis of glutamate-induced toxicity in HT22 cells. *Proteomics*. 2007;7:185-93.
21. Deryk TL and Jill RR. Measurement of cell death. *Methods in Cell Biology*. 1998;57:251-64.
22. Mensor LL et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the sue of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*. 2001;15:127-30.
23. Marino BA, Antonio C, and Manuel A. The hydrophilic and lipophilic contribution



- to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2001;73:239-44.
24. Roberta Re et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorisation Assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999;26:1231-7.
  25. Cathcart R, Schwiers E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Analytical Biochemistry*. 1983;134:111-6.
  26. 약학정보원. Available from: [www.health.kr/main.asp](http://www.health.kr/main.asp) (accessed 2022-10-01).
  27. Joseph TC and Pamela P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993;262:689-95.
  28. Beal MF. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *The Federation of American Societies for Experimental Biology of Journal*. 1992;6:3338-44.
  29. Choi DW. Excitotoxic cell death. *Journal of neurobiology*. 1992;23:1261-76.
  30. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology* 2017;11:613-9.
  31. Comporti M. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants. *Journal of the Siena Academy of Sciences*. 2010;2:13-26.
  32. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993;262:689-95.
  33. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine of Journal*. 1997;23:134-47.
  34. Everett J, Collingwood JF, Tjendana-Tjhin V, Brooks J, Lermyte F, Plascencia-Villa G, et al. Nanoscale synchrotron X-ray speciation of iron and calcium compounds in amyloid plaque cores from Alzheimers disease subjects. *Nanoscale*. 2018;10:11782-96.
  35. Hirschhorn T, Stockwell BR. The development of the concept of ferroptosis. *Free Radical Biology and Medicine of Journal*. 2019;133:130-43.
  36. Morris G, Berk M, Carvalho AF, Maes M, Walker AJ, Puri BK. Why should neuroscientists worry about iron? The emerging role of ferroptosis in the pathophysiology of neuroprogressive diseases. *Journal of Behavioural Brain research*. 2018;341:154-75.
  37. Stockwell BR, Friedmann AJP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell*. 2017;171:273-85.
  38. Guiney SJ, Adlard PA, Bush AI, Finkelstein DI, Ayton S. Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry international*. 2017;104:34-48.
  39. Belaidi AA, Bush AI. Iron neurochemistry in Alzheimers disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. *Journal of Neurochem*. 2016;139:179-97.
  40. Montine TJ, Diana NM, Quinn JF, Beal MF, Markesbery WR, Roberts LJ, Morrow JD. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radical Biology*

- & Medicine. 2002;33:620-6.
41. Shi J, Gong J, Liu J, Wu X, Zhang Y. Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 2009;42:477-82.
  42. Wisanu T, Boonsom L, Saisunee L. Flow injection analysis of total curcuminoids in turmeric and antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Food Chemistry*. 2009;112:494-9.
  43. Shimada KK, Fujikawa KY, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992;40: 945-8.
  44. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. 1993;84:407-12.
  45. Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Meth Enzymol*. 1994;234:279-93.
  46. Kang KM and Lee SH. Effects of extraction methods on the antioxidative activity of *Artemisia* sp. *Journal of the Korean Society of Food and Nutrition*. 2013;42:1249-54.
  47. Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cineros-Zevallos L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51:6657-62.
  48. Seo CS, Kim OS, Shin HK. Quantitative Determination and Antioxidant Effects of Cheonwangbosimdan. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 2014;45(4):300-14.
  49. Rice-Evans CA, Miller N, Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*. 1996;20:933-56.
  50. Kim JN, Chae H, Kwon YK, Kim BJ. Effects of *Schisandra chinensis* on Human Breast Cancer Cells. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. 2014;28(2):162-8.
  51. Moon JM, Seok GH, Cho SI. Antiproliferative effect of Schisandrae Fructus extract on PC-3 human prostate cancer cells. *Korea Journal of Herbology*. 2012;27(4):17-23.

