대 한 체 질 인 류 학 회 지
Korean J Phys Anthrop
16(2): 119 ~ 127, 2003

Magnolol의 세라마이드에 의한 SK-N-SH 신경세포사멸에 대한 신경보호효과에 대한 연구

이도연, 김성수, 김경용, 이원복
중앙대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : Magnolol (후박)은 *Magnolia officnalis* (후박나무) 가지의 껍질로부터 분리된 전형적인 동양의 자생초본으로, 현재까지 진정 및 흥분 완화작용, 항산화 및 지질개선효과, 항염증 작용, 중풍, 허혈, 신경통 및 고혈압, 스트레스 등 다양한 증상 및 질병에 대한 생물학적 보호활성이 알려져 있다. 그러나 Magnolol의 다양한 생물학적 활성 및 효능이 어떠한 조절기작을 통한 것인지에 대해서는 명확히 규명된 바가 없으며, 특히 신경세포에 대한 영향과 그 작용 기작에 대한 연구는 아직 미흡하다. 한편, 세라마이드는 아포토시스 양상의 세포사멸의 이차적 신호전달물질로서, 신경퇴행성 질환과 노화현상에 관여하는 중요한 원인물질로 제시되고 있다. 이에 본 연구에서는 신경모세포종 SK-N-SH에서 세라마이드에 의한 아포토시스 양상의 세포사멸과 Magnolol이 그러한 세포사멸을 차단하여 세포생존율에 변화를 가져올 수 있는지 조사하였으며, 그 결과 Magnolol이 세라마이드에 의해 유도되는 세포사멸을 효과적으로 차단하여 세포생존율을 증가시키는 것을 확인하였다. 또한 활성기산소의 생성여부 및 신경세포사멸과의 관련성을 규명하기 위하여 세라마이드를 처리한 후 활성기산소의 생성을 측정하고 Magnolol을 전처리하여, 증가되었던 활성기 산소의 생성이 억제됨을 관찰하였다. 이는 활성기 산소가 세라마이드로 유도된 신경세포사멸 과정을 매개하고 있음을 제시하는 결과이며, Magnolol이 효과적인 항산화적 작용을 나타내어 이를 차단함으로서, 신경보호효과를 나타내는 것임을 제시하는 결과라 하겠다. 나아가 아포토시스 하위 단계의 조절자로 알려진 caspase가 세라마이드에 의해서 활성화되는지 여부를 관찰하였으며, Magnolol에 의해서 효과적으로 활성이 저해하는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합하면, 세라마이드에 의해 유도되는 신경세포사멸 과정에 활성기 산소의 증가가 중요하게 매개되어 있으며, Magnolol이 그러한 활성기 산소를 의미있게 차단함으로서, 하위 세포사멸단계를 억제하여 신경보호작용을 한다고 할 수 있다.

찾아보기 낱말 : Magnolol (후박), 세라마이드, SK-N-SH, 아포토시스, 산화적 손상

RETRACTED

서 론

Magnolol (후박, 厚撲)은 *Magnolia officnalis* (후박나무)에 속하는 다년생초본으로서, 우리 나라를 비롯하여 중국, 일본 등 아시아 등지에서 자생하고 있는 식물이다 (Ikeda와 Nagase 2002, Zhong 등 2003). 최근들어 Magnolol에 관한 연구로서 다양한 세포 및 동물 실험 등을 통하여 진정 및 흥분 완화작용, 심장성 질병 완화, 항산화 및 지질개선효과, 신경통, 중풍, 고혈압, 항암작용, 항궤양작용을 비롯한 다양한 항염증작용 등이 나타난다고 알려져 있다 (Chiu 등 1999, Chen 등 2001, Lin 등 2002, Loong 등 2002).

특히, Magnolol이 hydroxyl radical 등의 ROS scavenger로서 활성기 산소를 제거한다는 많은 연구결과들이 도출됨에 따라 강력한 항산화 작용을 할 수 있는 것으로 기대되고 있어 활성기 산소가 발

* 이 논문은 2003학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.
교신저자 : 이원복 (중앙대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : whitefox@cau.ac.kr

병기전의 주요한 원인으로 알려진 여러 가지 신경퇴행성질환의 예방, 치료제 개발에 있어 적절하게 이용이 가능할 것이라 생각된다.

아포토시스(Apopotosis)는 손상된 세포만을 선택적으로 제거하는 일련의 계획된 세포자살의 행위를 의미(programmed cell death; PCD)하며, 세포 내 다양한 효소와 물질들이 참여하는 능동적인 과정이다(Jacobson 등 1994, Alnemri 등 1996, Feldmann 1997). 이러한 아포토시스는 세포내의 정상적인 메커니즘에서뿐만 아니라, 알츠하이머병이나 파킨슨씨병 등의 신경퇴행성질환(neurodegenerative disease) 등에서도 유발되며, 여러 퇴행성질환의 병리학적 요인으로 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다(Vaux 등 1994, Thompson 1995).

세라마이드는 세포막을 구성하고 있는 인지질 중 하나인 스핑고마이엘린(Sphingomyelin)이 스핑고마이엘리네이즈(sphyingomyelinase)에 의해 생성되는 세포 내 물질로서, 세포 성장(growth), 증식(proliferation), 분화(differentiation), 생존(survival) 등에서 중요한 역할을 하는 이차 신호전달물질로 알려져 있다. 최근 실험을 통하여, 세포 투과성의 합성 세라마이드를 처리한 경우에 아포토시스 형태의 세포사멸이 관찰되어 세라마이드가 아포토시스를 매개하는 신호전달 물질일 것이라는 보고들이 있다(Mathias 등 1998). 특히 신경 조직 및 신경세포의 경우 스핑고마이엘린의 함유량이나 스핑고마이엘리네이즈의 활성도가 상당히 높은 것으로 알려져 있으며, 이는 신경세포사멸 과정이나 신경퇴행성 질환 등에서 나타나는 아포토시스 과정과 깊은 관련성을 시사하는 것이다. 현재까지 이러한 세라마이드의 작용과 관련된 다양한 인자들이 밝혀지고 있으나 세라마이드에 의한 아포토시스가 구체적으로 어떠한 경로를 통한 것인지에 대해서 명확히 규명된 바는 없으며, 더욱이 이러한 신경세포들의 아포토시스에 대한 보호측면에서는 연구된 바가 미흡하여, 효과적인 치료제의 연구 및 개발이 시급하게 요구되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 사람신경모세포종(neuroblastoma cell)인 SK-N-SH 세포를 이용하여, 세라마이드에 의해 유도된 신경세포사멸의 기작과 경로를 규명하고, 그 과정에서의 활성기 산소의 생성여부와 이와 관련된 인자들의 영향을 밝히고 자생식물의 유래 약물성분으로 알려져 있는 Magnolol이 이러한 세라마이드에 의한 세포사멸기작에 어떠한 영향을 주어 신경세포보호효과를 나타낼 수 있는지 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

사람 신경모세포종(neuroblastoma cell)인 SK-N-SH 세포를 PEI-coated 96 well culture plate에 MTT reduction assay를 위해서는 40,000 cells/well의 밀도로 깔아주었다. SK-N-SH 세포는 DMEM에 10% FBS (fetal bovine serum)를 보충한 배양액으로 배양하였다. 실험하기 2시간 전에 low serum media (DMEM with 1% FBS)로 바꾸어주고 각각의 물질을 일정 시간동안 처리하였다.

2. Cell Viability Assay (MTT reduction assay)

MTT reduction assay는 기존에 보고된 방법을 약간 변형하여 시행하였다(Shearman 등 1994, 1995, Kaneko 등 1995). 배양된 세포에 세라마이드를 첨가한 뒤 37°C에서 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 48시간 후에 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma) 용액을 최종농도가 0.5 mg/ml 농도가 되도록 각 well에 첨가한 후에 4시간 반동안 더 배양하였다. MTT의 환원에 의해서 형성된 formazan precipitate를 dissolving solution (0.1 N HCl in absolute isopropanol)에 녹인 후에 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 sample의 값은 해당되는 용매만을 추가한 control값을 100%로 하고 0.9% Triton X-100에 의해 세포가 완전히 파괴되었을 때의 MTT reduction 정도를 0%로 하여 상대적인 값으로 표시하였다.

RETRACTED

3. Hoechst 33258 dye staining

Apoptotic cell 내의 nuclear chromatin의 형태변화는 DNA-binding fluorochrome bis-benze (Hoechst 33258 dye)로 염색하여 관찰하였다. $0.5 \sim 3.0 \times 10^6$ cell을 300×g에서 10분간 원심분리하여 모은 후 PBS로 세척하고, 세포를 50 μl의 paraformaldehyde에 현탁한 후 상온에서 10분간 고정하였다. 고정액을 제거하고 세포를 PBS로 세척한 후 16 μg/ml의 bis-benzimide를 포함한 PBS 15 μl를 넣었다. 상온에서 15분간 방치한 후 10 μl aliquots을 slide glass에 넣고 형광현미경 하에서 apoptotic chromatin의 변화를 관찰하였다.

4. 활성기산소의 생성 측정

배양한 세포에 HCSS buffer (20 mM HEPES, 2.3 mM $CaCl_2$, 120 mM NaCl, 10 mM NaOH, 5 mM KCl, 1.6 mM $MgCl_2$, 15 mM glucose) 완충액에 용해시킨 10 μM의 DCFDA (6-carboxy-2′, 7′-dichloro-dihydrofluoresceine diacetate, dicarboxym-ethylester)와 현탁보조제인 2% Pluronic F-127을 37°C에서 30분간 처리하였다. 세포 내 자유라디칼에 의한 DCF 형광은 실온에서 수은 램프 형광 부속을 갖춘 Olympus IX70 도립 현미경 상에서 관찰하고 (Excitation = 488 nm, Emission = 510 nm) CCD 카메라로 화상을 포착한 후 NIH Image 1.65 program을 이용하여 영상분석 하였다.

5. Caspase의 활성 측정

P100 plate 당 10×10^6 cells을 1 ml의 lysis buffer (10 mM Tris-Hcl, pH 7.4, 10 mM NaH_2PO_4/$NaHPO_4$, pH 7.4, 130 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM NaF)로 harvest 한 후 얻은 cell lysate 50 μl에 직접 pan caspase substrate인 0.25 mM zVAD-PNA를 HEPES buffer (40 mM HEPES, pH 7.5, 20% glycerol, 4 mM DTT)에서 1시간 실온 반응시킨 후 caspase에 의해 기질이 잘려서 생성되는 정도를 ELISA Reader (Molecular Devices)를 이용하여 405 nm 흡광도에서 측정하였다.

결 과

1. C2-ceramide가 SK-N-SH 신경모세포종에서 아포토시스 양상의 세포사멸유발

사람 신경모세포종 (neuroblastoma cell)인 SK-N-SH 세포에서 ceramide에 의한 세포사멸을 관찰하기 위해서, Ceramide를 처리하기 2시간 전에 1% FBS를 포함하는 배지에서 배양하였으며, Ceramide에 의해 유발된 세포사멸은 MTT reduction assay로 측정하였다. 신경모세포종 SK-N-SH에다가 세포투과성의 C2-ceramide (20, 40 μM)로 처리하였을 경우 시간 및 농도 의존적으로 세포사멸이 유발되었다 (Fig. 1A). 20 μM과 40 μM의 Ceramide 처리 후 18시간에 각각 약 40%와 65%의 세포사멸이 유도되는 것으로 나타났고, 48시간 후에는 20 μM 처리한 경우에도 60% 이상의 세포사멸이 유도되었다. Ceramide에 의한 SK-N-SH 세포의 세포사멸양상을 규명하기 위해 세포의 외형적 변화와 핵 형태변화를 Hoechst 33258염색을 통해 관찰하였다. 위상차현미경을 이용하여 세포외형의 변화를 18시간에 관찰한 결과 20, 40 μM C2-ceramide를 처리한 경우 모두 세포체의 응축과 분절 및 신경돌기 소실, 세포막수포현상 (membrane blebbing) 등의 전형적인 아포토시스 형태의 세포사멸을 나타내었다 (Fig. 1B-a, c, e). 또한 Hoechst 33258 염색을 이용하여 SK-N-SH 세포의 핵 형태변화를 관찰한 결과 세라마이드 20 μM과 40 μM에 노출된 경우 대조군에 비해 심각한 핵 응축과 분절을 나타내었다 (Fig. 1B-b, d, f).

2. Magnolol의 C2-ceramide에 의한 세포사멸에 대한 보호효과

Magnolol이 ceramide에 의해 유발된 세포사멸을 보호할 수 있는지 알아보기 위하여, ceramide를 처리하기 2시간 전에 1% FBS를 포함하는 배지와 함께 10 μM의 Magnolol을 전 처리하였으며, 20 μM의 ceramide를 24시간 처리한 후, MTT reduction assay로 세포생존율의 변화를 측정하였다 (Fig. 2A). 20

RETRACTED

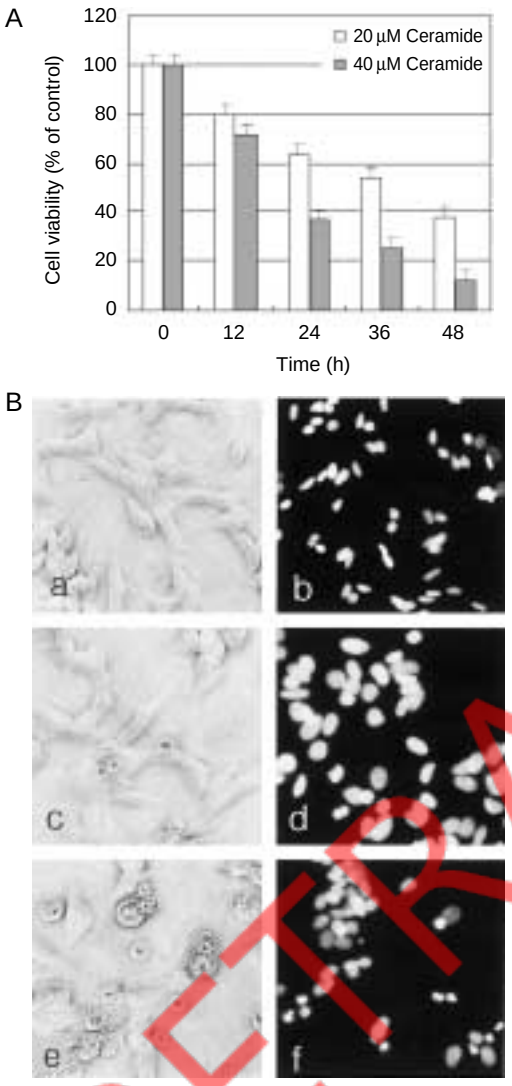

Fig. 1. Ceramide induces apoptosis in SK−N−SH neuroblastoma cells. (A) Time− and dose− dependent change of cell viability by ceramide. SK−N−SH cells were pre−incubated with 1% FBS/DMEM for 2 h and then treated with 20 and 40 μM of C2−ceramide. C2−ceramide was dissolved in ethanol (final con.＜0.1%). Cell viability was determined by MTT assay at indicated time points. (B) Assessment of apoptosis by Light microscopic morphology and Hoechst 33258 staining. SK−N−SH cells were either not treated (a, b) or treated with 20 μM (c, d) and 40 μM (e, f) of C2−ceramide for 18 h. The figures are shown that Light microscopic morphology (a, c, e) and Hoechst 33258 staining nuclear morphology (b, d, f). The figures are representative for three different experiments.

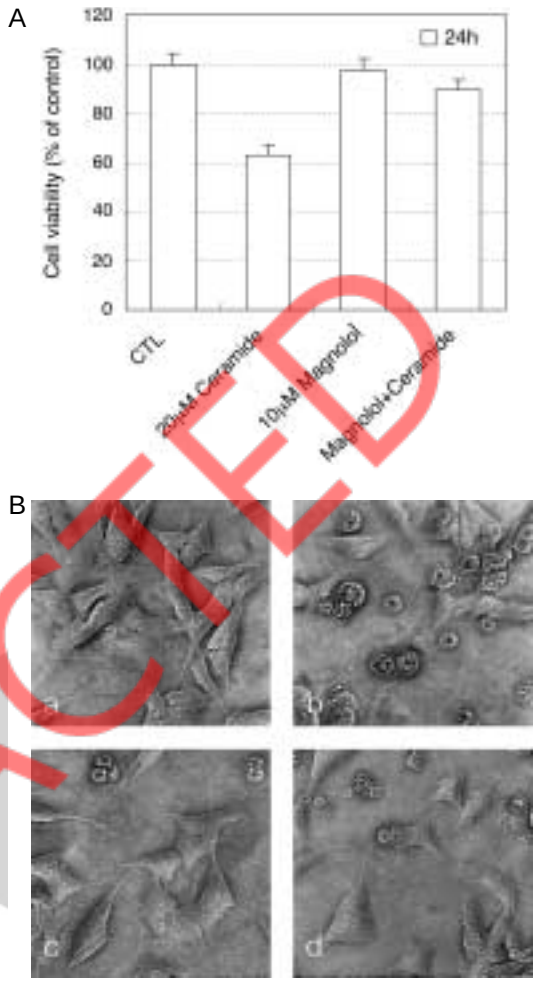

Fig. 2. Effect of Magnolol on ceramide induced neuronal cell death. (A) SK−N−SH cells were pre−treated with 10 μM of Magnolol for 2 h and then treated with 20 μM of C2−ceramide. Cell viability was determined by MTT assay at 18 h after 20 μM C2−ceramide treatment. (B) Assessment of apoptosis by Light microscopic morphology. SK−N−SH cells were untreated control (a) or treated (b) with 20 μM of C2−ceramide for 18 h. SK−N−SH cells were pre−treated with 10 μM of Magnolol (c) for 2h. Pretreatment of SK−N−SH cells with 10 μM of Magnolol were treated with 20 μM of C2−ceramide for 18 h (d).

μM의 ceramide를 18시간 처리 후 약 30%의 세포가 사멸되는 것으로 나타났으며, Magnolol을 전 처리한 후 ceramide를 처리한 군에서는 ceramide만

RETRACTED

단독으로 처리한 군에 비해 세포생존율이 30% 이상 높게 나타났다. 또한 위상차현미경을 이용하여 세포의 형태학적 양상을 관찰한 결과, 20 μM의 C2-ceramide에 의해 유도되는 신경돌기의 손실 및 세포막의 수포화와 같은 아포토시스의 형태적 변화가 Magnolol을 전 처리한 경우에는 효과적으로 감소하였다 (Fig. 2B-b, d). 한편, Magnolol을 단독 처리한 경우에는 세포사멸이 일어나지 않았으며, 이는 Magnolol 자체의 세포독성이 없음을 의미하는 것이다 (Fig. 2B-c).

3. C2-ceramide에 의한 활성기 산소의 증가와 Magnolol의 저해효과

Ceramide에 의하여 유발되는 신경세포사멸 과정이 어떠한 메커니즘을 통한 것인지 그 기작을 규명하기 위하여, Ceramide 세포사멸 과정이 이러한 활성기 산소종과 관련이 있는지를 알아보기 위하여, 10 μM의 DCF-DA를 이용하여 형광 현미경 상에서 관찰하였다 (Fig. 3A), 아무 것도 처리하지 않은 대조군에서는 활성기 산소 생성을 반영하는 형광이 관찰되지 않았으며, 20 μM의 C2-ceramide를 처리한 후 2시간 내에 활성기 산소의 양이 현저하게 증가되었다. 이것은 Ceramide가 활성기 산소의 증가를 매개하여 신경세포사멸을 유발하는 것을 의미하는 것이다. 한편, ceramide를 처리하기 2시간 전에 1% FBS를 포함하는 배지와 함께 10 μM의 Magnolol을 전 처리 한 경우에, ceramide에 의해 증가된 활성기 산소가 대조군에서의 수준으로 현저하게 저해되었으며, 이로서 Magnolol의 세포보호효과가 Ceramide에 의해 증가된 활성기 산소를 억제하는 항산화적 작용임을 예상할 수 있었다.

4. Ceramide에 의한 세포사멸에서 caspase와의 관련성 및 Magnolol의 보호효과

아포토시스의 하위단계에서 세포사멸에 관여하는 중요한 인자 중의 하나인 caspase의 활성화가

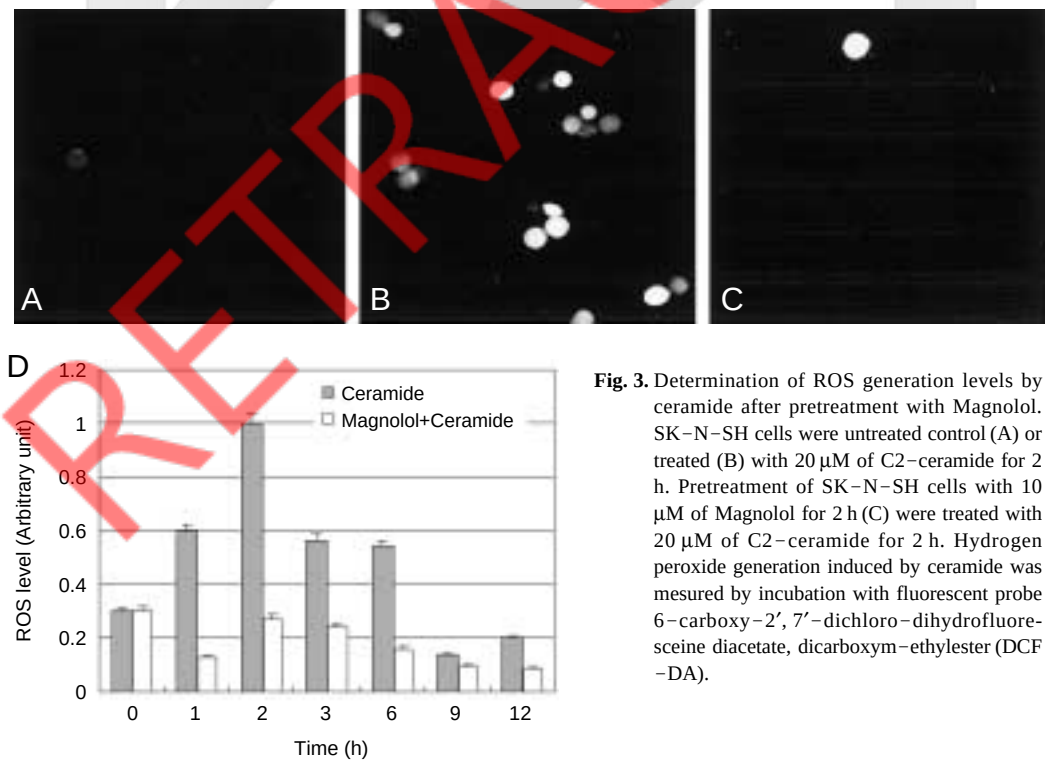

Fig. 3. Determination of ROS generation levels by ceramide after pretreatment with Magnolol. SK-N-SH cells were untreated control (A) or treated (B) with 20 μM of C2-ceramide for 2 h. Pretreatment of SK-N-SH cells with 10 μM of Magnolol for 2 h (C) were treated with 20 μM of C2-ceramide for 2 h. Hydrogen peroxide generation induced by ceramide was mesured by incubation with fluorescent probe 6-carboxy-2′, 7′-dichloro-dihydrofluoresceine diacetate, dicarboxym-ethylester (DCF-DA).

RETRACTED

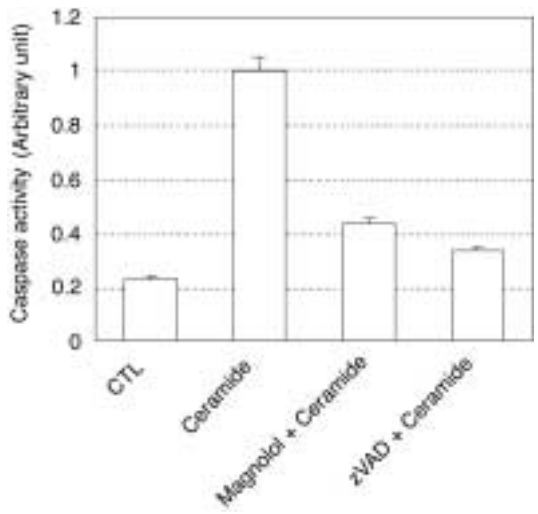

Fig. 4. Effect of Magnolol on caspase activity was increase by ceramide. Relative caspase activities induced by C2-ceramide after pre-treatment with Magnolol or zVAD-fmk. Control was untreated SK-N-SH cells (CTL). Cells were left untreated (Ceramide) of incubated with either 10 μM (Magnolol+ceramide) or 10 μM zVAD-fmk (zVAD+ceramide) for 2 h, followed treated with 20 μM of C2-ceramide. Enzymatic activity is expressed as arbitrary unit of relative value.

Ceramide에 의한 신경세포사멸 과정에 활성기 산소와 더불어 관련되어 있는지를 알아보기 위하여, pan caspase substrate인 0.25 mM zVAD-PNA를 처리한 후, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 caspase에 의해 기질이 잘려서 생성되는 정도를 ELISA Reader를 이용하여 405 nm 흡광도에서 측정하였다. 20 μM의 C2-ceramide를 8시간 처리하였을 때, 활성화된 caspase가 대조군에 비하여 5배 이상 현저한 증가를 보였으며, pan caspase inhibitor인 zVAD-fmk를 10 μM 전 처리한 후 Ceramide를 처리한 경우에는 대조군 수준으로 caspase 활성도가 확연하게 저해되었다. 이것은 Ceramide에 의한 세포사멸 과정이 활성기 산소의 증가를 매개하여 독성을 나타내는 것을 의미하며, Magnolol이 이러한 단계에서도 영향을 미치는가를 확인하기 위하여, Ceramide를 처리하기 2시간 전에 1% FBS를 포함하는 배지와 함께 10 μM의 Magnolol을 전처리 하였다. 이 때, 증가된 caspase의 활성화 정도가 60% 이상의 큰 차이의 감소가 나타나는 의미 있는 저해효과가 관찰되었다.

이러한 결과는 Ceramide에 의해 유발되는 세포사멸 기작에서 caspase가 관여하고, Magnolol이 활성기 산소의 저해와 더불어, 활성화된 caspase를 효과적으로 저해시킴으로서 세포보호기작을 나타냄을 제시할 수 있다.

고 찰

최근 전 세계적으로 경제 및 생명공학, 의학의 비약적인 발전으로 인류의 수명이 연장되면서, 노령화됨에 따라 증가하는 동맥경화, 암, 고혈압, 고지혈증, 알츠하이머병, 파킨슨씨병, 헌팅턴병 등 성인병 및 신경퇴행성 질환에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Hoehn와 Yahr 1967). 그러므로 이러한 노화 및 신경퇴행성 질환의 원인과 그 병리 기작을 규명하는 것은 기본적으로 선행되어야 하며, 더불어 원인과 기작을 바탕으로 치료제에 대한 개발이나 연구도 매우 가치 있는 일이라 하겠다.

본 실험에서 신경독소로서 사용한 세라마이드는 정상적인 세포 내 생리활성을 조절하는 이차신호 전달물질 이외에도, 신경세포를 포함하는 다양한 세포 및 조직에서 아포토시스 형태의 세포사멸을 유발하는 중요한 원인인자로 작용한다는 보고가 있으나 (Burgg 등 1996) 특히 사람신경세포 종에서의 세라마이드에 의해 유도되는 세포사멸 기작에 대해서는 아직 명확하게 규명되지 않고 있다. 세라마이드의 축적에 의한 결과로 인한 세포사멸은 아마도 노화 현상 및 알츠하이머병이나 파킨슨씨병 등 신경퇴행성질환에서 관찰되어지는 아포토시스와 관련되어 있을 것으로 생각되어지는데, 이는 세라마이드를 생성하는 스핑고마이엘리네이즈가 노화촉진생쥐의 대뇌 겉질에서 연령이 높아짐에 따라 증가한다거나 (Kim 등 1997). 노화 세포 배양 모델에서 노화형질 발현에 스핑고마이엘리네이즈 및 스핑고마이엘린이 관여한다는 보고에 근거한다

RETRACTED

(Vaneble 등 1995, Lightle 등 2000).

이러한 노화와 관련된 성인병, 신경퇴행성 질환에서 생성되어 이들 질환의 병리학적 주요한 원인물질로 인식되고 있으며, 생체에서 발생하는 자유라디칼의 이차생성물인 활성기 산소종(Reactive oxygen species; ROS)은 세포내의 DNA, 단백질, 생체막 등을 공격하여 과산화지질이나 여러 가지 유해한 산화 분해물을 생성함과 더불어 생체조직을 손상시켜, 결국 여러 질환 및 증상의 주요한 원인물질로 알려져 있다. 활성기 산소종(ROS)은 산소를 에너지 대사에 사용하는 NADPH oxidase system을 가진 모든 생물에서 필연적으로 발생하는 것이므로 세포는 이들로부터 안전하기 위한 여러 가지 항산화물질과 항산화효소 등의 산화적 손상에 대한 방어기작을 가지고 있다(Halliwell와 Cross 1994). 그러나, 스트레스 상황 하에서 과도하게 생성된 활성기 산소는 세포 내 효소 단백질이나 DNA 등의 거대분자에 산화적 손상(oxidative damage)을 유도하며 최종적으로는 세포사를 유도한다고 밝혀져 있다(Behl 등 1994). 그러나 지금까지의 연구결과들은 별개의 관점에서 산화적 독성과 아포토시스 기작에 의한 세포사멸 연구가 진행되어 왔고, 신경독성물질들에 의한 세포사멸신호전달에서의 활성기 산소의 관련성 및 그 작용기작에 대해서는 자세한 것을 알지 못하는 실정이다.

본 실험에서는 사람의 신경모세포종인 SK-N-SH 세포를 이용하여, 신경퇴행성질환 등에서 세포사멸을 유도한다고 알려져 있는 세라마이드를 처리하여, 세라마이드에 의해 유도된 아포토시스 양상의 신경세포사멸을 관찰하였다. 그리고 이러한 신경세포사멸 기작에 있어서, 활성기 산소의 연관성을 확인해 보았고, 그 결과 세라마이드에 의해서 세포 내 활성기 산소의 양이 빠른 시간 안에 현저하게 증가되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과로 세라마이드에 의한 세포사멸과정에 활성기 산소가 중요하게 매개되어 작용한다는 사실을 제시할 수 있다. 또한 활성기 산소의 작용으로 손상 받는 세포 내 단백질을 비롯한 물질 중에서 아포토시스 하위단계의 조절물질로 알려져 있는 caspase와의 관련성에 대해서도 확인해 보았다. 세라마이드에 의해서 초반기에 현저히 증가된 활성기 산소가 caspase의 활성에까지 영향을 미쳐 caspase의 활성도를 높이는 것으로 생각되어진다.

과거부터 중요한 한약재로 사용해 온 자생식물이 다양한 증상 및 질환 치료제로서 그 약리효능이 탁월하다는 보고와 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있다. 본 실험에서는 Magnolol을 이용하여, 이러한 자생식물이 세라마이드에 의한 신경세포사멸에 대해 보호효과를 나타낼 수 있는지를 확인해보고자 하였고, 연구 결과 Magnolol이 세라마이드에 의한 세포사멸에 매개되어 증가하는 활성기 산소의 양을 감소시킴으로서 탁월한 항산화 작용을 나타내었으며, 초반기의 세포사멸단계를 저해한 이후, caspase 활성화 단계까지 효과적으로 차단하여 궁극적으로 신경세포보호효과를 나타내는 것을 밝혔다.

이상의 결과로 노화와 다양한 신경퇴행성질환과 관련된 신경세포사멸 기작의 중요한 지표를 제시할 수 있었으며, 나아가 이러한 질병의 예방과 치료제로서, Magnolol 등의 자생식물의 신경보호측면의 탁월한 효능에 대해서도 제시하였다. Magnolol의 어떠한 구조적 또는 생리활성적 성분이 어떠한 조절인자 및 작용기전에 의하여 항산화 및 보호효과를 나타내는지 등에 관하여서는 본 실험만으로는 미흡하며, 앞으로 더 깊은 연구가 필요한 것이라고 생각된다.

참 고 문 헌

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J : Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell 18; 87 : 171-178, 1996.

Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D : Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. Cell 17; 77 : 817-827, 1994.

Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M : Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons. J Neurochem 66 : 733-739, 1996.

Chen Yuh-Lien, Lin Kuan-Fu, Shiao Ming-Shi, Chen Ya-Ting, Hong Chuang-Ye, Lin Shing-Jong : Magnolol, a

RETRACTED

potent antioxidant from Magnolia officinalis, attenuates intimal thickening and MCP-1 eapression after balloon injury of the aorta in cholesterol-fed rabbits. Basic Res Cardiol 96 : 353-363, 2001.

Feldmann G : Liver apoptosis. J Hepatol 26 Suppl 2 : 1-11, 1997.

Halliwell B, Cross CE : Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. Environ Health Perspect 102 Suppl 10 : 5-12, 1994.

Hoehn MM, Yahr MD : Parkinsonism: onset, progression and mortality. Neurology 17 : 427-442, 1967.

Jacobson MD, Burne JF, Raff MC : Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. EMBO J 15; 13 : 1899-1910, 1994.

Chiu Jen-Hwey, Wang Juo-Chi, Lui Wing-Yiu, Wu Chew-Wun, Hong Chuang-Ye : Effect of Magnolol on in vitro Mitochondrial Lipid Peroxidation and Isolated Cold-Preserved Warm-Reperfused Rat Livers. J Surgical Research 82 : 11-16, 1999.

Kim SY, Choi YH, Huh H, Kim J, Kim YC, Lee HS : New antihepatotoxic cerebroside from Lycium chinense fruits. J Nat Prod 60 : 274-276, 1997.

IKEDA K and NAGASE H : Magnolol Has the Ability to Induce Apoptosis in Tumor Cells. Biol Pharm Bull 25 : 1546-1549, 2002.

Lightle SA, Oakley JI, Nikolova-Karakashian MN : Activation of sphingolipid turnover and chronic generation of ceramide and sphingosine in liver during aging. Mech-Ageing 1; 120 : 111-125, 2000.

Loong CC, Chiu JH, Tiao RC, Chiu YY, Wu CW, Lui WY : Protective Effects of Magnolol on the Small Intestinal Ischemia-Reperfision Injury. Transplantation Proceedings 34 : 2679-2680, 2002.

Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN : Signal transduction of stress via ceramide. Biochem J 1; 335 : 465-480, 1998.

Lin Shyr-Yi, Liu Jean-Dean, Chang Hui-Chiu, Yeh Shauh-Der, Lin Chien-Huang, Lee Wen-Sen : Magnolol Supresses Proliferation of Cultured Human Colon and Liver Cancer Cells by inhibiting DNA Synthesis and Activating Apoptosis. J Cellular Biochmistry 84 : 532-544, 2002.

Thompson CB : Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 10; 267 : 1456-1462, 1995.

Venable ME, Lee JY, Smyth MJ, Bielawska A, Obeid LM : Role of ceramide in cellular senescence. J Biol Chem 22; 270 : 30701-30708, 1995.

Vaux DL, Haecker G, Strasser A : An evolutionary perspective on apoptosis. Cell 11; 76 : 777-779, 1994.

Zhong Wen-Bin, Wang Chih-Yuan, Ho Kuo-Jang, Lu Fung-Jou, Chang Tien-Chun, Lee Wen-Sen : Magnolol induces apoptosis in human leukemia cells via cytochrome C release and caspase activation. Anti-Cancer Drugs 14 : 211-217, 2003.

RETRACTED

Korean J Phys Anthrop
16(2): 119 ~ 127, 2003

Abstract

Protective Effect of Magnolol Against Ceramide-induced Apoptosis in SK-N-SH cells

Do-Yeon Lee, Sung-Su Kim, Kyung-Yong Kim, Won-Bok Lee

Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Magnolol, isolated from the stem bark of *Magnolia officnalis*, is typical Oriental herbs. It has been known to have many biological activities such as anti-platelet aggregation, hydroxyl radical scavenging, Ca^{2+}-channel blocking, a tonic, anti-rheumatic, anti-stress, anti-inflammatory, anti-cancer action and ischemic heart disease. But, it is still unclear how they effectively regulate their various biological properties. Ceramide is emerging as a second messenger of apoptotic cell death and there is increasing evidence that ceramide is involved in neurodegenerative disease and the process of senescence. The present study investigated the effect of Magnolol on ceramide-induced apoptosis in human neuroblastoma SK-N-SH cells. We showed that ceramide induced apoptosis through the mediation of reactive oxygen species (ROS) production and Magnolol, as an effective antioxidant, significantly inhibited the increase of ROS generation, thereby preventing apoptosis. Furthermore, an increase of caspase activity (apoptosis executors) resulted from ceramide reduced by Magnolol. These results implicate that ROS play on important roles in ceramide-induced apoptosis, also Magnolol protects via effectively inhibition of ROS generation by ceramide through selective pathway.

Key words : Magnolol, Ceramide, SK-N-SH, Apoptosis, Oxidative stress, Caspase

RETRACTED

correspondence to : Woo-Bok Lee (Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University)
email : whitefox@cau.ac.kr