

가시오갈피의 세라마이드에 의한 신경세포 아포토시스 억제

이도연, 김대성, 손동섭¹, 김성수, 김경용, 이원복

중앙대학교 의과대학 해부학교실, ¹중앙대학교 의과대학 흉부외과학교실

간추림 : 가시오갈피와 석창포는 일반적으로 동양에서 자생하는 식물로서, 강장, 강정, 항염증, 피로회복제, 항암, 빈혈성 심장병 등에 이용되어 왔다. 그러나 그 작용기작은 아직까지 확실하게 알려진 바가 없다. 세라마이드(ceramide)는 아포토시스(apoptosis) 형태의 세포사멸에서 이차 신호전달 물질로 알려져 있는데, 신경퇴행성 질환과 노화 과정에서 관련이 있는 것으로 밝혀지고 있다. 본 연구에서는 사람신경모세포종(neuroblastoma cell)인 SK-N-SH 세포를 이용하여, 세라마이드에 의해 유도된 신경세포사멸에서 가시오갈피와 석창포의 각각 다른 효과를 조사하였다. 그 결과 세라마이드에 의해서 활성화된 산소(ROS)가 형성되어 아포토시스가 유발되었음을 관찰하였다. 그리고 효과적인 산화방지제인 가시오갈피에 의해서 활성화된 산소 발생의 증가가 감소되어 아포토시스를 저해하였다. 게다가, 아포토시스를 유발하는 과정에서 관여하는 물질인 caspase의 활성화 증가가 가시오갈피에 의해서 감소되는 것도 확인하였다. 그러나 석창포의 경우는 아포토시스를 저해하는 효과가 거의 없었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 활성화된 산소는 세라마이드에 의해서 유도되는 아포토시스에서 중요한 역할을 하며, 이 과정에서 가시오갈피 추출물이 일련의 기작을 통하여 세라마이드에 의해서 유도되는 활성화된 산소의 생성을 저해하는 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : 가시오갈피, 석창포, 세라마이드, 아포토시스, SK-N-SH, ROS, Caspase

서론

가시오갈피(*Acanthopanax senticosus*, 刺五加)와 석창포(*Acorus gramineus Soland*, 石菖蒲)는 각각 오갈피과와 천남성과에 속하는 다년생 초본으로서, 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 아시아 등지에서 자생하고 있는 식물이다. 예로부터 한방에서는 이들을 일명 시베리아 인삼, 석창근이라 하여, 주로 강장, 강정, 신경통, 중풍, 이뇨, 식욕부진, 고혈압, 피로회복제 등으로 이용되어 왔다(한용남 등 1981, 박문수 1994, 안진권 등 2000, 이연실 등 2001).

한편 가시오갈피와 석창포의 추출물은 동물실험

등을 통하여 진정 및 흥분 완화작용, 항산화 및 지질개선효과, 신경세포손상의 보호효과 등이 최근 활발히 연구되고 있으며, 그 중에서도 특히, 이미 가시오갈피의 eleutheroside, triterpene, lignan 등의 성분들은 항알러지 작용이나 활성화된 산소를 제거하는 항산화 작용을 할 수 있는 것으로 알려져 있다(한용남 등 1981, 황완규 등 1996). 이처럼 가시오갈피와 석창포들의 식물유래 성분들에서 자유라디칼을 제거하는 효과가 강력하게 기대되는 바이며, 활성화된 산소가 발병기전의 주요한 원인으로 알려진 여러 가지 신경퇴행성 질환의 예방, 치료제 개발에 있어 매우 유용하게 이용되어 질 수 있으리라 사료된다.

아포토시스(Apoptosis)는 세포 내의 유전자의 발현에 의해 직접적으로 발생하는 과정으로 내적, 외적인 자극에 대한 일련의 계획된 자살 행위를 의미하는(programmed cell death; PCD) 세포의 적극적인

*본 논문은 2003학년도 중앙대학교 교내 학술비 지원에 의한 것이다.

교신저자: 이원복(중앙대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: whitefox@cau.ac.kr

반응이라 할 수 있겠다(Jacobson 등 1994, Alnemri 등 1996, Feldmann 1997). 지금까지 대부분의 apoptosis 관련 유전자들이 *C. elegans* (Ellis and Horvitz 1991)에서 연구되어 왔으나, 최근 들어 포유동물 세포에서도 apoptosis를 유발하거나 억제하는 여러 조절인자들이 밝혀지고 있는데, 원인 물질로 제시되고 있는 것 중 하나가 바로 세라마이드(ceramide)에 의한 신호전달과정이다(Mathias 등 1998).

한편 세라마이드는 구조적으로 N-acyl sphingosine으로 세포막을 이루는 인지질 중 하나인 스피고마이엘린(sphingomyelin; SM = ceramide phosphocholine)이 주로 자극에 의해 활성화되는 sphingomyelinase (SMase; EC 3.1.4.12.)에 의해 생성되는 지질성 이차 신호전달물질로서 growth arrest, differentiation, apoptosis 등에서 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다(Perry DK and Hannun 1998). 현재까지 세라마이드에 관한 연구는 주로 조혈계, 특히 leukemia 세포주에 대해 연구되어 왔으나 이 스피고마이엘린 경로(SM cycle)는 세포 표면의 수용체나 환경 인자로부터의 자극을 핵으로 전달하는 일반적인 신호 전달계일 것으로 생각되고 있다(Hannun 1996). 실제로 TNF α (Obeid 등 1993, Jarvis 등 1994), IL-1 (Andrieu 등 1995), INF- γ (Kim 등 1991), Fas/APO-1 (Cifone 등 1994, Tepper 등 1995, Martin 등 1995) 등의 agonist들과 UV-irradiation (Haimovitz-Friedman 등 1994, Santana 등 1996)와 항암제(Strum 등 1994, Jaffrezou 등 1996) 등의 작용이 SM cycle을 활성화 시키거나 또는 세라마이드의 증가를 통해 작용하는 것으로 보고되었고 세포-투과성의 합성 세라마이드를 처리하거나 세균의 SMase를 처리하는 경우 SM cycle을 활성화 시키는 agonist들을 처리한 경우와 유사하게 세포사멸이 유도되므로 세라마이드가 어포토시스를 매개하는 신호전달 물질일 것으로 생각되고 있다.

또한 어포토시스는 세포 내의 정상적인 메커니즘에서 뿐만 아니라, 노화 현상이나 알츠하이머병, 파킨슨씨병 등의 신경퇴행성질환(neurodegenerative disease) 등의 주요한 병인 기전으로도 알려져 있어(Vaux 등 1994, Thompson 1995), 세라마이드를 이용한 어포토시스의 세포사멸 기작에 대한 연구는 퇴

행성 질환들의 pathology의 이해는 물론 노화의 기작을 이해하는데 중요한 단서를 제공할 것이다.

그런데 최근에는 이런 ROS가 다양한 질환과 관련하여 세포 stressor로서 작용할 뿐만 아니라 자체가 세포 사멸의 신호 전달 물질의 하나로도 작용한다는 것이 알려지고 있다. 그 증거로서 여러 가지 세포의 자극에 의해 세포내 ROS의 양이 일시적으로 증가하며, 선택적인 ROS 생성 억제가 자극-의존적인 신호전달을 완전하게 차단 할 수 있다는 것이 알려져 있다(Gamaley IA 등 1999, Rhee SG 1999). 그렇지만 아직 이런 외부자극에 의한 ROS의 특이적인 증가를 유발하는 효과기 또는 생성된 ROS의 신호를 전달 받는 효과기 등은 잘 알려져 있지 않다. 따라서 현재까지 세포 내의 세라마이드의 구체적인 명확한 작용에 대해서는 아직 연구 단계에 있으며, 세라마이드의 작용과 관련된 다양한 인자들이 밝혀지고 있긴 하나, 세라마이드에 의한 어포토시스 경로에 대해서는 구체적으로 명확하게 규명되어진 바는 없다. 더욱이 이러한 신경세포들의 어포토시스로 인한 퇴행성 질환의 보호측면에서는 연구된 바가 미흡하여, 효과적인 치료제의 연구 및 개발이 시급하게 요구되고 있다.

뿐만 아니라, 본 연구에서 사용한 한국자생식물의 보호효과에 대해서는 신경세포를 비롯한 다른 시스템에서 연구되어진 바가 거의 희박하며, 특히 세라마이드에 대한 신경보호효과에 대해서 보고된 자생식물은 매우 미흡하기 때문에 본 연구에서 세라마이드에 의한 신경세포사멸 기전과 더불어 자생식물의 신경보호효과의 여부를 확인하고자 한 것은 매우 의미 있는 연구라고 생각한다.

따라서 본 연구에서는 사람신경모세포종(neuroblastoma cell)인 SK-N-SH 세포를 이용하여, 세라마이드에 의해 유도된 신경세포사멸의 기작과 경로를 규명하고, 그 과정에서의 주요한 원인 기전으로 예상되는 활성기 산소의 생성여부와 이와 관련된 인자들의 영향을 밝히고 국내 자생 식물 유래 약물인 가시오갈피와 석창포의 추출물들이 이들 기작에 어떤 영향을 주어 신경세포 보호 효과를 나타낼 수 있는지 확인하여 자생 식물의 신경 보호 작용을 규명 하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 (Cell culture)

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

2. Cell Viability Assay (MTT reduction assay)

MTT reduction assay는 기존에 보고된 방법을 약간 변형하여 시행하였다(Shearman 등 1994, Kaneko 등 1995). 배양된 세포의 배양액에 20 μ M과 40 μ M의 세라마이드를 농도 별로 첨가한 뒤 37°C에서 5% CO₂ incubator에서 배양한다. 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 반 동안 더 배양한다. MTT의 환원에 의해서 형성된 formazan precipitate를 dissolving solution (0.1 N HCl in absolute isopropanol)에 녹인 후에 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정한다. 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 표시한다.

3. Hoechst 33258 dye staining

Apoptotic cell 내의 nuclear chromatin의 형태변화는 DNA-binding fluorochrome bis-benze (Hoechst 33258 dye)로 염색하여 관찰하였다. 0.5-3.0 $\times 10^6$ cell을 300 \times g에서 10분간 원심분리하여 모은 후 PBS로 세척하고, 세포를 50 μ l의 paraformaldehyde에 현탁한 후 상온에서 10분간 고정한다. 고정액을 제거하고 세포를 PBS로 세척한 후 16 μ g/ml의 bis-

benzimidazole을 포함한 PBS 15 μ l를 넣는다. 상온에서 15분간 방치한 후 10 μ l aliquots을 slide glass에 넣고 형광현미경 하에서 apoptotic chromatin의 변화를 관찰한다.

4. Determination of ROS generation

배양한 세포에 HCSS buffer (20 mM HEPES, 2.3 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 10 mM NaOH, 5 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 15 mM glucose) 완충액에 용해시킨 10 μ M의 DCFDA (6-carboxy-2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate, dicarboxymethyl ester)와 현탁보조제인 2% Pluronic F-127을 37°C에서 30분간 처리한다. 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 영상분석하거나, Flow cytometry (GENios, Tecan, NC, USA)를 이용하여 Excitation 파장 485 nm와 Emission 파장 510 nm에서 측정한다.

5. Caspase Activity Assay

P100 plate 당 10 $\times 10^6$ cells을 1 ml의 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaH₂PO₄/NaHPO₄, pH 7.4, 130 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM NaF)로 harvest 한 후 얻은 cell lysate 50 μ l에 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 측정한다.

결 과

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

사람 신경모세포종(neuroblastoma cell)인 SK-N-

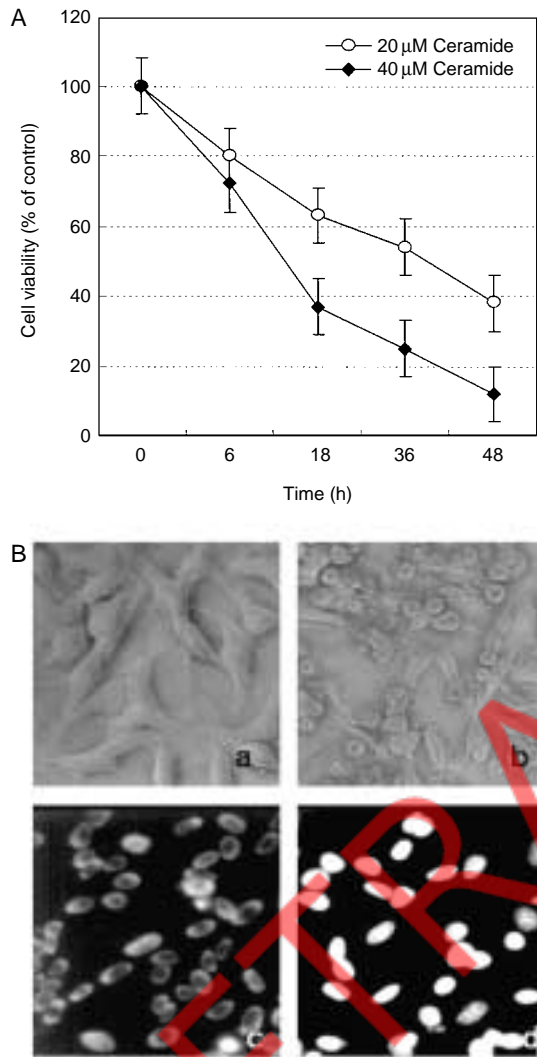


Fig. 1. Ceramide induces apoptosis in SK-N-SH neuroblastoma cells. (A) Time- and dose- dependent change of cell viability by ceramide. SK-N-SH cells were pre-incubated with 1% FBS/DMEM for 2 h and then treated with 20 and 40 μM of C2-ceramide. C2-ceramide was dissolved in ethanol (final con. < 0.1%). 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, c) or treated (b, d) with 20 μM of C2-ceramide for 24 h. The figures show Light microscopic morphology (a, b) and Hoechst 33258 staining nuclear morphology (c, d). The figures are representative for three different experiments.

SH 세포에서 C2-ceramide에 의한 세포사멸 유무와 그 양상을 관찰하기 위해서, ceramide를 처리하기 2 시간 전에 1% FBS를 포함하는 배지에서 배양하였으며, ceramide에 의해 유발된 세포사멸은 MTT reduction assay로 측정하였다. 신경모세포종 SK-N-SH에다가 세포투과성의 C2-ceramide를 각각 20 μM과 40 μM로 처리하였을 경우 시간 및 농도 의존적인 양상으로 세포사멸이 유발되었다(Fig. 1A). 20 μM과 40 μM의 ceramide 처리 후 24시간에 각각 약 40%와 65%의 세포사멸이 나타났으며, 48시간 후에는 20 μM 처리한 경우에도 60% 이상의 세포사멸이 유도되었다. SK-N-SH 세포에서 ceramide에 의한 세포사멸이 유발됨을 확인한 이후, 세포사멸양상은 어떠한지 알아보기 위해 세포의 외형적 변화와 핵 형태 변화를 확인하는 방법으로 위상차현미경과 Hoechst 33258 염색을 통해 실험을 수행하였다. 위상차현미경을 이용하여 세포외형의 변화를 24시간에 관찰한 결과 20 μM, 40 μM의 ceramide를 처리한 경우 모두에서 세포체의 응축과 분절 및 신경돌기 소실, 세포막수포현상(membrane blebbing) 등의 전형적인 아포토시스 형태의 세포사멸을 나타내었다(Fig. 1B-a, b). Hoechst 33258 염색을 이용하여 SK-N-SH 세포의 핵 형태변화를 관찰한 경우에도, 세라마이드 20 μM, 40 μM에 노출된 경우 대조군에 비해 심각한 핵 응축과 분절이 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 1B-c, d).

2. 가시오갈피와 석창포의 C2-ceramide에 의한 세포사멸에 대한 보호효과

한국 자생 식물인 가시오갈피와 석창포 추출물이 ceramide에 의해 유발되는 SK-N-SH 신경세포 사멸을 보호할 수 있는지 알아보기 위하여, ceramide를 처리하기 2시간 전에 1% FBS를 포함하는 배지와 함께 5 ng/μl의 가시오갈피와 석창포 추출물을 각각 전 처리 하였다. 20 μM의 ceramide를 24시간 처리한 후, MTT reduction assay로 세포생존율의 변화를 측정하였으며(Fig. 2), 그 결과 20 μM의 ceramide를 24시간 처리 후 약 40%의 세포가 사멸되는 것으로 나타났으며, 가시오가피를 전 처리한 후

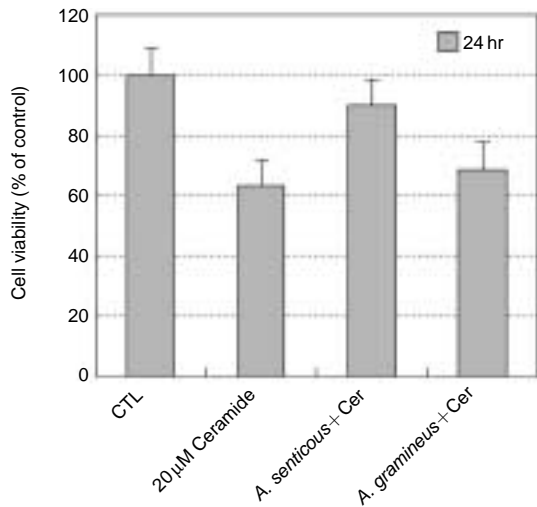


Fig. 2. Effect of *A. senticosus* and *A. gramineus* on ceramide induced neuronal cell death. SK-N-SH cells were pre-treated with 5 ng/µl of *A. senticosus*, *A. gramineus* for 2 h and then treated with 20 µM of C2-ceramide. Cell viability was determined by MTT assay at 24h after 20 µM C2-ceramide treatment. SK-N-SH cells were untreated control (CTL) or treated with 20 µM of C2-ceramide for 24 h (Ceramide). Pretreatment of SK-N-SH cells with 5 ng/µl of *A. senticosus* (*A. senticosus*+Ceramide) or *A. gramineus* (*A. gramineus*+Ceramide) were treated with 20 µM of C2-ceramide for 24 h.

ceramide를 처리한 군에서는 ceramide만 단독으로 처리한 군에 비해 살아있는 세포의 생존율이 30% 이상 높게 나타났다. 반면 가시오갈피에 의한 세포 사멸에 대한 영향과는 다르게, 석창포 추출물을 전 처리한 후 ceramide를 처리한 군의 세포생존율은 ceramide만 단독으로 처리한 경우에 비해 약간의 세포생존율을 높였으나 크게 의미 있는 변화는 아니었다. 또한 위상차현미경을 이용하여 세포의 형태학적 양상을 관찰한 결과에서도 20 µM의 C2-ceramide에 의해 유도되는 신경돌기의 손실 및 세포막의 수포화와 같은 아포토시스의 형태적 변화가 나타났으며, 가시오갈피를 전 처리한 경우에는 그러한 아포토시스 양상의 변화가 효과적으로 감소하였다. 반면, 석창포를 전 처리한 경우에는 아포토시스 형 세포사멸에 대해 효과적인 저해효과는 관찰할 수 없었다.

3. C2-ceramide에 의한 활성기 산소의 증가와 가시오갈피, 석창포의 보호효과

생체에서 발생하는 자유라디칼의 이차생성물인 활성기 산소종(Reactive oxygen species; ROS)은 세포내의 DNA, 단백질, 생체막 등을 공격하여 과산화 지질이나 여러 가지 유해한 산화 분해물을 생성함과 더불어 생체조직을 손상시켜, 결국 여러 질환 및 증상의 주요한 원인물질로 알려져 있다. 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. 3). 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 5 ng/µl의 가시오갈피와 석창포 추출물을 각각 전처리 한 경우에, 증가된 활성기 산소가 가시오갈피에 의해 대조군에서의 수준으로 현저하게 감소되었으며, 이로서 가시오갈피의 세포보호 효과가 세라마이드에 의해 증가된 활성기 산소를 억제하는 항산화적 작용이 효과적으로 나타난 것임을 예상할 수 있었다. 반면에 석창포의 경우에는 이러한 활성기 산소를 효과적으로 저해하는 데에 실패하였으며, 이것은 석창포의 미비한 세포보호효과와 일치하는 결과라 하겠다. 각각의 대조군과 실험군에서 활성기 산소의 정량적인 양은 Flow cytometry를 이용하여 485 nm의 Excitation 파장과 510 nm의 Emission 파장에서 측정하여 상대적으로 나타내었다 (Fig. 3E). 이 결과는 앞에서 시행한 형광 현미경상에서 관찰한 결과와 비슷한 양상을 보여준다.

4. C2-ceramide에 의한 세포사멸에서 caspase와의 관련성 및 가시오갈피, 석창포의 보호효과

아포토시스의 하위단계에서 세포사멸에 관여하는

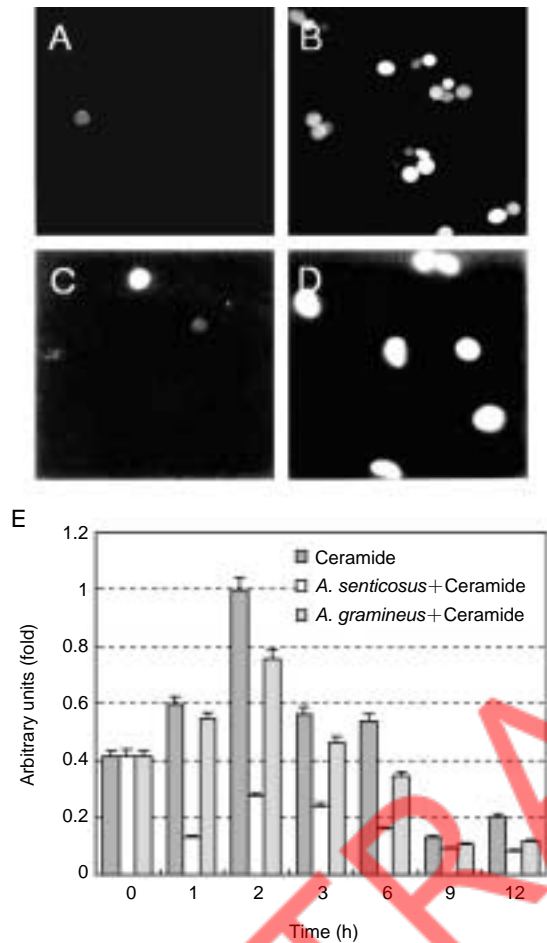


Fig. 3. Determination of ROS generation levels by ceramide after pretreatment with *A. senticosus* or *A. gramineus*. SK-N-SH cells were untreated control (A) or treated with 20 μM of C2-ceramide for 2 h (B). Pretreatment of SK-N-SH cells with 5 ng/μl of *A. senticosus* (C) or *A. gramineus* (D) was treated with 20 μM of C2-ceramide for 2 h. Hydrogen peroxide generation induced by ceramide was measured by incubation with fluorescent probe 6-carboxy-2',7'-dichloro-dihydrofluoresceine diacetate, dicarboxymethyl ester (DCF-DA). The figures are representative for three different experiments. (E) Quantification of fluorescent level was estimated using Flow cytometry at indicated time points. Fluorescent levels are expressed as arbitrary units of relative value.

중요한 인자 중의 하나인 caspase의 활성화가 ceramide에 의한 신경세포사멸 과정에 활성화 산소와

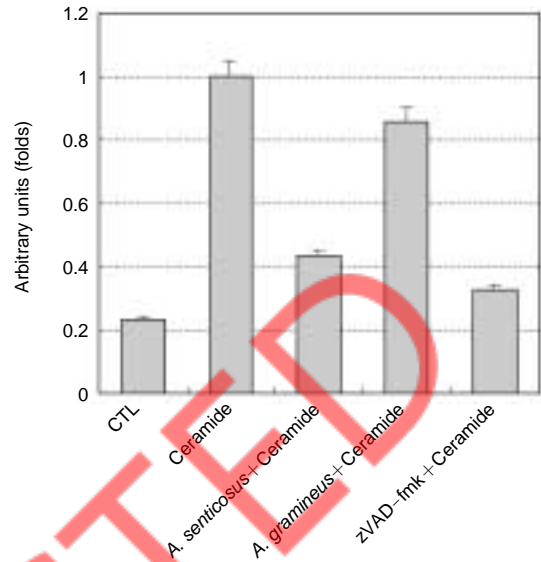


Fig. 4. Effect of *A. senticosus* and *A. gramineus* on caspase activity was increased by ceramide. Relative caspase activities were induced by C2-ceramide after pre-treatment with *A. senticosus*, *A. gramineus* or zVAD-fmk. Control was untreated SK-N-SH cells (CTL). Cells were treated with 20 μM of C2-ceramide (Ceramide). Also, cells were incubated with either 5ng/μl of *A. senticosus* (*A. senticosus*+ceramide), *A. gramineus* (*A. gramineus*+ceramide), or 10 μM zVAD-fmk (zVAD-fmk+ceramide) for 2 h, followed treated with 20 μM of C2-ceramide. Enzymatic activity is expressed as arbitrary units of relative value.

더불어 관련되어 있는지를 알아봄과 더불어 자생식물의 보호효과 여부가 caspase 단계에까지 영향을 미치는가를 알아보기 위하여, 아래와 같은 실험을 시행하였다. 가시오갈피오와 석창포를 전처리 한 후 20 μM의 ceramide를 처리한 후 6시간이 경과할 때, 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 6시간 처리하였을 때, 활성화된 caspase가 아무 것도 처리하지 않은 대조군에 비하여 5배 이상 현저한 증가를 보였으며, pan caspase inhibitor인 zVAD-fmk를 10 μM 농도로 전 처리 한 후 ceramide를 처리한 경우에는 대조군 수준으로

caspase 활성화도가 확연하게 저해되었다(Fig. 4). 이것은 ceramide에 의한 세포사멸과정이 caspase 활성화 단계를 매개하여 독성을 나타내는 것을 의미하며, 가시오갈피와 석창포가 이러한 단계에 영향을 미치는가를 확인하기 위하여, ceramide를 처리하기 2시간 전에 1% FBS를 포함하는 배지와 함께 5 ng/ μ l의 가시오갈피와 석창포 추출물을 각각 전 처리 한 후 caspase 활성화 정도를 마찬가지로 측정하였다. 그 결과 가시오갈피를 전 처리하였을 때, 증가된 caspase의 활성화 정도가 60% 이상의 감소 현상이 나타났으며, 동량의 석창포를 전 처리한 경우에는 단지 10% 내외의 값이 나타난 정도로 caspase 활성을 의미 있게 감소시키지 못하였다.

이러한 결과는 ceramide에 의해 유발되는 세포사멸 기작에서 caspase가 관여하고, 가시오갈피가 활성화 산소의 저해와 더불어, 활성화된 caspase를 효과적으로 저해시킴으로서 세포보호기작을 나타낼 수 있다. 반면에 석창포는 그러한 활성화 산소와 하위의 caspase 활성화 경로를 의미 있게 차단하지 못하며, 결국 ceramide에 의한 신경세포사멸에서는 보호 효과를 나타내지 못함을 알 수 있었다.

고 찰

최근 들어 경제가 발달하고 의학과 생명과학이 발달함에 따라 평균수명이 증가되어 사회적으로 노인인구가 크게 증가하게 되면서 삶의 질의 측면과 사회적 비용의 측면에서 현재 노인 사망의 많은 원인을 차지하는 암과 신경계 질환에 대한 관심이 커지고 있다. 이 두 가지는 공통적으로 세포사멸기작의 이상으로 인한 것이라는 시각이 최근의 공통된 주류 연구시각인데, 이런 병리 기작을 밝히는 것은 이들 질환의 치료 및 예방을 위한 적절한 방지 전략과 선택적인 치료제 개발에 필수적이라고 할 수 있다.

본 실험에서 신경계 질환의 치료 개발의 측면에서, 신경세포사멸을 유발시키는 독소로서 세라마이드를 사용하여 실험하였다. 세라마이드는 세포막을 구성하며 정상적인 세포 내 신호 전달을 매개하고

조절하는 이차 신호전달물질로의 작용 이외에도, 신경세포를 포함하는 다양한 세포 및 조직에서 아포토시스 형태의 세포사멸을 유발하는 중요한 원인 인자로 작용한다고 알려져 있다(Brugg 등 1996). 그러나 사람신경세포종에서의 세라마이드에 의해 유도되는 세포사멸 기작에 대해서는 많은 부분 연구가 진행되어 있지는 않았기에 본 연구에서 시행한 신경세포에서의 세라마이드에 대한 연구의 가치는 충분히 찾을 수 있을 것이다.

세라마이드의 축적에 의한 결과로 인한 세포사멸은 노화 현상 및 알츠하이머병이나 파킨슨씨병 등 신경 퇴행성 질환에서 나타나는 아포토시스 양상의 세포사멸과 관련되어 있을 것으로 생각되어진다. 그 이유에 대해서는 몇 가지 증거를 찾아볼 수 있는데, 우선 세라마이드를 생성하는 효소인 스핑고마이엘리네이스가 노화 모델 생쥐의 대뇌 겉질에서 증가한다는 보고가 한 예이며(Kim 등 1997), 노화 모델의 세포에서 노화 형질 발현에 스핑고마이엘리네이스 및 스핑고마이엘린이 관여한다는 보고 또한 그 예로 들 수 있겠다(Vaneble 등 1995, Lightle 등 2000).

한편, 다양한 스트레스 상황 하에서 과도한 활성화 산소의 생성이 나타난다. 이러한 활성화 산소는 세포 내 여러 효소 단백질이나 DNA 등 거대분자의 산화적 손상을 유도하고, 궁극적으로 세포사멸로까지 일으킨다고 알려져 있다(Behl 등 1994). 그러나 본 시스템에서 연구한 신경독성물질들에 의한 세포사멸 신호전달에서의 활성화 산소의 관련성 및 그 작용기전이나 차단 기전에 대해서는 많은 연구가 진행된 바가 없다.

본 실험에서는 사람의 신경모세포종인 SK-N-SH 세포를 이용하였으며, 신경퇴행성질환을 비롯한 다양한 스트레스 및 세포 내외 자극으로서, 세포사멸을 유발하는 물질 중 하나로 알려져 있는 세라마이드를 처리하여 실험하였다. 그 결과 아포토시스 양상의 신경세포사멸이 유도됨을 관찰할 수 있었다. 그리고 세라마이드에 의한 신경세포사멸 기작에 있어서, 매우 유력한 매개 단계로서 예상해 볼 수 있었던, 활성화 산소의 연관성을 DCF-DA staining을 통해 활성화 산소 발생을 측정하여 확인하였다. 그

결과 세라마이드에 의해서 세포 내 활성기 산소의 양이 빠른 시간 안에 현저한 수준의 차이를 보이며 증가하는 것을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 세라마이드에 의한 세포사멸과정에 활성기 산소가 중요하게 매개되어 신경세포사멸 경로를 자극하는 요인으로서 작용한다는 사실을 제시해 주는 것이라 하겠다.

Caspase는 아포토시스 양상을 띠는 다양한 자극이나 스트레스 상황에서 중요한 세포사멸 조절자로 작용한다고 널리 알려져 있다(Nicholson 등 1995, Schlegel 등 1996). 또한 활성기 산소의 작용으로 손상 받은 세포 내 단백질을 비롯한 물질 중에서 아포토시스 하위단계의 조절물질인 caspase의 활성 유도가 여러 차례 보고된 바 있는데(McGowan 등 1996, Higuchi 등 1998, Matsura 등 1999), 본 시스템에서도 활성기 산소와 caspase활성 간의 관련성에 대해서 확인해 보았다. 예상했던 바와 같이 세라마이드에 의해서 초반기에 현저히 증가된 활성기 산소가 하위 메커니즘인 caspase의 활성화까지 영향을 미쳐 caspase의 활성도를 높이는 것으로 나타났다. 이는 본 시스템에서 세라마이드에 의한 활성기 산소와 caspase 간의 긴밀한 상호 작용을 암시해 주는 부분이며, 세라마이드에 의한 세포사멸을 차단할 수 있는 기전으로, 활성기 산소 제거와 caspase 차단을 통해서 가능할 수 있다는 것을 제시해 주는 것이다.

구체적으로 어떠한 성분들이 작용하는가는 아직 많은 부분 밝혀지지 않은 채로 남아있지만, 다양한 증상 및 질환 치료제로서 과거부터 현재에 이르기까지 오랜 시간동안 중요한 한약재들로서 사용해 온 우리나라의 자생 식물들에 관한 탁월한 약리 효능을 입증하는 보고와 연구가 국내외에서 차츰 활발하게 진행되고 있다. 자생 식물들의 효능과 유효한 효과 등에 대해서 기대되는 바가 큰 만큼 연구 가치도 상당하며, 기초학문 뿐 아니라 산업적인 측면에까지도 이바지하는 바가 클 것이다.

본 실험에서는 신경세포 시스템에서 한국자생식물 중에 유효하다고 생각되었던 가시오갈피와 석창포 추출물을 이용하였으며, 이와 같은 자생식물이 세라마이드에 의한 신경세포사멸에 대해 보호효과를 나타낼 수 있는지를 확인해보고자 하였다. 그 결

과 가시오갈피가 세라마이드에 의한 신경세포사멸에 중요하게 매개하여 세포사멸을 유도하는 활성기 산소의 증가된 양을 효과적으로 감소시킴으로서 탁월한 항산화 작용을 나타내었다. 뿐만 아니라 초반기의 세포사멸단계인 활성기 산소 증가를 저해한 이후, 하위 caspase 활성화 단계까지 효과적으로 차단하여 궁극적으로 신경세포보호효과를 나타내는 것을 밝혔다. 아마도 가시오갈피는 직접적으로 구조 혹은 기능적으로 활성기 산소종을 제거시키는 역할을 하거나, 간접적으로 여러 촉진 인자와 상호작용하여, Superoxide dismutase, catalase 등의 세포 내의 다양한 항산화 시스템을 효과적으로 활성화 시킬 수 있었던 것으로 추측된다.

그러나, 또 다른 자생 식물인 석창포의 경우에 있어서는 가시오갈피와 같은 의미 있는 보호 효과를 확인하지 못하였는데, 그 원인에 대해 고려해 본다면, 첫째로 석창포의 효능이 신경 세포 시스템에서는 보호 효과를 나타내지 못하였을 것이라 생각할 수 있다. 항염증제, 항암제 등의 효과 등이 있는 것으로 알려져 있으므로, 혈구세포나 심장 및 기타 다른 세포나 조직에 대하여서는 그 효과를 충분히 나타낼 수 있으리라 생각되며, 둘째로, 석창포가 보호 효능을 나타내기에는 세포사멸을 유도시키는 시스템으로서 세라마이드의 농도가 맞지 않았음을 예상해 볼 수 있겠다. 마지막으로, 석창포에 의한 자체독성은 없어 세포에는 영향을 미치지 않았지만, 석창포의 효능을 나타내는 데는 그 농도가 다소 불충분하였음도 고려해 볼 수 있겠으며, 이에 대한 부분은 앞으로 석창포 연구에 적용하여 고려해야 할 부분이다.

이상의 결과로 본 연구에서는 세라마이드와 관련된 노화와 다양한 신경퇴행성질환에서의 신경세포사멸 기작의 중요한 지표로서 활성기 산소와 caspase 등을 제시할 수 있었다. 퇴행성 질병의 예방 및 치료제로서 사용 가치의 잠재성이 탁월하게 예상되는 가시오갈피라는 우리나라 자생 식물의 신경보호 측면의 효능에 대해서도 의미 있게 제시하였다. 구체적으로 가시오갈피의 어떠한 성분이 세포 내의 어떠한 경로와 조절인자와 작용하는지, 어떻게 항산화 시스템을 활성화 시킬 수 있는지, 항산화 작용

기전 등에 관하여서는 본 실험만으로는 미흡하다. 따라서 앞으로 가시오갈피의 성분 분석과 각각의 성분의 효능 입증에 필요하며, 세라마이드에 의한 세포사멸 경로에 관여하는 인자들과의 상호 작용 및 항산화 효소의 활성 변화에 대한 영향 등 좀 더 깊이 있는 연구가 진행 되어져야 할 것이라고 생각 된다.

참 고 문 헌

- 박문수 : 약용식물 “가시오갈피” 실생번식 기술개발, 후속과 휴면타과과정 거쳐 종자발아에 성공. 연구와 지도 35 : 88-91, 1994.
- 안진권, 이위영, 오성진, 박유현, 허성두, 최명석 : 가시오갈피 나무의 eleutheroside E 및 chlorogenic acid 성분함량. 한국입학회지 89 : 216-222, 2000.
- 이연실, 정상훈, 임순성, 지준, 이상현, 신국현 : 가시오갈피줄기의 물추출물이 지질대사에 미치는 영향, 생약학회지 32 : 103-107, 2001.
- 한용남, 권은경, 한병훈 : 인삼과 가시오갈피의 지질과 산화 억제작용에 관한 비교연구. 생약학회지 12 : 26-30, 1981.
- 황완규, 최수부, 김일혁 : 가시오갈피 및 두충 혼합엑기스의 생리활성 : Kor. J. Pharmacogn 27 : 65-74, 1996.
- Andrieu NR, Salvayre JP, Jaffrezou, Levade T : Low temperatures and hypertonicity do not block cytokine-induced stimulation of the sphingomyelin pathway but inhibit nuclear factor-kappa B activation. Journal Of Biological Chemistry 270 : 24518-24524, 1995.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thotnberry NA, Wong WW, Yuan J : Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell 87 : 171, 1996.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D : Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. Cell 17 : 817-827, 1994.
- Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M. : Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons. J Neurochem 66 : 733-739, 1996.
- Cifone MG, De Maria R, Roncaioli P, Rippo MR, Azuma M, Lanier LL, Santoni A, Testi R : Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. Journal Of Experimental Medicine 180 : 1547-1552, 1994.
- Ellis RE, Horvitz HR : Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in amyotrophic lateral sclerosis. Exp Neurol 124 : 64-72, 1991.
- Feldmann : Liver apoptosis. J Hpatol 26 : 2-11, 1997.
- Gamaley IA, IV Klyubin : Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. International Review Cytology 188 : 203-255, 1999.
- Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z, Kolesnick RN : Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. Journal Of Experimental Medicine 180 : 525-535, 1994.
- Hannun YA : Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. Science 274(5294) : 1855-1859, 1996.
- Higuchi M, Honda T, Proske RR, Yeh ET : Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases. Oncogene 17 : 2753-2760, 1998.
- Jacobson MD, Burne JF, Raff MC : Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. EMBO J 13 : 1899-1910, 1994.
- Jaffrezou JP, Levade T, Bettaieb A, Andrieu N, Bezombes C, Maestre N, Vermeersch S, Rousse A, Laurent G : Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. EMBO J 15 : 1417-1424, 1996.
- Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz DA, Grant S : Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. Proc Natl Acad Sci USA 91 : 73-77, 1994.
- Kaneko I, Yamada N, Sakuraba Y, Kamenosono M, Tutumi S : Suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase, a primary target of beta-amyloid, and its derivative racemized at Ser residue. J Neurochem 65 : 2585-2593, 1995.
- Kim MY, Linardic C, Obeid L, Hannun Y : Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. Journal Of Biological Chemistry 266 : 484-489, 1991.
- 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.
- 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 : 111-125, 2000.
- Martin SJ, Newmeyer DD, Mathias S, Farschon DM, Wang HG, Reed JC, Kolesnick RN, Green DR : Cell-free reconstitution of Fas-, UV radiation- and ceramide-induced apoptosis. *Embo Journal* 14 : 5191-5200, 1995.
- Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN : Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* 335: 465-80, 1998.
- Matsura T, Kai M, Ito H, Yamada K : Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells requires caspase-3 activation. *Free Radic Res* 30 : 73-83, 1999.
- McGowan AJ, Ruiz-Ruiz MC, Gorman AM, Lopez-Rivas A, Cotter TG : Reactive oxygen intermediate (s) (ROI) : common mediator (s) of poly (ADP-ribose)polymerase (PARP) cleavage and apoptosis. *FEBS Letter* 392 : 299-303, 1996.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday N, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miller DK : Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376 : 37-43, 1995.
- Obeid LM, Linaudic CM, Karolak LA, Hannun YA : Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259 : 1769-1771, 1993.
- Perry DK, Hannun YA : The role of ceramide in cell signaling. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1436 : 233-243, 1998.
- Rhee SG Redox signaling : hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 31 : 53-59, 1999.
- Santana P, Penya LA, Haimovitz-Friedman A, Martin S, Green D, McLoughlin M, Cordon-Cardo C, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R : Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 86 : 189-199, 1996.
- Schlegel J, Peters I, Orrenius S, Miller DK, Thornberry NA, Yamin TT, Nicholson DW : CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 271: 1841-1844, 1996.
- Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL : Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 15 : 1470-1474, 1994.
- Strum JC, Small GW, Pauig SB, Daniel LW : 1-beta-D-Arabinofuranosylcytosine stimulates ceramide and diglyceride formation in HL-60 cells. *Journal Of Biological Chemistry* 269 : 15493-15497, 1994.
- Tepper CG, Jayadev S, Liu B, Bielawska A, Wolff R, Yonehara S, Hannun YA, Seldin MF : Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 8443-8447, 1995.
- Thompson CB : Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267 : 1456-1462, 1995.
- Vaux DL, Haecker G, Strasser A : An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76 : 777, 1994.
- Venable ME, Lee JY, Smyth MJ, Bielawska A, Obeid LM : Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem* 22 : 30701-30708, 1995.

Abstract

**Attenuated Ceramide-induced Neuronal Apoptosis by
*Acanthopanax senticosus***

Do-Yeon Lee, Dae-Seong Kim, Dong-Suep Sohn¹,
Sung-Su Kim, Kyung-Yong Kim, Won-Bok Lee

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

¹Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine,
Chung-Ang University, Seoul, Korea

Both *Acanthopanax senticosus* and *Acorus gramineus Soland* are typical Oriental herbs. They have been used as a tonic, anti-rheumatic, anti-inflammatory, anti-stress, anti-cancer agent. 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 different effects of *A. senticosus* and *A. gramineus* 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 *A. senticosus*, 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 *A. senticosus*. But *A. gramineus* had almost no protective effects. These results implicate that ROS play on important roles in ceramide-induced apoptosis, also *A. senticosus* protects effectively via inhibition of ROS generation by ceramide through selective pathway.

Key words : *A. senticosus*, *A. gramineus*, Ceramide, SK-N-SH, Apoptosis, Oxidative stress, Caspase