

원 저

## 還少丹이 영양혈청 결핍성 PC12 신경세포의 apoptosis에 미치는 영향

임준식<sup>1)</sup>, 김명선<sup>2)</sup>, 소홍섭<sup>2)</sup>, 이지현<sup>1,2)</sup>, 한상혁<sup>1)</sup>, 허윤<sup>1)</sup>, 박래길<sup>1,2)</sup>, 문병순<sup>1)</sup>  
원광대학교 한의학 전문대학원<sup>1)</sup>, 의과대학 미생물학교실<sup>2)</sup>

### Protective Effects of *Hwansodan*(*Huanshao-dan*) Water Extract in Serum Deprivation-induced Apoptosis of PC12 Cells

Jun-Sik Lim<sup>1)</sup>, Myung-Sunny Kim<sup>2)</sup>, Hong-Seob So<sup>2)</sup>, Jienny Lee<sup>1,2)</sup>, Sang-Hyuk Han<sup>1)</sup>,  
Yun Heo<sup>1)</sup>, Rae-Kil Park<sup>1,2)</sup>, Byung-Soon Moon<sup>1)</sup>

Professional Graduate School of Oriental Medicine<sup>1)</sup> and Department of Microbiology School of Medicine<sup>2)</sup>, Wonkwang University

**Objectives :** This study was designed to investigate the neuroprotective effect of *Hwansodan*(*Huanshao-dan*) on the apoptosis induced by withdrawal of neurotrophic support.

**Methods :** PC12 pheochromocytoma cells have been used extensively as a model for studying the cellular and molecular effects of neuronal cells. The viability of cells was measured by MTT assay. We used DNA fragmentation and caspase 3-like protease activation assay.

**Results :** The water extract of *Hwansodan*(*Huanshao-dan*) significantly showed protective effects on serum and glucose deprivation-induced apoptotic death. *Hwansodan*(*Huanshao-dan*) also prevents DNA fragmentation and caspase 3-like protease activation, representing typical neuronal apoptotic phenomena in PC12 pheochromocytoma cells and induces tyrosine phosphorylation of proteins around 44 kDa, which was identified as ERK1 with electrophoretic gel mobility shift by Western blot. In addition, MAPK kinase(MEK) inhibitor PD98059 and Ras inactivator,  $\alpha$ -hydroxyfarnesylphosphonic acid attenuated the neuroprotective effects of *Hwansodan*(*Huanshao-dan*) in serum-deprived PC12 cells.

**Conclusions :** These results indicate that Ras/MEK/ERK signaling pathway plays a key role in neuroprotective effects of *Hwansodan*(*Huanshao-dan*) in serum-deprived PC12 cells. Taken together, we suggest the possibility that *Hwansodan*(*Huanshao-dan*) might provide a neurotrophic-like activity in PC12 cells. (*J Korean Oriental Med* 2000;21(4):64-72)

**Key Words:** *Hwansodan*(*Huanshao-dan*) water extract, Neuronal apoptosis, Phosphotyrosine, Ras/MEK/ERK

## 서 론

- 접수 : 2000년 10월 11일 · 채택 : 12월 8일
- 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 심계내과학교실  
(Tel. 063- 850-2102, Fax. 063- 841-0033, E-mail : moonbs58@hanmail.net)
- 본 논문은 BK21 한의학 전문대학원(2000)에서 지원하는 연구비에 의하여 지원되었음.

還少丹은《洪氏集驗方》<sup>1)</sup>과《醫方集解》<sup>2)</sup>에 수록된 처방으로 溫補脾腎, 養心安神의 효능으로 脾腎虛寒으로 인한 一切虛損, 神志俱耗, 筋力頓衰, 血氣羸乏 등에 활용되었으며<sup>1-3)</sup>, 최근에는 주로 노인성이나 혈

관성으로 인한 치매 등 퇴행성 뇌질환에 응용되고 있다<sup>4,5)</sup>.

韓醫學에서는《靈樞·海論》<sup>6)</sup>에서 “腦爲髓之海……髓海不足 則腦轉耳鳴 脛痠眩冒 目無所見 懈怠安臥”、《素問·刺禁論篇》<sup>7)</sup>에서 “腦爲髓之海 眞氣之所聚”라 하여 腦를 髓液이 모이는 곳이라고 설명하고 있으며,《靈樞·經脈篇》<sup>6)</sup>에서는 “人始生 先成精 精成而腦髓生”이라 하여 精이 먼저 生한 후에 精에 의하여 腦髓가 발생한다고 하였다.

뇌의 노화에 대하여 韓醫學에서는 나이가 많아지면 氣血不足과 腎精의 虧虛로 髓海不足을 야기하여 腦髓가 점차로 空虛해진다<sup>4,8)</sup>고 설명하고 있으며, 서양의학에서는 뇌의 미만성 위축과 뇌신경세포의 소실로 인한 뇌의 기질적 변성과 뇌의 각종 신경전달물질의 감소 등 뇌의 퇴행성 변화로 인하여 발생하는 것으로 인식하고 있다<sup>9,10)</sup>.

또한 뇌신경세포의 손상은 아미노산 글루타메이트에 의해 매개되는 흥분성 신경전달계의 발현을 통하여 점차 설명이 가능해지기 시작하였는데, 이를 흥분독성(excitotoxicity)이라고 한다. 흥분독성의 기전으로는 이온통로를 통한 칼슘의 세포내 유입이 중요하다고 알려져 있고<sup>11)</sup>, 산소유리기에 의한 산화성 손상도 관여하는 것으로 보고<sup>12,13)</sup>되어 있으며, 최근에는 이러한 기전 이외에 아포토시스(apoptosis)가 신경계 질환의 신경세포사망과 관련되어 있다는 증거들이 축적되고 있다<sup>12,14)</sup>.

還少丹에 대한 연구로는 徐<sup>15)</sup>는 뇌조직의 산소유리기에 의해 진행되는 뇌조직의 산화작용에 還少丹이 노화를 지연시킨다는 보고를 하였으나, 還少丹이 신경세포의 아포토시스에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 퇴행성 뇌질환에 활용되고 있는 還少丹이 뇌세포의 아포토시스에 미치는 영향을 알아보기 위하여 신경세포의 특성을 지니는 PC12세포에 영양공급을 차단한 상태에서 세포의 생존율, 염색사 응축과 핵분열, DNA ladder현상, caspase계 cysteine protease 활성도, mitogen activated protein kinase (MAPK)의 활성도 등을 관찰하였던 바 유의한 결과

를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 세포주

PC12세포는 쥐의 부신수질 암세포(rat adrenal pheochromocytoma cell)로서 한국 세포주은행에서 구입하여 CO<sub>2</sub> 세포배양기(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10% fetal bovine serum(FBS)가 포함된 dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 배양액으로 배양하였다.

#### 2) 약재

실험에 사용한 還少丹의 처방은 《醫方集解》<sup>2)</sup>에 거하였으며, 약재는 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 1첩의 내용과 분량은 Table 1과 같다.

#### 3) 시약 및 기기

DMEM, glucose-free DMEM, FBS, 항생제 및 trypsin 등의 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL Co.(Grand Island, NY, U.S.A.)로부터 구입하였으며, 세포배양용기(24 well plate와 10 cm dish)는 Falcon (Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 세포 및 핵염색과 관찰에 이용한 slide chamber는 Nunc Co.(Germany)로부터 구입하여 사용하였다. Methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl, tetrazolium bromide(MTT), Hoechst 33258, BCA, sodium dodesyl sulfate(SDS), DMSO는 Sigma(St. Louis, Missouri, U.S.A.)로부터 구입하였고 PD98059, AMC-DEVD 등은 Calbiochem Co.(San Diego, CA, U.S.A.)로부터 구입하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 검액의 조제 및 PC12세포의 배양

還少丹 4첩 분량을 3,000 ml 환저 플라스크에 증류수 1,500 ml와 함께 넣은 다음, 120분간 가열하여 얻은 전탕액을 여과지로 여과한 뒤 5,000 rpm으로 30분간 원심분리하고 rotary vacuum evaporator에 넣어 감압 농축한 후 동결건조기로 완전히 건조하여 시료

를 조제하였으며, eppendorf tube에 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹여서 냉장보관하면서 사용시에는 DMEM에 희석해서 사용하였다. PC12세포의 배양은 CO<sub>2</sub> 세포배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 배양하였다. 약 48시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포에 還少丹을 처리한 후 실험을 시행하였다.

### 2) 세포 생존율 측정

PC12세포를 세포배양용기(24well plate)에 10%FBS/DMEM으로  $1 \times 10^5/\text{ml}$ 의 세포를 24시간 동안 정치시켜 부착시킨 후 혈청이 제거된 DMEM으로 세척하여 영양성분을 모두 제거한 상태에서 還少丹을 처리한 다음 각각의 시간차에 따라서 세포 생존율(viability)을 측정하였다. 세포의 생존율은 MTT assay<sup>16)</sup>와 crystal violet 염색법<sup>16)</sup>을 이용하였다. 약제 처리 후 최종시간에 모든 배양액을 제거한 후 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MTT용액을 넣어 3시간 동안 37°C 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 불용성의 formazan을 확인한 후 DMSO에 의해 녹여낸 다음, ELISA reader(Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, U.S.A.)로 540 nm의 파장하에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 얻은 값은 평균을 내어 대조군에 비교한 백분율(%)로 나타내었다.

### 3) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

PC12세포를 4°C에서 15분 동안 lysis buffer (1% TritonX-100, 0.32M sucrose, 5mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris-HCl, pH 8.0)에서 용해하고 14,000 rpm으로 15분 동안 원심분리시켰다. 원심분리한 후 얻은 상층액은 bicinchoninic acid 용액에 30분간 반응시켜 얻은 흡광도(OD<sub>540</sub>)를 이용하여 정량하였다. 동량의 전체 단백질은 caspase assay buffer(100mM hepes, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1mM PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 2mM DTT, pH 7.5)에 희석되어 형광표지된 기질 50  $\mu\text{M}$  AMC-DEVD (7-amino-4-coumarin-aspartic acid-

glutamic acid-valine-aspartic acid: AMC-DEVD)과 37°C에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer(Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, U.S.A.)로 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(380nm)와 emission wavelength(460nm)를 사용하였다.

### 4) DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위하여 genomic DNA 추출은 Wizard genomic DNA purification kit(Promega Co., Medison, U.S.A.)를 이용하여 추출하였다. 먼저 還少丹이 처리된 PC12세포에 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴하고 RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260nm와 280nm의 spectrophotometer(Beckman Co., Du-7 Model, Palo Alto, CA, U.S.A.)하에서 흡광도를 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5  $\mu\text{g}$ 을 1.8% agarose gel에서 전기영동(50 voltage, 2시간)을 실시한 후, ethidium bromide로 염색하여 자외선 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

### 5) Western blotting

배양된 PC12세포에 還少丹을 다양한 시간동안 처리 후 세포를 포집하여 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS)로 2회 세척하였다. 얻은 세포는 파쇄 용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100  $\mu\text{M}$  phenylarsine oxide)으로 얼음 위에서 용해하였다. 용해세포 부유액에 2배의 sample buffer(5mM EDTA, 4% SDS, 20% glycerol, 200mM Tris, pH 6.8, 0.06% bromophenol blue)와 섞어 100°C에서 3분간 끓인 후 10% SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4°C, 30 V에서 16시간 동안 transfer한 후 blocking buffer(5% skim milk)로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 인산화타이로신(phosphotyrosine)에

대한 항체(Santa Cruz Co., San Diego, CA, U.S.A.)를 tris-buffered saline(TBS)에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 이차항체인 anti-mouse IgG conjugated horse-radish peroxydase(TBS로 1:1,000으로 희석, Amersham Co., Buckinghamshire, England)와 상온에서 1시간 동안 반응시키고 enhanced chemiluminescence kit(Amersham, England)를 사용하여 필름에 노출시켜 얻은 후 같은 membrane을 0.1 M glycine(pH 2.5) 용액으로 세척하여 항체반응을 제거한 후 다시 extracellular signal regulated kinase(ERK1/2)에 대한 항체로 반응시켜 마찬가지로 방법으로 필름에 노출시켰다.

6) 통계 처리<sup>17)</sup>

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의 평균(Mean)과 표준편차(S.D.)를 산출하여 나타내고 student's t-test로 검정하였다.

실험성적

1. 영양공급을 차단한 PC12세포의 사멸과정에 미치는 還少丹의 영향

1) 세포 활성도 조사

우태아혈청(FBS)을 제거한 상태에서 추출물의 농도를 변화시키면서 MTT assay<sup>16)</sup>를 사용하여 세포의

생존율을 관찰하였다. 먼저 PC12세포를 24시간 동안 부착시킨 후 글루코스(glucose)와 혈청이 들어있지 않은 DMEM으로 세포를 세척하고 20시간 동안 배양시 세포의 생존율은 32.1%로 나타났으나, 還少丹을 농도별로 처리시 세포의 생존율은 농도의존적으로 증가하다가 100 µg/ml에서는 정상대조군과 거의 동일한 95%의 생존율을 나타내었다(Table 2).

2) 영양공급을 차단한 PC12세포의 염색사음측과 핵분절에 미치는 영향

혈청이 결여된 배지로 PC12세포를 배양할 경우 세포의 부착성이 떨어지고 아포토시스 현상이 나타남을 확인할 수 있었는데 genomic DNA를 분리하여 agarose gel에 걸었을 경우 nucleosome 크기의 200 base pair로 잘려진 DNA ladder를 관찰할 수 있었으나, 還少丹을 처리한 군은 혈청결여배지로 배양한 군에서 보이는 genomic DNA의 분절 현상이 없었고 정상대조군과 별 차이없는 상태로 還少丹 농도의존적으로 DNA 분절현상이 감소되었다(Fig. 1).

3) Caspase 3-like protease 활성화에 미치는 영향

還少丹이 세포고사과정에 주요하게 작용하는 caspase 3-like protease의 활성화와 관계가 있는지 여부를 확인하기 위하여 PC12세포를 글루코스가 제거된 배양액에 還少丹 20, 50, 100 µg/ml로 20 시간 처리 후에 caspase 3-like protease의 활성 변화과정을 조사하였다. PC12세포는 혈청과 글루코스를 차단하여 고갈시키면 12시간 이후에 현저하게 죽음에 이르게 되는데 20시간 이후에 caspase 3-like protease의 활성도

Table 1. Prescription of Hwansodan(HSD)

韓藥名	生藥名	重量(g)
熟地黃	<i>Rhizoma Rehmanniae</i>	3.750
山藥	<i>Rhizoma Dioscoreae</i>	1.875
牛膝	<i>Radix Achyranthis</i>	1.875
枸杞子	<i>Fructus Lycii</i>	1.875
山茱萸	<i>Fructus Corni</i>	1.875
茯苓	<i>Poria</i>	1.875
杜	<i>Cortex Eucommiae</i>	1.875
遠志	<i>Radix Polygalae</i>	1.875
五味子	<i>Fructus Schizandrae</i>	1.875
楮實	<i>Fructus Broussonetiae</i>	1.875
小茴香	<i>Fructus Foeniculi</i>	1.875
巴戟天	<i>Radix Morindae</i>	1.875
肉蓉	<i>Caulis Cistanchis</i>	1.875
石菖蒲	<i>Rhizoma Acori Graminei</i>	0.938
大棗	<i>Fructus Zizyphi jujubae</i>	1.875
Total amount		29.063

Table 2. The Neuroprotective Effects of Hwansodan on the Cell Death by Serum/Glucose Deprivation

Serum/Glucose	HSD(µg/ml)	Viability(%)
+	0	100 ±2
-	0	32.1 ±4
-	20	75 ±2 *
-	50	85 ±2 *
-	100	95 ±2.5 **

Cells (3 × 10<sup>5</sup> cells/well) were washed with serum-free DMEM, treated without serum or with 20, 50, 100 µg/ml Hwansodan (HSD) for 20 hr. The viability of cells was measured by MTT assay. Results were represented as means (%) ± S. D. of three different experiments. \* P<0.01, \*\* P<0.05, compared to only serum-deprived group.

는 정상대조군에 비하여 20배로 증가하였으나, 還少丹 전 처리시에는 그 활성도를 5배로 감소시켰다 (Table 3).

2. 영양공급을 차단한 PC12세포의 사멸과정에 미치는 還少丹의 작용기전 연구

1) Ras 활성화저해제에 의한 PC12세포 생존율에 미치는 영향

혈청영양인자와 글루코스 제거시에 발생하는 세포고사에서 還少丹의 역할을 가명하고자 세포 성장에 관여하는 MAPK들의 특징적인 저해제를 전처리하여 혈청영양인자와 글루코스 제거에 의한 PC12세포 생존율을 검사하였다. 혈청이 결핍된 배양액에서

100 µg/ml 농도의 還少丹 처리 30분 전에 저해제를 투여하여 세포의 생존율을 MTT 방법에 의하여 관찰한 결과, Ras를 저해하는 α-hydroxyfarnesylphosphonic acid (HFPA)의 농도에 따라 농도 의존적으로 감소하였다 (Table 4). 2 µM 농도 투여시 세포의 생존율은 還少丹 단독 처리시의 99%수준에서 57%로 감소되었다. 그러나, 저해제 단독에 의해서는 혈청영양인자와 글루코스 제거시 세포 생존율에 영향을 주지 않았다.

2) MAPK kinase(MEK) 저해제에 의한 PC12세포 생존율에 미치는 영향

동일한 방법에 의하여 MEK를 특징적으로 저해하는 것으로 알려진 PD98059를 전 처리시 10 µM 농도 처리시에 73% 수준으로 세포 생존율을 감소시켰으며, 최고 20 µM 농도 처리시에 65%수준으로 세포 생존율을 감소시켰다. 즉, 저해제의 농도에 의존적으로

Serum + - - -  
HSD 0 0 50 100 200

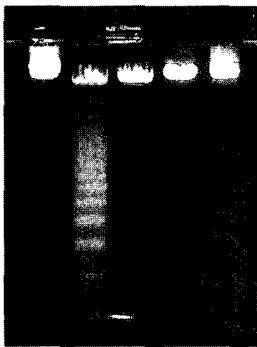


Fig. 1. Dose-dependent neuroprotective effects of *Hwansodan* on the cell death by serum deprivation. PC12 cells were incubated with serum-free DMEM in the absence or presence of *Hwansodan* (50, 100, 200 µg/ml) for 24 hr. Genomic DNA was separated on 1.5% agarose gels. DNA was stained with ethidium bromide and visualized under U.V. light.

Table 3. *Hwansodan* Reduced the Enzymatic Activation of Caspase 3-like Protease by Serum/Glucose Deprivation in PC12 Cells

Serum/Glucose	HSD(µg/ml)	Caspase 3-like Activity (arbitrary unit)
+	0	1±0.2
-	0	20±0.8
-	20	12±0.9 *
-	50	6±0.9 **
-	100	5±0.89 **

Cells ( $3 \times 10^5$  cells/well) were washed with serum-free DMEM, treated with/without serum or with various concentrations of *Hwansodan* as indicated. After treatment for 20 hr, whole lysates were used to measure the activity of caspase 3-like protease by using fluorogenic peptide DEVD-AMC (50 µM). Results were represented as means ± S. D. (%) of three different experiments. \*, P<0.01; \*\*, P<0.05.

Table 4. Farnesyl Transferase Inhibitor Attenuated the Neuroprotection of *Hwansodan*

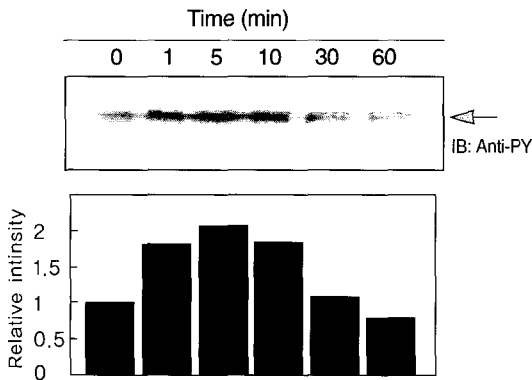
Serum/Glucose	HSD(µg/ml)	HFPA	Viability(%)
+	0	0	100±3
-	0	0	39±5
-	100	0	99±2
-	100	1	65±3 *
-	100	2	57±5 **
-	0	2	39±5

10% FBS or pretreated with 1, 2 µM α-hydroxyfarnesylphosphonic acid (HFPA) for 30 min before addition of *Hwansodan* (100 µg/ml). After 20 hr, the viability of cells was measured by MTT assay. Results were represented as means (%) ± S. D. of three different experiments. \* P<0.01; \*\* P<0.05, compared to group which treated 100 µg/ml of *Hwansodan*.

**Table 5.** MEK inhibitor, PD98059, Attenuated the Neuroprotection of *Hwansodan*

Serum/Glucose	HSD( $\mu$ g/ml)	PD98059( $\mu$ M)	Viability(%)
+	0	0	100 $\pm$ 3
-	0	0	39 $\pm$ 5
-	100	0	99 $\pm$ 6
-	100	10	73 $\pm$ 3 *
-	100	20	65 $\pm$ 5 **
-	0	20	40 $\pm$ 5

Cells ( $3 \times 10^5$  cells/well) were washed with serum-free DMEM, refreshed DMEM without 10% FBS or pretreated with PD98059 (10, 20  $\mu$ M) for 30 min before addition of *Hwansodan* (100  $\mu$ g/ml). The viability of cells was measured by MTT assay after 20 hr. \*, P<0.01; \*\*, P<0.05, compared to group which treated with 100  $\mu$ g/ml of *Hwansodan*.



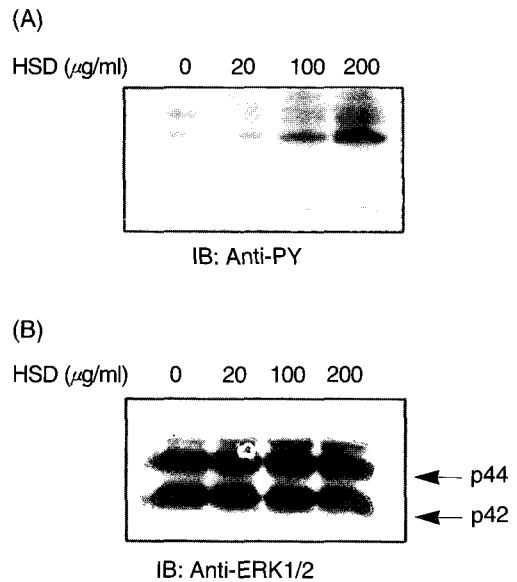
**Fig. 2.** *Hwansodan* increased the phosphotyrosine of ERK1/2 pathway of PC12 cells in a time-dependent manner.

PC12 cells were incubated with serum-free DMEM for 1 hr and treated with *Hwansodan* (100  $\mu$ g/ml) for various periods. Cell lysates were separated by 10% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with 4G10 anti-phosphotyrosine antibody (Upper panel). The intensity of bands was quantified using by TINA program (Fuji Co., Japan) and represented as a relative intensity compared to the value of control cells (Lower panel). EGF-stimulated A431 cell lysates was used for positive control (+) of 4G10 Ab.

감소하였다(Table 5).

3) MAPK의 직접적인 활성화에 미치는 還少丹의 영향

PC12세포를 DMEM으로 세척하고 1시간 배양하여 외부 신호전달을 차단시키고 還少丹을 200  $\mu$ g/ml로 시간별로 투여한 후 그 단백질만을 모아서 phosphotyrosine 항체를 이용하여 활성도를 측정한다. 還少丹을 처리하고 1분 후부터 연산화가 증가되었으며, 5분과 10분에서 최고 활성을 보여주었고 (Fig. 2A) 그 상대적인 감도를 수치로 확산하였을 때



**Fig. 3.** *Hwansodan* increased the phosphotyrosine of ERK1/2 pathway of PC12 cells in a dose-dependent manner.

A) PC12 cells were treated with *Hwansodan* (0, 20, 100, 200  $\mu$ g/ml) for 10 min. The immunoblot was probed with 4G10 anti-phosphotyrosine antibody. B) Membrane was reprobed with a polyclonal antibody that recognizes ERK1/2 regardless of its phosphorylation state (Lower panel) after stripping with 0.1 M glycine, pH 2.5.

5분 경과시 2배로 그 활성도가 증가하였다(Fig. 2B). 1시간 이후부터는 급격히 인산화가 대조군의 수준으로 감소하였다. 또한 還少丹을 농도를 달리하여 10분간 투여하였을 때도 같은 위치의 밴드에서 타이로신 인산화를 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 이 위치의 밴드가 정확히 ERK 단백질인지 여부를 알아보기 위하여 먼저 사용한 항체 결합을 0.1 M glycine, pH 2.5용액

으로 없앤 후 같은 nitrocellulose membrane에 ERK1/2 항체를 반응시킨 결과, 전보다 낮은 위치에서 ERK1/2인 p44/p42 밴드를 확인할 수 있었으며 농도의존적으로 mobility shift 현상을 나타내었다(Fig. 3B).

### 고 찰

韓醫學에서는 腦를 髓의 海로서 眞氣가 모여서 神氣의 精神思惟를 담당하는 곳으로 인식하였고, 腦의 생성에 대해서는 先天의 精에 의한 物質의 基礎下에서 出生 後의 後天腎精, 水穀精微, 氣血津液에 의하여 腦가 生長·發育하고 不斷히 充滿된다고 하였다<sup>46,7,18)</sup>. 또한 腦의 老化에 대해서는 첫째, 사람이 나이가 들어 稟賦不足하거나 腎氣가 점차 衰하여 髓海가 空虛해지고 元神이 失養케 되어 神明이 聰明함을 잃게 되며 둘째, 氣血의 虧虛로 인하여 氣血이 腦로 上衝하지 못하거나, 脾虛로 運化하지 못하고 氣의 鬱滯로 血行이 不暢하면 腦絡의 瘀滯가 發生하여 腦의 濡養을 막기 때문에 發生한다고 하였다<sup>4,8)</sup>. 그리고 《靈樞·經脈篇》<sup>9)</sup>의 “人始生 先成精 精成而腦髓生”이라 한 것을 張<sup>19)</sup>은 “先天水火의 精氣에서 먼저 兩腎이 生하고, 腎精이 上注하여 腦髓가 生한다”라고 하였는데, 이것으로 보아서 腎精이 腦髓를 構成하는 物質의 基礎가 되는 것임을 알 수 있다.

還少丹은 溫補脾腎, 養心安神하여 虛損勞傷, 脾腎虛寒, 心血不足 등에 使用된 處方<sup>1-3)</sup>으로 方中の 肉蓯蓉과 巴戟은 腎經血分으로 入하고, 茴香은 腎經氣分으로 들어가 命門相火의 不足을 補하니 火旺則土強하여 脾能健運하게 되며, 熟地黃과 枸杞子는 補腎水之藥으로 水足則有以濟火하여 相火가 不亢不害하게 하고, 杜仲과 牛膝은 補腰膝하고 助腎하며, 茯苓과 山藥은 滲濕熱하여 助脾하고, 山茱萸와 五味子는 肺의 津液을 生하게 하여 固精시키며, 遠志와 石菖蒲는 通心氣而交腎하고, 大棗는 補氣益血하여 潤肺強脾하며, 楮實은 助陽補虛하는 效能이 있다<sup>20,21)</sup>. 따라서 先天의 腎과 後天의 脾 二本을 補하는 脾腎虛寒에 活用<sup>1-3)</sup>되어 왔으며, 주로 퇴행성 뇌질환에 응용<sup>4,5)</sup>되고 있다.

老人性 痴呆에서 기억·인지 등에 관여하는 대뇌 피질과 해마의 신경세포들이 손실됨으로써 기억상실 증상들이 나타나는 것과 같이, 많은 신경계 질환의 증상발현에는 중추신경세포의 사멸이 그 궁극적 원인을 제공하고 있다. 그러나, 중추신경세포들은 현재까지 한번 사멸이 되면 다시 재생 불가능하기 때문에, 신경세포사의 분자적 기전을 이해하고 세포사를 예방하는 방법을 모색하는 것은 매우 중요한 의학적 과제이다<sup>1)</sup>.

중추신경세포의 손상에 대한 민감성은 아미노산 글루타메이트에 의해 매개되는 흥분성 신경전달계의 발견을 통하여 점차 설명이 가능해지기 시작하였는데, 이는 글루타메이트의 과다한 방출 또는 글루타메이트 수용체의 과다한 흥분에 의하여 비교적 짧은 시간 내에 신경세포의 비가역적 손상이 초래된다는 것이다<sup>11,13,14)</sup>. 이를 흥분특성(excitotoxicity)이라고 하며, 흥분특성의 기전으로는 이온통로를 통한 칼슘의 세포내 유입이 중요하다고 알려져 있고<sup>1)</sup>, 자유유리기(free radical)에 의한 산화성 손상도 기여하는 것으로 보고되어 있다<sup>13,14)</sup>. 이러한 여러 세포 손상기전들이 단독으로 또는 상호작용하여 신경세포사를 초래하여 신경계 질환들이 유발되리라 여겨지는데, 최근에는 이러한 기전 이외에 아포토시스(apoptosis)가 신경계질환의 신경세포사에 관여되어 있다는 증거들이 축적되고 있다<sup>14)</sup>.

국내문헌에 나타난 항노화 및 항산화의 실험적 연구에 대한 검색<sup>22)</sup>에 의하면 국내에서 발표된 항노화 및 항산화에 관련된 논문 35편에서는 대개 노화의 검증방법을 free radical 이론에 의한다고 하였으나, 아포토시스에 대한 노화기전연구는 아직 접하지 못하였다.

뇌의 노화에 관한 연구로는 차 등<sup>23)</sup>이 左歸飲과 右歸飲이 노화 Rat의 뇌 과산화지질 생성 및 활성산소 생성계 산소활성에 미치는 영향을, 徐<sup>24)</sup>가 聰明湯이 노화백서 뇌조직의 생화학적 변화와 신경세포의 손상에 미치는 영향을 발표하였고, 중국에서는 張<sup>8)</sup>이 中醫治療腦萎縮近況을 張<sup>25)</sup>이 略論腎骨髓腦的同病共治를 龔<sup>26)</sup>이 腎腦相關論用治現代腦病的理論探析을

보고하였다.

혈청이나 신경성장인자가 결핍된 상태하의 PC12 세포는 아포토시스에 빠지게 되고 다시 신경성장인자가 공급되면 세포는 살아나게 되므로, 이러한 유사성으로 인하여 PC12세포는 신경성장인자 차단으로 유발된 신경세포 사멸기전의 실험연구모델<sup>2)</sup>로서 주로 사용되었다. 본 연구에서, 지속적으로 혈청을 차단하게 되면 세포손상을 받으면서 아포토시스에 빠지게 되는데, 영양혈청이 결핍된 상태에서 발생하는 세포사멸현상에 還少丹 추출물은 농도의존적으로 세포의 생존율을 증가시킴을 알 수 있었다(Table 2). 還少丹을 처리한 군은 혈청결여배지로 배양한 군에서 보이는 genomic DNA의 분절 현상이 없었고, 정상대조군과 별 차이없는 상태로 완전히 방어하고 있음을 알 수 있었으며, 세포의 DNA 분절현상도 마찬가지로 방지하였다(Fig. 1). 혈청과 글루코스가 제거된 상태에서 발생하는 뇌세포의 아포토시스에서는 caspase-3 cysteine proteases의 활성화를 보이게 되는데, 還少丹은 그 활성도를 감소시켰다(Table 3). 이는 還少丹의 신호가 caspase의 upstream일 가능성을 내포하는 것이며, 또한 還少丹의 뇌세포 보호효과를 알 수 있는 거로가로 사료된다. 還少丹의 뇌세포 보호효과와 신호전달기전을 연구하고자 세포내부의 protein kinase들의 연결기전 특히, MAPK들의 특징적인 저해제를 전처리하여 혈청영양인자와 글루코스 제거에 의한 세포생존율을 검사하였다. Ras를 저해하는  $\alpha$ -hydroxyfamesylphosphonic acid(HFPA)와 MEK를 저해하는 PD98059에 의하여 뇌세포 보호효과는 還少丹 단독 처리 시보다 농도의존적으로 저해되었다(Table 4, 5). 또한 ERK의 활성화 형태인 타이로신 인산화정도가 시간, 농도의존적으로 증가하다가 사라졌다는 것(Fig. 2)은 還少丹이 ERK를 활성화시켰음을 의미한다. 이 때 같은 앞에서의 인산화 단백질보다 낮은 가치에서 ERK1/2를 인준할 수 있었으며, 還少丹의 농도가 증가할수록 mobility shift 현상을 보였다(Fig. 3). 이것은 ERK의 인산화에 따르는 분자량의 증가와 단백질의 형질 변화에 따르는 현상이다. 이러한 ERK의 활성화는 還少丹의 주요한 기전으로 사료

되며, 이는 Ras를 경유해서 성장인자나 분화에 관여하는 MAPK인 ERK1/2를 통해 신호를 전달하고 있음을 보여주는 것이다.

이상의 결과를 종합해 보면 還少丹은 Ras/MEK 신호전달 과정을 거치면서 ERK에 타이로신 인산화를 증가시키고 세포사멸에 관여하는 caspase, endonuclease 등의 활성을 억제하여 뇌세포 보호효과를 나타내었으며, 이외의 작용기전에 대하여는 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결론

還少丹이 신경세포의 아포토시스에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PC12세포에 혈청과 글루코스를 차단한 후 還少丹에 의한 효과를 검증하였다. 還少丹은 농도의존적으로 PC12세포의 사멸을 보호하였으며 DNA ladder현상을 caspase 3-like protease의 활성을 현저하게 방지하였다. PD98059와  $\alpha$ -hydroxyfarnesylphosphonic acid는 還少丹의 뇌세포 보호효과를 감소시켰으며 타이로신 인산화를 시간 및 농도의존적으로 활성화시켰다.

이상의 결과로 보아 還少丹은 caspase 3-like protease의 활성을 억제하고 Ras/MEK/ERK를 경유하여 신경세포 보호효과가 있는 것으로 사료된다.

## 感謝의 말씀

본 연구는 BK21 한의학 전문대학원(2000)에서 지원하는 연구비에 의해서 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

## 참고문헌

1. 宗全和. 中醫方劑通釋. 河北. 河北科學技術出版社. 1995:151-152.
2. 王認庵. 醫方集解. 台北. 文光圖書有限公司. 1975:6-7.
3. 許浚. 東醫寶鑑. 서울. 南山堂. 1986:315.
4. 閻孝誠. 實用中醫腦病學. 北京. 學苑出版社. 1993:2-16,242-251,784-797.



5. 王立忠. 腦血管病中西醫診療與康復. 北京. 中國中醫藥出版社. 1996:364.
6. 裴秉哲. 今釋黃帝內經靈樞. 서울. 傳統醫學研究院. 1994:210,297-298,436,414.
7. 裴秉哲. 今釋黃帝內經素問. 서울. 傳統醫學研究院. 1994:54-55,93.
8. 張吉. 中醫治療腦萎縮近況. 天津. 天津中醫. 1996:13(1):45-46.
9. 徐舜圭. 成人病·老人病學. 서울. 고려의학. 1992:10-15,28-30,225-229.
10. 김진수. 알츠하이머병의 신경화학적 변화에 관한 고찰. 大韓神經科學會誌. 1985;3(1):10-15.
11. Choi D.W., Maulucci-Gedde M.A., Kriegstein A.R.. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 1987;7:357-368.
12. 고재영, 김양희. 신경계 질환에서의 아포토시스 유전. 1998;2:147-165.
13. Dugan L.L., Sensi S.L., Canzoniero L.M.T., Choi D.W. Mitochondria production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci* 1995;15:6377-6388.
14. Savitz S.I., Rosenbaum D.M. Apoptosis in neurological disease. *Neurosurgery.* 1998;42:555-574.
15. 徐元熙. 還少丹이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 大田. 大田大 大學院. 1998.
16. Thornberry N.A., and Lazebnik Y. Caspases:enemies within. *Science.* 1998;281:1312-1316.
17. Snedecor G.H., Cochran W.G. *Statistical Methods*, 6th ed. Amos. Iowa State Univ. 1967.
18. 李東元 외. 痴呆에 관한 東西醫學의 比較考察. 大韓韓方內科學會誌. 1995;16(1):1-16.
19. 張隱庵. 馬元臺. 黃帝內經靈樞. 臺北. 臺聯國風出版社. 1986:73-74.
20. 辛民教. 臨床本草學. 서울. 永林社. 1986:171-172,174-175,190-194,219,241-245,257-258,370-371, 374-375,468-470.
21. 申佶求. 申氏本草學. 서울. 壽文社. 1988:36-38,40-41,55-58,77-79,92-95,101-106,110-112, 134-135,183-188,357-362,514-516,527-529,719-720.
22. 安相源, 李哲浣. 國內文獻에 나타난 抗老化 및 抗酸化의 實驗의 研究에 대한 檢索. 大韓韓醫學會誌. 1998;19(2):373-390.
23. 朴宣東 외. 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 腦 過酸化脂質 生成 및 活性酸素 生成系 酵素 活性에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1995;6(2):349-364.
24. 徐敏華. 聰明湯이 老化白鼠 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 影響. 圓光大大學院. 1996.
25. 張爲群. 略論腎骨髓腦的同病共治. 上海:上海中醫藥雜誌 1996;5:10-12.
26. 龔文德. 腎腦相關論用治現代腦病的理論探析. 實用中西醫結合誌. 1996;264-265.