

영양혈청 결핍성 PC12 세포고사에서 HO-1의 발현 증가를 통한 환소단의 보호 효과

정재은* · 김진경¹⁺ · 강백규 · 박찬희¹ · 박래길¹ · 문병순*

원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 1: 의과대학 미생물학교실

Protective Effect of Hwansodan in Serum and Glucose Deprivation Induced-apoptotic Death of PC12 Cells Via HO-1 Expression

Jae Eun Jung⁺, Jin Kyung Kim¹⁺, Baek Gyu Kang, Channy Park¹, Raekil Park¹, Byung Soon Moon*

Department of internal Medicine, School of Oriental Medicine, 1: Department of Microbiology, School of Medicine, Wonkwang University

The water extract of Hwansodan has been traditionally used for treatment of ischemic brain damage in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of Hwansodan rescues cells from neurodegenerative disease. PC12 pheochromocytoma cells have been used extensively as a model for studying the cellular and molecular mechanisms of neuronal cell damages. Under deprivation of growth factor and ischemic injury, PC12 cells spontaneously undergoes apoptotic cell death. Serum and glucose deprivation markedly decreased the viability of PC12 cells, which was characterized with apparent apoptotic features such as membrane blebbing as well as fragmentation of genomic DNA and nuclei. However, the aqueous extract of Hwansodan significantly reduced serum and glucose deprivation-induced cell death and apoptotic characteristics through reduction of intracellular peroxide generation. Pretreatment of Hwansodan also inhibited the activation of caspase-3, in turn, degradation of ICAD/DFF45 was completely abolished in serum and glucose deprived cells. Furthermore, pretreatment of Hwansodan obviously increased heme oxygenase 1 (HO-1) expression in PC12 cells. Taken together, the data suggest that the protective effects of Hwansodan against serum and glucose deprivation induced oxidative injuries may be achieved through the scavenging of reactive oxygen species accompanying with HO-1 induction.

Key words : Hwansodan, HO-1, PC12, apoptosis, protective effect

서론

환소단은 AD 1170년 송대의 <홍씨집험방>에 처음 수록된 것으로 온보비신, 양심안신의 효능을 가지며 <실용중의뇌병학>에서는 정기양허로 인한 치매에 사용되었다. 환소단에 대한 연구에서 서는 뇌조직의 산소유리기에 의해 진행되는 뇌조직의 산화작용에 환소단이 노화를 지연시킨다고 보고 하였으며¹⁾, 뇌신경 세포에 대한 보호 효과가 보고 되었다^{2,3)}.

퇴행성 뇌질환은 건망증이나 우울증 등의 최초기 질병과, 치

매나 뇌위축 같은 중기 혹은 말기 퇴행성 뇌질환으로 분류되어진다. 뇌에 대하여 한의학에서는 《素問·刺禁論篇》에서 “腦爲髓之海 眞氣所取”라 하여 뇌를 수액이 모이는 곳이라고 설명하고 있으며, 《靈樞·經脈論》에서는 “人始生 先成精 精成而腦髓生”이라 하여 정이 먼저 생한 후에 정에 의하여 뇌수가 발생한다고 하여 뇌와 정과의 상관성을 시사하였다. 뇌의 노화와 관련하여 한의학에서는 《靈樞·海論》에서 “腦爲髓之海 …… 髓海不足 卽腦轉耳鳴 瘈瘲眩暈 目無所見 懶怠安臥”이라 하여 사람이 나이가 들어, 稟賦가 부족하거나 진기가 점차 쇠하여 음정이 虧損되면 精이 결핍되어 뇌에 상충하지 못함으로써 수해가 공허해지고 원신이 실양케 되어 신명이 총명함을 잃는다고 언급하였다. 뇌세포의 퇴행성 변화의 분자생물학적 연구가 진행되고 있는데, 성장인자 결핍, 신경독성, 흥분성 아미노산의 과다, 세포내 Ca²⁺의 작용, 예너지 신진대사의 변화, free radical의 형성에 의한 산화적 손상

* 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

⁺The authors were equally contributed to this work.

· E-mail : mbs@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-2102

· 접수 : 2006/10/20 · 수정 : 2006/11/13 · 채택 : 2006/12/04

등이다. 퇴행성 뇌질환인 癩呆에 대한 연구는 한의학에서도 활발히 진행되고 있는데, 문헌적^{4,5)}, 임상적 연구⁶⁾ 외에 실험적 연구⁷⁾도 다수 보고 되어 있으며, 환소단에 관한 실험적 연구도 보고되었지만 아직은 그리 많지 않은 실정이다. 따라서 저자는 뇌세포의 산화적 손상에서 환소단의 보호기전을 확인하기 위하여, 신경세포의 특성을 지니는 PC12 세포에 혈청 및 글루코스 차단을 통해 허혈 상태를 유발하여 세포사멸 관련 단백질 등의 발현을 조사하였으며, 산화적 손상에 의한 뇌세포사멸을 방어하는 환소단의 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

Rat에서 유래한 PC12 세포주(rat adrenal pheochromocytoma cell)는 한국세포주은행(서울대학교)로부터 구입하여 계대 배양하면서 실험을 실시하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 약재는 <의방집해>에 의거하여 원광대학교 의산 한방 병원에서 정선한 것으로 한첩 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Hansodan

한약명	생약명	중량(g)
숙지황	<i>Rhizoma Rehmanniae</i>	3.750
산약	<i>Rhizoma Dioscoreae</i>	1.875
우슬	<i>Radix Achyranthis</i>	1.875
구기자	<i>Fructus Lycii</i>	1.875
산수유	<i>Fructus Corni</i>	1.875
복령	<i>Poria</i>	1.875
두충	<i>Cortex Eucommiae</i>	1.875
원지	<i>Radix Polygalae</i>	1.875
오미자	<i>Fructus Schizandrae</i>	1.875
저실	<i>Fructus Broussonetiae</i>	1.875
소회향	<i>Fructus Foeniculi</i>	1.875
파극전	<i>Radix Morindae</i>	1.875
육종용	<i>Caulis Cistanchis</i>	1.875
석창포	<i>Rhizoma Acori Graminel</i>	1.875
대조	<i>Fructus Zizyphi jujubae</i>	1.875
Total amount		29.063

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 Duplecco's modified Eagle's medium(DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며 배양용기(24-well plate, 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide(MTT), DAPI, DCF-DA는 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. ICAD/DFP45, HO-1, β -actin 등에 대한 항체들은 모두 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 Enhanced chemiluminescence kit(ELC kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 시료의 조제

실험에 사용된 약재는 물을 용매로 추출하였다. 물 추출물은 환소단 100g을 물 1ℓ와 함께 냉각기를 부착한 환저 플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하고 3200rpm으로 20분 원심분리 후 농축기(Rotary evaporator)로 농축한 다음 -70℃(Deep freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 Freeze Dryer로 동결건조시킨 것을 시료로 사용하였다. 이때 환소단은 100 mg/ml의 농도로 DMSO에 녹여서 냉동보관하고, 실험에 사용시 DMEM 배지에 희석하여 사용하였다.

2) PC12 세포주 배양

PC12 세포는 CO₂ 세포배양기에서(37℃, 5% CO₂) 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM에서 배양하였다. 48시간 주기로 0.05% Trypsine-EDTA를 사용하여 계대 배양하였으며, 분주 12시간 후에 약재를 처리하여, 세포 죽음과 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

3) 세포생존율 측정

세포생존율은 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10⁵ cells/ml)를 1 ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, 배양액 최종부피의 1/10 MTT 용액(5 mg/ml in PBS)을 첨가하여 4시간 반응하였다. 생존 세포에 의해 형성된 보라색 formazan은 10% sodium-dodesyl sulfate(SDS)가 포함된 0.01N HCl 용액 100 μ l/well을 세포에 첨가하여 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4) 세포주기 분석(Flow cytometry)

세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 propidium iodide(PI)로 DNA를 염색한 후에 Flow cytometry(FACSCalibur, BD Biosciences)를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. 세포에 부정함량단 등을 처리하여 48 시간 후에 포집하여 PBS로 두 번 세척하였다. 세척한 세포(1×10⁶)의 DNA는 PI 용액(0.1% Triton X-100, 20 μ g/ml PI, 200 μ g/ml RNase)을 600 μ l로 20분 반응하였다. Flow cytometry의 sub-G₀/G₁으로 얻어진 정보는 CellQuest software(Becton Dickinson)를 이용하여 세포고사를 분석하였다.

5) DAPI 염색

환소단을 처리한 세포를 4% formaldehyde 용액에 고정시킨 후 PBS로 세척하고, 10 μ M DAPI로 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS60, Germany)으로 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

6) H₂O₂ 생성의 측정

환소단 등에 의한 세포내 활성화 산소의 생성변화를 측정하기 위하여 형광 probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma)를 이용하였다. 비형광물질인 DCF-DA는 세포내 hydrogen peroxide와 관련된 peroxides 존재 시 형광의 DCF로 변환되어 녹색의 형광을 발한다. PC12 세포에 환소단 등을 처리한 후 세포를 수확하기 전에 5 μ M DCF-DA를 처리하여 37℃

에서 30분 배양하였다. 배양한 세포는 PBS(pH 7.4)로 세척하여 1% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하고, 다시 PBS로 세척하여 Flow cytometry(FACSCalibur, BD Biosciences)로 형광을 측정하고 CellQuest software(Becton Dickinson)를 이용하여 분석하였다.

7) Western blot analysis

세포는 환소단 등을 처리 후 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH7.4)으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)과 4°C에서 30분간 반응하였다. 세포 파쇄액은 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여, 상층액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량 하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질 : 200 µg)은 2×sample buffer와 혼합하여 100°C에서 5분 가열한 후에 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응하여 비특이적 항체결합을 예방하였다. Bcl-XL/S, ICAD/DFF45 및 HO-1에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후 이차항체(anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase)와 1시간 반응하였다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3번 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 현상하였다.

8) 면역화학염색법

커버글라스에 부착하여 배양한 세포(3×10⁴cells/ml)는 환소단 등을 처리한 후 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH7.4)으로 2회 세척하였다. HO-1에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 TBS에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후 이차항체(anti-rabbit IgG conjugated TRITC)와 1시간 반응하였다. 그 후 TBS로 3번 세척하고 10 µM의 DAPI 용액과 실온에서 30분간 반응 한 후, 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS60, Germany)으로 관찰하였다.

9) 결과 산출 방법

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 실험결과의 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였으며 p-value가 0.05 (p <0.05)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 혈청 및 글루코스 결핍이 PC12 세포생존율에 미치는 영향

허혈성 뇌질환의 실험 모델을 수립하게 위하여 혈청 및 글루코스를 제거한 배양액으로 PC12 세포를 다양한 시간동안 배양하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 조사하였다. 먼저 혈청(Serum, FBS)를 제거한 배지로 배양했을 경우 12시간 이후부터 세포생존율이 감소하기 시작하여 24시간 후에 약 60%의 세포생존율을 보였다(Fig. 1A). 또한 혈청과 글루코스를 동시에 제거한 배지로 배양하였을 경우 12시간 후부터 급격한 세포생존율의

감소가 관찰되었으며 18시간에 40%, 24시간 후에 약 30%의 세포생존율을 보였다(Fig. 1B). 이상의 결과는 혈청 및 글루코스 결핍에 의한 PC12 세포독성이 처리 시간에 의존적으로 축적됨을 알 수 있었다.

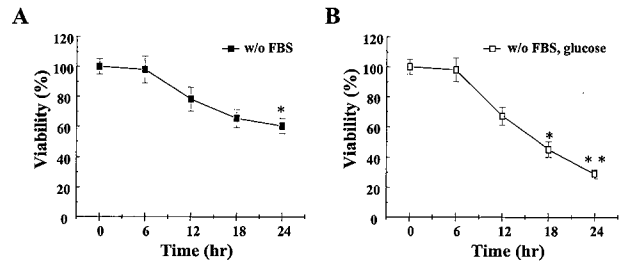


Fig. 1. Effects of serum and glucose deprivation on viability of PC12 cells. Cells were cultured with serum and glucose free DMEM media for indicate periods. Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates. *p<0.01, **p<0.001 by student's t-test, compared with control group.

2. 환소단의 혈청 및 글루코스 결핍에 의한 PC12 세포사멸에 대한 효과

PC12 세포 손상에 대한 환소단의 보호효과를 알아보기 위하여 혈청 및 글루코스가 결핍된 배지에 환소단을 다양한 농도로 처리한 후 24시간 배양하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 그 결과 세포생존율은 혈청을 결핍 시켰을 경우 대조군의 61%를 보였으나 환소단 처리 실험군은 50 µg/ml의 농도에서는 72%, 100 µg/ml의 농도에서는 83%, 200 µg/ml의 농도에서는 98%의 세포 생존율을 보여 농도의존적인 보호효과를 보였다(Fig. 2A). 또한 혈청과 글루코스를 제거한 배지로 24시간 배양한 실험군은 약 30%의 세포생존율을 보였으나 환소단을 처리하였을 경우, 50 µg/ml의 농도에서는 42%, 100 µg/ml의 농도에서는 65%, 200 µg/ml의 농도에서는 82%의 세포 생존율을 보여 농도의존적인 보호효과를 보였다(Fig. 2B). 이때 환소단 단독은 최고 200 µg/ml의 농도에서 자체 독성은 없었다.

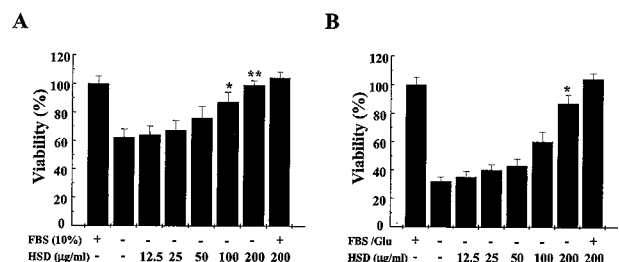


Fig. 2. Hwansodan prevented the cytotoxicity by serum and glucose deprivation in PC12 cells in a dose-dependent manner. Cells were treated with various concentrations of Hwansodan and followed by the addition of serum and glucose free media. Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates. * p<0.01, **p<0.001 by student's t-test.

3. 혈청 및 글루코스 결핍에 의한 PC12 세포사멸의 특성 및 환소단의 효과

PC12에서 혈청 및 글루코스 결핍에 의한 세포죽음이 세포고사 이전에 의해서 매개 되어질 가능성을 조사하기 위하여, 혈청과 글루코스를 제거한 배지로 12시간 배양 후 포집하여, 세포의

DNA를 PI 염색하고 유식 세포분석기(flow cytometry)를 이용하여 세포고사 정도를 조사하였다. 혈청과 글루코스를 제거한 배지로 배양하였을 경우 M1으로 표시한 sub-G0/G1 분획이 대조군 1.2%에서 43.7%로 증가하였으며, 환소단을 처리 하였을 경우, 100 µg/ml의 농도에서는 8.3%, 200 µg/ml의 농도에서는 5.7%로 감소하였다(Fig. 3).

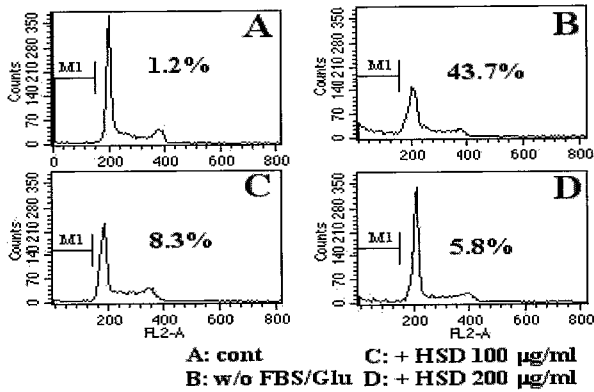


Fig. 3. Treatment of PC12 cells with Hwansodan prevented the apoptosis by serum and glucose deprivation. Cells were treated with various concentrations of Hwansodan and followed by the addition of serum and glucose free media. Cell cycle analysis was performed by flow cytometry after staining with propidium iodide (PI).

또한, 세포고사 현상의 형태학적 특징을 관찰하기 위하여 핵산의 DAPI 염색을 수행하였다. PC12 세포는 혈청 및 글루코스가 제거된 배지로 24시간 배양시 세포수의 현저한 감소와 세포 핵의 분절이 관찰되었으나(Fig. 4B), 환소단을 처리한 실험군에서는 대조군 수준으로 세포수와 형태가 환소단의 농도에 의존적으로 회복되는 것을 확인하였다(Fig. 4C와 D). 이상의 결과는 혈청 및 글루코스 결핍은 PC12의 세포 생존율을 저하시키며, 이러한 세포독성은 핵의 분절을 동반하는 전형적인 세포고사 기전에 의하여 매개되며, 환소단은 이러한 세포고사현상을 효과적으로 보호함을 시사하였다.

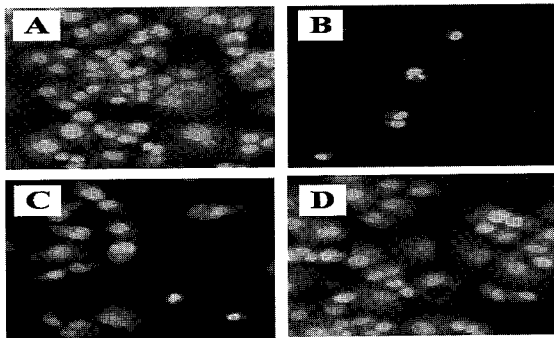


Fig. 4. Pretreatment of PC12 cells with Hwansodan prevented the morphological change by serum and glucose deprivation. Cells were treated with various concentrations of Hwansodan and followed by the addition of serum and glucose free media. Then, cells were stained with DAPI and observed under fluorescent microscopy.

4. PC12 세포사멸에서 ICAD/DFF45 단백질 발현에 환소단의 효과
세포고사 신호전달계의 잘 알려진 effector 분자로서 caspase-3의 세포내 표적 분자인 ICAD/DFF45의 발현변화를 조

사하였다. PC12 세포에 100 µg/ml 및 200 µg/ml 환소단을 처리한 후 혈청 및 글루코스가 결핍된 배지에서 24시간동안 배양하고 세포부유액으로부터 이들 단백질의 발현을 Western blot 방법으로 조사하였다. 혈청 및 글루코스가 결핍된 배지로 24시간 처리시 ICAD/DFF45는 분해 되어 이들 밴드가 사라진 형태로 나타났다. 그러나 100 µg/ml 및 200 µg/ml 환소단을 처리한 실험군에서는 이들 효소의 분해가 억제되어 대조군 수준의 발현을 나타냈다. 이상의 결과는 환소단이 혈청 및 글루코스에 의한 PC12 세포의 caspase-3 활성을 방해하는 효과를 시사한다. 이때 β-actin 단백질 발현을 통해 동량임을 확인하였다(Fig. 5).

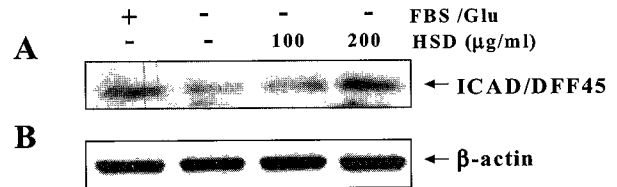


Fig. 5. Hwansodan inhibited the degradation ICAD/DFF45 in serum and glucose deprived PC12 cells. Cells were cultured in the absence or presence of Hwansodan for 24 hr. Cell lysates were used to measure the expression pattern of ICAD/DFF45 by Western blotting with anti-ICAD/DFF45 (A) and β-actin (B) antibodies.

5. PC12 세포에서 혈청 및 글루코스 결핍시 H₂O₂의 생성증가에 대한 환소단의 보호 효과

혈청 및 글루코스 결핍에 의한 PC12 세포고사에서 세포내 활성산소인 H₂O₂ 생성 변화를 관찰하기 위하여 DCF-DA로 염색하고 flow cytometry로 분석하였다. DCF-DA는 세포내 H₂O₂와 반응시 형광을 띠는 DCF로 전환된다. PC12세포는 혈청 및 글루코스가 제거된 배지로 12시간 배양시 세포내 활성산소의 양이 현저히 증가되었으나(Fig. 6B) 환소단 100 µg/ml 처리시 유의한 감소는 보이지 않았으나 200 µg/ml 처리시 대조군 수준으로 감소하였다(Fig. 6C와 D).

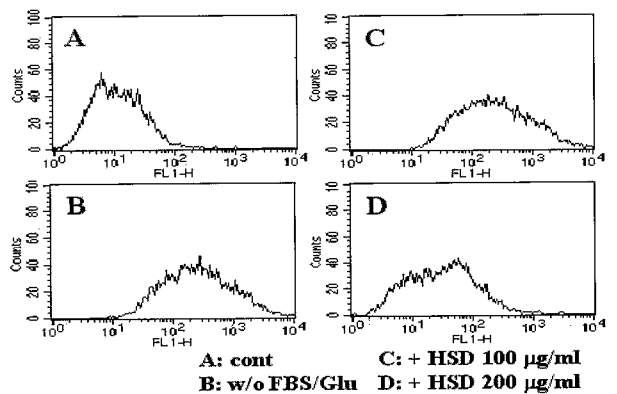


Fig. 6. Effect of Hwansodan on the production of H₂O₂ in serum and glucose deprived PC12 cells. Cells were cultured in the absence or presence of Hwansodan for 12 hr. Then, cells were incubated with the dye 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (5 µM) and the fluorescence intensity of more than 10,000 cells was analyzed using a flow cytometry.

6. 환소단의 혈청 및 글루코스 결핍에 의한 PC12 세포고사에서 Heat Shock Proteins 변화에 대한 효과

산화적 손상에 의한 세포고사 신호전달계에 중요한 단백질

인 Heat Shock Proteins(HSPs)에 대하여 HSP90, 60, 32의 단백질의 발현을 조사하였다. PC12 세포에 100 µg/ml 및 200 µg/ml의 환소단을 처리한 후 혈청과 글루코스가 제거된 배지로 20시간 배양한 세포부유액으로부터 HSP90, HSP60 및 HSP32/HO-1의 단백질 발현을 Western blot 방법으로 조사하였다. HSP90과 HSP60 단백질은 발현 변화가 없었으나 HO-1으로 잘 알려진 HSP32는 혈청 및 글루코스 결핍시 약간의 증가를 보였으나 환소단 처리에 의하여 현저히 증가 되었다(Fig. 7). 이때 단백질은 β-actin을 통하여 동량임을 확인하였다.

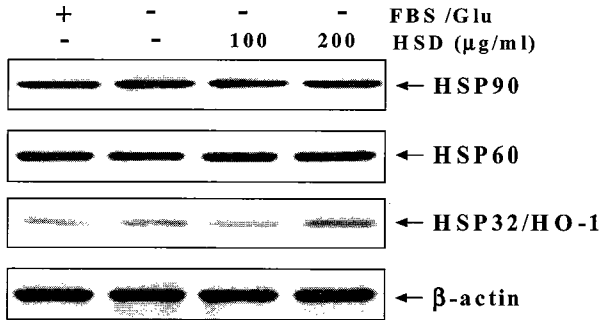


Fig. 7. Hwansodan induced the expression of HO-1 in serum and glucose deprived PC12 cells. Cells were cultured in the absence or presence of Hwansodan for 24 hr. Cell lysates were used to measure the expression of their patterns by Western blotting with anti-HSP90 (A), anti-HSP60, anti-HO-1 and β-actin (B) antibodies.

7. 환소단의 혈청 및 글루코스 결핍에 의한 PC12 세포고사에서 HO-1 단백질 변화에 대한 효과

앞에서 산화적 손상에 의한 PC12 세포손상을 보호하는 환소단이 HSP32/HO-1의 발현을 증가시킬 수 있었다. 따라서 HO-1의 발현변화를 HO-1의 면역화학염색법을 통해 발현 정도를 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 환소단은 세포질 및 세포핵 내의 HO-1의 발현을 증가시켰다. 파란색은 세포의 핵을 DAPI로 염색한 것이고 붉은색은 HO-1을 TRITC로 염색한 것이며, 환소단에 의해 HO-1이 세포질 및 핵에서 강하게 발현되고 있는 것을 merge 하여 확인 하였다. 이상의 결과는 환소단이 HO-1의 발현을 증가시켜 혈청 및 글루코스의 결핍에 따른 산화적 손상에 의한 PC12의 세포고사를 효과적으로 방어함을 시사하였다.

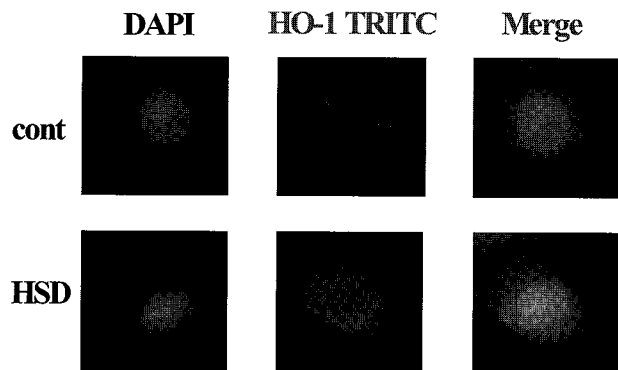


Fig. 8. Localization of HO-1 in Hwansodan-treated PC12 cells. Cells were cultured in the absence or presence of Hwansodan. After reaction with DAPI and anti-HO-1 antibody, cells were visualized under fluorescent microscope.

고찰

인체는 기능적으로 서로 비슷한 여러 가지 장기들이 모여 계통을 이루고 장기는 여러 조직 및 세포로 구성되어있다⁸⁾. 노화란 한 개체에서 시간의 진행에 비례하여 일어나는 점진적이고 내재적인 퇴행성 변화로 구조적·기능적 변화가 초래되어 외부환경에 대해 반응하는 기능이 저하되는 것이며⁹⁾ 뇌세포에서의 노화는 지속적으로 일어나고 있으나 분화가 완료된 성인의 뇌에서 뇌세포의 비가역적인 변화는 일어나지 않으므로 뇌세포에서의 노화는 뇌의 기능을 유지하는데 치명적이라고 할 수 있다. 뇌의 노화는 20대 후반부터 시작되어 신경세포의 수는 감소되고 축삭은 변성되면서 lipofuscin 과 같은 대사산물들이 축적되고 육안으로도 여러 가지 변화를 일으키면서 질량이 감소되어 60세가 지나면서 50~150g 정도 줄어든다¹⁰⁻¹⁵⁾.

뇌의 노화에 대하여 한의학에서는 나이가 많아지면 기혈부족과 신경휴허로 수해부족을 야기하여 뇌수가 점차 공허해진다¹⁶⁾고 설명하고 있으며, 서양의학에서는 뇌의 미란성 위축과 뇌신경세포의 소실로 인한 뇌의 기질적 변성과 뇌의 각종 신경전달물질의 감소 등 뇌의 퇴행성 변화로 인하여 발생하는 것으로 인식하고 있다.^{17,18)}

환소단은 AD 1170년 송대의 《洪氏集驗方》¹⁹⁾에 처음 수록된 것으로 溫補脾胃, 養心安神의 효능을 가지며 《中醫腦病學》²⁰⁾에서는 精氣不足症으로 인한 癡呆인 “年老表情呆滯, 行動退緩, ... ”에 사용되었으며 《腦病》²¹⁾에서는 환소단합동窮활혈탕가 감이 補腎健腦, 活絡行氣의 목적으로 사용되었다. 환소단에 대한 연구에서 서²⁾는 뇌조직의 산소유리기에 의해 진행되는 뇌조직의 산화작용에 환소단이 노화를 지연시킨다는 보고를 하였으며, 임³⁾은 caspase 3-like protease의 활성을 억제하고 apoptosis를 억제하여 뇌신경세포를 보호한다고 보고하였다.

본 연구에 사용된 환소단은 《醫方集解》¹⁾에 의거하였다. 약제는 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다²²⁾. 환소단에 사용되는 한약재의 약리학적인 분석을 살펴보면²³⁾, 숙지황은 catalpol, verbascose mannitol, glucose, maninotriose, vitamin A 등을 함유한다고 알려져 있으며 항염증 효과와 항 알레르기 효과에 대한 보고가 있다. 산약에 함유되어 있는 성분은 Batasin I, II, III과 steroid saponin인 diocin이 대표적이고, 기타 saponin tanin, polyphenol과 allantoin γ-amino butyric acid를 포함한 amino acid, 당류로 arabinose, rhamnose, 그 외에 chelidonic acid, sitosterol등을 함유한다. 항암작용과 면역계에 대한 작용이 보고되어있다. 우슬에 포함되어 있는 성분은 ecdysone, bidentatoside II, chikusetsusaponin V methyl ester, achyranthoside C, achyranthoside D, achyranthosides E, achyranthosides F, betaine, α-spinasterol, β-spinasterol 등의 화합물이 알려져 있다. 구기자에 포함되어있는 성분은 betaine, zeaxanthin, zeaxanthin dipalmitate, β-sitosterol, linoleic acid, vitamin B1, vitamin C 등의 화합물이 알려져 있다. 산수유에 포함되어있는 성분은 ursolic acid, oleanolic acid, cornin, morronidide, logamin, sweroside, tartaric acid, malic

acid, gallic acid, vitamine A 등의 화합물이 알려져 있다. 복령은 pachyman이 주성분으로 함유되어 있으며 특히 최근 보고에 의하면 90%정도가 β -glucan 이며 나머지 10%가 terpene등으로 구성되어 있다고 한다. 두충은 pinosresinol, epipinosresinol, medioresinol, pinosresinoldigluconide, syringaresinol, hydroxypinosresinol, aucubin, geniposide, geniposidic acid, β -sitosterol, betulin, betulic acid, ursolic acid, vanillic acid 등이 함유되어 있다. 원지에는 onjisaponin A-G, prosenegenin 등이 함유되어 있으며, 오미자에는 Ligan 화합물로서 schizandrol A, schizandrin A,B,C 등이 함유되어 있다. 저실은 마자인 이라고도 하며 olein, linolein, linolenin, pentosan, dextrin, inositol, trigonelline, choline, lecithin, emulsin, lipase, protease 등이 함유되어 있다. 소회향에는 anethole, estragole, anisaldehyde, (+)-fenchone, limonene 등이 함유되어 있다. 파극천에는 β -sistosterol, 2-methyl-antraquinone, rubiadin-1-methyl ether, 24-ethylcholesterol 등이 함유되어 있다. 육종용은 acteoside, isoacteoside 등의 phenylethanoid 화합물과 β -sistosterol, daucosterol 등을 함유하고 있다. 석창포에는 essential oil이 함유되어 있으며 주성분은 β -asarone 이다. 대조에 포함된 성분은 D-Fructose, D-glucose, sucrose, 중성다당, 산성다당이 90% 이상을 차지한다.

본 연구에서는 뇌 허혈시 뇌 실질세포의 직접적인 손상기전을 밝히기 위하여 신경세포의 노화 과정에서 혈청 및 글루코스 성분이 결핍되어 일어나는 세포사멸 현상을 조사하기 위하여, PC12 세포에서 혈청 및 글루코스가 제거된 배지로 배양시 H_2O_2 가 발생하는 것을 확인하였고, 이렇게 생성된 H_2O_2 에 의한 세포사멸 기전과 세포독성을 예방할 수 있는 환소단의 가능성을 조사하고자 하였다. 먼저 혈청 및 글루코스 성분의 결핍은 PC12 세포에 시간 의존적인 세포 독성을 보였으며, 이때 세포내 H_2O_2 생성에 의한 전형적인 핵의 분절을 보이는 산화적 손상에 세포고사 사임을 확인하였다. 이렇게 유발된 PC12 세포사멸에 대한 환소단의 보호효과는 처리 농도에 의존적으로 세포독성을 억제하였으며 이는 김 등²⁴⁾의 연구 결과와 일치하였다. 본 연구에서 환소단은 혈청 및 글루코스 결핍시 나타나는 특징적인 세포고사 현상의 세포막 수포화 현상을 억제하였다.

세포고사를 조절하는 Bcl-2는 사람의 림프종(human follicular lymphoma)과 관련된 유전자로서 크게 세포사멸 촉진 단백질과 세포사멸 억제 단백질의 두 부류가 존재한다²⁵⁾. 이중 Bcl-XL 단백질은 다른 암 유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸만을 억제한다. 한편, Bcl-XS 단백질은 Bcl-XL과는 달리 오히려 세포사멸을 촉진시키는 기능을 수행한다^{26,27)}. 다양한 자극시 Bcl-2나 Bcl-XL을 과발현 시켰을 경우 미토콘드리아 막전위(MPT, $\Delta\Psi_m$)의 상실이나 cytochrome c의 방출이 방지됨이 보고되었다²⁸⁾. 반대로 Bax나 Bcl-XS 단백질을 과발현 시켰을 경우에는 cytochrome c의 방출을 촉진하였고, 미토콘드리아 막탈전극을 유도한다²⁹⁾. 혈청 및 글루코스 결핍에 의한 PC12 세포고사는 세포내 활성산소종인 H_2O_2 의 생성 증가가 수반되었으므로 이러한 Bcl-2 단백질군의 발현 조절과 관련이 있을 것으로 추측되며, 이들에 대한 차후 연구가 요구되어진다. 또한 미토콘드

리아의 intermembrane space에 존재하여 respiratory chain에서의 전자전달자의 역할을 수행하는³⁰⁾, cytochrome c는 세포고사 자극에 의하여 세포질로 방출되어 Apaf-1, dATP, procaspase-9과 복합체를 형성하여 caspase-9을 활성화 한다. 이러한 cytochrome c는 아직 충분히 밝혀져 있지 않지만 Bcl-2 및 Bcl-XL은 방출을 억제하지만 Bax는 방출을 촉진한다고 알려져 있다³¹⁾. 활성화된 caspase-9는 다음 단계의 caspase-3를 활성화 한다³²⁾. 본 연구 결과에서는 혈청 및 글루코스 결핍은 caspase-3의 세포내 표적 단백질인 ICAD/DFP45의 분해에 의한 핵분절 현상이 초래되었으며, 환소단은 ICAD/DFP45의 분해를 억제하였다. 따라서 미토콘드리아 막 전위차 감소에 의한 미토콘드리아 기능 장애를 유도할수 있을 것이라 사료되며, 이는 Bcl-2 단백질군의 발현 변화에 따른 미토콘드리아 기능장애에 의해 caspase가 활성화 되어 세포고사가 촉진되었을 가능성을 시사한다.

다양한 heat shock proteins (HSPs)은 NO 및 산화적 손상의존적으로 발현이 조절되며, HSP70과 HSP27의 세포질 단백질과 HSP75, HSP60 및 HSP10 등이 미토콘드리아 단백질로 구분된다. 특히 HSP70과 HSP27은 NO donor에 의해 up-regulation되며, HSP70은 미토콘드리아 HSP75와 복합체를 형성하여 미토콘드리아 단백질의 import, folding 및 assembly에 중요한 역할을 담당한다. 또한 HSP75, HSP60 및 HSP10 등의 미토콘드리아 HSP 복합체는 cyclophilin과 함께 MPT opening에 관련되어 있다³³⁾. 하지만 이 실험에서는 혈청 및 글루코스 결핍에 의한 산화적 손상에서 HSP90 및 HSP60 단백질의 발현에는 변화가 없었으나 환소단 처리에 의하여 HSP32/HO-1의 발현이 증가하였다.

신체의 각 장기는 환경에서 오는 다양한 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위하여 즉각적으로 반응한다. 카드뎀, 납, 수은과 같은 중금속이나 endotoxin이 체내에 들어오거나, heat shock, 자외선, 활성산소, 저산소 상태에 노출되면, 장기는 스트레스에 대한 반응으로 다양한 단백질과 효소가 유도되면서 생체 방어 작용이 일어난다. 대표적인 예로 헤모글로빈을 비롯한 heme 단백질의 보결분자족인 heme을 담즙색소(biliverdin, bilirubin)와 일산화탄소와 환원철(Fe^{2+})로 분해하는 Heme Oxygenase(HO)를 들 수 있다³⁴⁾. Heme Oxygenase는 최소 두가지의 isozyme(HO-1과 HO-2)이 보고 되고 있다. HO-2는 구성형 효소이고, HO¹은 각종 스트레스원에 반응하여 세포내에서 유도 발현되는 효소로 이 효소의 반응을 조사하여 스트레스 검출에 이용할 수 있다. 본 연구에서 환소단에 의해서 PC12 세포의 HO¹ 단백질이 세포질과 핵내에서 발현이 증가되었다. 따라서 환소단에 의해서 유도된 HO-1의 발현 조절 및 기능에 대한 추가적인 연구가 요구되어진다.

이상의 연구 결과를 종합하면 혈청 및 글루코스 결핍에 의해 유도된 PC12 세포의 사멸은 세포내에서 생성된 H_2O_2 에 의한 세포의 형태적 변화를 동반한 세포막 수포화 현상, caspase-3의 활성화에 따른 ICAD/DFP45의 분해를 보이는 전형적인 세포고사 현상이었다. 그러나 환소단은 이러한 산화적 손상으로부터 세포막 수포화 및 세포고사성 단백질의 발현 조절을 통해 PC12 세포를 보호하였다. 또한 환소단은 세포내 HO-1 단백질의 발현증가

를 유도하였으며, 이는 새로운 표적인자들을 발굴하고 분석 및 기능 연구 등을 통하여 산화적 손상에 의한 퇴행성 뇌질환에서의 역할과 환소단의 작용 표적인자 등에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다.

결론

혈청 및 글루코스 결핍에 의한 PC12 세포의 산화적 손상에 대한 환소단의 보호 효과를 확인하기 위하여 세포생존율 변화, 세포의 형태적 변화, 세포내 H₂O₂의 생성, HSP90, HSP60 및 HO-1 단백질의 발현, caspase-3의 활성화에 따른 ICAD/DFF45 관련 단백질의 발현을 비교, 분석하였다. 환소단은 혈청 및 글루코스 결핍에 의해 세포고사 및 생성된 H₂O₂에 의한 산화적 손상으로 부터 뇌 세포를 보호하는 효과를 나타냈으므로 치매 등의 퇴행성 신경질환에 유효하게 활용될 수 있을 것이며, 산화적 손상 예방 물질을 개발하고 질환의 진단, 예방 및 치료에 기여할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 2004년 교내연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. 王昴.. 北京. 中國中醫藥出版社, 1997.
2. 서원희. 환소단이 뇌조직의 산화작용에 미치는 영향. 대전, 대전대 대학원, 1998.
3. 임준식. 환소단이 영양결핍 결핍성 PC12 신경세포의 apoptosis에 미치는 영향. 익산, 원광대 한의학 전문대학원, 2000.
4. 金賢兒. 老人性 痴呆에 대한 文獻의 考察. 大韓韓方內科學會誌 13(2):57-68, 1992.
5. 徐政烈 외. 痴呆에 대한 東西醫學의 文獻의 考察. 大韓針灸學會誌 14(1):226-238, 1997.
6. 黃義完 외. 痴呆에 대한 韓醫學의 臨床研究. 東醫神經精神科學會誌 7(1):1-13, 1996.
7. 姜亨沅. 天門冬에 의한 腦神經膠細胞로부터 炎症性 細胞活性 物質 分泌의 抑制 效果. 圓光大學校 大學院 碩士論文, 1997.
8. 김상호 외. 일반병리학 고문사. p.5, 2000. / 대한병리학회. 병리학. 고문사, p 28, 1995.
9. 장양태. 비부과학. 서울, 여문각, pp 23-25, 1994.
10. 이정복. 장수학. 서울, 의성당, pp 41, 64-69, 1987.
11. 박찬국. 장상학. 서울, 일중사, pp 167-168, 1992.
12. 정용주. 도해뇌신경외과학. 서울, 제일의학, p 30, 31, 1992.
13. 지제근. 신경병리학. 서울, 서울대학교출판부, pp 111-115, 1990.
14. 배철영 외. 노인의학. 서울, 고려의학, pp 24-27, 1996.
15. 진선 외. 실용중뇌병리학. 북경, 학원출판사, pp 216, 237-245, 784-797, 1993.

16. 장길. 중의치료뇌위축근황. 천진, 전진중의, 13(1):45-46, 1996.
17. 서순규. 성인병·노인의학. 서울, 고려의학, pp 10-15, 28-30, 225-229, 1992.
18. 김진수. 알츠하이머병의 신경화학적 변화에 관한 고찰. 대한 신경과학회지 3(1):46-46, 1985.
19. 종전화. 정의방제통서. 북경, 학원출판사, pp 245-237.
20. 許沛虎 외. 中醫 腦病學. 北京, 中國醫藥科技出版社, p 464, 1998.
21. 崔應珉 외. 腦病. 北京, 河南醫科大學出版社, p 185, 186, 1998.
22. 신민교. 임상본초학. 서울, 영림사, p 248, 185, 525, 260, 274, 649, 209, 646, 280, 225, 305, 227, 221, 604, 176, 2000.
23. 한방약리학 교재편찬위원회. 한방약리학. 서울, 신일상사, pp 682-683, 719-720, 734-735, 543-544, 717-718, 49-50, 420-421, 69-70, 307-308, 557-558, 583-584, 691-692, 738-739, 135-136, 2005.
24. Kim, M.S., So, H.S., Park, J.S., Lee, K.M., Moon, B.S., Lee, H.S., Kim, T.Y., Moon, S.K., Park, R. Hwansodan protects PC12 cells against serum-deprivation-induced apoptosis via a mechanism involving Ras and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway. Gen Pharmacol. 34(4):227-235. 2000.
25. Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev. 13: 1899-1911. 1999.
26. Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-rigon, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. Nature Med. 6: 614-620. 1998.
27. Reed, J.C. Bcl2 and the regulation of programmed cell death. J. Cell. Biol. 124: 1-6, 1994.
28. Herr, I., Wilhelm, D., Bohler, T., Angel, P., Debatin, K.M. Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. EMBO. 16: 6200-6208. 1997.
29. Heibein, J.A., Barry, M., Motyka, B., Bleackley, R.C. Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential ($\Delta\psi$) and cytochrome c release are caspase independent. J Immunology. 163(9):4683-4693. 1999.
30. Micheau, O., Solary, E., Hammann, A., Martin, F., Dimanche-Boitrel, M.T. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. J Natl Cancer Inst. 89: 783-789, 1997.
31. Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M.J, Matzuku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M., Krammer, P.H. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science. 245: 301-305. 1989.
32. Kim, Y.M., Talanian, R.V., Billiar, T.R. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increase in caspase-3 like activity via distinct mechanism. J. Biol. Chem. 272: 311-338. 1997.
33. Andreeva, L., Heads, R., Green, C.J. Cyclophilins and their possible role in the stress response. Int J Exp Pathol. 80(6):305-315. Review. 1999.

34. Lemos, F.B., Ijzermans, J.N., Zondervan, P.E., Peeters, A.M., Van Den Engel, S., Mol, W.M., Weimar, W., Baan, C.C. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol.* 14(12):3278-3287. 2003.