

β-Amyloid로 유도된 신경독성에 대한 熱多寒少湯 加感方の 抗치매효과

배나영^{a,b} · 양현옥^b · 안택원^a

^a대전대학교 한의과대학 사상체질과

^b한국과학기술 연구원 강릉분원 천연물 소재 연구센터

Abstract

Protection effect of New-Yeolda-Hanso tang against β-Amyloid Induced Cytotoxicity in NGF-differentiated PC12 Cells

Bae Na-Young^{a,b}, Yang Hyun-Ok^b, Ahn Taek-Won^a

^aDept. of Sasang Constitution Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon Univ.

^bNatural Product Research Center, Korea Institute of Science and Technology

1. Objectives

Yeolda-Hanso tang (YH) has long been used as traditional herbal formula in Korea as various diseases. Now we modified Yeolda-Hanso tang (YH) for neurodegenerative diseases treatment and named New-Yeolda-Hanso tang (NYH). We investigated neuroprotective effects of NYH on NGF-differentiated PC12 cells cytotoxicity induced by β-Amyloid peptide (Aβ₂₅₋₃₅) and evaluated the ability of NYH to prevent and treat for neurodegenerative diseases via autophagy enhancement.

2. Methods and Results

1) Protective effect of NYH on PC12 cells cytotoxicity induced by Aβ₂₅₋₃₅.

PC12 cells survival was measured by MTT and lactate dehydrogenase (LDH) assay. 20μM β-Amyloid peptide (Aβ₂₅₋₃₅) induced cytotoxicity on NGF-differentiated PC12 cells. NYH attenuated the cytotoxic effects of Aβ₂₅₋₃₅ in a dose-dependent manner.

2) Pharmacological induction of Autophagy by NYH in PC12 cells

Autophagy induction and activation was measured by immunoblot assay. Marker of autophagy, LC3 II expression and the ratio of LC3-II/I was slightly increased in the protein treated with YH, and significantly augmented in the protein treated with NYH. NYH-induced increase of LC3-II protein level was inhibited by 3MA.

3) Induction of Autophagy by NYH on Aβ₂₅₋₃₅-induced injury in PC12 cells

In MTT assay, 100μg/ml pre-treated NYH attenuated 20μM Aβ₂₅₋₃₅-induced cytotoxicity in PC12 cells. Protection effect of NYH was blocked by autophagy inhibitor 3MA. In immunoblot assay, 1200μg/ml pre-treated NYH activated autophagy in 20μM Aβ₂₅₋₃₅-induced cytotoxicity in PC12 cells. The observed effect was partially blocked by 3MA.

3. Conclusions

All the results indicated that NYH possesses neuroprotective potential partially mediated by autophagy enhancement and NYH may be considered to be a promising new herbal formula to prevent and treat for neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD).

Key Words: New-Yeolda-Hanso tang (NYH), Neuroprotection, Alzheimer's disease, β-Amyloid, Autophagy

• 접수일 2009년 10월 24일; 심사일 2009년 11월 05일;
승인일 2009년 12월 02일
• 교신저자 : 안택원
충남 천안시 두정동 621번지 대전대부속천안한방병원
사상체질의학과
Tel : +82-41-521-7535 Fax : +82-41-521-7007
E-mail : twahn@dju.kr

I. 緒 論

치매는 여러 가지 원인질환에 의해 야기되는 지능 저하를 특징으로 하는 중후군으로 대개 만성적으로 진행하여 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 고도의 대뇌 기능의 장애를 나타내며¹, 높은 유병률과 사망률의 문제 뿐 아니라 일상생활의 영위에서도 심각한 장애를 초래하는데² 근래 들어 생활수준의 향상과 의학의 발달 등으로 인간의 수명의 크게 연장되어 노년기 치매는 점차 증가 추세에 있으며 이는 커다란 사회문제로 대두되고 있다.³

치매의 원인질환 중 가장 대표적인 질환인 Alzheimer's disease (AD)는 뇌의 전반적인 위축과 특유의 조직학적 소견인 노인반(senile plaques), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포 변성 등의 원인으로 인해 시냅스의 기능적 퇴화와 신경세포의 소실을 특징으로 하는 대표적인 퇴행성 뇌신경 질환⁴이다. AD의 기전에 대하여 많은 연구들이 이루어지고 있는데, PS유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해 베타-아밀로이드(β -Amyloid) 단백질이 과량으로 만들어지게 되고, 이 베타-아밀로이드(β -Amyloid)가 침적되어 생기는 세포내부의 신경섬유다발과 세포외부의 노인반에 의한 신경독성으로 인해 신경세포가 파괴되고 기능상실이 일어난다는 이론이 가장 대표적인 가설이다.⁵

알츠하이머병이나 파킨슨병을 포함하는 많은 퇴행성 뇌신경 질환들은 대부분 변형된 단백질의 응축이나 축적과 연관이 있다.⁶ 따라서 이러한 단백질들의 축적을 막고 분해시킬 수 있다면 퇴행성 뇌신경 질환의 진행을 늦추거나 예방할 수 있다는 이론 하에 최근 많은 연구들이 시도되고 있다. Ubiquitin - proteasome system (UPS)은 인체 내에서 일어나는 대표적인 단백질 분해 메커니즘으로 많은 퇴행성 뇌신경 질환 환자들은 이 기능이 저하되어 있어 변형된 단백질의 축적이 제어되지 못하는 것으로 알려져 있다.⁷

UPS 외에 또 하나의 중요한 단백질 분해 기전에는 autophagy-lysosomal pathway (ALP)가 있는데 이것이 최근 퇴행성 뇌신경 질환 치료에 중요 타겟으로 연구되고 있다.⁸ 즉 UPS의 기능에 이상이 생겨 리소좀의

분해 기능이 차단되면 거대자가포식(macroautophagy)이라는 또 다른 단백질 분해 경로가 활성을 나타내면서 일종의 보상 작용을 시도한다. 이 기작에서는 β -Amyloid나 α -synuclein와 같은 이상 단백질을 분해하여 단백질이 뇌신경세포에 축적되어 세포손상을 일으키는 것을 방지한다.^{9,10} 따라서 UPS 기능에 이상이 생긴 퇴행성 뇌신경질환 환자에게 ALP를 통한 치료법의 개발이 주목을 받고 있다.

최근 四象處方의 효과를 실험적, 임상적으로 입증하고자 하는 시도가 활발히 이루어지고 있는데, 이에 따라 대표적인 난치성 질환인 퇴행성 뇌신경 질환에 대한 실험적 근거를 밝히는 연구의 필요성이 높아지고 있다.

『東醫壽世保元』¹¹에 기재된 熱多寒少湯은 太陰人 肝受熱裏熱病을 치료하도록 만들어진 처방으로, 임상에서는 太陰人의 대사증후군을 비롯한 성인병에 유효한 처방으로 활용되고 있다. 특히 熱多寒少湯 및 그 加味方들은 태음인의 중풍 초기 단계에서 뇌세포의 손상을 보호하는 등 활용빈도가 높은 처방으로 알려져 있다.¹² 본 연구에서는 이러한 임상적 활용에 착안하여, 熱多寒少湯이 알츠하이머병의 병인으로 알려진 베타-아밀로이드가 유발하는 뇌신경독성에 대하여 구체적으로 어떤 효과를 보이는지 확인하여 알츠하이머병을 비롯한 퇴행성 뇌신경 질환의 치료의 가능성을 알아보기 위하여 실험적 연구를 진행하였다.

熱多寒少湯이 뇌기능에 미치는 영향에 관한 선행 연구로는, 박¹³ 등의 熱多寒少湯이 低酸素性 大腸神經細胞 손상에 미치는 영향, 이¹⁴ 등의 熱多寒少湯 煎湯液이 Hydrogen Peroxide에 의해 損傷된 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향, 최¹⁵ 등의 人間腦星狀細胞에서 熱多寒少湯에 의한 細胞活性物質 生成 調節에 관한 研究 등이 있어 주로 뇌신경세포의 손상의 회복에 관한 연구가 있었으나 치매 증상으로 대표되는 퇴행성 뇌신경 질환에 대한 연구는 미흡하였으며 특히 알츠하이머 병에 관한 연구는 찾아보기 힘들었다. 한편 본 연구의 熱多寒少湯 加減方 (NYH)에 가미된 약재인 遠志, 石菖蒲에 관한 연구로는, 이¹⁶ 등의 遠志와 石菖蒲 混合抽出液의 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에 대한 항치매

Table 1. Plant constituents of YH and YH-1

No.	YH		YH-1	
	Scientific name	Contents(g)	Scientific name	Contents(g)
1	<i>Puerariae Radix</i>	16g	<i>Puerariae Radix</i>	16g
2	<i>Angelicae Tenuissime Radix</i>	8g	<i>Angelicae Tenuissime Radix</i>	8g
3	<i>Saundersiae Radix</i>	8g	<i>Saundersiae Radix</i>	4g
4	<i>Platyodi Radix</i>	4g	<i>Platyodi Radix</i>	2g
5	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	4g	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	4g
6	<i>Cimicifugae Rhizom</i>	4g	<i>Cimicifugae Rhizom</i>	4g
7	<i>Raphani Semen</i>	4g	<i>Raphani Semen</i>	4g
total		48g		42g

Table 2. Plant constituents of NYH

No.	Scientific name	Contents(g)
1	<i>Puerariae Radix</i>	16g
2	<i>Angelicae Tenuissime Radix</i>	8g
3	<i>Saundersiae Radix</i>	4g
4	<i>Platyodi Radix</i>	2g
5	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	4g
6	<i>Cimicifugae Rhizom</i>	4g
7	<i>Raphani Semen</i>	4g
8	<i>Polygalae Radix</i>	6g
9	<i>Acri Gramineri Rhizom</i>	6g
total		54g

효과, 강¹⁷ 등의 국소 뇌허혈 흰쥐모델에서 遠志石菖蒲散의 뇌손상 및 인지기능 보호효과, 임¹⁸ 등의 산화적 손상에 의한 Neuro 2A 치매모델에서 石菖蒲遠志散의 방어효과 등의 연구보고가 있었으나 주로 항산화 기능에 관련된 것으로 알츠하이머 병 치료에 관련된 연구는 미흡하였다.

이에 저자는 熱多寒少湯(YH)과 熱多寒少湯의 각 單味 약제가 알츠하이머 병의 원인이 되는 독성단백질인 베타-아밀로이드의 독성에 대하여 어떤 효과를 나타내는지 실험하고, 『東醫 四象 新編』¹⁹의 내용을 근거로 여러 태음인 약제의 신경 보호 효과를 실험하여, 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 만들었다. 또한 이 처방을 이용하여 베타-아밀로이드가 유발한 뇌세포 독성에 대한 보호효과와 自家 飢食 作用

(autophagy)의 활성화를 통한 뇌세포 보호 기작을 확인함으로써 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 알츠하이머 병을 비롯한 퇴행성 뇌신경질환의 치료와 예방에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 研究 材料 및 方法

1. 材料

1.1 약제

본 실험에 사용한 약제는 대전대학교 천안한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 熱多寒少湯(YH)과 熱多寒少湯 加減方(NYH)은 『東醫壽世保元』¹¹ 처방과 『東醫 四象 新編』¹⁹에 의거하였으

며 1칩의 분량은 Table 1, Table 2 와 같다.

1.2 검액조제

약재를 식물전체, 잎 또는 열매를 깨끗이 세척하고 잘게 절단한 후 증량비율의 4배의 물을 가하여 용기 약탕기에서 95℃에서 4시간동안 1차 추출한 후, 여과하고 남은 고형분에 다시 물을 절반량 추가하여 상기와 동일한 조건에 따라 2차 추출하였다. 이 두 가지 추출액을 여과하여 고형분을 제거한 후, 3200rpm에서 20분간 원심분리한 후 상청액을 수집하였다. 다시 상청액을 2.0 μm 마이크로 필터를 사용하여 필터링한 액체만을 수집하여 사용하였다.

1.3 시약 및 기기

세포주를 배양한 배지인 Dubecco's modified Eagle' medium (DMEM) 과 우태아혈청(fetal bovine serum : FBS) 은 HyClone Laboratories (HyClone Rd., Logan UT, USA)에서 구입하였으며, 항생제, trypsin 및 기타 세포주 배양에 필요한 시약은 Gibco RBL (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. 실험에 필요한 β-Amyloid peptide(Aβ25-35)와 autophagosome formation의 inhibitor인 3-methyladenine(3-MA)은 Signa Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Cell Counting Kit-8은 Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan) 제품을, In vitro toxicology assay kit (LDH diagnostic kit)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 각각 사용하였다.

2. 方法

2.1 세포 배양 및 처리

신경 영양인자인 NGF로 분화시킨 Rat pheochromocytoma cells (PC12 cell) 은 Japan에서 분양받아 37℃, 5% CO2 incubator에서 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100U/mL penicillin 과 100μg/mL streptomycin 이 포함된 Dubecco's modified Eagle' medium (DMEM) 배양액으로 배양하였으며, log phase에 있는 세포에 한약재 등을 처리한 후 세포 독성 실험과 이에 연관된 생화학 및 분자생물학적 변화 실험을 수행하였다.

세포성장률과 세포괴사율을 측정하는 MTT, LDH

실험에서, PC12 세포는 세포배양판(96-well microplates)에 1.5×10⁵cells/well의 농도가 되도록 100μL/well 씩 분주하여 24시간 동안 CO2 incubator에서 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. 이후 한약 單味 혹은 處方を 각 농도별로 배양한 세포에 전처리하여 2시간동안 배양한 후, Aβ25-35 등 실험에 필요한 각 조건의 시약을 추가로 처리하여 24시간동안 배양하였다. Distilled water만 처리한 대조군은 한약이나 Aβ25-35 등의 시약을 처리하지 않은 세포군을 사용하였다.

단백질 발현을 측정하는 western-blotting 실험에서는 PC12 세포는 세포배양판(6-well plates)에 4×10⁵cells/well의 농도가 되도록 2ml/well씩 분주하여 24시간 동안 CO2 incubator에서 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. 이후 한약 처방을 각 농도별로 배양한 세포에 전처리하여 2시간동안 배양한 후, Aβ25-35 등 실험에 필요한 각 조건의 시약을 추가로 처리하여 24시간동안 배양하였다. Distilled water만 처리한 대조군은 한약이나 Aβ25-35 등의 시약을 처리하지 않은 세포군을 사용하였다.

2.2 세포성장률 측정

세포성장률(Cell viability)은 MTT 용액을 이용한 quantitative colorimetric assay 방법을 사용하여 측정하였다. 상기한 세포 배양상태에서 각 조건에 맞는 처치를 하여 배양한 후, MTT 용액을 배양액 부피의 1/10이 되도록 첨가하여 5% CO2 incubator에서 1시간동안 배양하였다. 반응생성물의 흡광도는 분광광도계(ELISA reader, Bio-Rad, Germany)를 이용하여 450nm 파장에서 측정하였다.

2.3 세포괴사율 측정

세포괴사율(Cell death rate)은 세포배양액내로 분비된 lactate dehydrogenase enzyme(LDH) 을 이용한 LDH release assay 방법을 사용하여 측정하였다. 상기한 세포 배양상태에서 각 조건에 맞는 처치를 하여 배양한 후, LDH assay lysis 용액을 배양액 부피의 1/10이 되도록 대조군 세포에 첨가하여 5% CO2 incubator에서 45분 동안 배양하였다. 대조군 세포가 용해되면, LDH가 방출된 실험군 및 대조군 세포의 배양액을 각각 새로운 세포배양판(flat-bottom plates)에 옮긴 후, 배양액의 2

배 농도의 LDH assay mixture를 섞어서 빛을 차단한 상태로 실온에서 30분 동안 배양하였다. 배양액으로 방출된 LDH의 흡광도는 분광광도계(ELISA reader, Bio-Rad, Germany)를 이용하여 490nm 파장에서 측정하였다.

2.4 自食作用(autophagy) 유도효과 확인

自食作用(autophagy)의 유도는 자식소포체(autophagosome)의 세포막 표면에 나타나는 light chain3 (LC3) 단백질을 탐지하여 확인할 수 있다. LC3 단백질은 自食作用(autophagy)이 일어나는 동안 자식소포체의 세포막 표면에 발현되기 때문에 自食作用(autophagy)의 특이적인 지표로 사용된다. LC3 단백질에는 2가지 형태가 있는데, 세포질 내에 존재하는 LC3-I(18 KD) 단백질이 自食作用(autophagy)이 일어나서 자식소포체가 생기면 LC3-II(16 KD) 형태로 전환되어 소포체의 표면에 발현된다. 따라서 새로운 LC3-II 단백질의 발현이나, LC3-I 에서 LC3-II 로의 전환비율이 증가하는 것을 확인하는 것이 自食作用(autophagy)의 유도를 입증하는 방법이다.²⁰

2.4.1 Immunoblot analysis

세포는 한약재 등을 처리한 후, 포집하여 2500rpm에서 5분간 원심분리하여 FBS (pH 7.2)로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 mitochondrial lysis buffer (50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.3% NP-40, 100 μ M PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin)과 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켜 단백질을 분리한 후, 13,200rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상청액을 Bradford's method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 따라서 단백질을 정량하였다.

동량의 세포파쇄액은 SDS loading buffer와 혼합하여 99 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후에 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 를 시행하였다. 단백질은 분자량에 기초하여 분리하기 위하여 단일 15% SDS-polyacrylamide gel을 사용하였다. 각 gel 당 150V로 전기영동 한 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 15V의 전하를 1시간동안 걸어주어 nitrocellulose membrane상으로 이동시켰다. nitrocellulose membrane은

blocking buffer (5% skim milk in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20) 와 상온에서 30분 동안 반응하여 비특이적인 항체 결합을 예방하였다. LC3, GapDH에 대한 항체는 0.1% Tween-20이 포함된 5% skim milk/Tris-buffered saline 에 1:1000으로 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 동안 반응시킨 후, 이차항체 (anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase) 를 1:2000 의 비율로 희석하여 1시간동안 반응하였다. nitrocellulose membrane은 TBS로 3회 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL필름에 현상하였다. GapDH는 동량의 단백질 검증을 위하여 사용하였다.

3. 통계분석

실험에서 얻은 결과는 mean \pm SD로 기록하였고, one-way ANOVA법과 Student's t-test 분석방법을 이용하여 통계처리하여, p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

III. 研究結果

1. 熱多寒少湯(YH)이 A β 25-35로 유발된 PC12 세포독성에 미치는 영향

熱多寒少湯(YH)이 신경독성 물질인 A β 25-35로 유발된 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 신경영양인자 NGF를 처리하여 신경세포로 분화시킨 PC12 세포주에 熱多寒少湯(YH)을 다양한 농도 (300 μ g/ml, 600 μ g/ml, 1200 μ g/ml)로 처리하고, 2시간 후에 20 μ M A β 25-35로 독성을 유발하여 24시간 배양한 후 세포성장률을 측정하는 MTT 실험을 진행하였다. 20 μ M A β 25-35의 독성으로 대조군에 비해 70% 감소된 세포성장률에 대하여 600 μ g/ml 농도로 熱多寒少湯(YH)을 전처리한 실험군에서 유의하게 세포성장률이 증가되었으나 (P<0.05), 1200 μ g/ml 농도에서는 세포 보호 효과가 보이지 않았다. 세포괴사율을 측정한 LDH 실험에서는, 40 μ M A β 25-35의 독성으로 대조군에 비해 20% 증가한 세포괴사율에 대하여 300 μ g/ml, 600 μ g/ml 농도로 熱多寒少湯(YH)을 전처리한 실험군에서 세포괴사율이 감소되는 경향을 보였으나, 1200 μ g/ml 농도에서는 오히려 세포괴사율이 증가하

Table 3. Protective effect of NYH extract pre-treatment for 2h at different concentrations on the differentiated PC12 cells cytotoxicity of 24h Aβ25-35 exposure. (MTT assay, LDH assay) 1)

	MTT assay			LDH assay		
	Cell viability(%)			Cell death rate(%)		
Control	100.00±0.2			0.00±0.2		
Aβ25-35	70.07±0.3#			20.95±0.2#		
Dose(μg/ml)	300	600	1200	300	600	1200
YH	83.79±0.3	87.80±0.6*	64.93±0.4#	17.32±0.3	15.15±0.2	27.82±0.6#
YH-1	85.30±0.6	104.77±0.4*	127.12±0.5**#	17.32±0.4	11.09±0.3*	8.50±0.5*
NYH	100.50±0.5*	129.03±0.4**#	162.85±0.3**##	11.12±0.3	3.27±0.5*	-2.34±0.2**

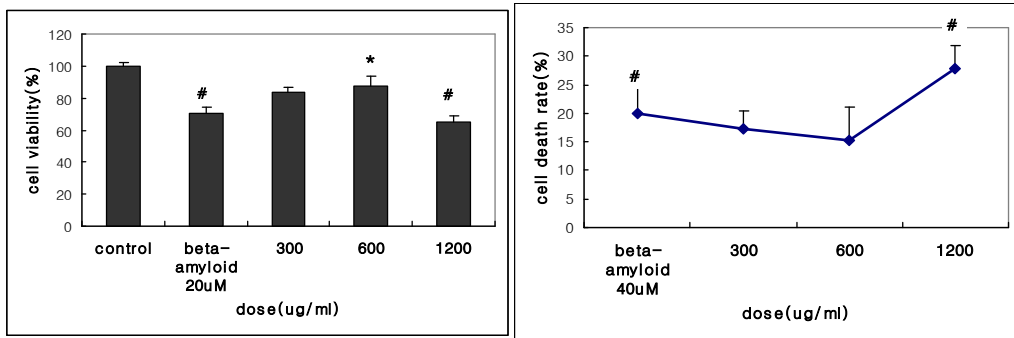


Fig. 1 Protective effect of YH pre-treatment at different concentrations on the differentiated PC12 cells cytotoxicity of Aβ25-35 exposure. (Lt. MTT assay, Rt. LDH assay)

The differentiated PC12 cells were pre-treated with YH at various concentration for 2h followed by addition of 20μM Aβ25-35 for another 24h. The cell viability was measured by MTT assay and the results were expressed as % viability of distilled water-treated control.

The differentiated PC12 cells were pre-treated with YH at various concentration for 2h followed by addition of 40μM Aβ25-35 for another 24h. The cell death rate was measured by LDH assay and the results were expressed as % cell death rate of distilled water-treated control.

Differences are significant at # p<0.05, ## p<0.01 values against distilled water-treated control group. Differences are significant at * p<0.05, ** p<0.01 values against Aβ25-35-treated group. Each data represents the mean± SEM(n=3). ANOVA

1) The differentiated PC12 cells were pre-treated with YH, YH-1, NYH at various concentration (300, 600, 1200μg/ml) for 2h followed by addition of 20μM Aβ25-35 for another 24h. The cell viability was measured by MTT assay and the results were expressed as % viability of distilled water-treated control. The differentiated PC12 cells were pre-treated with YH, YH-1, NYH at various concentration (300, 600, 1200μg/ml) for 2h followed by addition of 40μM Aβ25-35 for another 24h. The cell death rate was measured by LDH assay and the results were expressed as % cell death rate of distilled water-treated control. Differences are significant at # p<0.05, ## p<0.01 values against distilled water-treated control group. Differences are significant at * p<0.05, ** p<0.01 values against Aβ25-35-treated group. Each data represents the mean± SEM(n=3). ANOVA

였다 (P<0.05). (Table 3, Fig. 1)

2. 熱多寒少湯(YH) 구성 單味약재가 Aβ25-35로 유발된 PC12 세포독성에 미치는 영향

熱多寒少湯(YH)의 구성 單味약재가 Aβ25-35로 유발된 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 신경영양인자 NGF를 처리하여 신경세포로 분화시킨 PC12 세포주에 각 單味들을 다양한 농도 (150μg/ml, 300μg/ml, 600μg/ml) 로 처리하고, 2시간 후에 20μM Aβ25-35로 독성을 유발하여 24시간 배양한 후 세포성

Table 4. Protective effect of NYH extract pre-treatment for 2h at different concentrations on the differentiated PC12 cells cytotoxicity of 24h Aβ25-35 exposure. (MTT assay, LDH assay) 2)

	MTT assay			LDH assay		
	Cell viability(%)			Cell death rate(%)		
Control	100.00±0.2			0.00±0.2		
Aβ25-35	70.07±0.3#			20.95±0.2#		
Dose(μg/ml)	150	300	600	150	300	600
葛根(Puerariae Radix)	99.01±0.1*	109.86±0.1*	112.54±0.1*	19.72±0.1#	17.22±0.2	11.63±0.2*
藁本(Angelicae Tenuissimae Radix)	89.38±0.6*	98.46±0.2*	118.81±0.4**#	14.12±0.2	10.70±0.1	9.65±0.2*
黄芩(Scutellariae Radix)	70.41±0.3#	66.47±0.7#	40.59±0.5*##	20.78±0.3#	29.16±0.2#	57.47±0.1*##
桔梗(Platycodi Radix)	85.28±0.3	80.33±0.5	56.03±0.2##	19.42±0.3#	14.66±0.4	14.43±0.2
升麻(Angelicae Dahuricae Radix)	100.15±0.3*	117.26±0.7*	121.92±0.5**#	20.15±0.3#	18.62±0.3#	17.65±0.4
白芷(Cimicifugae Rhizoma)	84.69±0.5	89.76±0.1*	106.40±0.2*	21.64±0.3#	19.28±0.4#	15.70±0.5
萊菔子(Raphani Semen)	78.29±0.5	93.43±0.3*	101.57±0.5*	18.33±0.5	15.60±0.2	21.81±0.2#
遠志(Polygalae Radix)	92.09±0.7	96.26±0.4*	102.34±0.5*	2.67±0.3*	0.75±0.6*	-4.38±0.7**
石菖蒲(Acori Gramineri Rhizoma)	110.45±0.1*	136.43±0.2**##	155.09±0.2**##	10.21±0.3	8.58±0.3*	5.67±0.4*

장률과 세포괴사율을 각각 MTT, LDH법을 사용하여 측정하였다.

2.1 葛根

葛根을 2시간동안 전처리한 PC12 세포주에 20μM Aβ25-35로 독성을 유발한 후 세포성장률을 측정한 MTT 실험에서는, 20μM Aβ25-35의 독성으로 대조군에 비해 70% 감소된 세포성장률에 대하여 葛根 전처리군은 150μg/ml 농도에서 세포성장률을 대조군 수준으로 회복시켰으며 (P<0.05), 300μg/ml, 600μg/ml 농도에서도 세포성장률이 농도 의존적으로 증가하였다 (P<0.05). 세포괴사율을 측정한 LDH 실험에서는, 40μ

M Aβ25-35의 독성으로 대조군에 비해 20% 증가한 세포괴사율에 대하여 葛根 전처리군은 600μg/ml 농도에서 유의한 세포괴사율의 감소를 확인하였다 (P<0.05). (Table 4)

2.2 藁本

세포성장률을 측정한 MTT 실험에서 藁本 전처리군은 150μg/ml 농도에서 세포성장률을 대조군 수준으로 회복시켰으며 (P<0.05), 600μg/ml 농도에서는 세포성장률이 대조군보다도 유의하게 증가하였다 (P<0.05). 세포괴사율을 측정한 LDH 실험에서는, 40μM Aβ25-35의 독성으로 대조군에 비해 20% 증가한 세포괴사율에 대하여 藁本 전처리군은 600μg/ml 농도에서 유의한 세포괴사율의 감소를 확인하였다 (P<0.05). (Table 4)

2.3 黄芩

MIT 실험에서, 黄芩 전처리군은 300μg/ml, 600μg/ml 농도에서 Aβ25-35의 독성에서 세포를 보호하지 못하였으며, 600μg/ml 농도에서는 오히려 세포성장률이 대조군 대비 40%로 감소하였다 (P<0.01). LDH 실험에서는, 40μM Aβ25-35가 유발한 세포독성에 대하여 600μg/ml 黄芩을 전처리한 실험군에서 세포괴사율이 Aβ25-35 처리군 보다도 유의하게 증가함을 확인하였다 (P<0.05). (Table 4)

2) The differentiated PC12 cells were pre-treated with herbs contents of NYH at various concentration (150, 300, 600μg/ml) for 2h followed by addition of 20μM Aβ₂₅₋₃₅ for another 24h. The cell viability was measured by MTT assay and the results were expressed as % viability of distilled water-treated control. The differentiated PC12 cells were pre-treated with herbs contents of NYH at various concentration (150, 300, 600μg/ml) for 2h followed by addition of 40μM Aβ₂₅₋₃₅ for another 24h. The cell death rate was measured by LDH assay and the results were expressed as % cell death rate of distilled water-treated control. Differences are significant at # p<0.05, ## p<0.01 values against distilled water-treated control group. Differences are significant at * p<0.05, ** p<0.01 values against Aβ₂₅₋₃₅-treated group. Each data represents the mean±SEM(n=3). ANOVA

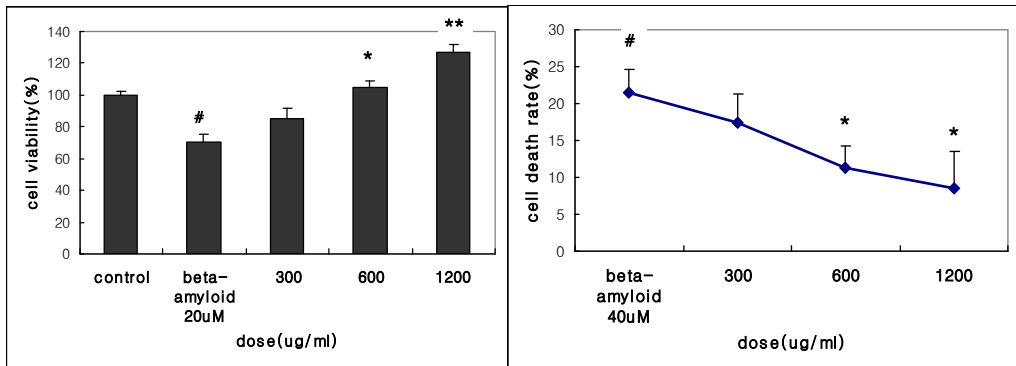


Fig. 2 Protective effect of YH-1 pre-treatment at different concentrations on the differentiated PC12 cells cytotoxicity of Aβ25-35 exposure. (Lt. MTT assay, Rt. LDH assay)

The differentiated PC12 cells were pre-treated with YH-1 at various concentration for 2h followed by addition of 20μM Aβ25-35 for another 24h. The cell viability was measured by MTT assay and the results were expressed as % viability of distilled water-treated control.

The differentiated PC12 cells were pre-treated with YH-1 at various concentration for 2h followed by addition of 40μM Aβ25-35 for another 24h. The cell death rate was measured by LDH assay and the results were expressed as % cell death rate of distilled water-treated control.

Differences are significant at # p<0.05, ## p<0.01 values against distilled water-treated control group. Differences are significant at * p<0.05, ** p<0.01 values against Aβ25-35-treated group. Each data represents the mean± SEM(n=3). ANOVA

2.4 桔梗

세포성장률은 150μg/ml, 300μg/ml 농도에서는 증가하는 경향을 보였으나 600μg/ml 농도에서는 黃芩과 마찬가지로 세포성장률이 대조군대비 56%로 감소하였다 (P<0.01). 세포괴사율은 40μM Aβ25-35가 유발한 세포독성에 대하여 桔梗 300μg/ml, 600μg/ml을 전처리한 실험군에서 세포괴사율이 감소하였으나 유의성은 없었다. (Table 4)

2.5 升麻

세포성장률은 농도 의존적으로 증가하였는데, 150 μg/ml 농도에서 세포성장률을 대조군 수준으로 회복시켰으며 (P<0.05), 600μg/ml 농도에서는 세포성장률이 대조군보다 유의하게 증가하였다 (P<0.05). 세포괴사율은 40μM Aβ25-35가 유발한 세포독성에 대하여 升麻를 전처리한 실험군에서 세포괴사율이 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. (Table 4)

2.6 白芷

세포성장률은 농도 의존적으로 증가하였는데, 300

μg/ml, 600μg/ml 농도에서 유의성이 확인되었다 (P<0.05). 세포괴사율은 40μM Aβ25-35가 유발한 세포독성에 대하여 白芷를 전처리한 실험군에서 세포괴사율이 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. (Table 4)

2.7 萊菔子

세포성장률은 농도 의존적으로 증가하였다 (P<0.05). 세포괴사율은 40μM Aβ25-35가 유발한 세포독성에 대하여 萊菔子 전처리군은 300μg/ml 농도에서 세포괴사율이 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. (Table 4)

3. 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 Aβ25-35로 유발된 PC12 세포독성에 미치는 영향

3.1 熱多寒少湯 減 黃芩, 桔梗(YH-1)

세포성장률을 측정된 MTT 실험에서 Aβ25-35 처리군에 비하여 세포성장률이 농도 의존적인 증가를 보였으며 (600μg/ml 농도에서 P<0.05, 1200μg/ml 농도에서 P<0.01), 1200μg/ml 농도에서서는 대조군 대비

127%가 증가 (P<0.05)하였다. 이는 YH-1 처방이 세포를 보호하는 것 뿐만 아니라 보호기전으로 세포의 성장을 촉진시킨다고 보여진다. 세포괴사율을 측정할 LDH 실험에서는 40μM Aβ25-35가 유발한 세포독성(대조군 대비 세포괴사율이 20% 증가)에 대하여 熱多寒少湯 減 黃芩, 桔梗(YH-1)을 전처리한 실험군에서 농도의존적으로 세포괴사율이 감소함을 확인하였다. (P<0.05) (Table 3, Fig. 2)

3.2 遠志 石菖蒲

3.2.1 遠志

세포성장률은 농도 의존적으로 증가하였는데, 150 μg/ml 농도에서 대조군 대비 92%까지 회복되었으며 (P<0.05), 600μg/ml 농도에서 세포성장률은 대조군 수준으로 회복되었다 (P<0.05). 세포괴사율은 40μM Aβ25-35가 유발한 세포독성에 대하여 150μg/ml 농도로 遠志를 전처리한 실험군에서 대조군 수준으로 세포괴사율이 감소하였으며 (P<0.05), 600μg/ml 농도에서는 대조군보다 세포괴사율이 감소하여 遠志가 자연

발생적인 세포괴사까지도 억제하는 효과가 있다고 보여진다. (Table 4)

3.2.2 石菖蒲

세포성장률은 150μg/ml 농도에서 대조군 수준으로 회복되었으며(P<0.05), 300μg/ml 농도의 경우 대조군 대비 136%(P<0.01), 600μg/ml 농도에서는 155% 세포성장률이 증가(P<0.01) 하였다. 세포괴사율은 40μM Aβ25-35가 유발한 세포독성에 대하여 石菖蒲를 전처리한 실험군에서 농도의존적으로 세포괴사율이 감소함을 확인하였다. (P<0.05) (Table 4)

3.3 熱多寒少湯 減 黃芩, 桔梗 加 遠志 石菖蒲

세포성장률은 300μg/ml 농도에서 대조군수준으로 회복되었으며(P<0.05), 대조군 대비 세포 성장률이 600μg/ml 농도에서는 129%(P<0.05), 1200μg/ml 농도에서 162% 증가(P<0.01)하였다. 이는 20μM Aβ25-35의 독성 자극에 대하여 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 세포를 보호하는 것 뿐만 아니라 보호기전으로 세

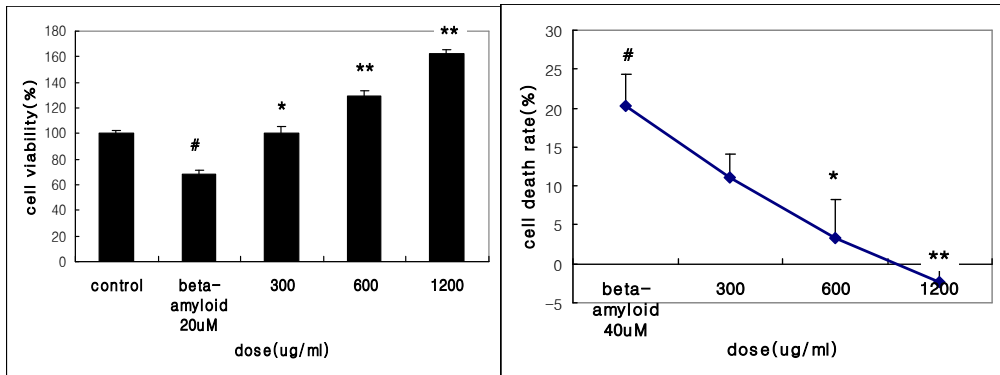


Fig. 3 Protective effect of NYH pre-treatment at different concentrations on the differentiated PC12 cells cytotoxicity of Aβ25-35 exposure. (Lt. MTT assay, Rt. LDH assay)

The differentiated PC12 cells were pre-treated with NYH at various concentration for 2h followed by addition of 20μM Aβ25-35 for another 24h. The cell viability was measured by MTT assay and the results were expressed as % viability of distilled water-treated control.

The differentiated PC12 cells were pre-treated with NYH at various concentration for 2h followed by addition of 40μM Aβ25-35 for another 24h. The cell death rate was measured by LDH assay and the results were expressed as % cell death rate of distilled water-treated control.

Differences are significant at # p<0.05, ## p<0.01 values against distilled water-treated control group. Differences are significant at * p<0.05, ** p<0.01 values against Aβ25-35-treated group. Each data represents the mean± SEM(n=3). ANOVA

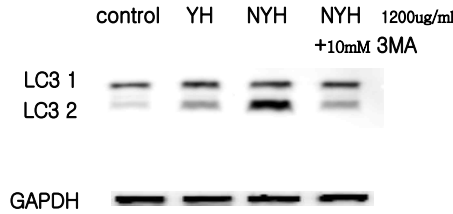


Fig. 4 Induction of Autophagy-lysosomal pathway by YH, MYH in differentiated PC12 cells. (Immunoblotting assay)

The induction of autophagy by YH, NYH on the differentiated PC12 cells was determined by measuring the LC3 protein expression levels using immunoblotting assay with antibody against LC3. Cellular proteins extracted from pre-treated with 1200 μ g/ml YH, NYH for 24h were examined by western blotting to determine the expression level of LC3 I, LC3 II proteins. The ratio of LC3B-II/I expression was evaluated by densitometric analysis and data were expressed as folds of distilled water-treated control. GapDH used as an equal loading of proteins.

포의 성장을 촉진시킨다고 보여진다. 세포괴사율은 40 μ M A β 25-35가 유발한 세포독성에 대하여 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 전처리한 실험군에서 A β 25-35 처리군에 비하여 농도의존적으로 세포괴사율이 감소함을 확인하였다. (600 μ g/ml 농도에서 P<0.05, 1200 μ g/ml 농도에서 P<0.01) (Table 3, Fig. 3)

4. 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 自食作用(autophagy)을 유발하는 효과

熱多寒少湯(YH)과 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 自食作用(autophagy) 유발에 미치는 효과를 알아보기 위하여 自食作用(autophagy) 발현의 마커인 LC3-II/I 단백질의 발현 변화를 Western blotting assay로 조사하였다.

4.1 熱多寒少湯(YH), 熱多寒少湯 加減方(NYH)

이 自食作用(autophagy) 유발에 미치는 효과 배양된 PC12 세포에 熱多寒少湯(YH)과 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 각각 1200 μ g/ml 농도로 처리한 실험군과 熱多寒少湯 加減方(NYH) 1200 μ g/ml과 自食作用 억제제(autophagy inhibitor)인 3MA 10mM을 혼합 처리한 실험군을 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C의 조건에서 배양하였다. 24시간 후에 LC3 I, LC3 II 단백질 검출을 위한 Lysate를 만든 후, western-blotting assay법을 이용하여 LC3 I 에서 LC3 II로의 전환비율을 확인하였다.

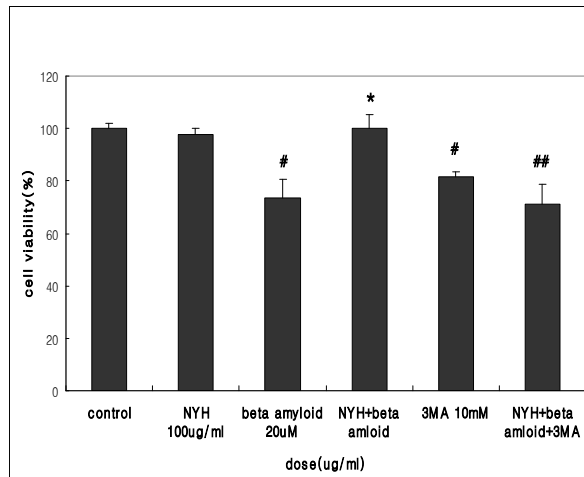
먼저 熱多寒少湯(YH) 1200 μ g/ml을 처리한 실험군에서 LC3 I 에서 LC3 II로의 단백질 전환 비율이 대조군에 비하여 증가하는 것으로 나타나 熱多寒少湯(YH)이 PC12 세포주에 대하여 自食作用(autophagy)을 유도하는 효과가 있음을 확인하였다. 다음으로 熱多寒少湯 加減方(NYH)의 경우는 LC3-II/I 단백질 전환 비율이 대조군에 비하여 현저히 증가하였으며, 熱多寒少湯(YH)만을 처리한 실험군에 비하여도 LC3-II 단백질의 발현이 뚜렷함을 확인하였다. 따라서 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 熱多寒少湯(YH)보다 PC12 세포주에 대한 自食作用(autophagy) 유도효과가 우수함을 확인할 수 있었다. 또한 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 自食作用 억제제(autophagy inhibitor)인 3MA과 혼합 투여했을 때는 LC3 II 단백질의 발현이 대조군 수준으로 감소하여 NYH의 자식작용이 억제됨을 확인하였다. (Fig. 4)

4.2 A β 25-35로 유발된 세포독성에 대한 熱多寒少湯 加減方(NYH)의 autophagy유도효과

熱多寒少湯 加減方(NYH)이 알츠하이머 병의 원인물질인 A β 25-35 단백질이 유발하는 세포독성에 대하여 autophagy를 유도하여 세포를 보호하는 효과가 있는지 확인하는 MTT assay와 western-blotting assay를 시행하였다.

Table 5. Protective effect of NYH extract pre-treatment for 2h on the differentiated PC12 cells cytotoxicity of 24h 20 μ M A β 25-35 exposure. (MTT assay)³⁾

	Control	100 μ g/ml NYH	20 μ M A β 25-35	NYH+A β 25-35	10mM 3MA	NYH+A β 25-35 +3MA
Cell viability(%)	100.00 \pm 0.2	97.93 \pm 0.2	73.44 \pm 0.7#	100.29 \pm 0.5*	81.39 \pm 0.2#	70.97 \pm 0.8##

Fig. 5 Protective effect of NYH extract pre-treatment for 2h on the differentiated PC12 cells cytotoxicity of 24h 20 μ M A β 25-35 exposure. (MTT assay)

The differentiated PC12 cells were pre-treated with 100 μ g/ml NYH with or without 10mM 3MA for 2h followed by addition of 20 μ M A β 25-35 for another 24h. The cell viability was measured by MTT assay and the results were expressed as % viability of distilled water-treated control.

Differences are significant at # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ values against distilled water-treated control group. Differences are significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ values against 20 μ M A β 25-35-treated control group. Each data represents the mean \pm SEM (n=3). ANOVA

4.2.1 MTT assay

MTT 분석을 위해 배양된 세포에 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 100 μ g/ml 농도로 처리한 실험군과 熱多寒少湯 加減方(NYH) 100 μ g/ml에 autophagy 억제제인 3MA 10mM을 혼합 처리한 실험군을 5% CO₂, 37°C의 조건에서 배양하였다. 2시간 후에 각 군에 20 μ

M A β 25-35를 처리하고, 24시간 후에 MTT 용액을 첨가하여 1시간동안 배양한 후, ELISA 기기를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

실험결과 20 μ M A β 25-35가 유발한 세포독성에 대하여 100 μ g/ml 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 처리한 실험군에서 세포성장률이 대조군 수준으로 회복되어 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 A β 25-35가 유발한 세포독성으로부터 뇌신경세포를 보호하는 효과가 확인되었다. 自食作用 억제제(autophagy inhibitor)인 3MA와 혼합처리한 실험군에서는 세포보호 효과가 거의 나타나지 않았다. (Table 5, Fig. 5)

3) The differentiated PC12 cells were pre-treated with 100 μ g/ml NYH with or without 10mM 3MA for 2h followed by addition of 20 μ M A β 25-35 for another 24h. The cell death rate was measured by MTT assay and the results were expressed as % viability of distilled water-treated control. Differences are significant at # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ values against distilled water-treated control group. Differences are significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ values against 20 μ M A β 25-35-treated group. Each data represents the mean \pm SEM (n=3). ANOVA

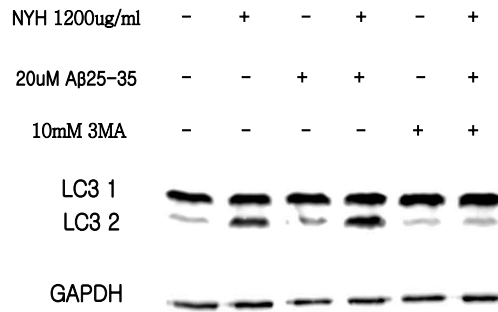


Fig. 6 Induction of ALP by NYH on Aβ25-35-induced injury in differentiated PC12 cells. (Immunoblotting assay)

The induction of autophagy by NYH on the differentiated PC12 cells was determined by measuring the LC3 protein levels using immunoblotting assay with antibody against LC3.

Cellular proteins extracted from pre-treated with 1200ug/ml NYH with or without 10mM 3MA for 2h followed by addition of 20uM Aβ25-35 for another 24h were examined by western blotting to determine the protein level of LC3 I and LC3 II. The amount of LC3 II or LC3 II/LC3 I ratio correlates with the number of autophagosomes.

The ratio of LC3 II/I was evaluated by densitometric analysis and data were expressed as folds of distilled water-treated control. GapDH used as an equal loading of proteins.

4.2.2 western-blotting assay

배양된 PC12 세포에 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 1200ug/ml 농도로 처리한 실험군과 熱多寒少湯 加減方(NYH) 1200ug/ml과 3MA 10mM을 혼합 처리한 실험군을 5% CO2, 37°C의 조건에서 배양하였다. 2시간 후에 각 군에 20uM Aβ25-35를 처리하고, 24시간 후에 LC3 I, LC3 II 단백질 검출을 위한 Lysate를 만든후, western-blotting assay법을 이용하여 LC3 I에서 LC3 II로의 전환비율을 확인하였다. 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 처리한 실험군에서는 autophagy 유도 효과를 나타내는 LC3 II 단백질의 발현이 확인되었고, Aβ25-35 처리군에서는 LC3 I에서 LC3 II로의 전환 비율이 대조군과 거의 차이가 없어 自食作用 (autophagy) 유발이 확인되지 않았다. 熱多寒少湯 加減方(NYH) 처리후 Aβ25-35를 처리한 실험군에서는 LC3 II 단백질의 발현이 확인되었을 뿐만 아니라 LC3 I에서 LC3 II로의 전환비율이 熱多寒少湯(YH)만 처리한 실험군에 비해 증가하는 경향을 확인하였다. 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 自食作用 억제제 (autophagy inhibitor)인 3MA과 혼합하여 전처리한 후 20uM Aβ25-35를 처리한 실험군에서는 LC3 II 단백질의 발현이 나타나지 않았다. (Fig. 6)

IV. 考察 및 結論

Alzheimer's disease (AD)는 뇌의 전반적인 위축과 특유의 조직학적 소견인 노인반 (senile plaques), 신경섬유다발 (neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립 공포 변성 등의 원인으로 인해 시냅스의 기능적 퇴화와 신경세포의 소실을 특징으로 하는 퇴행성 뇌신경 질환⁴이다. AD는 베타-아밀로이드(β-Amyloid), estrogen, apolipoprotein E, PS, oxidant, 염증, 사고에 의한 손상, 신경전달물질, 신경영양인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데²¹, 이중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 PS유전자들의 돌연변이와 APP의 과다생성으로 인해 베타-아밀로이드(β-Amyloid) 단백질이 과량으로 만들어지게 되고, 이 베타-아밀로이드(β-Amyloid)가 침적되어 생기는 세포내부의 신경섬유다발과 세포외부의 노인반에 의한 신경독성으로 인해 신경세포가 파괴되고 기능상실이 일어난다는 것이다²².

한편 알츠하이머 병을 포함하는 퇴행성 뇌신경 질환에서는 두 가지 공통적인 특징이 나타나는데 바로 잘못된 단백질의 축적과 단백질 분해 시스템의 문제 발생이 그것이다. 즉, 단백질의 misfolding으로 숨겨져

있었던 소수성 아미노산들이 노출되고 이런 잘못된 단백질에 대하여 신경세포가 반응하여 chaperon 단백질 그리고 protease을 활성화시켜 refolding, 즉 단백질을 분해를 유도하게 되는데, 퇴행성 뇌신경 질환의 초기에 이런 chaperon, 단백질 분해효소들의 활성이 떨어지면서 결국 misfolding된 단백질이 축적되게 된다. 알츠하이머 병의 원인인 베타-아밀로이드 단백질의 축적이나 파킨슨병의 α -synuclein 단백질, 헌팅톤 병을 일으키는 돌연변이 huntington 단백질의 축적 등을 그 예로 들 수 있다.^{7,23}

따라서 이러한 단백질들의 축적을 막고 분해 시스템을 활성화시킨다면 퇴행성 뇌신경 질환의 진행을 늦추거나 예방할 수 있다는 이론 하에 최근 많은 연구들이 시도되고 있다. ubiquitin-proteasome system (UPS)은 인체 내에서 일어나는 대표적인 단백질 분해 메커니즘으로 많은 퇴행성 뇌신경 질환 환자들은 이 기능이 저하되어 있어 변형된 단백질의 축적이 제어되지 못하는 것으로 알려져 있다.²⁴ UPS 외에 또 하나의 중요한 단백질 분해 기전에는 autophagy-lysosomal pathway (ALP)가 있는데 이것이 최근 퇴행성 뇌신경 질환 치료에 중요한 타겟으로 연구되고 있다.⁸ 즉 UPS의 기능에 이상이 생겨 리소좀의 분해 기능이 차단되면 거대자가포식 (macroautophagy)이라는 또 다른 단백질 분해 경로가 활성을 나타내면서 일종의 보상 작용을 시도한다. 이 기작에서는 β -Amyloid나 α -synuclein와 같은 이상 단백질을 분해하여 단백질이 뇌신경세포에 축적되어 세포손상을 일으키는 것을 방지한다.^{9,10} 따라서 UPS 기능에 이상이 생긴 퇴행성 뇌신경 질환 환자에게 ALP를 통한 치료법의 개발이 주목을 받고 있다.

이에 저자는 熱多寒少湯(YH)이 AD에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, 熱多寒少湯과 熱多寒少湯의 각 單味の 세포독성을 PC12 세포주에서 관찰하고, 베타-아밀로이드가 유발하는 독성에 대하여 세포보호 효과가 있는지 실험하였다. 또한 東醫四象 新編의 내용에 근거하여 여러 태음인 약제의 신경 보호 효과를 관찰한 결과를 바탕으로 熱多寒少湯(YH) 구성 약제 중 뇌신경세포 독성이 있을 것으로 추정되는 약제를 감량하고 뇌신경세포 보호 효과가 좋은 약제를 가미하여 熱多寒少湯 加減方(NYH)을

만들었다. 또한 이렇게 만든 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 A β 25-35가 유발한 뇌세포 독성에 대한 보호 효과와 독성 단백질 분해 기작인 自家 飮食 作用 (autophagy)을 활성화하는 효과가 있음을 확인함으로써 알츠하이머 병을 비롯한 퇴행성 뇌신경질환의 치료와 예방에 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

먼저 진행한 실험은 熱多寒少湯(YH)이 신경독성 물질인 A β 25-35로 유발된 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험으로, 신경영양인자인 NGF로 분화시킨 PC12 세포주에 熱多寒少湯(YH)을 다양한 농도(300 μ g/ml, 600 μ g/ml, 1200 μ g/ml)로 처리하고, 2시간 후에 20 μ M A β 25-35로 독성을 유발하여 24시간 배양한 후 세포성장률을 측정하는 MIT 실험을 진행하였다. 20 μ M A β 25-35가 유발한 세포독성에 대하여 熱多寒少湯(YH)은 600 μ g/ml 농도에서 유의하게 세포독성을 감소시켰으나, 1200 μ g/ml 농도에서는 세포 보호 효과가 보이지 않았다. (Table 3, Fig. 1) 이는 熱多寒少湯(YH)이 뇌세포 보호효과가 있는 약제와 뇌세포 독성을 유발하는 약제가 섞여 있어서 농도에 따라 효과가 다르게 나타나는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 熱多寒少湯(YH)을 구성하는 각 單味 약제에 대해서 위와 동일한 실험을 진행하였다. 그 결과, 葛根, 藜本, 白芷, 升麻, 萊菔子是 20 μ M A β 25-35가 유발하는 독성에 대해 세포 보호 효과와 사멸억제 효과가 농도 의존적으로 증가하였으나 黃芩과 桔梗은 고농도에서 20 μ M A β 25-35와 함께 처리 하였을 때 A β 25-35 단독처리군보다 세포 독성이 더욱 증가함을 확인하였다. (Table 4) 이상의 실험 결과를 바탕으로 熱多寒少湯(YH) 구성 단미 중 세포 독성이 확인된 黃芩과 桔梗의 함량을 감량한 처방(YH-1)으로 세포 독성 실험을 진행한 결과, 20 μ M A β 25-35가 유발하는 독성에 대해 세포 보호 효과와 사멸 억제 효과가 농도 의존적으로 증가하였으며 600 μ g/ml 농도에서 대조군 수준으로 세포성장률이 회복되었고 1200 μ g/ml 농도에서는 오히려 대조군보다 세포 성장률이 증가하였다. (Table 3, Fig. 2)

한편, 『四象 新編』의 내용을 근거로 하여 健忘 등을 치료하는 효과가 예상되는 單味인 遠志와 石菖蒲에 대하여 위와 동일한 실험을 진행하였다. 遠志를 2시간동안 전처리한 후 20 μ M A β 25-35가 유발한

세포독성에 대하여 세포성장률은 농도 의존적으로 증가하였는데, 150 μ g/ml 농도에서 대조군 대비 92%까지 회복되었으며 600 μ g/ml 농도에서 세포성장률은 대조군 수준으로 회복되었다. 세포괴사율을 측정할 LDH 실험에서는 40 μ M A β 25-35가 유발한 세포독성에 대하여 150 μ g/ml 농도의 遠志를 전처리한 실험군에서 대조군 수준으로 세포괴사율이 감소하였으며, 600 μ g/ml 농도에서는 대조군보다도 세포괴사율이 감소되어 遠志가 자연발생적인 세포괴사까지도 억제하는 효과가 있다고 생각된다. (Table 4) 石菖蒲를 2시간동안 전처리한 후 20 μ M A β 25-35가 유발한 세포독성에 대하여 세포성장률은 150 μ g/ml 농도에서 대조군수준으로 회복되었으며, 300 μ g/ml 농도의 경우 대조군 대비 136%, 600 μ g/ml 농도에서 155% 세포성장률이 증가하였다. 세포괴사율을 측정할 LDH 실험에서는 40 μ M A β 25-35가 유발한 세포독성에 대하여 石菖蒲를 전처리한 실험군에서 농도 의존적으로 세포괴사율이 감소함을 확인하였다. (Table 4)

따라서 이상의 결과를 바탕으로 熱多寒少湯(YH)에 黃芩과 桔梗을 감량하고 遠志와 石菖蒲를 가한 처방인 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 만들었고, 이 처방이 A β 25-35로 유발된 세포독성에 대하여 熱多寒少湯(YH)보다 탁월한 세포 보호 효과가 나타나는지 확인하기 위하여 동일한 방법으로 실험을 진행하였다. 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 2시간동안 전처리한 후 20 μ M A β 25-35가 유발한 세포독성에 대한 세포보호 효과를 측정할 결과, 세포성장률은 300 μ g/ml 농도에서 대조군수준으로 회복되었으며, 1200 μ g/ml 농도에서 대조군 대비 162% 세포성장률이 증가하였다. (Table 3, Fig. 3) 이는 20 μ M A β 25-35의 독성 자극에 대하여 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 세포를 보호하는 것 뿐만 아니라 보호기전으로 세포의 성장을 촉진시킨다고 보여진다. 또한 熱多寒少湯에서 黃芩, 桔梗을 감량하고 遠志, 石菖蒲는 가하지 않은 처방(YH-1)에 비하여 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 모든 농도에서 세포성장률의 증가가 우수함을 확인하였다. 또한 세포괴사율을 측정할 LDH 실험에서도 40 μ M A β 25-35가 유발한 세포독성에 대하여 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 전처리한 실험군에서 농도 의존적으로 세포괴사율이 감소하였으며 熱多寒少湯에서 黃芩,

桔梗을 감량하고 遠志, 石菖蒲는 가하지 않은 처방(YH-1)에 비하여 세포괴사율의 감소가 우수함을 확인할 수 있었다. (Table 3, Fig. 2, Fig. 3) 이상의 결과를 종합하여, 熱多寒少湯에서 黃芩, 桔梗을 감량하고 遠志, 石菖蒲를 가미한 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 자체적으로 뇌세포를 증식시키는 효과가 있으며, A β 25-35가 유발하는 세포독성에 대하여 세포를 보호하여 괴사를 억제하는 효과가 매우 우수하며, 독성 자극에 대하여 뇌세포를 증식시키는 효과가 있음을 확인하였다.

다음으로 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 베타-아밀로이드와 같은 독성 단백질을 분해하여 단백질이 뇌신경세포에 축적되어 세포손상을 일으키는 것을 방지하는 自食作用(autophagy) 유발효과가 있는지 확인하기 위한 Western blotting 실험을 진행하였다. 세포 내에서 自食作用(autophagy)이 유도되는 것을 확인하는 방법은 autophagy marker인 LC3-II/I 단백질의 발현 변화를 측정하는 것이 가장 일반적인 방법이다²⁵. 우리 몸에서 light chain 3 (LC3) 단백질은 두 가지 형태로 존재하는데, 정상세포에서는 LC3-I (18 KD) 단백질이 세포질 내에 흩어져 존재한다. 그러나 自食作用(autophagy)이 시작되어 autophagosome이 형성되면 세포질 내에 존재하던 LC3-I 단백질이 자식세포체의 세포막으로 이동하여 LC3-II (16 KD) 단백질로 전환되어 발현된다. 따라서 LC3-II 단백질의 발현량이 증가하거나 LC3 I에서 LC3 II로의 단백질 전환 비율이 증가하면 세포내에서 autophagosome이 형성되었음을 보여주는 것이고, 이로써 自食作用(autophagy) 유도효과를 확인할 수 있다²⁶. 이상의 이론을 바탕으로 熱多寒少湯(YH)과 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 自食作用(autophagy) 유발에 미치는 효과를 알아보기 위하여 LC3-II/I 단백질의 발현 변화를 측정하였다.

먼저 熱多寒少湯(YH) 1200 μ g/ml을 처리한 실험군에서 LC3 I에서 LC3 II로의 단백질 전환 비율이 대조군에 비하여 증가하는 것으로 나타나 熱多寒少湯(YH)이 PC12 세포주에 대하여 自食作用(autophagy)을 유도하는 효과가 있음을 확인하였다. 다음으로 熱多寒少湯 加減方(NYH)의 경우는 LC3-II/I 단백질 전환 비율이 대조군에 비하여 현저히 증가하였으며, 熱多寒少湯(YH)만을 처리한 실험군에 비하여도

LC3-II 단백질의 발현이 뚜렷함을 확인하였다. 따라서 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 熱多寒少湯(YH)보다 PC12 세포주에 대한 自食作用(autophagy) 유도효과가 우수함을 확인할 수 있었다. 한편, 3-methyladenine(3MA)은 PI3 kinase inhibitor로서 세포내에서 일어나는 自食作用(autophagy)을 억제하는 효과가 있어 세포에 自食作用을 유발하는 약물과 함께 처리하였을 때 약물에 의해 유발되는 自食作用의 효과를 감소시키는 것으로 알려져 있다²⁷. 본 실험에서 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 3MA와 혼합투여했을 때 LC3II 단백질의 발현이 대조군 수준으로 감소하여 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 진정한 autophagy inducer임을 확인하였다. (Fig. 4)

다음으로 진행한 실험은, 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 알츠하이머 병의 원인물질인 베타-아밀로이드 단백질이 유발하는 세포독성에 대하여 autophagy를 유도하여 세포를 보호하는 효과가 있는지 확인하는 MIT assay와 western-blotting assay를 시행하였다. MIT 실험결과 20 μ M A β 25-35가 유발한 세포독성에 대하여 100 μ g/ml 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 처리한 실험군에서 세포성장률이 대조군 수준으로 회복되어 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 A β 25-35가 유발한 세포독성으로부터 뇌신경세포를 보호하는 효과가 있음을 보여주었으나, 自食作用 억제제(autophagy inhibitor)인 3MA와 혼합처리한 실험군에서는 세포보호 효과가 거의 나타나지 않았다. 이는 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 A β 25-35로 유발된 세포독성으로부터 뇌세포를 보호하는 기전에 있어서 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 유도하는 自食作用(autophagy)이 관여하고 있음을 보여주는 결과라고 할 수 있다. (Table 5, Fig. 5)

다음으로 상기결과를 LC3-II/I 단백질의 발현 변화로 확인하기 위하여 western-blotting assay법을 이용하여 LC3 I에서 LC3II로의 전환비율을 확인하였다. 熱多寒少湯 加減方(NYH)을 처리한 실험군에서는 autophagy 유도 효과를 나타내는 LC3II 단백질의 발현이 확인되었고, A β 25-35 처리군에서는 LC3 I에서 LC3II로의 전환 비율이 대조군과 거의 차이가 없어 自食作用(autophagy) 유발이 확인되지 않았다. 그러나 熱多寒少湯 加減方(NYH) 처리 후 A β 25-35를 처리한 실험군에서는 LC3II 단백질의 발현이 확인되었을 뿐만

아니라 LC3 I에서 LC3II로의 전환비율이 熱多寒少湯(YH)만 처리한 실험군에 비해 증가하는 경향을 확인하였다. 이는 A β 25-35를 이용하여 세포독성이 유발된 상황에서, 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 autophagy를 활성화하는 것으로 보여진다. 또한 이러한 효과는 自食作用 억제제(autophagy inhibitor)인 3MA에 의해 억제되었다. 따라서 熱多寒少湯 加減方(NYH)은 autophagy inducer이며, 熱多寒少湯 加減方(NYH)이 A β 25-35로 유발된 자극에 대하여 뇌세포에 自食作用(autophagy)의 유도를 더욱 활성화하는 기전이 작용한다고 판단된다. (Fig. 6)

이상의 결과를 종합해보면, 熱多寒少湯 구성 약재 중 뇌신경세포 독성이 있을 것으로 추정되는 약재를 감량하고 뇌신경세포 보호 효과가 좋은 약재를 가미하여 만든 熱多寒少湯 加減方(NYH)은 베타-아밀로이드가 유발한 독성에 대한 뇌신경 세포 보호효과와 독성 단백질 분해 기작인 自家 食食 作用(autophagy)작용을 활성화하는 효과가 있음을 확인하였고 이를 바탕으로 알츠하이머 병을 비롯한 퇴행성 뇌신경질환의 치료와 예방에 유의한 효과가 있을 것으로 예상된다.

앞으로 熱多寒少湯 加減方(NYH)의 퇴행성 뇌신경 질환 치료 효과에 대한 좀더 다각도의 연구와 in vitro 실험 결과를 바탕으로 하는 in vivo 실험 및 임상 시험으로의 연계가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 감사의 말

본 논문은 한국과학기술연구원 강릉분원 천연물소재 연구센터의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 한국과학기술연구원 강릉분원의 연구지원에 감사드립니다.

VI. 參考文獻

1. 김지혁 외. 동의 정신의학. 현대의학서적사, 서울, 1992:256-271, 327-330.
2. 이가옥. 노인생활 실태분석 및 정책과제. 한국보건사회연구원, 1994:114-132.
3. Butler R.N. geriatric psychiatry. In Kalplan HI, Sadock

- BJ, eds. Comprehensive textbook of psychiatry V. Baltimore Williams and Wilkins, 1989:2014-2019.
4. Price D.L, Sisodia S.S. Mutant genes in familial Alzheimer's diseases and transgenic models. *Annu. Rev. Neurosci.* 1998;21:479-505.
 5. Selkoe D.J. Alzheimer's diseases: Mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Med.* 2004;140:627-638.
 6. Lansbury P.T, Lashuel H.A. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature.* 2006;443:774-779.
 7. Olanow C.W, McNaught K.S. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2006;21:1806-1823.
 8. Bandhyopadhyay U, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in aging and neurodegeneration: lessons from alpha-synuclein. *Exp Gerontol.* 2007;42:120-8.
 9. Martinez-Vicente M, Cuervo A.M, Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol.* 2007;6:352-361.
 10. Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein D.C. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyaniline expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet.* 2002;11:1107-1117.
 11. 전국한의과대학 사상의학 교실. *四象醫學*. 서울, 집문당, 2004:419-421.
 12. 송일병. 사상의학적 증풍관리의 임상적 연구. *四象體質醫學會紙*. 1996;8(2):117-130.
 13. 박수정 외 6명. 熱多寒少湯이 低酸素性 大腸神經細胞 손상에 미치는 영향. *四象體質醫學會紙*. 2003;15(1):72-89.
 14. 이재홍 박혜선, 김경요, 고기덕, 김일환. 熱多寒少湯 煎湯液이 Hydrogen Peroxide에 의해 損傷된 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향. *四象體質醫學會紙*. 2002;14(1):79-89.
 15. 최지숙, 김경요, 김형민, 주종천. 人間腦星狀細胞에서 熱多寒少湯에 의한 細胞活性物質 生成 調節에 관한 研究. *四象體質醫學會紙*. 2001;13(1):61-69.
 16. 이성률, 강형원, 김상태, 류영수. 遠志와 石菖蒲 混合抽出液의 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에 대한 항치매 효과. *東醫生理病理學會紙*. 2003;17(4):1037-1049.
 17. 임준모, 이인구, 윤종민, 이인, 문병순. 산화적 손상에 의한 Neuro 2A 치매모델에서 石菖蒲遠志散의 방어 효과. *大韓韓醫學會紙*. 2005;26(1):161-173.
 18. 강미선, 장규태, 김장현. 일시적 국소 뇌허혈 환쥐 모델에서 遠志石菖蒲散의 뇌손상 및 인지기능 보호효과. *東醫生理病理學會紙*. 2004;18(6):1777-1783.
 19. 원지상. *東醫 四象 新編*. 정담, 서울 2002.
 20. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19:5720-5728.
 21. Whitehouse PJ, Price DL, Stuble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia ; loss of neurons in the basal forebrain. *Science.* 1982;215(4537):1237-1239.
 22. Gridley KE, Green PS, Simpkin JW. Low concentration of estradiol reduce beta-amyloid25-35-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Brain Res.* 1997;778(1):158-165.
 23. Soto C, Estrada L.D. Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol.* 2008;65:184-189.
 24. Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev.* 2005;6:79-86.
 25. Dice J.F. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in Biological Sciences.* 1990;15:305-309.
 26. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19:5720-5728.
 27. Seglen P.O, Gordon P.B. 3-methyladenine; specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proceeding of the a National Academy of Sciences of U.S.A.* 1982;79:1889-1892.