

베타아밀로이드 유도성 SH-SY5Y 세포독성에서 丹川丸의 보호효과

유봉선⁺ · 김진경¹⁺ · 남상규 · 박찬희¹ · 소홍섭¹ · 문병순^{*}

원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 1:의과대학 미생물학교실

Danchunhwan Protects the Cytotoxicity of Beta-amyloid in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells

Bong Sun Yu⁺, Jin Kyung Kim¹⁺, Sang Kyu Nam, Channy Park¹, Hong Seob So¹, Byung Soon Moon^{*}

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

The water extract of Danchunhwan(DCH) has been traditionally used for treatment of dementia damage in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of DCH rescues cells from neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease. This study was designed to investigate the protective mechanisms of DCH on β -amyloid or H_2O_2 -induced cytotoxicity in SH-SY5Y neuronblastoma cells. β -amyloid and H_2O_2 markedly decreased the viability of SH-SY5Y cells, which was characterized with apparent apoptotic features such as membrane blebbing as well as fragmentation of genomic DNA and nuclei. However, the water extract of DCH significantly reduced both β -amyloid or H_2O_2 -induced cell death and apoptotic characteristics through reduction of intracellular peroxide generation. Also, the water extract of DCH prevented the mitochondrial dysfunction including the disruption of mitochondria membrane permeability transition (MPT) and the perturbation in Bcl-2 family protein expressions in H_2O_2 -treated SH-SY5Y cells.

Key words : Danchunhwan, neurodegenerative disease, protective effect, mitochondrial dysfunction

서 론

丹川丸은 丹蔘, 川芎으로 구성된 처방으로, 圓光大學校 附屬 韓方病院에서 腦卒中, 癡呆 등 腦細胞 損傷으로 인한 질환의 예방 및 치료에 활용되고 있다. 丹蔘은 性味가 苦, 微寒, 無毒하여 活血調經, 行血, 祛瘀, 涼血消痰, 生新血하는 효능이 있어, 血滯經閉, 血虛血瘀, 心悸失眠, 血邪心煩 등의 병증을 치료한다. 川芎은 性味가 辛, 溫, 無毒하여, 活血行氣, 開鬱, 養新血, 祛風止痛 등의 효능이 있으며, 一切血病, 氣鬱血鬱, 肢體麻痺, 一切心病 등의 병증을 치료한다¹⁻¹³⁾.

노인성 치매의 대표적인 질환인 알츠하이머병은 특히 미국, 유럽 등에서 전체 치매환자의 50~60%를 차지하며 의료, 사회적으로 문제가 되고 있으며 처음에는 초로기(65세 이전)에서만 생기는 질환으로 생각하였으나 현재는 모든 연령에서 생길 수 있

으며 나이가 들면서 그 빈도가 증가한다고 알려져 있다^{14,15)}. CT, MRI 검사상 전반적인 뇌위축과 대뇌피질 및 피질하백질에 산재하는 노인반(senile plaque) 그리고 신경섬유성 변화가 특징이다¹⁶⁾. 생화학적으로 아세틸콜린의 합성 효소의 활성이 저하되어 있고 노인반과 뇌혈관에서 아포리포단백질, 또는 베타 아밀로이드 단백질이 분리되었고, 21번 염색체에 그 유전자가 위치하고 있는 것도 확인되었다¹⁷⁾. 그러나 왜 알츠하이머병이 생기는지 그 발생 기전은 아직 잘 모르는 상태이다. 중요한 의문점은 정상 노화기 전과의 관련성이다. 임상적 증상으로는 정상 노화와 구별이 유용하지만 분자생물학적인 기전에서는 비슷한 점이 많은 이유에서이다. 최근 알츠하이머병에서 뇌세포의 퇴행성 변화의 분자생물학적 연구가 진행되고 있는데, 성장인자 결핍, 신경독성, 흥분성 아미노산의 과다, 세포내 Ca^{2+} 의 작용, 에너지 신진대사의 변화, free radical의 형성 등이다¹⁸⁾. 이와 같이 알츠하이머병은 아직까지 정확한 발생기전은 잘 모르는 상태로 근본 치료는 아직 없이 증상에 대한 치료가 대부분이다. 약물요법은 주로 부족한 신경전달 물질(neurotransmitter; 콜린계, 모노아민계)의 보충과 남아있는 뇌신경 세포의 대사 항진을 목적으로 하며, 콜린계에 작

* 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

용하는 약물이 주를 이루고 있으나 알츠하이머병에서 인지 기능의 개선에 대한 효과는 일부의 연구에서만 확인되는 정도이다¹⁹⁾.

따라서 이 연구에서는 알츠하이머병의 병인이 되는 베타 아밀로이드 펩타이드(β -amyloid)를 사람신경아종 세포주인 SH-SY5Y 세포에 직접 처리하여 세포사멸 현상의 기전을 밝히고, 베타 아밀로이드 및 이에 연관된 산화적 손상에 의한 SH-SY5Y 세포사멸을 방어하는 단천환의 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

사람 신경아종 SH-SY5Y 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 구입하여 계대 배양하면서 실험을 실시하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 약재는 익산한방병원 처방모음집에 기재된 구성내용을 바탕으로 하여 원광대학교 익산한방병원에서 정선한 것으로 한 첩 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Danchunhwan

韓藥名	生藥名	重量(g)
丹蔘	Radix Salviae miltiorrhizae	10.00
川芎	Rhizoma Cnidii	10.00
總量		20.00

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 RPMI 1640, 항생제, trypsin 및 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며 배양용기(24-well plate, 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide (MTT), crystal violet은 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Bcl-XL/S, ICAD/DFP45, HO-1 등의 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 단천환 100g을 물 1ℓ와 함께 냉각기를 부착한 환저 플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하고 3200rpm으로 20분간 원심 분리 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 RPMI1640 배

지에 희석하여 사용하였다.

2) SH-SY5Y 세포주 배양

사람 신경아종 세포주인 SH-SY5Y는 CO₂ 세포배양기에서 (37℃, 5% CO₂) 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640에서 배양하였다. 48시간 주기로 0.05% Trypsin-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(1×10^5 cells/ml)를 1ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, 배양액 최종 부피의 1/10 MTT 용액(5mg/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 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4) H₂O₂ 생성의 측정

베타아밀로이드 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. SH-SY5Y 세포에 단천환 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.

5) DAPI 염색

단천환을 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) 세포질과 핵 분획 분리

세포는 단천환을 처리한 후 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH7.4)으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액과 4℃에서 30분간 반응하였다. 세포 파쇄액은 먼저 750 \times g에서 10분간 원심 분리하였다. 얻어진 침전물은 파쇄용액으로 4℃에서 30분간 반응하여 세포핵 분획으로 사용하였고, 상층액은 다시 10,000 \times g에서 30분간 원심 분리하였다. 이때 얻어진 상층액은 세포질 분획으로 사용하였으며, 세포핵과 세포질 분획은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포파쇄액은 Western blot analysis 방법을 통해 Nrf-2의 발현 변화를 조사하였다.

7) Western blot analysis

세포는 단천환을 처리한 후 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH7.4)으로 2회 세척하였다. 얻어

진 세포는 파쇄용액(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin)과 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응하였다. 세포 파쇄액은 13,000rpm에서 20분간 원심 분리하여, 상층액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질 : 200 μ g)은 2 \times sample buffer와 혼합하여 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후에 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane 상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응하여 비특이적 항체결합을 예방하였다. Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-XL/S, HO-1 및 Nrf2에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응한 후 이차항체(anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase)와 1시간 반응하였다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3회 세척한 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 현상하였다.

8) 결과 산출 방법

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

결 과

1. 베타 아밀로이드 및 H₂O₂에 의한 SH-SY5Y 세포주의 생존율 변화

베타 아밀로이드 및 H₂O₂에 의한 SH-SY5Y 신경아종 세포주의 세포독성을 보기 위해 다양한 농도의 베타 아밀로이드와 H₂O₂를 각각 12시간 처리한 후 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 세포의 생존율은 1.25 μ M 베타 아밀로이드 처리군에서는 대조군의 97%, 2.5 μ M 농도에서는 83%로 감소하였으며, 5 μ M의 농도에서는 76%, 10 μ M의 농도에서는 63%의 세포 생존율을 보였으며 20 μ M의 농도에서는 49% 미만으로 감소하였다(Fig. 1A). 또한 H₂O₂의 세포독성에 있어서 세포독성은 200 μ M H₂O₂ 처리군에서 대조군의 51%, 400 μ M 농도에서는 42% 미만으로 현저히 감소하여(Fig. 1B) 베타 아밀로이드 및 H₂O₂에 의한 SH-SY5Y의 세포독성은 농도의존적으로 축적됨을 알 수 있었다.

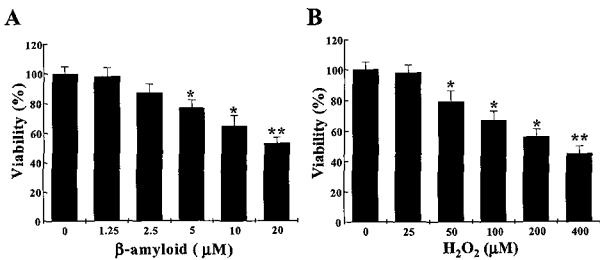


Fig. 1. Effects of β -amyloid and H₂O₂ on viability of SH-SY5Y cells. Cells were treated with various concentrations of β -amyloid for 12 hr (A), or added with 200 μ M H₂O₂ for 12 hr (B). Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean \pm S.D. of quadruplicates. * p<0.01, ** p<0.001 by student's t-test, compared with control group.

2. 단천환의 베타 아밀로이드 및 H₂O₂에 의한 SH-SY5Y 세포사멸에 대한 효과

베타 아밀로이드 및 H₂O₂의 처리에 의한 세포사멸을 확인하였으므로, 이때 SH-SY5Y 세포 손상에 대한 한약 처방의 보호효과를 알아보기 위하여 단천환을 다양한 농도로 30분 전 처리한 후 20 μ M의 베타아밀로이드 혹은 200 μ M의 H₂O₂를 12시간 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 세포생존율은 베타아밀로이드 단독처리시 대조군의 48%를 보였으나 단천환 전처리 실험군은 50 μ g/ml의 농도에서는 73%, 100 μ g/ml의 농도에서는 86%, 그리고 200 μ g/ml의 농도에서는 91%의 세포생존율을 보였다(Fig. 2A). 또한 200 μ M H₂O₂ 단독 처리시 대조군의 45%를 보였으나 단천환을 전처리한 실험군은 50 μ g/ml의 농도에서는 58%, 100 μ g/ml의 농도에서는 76%, 그리고 200 μ g/ml의 농도에서는 83%의 세포생존율을 보여(Fig. 2A), 단천환 농도의존적인 세포생존율의 증가를 확인할 수 있었다.

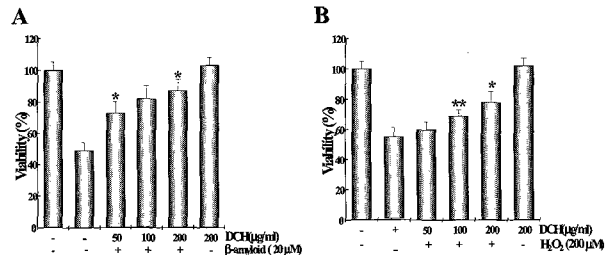


Fig. 2. Danchunhwan prevented the cytotoxicity by β -amyloid or H₂O₂ in SH-SY5Y cells in a dose-dependent manner. Cells were pretreated with various concentrations of DCH for 30 min and followed by the addition of 20 μ M β -amyloid or 200 μ M H₂O₂ for 12 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean \pm S.D. of quadruplicates. * p<0.05, ** p<0.01 by student's t-test.

3. 베타 아밀로이드에 의한 SH-SY5Y 세포사멸에서 H₂O₂ 생성 변화

베타 아밀로이드에 의한 SH-SY5Y 신경아종 세포의 사멸이 H₂O₂에 의한 세포사멸임을 밝히기 위하여 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 염색으로 세포내 H₂O₂의 생성을 flow cytometry(FACS) 분석을 통하여 조사하였다. 먼저 H₂O₂ 처리에 의한 DCF-DA의 형광 변화를 알아보기 위하여 200 μ M 농도의 H₂O₂를 2시간 처리한 후 FACS로 분석하였다. 그 결과 대조군에 비하여 현저한 형광의 증가가 관찰되었으며(Fig. 3D), 20 μ M 베타 아밀로이드에 의해서도 DCF-DA의 형광 변화가 관찰되기 시작하여 처리 6시간 이후에 최대의 형광변화를 보였다(Fig. 3B). 이때 단천환의 전처리에 의해서 세포내 H₂O₂의 생성이 감소되었으며(Fig. 3E), 베타 아밀로이드에 의해 생성된 H₂O₂도 뚜렷하게 감소하였다(Fig. 3C). 이상의 결과로 베타 아밀로이드에 의한 세포사멸은 세포내 활성산소종, 특히 H₂O₂의 생성에 의한 것으로 판단된다.

4. 산화적 손상에 의한 SH-SY5Y 세포의 형태적 변화에 대한 단천환의 효과

베타아밀로이드 혹은 H₂O₂에 의한 SH-SY5Y의 세포독성의 형태학적 특징을 관찰하기 위하여 핵산의 DAPI 염색을 수행하였다. SH-SY5Y 세포는 베타아밀로이드나 H₂O₂를 12시간 처리시 세

포수의 현저한 감소와 세포핵의 분절현상이 관찰되었으나(Fig. 4B와 D), 단천환을 30분간 전처리한 실험군에서는 대조군 수준으로 세포수와 형태가 농도의존적으로 회복되는것을 확인하였다(Fig. 4C와 E). 이상의 결과는 베타아밀로이드는 세포내에 활성산소인 H₂O₂를 생성시켰고 이에 따라 핵의 분절을 유도하는 전형적인 세포고사사이었으며 단천환은 이러한 산화적 손상에 의한 SH-SY5Y 세포 고사를 보호함을 알 수 있었다. 따라서 다음 실험에서는 세포에 베타아밀로이드 대신 H₂O₂를 직접 처리하여 수행하였다.

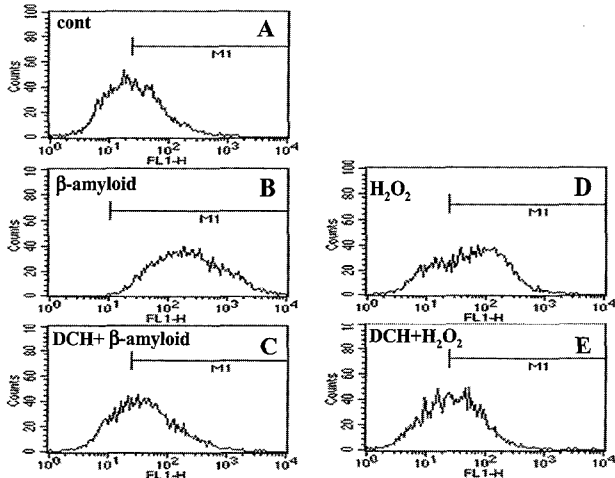


Fig. 3. Reduction of intracellular peroxide by Danchunhwan in β -amyloid-treated SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were treated with β -amyloid for 6 hr in the absence or presence of Danchunhwan. Then, cells were incubated with 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, 50 μ M) and fluorescence intensity of cells was analyzed by flow cytometry. The assay was repeated three times independently. The representative data are shown.

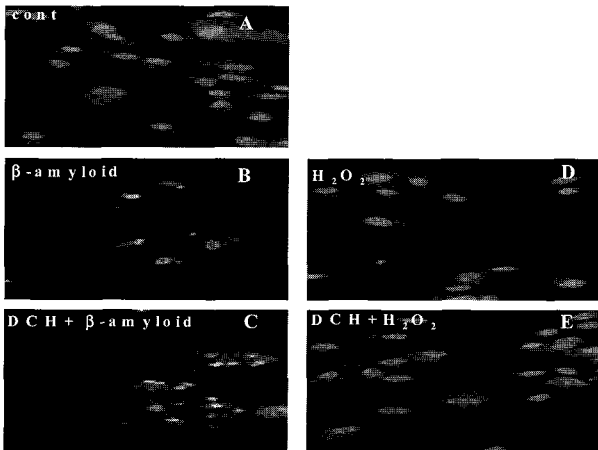


Fig. 4. Pretreatment with Danchunhwan prevented the morphological change by oxidative stress in SH-SY5Y cells. Cells were treated with β -amyloid (20 μ M) or H₂O₂ (200 μ M) for 12 hr. Then, cells stained with DAPI and observed under fluorescent microscopy.

5. 단천환의 SH-SY5Y 세포사멸에서 HO-1 단백질 발현에 대한 효과

산화적 손상에 의한 방어기작으로 세포내 발현이 증가되는 HO-1 단백질에 대한 단천환의 효과를 Western blot 방법으로 조사하였다. SH-SY5Y 세포의 HO-1 단백질 발현은 200 μ M H₂O₂ 처리시 약간 감소하였으나(Fig. 5A), 단천환 (200 μ g/ml) 처리시 시간 의존적으로 HO-1의 발현이 증가하였다(Fig. 5B). 또한 단천환을 전처리하고 H₂O₂ (200 μ M)를 처리하였을 경우 단천환 농도

의존적으로 HO-1의 발현이 증가하였다(Fig. 5C). 이때 단백질은 β -actin을 통하여 동량임을 확인하였다(Fig. 5)

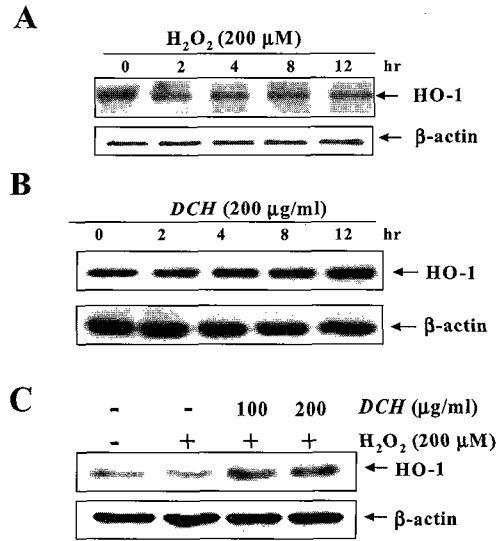


Fig. 5. Danchunhwan increased the HO-1 expression in H₂O₂-treated SH-SY5Y cells. Cells were treated with 200 μ M H₂O₂ in the absence and presence of 100 μ g/ml or 200 μ g/ml Danchunhwan for 6 hr. Cell lysates were used to measure the HO-1 and β -actin expression by Western blot analysis with anti-HO-1 and β -actin antibodies, respectively.

6. 단천환의 H₂O₂에 의한 SH-SY5Y 세포고사에서 Nrf2 translocation에 미치는 영향

앞에서 단천환에 의한 HO-1의 발현 증가를 확인하였으므로, HO-1의 발현을 조절하는 전사인자인 Nrf2의 활성 변화를 조사하였다. Nrf2는 세포질에서 세포핵 내로 이동함으로써 전사인자로서의 활성을 갖는다. SH-SY5Y 세포에 100 μ g/ml, 200 μ g/ml의 단천환을 30분 전처리한 후 200 μ M H₂O₂를 처리하여 세포질과 세포핵의 분획을 분리하여 얻은 세포부유액으로 Nrf2 단백질의 발현을 Western blot 방법으로 조사하였다. SH-SY5Y 세포에서 Nrf2는 200 μ M H₂O₂를 4시간 처리시 대조군과 비교하여 변화가 관찰되지 않았지만 단천환 처리시 농도의존적으로 세포질의 Nrf2 단백질의 양은 감소하였고 핵내 Nrf2 단백질은 증가하였다(Fig. 6).

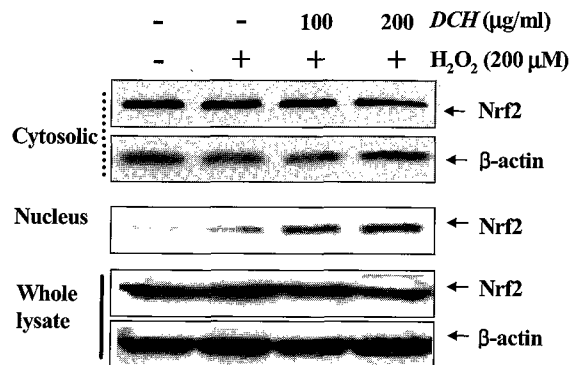


Fig. 6. Pretreatment with Danchunhwan induced the nuclear translocation in H₂O₂ treated SH-SY5Y cells. Cells were treated with H₂O₂ in the absence and presence of Danchunhwan. Cytosolic and nuclear extracts from cells were separated on 12% SDS-PAGE, and analyzed the Nrf-2 and β -actin expression by Western blot with anti-Nrf2 and anti- β actin antibody, respectively.

이때 전체적인 Nrf2 단백질의 발현 변화는 없었으므로, 단천환은 Nrf2 단백질의 세포질에서 핵내로의 이동을 촉진하여 활성을 조절한 것으로 판단된다.

7. 단천환의 H₂O₂에 의한 Bak, Bax 및 Bcl-2, Bcl-XL 단백질 발현에 대한 효과

세포고사 신호전달계에서 중요한 기관인 미토콘드리아에 연관된 Bcl-2 family 단백질군 즉, Bak, Bax, Bcl-2와 Bcl-XL의 발현을 조사하였다. SH-SY5Y 세포에 100, 200 µg/ml 단천환을 30분 전처리한 후 200 µM H₂O₂를 처리하여 세포부유액으로부터 이들 단백질의 발현을 Western blot 방법으로 조사하였다. SH-SY5Y 세포에서 H₂O₂의 처리는 pro-apoptotic Bak 및 Bax 단백질의 발현을 현저히 증가시켰으나 단천환 전처리에 의하여 대조군 수준으로 감소하였다(Fig. 7). 반면 anti-apoptotic Bcl-2 및 Bcl-XL 단백질의 발현은 200 µM H₂O₂를 6시간 처리시 대조군에 비교하여 현저히 감소하였지만 단천환을 30분간 전처리한 실험군에서는 농도의존적으로 증가시켜 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 7). 이때 β-actin 단백질 발현을 통해 동량임을 확인하였다.

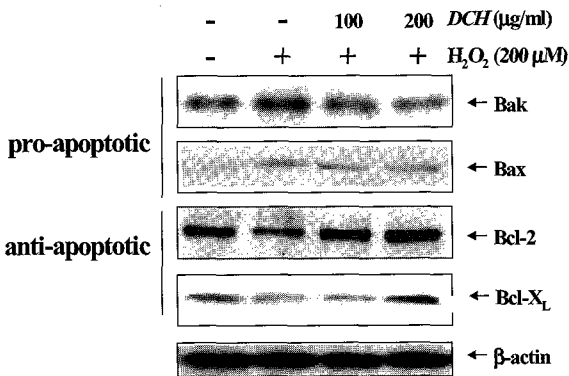


Fig. 7. Danchunhwan induced the increase of Bcl-2 and Bcl-XL expressions, whereas the decrease of Bak and Bax expressions in H₂O₂-treated SH-SY5Y cells. Cells were treated with 200 µM H₂O₂ in the absence or presence of DCH for 6 hr. Cell lysates were used to measure their expression patterns by Western blotting with anti-Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-XL and β-actin antibodies.

고찰

한의학에서 뇌에 관한 최근의 연구로는 기억장애²⁰⁾,健忘²¹⁾,痴呆²²⁾ 등을 중심으로 진행되고 있으며 특히 실험적 연구로는, 우²³⁾가 調胃升清湯을 白鼠에 투여하여 학습과 기억을 증진시키는 효과가 있음을, 金²⁴⁾은 洗心湯이 뇌세포에서 oxygen free radical에 대한 항산화작용을 통해 老化에 치료효과가 있음을, 黃²⁵⁾은 遠志가 腦神經膠細胞로부터 분비된 염증성 뇌세포 활성물질에 대한 억제효과가 있음을 보고하였고, 이외에도 다수의 연구 보고가 발표된 바 있다.

丹川丸은 丹蔘, 川芎의 두 가지 약물로 구성되었는데, 구성 약물의 效能과 主治 및 藥理作用에 관해 살펴보면 丹蔘(Radix Salviae miltiorrhizae)은 꿀풀과(脣形科, Labiatae)의 多年生 草本植物의 根과 根莖으로 性味가 苦, 微寒, 無毒하고 心, 肝經에 작용하며 活血調經, 行血, 祛瘀, 涼血消瘀, 生新血하는 효능이 있고

藥理作用으로는 心血管血流量增加, 血清脂質減少, 微細循環改善, 充血栓作用, 鎮靜作用, 抗菌作用, 免疫增強, 亢奮作用, 血糖降下 등이 있는 것으로 보고 되어 있다²⁶⁾. 川芎(Rhizoma Cnidii)은 미나리과(繖形科, Umbelliferae)에 속한 다년생초본인 川芎의 根莖으로 性味가 辛, 溫, 無毒하여, 活血行氣, 開鬱, 養新血, 祛風止痛 등의 효능이 있고, 藥理作用으로는 中樞神經系의 鎮靜作用, 冠狀動脈血流增強作用, 血壓降下作用, 血小板凝集抑制, 末梢血管擴張作用, 抗菌作用 등이 보고 되었다²⁷⁾. 이와 같이 丹川丸은 丹蔘의 活血祛瘀하는 효능과 川芎의 活血祛風하는 효능이 합용되어 活血化痰祛風의 작용을 가지고 있으므로 뇌세포손상질환의 예방 및 치료에 광범위하게 활용할 수 있을 것이다. 丹川丸에 관한 실험적 연구로는 한²⁸⁾, 나²⁹⁾ 등의 논문이 보고 되었다.

현대사회에 접어들면서 나름대로의 삶을 누리는 사람들의 최대 관심사는 건강으로 쏠리고 있으며, 남녀노소를 막론하고 정신적, 육체적, 사회적으로 질병이나 고통에 시달리지 않는 삶을 꿈꾸는 건 당연한 일이다. 특히 인구증가와 평균수명 연장으로 노령인구가 점점 증가하게 됨에 따라 뇌의 퇴행성 변화로 인한 질환을 비롯한 여러 가지 의학적 문제점들이 사회문제로까지 대두되고 있다³⁰⁾. 이러한 뇌의 퇴행성 변화로 인한 질환 중에 뇌졸중이나 뇌 손상, 척수 손상 및 癱瘓은 신경성 퇴행 질환으로서 신경 세포의 손상에 의하여, 이러한 癱瘓 중에서도 대표적 노인성 질환인 알츠하이머병(Alzheimer's disease)는 진행성 癱瘓로 점진적인 뇌위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 하는 원발성 퇴행성 대뇌질환으로 특히 미국, 유럽 등에서 전체 癱瘓 환자의 50~60%를 차지하여 의료, 사회적으로 문제가 되고 있다. 뿐만 아니라 AD는 처음에는 初老期(65세 이전)에서만 생기는 질환으로 생각하였으나 현재는 모든 연령에서 생길 수 있으며 나이가 들면서 점차 그 빈도가 증가한다고 알려져 있다^{14,15)}. AD는 1907년 독일의 알로이스 알츠하이머가 급격한 기억력장애와 실어증 및 편집증을 보인 51세 환자를 처음 보고함으로써 알려졌고, 이를 65세 이후 발병하는 노인성 癱瘓과 달리 65세 이전에 발병하는 初老期 癱瘓(presenile dementia, early-onset)라고 하였다. 이러한 AD는 CT나 MRI 검사상 전반적인 뇌위축과 대뇌피질 및 피질하 백질에 산재하는 老人斑(senile plaque), 그리고 신경섬유다발의 구조가 침착되며 老人斑 주변에 활성화된 교세포들이 발견되는 병리학적 변화가 특징으로¹⁶⁻¹⁸⁾, 생화학적으로는 아세틸콜린 합성 효소의 활성이 저하되어 있고, 老人斑과 뇌혈관에서 아포리포단백질 또는 베타 아밀로이드 단백질이 분리되어 있으며, 21번 염색체에 그 유전자가 위치하고 있는 것도 확인되었다¹⁹⁾. 특히 老人斑은 이형성 neurite로서 세포밖에 베타 아밀로이드 펩티드가 핵을 이루면서 쌓인 것으로, 펩티드 병변은 비례적으로 신경원의 진행적인 소실을 동반하여 해마, 신피질(neocortex), 편도(amygdala), 뇌간핵 및 전뇌 뇌저부의 콜린성 신경계에서 신경회로의 선택적인 손상을 일으켜 癱瘓을 일으키는 가장 중요한 원인 중의 하나이다. 알츠하이머병의 원인은 아직 밝혀져 있지 않으나 5~10%는 유전자 변이에 의한 가족형이고 나머지 대부분은 후천성인 산발형으로 추정되고 있다. 현재까지 알츠하이머병의 病因論은 크게 두 개의 화설로 대별할 수 있

는데, 첫 번째 학설은 베타 아밀로이드 전구단백(amyloid precursor protein, APP)이 정상 세포 내에서 합성되어 성숙된 후 세포막 표면에 이르면 α -secretase에 의하여 세포막 표면에서 떨어져 후 수용성 APP가 되지만 만일 이 APP가 β -secretase나 γ -secretase에 의하여 분해되면 베타 아밀로이드가 되어 아밀로이드원섬유로 구성된 불용성의 아밀로이드가 축적이 되어 뇌신경 세포의 손상 및 세포사멸을 초래한다는 것으로 현재 가장 지지를 받고 있는 病因論이다. 두 번째 학설은 APP 대사 과정에서 베타 아밀로이드 축적이 특히 후기 발현형의 산발성 알츠하이머병의 경우 alpha-1 antichymotrypsin(ACT) 또는 alpha-2 macroglobulin(A2M)과 같은 natural scavenger 기능의 단백질을 생산하는 유전자의 다형성 및 변이로 인하여 축적된 베타 아밀로이드의 제거 기능이 저하 내지는 상실되어 신경조직의 사멸을 초래한다는 주장이 최근에 대두되었다. 이상의 학설에서와 같이 대뇌의 아밀로이드 침착은 알츠하이머병의 확진 기준에 포함될 정도로 AD의 病態生理에 핵심적인 역할을 하고 있다.

본 연구에서는 알츠하이머병에서 뇌 실질세포의 직접적인 손상기전을 밝히면서 정상적으로 신경세포의 노화 과정에서 형성된 베타 아밀로이드가 세포내에 축적되어 일어나는 세포사멸 현상을 조사하기 위해, 신경아종 SH-SY5Y 세포에 베타 아밀로이드 펩타이드를 처리하여 세포사멸 기전과 세포독성을 예방할 수 있는 단천환의 가능성을 조사하고, 그 작용 기전을 조사하고자 하였다. 먼저 베타 아밀로이드는 SH-SY5Y 세포에 농도 의존적인 세포독성을 보였으며, 이때 베타 아밀로이드에 의한 세포독성은 세포내 H_2O_2 생성에 의한 것임을 확인하였다. 이렇게 유발된 SH-SY5Y 세포사멸은 단천환 처리 농도에 의존적으로 억제하였다. 또한 H_2O_2 의 직접적인 손상에 의한 세포사멸도 억제하였으며, 이는 핵의 분절을 보이는 전형적인 세포고사 현상으로부터 단천환의 보호효과를 의미하였다.

신체의 각 臟器는 환경에서 오는 다양한 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위하여 즉각적으로 반응한다. 카드뮴, 납, 수은과 같은 중금속이나 endotoxin이 체내에 들어오거나, heat shock, 자외선, 활성산소, 저산소 상태에 노출되면, 臟器에서는 스트레스에 대한 반응으로 다양한 단백질과 효소가 유도되면서 생체 방어작용이 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 있다. Heme Oxygenase는 최소 두 가지의 isozyme(HO-1과 HO-2)이 보고되고 있는데, HO-2는 구성형 효소이고, HO-1은 각종 스트레스원에 반응하여 세포내에서 유도 발현되는 효소로 이 효소의 반응을 조사하여 스트레스 검출에 이용할 수 있다³¹⁾. 본 연구에서 단천환은 SH-SY5Y 세포 HO-1 단백질 발현을 증가시켰는데, 이러한 결과는 베타 아밀로이드에 의한 세포내 H_2O_2 생성에 따른 산화적 손상으로부터 세포를 보호하기 위한 방어기작으로 사료되어진다. 특히 HO-1의 발현은 Nrf2라는 전사활성인자에 의해 조절되는 것을 확인 할 수 있었으며 이에 대한 정확한 조절 기전연구가 요구되어진다.

세포고사를 조절하는 Bcl-2는 사람의 림프종(human

follicular lymphoma)과 관련된 유전자로서 크게 세포사멸 촉진 단백질과 세포사멸 억제 단백질의 두 부류가 존재한다³²⁾. 이중 Bcl-1 및 Bcl-XL 단백질은 다른 암 유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸만을 억제한다. 한편, Bak이나 Bax 단백질은 Bcl-2 및 Bcl-XL과는 달리 오히려 세포사멸을 촉진시키는 기능을 수행한다³³⁾. 특히 Bcl-2 family 단백질은 c-terminal이 소수성 막으로 구성되어 미토콘드리아의 막에 결합할 수 있다³⁴⁾. 다양한 자극시 Bcl-2나 Bcl-XL을 과발현 시켰을 경우 미토콘드리아 막전위(MPT, $\Delta\Psi_m$)의 상실이나 cytochrome c의 방출이 방지됨이 보고 되었다³⁵⁾. 반대로 Bax나 Bcl-XS 단백질을 과발현시켰을 경우에는 cytochrome c의 방출을 촉진하였고, 미토콘드리아 막의 탈전극을 유도한다³⁶⁾. H_2O_2 는 SH-SY5Y 세포사멸에서는 Bak 및 Bax 발현의 증가 그리고 Bcl-2 및 Bcl-XL의 발현 감소를 초래하였다. 또한 이러한 apoptogenic Bak 및 Bax의 발현 증가와 비교된 antiapoptotic Bcl-2 및 Bcl-XL 발현 감소에 따른 비율의 감소가 초래되어 H_2O_2 에 의한 SH-SY5Y 세포사멸을 촉진하였을 것으로 판단된다. 단천환은 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-2와 Bcl-XL의 발현 증가와 세포사멸 촉진 단백질인 Bak와 Bax의 발현 감소를 유도하여 H_2O_2 세포독성을 방어하였다. 이는 Bcl-2 단백질군의 발현 변화에 따른 미토콘드리아 기능장애와 그에 따른 caspase가 활성화가 예상되어지며, 이러한 결과는 1960년대부터 보고되었던 알츠하이머형 癡呆에서 미토콘드리아의 구조 혹은 기능의 이상과 일치하는 것으로, 단천환의 SH-SY5Y 세포사멸 방어 효과는 미토콘드리아 막전위차 감소를 억제하는 현상과 연관함을 유추할수 있으며, 이에 대한 정확한 기전 연구가 요구되어진다.

이상의 연구 결과를 종합하면 베타 아밀로이드에 의해 유도된 SH-SY5Y 신경아종 세포의 사멸은 세포내에서 생성된 H_2O_2 에 의한 세포의 형태적 변화를 동반한 세포핵의 분절, Bak 및 Bax의 발현증가, Bcl-2 및 Bcl-XL의 발현 감소를 보이는 전형적인 세포고사 현상이었다. 그러나 단천환은 이러한 산화적 손상으로부터 세포막 수포화 및 세포고사성 단백질의 발현 조절을 통해 SH-SY5Y 세포를 보호하였으며, 특히 단천환은 Nrf2의 활성 조절을 통한 HO-1 단백질의 발현을 유도하였다. 따라서, 이에 대한 정확한 분석 및 기능 연구 등을 통하여 베타 아밀로이드 및 산화적 손상에 의한 퇴행성 신경질환에서의 역할에 대해 연구되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

베타 아밀로이드에 의한 SH-SY5Y 신경아종 세포의 산화적 손상에 대한 단천환의 보호 효과를 확인하기 위하여 세포생존율 변화, 세포의 형태적 변화, HO-1, Bak, Bax, Bcl-2 및 Bcl-XL 단백질의 발현 변화를 분석하였다. 단천환은 베타 아밀로이드에 의해 생성된 H_2O_2 에 의한 산화적 손상으로부터 신경아종 세포를 보호하는 효과를 나타냈으며, 이는 알츠하이머병 등의 퇴행성 신경질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료되며, 베타 아밀로이드에 의한 알츠하이머병의 병인과 단천환과 같은 산화적 손상 예방 물질을 개발하는데 응용될 수 있으리라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 2004년 교내연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. 吳普. 神農本草經. 서울, 醫聖堂 p 24, 25, 29, 30, 1994.
2. 辛民教. 臨床本草學. 서울, 永林社, pp 519-521, 530-532, 1997.
3. 鄭普燮, 辛民教. 鄉藥(生藥)大辭典. 서울, 永林社, pp 418-419, 860-862, 1990.
4. 申佶求. 申氏本草學. 서울, 壽文社, pp 519-521, 600-602, 1988.
5. 李尙仁. 本草學. 서울, 醫藥社, pp 398-400, 419-420, 1975.
6. 楊東喜. 本草備要解析. 서울, 醫聖堂, pp 29-30, 125-127, 1993.
7. 李時珍. 本草綱目. 北京, 人民衛生出版社, pp 758-760, 837-841, 1982.
8. 金殿壽. 標準本草學. 서울, 進明出版社, pp 107-108, 367-370, 1975.
9. 中華人民共和國衛生部藥典委員會. 中華人民共和國藥典. 北京, 人民衛生出版社, p 26, 58, 59, 1985.
10. 李尙仁 外. 漢藥臨床應用. 서울, 醫聖堂, pp 299-303, 1982.
11. 陳嘉謨. 本草蒙筌. 北京, 人民衛生出版社, pp 77-78, 119-120, 1988. / 金昌謙. 本草從新, 서울, 행림출판, pp19-20, 31, 1989.
12. 과학백과사전출판사. 실용동의약학. 서울, 일월서각, pp 161-163, 177-179, 1990. / 上海中醫學院. 中草藥學, 香港, 商務印書館香港分館, pp 119-127, 223-236. 1983.
13. 김창민, 辛民教, 이경순, 안덕균 역. 中藥大辭典. 서울, 도서출판 정답, pp 1117-1126, 5258-5265, 1998.
14. 서순규. 成人病·老人醫學. 서울, 高麗醫學, pp 225-228, 230-232, 1992.
15. 大韓神經精神醫學會. 神經精神科學. 서울, 하나의학사, pp 211-220, 1997.
16. 黃義完 外. 東醫精神醫學. 서울, 現代醫學書籍社, pp 256-271, 327-330, 1992.
17. Reznik-Wolf, H., Machado, J., Haroutuian, V., DeMacro, L., Walter, G.F., Goldman, B., Davidson, M., Johnston, J.A., Lannfelt, L., Dani, S.U., Friedman, E. Somatic mutation analysis of the APP and Presenilin 1 and 2 genes in Alzheimer's disease brain. J Neurogenet. 12(1):55-65, 1998.
18. Alzheimer's disease collaborative group. The structure of the presenilin 1(SI82) gene and identification of six novel mutation in early onset AD families. Nat Genet. 11(2):219-222, 1995.
19. Tabaton, M., Cammarata, S., Mandybur, T., Richy, P., Kawai, M., Perry, G., Gambetti, P. Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities. Brain Res. 593(2):299-303, 1992.
20. 柳泳秀 外. 記憶障礙에 관한 東西醫學의 比較 研究. 東醫神經精神科學會誌 7(1):155-166, 1996.
21. 崔龍俊. 健忘의 辨證分型에 대한 研究. 大韓韓醫學會誌 17(1):374-406, 1996.
22. 金利和 外. 痴呆治療의 最近 研究動向에 관한 考察. 大韓針灸學會誌 14(2):115-126, 1997.
23. 우주영. 調胃升清湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 영향. 東醫神經精神科學會誌, 8(1):69-79, 1997.
24. 金聖賢. 洗心湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 東醫神經精神科學會誌, 8(2): 39-50, 1997.
25. 黃始榮. 遠志에 의한 腦 星狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制 效果에 관한 研究. 東醫神經精神科學會誌 10(1):95-108, 1999.
26. 王浴生 : 中藥藥理與應用, 北京, 人民衛生出版社, pp119-127, 223-236, 1983.
27. 新文豐出版公司 編 : 新編中藥大辭典, 臺北, 新文豐出版公司, pp261-264, 302-306, 1982.
28. 한상혁. 단천환이 사람신경세포의 산화적 손상에 미치는 영향. 익산, 원광대학교 한의학전문대학원, 1999.
29. 나영훈. 단천환이 Hydrogen Peroxide에 의한 심근세포 독성에 미치는 영향. 익산, 원광대학교 한의학전문대학원, 2001.
30. 이근후. 최신임상정신의학. 서울, 하나의학사, pp 138, 216-228, 1988.
31. 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..
32. Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev. 13:1899-1911, 1999. Vander Heiden, M.G., and Thompson, C.B. Bcl-2 proteins: inhibitors of apoptosis or regulators of mitochondrial homeostasis? Nat Cell Biol. 1:E209-E216, 1999.
33. Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-rigon, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. Nature Med. 6: 614-620, 1998.
34. Reed, J.C. Bcl2 and the regulation of programmed cell death. J. Cell. Biol. 124: 1-6, 1994.
35. Herr, I., Wilhelm, D., Bohler, T., Angel, P., and Debatin, K. M. Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. EMBO. 16: 6200-6208, 1997. LiPF, Dietz, R., Von Harsdorf, R. P53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. EMBO. 18: 6027-6036, 1999.

36. Heibein, J.A., Barry, M., Motyka, B., Bleackley, R.C. Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential

(Delta Psi m) and cytochrome c release are caspase independent. J Immunology. 163(9):4683-4693, 1999.