

허혈 상태의 PC12 세포에 대한 大補元煎의 신경보호효과

김봉상¹ · 이선우^{1,2} · 문병순^{1,2*}

1:원광대학교 한의과대학 내과학교실, 2:원광대학교 한의학전문대학원

Neuroprotective Effects of *Daebowonjeon* on PC12 Cells Exposed to Ischemia

Bong Sang Kim¹, Sun Woo Lee^{1,2}, Byung Soon Moon^{1,2*}

1:Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,

2:Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

Neuronal ischemia is a pathological process caused by a lack of oxygen (anoxia) and glucose (hypoglycemia), resulting in neuronal death. It is believed that apoptosis is one of the mechanisms involved in ischemic cell death. Neuronal apoptosis is a process characterized by nuclear DNA fragmentation, changes of plasma membrane organization. To elucidate the mechanism of neuronal death following ischemic insult and to develop neuroprotective effects of *Daebowonjeon*(DBWJ) against ischemic damage, *in vitro* models are used. *In vitro* models of cell death have been developed with pheochromocytoma (PC12) cell, which have become widely used as neuronal models of oxidative stress, trophic factor, serum deprivation and chemical hypoxia. Using a special ischemic device and PC12 cultures, we investigated an *in vitro* model of ischemia based on combined Oxygen and Glucose Deprivation (OGD) insult, followed by reoxygenation, mimicking the pathological conditions of ischemia. In this study, *Daebowonjeon* rescued PC12 cells from Oxygen-Glucose Deprivation (OGD)-induced cell death in a dose-dependent manner. The nuclear staining of PC12 cells clearly showed that DBWJ attenuated nuclear condensation and fragmentation which represent typical neuronal apoptotic characteristics. DBWJ also prevents the LDH release and induction of Hypoxia Inducing Factor (HIF)-1 by OGD-exposed PC12 cells. Furthermore, DBWJ reduced the activation of polyADP-ribose polymerase (PARP) by OGD-exposed PC12 cells. These results suggest that apoptosis is an important characteristic of OGD-induced neuronal death and that oriental medicine, such as DBWJ, may prevent PC12 cell from OGD-induced neuronal death by inhibiting the apoptotic process.

Key words : PC12 cells, Neuronal apoptosis, *Daebowonjeon*(DBWJ)

서 론

大補元煎은 明代 張⁸⁾의 《景岳全書》에 “治男婦氣血大壞 精神失守危劇等證 此回天贊化 救本培元 第一要方”⁹⁾이라고 처음 수록되었으며, 益氣養血, 滋補肝腎하는 효능으로 氣血虧損, 肝腎不足의 病症에 활용되고 있다¹⁰⁾.

뇌 조직으로의 산소 공급이나 혈액 공급이 차단되었을 때, 해당 조직은 저산소증과 허혈로 인한 손상을 입게 되며, 급속도로 신경세포 사멸에 이르게 된다. 또한 산소나 혈액의 재관류는

활성 산소종 (ROS) 생성을 증가시켜 뇌손상을 더욱 가중시킨다. 이러한 허혈성 뇌 손상에 대한 생화학적 기전은 완전히 밝혀지지 않았으나, 현재까지는 글루타메이트의 과다한 방출, 글루타메이트 수용체의 과다한 흥분에 의한 흥분성 독성 또는 이온통로를 통한 칼슘의 세포내 유입 등의 세 가지 주요한 원인이 알려져 있다^{11,12)}. 최근에는 활성산소에 의한 산화적 손상도 이에 관여하는 것으로 보고되었으며, 이러한 기전 외에 세포고사가 허혈성 뇌질환, 간질, 알츠하이머병 등 신경계 질환의 신경세포사에 관여되어 있다는 보고가 증가하고 있다^{5,13-15)}.

최근 Tabakman¹⁾ 등은 Oxygen-Glucose Deprivation(OGD)에 의한 노출 시간과 정도에 따라 신경세포 사멸의 기전을 연구하였으며, OGD에 의한 세포의 사멸은 LDH 방출의 증가,

* 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-3 원광대학교 익산한방병원

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

· 접수 : 2006/11/27 · 수정 : 2007/01/12 · 채택 : 2007/01/26

polyADP-ribose polymerase (PARP)의 절단 등 여러 가지 세포 사멸과 관련된 신호를 갖는다고 보고하였다.

大補元煎에 대한 실험적 연구로는 趙¹⁶⁾의 “大補元煎이 卵巢摘出로 骨多孔症이 유발된 白鼠에 미치는 영향”이 보고되었다. 또한 뇌신경세포 고사에 대한 한방약재의 방어효과에 대한 연구는 다양하게 진행되고 있으며^{3,15,17-19)}, 특히 영양혈청결핍에 의한 신경세포 고사에 대한 연구는 金²⁰⁾의 “補陽還五湯이 營養血淸缺乏에 의한 PC12 細胞의 枯死에 미치는 영향”과 林²¹⁾의 “還少丹이 營養血淸缺乏性 PC12細胞의 Apoptosis에 미치는 影響” 등이 보고되었다. 그러나 大補元煎이 산소와 포도당의 결핍으로 야기된 뇌신경세포 고사에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 PC12 세포를 이용하여 OGD에 의한 일시적 허혈로 손상된 뇌세포에 大補元煎의 방어효과를 究明하기 위하여 PC12 세포를 OGD 상태에 노출시킨 후 처리 시간에 따른 세포 생존율, 형태적 변화, 핵 염색 변화, DNA ladder 변화, LDH 방출 양의 변화, 미토콘드리아 막전위 변화 그리고 Hypoxia Inducing Factor (HIF)-1 발현 양상, PARP의 절단 양상 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

大補元煎의 처방내용은 張⁸⁾의 《景岳全書》에 의거하였으며, 본 실험에 사용한 약재는 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 精選하여 사용하고, 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Daebowonjeon (DBWJ)

herbal name	scientific name	amount (g)
Radix Ginseng (人蔘)	Panax Ginseng	7.5
Rhizoma Dioscoreae (山藥)	Dioscorea Batatas	7.5
Rehmanniae Radix Et Rhizoma Preparata (熟地黃)	Rehmannia Glutino Var. Purpurea Makino	11.25
Cortex Eucommiae (杜仲)	Eucommia Ulmoides	7.5
Radix Angelicae Sinens (當歸)	Angelica Sinensis	11.25
Fructus Corni (山茱萸)	Cornus Officinalis	3.75
Lycii Fructus (枸杞子)	Lycium Barbarum L.	3.75
Radix Glycyrrhizae (炙甘草)	Glycyrrhizae Uralensis	7.5
Total amount	56.25	

2) 세포주

본 실험에 사용한 백서의 부신수질로부터 유래한 PC12 세포주는 한국 세포주 은행 (KNCC, 서울대학교)에서 분양 받았으며, 세포 배양기에서 계대배양 하면서 실험을 실시하였다.

3) 시약 및 기기

본 실험의 세포배양에 필요한 Dubellco's minimum essential medium (DMEM), 항생제, Glucose free DMEM, trypsin 및 우태아 혈청 (fetal bovine serum: FBS)은 GIBCO BRL사 (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입 하였다. 세포 배양 배양용기 (48-well plate, 6cm dish, 10cm dish)는 Falcon사 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)의 coating dish를 사용하였다.

MTT (methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide),

JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide), NAC (N-acetyl-L-cysteine), SDS(Sodium dodecyl sulfate)는 Sigma사 (St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하였다. Lactate dehydrogenase(LDH) 측정은 Roch (R&D, Germany)로부터 구입한 kit을 사용하였다. Western blotting에 사용된 각각의 항체들은 Santa Cruz사 (San Diego, CA, USA)제품, Enhanced chemiluminescence kit(ECL kit, Amersham, England)을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액 조제

실험에 사용된 약재는 물 용매를 사용한 추출방법을 이용하여 본 실험에 사용하였다. 물 추출물 (H₂O extract)은 陰乾된 大補元煎 100 g을 물 1 ℓ와 함께 냉각기를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하고 3,200 rpm으로 20분간 원심분리 후 감압 농축기 (Rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃ (Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고, Freeze Dryer로 동결건조 시킨 것을 시료로 사용하였다. 시료는 eppendort tube에 100 mg/ml이 되도록 Dimethyl sulfoxide(DMSO)로 녹여 -20℃에 보관하고 실험 시에는 세포 배양액인 DMEM에 희석하여 사용하였다.

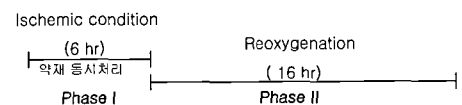
2) 세포주 배양

PC12 세포주는 세포배양기(37℃, 5% CO₂)에서 10% FBS가 포함된 DMEM (Gibco BRL, England) 배양액으로 배양하였으며, 3-4일 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포를 이용하였다. 혐기성 배양시에는 각 실험 조건에 따라 포도당이나 한약재 등을 처리한 후 일시적 허혈상태로 인한 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학 및 분자생물학적 실험을 수행하였다

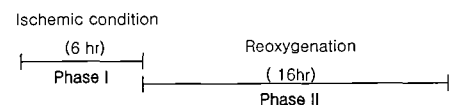
3) Oxygen-Glucose Deprivation (OGD)

일시적 허혈상태를 만들기 위해서 PC12 세포를 hypoxia chamber에서 일정 시간동안 배양하였다. 허혈상태 유도 시 한약재를 동시 처리 하였으며, glucose-free DMEM을 이용하여 다양한 배양액의 조건을 조성하여 세포에 처리하였다. 일시적 허혈상태에 대한 실험은 2단계로 구성되어 있다 (Phase I : 허혈상태 유도, Phase II : Reoxygenation 단계). 허혈성 손상을 주기위한 실험 방법은 아래도표로 구성하여 실시하였다.

실험군 1. 약재처리군



실험군 2. 대조군



4) 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정에는 MTT (Sigma Co, St. Louis, MO, USA) assay 방법을 이용하였다. 세포 배양판 (48-well plate)에 세포

(1×10^6 세포 수/ml)를 분주하여 16시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정화시켰으며, glucose-free DMEM으로 배양액을 교환한 후 혐기성 배양기 안에서 일정시간 배양하였다. 배양 완료 4시간 전에 MTT 용액 (5 mg/ml in PBS)을 배양액 부피에 최종적으로 100 μ l씩 첨가한 다음, 4시간 후 상층액을 제거하여 바닥에 부착된 불용성의 보라색 formazan을 완전히 건조시켰다. 불용성 formazan을 용해시키기 위해 1 ml의 DMSO 용액으로 충분히 용해시킨 다음 분광광도계 (ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 545 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정상 대조군의 값과 비교하여 백분율 (%)로 표시 하였다.

5) DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit (Promega사)을 이용하여 추출하였다. 먼저 약제가 처리된 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase 를 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 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH8.0)을 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 Spectrophotometer (Beckman 사)하에서 optical density (OD)값을 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5 μ g을 2.0% agarose gel에서 전기영동 (50V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

6) 핵 염색 (Hoechst staining)

세포핵의 형태적 변화를 조사하기 위하여 정상 대조군 혹은 OGD에 의해 유도된 허혈상태의 실험군의 세포들을 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 2회 세척하였다. 세포는 4% formaldehyde 용액으로 실온에서 10분 동안 고정한 후 Hoechst 33342 (Sigma사) 염색약을 PBS에 10 μ M/ml이 되도록 희석하여 실온에서 10분간 염색한 다음 다시 PBS로 세척하였으며, 염색된 세포는 형광 현미경 (Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

7) Lactate dehydrogenase (LDH) 활성도 측정

혐기성 배양기에 의해 허혈성 손상을 받은 대조군과 실험군으로부터 각기 well의 상층액을 모아 1,000 rpm으로 7분간 원심 분리 한 tube의 부유액을 LDH 분석에 이용하였다. LDH 측정은 Roch (R&D., Germany)로부터 구입한 kit을 이용 하였다. 각 실험군으로부터 포획한 상층액 100 μ l에 LDH 측정을 위한 반응 혼합액 100 μ l을 혼합하여, 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응은 빛을 차단한 상태로 진행하였으며, 반응 후 분광광도계 (ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 490nm 파장에서 흡광도를 측정하여 아래와 같은 식에 의하여 활성도를 산출하였다. LDH 양은 전체 LDH 활성도에 대한 실험군에서의 LDH 활성도를 백분율 (%) 로 표시하였다.

세포독성(%)

$$\frac{\text{실험군의 방출 LDH 흡광도} - \text{대조군의 방출 LDH 흡광도}}{\text{대조군의 총 LDH 흡광도}} \times 100$$

8) 미토콘드리아 막전위 변화 측정

세포내 소기관 중 하나인 미토콘드리아의 막전위 (membrane potential)의 변화를 조사하기 위하여 JC-1염색을 시행하였다. OGD 상태에서 大補元煎을 함께 처리한 세포 및 실험군 세포들을 PBS로 2회 세척하였다. JC-1 (10 μ g/ml)은 각각 DMEM 배지에 희석하여 20분간 37°C, CO₂ 배양기에서 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경 (Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

9) Western blotting

배양된 PC12세포에 혐기성 배양기에 의한 허혈성 손상을 유도한 후 일정 시간 후에 세포를 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution (HBSS)로 2회 세척하였다. 얻은 세포는 total cell lysate를 얻기 위하여 RIPA 용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSH, 1 μ g/ml aprotinin)으로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포 부유액에 2 X sample buffer와 섞어 98°C에서 5분간 끓인 후 12.5% sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel 의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4°C, 30 V에서 16시간 동안 transfer한 후 blocking (5% skim milk)하여 상온에서 1시간 동안 반응하여 비특이적 항체결합을 예방하였다. HIF-1, PARP 및 β -actin 등에 대한 항체를 tris-buffered saline에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 이어서 2차 항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase (TBS로 1:1,000으로 희석, Amersham사)와 상온에서 1시간 반응하였다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3회 세척 후 enhanced chemiluminescence kit (ECL kit)을 사용하여 필름에 노출시켰다.

10) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 실험결과 의 통계처리는 Student's t-test에 준하여 처리하였으며, p-value가 최대치 0.05 (p<0.05)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

실험성적

1. 大補元煎이 OGD에 의한 세포 생존율에 미치는 영향

허혈상태를 유도하기 위하여 산소와 포도당 공급을 동시에 차단한 OGD에 의한 PC12 세포를 배양하여 허혈상태 시간에 따른 세포의 형태적 변화와 세포생존율을 MTT assay 방법으로 측정하였다. OGD 시간에 따른 세포 생존율은 3시간까지는 OGD 이후 산소와 포도당의 재공급으로 인한 세포 생존율이 비교적 높게 나타났으나, 6시간의 경우는 산소와 포도당 재공급에 의한 16시간 정도의 배양 결과 60% 정도의 세포생존율을 나타내었다. 그러나 OGD 기간이 8시간 정도일 경우는 산소와 포도당 재공급으로도 세포생존율이 30% 정도로 미약하게 나타났다(Fig. 1).

大補元煎이 일시적 허혈 상태에서 PC12 세포에 대한 보호효과를 알아보기 위하여 다양한 농도의 大補元煎을 처리한 후 OGD 상태에서 배양하였다. 산소와 포도당 재공급으로 16시간 배양 후 세포생존율을 측정하였다. 大補元煎 125 μ g/ml 의 경우

는 대조군 수준에 미치지 못하는 세포생존율 (90%)을 보였으나, 250, 500 ug/ml 의 경우는 대조군 수준 이상의 세포생존율이 105%를 나타내었다(Fig. 2).

또한 항산화제와 大補元煎의 효과를 비교하기 위하여 항산화제인 NAC을 전처리한 다음 OGD 상태를 유도한 후 16시간의 산소와 포도당 재공급에 의한 세포 생존율을 측정하였다. 항산화제인 NAC 10 mM을 처리한 경우 98%정도의 세포생존율을 나타내어 OGD 상태에서의 세포 손상을 방어하였다(Fig. 3).

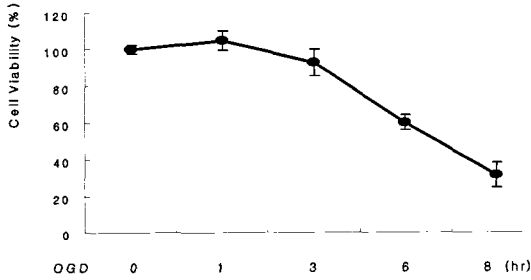


Fig. 1. Oxygen-Glucose Deprivation (OGD) decreased the viability of PC12 cells in a time-dependent manner. Cells were with glucose-free DMEM and exposed to Oxygen-Glucose Deprivation (OGD) for 6 hrs, followed by reoxygenation for 16 hrs. The viability of cells was measured by MTT assay. Results were represented as the means \pm S.D. of three experiments.

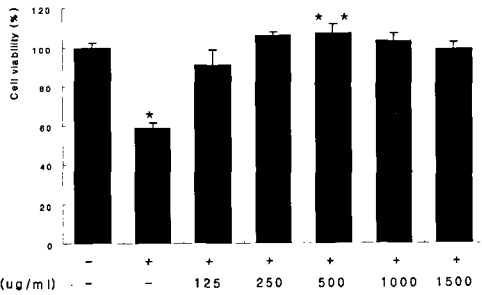


Fig. 2. *Daebowonjeon* (DBWJ) inhibited the ischemia-induced cell death in PC12 cells. Cells were treated with the various concentrations of DBWJ and PC12 cells were exposed to OGD for 6 hrs, followed by reoxygenation for 16 hrs. The viability of cells was measured by MTT assay. Results were represented as the means \pm S.D. of three experiments. *, $p < 0.05$ compared to control cells. **, $p < 0.01$ compared to only OGD group.

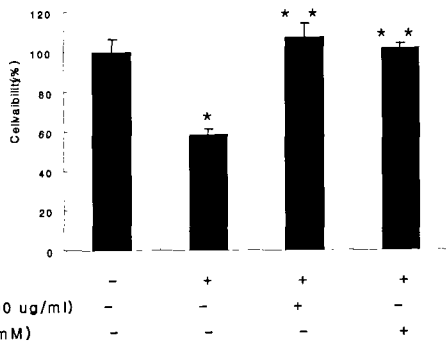


Fig. 3. Antioxidants inhibited the ischemia-induced cell death in the PC12 cells. Cells were exposed to OGD condition in the presence of NAC (10 mM) and DBWJ (500 ug/ml). The viability of cells was measured by MTT assay. Results were represented as the means \pm S.D. of three experiments. *, $p < 0.05$ compared to control cells. **, $p < 0.01$ compared to only OGD group.

2. 大補元煎이 OGD에 의한 세포의 형태적 변화에 미치는 영향

大補元煎이 OGD에 의한 PC12 세포의 형태적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 OGD 시간에 따른 형태적 변화를 관찰하였다. 이때 glucose 뿐만 아니라 다른 영양 공급원인 serum을 제거한 상태에서의 형태적 변화 양상도 살펴보았다. OGD 시간에 따른 PC12 세포의 형태적 변화는 OGD 처리 6시간에서 형태적 변화가 뚜렷하게 나타났다(Fig. 4). 각 처리군의 PC12 세포는 특징적인 세포의 형태적 특징을 잃어버린 상태를 나타내었다. 그러나 大補元煎 500 ug/ml을 전처리한 실험군에서는 대조군의 세포 형태인 neurite가 유지되고 있었다(Fig. 4).

또한 형태적 변화에 대한 세포 내의 핵 변화 양상을 알아보기 위하여 Hoechst 염색을 시행한 결과 OGD 처리로에서 세포고사의 형태적 특징 중 하나인 염색사의 응축이나 핵 분절 현상이 관찰되었다(Fig 5B). 그러나 大補元煎 500 ug/ml을 동시 처리한 실험군에서는 DNA분절 현상이 거의 나타나지 않았다(Fig. 5C & 5A, respectively).

더불어 DNA 분절 현상을 agarose gel을 이용한 전기영동 방법으로 확인하기 위하여 genomic DNA를 분리하고 전기영동을 시행한 결과, OGD 처리로에서 DNA 분절 현상을 뚜렷하지는 않으나 관찰할 수 있었다. 그러나 大補元煎 500 ug/ml을 동시 처리한 실험군에서는 DNA분절 현상이 감소되어 대조군 수준으로 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

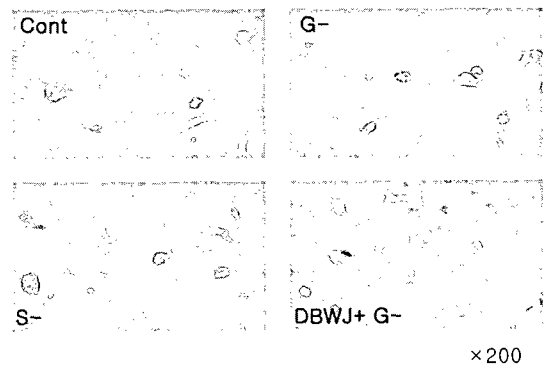


Fig. 4. Light micrographs of PC12 cells exposed to OGD. PC12 cells were maintained at normal condition (Cont, x 200), or exposed to OGD for 6 hrs in the absence glucose (G-, x200) or serum (S-, x200), or presence of 500 ug/ml *Daebowonjeon*(DBWJ) (DBWJ+, G-), followed by reoxygenation for 16 hrs.

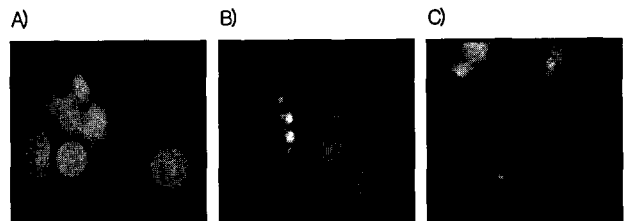


Fig. 5. *Daebowonjeon* (DBWJ) attenuated the nuclear fragmentation the PC12 cells OGD (Oxygen-Glucose Deprivation) model. Cells were exposed to OGD in the presence or absence of DBWJ (500 ug/ml) for 6 hrs. After washing the cells with PBS, cells were fixed with 4% formaldehyde and stained with Hoechst 33258. Morphology of nuclei from the cells was under fluorescent microscope. A: Control cells, B: OGD-exposed cells, C: OGD-exposed cells in the presence of DBWJ (500 ug/ml)

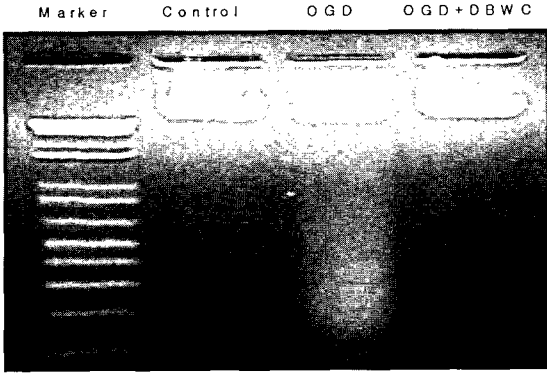


Fig. 6. Daebowonjeon (DBWJ) inhibited DNA fragmentation in the PC12 OGD (Oxygen-Glucose Deprivation) model. Cells were exposed to OGD for 6 hrs in the absence or presence of DBWJ (500 ug/ml). The cells were harvested, DNA was extracted and separated on 2% agarose gels. DNA was stained with ethidium bromide and visualized under U.V. light.

3. OGD에 의한 LDH 활성도의 변화

OGD에 의한 세포독성은 세포의 형태적 변화 뿐만 아니라 lactate dehydrogenase (LDH)의 방출을 야기 시키며, 이는 세포의 사멸을 매개로 한다고 알려져 있다. 따라서 OGD 처리 시간에 따른 LDH 방출량을 측정하고, 大補元煎의 처리가 OGD 시 방출되는 LDH 양에 미치는 영향을 관찰하였다. PC12 세포에서 OGD시간에 따른 LDH 방출량을 측정된 결과, OGD 처리 1시간 후에는 대조군에 비해 약간 높은 16% 정도이나 OGD처리 3시간 후에는 뚜렷하게 증가하기 시작하여 OGD처리 6시간 후에는 57%정도로 높은 LDH 방출을 나타내었다 (Fig. 7).

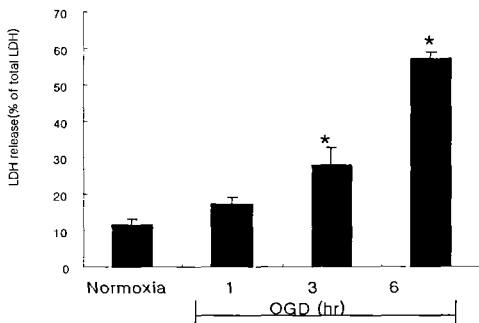


Fig. 7. Oxygen-Glucose Deprivation (OGD)-induced cell death in the PC12 cells, evaluated by LDH release. Cells were exposed to OGD for different periods, followed by reoxygenation for 16 hrs, or left untreated (normoxia). Culture medium samples were then collected and assayed for LDH. Results were represented as the means \pm S.D. of three experiments. *, $p < 0.05$ compared to normoxia cells.

4. 大補元煎이 OGD에 의한 LDH 활성도에 미치는 영향

OGD에 의한 일시적 허혈 상태로 인한 PC12 세포의 세포독성은 OGD 시간에 따른 LDH 방출의 증가로 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 따라서 大補元煎이 OGD에 의한 LDH 방출 증가에 미치는 영향을 알아보려, LDH 방출이 증가되었던 OGD 처리 6시간 상태에서 大補元煎 500 ug/ml를 동시에 처리하여 LDH 방출의 양을 측정하였다. 大補元煎 동시 처리 상태에서의 OGD 유도도는 대조군에 비하여 LDH 방출을 약 30%정도 감소시켰으며,

약 25% 정도의 LDH 방출을 나타내었다 (Fig. 8).

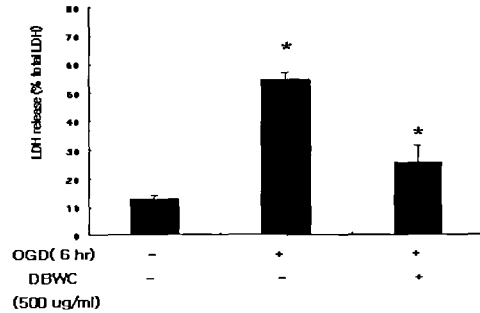


Fig. 8. Daebowonjeon (DBWJ) decreased the LDH release by the OGD in PC12 cells. Cells were exposed to OGD for 6 hrs in the absence or presence of DBWJ (500 ug/ml), followed by reoxygenation for 16 hrs, or left untreated (normoxia). Culture medium samples were then collected and assayed for LDH. Results were represented as the means \pm S.D. of three experiments.

5. 大補元煎이 PC12 세포의 미토콘드리아 막전위에 미치는 영향

大補元煎이 OGD 상태의 PC12 세포에서 미토콘드리아 막전위 변화에 미치는 효과를 알아보려 JC-1을 이용하여 형광현미경 하에서 관찰하였다. OGD 처리와 大補元煎을 동시에 처리한 실험군의 미토콘드리아 막전위는 정상 대조군과 비슷하게 오렌지색 형광을 내었으며, OGD 처리로에서의 미토콘드리아 막전위는 초록색 형광을 나타내었다 (Fig. 9). 이와 같은 결과로 OGD에 의해 유도된 세포독성은 산화적 손상으로 인한 세포고사의 유도과 관련되어짐을 추측할 수 있었다.



Fig. 9. Daebowonjeon (DBWJ) inhibited the changes of the mitochondria membrane potential transition (MMPT). Cells were exposed to OGD for 6 hrs in the absence or presence of DBWJ (500 ug/ml), followed by reoxygenation for 16 hrs(B & C, respectively), or left untreated (normoxia)(A). Then, cells were stained with JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) for 30 mins and visualised under fluorescent microscope. The data was one of three independent experiments.

6. 大補元煎이 OGD에 의한 Hypoxia Inducing Factor (HIF)-1 발현 변화에 미치는 영향

일반적으로 세포가 hypoxia에 의한 자극을 받을 때 세포 내에서 HIF-1이 발현된다. 본 연구에서도 OGD에 의한 일시적 허혈상태 시 PC12 세포에서의 HIF-1의 발현을 관찰하였다. OGD에 처리 시 PC12 세포에서 HIF-1의 발현이 대조군에 비하여 증가되었으며, 大補元煎을 동시 처리한 실험군은 대조군에서와 유사한 HIF-1의 발현을 나타내었다. 이러한 결과로 OGD에 의한 PC12 세포에서는 HIF-1의 발현을 증가시켰으며, 大補元煎의 동

시 처리는 OGD에 의한 HIF-1의 발현 유도를 억제시킴을 알 수 있었다(Fig. 10).

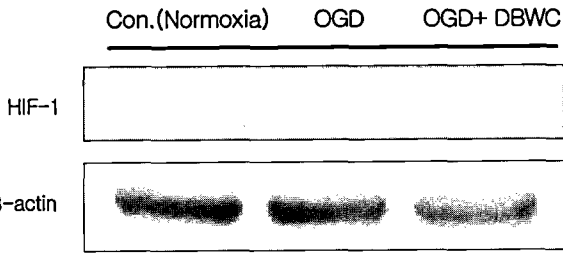


Fig. 10. *Daebowonjeon* (DBWJ) regulated the activity of HIF-1 protein in PC12-cells. The cells were exposed to Oxygen-Glucose Deprivation(OGD) in absence or presence of DBWJ for 6 hrs. The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on 12.5% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-HIF-1 antibody. The immunoreactive signals were visualized by ECL.

7. 大補元煎이 OGD에 의한 polyADP-ribose polymerase (PARP) 절단에 미치는 영향

OGD에 의한 세포고사 유도현상이 세포사 신호전달계의 중요한 caspase-3 protease의 주요 표적인자인 PARP의 절단 양상에 미치는 영향을 관찰하였다. OGD 처리 6시간 후 PC12 세포와 OGD 처리와 大補元煎을 동시 처리한 세포를 채취하여, 분쇄한 세포부유액의 PARP 분자를 anti-PARP 항체를 이용한 western blotting을 시행하였다. OGD 처리시 PARP 절단은 대조군에 비하여 증가됨을 알 수 있었으며, 大補元煎을 동시 처리한 실험군의 PARP 절단 경향은 대조군과 같은 양상을 보였다 (Fig. 11). 이러한 결과로 OGD에 의한 노출이 caspase-3-protease의 활성을 유도하여 세포내 PARP 단백질의 분해를 증가시켰으며, 大補元煎은 PARP의 활성을 억제시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

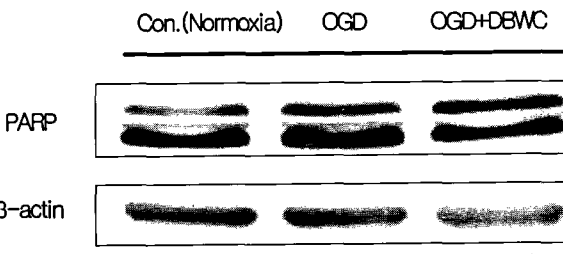


Fig. 11. OGD cleaved polyADP-ribose polymerase (PARP) in PC12 cells. The cells were exposed to OGD in absence or presence of DBWJ for 6 hrs. The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on 12.5% SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis), transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-PARP antibody. The immunoreactive signals were visualized by ECL(Enhanced chemiluminescence kit).

고찰

大補元煎은 六味地黃元에서 “三瀉”의 茯苓, 澤瀉, 牡丹皮를 제거하고, 補血滋陰의 枸杞子, 杜沖, 當歸와 補氣의 人蔘, 炙甘草를 가한 처방으로 그 구성약물의 性味와 效能을 살펴보면²²⁾, 人蔘은 甘·微溫하여 大補元氣, 健脾益氣하고, 山藥은 甘·平하여

補脾胃, 益肺腎하며, 熟地黃은 甘·微溫하여 補精, 補陰, 補五臟하고, 當歸는 甘·辛·溫하여 補血和血하며, 枸杞子는 甘·平으로 滋補肝腎, 益精, 堅筋骨하고, 山藥은 酸·微溫하여 補益肝腎, 澁精하며, 杜沖은 甘·微辛·溫하여 補肝腎, 壯筋骨하고, 甘草는 甘·平하여 補脾益氣, 調和諸藥하는데, 이상으로 보아 大補元煎은 益氣養血, 滋補肝腎 하는 효능이 있으므로 氣血大虧, 精神失守之危劇으로 인한 제반 소모성 질환 및 퇴행성 질환을 치료하는데 응용되고 있으며^{23,24)}, 약리적으로는 免疫機能增進, 強壯, 強心, 血液循環改善 등의 작용을 한다고 알려져 있다¹⁰⁾.

뇌혈관 질환시 나타나는 뇌세포 손상은 허혈상태에서 발생하는 활성산소에 의한 산화적 손상이 중요한 기전의 하나로 알려져 있으며, 신경계 질환에서 나타나는 세포고사의 경로에 활성산소가 중요한 매개체로 작용한다는 증거들이 제시되고 있다^{4,7,12,25,26)}.

뇌세포는 아주 민감하여 단시간의 허혈에 의해 방출된 glutamate 흥분독성에 의한 손상뿐만 아니라, 직접적인 산화성 손상도 뇌세포 고사의 중요한 기전으로 논의되고 있다. 이러한 허혈성 산화적 손상이 세포 내에서 어떤 대사경로를 통하여 신경세포 고사를 일으키는지는 아직 명확히 알려져 있지는 않지만 활성산소 생성에 의한 산화적 손상이 관여하고²⁷⁾, 이러한 세포 손상 기전들이 단독 또는 복합적인 기전으로 신경세포 고사를 초래하여 신경계 질환들을 유발한다고 보고되고 있다²⁸⁾. 산화성 손상에 의한 신경세포 고사는 활성 산소가 세포 내 Ca²⁺의 양을 증가시키고, insulin receptor kinase, src protein kinase, p72syk tyrosine kinase 등의 효소를 자극하여 tyrosine phosphorylation, PKC 및 PLA2의 활성 등을 유도하여 세포의 기능 및 생존에 필수적인 신호전달계에 영향을 주는 것으로 알려져 있다^{22,33)}.

또한 Tabakman¹⁾ 등은 OGD에 의한 노출 시간과 정도에 따라 신경세포 사멸의 기전을 연구하는 등 허혈상태의 정도와 시간에 따른 신경세포의 사멸에 대한 연구도 꾸준히 진행되고 있다^{1,2,5)}.

한방약재를 이용한 영양혈청 결핍에 의한 신경세포 고사에 관한 연구로는 林²¹⁾의 Ras와 MAP kinase 경로를 통한 환산단의 PC12 세포 고사 방어에 대한 연구와 金²⁰⁾의 補陽還五湯이 養血精缺乏에 의한 PC12 細胞의 枯死에 미치는 영향 등이 보고되었다. 그러나 大補元煎이 OGD에 의한 뇌세포 손상에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 大補元煎이 산소와 포도당의 결핍으로 야기되는 뇌신경세포 손상에 미치는 영향을 실험적으로 연구하기 위하여 PC12 세포에 大補元煎을 OGD 상태에 동시 처리한 후 PC12 세포의 생존율, 핵 분열 양상, LDH 방출도, 미토콘드리아 막 전위 변화 그리고 발현되는 단백질의 변화 양상을 관찰하였다.

먼저 PC12 세포를 OGD 상태에 노출시킨 후 시간에 따른 세포의 생존율을 MIT방법에 의해 측정된 결과 OGD 3시간 정도의 노출은 산소, 당의 제공급으로 많은 회복율을 보였으나, 6시간, 8시간 노출의 경우는 회복율이 현저히 감소되어 나타났다 (Fig. 1). 이는 Tabakman 등¹⁾의 보고에서와 같이 OGD 정도나 노출 시간에 따라 영양 제공급 후 세포의 회복율에 많은 영향을 미친다는 것과 일치한다. 그러나 大補元煎을 OGD 상태에 동시 처리한 결과 PC12 세포의 생존율이 거의 대조군 수준으로 회복됨

을 볼 수 있었다. 이는 大補元煎이 OGD 상태 시 포도당 혹은 세포 생존에 필요한 여러 성분을 제공하여 일시적인 허혈 상태에서도 세포의 정상적인 형태를 유지할 수 있도록 한다고 생각된다.(Fig. 2, Fig. 4).

또한 허혈상태에 의한 세포의 손상이 신경세포 고사의 주원인으로 알려져 있는 산화적 손상에 의한 것인지를 알아보고자 OGD 처리 시 항산화제를 동시 처리하여 세포 생존율을 관찰하였다. 일반적으로 잘 알려진 NAC의 동시 처리로 PC12 세포의 생존율이 대조군에 가깝게 회복되는 결과를 나타내어 OGD로 유도되는 세포 손상이 산화적 손상에 의한 것임을 알 수 있었다 (Fig. 3). 이에 산화적 손상에 의한 세포고사의 기전을 알아보기 위하여 세포고사의 특징을 나타내는 핵 분절 현상이나 DNA ladder 현상을 관찰하였다. OGD에 노출된 세포의 핵에서 핵 분절 현상을 관찰할 수 있었으며, DNA ladder 현상 또한 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 OGD에 의한 세포 손상이 산화적 손상에 의한 세포고사 기전을 통해 진행됨을 추측할 수 있었다.

외부의 자극에 손상받은 세포는 세포 밖으로 LDH를 방출하고, 방출된 LDH를 매개로 세포고사가 진행된다고 알려져 있다^{4,29)}. OGD에 의한 신경세포 손상 기전연구에서 세포에 미치는 독성을 측정하기 위하여 세포 밖으로 방출되는 LDH의 양을 측정한다^{2,28)}. 본 연구에서도 OGD 처리 시간에 따른 LDH 방출 양을 측정된 결과 OGD 처리 시간에 따라 방출되는 LDH 양이 증가되었으며, 이는 세포 생존율의 감소와 연관이 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1, Fig 6). 그러나 OGD 상태에서 大補元煎의 동시 처리는 LDH의 방출 양을 감소시켰다. 이는 大補元煎이 OGD로 야기되는 PC12 세포의 손상으로부터 세포를 보호하는 효과가 있음을 제시하고 있다 (Fig. 8).

또한 OGD에 의한 산화적 손상이 미토콘드리아 막전위 변화에 미치는 영향을 관찰하였다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 OGD 처리 6시간이 경과하면 미토콘드리아 막전위의 뚜렷한 증가를 나타내었으며, 이때 大補元煎의 동시처리는 미토콘드리아 막전위 변화를 감소시켜 대조군의 양상과 유사하게 나타났다.

신경세포의 OGD에 의한 노출은 정도와 시간에 따라 손상 받는 정도가 다르게 나타난다고 한다²⁹⁾. 또한 세포가 OGD와 같은 일시적 허혈상태에 노출되면 다양한 신호전달 체계가 관여하는데, 그 중 hypoxia inducing factor (HIF)-1이 영향을 받게 된다. HIF-1은 hypoxia에 의해 유도되는 전사인자로서 glycolytic enzymes, glucose transporter(GLUT)-1, LDH, erythropoietin과 같은 다양한 유전자의 발현을 조절한다^{6,30)}. 본 연구에서도 OGD 처리에 의해 HIF-1의 발현이 유도되는지를 관찰한 결과, PC12 세포의 OGD 노출시 HIF-1의 발현이 증가됨을 알 수 있었다 (Fig. 10). 그러나 大補元煎의 동시 처리군은 대조군과 유사한 양상을 나타내었다. OGD에 의한 HIF-1의 발현 증가는 앞서 얻어진 LDH 방출의 증가와 일치하는 결과라고 생각되며, 大補元煎은 OGD에 의한 HIF-1의 발현 증가를 억제시켰다.

또한 OGD에 의한 세포고사의 진행을 측정하기 위하여 PARP의 절단을 western blotting으로 확인하였다 (Fig. 11). OGD 처리 시 PARP 절단은 대조군에 비하여 85-kDa 크기로 증

가됨을 볼 수 있었으며, 大補元煎을 동시 처리한 실험군에서는 PARP의 활성을 억제시키는 것으로 나타났다. 그러나 OGD에 의한 신경세포 고사의 기전을 연구하기 위해서는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)에 관련된 ERK, JNK 등의 발현 변화를 western blotting을 이용하여 분석하여야 할 것으로 생각된다¹⁾.

이상의 결과를 종합하면 大補元煎은 OGD 상태에서 세포독성의 매개역할을 하는 LDH 방출 양을 감소시켰으며, hypoxia에 의해 유도되는 HIF-1의 발현을 억제하는 효과를 나타내었다. 보였음을 알 수 있다. 따라서 大補元煎은 허혈상태의 신경세포에서 활성 산소로 인한 세포손상 보호효과가 있는 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 허혈로 유발된 뇌세포 손상에 대한 大補元煎의 신경세포 보호효과와 작용기전을 究明하기 위하여 PC12 세포를 oxygen glucose deprivation (OGD) 상태에 노출시킨 후 처리 시간에 따른 세포의 생존율, 형태적 변화, 핵 염색 변화, DNA ladder 변화, LDH 방출 양의 변화, 미토콘드리아 막전위 변화 그리고 Hypoxia Inducing Factor (HIF)-1 발현 양상, polyADP-ribose polymerase (PARP)의 절단 양상 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

大補元煎은 OGD에 의한 PC12 세포의 생존율 감소를 억제시켰다. 大補元煎은 OGD에 의한 PC12 세포의 형태적 변화를 감소시켰다. 大補元煎의 동시처리는 OGD에 의한 핵 분절 현상과 DNA ladder 현상을 억제시켰다. 大補元煎의 동시처리는 OGD에 의한 LDH 방출 양을 감소시켜 세포독성을 감소시켰다. 大補元煎의 동시처리는 OGD에 의한 HIF-1의 발현 유도를 억제시켰다. 大補元煎의 동시처리는 OGD에 의한 PARP의 활성을 억제시켰다.

이상의 결과로부터 大補元煎은 HIF-1의 발현을 조절함으로써 OGD에 의한 PC12 세포의 LDH 방출과 활성산소의 세포손상을 억제시키는 것으로 나타났다. 따라서 大補元煎은 일시적 허혈로 인한 신경세포 고사에 대한 방어역할을 하는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2005년도 원광대학교 교비 지원에 의하여 수행됨.

참고문헌

1. Tabakman, R., Lazarovici, P., Kohen, R. Neuroprotective effects of carnosine and homocarnosine on pheochromocytoma PC12 cells exposed to ischemia. *J. Neurochem. Res.*, 68:463-469, 2002.
2. Peter, L. Ischemia cell death in brain neurons. *Physiol. Review*, 70:1499, 1999.
3. 崔恩禎. Mongolian Gerbil의 Reversible forebrain ischemia 모델에 미치는 補陽還五湯의 효과, 동의대학교 대학원, 1999.
4. Tabakman, R., Jiang, H., Levine, R.A., Kohen, R. and

- Lazarovici, P. Apoptotic characteristics of cell death and the neuroprotective effect of Homocarnosine on Pheochromocytoma PC12 cells exposed to ischemia. *J. of Neuroscience Res.*, 75:499-507, 2004.
5. Rukenstein, A., Rydel, R.E., Greene, L.A. Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation- and transcription-independent mechanisms. *J. Neurosci.*, 11:2552-2563, 1991.
 6. Jin, K.L., Mao, X.O., Nagayama, T., Goldsmith, P.C., Greenberg, D.A. Induction of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 α by global ischemia in rat brain. *Neuroscience*, 99:577-585, 2000.
 7. Brunelle, J.K. and Chandel, N.S. Oxygen deprivation induced cell death: An update. *Apoptosis*, 7:475-482, 2002.
 8. 張介賓. 張氏景岳全書, 서울, 杏林書院, p 99, 1975.
 9. 張介賓著, 김영남 譯. 國譯景岳全書(보급판), 서울, 一中社, pp 15-16, 1993.
 10. 劉蘭芳 主編. 中藥湯劑 臨床新用途, 北京, 人民軍醫出版社, p 54-55.
 11. Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M.A., Kriegstein, A.R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.*, 7:357-368, 1987.
 12. Coyle, J.T. and Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*, 262:689-695, 1993.
 13. Behl, C. Apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 107:1325-1344, 2000.
 14. Kirino, T., Tamura, A., Sano, K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Progress in Brain Res*, 63:39-58, 1985.
 15. Banasiak, K.J., Xia, Y., Haddad, G.G. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol*, 62:215-249, 2000.
 16. 趙漢栢. 大補元煎이 卵巢摘出로 骨多孔이 誘發된 白鼠에 미치는 影響. 원광대학교 대학원, 1998.
 17. 전연이, 박치상, 박창국 등. 당귀의 허혈성 뇌손상 억제작용 및 신경세포 보호효과. *대한본초학회지*, 18(4).
 18. 백일성, 박치상, 박창국. 천궁의 허혈성 뇌손상 억제작용 및 신경세포 보호효과. *대한본초학회지*, 18(4), 2003.
 19. 崔哲源. PC12 세포의 Apoptosis에 대한 星香正氣散의 防禦效果 및 作用機轉 研究. 원광대학교 대학원, 1999.
 20. 金鐘吉. 補陽還五湯이 營養血清缺乏에 의한 PC12 細胞의 枯死에 미치는 영향. 원광대학교 대학원, 2000.
 21. 林俊植. 還少丹이 營養血清 缺乏性 PC12細胞의 Apoptosis에 미치는 影響. 원광대학교 대학원, 2000.
 22. 신민교. 원색 임상본초학, 서울, 남산당, pp 166-167, 171-172, 175-177, 198-199, 219, 221-223, 243-245, 1988.
 23. 彭志仁. 主編. 中華名醫方劑大全, 北京, 金盾出版社出版總發行, pp 56-57, 1995.
 24. 裴元植. 最新韓方臨床學, 서울, 南山堂, p 881, 1994.
 25. Aizenman, Y., de Vellis, J. Brain neurons develop in a serum and glucose free environment : effect of transferrin, insulin, insulin-like growth factor-I and thyroid hormone on neuronal survival, growth and differentiation. *Brain Res.*, 406:32-42, 1987.
 26. Aruoma, O.L., Halliwell, B., Hoey, B.M. and Butler, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine : its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.*, 6:593-597, 1989.
 27. Savitz, S.I., Rosenbaum, D.M. Apoptosis in neurological disease. *J. Neurosurgery*, 42:555-574, 1998
 28. Greene, LA. and Tischler, A.S. PC12 pheochromocytoma cells in neurobiological research. *Adv. Cell Neurobiol.*, 3:373-414, 1982.
 29. 洪元植. 中國醫學史, 서울, 東洋研究院, pp 335-336, 1987.
 30. Lim, M.L., Lum, M.G., Hansen, T.M., Roucou, X., Nagley, P. On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *J. Biomed. Sci.*, 9:488-506, 2002.
 31. Murphy, T.H., M. Miyamoto, A. Sastre, R.L. Schnaar and J.T. Coyle : Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cysteine transport leading to oxidative stress. *Neuron*, 2:1547-1548, 1989.
 32. Ozyurt, E., Graham, D.I., Woodruff, G.N., McCulloch, J. Protective effect of the glutamate antagonist MK-801 in focal cerebral ischemia in the cat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 8:138-143, 1988.
 33. Jiang, Z., Zhang, Y., Chen, Y., Lam, P.Y., Yang, H., Xu, Q., Yu, A.C. Activation of ERK and Akt in astrocytes under ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 294:726-733, 2002.
 34. Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K.C., Ames, B.N. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine and anserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:3175-3179, 1988.
 35. Cowan, K.J., and Storey, K.B. Mitogen-activated protein kinases : new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J. Exp. Biol.*, 206:1107-1115, 2003.
 36. Nicole, M.J., and Bergeron, M. Hypoxia Preconditioning Induces changes in HIF-1 target genes in Neonatal Rat Brain. *J. Cerebral Blood Flow and Metab.* 18. Savitz S.I., Rosenbaum DM. Apoptosis in neurological disease. *J. Neurosurgery*, 42:555-574, 1998.
 37. Lambeng, N., Willaime-Moraw, S., Mariani, J., Ruberg, M., Brugg, B. Activation of mitogen-activated protein kinase pathway during the death of PC12 cells is dependent on the state of differentiation. *Brain Res Mol Brain Res*,

- 111:52-60, 2003.
38. Saikumar, P., Dong, Z., Patel, Y., Hall, K., Hopfer, U., Weinberg, J.M., Venkatachalam, M.A. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene*, 17:3401-3415, 1998.
39. Buttke, T.M., and Sandatrom, P.A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today.*, 15:7-10, 1994.
40. Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T. Formation mechanisms of stress adaptation : role of functional coupling of glucocorticoids and brain serotonergic nervous system. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 20(3):83-91, 2000.
41. Li, Y.F., and Luo, Z.P. Protection of buspirone on the cultured PC12 cells lesioned by corticosterone. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 15(5):333-336, 2001.
42. 鄭普燮, 辛民教. 圖解 鄉藥(生藥)大事典, 서울, 永林社, pp 407-408, 418-419, 523-524, 632-664, 1034-1035, 1990.