

桃紅四物湯이 C6 신경교세포의 2-DG에 의한 오토파지성 세포사멸에 미치는 영향

신학수¹ · 이성근² · 문병순^{1,2*}

1: 원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과, 2: 원광대학교 한의과대학 내과학교실

Protective Effects of *Dohongsamul-tang* on 2-deoxy-D-glucose Induced Autophagic Cell Death in C6 Glial Cells

Hak Soo Shin¹, Seung Geun Lee², Byung Soon Moon^{1,2*}

1: Department of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine,
2: Department of Internal Medicine, School of Oriental Medicine, Wonkwang University

The water extract of *Dohongsamul-tang*(DHSMT) has been traditionally used in treatment of ischemic heart and brain diseases in Oriental Medicine. However, little is known about the mechanism by which DHSMT protects C6 glial cells from glucose deprivation induced damages. Therefore, this study was designed to evaluate the protective effects of DHSMT on 2-deoxy-D-glucose induced autophagy of C6 glial cells. Autophagic phenotype is evaluated by fluorescence microscopy and flow cytometry with specific biological staining dyes, including monodansylcadaverine and acridine orange, as well as Western blot analysis with microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3) and Beclin-1. Treatment with 2-deoxy-D-glucose significantly resulted in a decrease of the viability of C6 glial cells and increase of the extracellular LDH release in a dose and time-dependent manner. However, pretreatment with DHSMT protected C6 glial cells from glucose deprivation with 2-deoxy-D-glucose. The author also observed the fact that autophagy phenotype occurred by 2-deoxy-D-glucose in C6 glial cells. Pretreatment with 3-MA, a pharmacological inhibitor of autophagy, abolished the formation of acidic vesicle organelle in C6 glial cells treated with 2-deoxy-D-glucose. However, pretreatment with DHSMT inhibited the formation of autophagic phenotypes, including formation of acidic vesicle organelle, and increase of the expression of LC-3 II Beclin-1 proteins in C6 glial cells treated with 2-deoxy-D-glucose. Taken together, these data suggest that DHSMT is able to protect C6 glial cells from glucose deprivation with marked inhibition of autophagy formation.

Key words : *Dohongsamul-tang*(DHSMT), 2-deoxy-D-glucose(2-DG), autophagic cell death, autophagy, C6 glial cell

서 론

桃紅四物湯은 四物湯에 桃仁, 紅花를 加味한 처방으로, 清代 吳¹⁾의 《醫宗金鑑·婦科心法要訣》에 처음 수록되었다. 朱²⁾의 《丹溪心法》에서는 “中風 在左屬死血少血 左以四物湯加桃仁紅花... 人身諸病 多生於鬱 血鬱 桃仁紅花...” 라고 수록되어 있으며, 養血, 活血, 祛瘀의 효능으로 血瘀腹痛, 經行不暢 뿐만 아니라 瘀血로 인한 中風에 활용되고 있다³⁾.

四物湯의 심혈관계에 관한 실험적 연구로는 南⁴⁾의 혈관내피 손상에 대한 회복, 河⁵⁾의 혈전증 억제효과, 姜⁶⁾의 혈압강하, 朴⁷⁾과 趙⁸⁾의 배양 심근세포의 산화적 손상에 대한 방어효과 등이 있다. 또한 桃紅四物湯에 관한 연구로는 郭⁹⁾과 田¹⁰⁾의 혈전생성 억제효과와 趙¹¹⁾의 항암 및 항전이 효과, 柳¹²⁾의 심근세포 보호효과, 朴¹³⁾의 뇌경색 환자의 혈액 내 세포활성물질의 생성 증가효과 등에 대한 보고가 있으나 중추신경세포와 관련된 뇌신경계 질환에 대한 연구가 부족한 실정이다.

허혈성 뇌손상에서 신경세포는 산소와 포도당의 공급장애로 인한 흥분독성, 활성산소의 작용, 그리고 세포자멸사의 과정을 통하여 손상을 입게 된다. 최근 세포자멸사에 관한 많은 연구

* 교신저자 : 문병순, 익산시 신용동 344-2 원광대학교 익산한방병원 2내과

· E-mail : mbs@wku.ac.kr, · Tel : 063-859-2802

· 접수 : 2009/04/27 · 수정 : 2009/05/18 · 채택 : 2009/06/02

가 이루어져 알츠하이머병¹⁴⁾이나 파킨슨병¹⁵⁾과 같은 각종 퇴행성 뇌질환과도 깊은 연관이 있음이 밝혀졌으며, 이후 다양한 기전을 통해 허혈성 뇌질환을 규명하려는 많은 연구가 이루어지고 있다^{16,17)}.

본 연구에서는 세포 내 대사를 통해 에너지원으로 사용되는 글루코스 대신에 구조적으로 비슷하지만 에너지원으로 사용될 수 없는 글루코스 유사체인 2-DG(2-Deoxy-D-Glucose)에 의한 C6 신경교세포의 손상모델에서 桃紅四物湯의 신경세포 보호효과 및 autophagy에 의한 세포자멸사 기전을 규명하기 위하여 2-DG에 의해 유도된 C6 신경교세포의 손상에서 MTT assay, 유식세포 분석, 형광현미경적 조사, flow cytometry, Western blotting 등의 방법으로 桃紅四物湯이 세포생존율, LDH 방출, acidic vesicular organelle 생성, LC3-II 단백질, Beclin-1 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

실험에 사용한 세포는 백서로 부터 유래한 C6 신경교세포주를 한국 세포주 은행 (KNCC, 서울대학교)에서 분양 받았으며, 5% CO₂, 95% 대기 공기 및 37°C 환경의 세포 배양기에서 계대 배양하면서 실험하였다.

2) 약제

본 실험에 사용된 桃紅四物湯의 처방내용은 梟¹⁾의 《醫宗金鑑》에 의거하였다. 약재는 원광대학교 익산한방병원에서 구입하여 정선한 것으로 사용하였으며, 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Dohongsamul-tang*(DHSMT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
桃仁	<i>Prunus persica Batsch</i>	7.50 g
紅花	<i>Carthamus tinctorius Linne</i>	3.75 g
生地黃	<i>Rehmannia glutinosa Libschitz</i>	7.50 g
當歸	<i>Angelis gigas Nakai</i>	7.50 g
赤芍藥	<i>Paeonia lactiflora var</i>	3.75 g
川芎	<i>Cnidium officinale Makino</i>	3.75 g
Total amount		33.75 g

3) 시약 및 기기

세포배양에 필요한 Dubelco's minimum essential medium (DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청 (fetal bovine serum: FBS)은 GIBCO BRL사 (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 세포 배양용기 (24, 48-well plate, 6 cm dish, 10 cm dish)는 Falcon사 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로 부터 구입하여 사용하였다. MTT(methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl, tetrazolium bromide), 2-DG(2-deoxy-d-glucose), acridine orange, MDC(monodansylcadaverine), 3-MA(3-methyladenine)는 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)로 부터 구입하였다. LDH

측정은 Roch사(R&D, Germany)로 부터 구입한 kit를 사용하여 측정하였다. Western blotting에 사용된 LC3, Bclin-1, β-actin의 항체들은 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)로 부터 구입하였으며, ECL kit는 Amersham사(Buckinghamshire, England)제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제

실험에 사용된 藥材는 물을 용매로 사용한 추출방법을 이용하여 본 실험에 사용하였다. 물 추출물 (H₂O extract)은 桃紅四物湯 3첩(101.25 g)을 물 1 ℓ와 함께 냉각기를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하였고, 3,200 rpm으로 20분 동안 원심분리 후 감압농축기(rotary evaporater)로 농축한 다음 -70°C(deep freezer)에서 12시간 이상 동결시키고, freeze dryer로 동결건조하여 17.1 g의 시료를 얻었다. 추출물의 수율(W/W)은 약 16.89%이었으며, 시료를 eppendorf tube에 100 mg/ml가 되도록 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 녹여 4°C에서 보관하고 실험 시에는 DMEM 배지에 희석하여 사용하였다.

2) 세포주 배양

세포주는 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% FBS가 포함된 DMEM (Gibco BRL, England) 배양액으로 배양하였으며, 2-3일 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포를 이용하였다. 각 실험 조건에 따라 2-DG나 한약제 등을 처리한 후 소포체 손상으로 인한 세포자멸사와 이에 연관된 생화학 및 분자생물학적 실험을 수행하였다.

3) 세포생존율 측정

세포생존율 측정은 MTT (Sigma Co, St. Louis, MO, USA) 방법을 이용하였다. 세포 배양판 (48-well plate)에 세포 (1×10⁵ 세포 수/ml)를 분주하여 12시간 이상 세포 배양기 안에서 안정화하였으며, 각 조건에 따라 처리한 후 배양기 안에서 일정 시간 배양하였다. 배양 완료 4시간 전에 MTT 용액 (5 mg/ml in PBS)을 배양액 부피의 1/10이 되도록 50 µl씩 첨가한 다음, 4시간 후 상층액을 제거하여 바닥에 부착된 불용성의 보라색 formazan을 완전히 건조시켰다. 불용성 formazan은 DMSO (dimethyl sulfoxide)용액으로 충분히 용해한 다음, 분광광도계 (ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 545 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 정상 대조군의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) Lactate dehydrogenase (LDH) 측정

세포독성을 조사하기 위하여 처리시간과 처리군에 따라 방출되는 LDH 양을 측정하였다. 각 실험군의 상층액을 1,000 rpm으로 7분 동안 원심분리한 후 부유액을 LDH 분석에 사용하였다. LDH 측정은 Roch사 (R&D, Germany)로 부터 구입한 kit를 사용하였다. 각 실험군으로 부터 포획한 상층액 100 µl에 LDH 측정을 위한 반응 혼합액 100 µl를 혼합하여 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응은 빛을 차단한 상태로 진행하였으며, 반응 후 분광광도계 (ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고,

아래와 같은 식에 의해 활성도를 산출하였다. LDH 양은 전체 LDH 활성도에 대한 실험군에서의 LDH 활성도를 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{세포독성(\%)} = \frac{(\text{실험군의 흡광도} - \text{정상 실험군의 흡광도})}{(\text{정상 실험군의 총 LDH를 나타내는 흡광도})} \times 100$$

5) Acidic vesicular organelle 생성의 측정

C6 신경교세포에서 발생하는 세포 내 acidic vesicular organelle를 확인하기 위하여 acidic compartments를 특이적으로 염색시키는 시약인 acridine orange와 monodansylcadaverine (MDC)을 사용하여 실험하였다. C6 신경교세포에 1 µg/ml의 acridine orange와 15분 동안 반응시킨 후 PBS로 세척하여 형광 현미경 (Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였고, 같은 조건으로 acridine orange로 염색한 후 PBS로 세척하고, 1% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 세포를 포집하였다. Acidic vesicular organelle 생성은 flow cytometry (FACS Calibur, BD Bioscience)를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. FL3-parameter는 acridine orange에 의한 오렌지색 형광의 생성 정도를 나타낸 것이다. 또한 50 mM MDC를 DMEM 배지에 희석하여 30분 동안 CO₂ 배양기에서 반응시킨 후 같은 방법으로 flow cytometry를 시행하였고, 이때 FL1-parameter는 MDC에 의한 녹색 형광의 생성 정도를 나타낸 것이다.

6) Western blotting

C6 신경교세포를 각 실험 조건에 따라 시약을 처리하여 배양한 후 세포를 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution (HBSS)로 2회 세척하였다. 세척 후 얻은 세포를 total cell lysate 하기 위하여 RIPA 용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSH, 1 µg/ml aprotinin)으로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포 부유액에 2 X sample buffer와 섞어 98°C에서 5분 동안 끓인 후 15% sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4°C, 30 V에서 16시간 동안 transfer한 후 blocking (5% skim milk)하여 상온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 항체결합을 예방하였다. LC3, Beclin-1 및 β-actin 등에 대한 항체를 tris-buffered saline (TBS)에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이어서 2차 항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase (TBS로 1:1,000으로 희석, Amersham사)와 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3회 세척한 후 enhanced chemiluminescence kit (ECL kit)를 사용하여 필름에 노출하였다.

7) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 실험결과와 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였고, p-value가 최대치 0.05(p<0.05) 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 2-DG 처리에 의한 C6 신경교세포의 생존율 변화

2-DG에 의한 C6 신경교세포의 세포독성을 조사하기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 먼저, 1, 2, 4 및 8 mM 농도의 2-DG를 C6 신경교세포에 각각 48시간 처리한 결과, 대조군에 비해 각각 72.73%, 49.36%, 39.26% 및 27.07%의 세포생존율을 보였다(Fig. 1A). 또한, 2-DG에 의한 세포독성의 시간 의존적인 변화를 알아보려고 C6 신경교세포에 2 mM 2-DG를 12시간, 24시간, 36시간, 48시간 및 60시간 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. C6 신경교세포의 생존율은 2-DG 처리 24시간 후부터 감소하기 시작하여 48시간 후에는 정상 대조군과 비교하여 45.06%의 세포생존율을 보였으며, 60시간 후에는 18.23%로 현저하게 감소되었다(Fig. 1B). 이상의 결과에서 C6 신경교세포에 대한 2-DG 독성은 농도 및 시간 의존적으로 측정됨을 알 수 있었다.

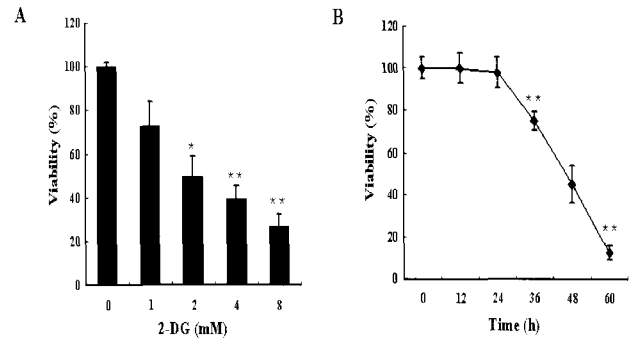


Fig. 1. 2-DG decreased the viability of C6 glial cells in a dose and time-dependent manner. (A) Cells were treated with a various concentration of 2-DG for 48 hrs. (B) Cells were treated with 2 mM 2-DG for indicated periods. Cell viability was measured by MTT assay. Results were represented as the means ±S.D. of three experiments. *p <0.05, **p <0.01 compared to control cells.

2. 桃紅四物湯이 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 생존율에 미치는 영향

2-DG에 의한 C6 신경교세포 생존율에 대한 桃紅四物湯의 효과를 조사하기 위하여 MTT assay를 시행하였다. 먼저 桃紅四物湯 자체 독성을 조사하기 위하여 다양한 농도의 桃紅四物湯을 C6 신경교세포에 48시간 처리하였다. 그 결과 桃紅四物湯 단독 처리 시 최고 1000 mg/ml 농도에서도 세포생존율의 감소를 보이지 않았다(Fig. 2A). 다음은, C6 신경교세포에 桃紅四物湯을 800 mg/ml, 900 mg/ml 및 1000 mg/ml 농도로 1시간 전처리한 후 2 mM 2-DG를 48시간 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT assay로 확인하였다. 세포생존율은 2-DG 단독처리군에서 대조군의 48.54%를 나타내었으나 1000 mg/ml 농도의 桃紅四物湯 전처리 시 71.3%로 세포생존율이 증가되었다(Fig. 2A).

3. 桃紅四物湯이 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 LDH 방출에 미치는 영향

2-DG에 의한 C6 신경교세포 자멸사에서 桃紅四物湯의 효과를 알아보기 위하여 세포 내 LDH의 방출량을 조사하였다. 2

mM의 2-DG를 단독으로 처리한 군에서 방출되는 LDH양은 세포 내 존재하는 LDH 총량의 67.2%이었으나, 1000 mg/ml 농도의 桃紅四物湯을 전처리 하였을 경우 2-DG 처리에 의해 증가되었던 LDH 방출량이 29.58%로 현저하게 감소되었다(Fig. 3A). 이때 桃紅四物湯 단독처리에 의한 LDH의 방출은 없었다(Fig. 3B).

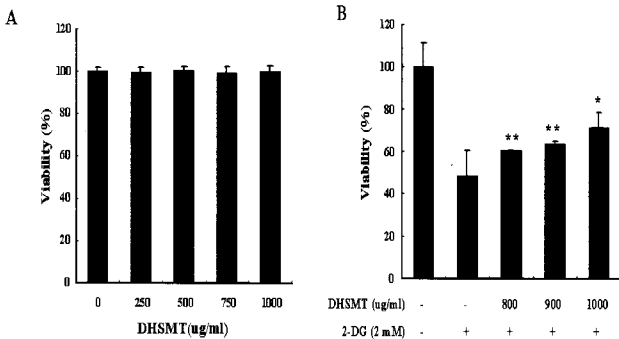


Fig. 2. 2-DG decreased the viability of C6 glial cells in a dose-dependent manner. Cells were pre-treated with the various concentrations of DHSMT for 1 hr and the cells were exposed to 2-DG for 48 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. Results were represented as the means \pm S.D. of three experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 compared to control cells.

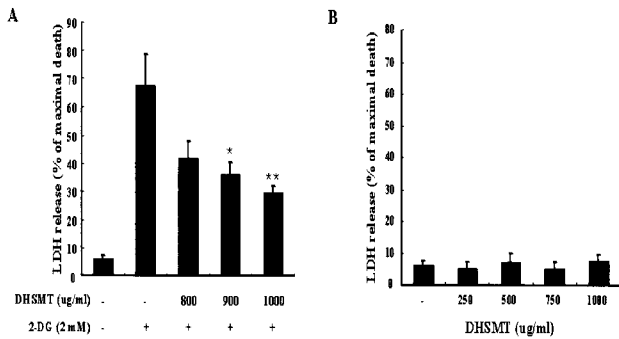


Fig. 3. DHSMT protected 2-DG-induced cell death in C6 glial cells. Cells were pre-treated with the various concentrations of DHSMT for 1 hr and the cells were exposed to 2-DG for 48 hrs. Cell viability was measured by LDH release method. Results were represented as the means \pm S.D. of three experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 compared to control cells.

4. 桃紅四物湯이 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 acidic vesicular organelle 생성에 미치는 영향

2-DG에 의한 C6 신경교세포 자멸사의 형태를 확인하고자 autophagy를 인지하는 일반적인 특징인 acidic vesicular organelle의 생성을 acridine orange 염색 후 형광현미경과 유식세포 분석기를 이용하여 조사하였다. Acridine orange는 세포 내 acidic vesicular organelle에 따라 orange의 형광을 발하게 되므로 세포 내 축적된 acidic vesicular organelle 농도에 비례하여 형광의 강도가 증가하게 된다. Fig. 4A에서 2 mM 농도의 2-DG 처리 시 시간 의존적으로 C6 신경교세포 내에 오렌지색 형광이 증가하여 acidic vesicular organelle이 생성됨을 알 수 있었으며 (Fig. 4A), 이때 형광의 세기를 유식세포 분석을 통해 수치화하였다. Acidic vesicular organelle의 생성은 2-DG 처리 48시간 후 대조군과 비교하였을 때 3.89%에서 43.2%로 증가하였다(Fig. 4B와 Fig. 5). 따라서, 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 자멸사는 acidic

vesicular organelle이 시간 의존적으로 증가하는 autophagy 현상으로 판단되었다.

다음은, 桃紅四物湯의 효과를 알아보기 위하여 1000 mg/ml 농도의 桃紅四物湯을 1시간 전처리한 후 2 mM 2-DG를 48시간 처리하여 acridin orange 염색 후 유식세포 분석을 실시하였다. Acidic vesicular organelle은 2-DG 단독처리군에서 대조군에 비해 44.08%로 증가되었으나 桃紅四物湯 전처리 시 13.5%로 현저하게 감소되었다(Fig. 6).

또한, C6 신경교세포에서 acidic compartments를 염색하는 시약인 monodansylcadaverine (MDC)을 사용하여 acidic vesicular organelle의 생성을 유식세포 분석으로 C6 신경교세포에서 재확인하였다. 2-DG 처리 후 C6 신경교세포 내 acidic vesicular organelle 생성은 시간 의존적으로 증가되었으나(Fig. 7), 桃紅四物湯을 전처리한 결과, 2-DG에 의해 증가되었던 형광의 세기가 桃紅四物湯 전처리 시 대조군과 유사한 수준으로 감소되었다(Fig. 8).

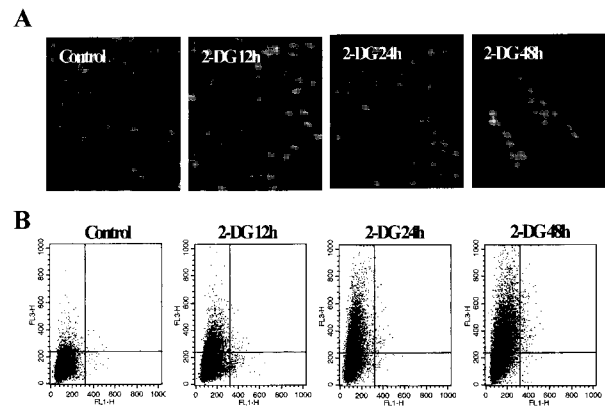


Fig. 4. 2-DG induced the increase of acidic vesicular organelle on C6 glial cells in a time-dependent manner. (A) Cells were treated with 2 mM 2-DG for indicated periods. The cells were stained with acridine orange for 15 min, and then fluorescence intensity of cells was visualized fluorescence microscope. The data was one of three independent experiments. (B) Cells were treated with 2 mM 2-DG for indicated periods. The cells were stained with acridine orange for 15 min, and then cells were harvested. After washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular acidic vesicular organelle levels.

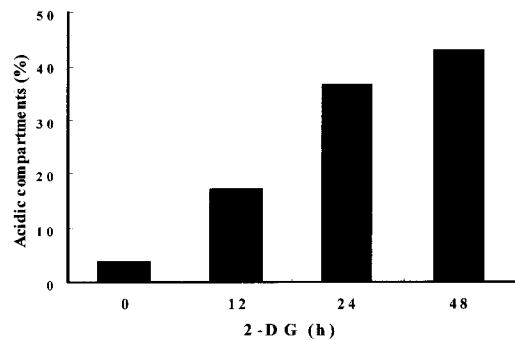


Fig. 5. 2-DG induced the increase of acidic vesicular organelle on C6 glial cells in a time-dependent manner. Quantification of acidic vesicular organelle in C6 glial cells. The percentage of autophagy was quantified by counting the number of cells located in up-left square of each FACS analysis data.

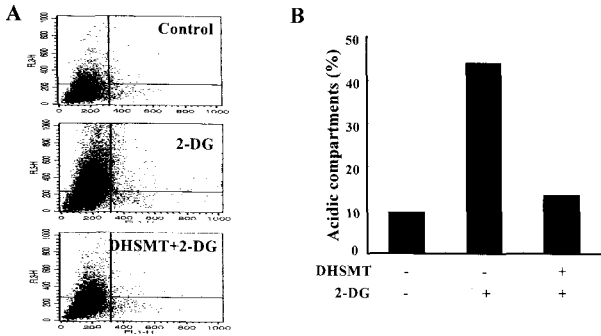


Fig. 6. DHSMT protected 2-DG-induced the increase of acidic vesicular organelle in C6 glial cells. (A) Cells were pre-treated with 1000 mg/ml DHSMT for 1 h and the cells were exposed to 2-DG for 48 h. The cells were stained with acridine orange for 15 min, and then cells were harvested. After washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular acidic vesicular organelle levels. The data was one of three independent experiments. (B) Quantification of acidic vesicular organelle in C6 glial cells. The percentage of autophagy was quantified by counting the number of cells located in up-left square of each FACS analysis data.

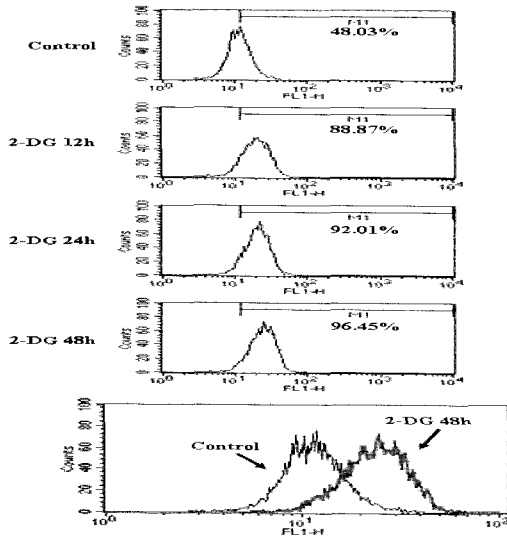


Fig. 7. 2-DG induced the increase of acidic vesicular organelle on C6 glial cells in a dose and time-dependent manner. Cells were treated with 2 mM 2-DG for indicated periods. The cells were stained with monodansylcadaverine for 30 min, and then cells were harvested. After washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular acidic vesicular organelle levels. The data was one of three independent experiments.

5. 桃紅四物湯이 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 autophagy 관련 단백질 발현에 미치는 영향

2-DG에 의한 C6 신경교세포 자멸사에서 autophagy 기전에 관련된 단백질 LC3-II 및 Beclin-1의 발현 변화와 이때 桃紅四物湯의 효과를 알아보기 위하여 western blot 방법으로 조사하였다. C6 신경교세포에 2 mM 2-DG를 24시간과 48시간 동안 처리하였다. 그 결과 C6 신경교세포에서 2-DG 처리 시 LC3-II 단백질과 Beclin-1 단백질의 발현이 시간 의존적으로 증가되었다(Fig. 9). 그러나 C6 신경교세포에 1000 mg/ml 농도의 桃紅四物湯을 1시간 전처리한 후 2 mM 2-DG를 48시간 처리 시 2-DG에 의해 증가된 LC3-II 단백질과 Beclin-1 단백질의 발현이 桃紅四物湯 전처리에 의해 대조군 수준으로 감소되었다(Fig. 10).

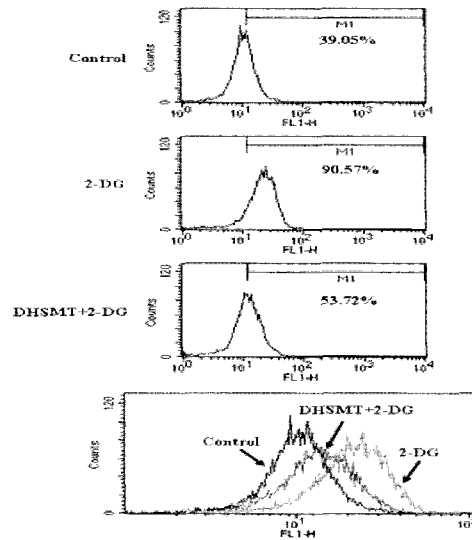


Fig. 8. DHSMT protected 2-DG-induced the increase of acidic vesicular organelle in C6 glial cells. Cells were pre-treated with 1000 mg/ml DHSMT for 1 hr and the cells were exposed to 2-DG for 48 hrs. The cells were stained with monodansylcadaverine for 30 min, and then cells were harvested. After washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular acidic vesicular organelle levels. The data was one of three independent experiments.

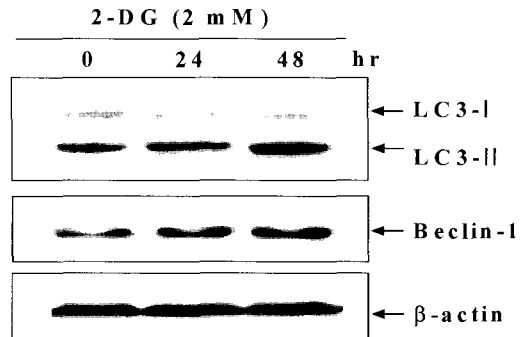


Fig. 9. 2-DG increased the LC3-II and the Beclin-1 expression on C6 glial cells in a time-dependent manner. Cells were treated with 2 mM 2-DG for indicated periods. The cell lysates were separated on 15% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-LC3, anti-Beclin-1 and anti-β-actin antibodies. The immunoreactive signals were visualized by ECL kit.

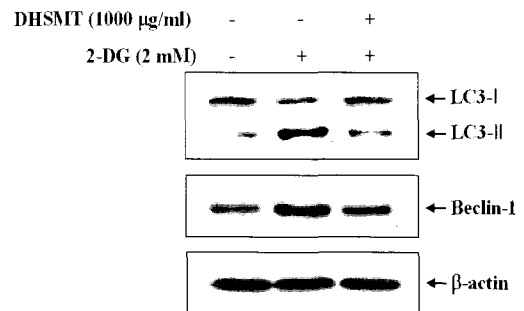


Fig. 10. DHSMT regulated the LC3-II and the Beclin-1 expression in C6 glial cells. Cells were pre-treated with 1000 mg/ml DHSMT for 1 hr and the cells were exposed to 2-DG for 48 hrs. The cell lysates were separated on 15% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-LC3, anti-Beclin-1 and anti-β-actin antibodies. The immunoreactive signals were visualized by ECL kit.

고찰

6. 3-MA(3-Methylamide)가 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 생존율 및 acidic vesicular organelle 생성에 미치는 영향

2-DG에 의한 C6 신경교세포의 자멸사에서 Autophagy 억제제인 3-MA의 효과를 알아보기 위하여 3-MA를 전처리한 후 C6 신경교세포에 대한 2-DG의 autophagy 현상을 재확인하였다. 먼저 C6 신경교세포에 3-MA를 12.5 mM, 25 mM 및 50 mM 농도로 1시간 전처리한 후 2 mM 2-DG를 48시간 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 확인하였다. 2-DG 단독처리 시 대조군에 비하여 49.06%의 세포생존율을 보였으나 최고 50 mM 농도의 3-MA를 전처리 시 71.91%의 세포생존율을 보였다. 이때 3-MA 자체 독성은 없었다(Fig. 11). 또한 같은 조건에서 세포 내 존재하는 acidic vesicular organelle의 생성을 acridine orange 염색 후 유식세포 분석기를 통하여 확인한 결과, acidic vesicular organelle은 2-DG 단독처리군에서 대조군에 비해 45.25%로 증가되었으나 50 mM 농도의 3-MA 전처리 실험군에서는 17.29%로 감소되었다(Fig. 12). 이상의 결과는 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 자멸사는 autophagy 현상이며, 이때 桃紅四物湯은 autophagy 억제제인 3-MA와 동일한 효과를 보인 것으로 판단된다.

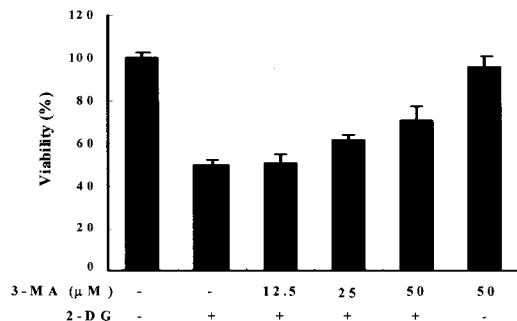


Fig. 11. 3-MA inhibited 2-DG induced cell death in C6 glial cells. Cells were pre-treated with the various concentrations of 3-MA for 1 hr and the cells were exposed to 2-DG for 48 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. Results were represented as the means ± S.D. of three experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 compared to control cells.

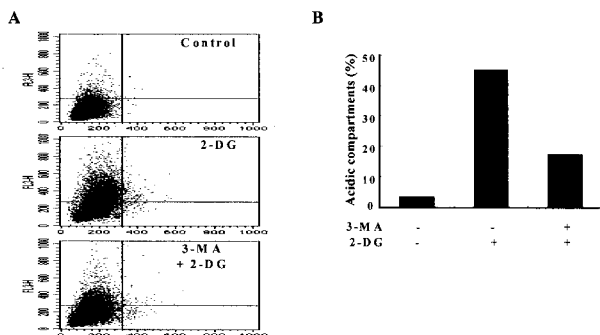


Fig. 12. 3-MA inhibited 2-DG induced the increase of acidic vesicular organelle in C6 glial cells. (A) Cells were pre-treated with 50 mM 3-MA for 1 hr and the cells were exposed to 2-DG for 48 hrs. The cells were stained with acridine orange for 15 min, and then cells were harvested. After washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular acidic vesicular organelle levels. The data was one of three independent experiments. (B) Quantification of acidic vesicular organelle in C6 glial cells. The percentage of autophagy was quantified by counting the number of cells located in up-left square of each FACS analysis data.

桃紅四物湯은 養血調經하는 四物湯에 活血化痰하는 桃仁, 紅花를 加하여 活血하면서도 養血케하고 化痰하는 가운데서도 新生케하는 처방¹⁸⁾으로, 구성약물 각각의 본초학적 효능과 약리학적 효과를 살펴보면 桃仁은 破血祛瘀, 潤腸滑腸의 효능과 혈관 확장작용, 항혈전 작용, 항염증작용의 약리적 효과가 있고, 紅花는 活血通經·祛瘀止痛의 효능과 혈관확장작용, 항혈전작용, 항고지혈증작용의 효과를 가진다. 生地黃은 清熱涼血·生津止渴의 효능과 진정, 항염증, 면역촉진 등의 작용이 있고, 當歸는 補血和血·調經止痛·潤腸通便의 효능과 항혈전, 혈관확장 및 면역기능개선 등의 작용이 있고, 赤芍藥은 涼血活血·消癰散腫의 효능과 면역조절작용, 진통작용, 항혈전작용 등이 있고, 川芎은 活血行氣·祛風止痛의 효능과 혈관확장작용, 항혈전작용 등이 있다¹⁹⁾. 이들 桃紅四物湯의 구성 약물들은 주로 순환기계 및 혈액 대사에 약리작용이 있는 것을 알 수 있다.

또한 최근 桃紅四物湯의 각각의 약물들이 신경세포나 중추신경에 미치는 영향들이 보고되고 있는데, 전²⁰⁾은 당귀의 뇌허혈 후 회복효과에 대해 보고하였고, 이²¹⁾는 桃仁의 중추신경 재생효과, Li²²⁾등은 허혈성 뇌손상에서 生地黃의 보호효과, 柳²³⁾는 뇌출혈에서 芍藥의 신경세포 보호효과, 金²⁴⁾은 川芎의 신경세포 보호효과 등을 보고하였다.

허혈성 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병 등과 같은 신경계질환에 있어서는 생체 내의 다양한 생화학적 기전들이 작용하여 신경세포와 신경교세포의 자멸사를 초래하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁷⁾.

허혈성 뇌질환이나 대사성 뇌질환에서 중추신경세포 손상에 기여하는 물질은 여러 가지가 있다. 글루코스(D-glucose, 포도당)는 세포 기능에 필요한 에너지의 원천으로 대사 조절작용을 한다²⁵⁾. 식물의 주요 에너지를 저장하는 탄수화물인 녹말 분자는 수천 개의 포도당 단위체로 이루어져 있으며, 셀룰로오스도 포도당 단위체로 이루어져 있다. 수많은 균류(菌類)와 원생동물 뿐만 아니라 대부분의 척추동물 및 무척추동물의 세포에 저장되어 있는 탄수화물인 글리코젠도 포도당으로 이루어져 있다. 반면 2-DG는 글루코스 2번 탄소의 -OH가 탈산소화된 구조로서 글루코스와 비슷한 구조이지만 세포 내에서 에너지원으로 대사될 수 없으므로 세포 내 허혈상태를 모방하기 위해 사용되는 물질이다²⁶⁾.

본 연구 결과에서도 C6 신경교세포에 2-DG를 처리하였을 경우 농도와 시간 의존적으로 세포생존율이 감소하였으며, 이는 세포 내 에너지원의 고갈에 의한 세포자멸사 효과로 사료된다.

최근 C6 신경교세포 세포자멸사에 대한 한약재의 보호효과를 실험적으로 연구한 논문으로는 김²⁷⁾의 Nitric Oxide에 의해 유발된 C6 glial 세포독성에 대한 四物湯의 방어효과, 나²⁸⁾의 炙甘草湯이 LPS와 PMA에 의해 손상된 C6 glial 세포에 미치는 영향, 김²⁹⁾의 攝生散이 C6 glial 세포의 NO 생성에 미치는 영향, 이³⁰⁾의 Zinc에 의한 C6 신경교세포 고사로부터 대뇌중탕에 의한 보호효과, 이³¹⁾의 右歸飲이 Zinc에 의한 C6 신경교세포의 고사에 미치는 영향 등이 보고되었으나, 桃紅四物湯이 C6 신경교세포 손상에 미치는 보호효과에 대한 연구는 아직 없었다.

본 연구에서는 혈청이나 글루코스 결핍성 허혈성 뇌질환 실험 모델 대신 2-DG를 C6 신경교세포에 처리하여 세포생존율이 감소됨을 확인하였고, 이때 桃紅四物湯의 전처리시는 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 세포생존율 감소를 억제하여 보호효과를 나타내었다.

Autophagy는 programmed cell death(PCD)와 관련되어 있다. 세포질, 염색체 응축 및 DNA 분절 등의 특징으로 보여주는 세포자멸사(apoptosis)는 type I PCD라고 부르고, autophagy에 의한 세포자멸사는 type II PCD라고 부른다. Autophagy에 의한 세포자멸사의 가장 큰 특징은 세포 내에 산성의 autophagy vesicle이 축적되고, lysosomal machinery가 관여한다. 그러나 autophagy에 의한 직접적인 세포자멸사 기전에 대해서는 증거가 부족한 실정이다. 일반적으로 낮은 수준의 자극으로 인한 autophagy 유도는 세포 내의 항상성 유지와 생존에 필요한 기전으로 이해되나 과부하의 자극은 autophagy로 인한 type II PCD로 알려져 있다^{32,33}).

본 연구에서는 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 세포독성을 조사하기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. C6 신경교세포의 생존율은 1, 2, 4, 8 mM의 2-DG를 C6 신경교세포에 각각 48시간 처리한 결과 대조군에 비해 각각 72.73%, 49.36%, 39.26% 및 27.07%의 세포생존율을 보였고(Fig. 1A), 2 mM의 2-DG 처리 24시간 후부터 생존율이 감소하기 시작하여 48시간 후에는 정상 대조군과 비교하여 45.06%의 세포생존율을 보였으며, 60시간 후에는 18.23%로 현저하게 감소되었다(Fig. 1B). 따라서 C6 신경교세포에 대한 2-DG 독성은 농도 및 시간 의존적으로 축적됨을 알 수 있었다.

2-DG에 의한 C6 신경교세포 생존율에 대한 桃紅四物湯의 효과를 알아보기 위하여 MTT assay를 시행하였다. 그 결과 桃紅四物湯 단독처리 시 최고 1000 mg/ml 농도에서도 세포생존율의 감소를 보이지 않았으며(Fig. 2A), 세포생존율은 2-DG 단독처리군에서는 대조군의 48.54%의 세포생존율을 나타내었으나 1000 mg/ml 농도의 桃紅四物湯 전처리 시 71.3%로 세포생존율이 증가되었다(Fig. 2B). 2-DG에 의한 C6 신경교세포 사멸에서 桃紅四物湯의 효과를 알아보기 위하여 세포 내 LDH의 방출량을 조사하였다. 2 mM의 2-DG를 단독처리한 군에서 방출되는 LDH양은 세포 내 존재하는 LDH 총량의 67.2%이었으나, 1000 mg/ml 농도의 桃紅四物湯을 전처리 하였을 경우 2-DG 처리에 의해 증가되었던 LDH 방출량이 29.58%로 현저하게 감소되었다(Fig. 3A). 이때 桃紅四物湯 단독처리에 의한 LDH의 방출은 없었으므로(Fig. 3B) 桃紅四物湯이 LDH 방출을 감소시킴을 알 수 있었다.

2-DG에 의한 C6 신경교세포 자멸사의 형태를 확인하고자 autophagy를 인지하는 일반적인 특징인 acidic vesicular organelle의 생성을 acridine orange 염색 후 형광현미경과 유식세포 분석기를 이용하여 조사하였다. Acridine orange는 세포 내 acidic vesicular organelle에 따라 orange의 형광을 발하게 되므로 세포 내 축적된 acidic vesicular organelle 농도에 비례하여 형광의 강도가 증가하게 된다. 본 연구에서는 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 자멸사는 acidic vesicular organelle이 시간 의존적

으로 증가하는 autophagy 현상으로 판단되었으며(Fig. 4, 5), Acidic vesicular organelle은 2-DG 단독처리군에서 대조군에 비해 44.08%로 증가되었으나 桃紅四物湯 전처리시 13.5%로 현저하게 감소되었다(Fig. 6). 또한 C6 신경교세포에서 acidic compartments를 염색하는 시약인 monodansylcadaverine (MDC)을 사용하여 acidic vesicular organelle의 생성을 유식세포 분석으로 C6 신경교세포에서 재확인한 결과, 2-DG 처리 후 C6 신경교세포 내 acidic vesicular organelle 생성은 시간 의존적으로 증가되었으나(Fig. 7), 桃紅四物湯을 전처리한 결과, 2-DG에 의해 증가되었던 형광의 발현이 대조군과 유사한 수준으로 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 8).

Autophagy 과정 중 autophagosome 형성에 중요한 역할을 담당하는 LC3 단백질은 2가지 형태로 존재하며, 18 kDa의 LC3-I 단백질은 세포질에 존재하고, autophagy 과정 중 나타나는 16 kDa의 LC3-II 단백질은 autophagosome membrane 안에 위치한다. 또한 세포질에 광범위하게 존재하는 Beclin-1 단백질은 autophagy 과정을 조절하는 중요한 인자로 알려져 있다.

2-DG에 의한 C6 신경교세포 사멸에서 autophagy 기전에 관련된 단백질 LC3-II와 Beclin-1의 발현 변화와 桃紅四物湯의 효과를 알아보기 위하여 western blotting 방법으로 조사하였다. 그 결과 C6 신경교세포에서 2-DG 처리 시 LC3-II 단백질과 Beclin-1 단백질의 발현이 시간 의존적으로 증가하였다(Fig. 9). 그러나 C6 신경교세포에 1000 µg/ml 농도의 桃紅四物湯을 1시간 전처리한 후 2 mM 2-DG를 48시간 처리시 LC3-II 단백질과 Beclin-1 단백질의 발현이 대조군 수준으로 감소되었다. 특히 autophagosome 형성억제제³⁴)로 잘 알려진 3-Methyladenine (3-MA)과 비교 시 桃紅四物湯의 효과가 더 뛰어난 것으로 나타났다(Fig. 6, Fig. 12).

앞에서 2-DG가 autophagy 기전으로 C6 신경교세포의 손상을 유도한다는 사실을 확인하였으므로 autophagy 억제제인 3-MA를 전처리한 후 C6 신경교세포에 대한 2-DG의 autophagy 현상을 재확인하였다. 먼저 C6 신경교세포에 3-MA를 12.5 mM, 25 mM 및 50 mM 농도로 1시간 전처리한 후 2 mM 2-DG를 48시간 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 확인한 결과, 2-DG 단독처리 시 대조군에 비하여 49.06%의 세포생존율을 보였으나 최고 50 mM 농도의 3-MA를 전처리 시 71.91%의 세포생존율을 보였다(Fig. 11). 이때 3-MA 자체 독성은 없었으며, 같은 조건에서 세포 내 존재하는 acidic vesicular organelle의 생성을 acridine orange 염색 후 유식세포 분석기를 통해 확인한 결과, acidic vesicular organelle은 2-DG 단독처리군에서 대조군에 비해 45.25%로 증가되었으나 50 mM 농도의 3-MA 전처리 실험군에서는 17.29%로 감소되었다(Fig. 12). 따라서 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 자멸사는 autophagy 현상이며, 이때 桃紅四物湯은 autophagy 억제제인 3-MA와 동일한 효과가 있음을 시사한다.

이상의 결과를 종합하면 桃紅四物湯은 C6 신경교세포에서 2-DG에 의한 오토파지성 세포사멸 보호효과를 나타내었으므로 글루코스 결핍에 의한 허혈성 뇌졸중 및 뇌의 퇴행성질환을 치료하는데 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료되며, 오토파지성 세포사멸 기전 및 관련 단백질의 발현과 관련된 작용기전에 대

한 보다 세밀한 연구가 계속되어야 할 것이다.

결론

桃紅四物湯이 뇌신경세포에서 2-DG(2-deoxy-D-glucose)에 의한 세포손상에 미치는 보호효과 및 기전을 구명하기 위하여 桃紅四物湯을 전처리한 후 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 세포 생존을 변화, LDH 방출량 변화, acidic vesicular organelle 생성에 미치는 영향, LC3-II 단백질과 Beclin-1 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

2-DG 처리는 C6 신경교세포에서 농도 및 시간 의존적인 세포 생존율의 감소를 나타내었다. 桃紅四物湯은 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 생존율 감소를 억제시켰다. 桃紅四物湯은 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 LDH 방출을 감소시켰다. 桃紅四物湯은 2-DG에 의한 C6 신경교세포의 acidic vesicular organelle 생성을 억제시켰다. 桃紅四物湯은 2-DG에 의한 LC3-II 단백질과 Beclin-1 단백질 발현 증가를 억제하였다. 桃紅四物湯은 3-MA와 동일한 autophagy 억제효과를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 桃紅四物湯은 2-DG에 의한 C6 신경교세포에서 LC3-II 단백질과 Beclin-1 단백질의 발현에 관여하여 오토파지성 세포사멸 보호효과를 나타내었다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 원광대학교 교비연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. 吳謙. 醫宗金鑑. 北京, 人民衛生出版社, pp 1145-1169, 1996.
2. 朱震亨. 新編 丹溪心法附餘. 서울, 大星文化社, p 67, 69, 515, 533, 541, 1982.
3. 陳偉, 路一平. 方劑學. 上海, 上海中醫學院出版社, pp 206-207, 1990.
4. 남창규. 四物湯이 血管內皮細胞에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 20(1):83-98, 1999.
5. 하지용. 四物湯 및 四君子湯이 Endotoxin으로 유발된 血栓症에 미치는 영향. 경희한의대논문집, 11(1):113-121, 1988.
6. 강창수. 四物湯 煎湯液이 家兔의 血壓降下에 미치는 영향. 원광한의대논문집, 2: 145-158, 1984.
7. 박종운. H₂O₂에 의한 培養心筋細胞枯死에 미치는 四物湯의 防禦效果. 대한한의학회지 22(4):58-68, 2001.
8. 조권일. 배양심근세포의 산화적 손상에 대한 四物湯의 방어효과. 동의생리병리학회지 18(5):1374-1381, 2002.
9. 광근신. 桃紅四物湯이 Endotoxin으로 유발된 血栓症에 미치는 영향. 동의병리학회지 5(1):67-76, 1990.
10. 전병훈, 정우열. 實驗의 血栓症에 미치는 韓藥材의 抗血栓效果에 관한 연구. 대한동의병리학회지 10(1):72-78, 1996.

11. 조한진, 김성훈. 桃紅四物湯加減方의 抗癌 및 抗轉移 효과에 관한 연구. 대한동의병리학회지 13(1):76-90, 1999.
12. 유봉선. 산화적 손상에 의해 유발된 심근세포 독성에 대한 桃紅四物湯의 방어효과. 동의생리병리학회지 18(5):1374-1381, 2004.
13. 박세욱. 桃紅四物湯이 急性 腦硬塞 患者의 末梢血液單核細胞에서 細胞活性物質 生成에 미치는 영향. 원광대학교 대학원, 2004.
14. Nixon, R.A., Cataldo, A.M., Mathews, P.M. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. Neurochem Res. 25(9-10): 1161-1172, 2000.
15. Stefanis, L., Larsen, K.E., Rideout, H.J., Sulzer, D., Greene, L.A. Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. J Neurosci. 21(24):9549-9560, 2001.
16. Sugawara, T., Fujimura, M., Noshita, N., Kim, G.W., Saito, A., Hayashi, T., Narasimhan, P., Maier, C.M., Chan, P.H. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. Neuro Rx. 1(1):17-25, 2004.
17. Adhami, F., Liao, G., Morozov, Y.M., Schloemer, A., Schmithorst, V.J., Lorenz, J.N., Dunn, R.S., Vorhees, C.V., Wills-Karp, M., Degen, J.L., Davis, R.J., Mizushima, N., Rakic, P., Dardzinski, B.J., Holland, S.K., Sharp, F.R., Kuan, C.Y. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. Am J Pathol. 169(2):533-583, 2006.
18. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울, 醫聖堂, pp 711-712, 2002.
19. 한종현, 김기영. 한방약리학. 서울, 醫聖堂, p 169, 364, 375, 377, 479, 493, 2004.
20. 전용철. 當歸가 MCAO 모델에 흰쥐에서 gliosis 억제에 미치는 영향. 원광대학교대학원, 2008.
21. 이재원, 신진봉, 문구, 이종덕, 원진희. 桃仁이 중추신경 재생 촉진에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 21(1):145-152, 2007.
22. Li, D.Q., Li, Y., Liu, Y., Bao, Y.M., Hu, B., An, L.J. Catalpol prevents the loss of CA1 hippocampal neurons and reduces working errors in gebils after ischemia-reperfusion injury. Toxicol. 46(8):845, 2005.
23. 유제원. Paeoniae radix decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death and increases cell proliferation in the dentate gyrus of streptozotocin-induced hyperglycemic Rats. 경희대학교대학원, 2004.
24. 김경선. 川芎의 口腔投與 및 藥鍼施術이 흰쥐 MCAO로 유발된 局所腦虛血에 對한 콜린성 神經保護效果研究. 동신대학교대학원, 2004.
25. DiPaola, R.S., Dvorzhinski, D., Thalasila, A., Garikapaty, V.,

- Doram, D., May, M., Bray, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Karp, C., Stein, M., Foran, D.J., White, E. Therapeutic starvation and autophagy in prostate cancer: a new paradigm for targeting metabolism in cancer therapy. *Prostate* Dec. 1; 68(16):1743-1752, 2008.
26. Reunanen, H., Nykänen, P. A cytochemical study on the effects of energy deprivation on autophagocytosis in Ehrlich ascites tumor cells. *Histochemistry*. 90(3):177-184, 1988.
27. 김도환. Nitric Oxide에 의해 유발된 C6 glial 細胞毒性에 대한 四物湯의 防禦效果. 서울, 대한한방내과학회지 21(4): 535-542, 2000.
28. 나영훈. 炙甘草湯이 LPS와 PMA에 의해 손상된 C6 glial 세포에 미치는 영향. 서울, 대한한방내과학회지 21(3):467-476, 2000.
29. 김요한. 攝生飲이 C6 glial 세포의 NO생성에 미치는 영향. 대한한의학회지 21(4):84-92, 2000.
30. 이지현. Protective effects of Daebojungtang on zinc-induced apoptosis in C6 glial cells. 원광대학교 한의학전문대학원, 2000.
31. 이영구, 문병순. 右歸飲이 Zinc에 의한 신경교세포의 고사에 미치는 영향. 대한한의학회지 22(3):63-73, 2001.
32. Levine, B., Klionsky, D.J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 6(4):463-477, 2004.
33. Meijer, A.J., Codogno, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 36(12):2445-2462, 2004.
34. Zhang, Y., Wu, Y., Cheng, Y., Zhao, Z., Tashiro, S., Onodera, S., Ikejima, T. Fas-mediated autophagy requires JNK activation in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 377(4):1205-1210, 2008.