대한한방내과학회지 제31권 4호(2010년 12월)
Korean J. Orient.Int. Med. 2010:31(4)693-705

大七氣湯이 Glutamate에 의한 C6 Glial 세포의 Apoptosis에 미치는 영향

김혜윤*, 고석재*, 방창호*, 신선호*, 이동엽**, 이 인***
*원광대학교 심계내과학교실, **원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과, ***부산대학교한의학전문대학원

Effects of *Daechilgi-tang* on Glutamate-induced Apoptosis in C6 Glial Cells

Hye-yoon Kim*, Seok-jae Ko*, Chang-ho Bang*, Sun-ho Shin*, John Dong-yeop Lee**, In Lee***
*Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Won-Kwang University
**Dept. of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Won-Kwang University
***Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Pu-San National University

ABSTRACT

Objectives : The water extract of *Daechilgi-tang*(DCGT) has traditionally been used for treatment of *qi* stagnation(氣滯), which is considered to be one of the important causes of neuronal disease in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which DCGT protects neuronal cells from brain cell damages.

Methods and Results : The author tested the mechanism of the cytoprotective effect of DCGT on glutamate-stimulated rat C6 glial cells. DCGT significantly protected C6 glial cells from glutamate in MTT assay. Pre-treatment of C6 glial cells with DCGT markedly inhibited the DNA fragmentation of C6 cells induced by glutamate. Glutamate increased the generation of reactive oxygen species(ROS) and intracellular calcium level in C6 glial cells. However, pre-treatment with DCGT markedly suppressed the increase of ROS generation and intracellular calcium accumulation induced by glutamate. Among apoptosis signaling mediators, DCGT markedly increased the expression level of Bcl2 in glutamate-treated cells. It also inhibited the cleavage of caspase-3 and PARP proteins by glutamate in C6 glial cells.

Conclusions : These results suggest that DCGT protects brain cells from glutamate cytotoxicity through inhibition of ROS generation and activation of apoptosis signaling pathway as well as induction of the anti-oxidant system.

Key words : *Daechilgi-tang*(DCGT), Apoptosis, Glutamate, C6 Glial Cell

Ⅰ. 서 론

大七氣湯은 明代 李梴[1]의 《醫學入門》에 처음 인용된 처방으로 "一切氣積 自舒伸"이라 하였고, 《方藥合編》에서는 "治五積六聚 心腹疼痛 二便不利"라 하여 積聚가 위로 이동하면서 일정하게 발생하는 心腹脹痛, 上氣窒塞, 少腹脹滿, 大小便不利 등의 증상 및 氣滯로 기인한 五積六聚를 치료하는데 사용되어 왔다[2].

氣滯는 氣機가 울체되어 運行이 不暢한 병리상태로 七情內鬱, 濕痰, 食積, 瘀血 등이 氣의 소통운행에 영향을 미쳐 臟腑經絡의 기능장애를 일으키게 되며, 氣滯로 인해 氣機失調가 되면 血行에 영향을 미쳐 血液瘀滯하게 되고 이는 中風 발병의 원인이 된다[3]. 그러므로 氣滯를 소통시켜 氣血運行

· 교신저자: 이 인 경상남도 양산시 물금읍 범어리
부산대학교 한의학전문대학원
TEL: 055-360-5840 FAX: 055-360-5555
E-mail: leein21@hanmail.net

을 원활하게 해주는 大七氣湯은 中風의 예방과 치료에도 응용 가능할 것이다.

한편 허혈성 뇌질환에서 중추신경세포손상에 기여하는 물질은 여러 가지가 있으나 그 중 대표적인 것은 아미노산계의 흥분성 신경전달물질인 glutamate이다. 즉 신경세포가 허혈성 손상을 받게 되면 신경말단에서 glutamate를 포함한 신경전달물질이 과다하게 유리되고 신경아교세포에 의한 재흡수가 감소하여 glutamate가 신경연접부위에 축적되어 독성을 유발하고, cytokine 증가, 활성산소종 생성 유도, 산화적 스트레스 등을 유도하여 신경세포의 손상을 초래하게 된다[4].

大七氣湯에 관한 실험적 연구로는 항암, 면역조절작용 및 apoptosis에 미치는 영향[5], 자궁근종 세포의 증식억제, MAP kinase 활성 및 cell apoptosis에 미치는 영향[6]에 대한 보고가 있으나, 大七氣湯이 신경세포 보호효과에 대한 연구는 보고된 바 없다.

이에 본 연구에서는 氣滯를 소통시키고 破氣祛瘀의 효능이 있는 大七氣湯의 신경세포 보호효과를 알아보기 위하여 백서 신경아교세포인 C6 glial 세포에 大七氣湯을 전처리한 후 glutamate로 유도된 신경세포 손상에 미치는 영향, 세포자멸사 현상에 관여하는 물질의 변화, 활성산소종 중 하나인 H_2O_2의 생성에 미치는 영향, 세포 내 칼슘 변화에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용된 大七氣湯의 처방은《方藥合編》[2]에 의거하여 사용하였다. 약재는 원광대학교 전주 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 한 첩의 내용과 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of *Daechilgi-tang*

韓藥名	生藥名(學名)	重量(g)
三 稜	Rhizoma Scirpi	4.0
蓬 朮	Rhizoma Zedoariae	4.0
靑 皮	Pericarpium Citri Nobilis Viride	4.0
陳 皮	Pericarpium Citri Nobilis	4.0
桔 梗	Radix Platycodi	4.0
藿 香	Herba Agastachis	4.0
益智仁	Fructus Alpiniae Oxyphyllae	4.0
香附子	Rhizoma Cyperi	4.0
肉 桂	Cortex Cinnamomi	4.0
甘 草	Radix Glycyrrhizae	4.0
生 薑	Rhizoma Zingiberis	4.0
大 棗	Jujubae Fructus	4.0
Total amount		48.0

2) 세포주

백서 C6 glial 세포주는 ATCC(American Type Cell Culture)로부터 구입하여 계대배양하면서 실험을 실시하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 DMEM, 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA) 제품을, 배양용기(24 well plate와 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl, tetra zolium bromide(MTT), diamidino-2-phenylindone(DAPI), bicinchoninic acid(BCA), dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)에서 구입하였다. Procaspase-3 protease, PARP 및 β-actin 등의 antibodies는 Santa Cruz사(San Joes, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 방 법

1) 시료의 제조

실험에 사용된 藥材는 물을 용매로 사용한 추출방법을 이용하여 본 실험에 사용하였다. 물 추출물은 大七氣湯 4첩(192.0g)에 증류수 2 ℓ를 가하여

냉각기를 부착한 환저플라스크에서 2시간 끓인 다음 거즈로 여과하였고, 3200 rpm으로 20분 동안 원심분리 후 감압농축기로 농축한 다음 -70 ℃에서 12시간 이상 동결시키고, freeze dryer로 동결 건조하여 21.3 g의 시료를 얻었다. 진공 건조된 大七氣湯 시료를 세포배양용 DMSO에 용해하여 50 ㎎/㎖의 저장용액을 조제하여 사용하였다.

2) 세포배양

백서의 C6 glial 세포주는 ATCC(American Type Cell Culture)에서 구입하였으며, 5% CO_2/95% air 배양기에서 불활성된 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 배양하여 실험 목적에 맞게 사용하였다.

3) 세포생존율 측정

Glutamate에 의한 C6 glial 세포의 세포독성과 大七氣湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT분석방법을 이용하여 실험하였다. 즉, 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10^5 cells/㎖)를 1 ㎖씩 분주하여 12 시간 이상 CO_2 세포배양기 안에서 안정시킨 후 다양한 농도(0~30mM)의 glutamate를 24시간 처리한 후, 각각의 배양세포에 배양액의 1/10로 MTT용액(5 ㎎/㎖ in PBS)을 첨가하였다. 4 시간 후 배양액을 제거하고 1 ㎖ DMSO를 첨가하여 세포를 용해시킨 다음, 분광광도계(THERMO max, USA)를 이용하여 540 ㎚ 파장에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 다양한 농도(0~800㎍/㎖)의 大七氣湯을 1시간 전처리한 후 20 mM의 glutamate를 처리하여 24시간 배양한 다음, 위와 같이 MTT 분석방법을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 세포생존율은 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) 유세포분석기(Flow cytometry)를 이용한 세포주기 분석

Glutamate에 의한 C6 glial 세포의 사멸과 大七氣湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 사멸에서 세포주기 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 유세포분석기를 이용하여 실험하였다. 즉, C6 glial 세포에 20mM 농도의 glutamate를 처리한 후 세포주기를 조사하기 위하여 propidium iodide(PI)로 DNA를 염색한 후 유세포분석기(flow cytometry, FACSCalibur, BD Biosciences)를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. 세포에 시약을 처리하여 시간별로 포집하여 PBS로 2회 세척하였다. 세척한 세포(1×10^6)의 DNA는 PI 용액(0.1% Triton X-100, 20 ㎍/㎖ PI, 200 ㎍/㎖ RNase) 600 ㎕로 20분 동안 반응시켰다. 또한, 100 ㎍/㎖ 농도의 大七氣湯을 C6 glial 세포에 1시간 전처리한 후 20 mM glutamate를 24시간 처리한 후, 위와 같이 유세포분석기를 이용하여 세포주기를 분석하였다. 유세포분석에서 얻은 정보의 분석은 CellQuest software (Becton Dickinson)를 이용하였다.

5) DAPI 염색

Glutamate에 의한 C6 glial 세포의 사멸이 세포자멸사 기전에 의하여 매개됨을 확인하고자 세포자멸사 현상의 형태학적 특징을 관찰하기 위하여 핵산에 DAPI 염색을 수행하였다. 세포는 4% formaldehyde 용액에 고정한 후 PBS로 세척하고, 10 ㎛M DAPI로 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS60, Germany)으로 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

6) Crystal violet 염색

大七氣湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 독성에 대한 보호효과에서 caspase-3 protease의 활성화와 관계가 있는지를 western blot 분석법을 통해 조사하였다. C6 glial 세포에서 大七氣湯을 1 시간 전처리한 후 20 mM 농도의 glutamate를 24시간 처리하여 각각의 세포를 포집, 파쇄한 후 세포 부유액으로부터 procaspase-3 protease와 PARP 단백질의 발현 변화를 관찰하였다. 세포는 4% formaldehyde 용액에 고정한 후 PBS로 세척하고, 10 ㎍/㎖ crystal violet으로 3분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 광학현미경(Olympus, Japan)으로 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

7) 세포 내 H_2O_2 생성의 측정

Glutamate에 의한 C6 glial 세포의 자멸사에서 大七氣湯의 보호효과에 대한 기전 연구를 위해 세포 내 활성산소종의 생성을 형광염색을 통해 조사하였다. 세포 내 활성산소종의 생성을 측정하기 위하여 형광 probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma사)를 이용하여 H_2O_2의 생성을 측정하였다. 비형광물질인 DCF-DA는 세포 내 hydrogen peroxide와 관련된 peroxides 존재 시 형광의 DCF로 변환되어 녹색의 형광을 발한다. 세포에 大七氣湯, glutamate, N-acetyl cystein(NAC)을 처리한 후 세포를 수확하기 전에 5 ㎛ DCF-DA를 처리하여 37℃에서 30분 동안 배양하였다. 배양한 세포는 PBS(pH 7.4)로 세척하고 1% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하고, 다시 PBS로 세척하여 유세포분석기로 형광을 측정하고, CellQuest software를 이용하여 분석하였다.

8) 세포 내 칼슘 측정

세포 내에 축적되는 칼슘의 양을 측정하기 위하여 Fluo-3AM으로 염색하여 형광현미경 분석을 수행하였다. 100 ㎍/㎖ 농도의 大七氣湯을 C6 glial 세포에 1시간 전처리한 후 20 mM glutamate를 24시간 처리하고, 세포를 수확하기 전에 5 ㎛ Fluo-3AM을 처리하여 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 배양한 세포는 PBS(pH 7.4)로 세척하여 1% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하고, 다시 PBS로 세척하여 유세포분석기로 형광을 측정하고 CellQuest software를 이용하여 분석하였다.

9) Western blot 분석

단백질 발현 변화를 관찰하기 위하여 100 ㎍/㎖의 大七氣湯을 1시간 동안 전처리한 후 20 mM 농도의 glutamate를 C6 glial 세포에 24시간 처리한 세포를 냉 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 ㎍/㎖ aprotinin)과 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 동량의 세포 파쇄액(200 ㎍)과 2× sample buffer를 혼합하여 100℃에서 3분간 가열하여 단백질의 변성을 유도한 후 12.5% 및 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 electrotransfer system (Ellard Inc, Seattle, WA, USA)을 이용하여 (0.8 ㎃/㎝) nitrocellulose membrane으로 이동시키고, blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. Procaspase-3 protease, PARP 및 β-actin에 대한 항체는 0.05%(v/v)의 tween-20이 함유된 tris-buffered saline(TBS-T)에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 동안 반응시켰으며, 각 항체에 대한 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse radish peroxidase (HRP)와 anti-mouse IgG conjugated HRP는 TBS-T로 희석(1:3,000)하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, enhanced chemilluminescence kit(ECL kit, Amersham, England)을 이용하여 현상하였다.

10) 통계처리

모든 실험결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이고 통계처리는 Student's t-test에 준하여 처리하였으며, p-value가 최대치 0.05 미만의 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. Glutamate가 C6 glial 세포의 생존율에 미치는 영향

C6 glial 세포에서 glutamate 처리 시, 10 mM 농도에서 세포생존율은 80%, 15 mM의 농도에서 63%, 20 mM 농도에서 48%, 25 mM 농도에서 29% 그리고 30 mM 농도에서 28%로 농도 의존적인 세포생존율의 감소를 나타내었다(Fig. 1).

2. 大七氣湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 사멸에 미치는 영향

C6 glial 세포에 20 mM 농도의 glutamate 처리 시 50%의 세포생존율을 보였으나 25 ㎍/㎖ 농도의 大七氣湯을 전처리하였을 경우 65%의 세포생존율

을 나타내었으며, 50 ㎍/㎖ 농도의 大七氣湯 전처리 시 76%, 100 ㎍/㎖ 농도의 大七氣湯 전처리 시 99%의 세포생존율을 보여 농도 의존적인 보호효과를 나타내었다. 특히 100 ㎍/㎖ 농도 이상의 大七氣湯 처리 시 대조군 수준의 세포생존율을 보여 glutamate에 의한 세포사멸을 현저하게 보호하였다(Fig. 2).

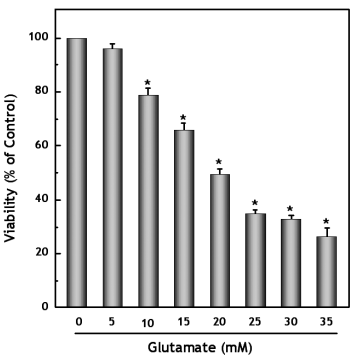

Fig. 1. Glutamate-induced C6 glial cell death in a dose dependent manner.

C6 glial cells were incubated for 24 hrs with glutamate at the indicated concentrations. The cell viability was assessed by MTT assay. Data represents the mean ± S.E.M. of three individual experiments. * $p<0.05$

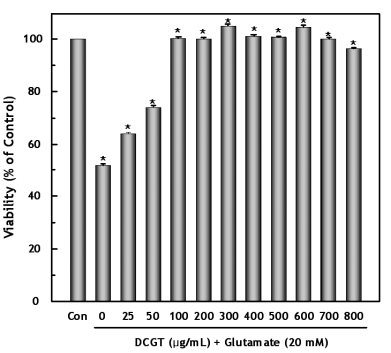

Fig. 2. Protective effect of DCGT on glutamate-induced C6 glial cell death.

DCGT was treated 1 hr before treating glutamate and incubated for 24 hrs. The cell viability was assessed by MTT assay. Data represents the mean ± S.E.M. of three individual experiments. * $p<0.05$

3. Glutamate에 의한 C6 glial 세포의 사멸에서 Sub-G0 분획의 변화

정상 세포핵의 DNA는 G1, S 및 G2/M기로 나타내어지며 세포자멸사 유도 시 분절된 DNA가 Sub-G0 분획으로 증가된다. 대조군에서는 전형적인 DNA의 분포를 보이는 그래프의 형태를 나타내었으나 20 mM 농도의 glutamate를 처리한 실험군에서는 대조군과 달리 Sub-G0 분획이 증가되었다(Fig. 3).

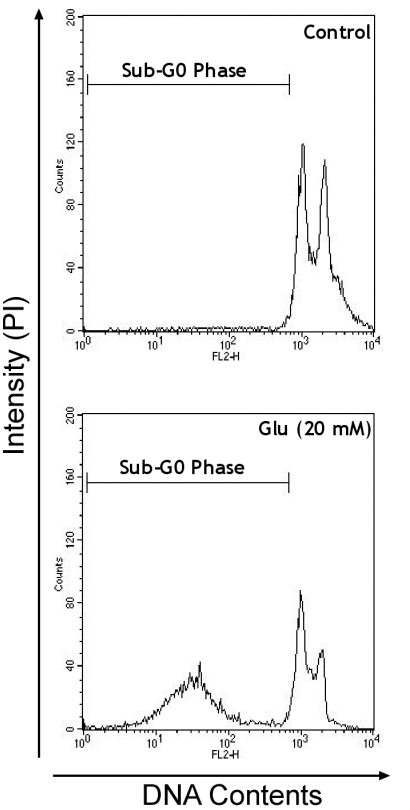

Fig. 3. DNA fragmentation analysis for glutamate-induced apoptosis of C6 glial cells.

C6 glial cells were treated for 24 hrs with or without 20 mM of glutamate. Also DNA contents were assessed by PI staining and FACS analysis. The results showed that cells with DNA content below sub-G0 phase, which is defined as a sub-G0 peak, were regarded as a apoptotic cells.

4. 大七氣湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 사멸에서 세포주기 변화에 미치는 영향

대조군에서는 전형적인 세포 주기 단계를 거치며 증식하는 것을 알 수 있었으며, glutamate 혹은 大七氣湯에 의해 특정 세포 주기에 고정되거나 축적되는 현상은 나타나지 않았다. Glutamate 처리 시 Sub-G0의 분획이 증가되었으나 100 ㎍/㎖ 농도의 大七氣湯 전처리에 의해 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 4).

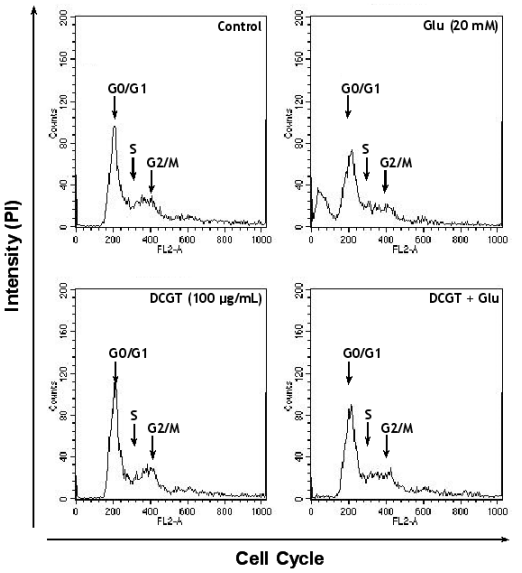

Fig. 4. Cell cycle analysis by glutamate and DCGT on C6 glial cells.

C6 glial cells were pre-treated with 100 ㎍/㎖ of DCGT and 20 mM of glutamate was stimulated for 24 hrs. Cell cycle analysis was assessed by PI staining and FACS analysis. The results showed pre-treatment with 100 ㎍/㎖ of DCGT inhibited the glutamate-induced apoptotic peak.

5. 大七氣湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 자멸사에서 형태학적 변화에 미치는 영향

DAPI는 DNA에 특이적으로 결합하는 형광염료이며 푸른색 형광을 나타낸다. 대조군에서 C6 glial 세포의 핵은 둥글고 뚜렷한 형태의 일정한 모양을 유지하였으나 20 mM 농도의 glutamate를 24 시간 처리 시 불규칙적인 핵 모양을 나타내었고, 핵이 응축되며 nuclear body fragment(apoptotic body)의 수가 증가하였다. 그러나 大七氣湯을 전처리한 실험군에서는 대조군과 유사한 세포핵의 형태를 나타내었다(Fig. 5).

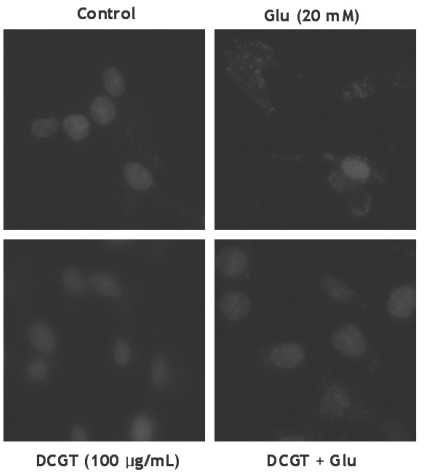

Fig. 5. DCGT protected C6 glial cells from glutamate-induced nuclear condensation.

C6 glial cells were pre-incubated with DCGT for 1 hr and stimulated with 20 mM of glutamate for 24 hrs. After staining with DAPI, cells were observed under fluorescent microscope.

6. 大七氣湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 자멸사에서 caspase-3 protease 및 PARP 단백질에 미치는 영향

세포자멸사의 특징적인 현상을 초래하는 세포 내 신호전달 기전에서 caspase의 중요성은 이미 잘 알려져 있다. Glutamate를 C6 glial 세포에 처리한 결과 procaspase-3 protease는 감소하였다. 그러나 大七氣湯을 전처리한 실험군에서 procaspase-3 protease는 대조군 수준으로 발현이 증가되었으며 大七氣湯 단독처리군에서 procaspase-3 protease의 분해는 관찰되지 않았다. PARP 단백질은 핵 내에 존재하는 caspase-3의 작용으로 분절되어 활성화한다. C6 glial 세포에 大七氣湯을 전처리한 후 20 mM의 glutamate를 24 시간 처리하여 PARP 단백

질 발현을 western blot 방법으로 조사한 결과 glutamate에 의해 분절된 PARP 단백질이 大七氣湯 전처리에 의해서는 분절이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이때 단백질양은 β-actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다(Fig. 6).

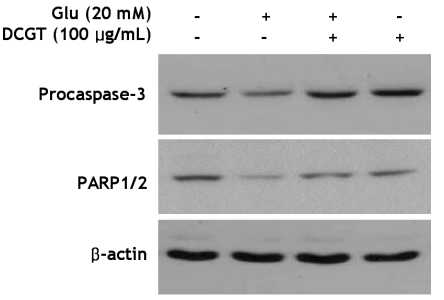

Fig. 6. Procaspase-3 and PARP expressions by glutamate and/or DCGT in C6 glial cells.

C6 glial cells were incubated with glutamate and/or DCGT for 24 hrs. After washing with PBS, cells were lysed and analysed by western blot methods. Pretreatment of cells with DCGT inhibited the cleavage of caspase-3 and PARP proteins by glutamate in C6 glial cells.

7. 大七氣湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 자멸사에서 세포 내 H_2O_2의 생성에 미치는 영향

C6 glial 세포에 20 mM 농도의 glutamate를 24시간 처리 시 그래프가 오른쪽으로 이동하여 형광이 증가하였으므로 세포 내 H_2O_2의 생성이 증가되었음을 알 수 있었다. 그러나 大七氣湯을 1시간 전처리하고 glutamate를 처리하였을 경우 다시 왼쪽으로 이동하여 세포 내 H_2O_2의 양이 감소하였다. 이때 大七氣湯 단독처리군은 대조군과 동일한 형광세기를 나타내었다(Fig. 7A, B). 이상의 결과를 정량화하여 대조군에 비해 증가된 H_2O_2의 양을 히스토그램으로 표현하였다. 특히 대표적 항산화제인 N-acetyl cystein(NAC)를 전처리한 후 glutamate를 24시간 처리하여 H_2O_2 양을 측정한 결과와 비교하였을 때 유의하게 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 7C).

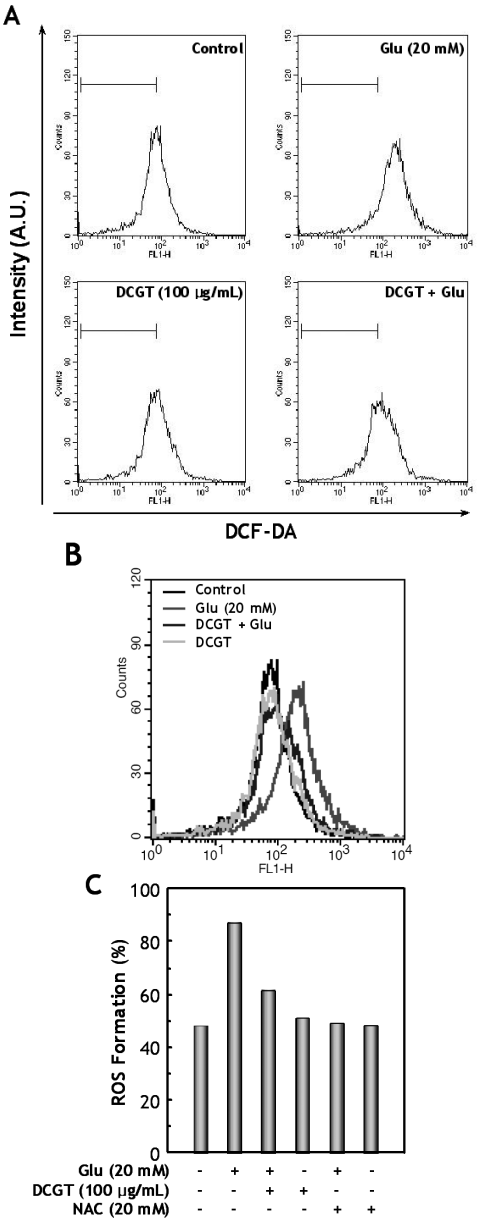

Fig. 7. Glutamate-induced H_2O_2 formation and effect of DCGT on C6 glial cells.

DCGT and/or glutamate were treated on C6 glial cells for 24 hrs. After DCF-DA staining, cells were analysed using FACS.(A,B) Pretreatment of cells with DCGT reduced H_2O_2 by glutamate in C6 glial cells. (C) Effects of DCGT and NAC on the ROS formation ratio of C6 cells subject to glutamate exposure.

8. 大七氣湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 자멸사에서 세포 내 칼슘의 축적에 미치는 영향

세포 내 축적된 칼슘은 Fluo-3AM과 결합하여 적색 형광을 나타낸다. Fig. 8에서와 같이 glutamate 처리 시 C6 glial 세포는 세포질 내에 적색 형광이 증가하여 칼슘이 축적됨을 알 수 있었다. 그러나 大七氣湯 처리 시 적색 형광이 관찰되지 않았으며, 大七氣湯 단독처리 시에도 세포 내 칼슘의 축적에는 영향을 미치지 않았다.

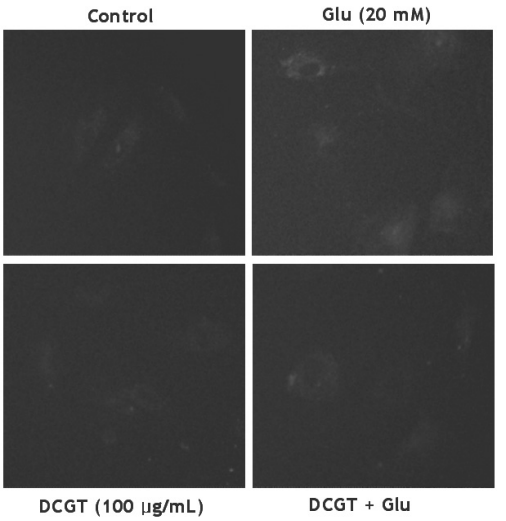

Fig. 8. Increase of intracellular calcium level by glutamate and effect of DCGT on C6 glial cells.

C6 glial cells were treated with DCGT and/or glutamate for 24 hrs. After phosphate-buffered saline washing, cells were stained with Fluo-3AM and observed under fluorescent microscope. Pretreatment of cells with DCGT reduced calcium level.

9. 大七氣湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 자멸사에서 Bcl2 단백질의 발현 변화에 미치는 영향

세포자멸사 신호전달계의 중요 신호전달 분자인 Bcl2의 발현을 단백질 수준에서 관찰하였다. 그 결과 glutamate 처리 시 세포사멸 억제 단백질인 Bcl2 단백질의 발현이 감소하였으나 大七氣湯 전처리 시 대조군과 비슷한 발현 양상을 보였다(Fig. 9). 이때 단백질양은 β-actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다.

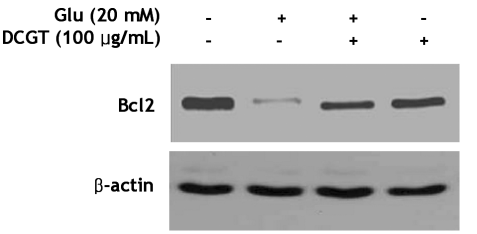

Fig. 9. Bcl2 protein expression by glutamate and/or DCGT in C6 glial cells.

C6 glial cells were incubated with glutamate and/or DCGT for 24 hrs. After washing with PBS, cells were lysed and analysed by western blot methods. Pretreatment with DCGT inhibited the Bcl2 expression by glutamate in C6 glial cells.

Ⅳ. 고 찰

인구의 노령화와 더불어 노인성 치매, 허혈성 뇌질환 같은 퇴행성 신경계 질환들이 증가하고 있으며 그 중요성 역시 크게 인식되고 있다[7]. 그 중 허혈성 뇌질환이 많은 비중을 차지하고 있는데 허혈성 뇌질환은 의식장애, 운동마비 등을 동반하고 신체적, 정신적 장애가 삶의 전반적 부분에 큰 영향을 미치게 되므로 적극적인 예방과 치료가 요구된다[8].

허혈성 뇌질환은 한의학적으로 中風의 범주에 속한다. 中風은 뇌혈관의 순환장애로 인해 국소적인 신경학적 결손을 나타내어 人事不省, 手足癱瘓, 言語蹇澁, 口眼喎斜, 手足麻木 등의 임상증상을 특징으로 하는 병증이라고 정의된다. 中風은 《內經》에 仆擊, 偏枯, 偏風 등으로 기재 된 이래 風, 火, 濕痰, 虛, 瘀血 등이 주요 원인으로 제시되었다. 唐宋代 이전에는 "外風"으로 인식하였으나, 金元時代 이후부터는 火, 氣, 濕痰, 瘀血 등의 內因을 원인으

로 제시하였다[9]. 氣滯란 氣機가 鬱滯되어 運行이 不暢한 병리상태로 氣滯의 병리반응은 여러 방면에서 나타나게 된다. 氣滯가 일부분에서 일어나면 經脈之氣가 阻滯不行하고 血運이 不暢하게 되고 심하면 氣滯則血瘀가 되어 血流澁滯하고 瘀血이 발생하게 된다. 또한 氣機鬱滯不暢하면 水液代謝에 장애가 생겨 정상적인 運化輸布가 이루어지지 못해 水濕內聚하여 痰飮이나 水腫病症을 발생시킨다[3]. 이상을 종합하면 氣滯는 中風의 주요한 원인이 되는 瘀血과 濕痰의 발생기전이라는 것을 알 수 있다. 그러므로 氣滯를 소통시켜 氣機失調를 조절하는 효능을 지니는 한약제제들이 中風의 발병에 예방적 작용이 있을 것으로 생각할 수 있다.

大七氣湯은 心腹腸痛, 上氣窒塞, 少腹脹滿, 大小便不利 등의 증상 및 氣滯로 기인한 癥瘕를 치료하는데 활용되는 처방으로 三稜, 蓬朮, 香附子, 靑皮, 陳皮, 桔梗, 藿香, 益智仁, 肉桂, 甘草, 生薑, 大棗로 구성되어 있다[1,2]. 方劑 중 香附子는 理氣解鬱하고, 靑皮는 疏肝破氣 · 散積化滯하고, 陳皮는 理氣化痰하며, 三稜과 蓬朮은 破血祛瘀 · 消積止痛한다. 桔梗은 理氣疏通하며, 益智仁은 溫脾暖腎하고 藿香은 化濕辟濁, 肉桂는 溫照引氣하고, 甘草는 補中益氣하는 작용이 있다. 따라서 大七氣湯은 行氣導滯, 開鬱破結, 理氣化痰하는 效能이 있다[10].

大七氣湯의 구성 약물 중 뇌혈류 및 신경세포에 대한 실험적 연구로는 香附子가 치매병태 모델에 미치는 영향[11], 靑皮가 뇌혈류 역학에 미치는 실험적 연구[12], 뇌신경아교세포에서 생강이 미치는 영향에 대한 연구[13,14], 배양섬유모세포에서 산소유리기의 세포독성에 대한 陳皮의 항산화효과에 관한 연구[15] 등이 보고되었다.

허혈성 뇌질환이나 뇌의 퇴행성 질환에 대한 기전으로 신경흥분 독성이 주요한 기전 중 하나로 알려져 있는데, glutamate 등 흥분성 아미노산이 과다 분비되면 수용체들이 과도한 자극을 받게 되어 신경세포사멸이 일어난다. 뇌허혈 시 흥분성 아미노산들이 다량 분비되고 astrocyte에 있는 glutamate transporter의 작용이 억제되거나 역작용이 일어나게 되어 허혈 수분 내에 glutamate의 농도가 급격히 증가되고 증가된 glutamate는 세포 내 흥분성 아미노산 수용체를 활성화하여 세포 내로의 칼슘의 유입을 증가시켜 뇌세포 손상을 유도한다[16,17].

최근 허혈성 뇌질환, 퇴행성 신경계질환에 대한 관심이 커지면서 신경세포 손상에 대한 한약재의 연구가 활발히 진행되고 있는데 그 중에서도 glutamate에 의한 신경세포 손상에 대한 한약재의 보호효과에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 안[18] 등은 加味鷄血藤湯이 glutamate receptor와 free radical 및 뇌손상 보호에 미치는 영향, 오[19] 등은 加味柴胡湯이 뇌허혈 시 glutamate receptor, free radical 및 뇌손상 보호에 미치는 영향, 강[20] 등은 歸脾湯이 glutamate에 의한 C6 glial cell의 apoptosis에 미치는 영향, 정[21] 등은 四物湯이 glutamate에 의한 해마세포의 손상에 미치는 영향, 정[22] 등은 疎風湯이 glutamate에 의한 C6 glial cell의 apoptosis에 미치는 영향에 대하여 보고하였다. 그러나 大七氣湯의 신경세포 보호효과에 대한 연구는 보고된 바 없다.

이에 저자는 行氣導滯, 開鬱破結, 理氣化痰하는 大七氣湯이 신경세포사멸에 대하여 일정한 보호효과를 나타낼 것으로 예상하여 본 연구를 수행하였다.

먼저 허혈성 손상모델을 만들기 위해 백서 C6 glial 세포에 glutamate로 세포사멸을 유도하고 배양하여 glutamate에 의한 세포손상 모델을 만들었다. 여기에 大七氣湯을 전처리하여 세포생존율에 미치는 영향, 세포자멸사 현상에 관여하는 물질의 변화, H_2O_2의 생성에 미치는 영향, 세포 내 칼슘 변화에 미치는 영향 등을 관찰하였다.

세포자멸사는 특히 외부자극에 대해서 세포 내부에 이미 존재하는 일련의 프로그램에 의해 세포가 사멸하는 과정을 의미한다. 세포자멸사는 세포나 장기의 항상성 유지를 위해 중요한 기전으로서 1980년대 후반기부터 세포 생물학 영역에서 발전

되어 왔다. 특히 신경계와 면역계에서 세포의 생성, 분화 및 기능 등에 그 중요성이 밝혀졌으며[23], 세포자멸사 기전의 이상은 암 발생, 암치료에 대한 내성발현, 자가면역 질환의 발생, 퇴행성 질환 및 HIV에 의한 병리현상에도 중요하다.

본 연구에서 glutamate는 C6 glial 세포에서 농도 의존적인 세포생존율의 감소, Sub-G0 분획증가와 caspase-3의 분해를 초래하는 전형적인 세포자멸사를 유도하였다.

우선 glutamate가 C6 glial 세포에 나타내는 세포독성을 알아보기 위하여 glutamate를 농도별로 C6 glial 세포에 24시간 동안 처리한 후 MTT 분석방법을 통하여 세포생존율을 관찰한 결과 glutamate의 농도 의존적으로 C6 glial 세포의 사멸이 유도되었다(Fig. 1). 大七氣湯을 다양한 농도로 C6 glial 세포에 1시간 전처리한 후 20 mM 농도의 glutamate를 처리하여 24시간 동안 배양한 결과 大七氣湯은 농도 의존적으로 glutamate에 의한 세포생존율의 감소를 억제하였다(Fig. 2).

세포는 성장하고 분열하는 일련의 과정 동안 세포핵의 DNA가 합성되고 분열되는 세포주기를 거치게 되는데, 단계별로 G1, S 및 G2/M기로 구분된다. C6 glial 세포에서도 DNA 합성 및 세포분열 등의 과정을 거치면서 증식하게 되는데 DNA 합성을 위한 준비 기간으로서 G1기, DNA 합성 기간인 S기, 세포분열의 준비 기간인 G2기 그리고 세포분열 단계인 M기가 있다. M기와 G1기 사이에 G0기의 휴지기가 있어 대부분의 세포는 분열할 필요성이 있을 때까지 이 단계에 머물게 되며, 세포 내 자극에 의해 세포자멸사가 유도되는 경우 DNA의 분절이 발생하고 이러한 영역을 Sub-G0기라고 표현한다.

본 연구에서 세포주기에 대한 glutamate와 大七氣湯의 효과를 관찰하였다. 大七氣湯을 100 ㎍/㎖의 농도로 C6 glial 세포에 1시간 전처리하고 glutamate로 20 mM 농도로 24시간 처리한 후 세포의 DNA를 PI로 염색하고 유세포분석기로 분석하였다. C6 glial 세포는 전형적인 세포주기 단계를 거치며 증식하였으며, 20 mM 농도의 glutamate를 C6 glial 세포에 처리 시 Sub-G0 분획이 증가하는 전형적인 세포자멸사를 유도하였다(Fig. 3). Glutamate 혹은 大七氣湯 처리 시 특정한 세포주기에 고정이 되는 현상은 관찰할 수 없었으며, glutamate 처리 시 DNA 분절이 일어나고, Sub-G0의 분획이 증가하였으나 大七氣湯 전처리에 의해 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 4).

세포자멸사가 진행이 되면 여러 형태학적, 생화학적 변화가 수반되는데, 중요한 형태학적 변화의 하나가 세포핵의 응축과 DNA 절편에 따른 apoptotic body의 형성이다. 본 연구에서는 DAPI 염색으로 핵의 응축, 분절, apoptotic body를 확인하였고(Fig. 5), C6 glial 세포에서 glutamate에 의한 세포독성이 세포자멸사에 의한 것임을 확인하였다. 따라서 glutamate에 의한 세포자멸사가 caspase 활성 및 PARP의 활성과 관련이 있음을 확인하기 위하여 western blotting을 수행하였다.

Caspase-3 protease는 가장 하방에 존재하는 caspase-family 단백질이며 세포 내에 34 kDa procaspase-3의 형태에서 자극 시 17 및 10 kDa의 activecaspase-3로 분해된다. 또한 caspase-3의 세포 내 기질인 PARP 단백질의 분절을 초래한다. 본 연구 결과 glutamate 처리군에서는 procaspase-3 활성이 절단되어 감소된 반면 大七氣湯을 처리한 군에서는 이러한 현상이 현저하게 억제되었다. 또한 핵 분절 및 DNA ladder 형성에 관여하는 PARP의 활성은 glutamate 처리군에서 절단되어 감소된 반면 大七氣湯을 전처리한 군에서는 이러한 현상이 억제되어 大七氣湯이 세포자멸사 기전을 억제시키고 있음을 확인하였다(Fig. 6).

활성산소종은 호흡 과정에서 생성되며, 일부 활성산소종의 경우 특정한 생체 내 기능에 필요하지만, 과도한 생성은 독성물질로 작용하여 뇌질환뿐만 아니라 다른 여러 질병의 발병에 기여하게 된다[24]. 이러한 활성산소종의 과도한 형성은 세포 자

극물질에 의하여 유도될 수 있는데, glutamate와 같은 신경전달물질이 신경세포 부근에 과도하게 유리되어 영향을 줄 때 다량으로 생성된다. 활성산소종을 확인하기 위한 probe로는 DCF-DA가 사용되고 있는데 glutamate에 의한 산화적 손상이 활성산소종의 생성에 기인하고 있음을 확인하기 위하여 활성산소종 중 하나인 H_2O_2에 특이적으로 반응하는 DCF-DA로 염색하고 유세포분석기를 이용하여 분석하였다. 그 결과 glutamate 처리군은 정상대조군에 비하여 약 2배의 H_2O_2가 생성됨을 확인하였고, 大七氣湯을 처리한 군에서는 정상대조군에서 생성되는 H_2O_2의 양보다 낮은 수준으로 유지하는 것으로 나타났다(Fig. 7). 이것은 glutamate에 의한 산화적 손상에 대하여 大七氣湯의 방어작용이 활성산소종의 생성 억제에도 기인하고 있음을 의미한다.

세포사멸에서 세포 내 칼슘의 역할에 대해서는 아직 여러 쟁점 중의 하나인데 지속적인 세포 내 칼슘의 유입은 신경세포사멸의 일반적 경로이며 중추신경계에서 과량의 glutamate는 세포 내 칼슘 농도의 증가를 유도하고 미토콘드리아와 소포체 같은 세포 내 민감성 소기관들에서 칼슘 농도를 높여 세포사멸과 매우 밀접한 관계를 가지고 있다[17]. 본 실험에서는 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 자멸사 과정에서 세포 내 칼슘 증가에도 大七氣湯이 영향을 줄 것이라고 예상하여 Fluo-3AM으로 염색하여 유세포분석기를 통하여 조사한 결과 glutamate에 의해 증가된 칼슘의 양이 大七氣湯에 의하여 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

발생이나 분화 과정에서 세포자멸사는 필수적인 과정이며 세포 내에서는 매우 다양한 신호전달 과정들이 직접 및 간접적으로 연관되어 복잡한 네트워크를 형성하게 된다[25]. Bcl2 family 단백질들은 proapoptotic 및 antiapoptotic 단백질이며, Bcl2 혹은 Bax 단백질 등의 균형이 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 방출에 관여하고 더 나아가 세포자멸사와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다[26].

Glutamate로 유도되는 세포사멸 분석에서 Bcl2, Bax, caspase-3 및 PARP 단백질의 변화 분석이 많이 시도되는데, 본 실험에서도 C6 glial 세포의 자멸사에서 glutamate에 의한 Bcl2 단백질 발현 변화를 관찰하였으며, 大七氣湯은 C6 glial 세포에서 glutamate에 의한 Bcl2 단백질의 발현 감소를 억제하였다(Fig. 9).

이상의 결과를 요약하면 大七氣湯은 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 세포독성으로부터 Sub-G0 분획 감소, caspase-3 단백질 분해 및 PARP 단백질의 분절 억제, H_2O_2의 생성 억제, 세포 내 칼슘 축적 억제에 관여하여 세포사멸에 대한 보호효과를 나타내었으며, Bcl2 단백질의 발현 조절에 기여하는 것으로 추정된다. 이 결과는 大七氣湯이 정확한 기전 연구를 통해 허혈성 뇌질환의 예방 및 치료제로 사용될 수 있다는 것을 시사하며, 앞으로 大七氣湯과 gluamate로 인한 세포사멸 기전 및 관련 단백질의 발현과 관련된 작용기전에 대한 보다 세밀한 연구가 계속되어야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 大七氣湯이 신경아교세포인 C6 glial 세포에서 glutamate에 의해 유도된 세포사멸에 미치는 보호효과 및 기전을 규명하기 위하여 세포생존율, Sub-G0 분획, caspase-3의 활성, PARP 단백질의 분절, H_2O_2의 생성, 세포 내 칼슘의 축적, Bcl2 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Glutamate는 농도 의존적으로 C6 glial 세포의 사멸을 유도하였다.
2. 大七氣湯은 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 사멸을 농도 의존적으로 억제하였다.
3. 大七氣湯은 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 Sub-G0 분획의 증가를 억제하였다.

4. 大七氣湯은 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 자멸사에서 procaspase-3의 분해와 PARP 단백질의 분절을 억제하였다.
5. 大七氣湯은 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 자멸사에서 Bcl2의 발현 감소를 억제하였다.

이상의 결과는 大七氣湯의 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 세포사멸에서 H_2O_2의 생성 억제, 세포내 칼슘 농도 조절, 세포자멸사 관련 단백질인 procaspase-3, PARP, Bcl2의 발현 조절을 통해서 세포 보호효과를 나타냈었다. 따라서 大七氣湯은 허혈성 뇌졸중 등의 예방 및 치료에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 李梴. 國譯編註醫學入門. 서울: 南山堂; 2001, p. 403.
2. 黃道淵. 方藥合編. 서울: 永林社; 2002, p. 278.
3. 전국한의과대학심계내과학교실. 심계내과학. 서울: 군자출판사; 2006, p. 331-6.
4. Peter L. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. Physiol. Review. 1999;70:1499.
5. 하지용, 정병억, 이선구, 윤병길. 大七氣湯이 抗癌, 免疫調節作用 및 apoptosis에 미치는 影響. 동의생리병리학회지. 2001;15(1):111-24.
6. 이승재. 大七氣湯이 자궁근종 세포의 증식억제, MAP kinase 활성 및 cell apoptosis에 미치는 影響. 경희대학교 박사학위논문. 2002.
7. Arce MP, Rodriguez-Franco MI, Gonzalez-Munoz GC, Perez C, Lopez B, Villarroya M, Lopez MG et al. Neuroprotective and Cholinergic Properties of Multifunctional Glutamic Acid Derivatives for the Treatment of Alzheimer's Disease. J. Med Chem. 2009;52(22):7249-57.
8. Straus SE, Majumdar SR, McAlister FA. New evidence for stroke prevention: scientific review. JAMA. 2002;288(11):1388-95.
9. 김세길. 風의 病理的 意味糾明과 中風의 原因 및 治療에 대한 東西醫學的 比較. 대한한의학회지. 1995;16(1):96-117.
10. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울: 醫聖堂; 1998, p. 118.
11. 윤상학, 정인철, 이상룡. 香附子가 치매병태 모델에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2004; 14(1):59-74.
12. 이금수, 정현우, 이원석. 靑皮가 腦血流力學에 미치는 실험적 연구. 동의생리병리학회지. 2002; 16(1):104-10.
13. 서운교, 정효원, 박용기. 생강 클로로포름 분획의 활성화된 腦神經膠細胞에서 염증반응 억제효과. 대한본초학회지. 2008;23(3):73-83.
14. 정환용, 주혜진, 정혜미, 신우진, 서운교. 腦神經小膠細胞에서 생강 헥산 분획물의 염증매개물질 生成 抑制效果. 대한한의학회지. 2009;30(2):17-29.
15. 오용열. 배양섬유모세포에서 산소유리기의 세포독성에 대한 진피의 항산화효과에 관한 연구. 대한본초학회지. 2006;21(4):143-8.
16. Landucci E, Boscia F, Gerace E, Scartabelli T, Cozzi A, Moroni F, Mannaioni G, Pellegrini-Giampietro DE. Involvement of endocannabinoid signaling in the neuroprotective effects of subtype 1 metabotropic glutamate receptor antagonists in models of cerebral ischemia. Int Rev Neurobiol. 2009;85:337-50.
17. 황인영, 신임철, 송연숙, 성민제, 박혜지, 박철범 등. Glutamate에 의한 세포 내 칼슘농도 변화와 세포독성과의 관계. Toxicological Research. 2002;18(4):355-62.
18. 안종석, 김동희, 김윤식, 이용구, 남궁욱, 설인찬. 加味鷄血藤湯이 Glutamate receptor와 Free radical 및 뇌손상 보호에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17(3):728-37.

19. 오병열, 김민창, 유병열, 최영, 설인찬 加味柴胡湯이 뇌허혈 시 Glutamate receptor, free radical 및 뇌손상 보호에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2004;25(3):32-44.
20. 강익현, 한상혁, 이인, 문병순. 歸脾湯이 Glutamate에 의한 C6 Glial Cell의 Apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2001;22(4):45-57.
21. 정대영, 최철원, 문병순. 四物湯이 Glutamate에 의한 해마세포의 손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2009;30(1):64-75.
22. 정승원, 최철원, 김봉상, 문병순. 疎風湯이 Glutamate에 의한 C6 Glial Cell의 Apoptosis에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2008;22(6):1423-30.
23. Solary E, Droin N, Bettaieb A, Corcos L, Dimanche-Boitrel MT, Garrido C. Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. Leukemia. 2000;14:1833-49.
24. Wilson JX, Gelb AW. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. J. Neurosurg Anesthesiol. 2002;14:66-79.
25. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407:770-6.
26. Deveraux QL, Schendel SL, Reed JC. Antiapoptotic proteins: the Bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. Cardiol Clin. 2001;19:57-74.