

Glutamate 로 유도된 C6 glial 세포의 독성에 대한 八物湯의 보호 효과

신용진 · 신선호*

원광대학교 한의과대학 심계내과학교실

Protective Effect of *Palmul-tang* on Glutamate Induced Cytotoxicity in C6 Glial cells

Yong Jeen Shin, Sun Ho Shin*

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

This study was designed to elucidate the mechanism of the cytoprotective effect of the *Palmul-tang* (PMT) on glutamate induced cytotoxicity in rat C6 glial cells. We determined the increase of cell viability by PMT on glutamate-induced death of C6 glial cell. On some experiments, glutamate induced cell death to be an apoptotic phenomena characterized by G1 arrest in cell cycle, chromatin condensation, DNA fragmentation in C6 glial cells. However, pre-treatment of PMT inhibited characteristic apoptotic phenomena. One of the main mediator of glutamate-induced cytotoxicity was known to generation of reactive oxygen species. In this study, PMT attenuated generation of reactive oxygen species by glutamate through down-regulation of NOX1 expression in C6 glial cells. Furthermore, PMT regulated Bcl2 families and caspase proteins, which contribute the cell survival or death. This study suggests that PMT may be candidate for both of therapeutic and protective prescription.

Key words : *Palmul-tang*, C6 glial cells, Glutamate, Cytotoxicity, Apoptosis

서 론

뇌졸중은 뇌혈관의 순환장애 또는 파열로 인한 국소적인 신경학적 결손을 나타내는 뇌혈관질환으로 노령 인구의 증가와 생활방식의 변화 등으로 인하여 발병률이 증가하고 있으며, 특히 허혈성 뇌졸중의 비중이 높아지는 추세이다¹⁾.

뇌졸중은 정도에 따라 차이는 있으나 급속한 발병과 의식장애, 운동마비를 동반하기 때문에 발병 후 신체적, 정신적 장애가 매우 커 적극적인 예방과 치료가 요구된다²⁻⁴⁾.

흥분성 아미노산은 대뇌 피질과 해마에서 주요한 흥분성 신경전달물질로 알려져 있고, 학습과 기억 등 중요한 기능적 역할을 하는 한편, 이러한 물질들의 장애로 인하여 신경계 질환이 유발될 수 있다⁵⁾.

Glutamate는 포유동물의 중추 신경계에서 작용하는 주요 흥

분성 신경전달물질로서, 이러한 물질에 의한 독성은 일반적으로 장시간 동안 노출되었을 때 신경세포의 손상과 사멸로 나타나며, 이때 세포 내로 과량의 이온들이 유입되는 것이 중요 인자 중의 하나로 알려져 있다. 특히 신경세포 내 칼슘의 유입 증가에 따른 활성산소종의 증가는 단백질과 막 그리고 핵산을 분해시키는 효소들의 활성화를 유도하므로 신경독성의 주요 인자로 생각되고 있으며^{6,7)}, 이러한 활성산소종의 증가에 따른 산화적 스트레스는 신경퇴행성 질환들의 병리에 주요한 역할을 하고 있기 때문에 산화적 스트레스와 신경세포 사멸사이의 관계에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다⁸⁾.

八物湯은 元代 沙圖穆蘇가 지은 《瑞竹堂經驗方》에 최초로 기록되어 있는 처방으로⁹⁾, 補氣의 효과가 있는 四君子湯, 補血의 효과가 있는 四物湯을 合方한 복합방이며, 氣血을 雙補할 목적으로 구성되어 있다^{10,11)}. 따라서 八物湯은 虛勞, 氣血兩虛 등으로 발생하는 만성질환에 陰陽을 조화롭게 하기 위한 처방으로 사용되어 왔으며¹¹⁻¹⁴⁾, 최근의 연구에서 유즙분비 촉진¹⁵⁾, 항 알레르기¹⁶⁾, 뇌혈류에 미치는 영향 및 기전^{17,18)}, 항피로¹⁹⁾, 항암 및 면역기능

* 교신저자 : 신선호, 전북 전주시 덕진구 덕진동, 원광대학교 전주한방병원
· E-mail : shshin@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-270-1013
· 접수 : 2012/03/23 · 수정 : 2012/07/16 · 채택 : 2012/08/06

에 미치는 효과^{20,22)}, 심근 세포고사에 미치는 효과²³⁾ 등이 규명되었다.

이에 저자는 八物湯의 신경세포 보호 효과 및 그 기전을 알아보기 위하여 glutamate로 유도된 백서 신경교세포인 C6 glial 세포 사멸에서 八物湯을 전처리하여 세포 생존율의 변화, 세포의 형태학적 변화, 활성산소종 생성의 변화 및 세포고사 (apoptosis) 관련 단백질 발현의 변화 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 八物湯의 처방 내용은 《方藥合編》²⁴⁾에 수록된 약재의 구성과 용량을 기준으로 하였다. 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였으며, 1 첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Palmul-tang*

Herbal name	Scientific name	Dosage(g)
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4.8
白朮	<i>Atractylodes Rizoma alba</i>	4.8
白茯苓	<i>Poria cocos</i>	4.8
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.8
熟地黄	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	4.8
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	4.8
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4.8
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4.8
Total amount		38.4 g

2. 방법

1) 시약 및 기기

세포 배양에 필요한 Dubellco's minimum essential medium (DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 GIBCOBRL사 (Grand Island, NY, USA) 제품을, 배양용기 (24 well plate와 10 cm dish)는 Falcon사 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), bicinchoninic acid (BCA), dimethyl sulfoxide (DMSO), glutamate는 Sigma사 (St. Louis, Missouri, USA)에서 구입하였다. 분광광도계 (ELISA reader)는 THERMO max (Thermo Fisher Scientific Inc., CA, USA)를 사용하였고, NOX1, Bcl2, BclxL, Bax, procaspase-3, procaspase-9 및 actin에 대한 항체는 Santa Cruz사 (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, Enhanced chemiluminescence kit (ECL kit)은 Amersham사 (Amersham, England)에서 구입하여 사용하였다.

2) 시료 제조

八物湯 5첩 (총 192 g)을 증류수 1,500 ml와 함께 3,000 ml 환저 플라스크에 넣은 다음, 2시간 가열하여 얻은 전탕액 723.4 ml를 여과지로 여과한 후 5,000 rpm으로 30분 원심분리하고, 감압농축기 (rotary vacuum evaporator)에 넣어 감압 농축한 후 동결건조기로 완전히 건조하여 시료 27.8 g을 얻었으며, 튜브에 100

mg/ml 농도로 증류수에 녹여서 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 원심분리한 시료의 상층액을 0.2 μm filter에 통과시켜 멸균한 후 냉장보관하고, 사용 시에는 세포 배양액인 DMEM에 희석하여 사용하였다.

3) 세포 배양

백서 신경교세포인 C6 glial 세포는 ATCC (American Type Cell Culture)에서 구입하여 세포 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 10% FBS가 포함된 DMEM (GIBCO BRL, NY, USA)으로 배양하였으며, 2-3일 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포를 이용하였다.

4) 세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT 분석방법을 이용하여 측정하였다. 세포 배양판(24-well plate)에 세포 (1×10⁵ cells/ml)를 1 ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포 배양기 안에서 안정시킨 후 시료를 각각의 조건에 따라 처리하였다. 각각의 배양세포에 배양액의 1/10로 MTT 용액 (5 mg/ml in PBS)을 첨가하였다. 4시간 후 배양액을 제거하고, 1 ml DMSO를 첨가하여 세포를 용해한 다음, 분광광도계 (THERMO max, USA)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

5) DAPI 염색

세포는 4% formaldehyde 용액에 고정한 후 인산완충용액 (phosphate-buffered saline: PBS)으로 세척하고, 10 μM 2-[4-Amidinophenyl]-6-indolecarbamidine dihydrochloride (DAPI)로 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경 (Leica MPS60, Germany)으로 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

6) 세포주기에 대한 분석

세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 propidium iodide (PI)로 DNA를 염색한 후 flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson, CA, USA)를 이용하여 형광을 측정하였다. 세포에 검액을 처리한 다음, 24시간 후에 포집하여 PBS로 2회 세척하였다. 세척된 세포는 PBS를 300 μl를 넣고, 세포의 DNA를 PI 용액 (0.1% Triton X-100, 20 μg/ml PI, 200 μg/ml RNase) 500 μl에 넣어 20분 동안 반응시킨 후 1×10⁴ 세포를 flow cytometry로 세포주기에 대한 측정을 하였다. 얻어진 정보는 Cell Quest software (Becton Dickinson, USA)를 이용하여 분석하였다.

7) 세포 내 활성산소종(ROS) 생성의 측정

세포 내 활성산소종 (Reactive Oxygen Species: ROS)의 생성을 측정하기 위하여 형광 probe인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. 비형광물질인 DCF-DA는 세포 내 과산화수소와 관련된 peroxides 존재 시 형광의 DCF로 변환되어 녹색의 형광을 발한다. 세포에 八物湯을 처리한 후 세포를 수확하기 전에 5 μM DCF-DA를 처리하여 37°C에서 30분 배양하였다. 배양한 세포는 PBS (pH 7.4)로 세척하여 1% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하였고, 다시 PBS로 세척하여 flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson, CA, USA)로 형광을 측정하고, Cell Quest software (Becton Dickinson, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

8) Western blot 분석

배양된 C6 glial 세포는 포집하여, 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액 (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin)과 4°C에서 30분 반응시켰다. 동량의 세포파쇄액 (200 μg)과 2 × sample buffer를 혼합하여 100°C에서 3분 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 nitrocellulose membrane으로 이동시키고, blocking buffer (5% skim milk)와 상온에서 2시간 반응시켰다. Bcl2, BclxL, Bax, procaspase-3, procaspase-9 및 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 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 각각 1시간 반응시킨 후 ECL kit (Amersham, England)을 이용하여 현상하였다.

9) DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA)을 이용하여 추출하였다. 먼저 조건에 따라 처리된 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 다음, RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고, isopropanol 침전에 의해 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., CA, USA)로 optical density (OD)값을 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5 μg 을 2.0% agarose gel에서 전기영동 (50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

10) 세포면역염색법

세포면역염색법 (Immunocytochemistry)을 통하여 세포 내 NOX1의 발현을 확인하였다. 세포를 4% paraformaldehyde로 실온에서 15분 동안 고정한 후 PBS로 세척하고, blocking solution (3% hydrogen peroxide)을 10분 동안 실온에서 반응시켰다. 세포 내 염색시약 투과성을 높이기 위하여 0.1% Triton X-100을 15분 동안 실온에서 반응시켰다. PBS로 3회 세척한 후 NOX1 항체를 PBS에 1:200으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시켰으며, 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated Alexa 588을 PBS로 희석 (1:1,000)하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 세포의 핵은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 DAPI를 사용하여 실온에서 10분 동안 염색하였다. 50% glycerol을 이용하여 조직을 mounting하였으며, 형광 현미경을 통하여 NOX1의 세포 내 발현 (red color)을 관찰하였다.

11) Total RNA의 분리

세포로부터 total RNA의 분리는 RNAzoITMB (Tel-Test, Friendswood, TX, USA)를 이용하여 수행하였다. 배양판에 붙어 있는 3~5×10⁶ 세포는 차가운 생리식염수로 1회 세척한 후 1 ml의 RNAzoITMB B로 용해시켰다. 이를 eppendorf tube에 옮긴 후 100 μl chloroform을 첨가하여 완전하게 혼합한 다음, 12,000 g, 4°C에서 20분 동안 원심분리 후 상층액은 새로운 튜브에 옮겼다. 위 상층액에 0.5 ml의 isopropanol을 첨가하여 혼합하고, 4°C에서 30분 동안 반응시킨 후 다시 12,000 g, 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 침전물은 80% 에탄올로 세척하였다. 세척한 RNA는 건조 후 DEPC를 처리하여 RNase 활성이 제거된 증류수 20 μl 로 용해시켰다. 이를 증류수로 200배 정도 희석하여 분광광도계로 260 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였고, 1 OD 당 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 계산하여 각 시료의 total RNA의 양을 정량하였다.

12) 역전사 중합효소 연쇄반응

역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)은 2 μg total RNA를 70°C에서 10분 동안 변성시킨 후 4°C에서 급냉하고, reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 역전사 반응에 의한 cDNA의 합성은 2 μg total RNA, 1 μl oligo d (T), 2 μl dNTP (10 mM), 2 μl Superscript II reverse transcriptase (5 U/ μl), 1 μl DTT (10 mM) 및 1 μl RNasin을 최종적으로 20 μl 완충용액 (50 mM Tris-Cl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂)과 혼합하여 42°C에서 60분 동안 반응시켰으며, 특정 유전자 증폭을 위한 중합효소 연쇄반응은 2 μl 역전사 반응액, 2 μl dNTP (2.5 mM), 2.5 μl sense 와 antisense primer (1.1 μM), Taq DNA polymerase (0.6 U)가 함유된 최종 30 μl 반응액 (20 mM Tris-Cl pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT)을 이용하였다.

13) 통계처리

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이며, 실험결과와 통계처리는 Origin 7.5의 one way ANOVA에 준하여 처리하였고, p-value가 최대치 0.05 (p < 0.05) 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. Glutamate 농도에 따른 C6 glial 세포의 생존율 변화

흥분성 신경전달물질인 glutamate는 과량으로 유리될 경우 신경세포막을 파괴하여 신경세포 손상을 유도하고 여러 뇌질환의 근원이 될 수 있다²⁵⁾. 따라서, glutamate에 의한 C6 glial 세포의 사멸이 유도되는지를 확인하기 위하여 C6 glial 세포에 glutamate를 농도별로 처리한 다음, 24시간 후에 MTT 방법으로 세포 생존율을 조사하였다. 그 결과, glutamate 처리농도에 의존적으로 세포 생존율이 감소되는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 1), 20 mM glutamate 처리 시 약 50%의 세포 생존율을 나타냈으므로 이하 모든 실험에서 20 mM glutamate를 이용하였다.

2. 八物湯의 농도에 따른 C6 glial 세포의 생존율 변화

八物湯 자체의 독성을 확인하기 위하여 다양한 농도의 八物

탕을 단독으로 C6 glial 세포에 24시간 동안 처리한 결과, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지는 유의한 세포 독성이 없었으며, 900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 약간의 세포독성이 관찰되었다(Fig. 2).

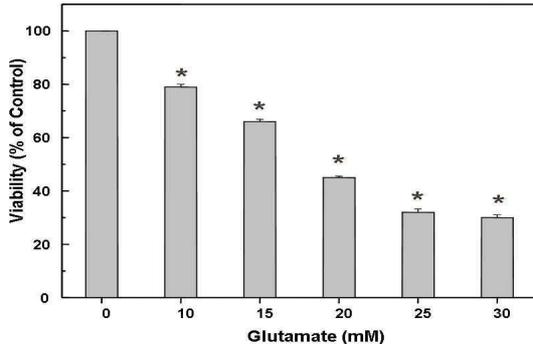


Fig. 1. Cell viability assay for glutamate-induced C6 glial cell death. C6 glial cells were incubated for 24 hr with glutamate at indicated concentrations. The cell viability was assessed by MTT assay. Data represent the mean \pm S.E.M. of three individual experiments. * $p < 0.05$

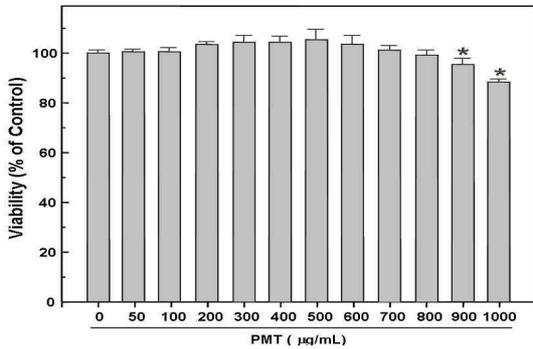


Fig. 2. Effect of PMT on C6 glial cell death. Cells were treated with the indicated doses of PMT for 24 hr. The cell viability was assessed by MTT assay. Data represent the mean \pm S.E.M. of three individual experiments. * $p < 0.05$

3. 八物湯이 Glutamate에 의한 C6 glial 세포 사멸에 미치는 영향
다음으로 八物湯의 glutamate로 유도된 C6 glial 세포 사멸에 대한 보호 효과를 조사하기 위해 八物湯을 농도별로 1시간 전 처리한 후 20 mM glutamate로 24시간 동안 자극한 다음, MTT 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 八物湯은 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서부터 glutamate로 유도된 C6 glial 세포 사멸 보호 효과가 있는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 정상 대조군과 유사한 정도로 세포 생존율 회복을 확인하였다(Fig. 3).

4. 八物湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향

八物湯이 glutamate에 의한 세포고사를 억제하여 C6 glial 세포의 생존율을 증가시키는지를 확인하기 위하여 먼저 핵산 염색 시약인 DAPI를 이용하여 세포핵의 형태를 조사하였다. 정상 대조군 세포의 핵은 타원 형태의 핵이 균질하게 염색되어 관찰되었으나, glutamate (20 mM)를 처리한 세포의 핵은 세포고사 현상의 형태학적 특징으로 알려진 염색사 응축현상 (chromatin condensation)이 관찰되었다. 그러나 八物湯 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 전처

리한 군의 세포핵은 glutamate 단독 처리군에서 발견되는 염색사의 응축현상이 없이 정상 대조군 세포와 유사한 핵 모양이 관찰되었다(Fig. 4A). 또한, 각각의 처리군의 세포 내 DNA를 추출하여 전기영동을 통해 관찰한 결과, glutamate (20 mM)를 처리한 군에서는 명확한 DNA ladder 현상이 관찰되었으나 八物湯 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 전처리한 군에서는 glutamate 단독 처리군에서 발견되는 DNA ladder 현상이 없이 정상 대조군과 비슷한 양상으로 관찰되었다(Fig. 4B).

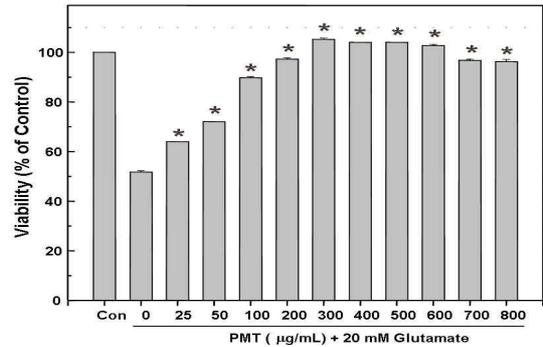


Fig. 3. Effect of PMT on glutamate-induced C6 glial cell death. PMT treated 1hr before treating glutamate and incubated for 24 hr. The cell viability was assessed by MTT assay. Data represent the mean \pm S.E.M. of three individual experiments. * $p < 0.05$

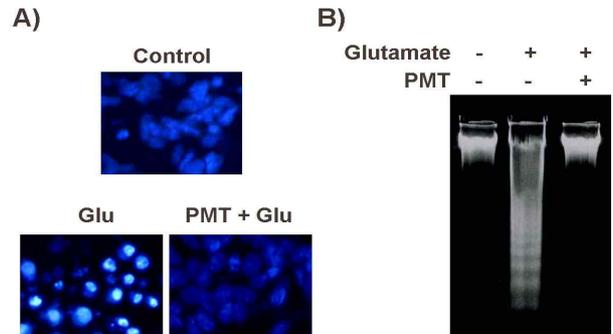


Fig. 4. Effect of PMT on glutamate-induced apoptosis in C6 glial cells. Cells were preincubated with PMT (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and followed by the addition of 20 mM glutamate for 24 hr. (A) After washing the cells with PBS, cells were fixed with 4% formaldehyde and stained with DAPI. Morphology of nuclei from the cells were observed under fluorescent microscope. (B) Genomic DNA was isolated, and separated on 2% agarose gels, then stained with EtBr and visualized under UV light.

5. 八物湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 주기 변화에 미치는 영향

八物湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 주기에 미치는 변화를 살펴보기 위하여 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 八物湯을 C6 glial 세포에 1시간 전처리한 후 20 mM glutamate로 자극하고 24시간 후 세포 DNA를 PI 염색하여 유식세포 분석기를 통하여 분석하였다. 그 결과, 정상 대조군과 八物湯을 전처리한 군에서는 Sub-G0/G1 영역이 1.5%, 9.7%로 나타났으나, glutamate 단독 처리군에서는 Sub-G0/G1 영역이 50.1%로 현저히 증가된 결과를 나타내었다. 이를 통하여 glutamate에 의한 세포독성에 의해 Sub-G0/G1에서 G1과정으로 이행하지 못하여 세포고사가 일어

남을 확인하였으며, 八物湯은 glutamate에 의한 세포고사를 효과적으로 억제함을 확인하였다(Fig. 5).

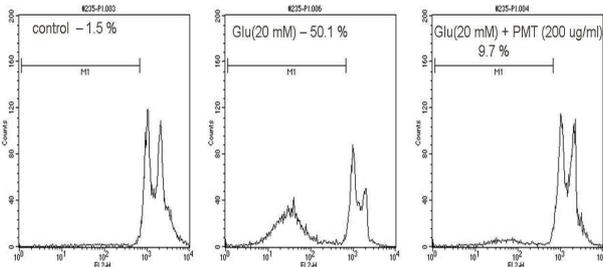


Fig. 5. Cell cycle analysis by glutamate and PMT on C6 glial cells
C6 glial cells were pre-treated with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PMT and 20 mM glutamate was stimulated for 24 hr. Cell cycle was assessed by PI staining.

6. 八物湯이 glutamate에 의한 활성산소종 생성에 미치는 영향
활성산소종은 효소 매커니즘 및 비효소 매커니즘을 통하여 포유동물의 세포에서 생성되며, 일부 활성산소종의 경우 특정한 생체 내 기능에 필요하지만, 과도한 생성은 독성물질로 작용하여 뇌질환 뿐만 아니라 다른 여러 질병 발병에 기여를 하게 된다²⁶. 八物湯이 glutamate로 유도된 C6 glial 세포의 활성산소종 생성에 미치는 변화를 확인하기 위하여 20 mM의 glutamate와 다양한 농도의 八物湯 (50-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 24시간 동안 처리한 후 DCF-DA로 염색된 세포를 유식세포 분석기를 통해 관찰하였다. 그 결과, 정상 대조군에 비하여 glutamate가 처리된 군에서 DCF-DA에 의한 피크의 이동, 즉 활성산소종의 생성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, glutamate에 의해 유도된 활성산소종의 생성은 八物湯 전처리에 의해 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

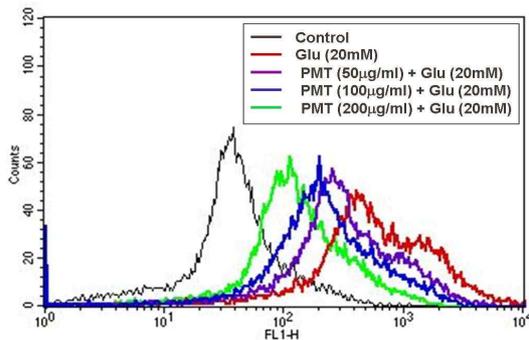


Fig. 6. Effect of PMT on glutamate-induced ROS generation in C6 glial cells. PMT and/or glutamate were treated on C6 glial cells for 24 hr. After DCF-DA staining cells were analysed using FACS.

7. 八物湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 NOX1 발현에 미치는 영향

NADPH oxidase (NOX)는 산화-환원 신호전달 기전을 통해 다양한 세포에서 활성화된다. 이 과정을 통해 생성된 활성산소종이 세포의 손상 및 사멸을 유발하는 것으로 보고되고 있다. NOX는 활성화를 위한 다양한 활성제와 소단위의 종류에 따라 NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 등으로 분류된다²⁷. C6 glial 세포에서 glutamate에 의한 활성산소종의 생성에 NOX가 관여하는

지를 확인하기 위하여 20 mM의 glutamate를 처리한 세포들에서 NOX유전자들의 발현 변화를 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. 그 결과, 20 mM의 glutamate를 처리한 세포들에서 NOX1의 발현이 glutamate 처리시간에 따라 증가하는 현상을 관찰하였으며, 다른 NOX들의 발현에는 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 7A). 또한, glutamate에 의해 유도되는 NOX1의 발현 증가는 八物湯 전처리에 의해 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 7B, C). 따라서, glutamate에 의한 NOX1의 발현 증가가 활성산소종을 생성하여 C6 glial 세포의 세포고사를 유도함을 확인할 수 있었으며, 八物湯은 glutamate에 의한 NOX1의 발현 증가를 억제함으로써 세포고사를 억제함을 알 수 있었다.

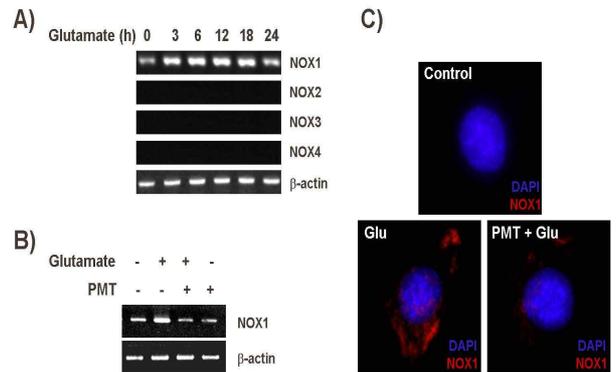


Fig. 7. PMT attenuated NOX1 expression by glutamate in C6 glial cells. C6 glial cells were treated with glutamate and PMT. NOXs expressions were detected by RT-PCR (A, B) and immunocytochemistry (C).

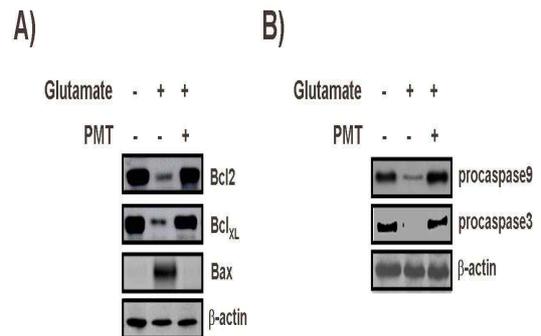


Fig. 8. Pro-apoptotic and anti-apoptotic protein expressions by glutamate and PMT in C6 glial cells. C6 glial cells were incubated with glutamate and PMT for 24 hr. After washing with PBS, cells were lysed and analysed by western blot analysis.

8. 八物湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 세포고사 관련 단백질 발현에 미치는 영향

Bcl2 계열 단백질들은 대표적으로 항세포고사 단백질인 Bcl2와 BclxL, 그리고 세포고사 단백질인 Bax 등이 있으며, 이들의 균형이 caspase들의 활성화를 조절함으로써 세포고사와 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다²⁸⁻³⁰. 따라서, glutamate에 의한 Bcl2 계열 단백질의 발현 변화와 이에 대해 八物湯이 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, glutamate 단독 처리군에서는 항세포고사 단백질인 Bcl2와 BclxL의 발현이 정상 대조군에 비해 감소되었으며, 세포고사 단백질인 Bax의 발현은 정상 대조군에

비해 현저히 증가되었다. 반면, 八物湯을 전처리한 군에서는 Bcl2와 BclxL의 발현이 정상 대조군과 비슷한 수준으로 증가되었으며, Bax의 발현은 정상 대조군과 같은 수준으로 감소되었다 (Fig. 8A). 또한 glutamate 처리에 의해 procaspase-9과 procaspase-3의 발현이 정상 대조군에 비해 현저히 감소되었으며, 이러한 현상도 八物湯의 전처리에 의해 억제됨을 확인하였다 (Fig. 8B).

고찰

뇌졸중, 근위축성 측삭경화증, 헌팅턴 질환, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환과 같은 다양한 신경계 질환에는 중추신경세포의 사멸이 주요 원인으로 작용하는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 중추신경세포들은 대사성 손상을 비롯한 여러 종류의 화학적, 물리적 손상에 매우 취약하다³¹.

홍분성 아미노산은 대뇌 피질과 해마에서 주요한 홍분성 신경전달물질로 작용하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 홍분성 아미노산을 포함하고 있는 신경세포들은 학습과 기억 등의 정신적 기능에 중요한 역할을 한다. 홍분성 아미노산의 장애는 정신 착란이나 치매와 관련된 정신 분열증과 신경정신의학 증후군 등의 병인에 크게 관여되며³², 홍분성 아미노산 중 하나인 glutamate는 포유동물의 중앙 신경 시스템에서 주요 홍분성 신경전달물질로 알려져 있고³², 뇌세포 전체에 분포하는 글루타메이트 신경세포 (glutamatergic neuron)는 다른 신경세포의 활성화를 유도하여 신경계의 정보전달 기능에 중요한 역할을 담당한다³³.

그러나 뇌허혈로 인한 신경조직으로의 산소 및 포도당의 공급이 줄어들면 ATP-dependent ion channels의 기능저하에 의한 Ca²⁺ 과 같은 양이온의 세포내 유입으로 신경세포 탈분극이 발생하며, 신경말단에서 glutamate 등을 포함하는 신경전달물질의 유리가 증가한다. 그 결과, 신경교세포에 의한 glutamate 재흡수가 감소하여 궁극적으로 홍분성 신경전달물질인 glutamate가 신경연접부에 축적되어 이온성 수용체인 AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 및 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 수용체 등의 활성을 유도하며, 이로 인하여 신경세포의 사멸이 초래된다³⁴⁻³⁶.

활성산소종은 산소가 지닌 화학적 특성으로 인하여 생산되는 산소유리기 및 이들로부터 유래된 산소화합물을 총칭하며, 여러 산화효소 (xantine oxidase, NADPH oxidase 등)들에 의하여 생성되는 것으로 알려져 있다. 활성산소종은 화학적으로 쌍을 이루는 전자를 얻어 안정된 상태로 가려는 성질을 가지고 주변의 물질과 전자를 주고받기 때문에 반응성이 대단히 큰 불안정한 물질이므로 정상생리 상태에서는 활성산소종으로부터 조직을 보호하기 위하여 다양한 항산화 효소가 방어 체계를 형성하고 있다. 이러한 항산화 기전에도 불구하고 과도한 활성산소종의 생성은 산화적 스트레스를 야기하고, 산화적 스트레스는 핵산, 단백질 및 지질에 손상을 주며, 잠재적으로 미토콘드리아 (mitochondria) 투과성을 증가시키게 되고, 이로 인하여 에너지 시스템 이상과 세포질로의 cytochrome-c와 같은 세포고사 인자들의 방출이 진행된다³⁷.

Bcl2 계열 단백질은 cytochrome-c의 유출을 조절하는데 관여하는 중요한 단백질로, 미토콘드리아 외막에 존재하여 미토콘드리아에서 세포질로 cytochrome-c나 세포고사 유발인자의 이동을 조절한다. Bcl2 계열 단백질은 기능적으로 cytochrome-c의 배출을 억제시키는 Bcl2와 BclxL 같은 항세포고사 단백질과 Bax, Bad와 같은 전세포고사 (pro-apoptotic) 단백질군으로 분류되며, 이들의 상호작용을 통하여 세포의 운명을 결정한다. 유출된 cytochrome-c는 apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) 및 procaspase-9과 결합하여 apoptosome을 형성함으로써 caspase-9을 활성화시켜 마지막으로 caspase-3를 활성화시킨다. 활성화된 caspase-3는 단백질 분해효소로 세포고사 신호를 세포 밖에서 세포 내로 매개하는 역할과 세포 내 핵심적 단백질이나 구성 분자를 분해하는 등 다양한 기능을 통해 세포고사를 유도한다. 이처럼 과량의 활성산소종의 증가와 항산화 메커니즘의 감소는 신경퇴행성 질환과 관련된 신경세포의 세포고사를 진행시킬 수 있다³⁸.

八物湯은 元代 沙圖穆蘇가 지은 《瑞竹堂經驗方》에 “八珍散 治月水不調…此藥 調暢營衛 滋養氣血 能補虛損” 이라고 처음 수록되었으며³⁹, 益氣健脾의 四君子湯과 養血活血의 四物湯을 합방한 氣血 雙補劑로서, 補血, 補氣의 작용이 있어, 氣血不足으로 인한 面白黃, 健忘, 失眠, 多夢, 貧血 및 월경부조나 기능성자궁출혈, 만성소모성 질병 등을 치료하는데 사용되어 왔다⁴⁰.

근래 八物湯에 대하여 송 등¹⁵은 산후 유즙분비 관련 인자에 미치는 영향을, 허 등¹⁶은 알레르기 반응에 미치는 효과를 연구하였고, 박 등^{17,18}은 뇌혈류를 증가시키는 효과와 작용 기전 등을 확인하였다. 권 등¹⁹은 항피로 효과를 확인하였고, 하²⁰, 은²¹, 박²² 등은 항암 및 면역효과 등을 연구하였으며, 임등²³은 심근세포고사에 미치는 영향을 보고하였다. 이러한 경향들을 살펴볼 때 八物湯에 대한 연구는 꾸준히 증가하고 있는 추세로 임상연구보다는 실험연구가 많고, 그 중 면역강화에 관한 연구가 가장 많았으며 그 외 심혈관계, 생식능력 관련, 세포 사멸 관련, 뇌혈류역학 관련, 대사물질 및 호르몬 관련 효과와 마우스를 이용한 독성 관련 연구들이 진행되고 있다⁹.

본 연구에서는 八物湯이 백서 신경교세포인 C6 glial 세포에서 glutamate로 유도된 신경세포 손상에 대한 세포 생존율에 미치는 영향, 세포고사 현상에 관여하는 단백질의 변화, 활성산소종의 생성에 미치는 영향, 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향 등을 조사하였다.

홍분성 신경독성물질인 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 손상을 조사한 결과, glutamate 처리 농도에 의존적으로 세포 생존율이 감소되었으며, 八物湯은 glutamate로 유도된 C6 glial 세포 사멸을 보호하였다. 특히 200 μg/ml 八物湯에서는 정상 대조군과 비슷한 수준의 세포 생존율 회복을 확인하였으며 (Fig. 1, 3), 이는 八物湯이 glutamate에 의한 세포독성을 현저히 억제하는 효과를 가지고 있음을 의미한다. 또한 glutamate를 처리한 군에서는 세포고사의 전형적인 형태학적 특징인 염색사의 응축과 핵분열이 관찰되었으며, 八物湯은 이러한 현상을 현저히 억제시켰다 (Fig. 4). 이상의 결과는 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 사

멸이 세포고사의 과정에 의한 것을 나타내는 것으로, 八物湯은 glutamate에 의한 세포고사를 억제함을 시사한다.

일반적으로 세포의 증식은 유사분열과 세포질분열 과정인 G1-S-G2-M기의 순차적 단계에 의해 이루어진다. 유식세포 분석기를 이용하여 세포 내 염색체의 양적인 변화를 분석할 때, G1은 2n을, G2는 4n을 나타내며, G1의 앞부분은 sub-G₀/G₁으로 분류하는데 sub-G₀/G₁의 양적인 증가는 전형적인 세포고사 현상을 의미한다^{41,42}. 각각의 실험군에서 유식세포 분석을 실시한 결과 glutamate 단독 처리군에서는 sub-G₀/G₁ 영역에서 세포수가 현저히 증가하였으며, 八物湯을 전처리한 군에서는 sub-G₀/G₁ 영역의 세포수가 glutamate 단독 처리군에 비해 현저하게 감소하였다(Fig. 5). 또한 glutamate 단독 처리군에서는 활성산소종의 생성이 현저히 증가하였으며, 이러한 현상은 八物湯의 처리 농도에 의존적으로 억제됨을 유식세포 분석기를 통해 확인하였다(Fig. 6). 이러한 결과는 glutamate가 C6 glial 세포 내의 활성산소종의 생성을 크게 증가시켜 세포고사에 이르게 하며, 八物湯은 세포 내에서 활성산소종의 생성을 억제하여 산화적 손상을 방어함으로써 glutamate에 의한 세포독성을 억제함을 시사한다. 뿐만 아니라 glutamate는 활성산소종의 생성에 관여하는 NOX1의 발현을 현저히 증가시켰으며, 八物湯은 glutamate 처리에 의해 증가한 NOX1의 발현을 현저히 억제함을 확인하였다(Fig. 7). 따라서, 八物湯은 glutamate에 의한 NOX1의 발현을 조절함으로써 C6 glial 세포의 산화적 스트레스를 억제함을 알 수 있었다.

마지막으로 八物湯이 세포고사 관련 단백질들의 발현에 미치는 영향을 western blot 방법으로 확인한 결과 glutamate 단독 처리군에서는 항세포고사 단백질인 Bcl2와 BclxL의 발현이 정상 대조군에 비해 감소되었으며, 八物湯을 전처리한 군에서는 Bcl2와 BclxL의 발현이 다시 정상 대조군과 비슷한 수준으로 증가됨을 볼 수 있었다. 또한 glutamate 단독 처리군에서는 세포고사 단백질인 Bax의 발현이 정상 대조군에 비해 현저히 증가된 반면, 八物湯을 전처리한 군에서는 Bax의 발현이 정상 대조군과 비슷한 수준으로 감소되었다(Fig. 8A). 이러한 현상들에 의해 glutamate 처리군에서는 procaspase-9과 procaspase-3의 발현이 감소되었으며, 八物湯의 전처리에 의해 이들 procaspase들의 발현도 정상 대조군과 비슷한 수준으로 회복됨을 확인하였다(Fig. 8B).

따라서, 세포 내에서 분절되어 활성화되는 단백질효소인 caspase-3의 활성화가 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 세포고사에 중요한 역할을 하며, 八物湯은 항세포고사 단백질들의 발현 향상을 통하여 procaspase-3의 발현을 유지시켜 caspase-3로의 활성화를 억제함으로써 glutamate에 의해 나타나는 C6 glial 세포의 세포고사를 억제하는 것을 확인하였다.

이상의 결과를 요약하면 八物湯은 glutamate에 의해 유발된 C6 glial 세포의 활성 산소종의 생성과 NOX1의 발현을 억제하여 산화적 손상을 방어하는 동시에 glutamate에 의한 항세포고사 관련 단백질들인 Bcl2, BclxL의 발현 감소 및 세포고사 관련 단백질인 Bax의 발현 증가를 억제하여 procaspase-9과 procaspase-3가 caspase-9과 caspase-3로 활성화되는 것을 억제함으로써 C6

glial 세포의 세포고사를 보호하는 효과를 나타내었다.

결론

Glutamate에 의한 C6 glial 세포의 손상에 대하여 八物湯의 보호 효과를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Glutamate 처리농도가 높을수록 C6 glial 세포의 생존율이 감소되었다. Glutamate에 의한 C6 glial 세포의 사멸이 八物湯의 전처리 농도에 따라 유의성 있게 감소하였다. 八物湯의 전처리에 의해 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 핵 응축 및 분절이 억제되었다. Glutamate에 의한 C6 glial 세포의 활성산소종의 생성은 八物湯의 처리 농도에 따라 유의성 있게 감소하였다. 八物湯을 전처리에 의해 glutamate에 의한 C6 glial 세포의 NOX1 발현이 억제되었다. Glutamate에 의한 C6 glial 세포의 Bcl2, BclxL 단백질의 발현 감소 및 Bax 단백질의 발현 증가는 八物湯의 전처리에 의해 억제되었다. Glutamate에 의한 C6 glial 세포의 procaspase-9과 procaspase-3의 발현 감소가 八物湯의 전처리에 의해 억제되었다.

이상의 결과로부터 glutamate에 의한 C6 glial 세포 손상에 있어 八物湯 보호 효과는 활성산소종 생성 억제 및 세포고사 관련 단백질들의 활성 억제를 통하여 세포를 보호하는 것으로 나타났다. 따라서 八物湯은 중추신경세포의 산화적 손상과 이로 인한 각종 신경계 질환을 치료하는데 유용하게 활용될 가능성이 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Jae-Chul Lee and Won-Ki Kim. Aging and Stroke. Kor J Gerontol. 16(1):11-16, 2006.
2. Straus, S.E., Majumdar, S.R., McAlister, F.A. New evidence for stroke prevention. JAMA. 288(11):1388-1395, 2002.
3. Garcia, J.H., Lassen, N.A., Weiller, C., Sperling, B., Nakagawara, J. Ischemic stroke and incomplete infarction. Stroke. 27(4):761-765, 1996.
4. 강성돈, 정진원, 문병순, 김종문. 뇌졸중의 역학적 동향에 대한 연구. 대한신경외과학회지 28: 509-513, 1999.
5. Javitt, D.C., Zukin, S.R. The role of excitatory amino acids in neuropsychiatric illness. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 2(1):44-52, 1990.
6. Hrabarova, E., Juranek, I., Soltes, L. Pro-oxidative effect of peroxynitrite regarding biological systems: a special focus on high-molar-mass hyaluronan degradation. Gen Physiol Biophys. 30(3):223-238, 2011.
7. Berliocchi, L., Bano, D., Nicotera, P. Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 360(1464):2255-2258, 2005.
8. Xiao-xia, DONG., Yan, WANG., Zheng-hong, QIN. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance

- to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 30(4):379-387, 2009.
9. 마충제, 이남현, 마진열, 하혜경, 유영범, 신현규. EBM 기반 구축을 위한 팔물탕 문헌 연구 분석. *대한 한의학방제학회지* 15(2):35-45, 2007.
 10. 虞搏. 醫學正傳. 北京, 人民衛生出版社, p 156, 1981.
 11. 汪昂. 醫方集解. 서울, 大星文化社, p 262, 1984.
 12. 康舜洙, 盧昇鉉, 李尙仁. 方劑學. 서울, 癸丑文化社, p 37, 1985.
 13. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 南山堂, p 447, 1983.
 14. 李載熙. 圖說韓方診療要方. 서울, 醫學研究社, p 711, 1993.
 15. 송윤희, 김태희. 八物湯 복용이 산후 유즙분비 관련인자에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지* 23(1):12-29, 2010.
 16. 허만규, 홍현우, 감철우, 박동일. 八物湯이 알레르기반응에 미치는 효과. *동의병리생리학회지* 17(4):1075-1081, 2003.
 17. 박철훈, 배인태, 정현우. 八物湯이 腦血流力學 변화에 미치는 효과. *동의생리병리학회지* 18(4):1014-1020, 2004.
 18. 박철훈, 김계엽, 정현우. 八物湯이 腦血流力學 변화에 미치는 작용기전. *동의생리병리학회지* 18(6):1714-1722, 2004.
 19. 권오봉, 임형호. 八物湯 및 加味八物湯이 白鼠의 항피로에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지* 12(1):89-100, 2002.
 20. 하지용, 남우열. 八物湯이 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 10: 295-315, 1995.
 21. 은재순, 전훈, 김대근. 八物湯이 복강 마크로파지의 탐식능에 미치는 영향. *생약학회지* 30(4):363-367, 1999.
 22. 박혜준, 고우신. 八物湯이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 實驗의 效果. *대한한의학회지* 19(1):327-338, 1998.
 23. 임은경, 신선호. 八物湯이 저산소증에 의한 배양심근세포고사에 미치는 영향. *대한한의학회지* 25(2):67-76, 2004.
 24. 辛民教, 永林社 編輯部. 新增 方藥合編. 서울, 永林社, p 139, 2003.
 25. Severino, P.C., Muller Gdo A., Vandresen-Filho, S., Tasca, C.I. Cell signaling in NMDA preconditioning and neuroprotection in convulsions induced by quinolinic acid. *Life Sci.* 289(15-16):570-576, 2011.
 26. Wilson, J.X., Gelb, A.W. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. *J Neurosurg. Anesthesiol.* 14(1):66-79, 2002.
 27. Kim, H.J., Lee, J.H., Kim, S.J., Oh, G.S., Moon, H.D., Kwon, K.B., Park, C., Park, B.H., Lee, H.K., Chung, S.Y., Park, R., So, H.S. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. *J Neurosci.* 30(11):3933-3946, 2010.
 28. Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407: 770-776, 2000.
 29. Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Dev.* 13: 1899-1911, 1999.
 30. Deveraux, Q.L., Schendel, S.L., Reed, J.C. Antiapoptotic proteins: The Bcl-2 and Inhibitor of apoptosis protein families. *Cardiol Clin.* 19(1):57-74, 2001.
 31. Vucic, D., Dixit, V.M., Wertz, I.E. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translation modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(7):439-452, 2011.
 32. Kim, K., Lee, S.G., Kegelman, T.P., Su, Z.Z., Das, S.K., Dash, R., Dasgupta, S., Barral, P.M., Hedvat, M., Diaz, P., Reed, J.C., Stebbins, J.L., Pellicchia, M., Sarkar, D., Fisher, P.B. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol.* 226(10):2484-2493, 2011.
 33. Fröhlich, N., Nagy, B., Hovhannisyan, A., Kukley, M. Fate of neuron-glia synapses during proliferation and differentiation of NG2 cells. *J Anat.* 219(1):18-32, 2011.
 34. Buttke, T.M., Sandstrom, P.A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today.* 15(1):7-10, 1994.
 35. Coyle, J.T., Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 262(5134):689-695, 1993.
 36. Dugan, L.L., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Handran, S.D., Rothman, S.M., Lin, T.S., Goldberg, M.P., Choi, D.W. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci.* 15(10):6377-6388, 1995.
 37. Ndountse, L.T., Chan, H.M. Role of N-methyl-D-aspartate receptors in polychlorinated biphenyl mediated neurotoxicity. *Toxicol Lett.* 184(1):50-55, 2009.
 38. Farooqui, T., Farooqui, A.A. Aging: An important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev.* 130(4):203-215, 2009.
 39. 沙圖穆蘇. 瑞竹堂經驗方. 서울, 大星文化社, p 30, 1995.
 40. 동의학사전 편찬위원회. 新東醫學辭典. 서울, 여강출판사, p 460, 463, 1198, 2005.
 41. Nigg, E.A., Stearns, T. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol.* 13(10):1154-1160, 2011.
 42. Prasad, R., Beard, W.A., Batra, V.K., Liu, Y., Shock, D.D., Wilson, S.H. A review of recent experiments on step-to-step "hand-off" of the DNA intermediates in mammalian base excision repair pathways. *Mol Biol (Mosk).* 45(4):586-600, 2011.