

원 지

歸脾湯이 Glutamate에 의한 정상세포의 손상에 미치는 영향

전희준, 박세욱¹⁾, 이인, 문병순¹⁾

원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 원광대학교 한의학전문대학원¹⁾

Effects of *Gwibitang* on Glutamate-induced Death in Rat Neonatal Astrocytes

Hui-Jun Jeon, Sae-Wook Park, In Lee, Byung-Soon Mun

Department of internal medicine, College of Oriental medicine, Wonkwang university
Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang university¹⁾

Objectives : This study was designed to investigate effects of *Gwibitang* on the glutamate-induced toxicity of primary rat neonatal astrocytes.

Methods and Results : *Gwibitang* significantly recovered the glutamate-induced apoptosis and inhibited the generation of H₂O₂ in astrocytes. In addition, both *Gwibitang* and antioxidants such as GSH reduced the glutamate-induced cytotoxicity in astrocytes, indicating that *Gwibitang* possibly had an antioxidative effect. Moreover, *Gwibitang* also inhibited the glutamate-induced degradation of Bcl-2 protein and poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) in astrocytes.

Conclusions : We suggest that *Gwibitang* has protective effects on glutamate-induced cytotoxicity via an antioxidative mechanism.

Key Words: *Gwibitang*, glutamate, astrocytes

서 론

歸脾湯은 宋代 嚴¹⁾의 《濟生方》에 최초로 수록된 이래 역대 의가들에 의해 思慮過度, 勞傷心脾로 인한 健忘, 怔忡 등을 치료하는데 사용되어 왔으며^{2,6)}, 최근에는 뇌신경계 질환, 혈액질환, 부인과 질환 및 심

인성 질환 등에 광범위하게 활용되고 있다^{7,9)}.

glutamate는 포유류의 대표적인 중추신경계 흥분성 신경전달물질로 과도하게 분비되면 양성 되먹이기 기전에 의해 신경계가 과다 흥분하여 중추신경계에 서 신경독소로 작용하는데, ATP 관련 이온채널의 기능 손실을 가져와 세포막을 통한 Ca²⁺과 같은 양이온들의 유입으로 세포의 탈분극(depolarization)현상을 초래하고, 산소고갈 및 산화적 손상 등을 유도한다. 그리고 대교세포의 하나인 정상세포(astrocyte)의 성장에 변성을 가져와 뉴런과 정상세포에 손상을 일으킨다. 이러한 흥분성 세포 독성 기전은 급성 뇌졸중, 중추신경계 외상 등의 급성 신경병증 뿐만 아니라 Alzheimer 병, Parkinson 병과 같은 만성 퇴행성 신경

· 접수 : 2004년 4월 28일 · 논문심사 : 2004년 5월 6일
· 채택 : 2004년 5월 15일
· 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 익산한방병원
(Tel: 063-850-2102, Fax: 063-841-0033, E-mail: mbs@wonkwang.ac.kr)

병증의 병리기전의 한 요인으로 알려져 있다¹⁰⁻¹⁵⁾.

따라서 뇌신경계 질환, 심인성 질환에 광범위하게 활용되고 있는 歸脾湯이 glutamate에 의한 중추신경 세포의 산화적 손상과 세포고사 기전에 일정한 효과가 있을 것으로 사료되어 본 연구를 시행하였다.

이에 저자는 歸脾湯의 중추신경계 세포손상에 대한 방어 효과를 구명하기 위하여 glutamate에 의해 유도된 배양 정상세포의 손상에서 歸脾湯을 전처리한 후 세포생존율, 염색사 응축, mitochondria, Bcl-2 단백질, ICAD와 PARP 분절 등에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

임신중인 성체 rat를 대한실험동물센터(청주, 대한민국)로부터 구입하여 사육 중 태어난 지 3일 이내의 Sprague Dawley rat를 암수 구별없이 사용하였다.

2) 약재

실험에 사용한 歸脾湯의 처방은 許¹⁶⁾의 《東醫寶鑑》에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 1貼의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

3) 시약 및 기기

DMEM(dulbecco's modified eagle's medium), glucose-free DMEM, FBS(fetal bovine serum), 항생제 및 trypsin 등의 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL Co.(Grand Island, NY, U.S.A.)로부터 구입하였으며, 배양용기(24 well plate와 10 cm dish)는 Falcon Co.(Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 세포 및 핵염색과 관찰에 이용한 slide chamber는 Nunc Co.(Germany)로부터 구입하여 사용하였다.

MTT(methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl, tetrazolium bromide), Hoechst 33258, BCA(bicinchoninic acid), glutamate, GSH(reduced glutathione), NAC(N-acetyl-L-cysteine), SDS(sodium dodesyl sulfate), DMSO(dimethyl sulfoxide), Hoechst 33258, scopoletin(7-hydroxy-6-

methoxy- 2H-1-benzopyran-2-one), HRP(horse radish peroxide)은 Sigma Co.(St. Louis, Missouri, U.S.A.)로부터 구입하였고, JC-1은 Molecular probes(U.S.A.)로부터 구입하였다. inhibitor of caspase-3-activated DNase(ICAD), poly(ADP-ribose polymerase(PARP) 및 Bcl-2에 대한 항체는 Santa Cruz Co.(CA, U.S.A.)로부터 구입하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

歸脾湯 3貼 분량을 3,000 ml 환저 플라스크에 증류수 800 ml와 함께 넣은 다음, 120분간 가열하여 얻은 진탕액을 rotary vacuum evaporator에 넣어 감압 농축한 후 동결건조기로 완전히 건조하여 35.25 g(수득율: 27.64%)을 얻었다. 시료는 eppendorf tube에 100 mg/ml를 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 녹인 후 냉장 보관하면서 사용시에는 DMEM에 희석하여 사용하였다.

2) 정상세포의 분리 및 배양

정상세포는 rat의 뇌조직으로부터 Fischer 등¹⁷⁾의 방법에 따라 분리하였으며, 필요에 따라 다른 방법을 혼용하였다^{18,19)}. 생후 3일 이내의 rat의 대뇌를 무균장치 속에서 분리하여 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺이 없는 Hank's balanced salt solution(HBSS)에 넣어 세척한 다음, 3 ml의 1% trypsin/phosphate buffered saline(PBS)에 옮긴 후 실온에서 10분간 방치하였다. Trypsin에 의해 용해된 rat 대뇌조직에 10% FBS와 penicillin(50 U/ml) 및 streptomycin(250 ng/ml)이 포함된 DMEM으로 trypsin을 희석시킨 다음, pasteur pipette으로 잘게 분쇄한 후 20분간 절개하였다. 얻어진 세포는 멸균된 거즈를 통과시킨 후, 200 xg로 원심분리하여 침전세포만을 모은 다음, 10% FBS/DMEM로 현탁시킨 후에 poly-L-lysine으로 coating된 75cm² flasks에 부착시키기 위하여 37℃, 습기가 충분한 5% CO₂에서 배양하였다. 배양 3일 후에 비부착 세포는 제거하고, 부착세포만을 HBSS로 세척한 다음, 10% FBS/DMEM으로 배양액을 교환한 후 매 3일마다 배양액을 교환해 주면서 10일 동안 세포배양을 유지하였다. 이 때 소교세포(microglia)의 부착을 배제하기 위하여 flask를 교반기

에 250rpm으로 6-24 시간동안 흔들어 이틀에 한번씩 떨어진 세포를 제거하였다. 이와 같은 방법으로 얻어진 세포는 0.25% trypsin으로 처리하여 떼어낸 다음, 2번의 계대배양을 거친 후 10 cm 접시에 배양하면서 필요에 따른 실험을 시행하였다. 얻어진 정상세포는 세포막 표지 단백질(gial fibrillary acidic protein)에 대한 항체로 면역 염색하여 정상세포임을 확인하였다.

3) 세포의 약제 처리 및 생존율 측정

세포생존율은 MTT assay²⁰⁾를 이용하였다. 정상세포를 24 wells 세포배양판에 1×10^5 cells/ml씩 분주하여 24 시간 배양판에 부착시키고, glutamate와 歸脾湯 및 항산화제 등을 전처리한 후 MTT(0.5mg/ml)와 3시간 반응시켰다. 살아있는 세포에 의해 MTT로부터 생성된 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 540 nm 파장에서 분광광도계(THERMO max, U.S.A.)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) 핵 염색

세포핵의 형태를 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다. 먼저 3.7% formaldehyde 용액으로 세포를 고정시킨 다음, PBS로 2번 세척하고 Hoechst 33258을 10 μ M로 희석하여 10분 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 관찰하였으며, 역상 광학 현미경(Nikon Eclipse TE 300, Japan)을 이용하여 10 \times 10의 배율로 촬영하였다.

5) Mitochondria 막전위 측정

세포내 소기관의 하나인 mitochondria의 막전위(membrane potential)의 변화를 조사하기 위하여 JC-1(1 μ M)과 Rhodamine123 염색을 시행하였다. 먼저 歸脾湯과 glutamate를 처리한 세포의 배양액을 버린 후 차가운 PBS로 세척하였으며, 정상세포에 JC-1(1 μ M)을 처리하고, 세포배양기에서 20분 반응시켰다. 또한 歸脾湯과 glutamate를 처리한 정상세포에 위와 같은 방법으로 Rhodamine123(5 μ g/ml)을 처리하고 세포배양기에서 20분 반응시켰다.

그 후 PBS로 3번 세척한 후, 역상 형광 현미경(Leica MPS60, Germany)을 이용하여 10 \times 40의 배율로 촬영하였다.

6) 유식세포기 분석(Flow cytometric analysis)

실험에 사용한 세포는 시험관에 원심분리하여 모은 후, propidium iodide(PI) solution으로 1분 염색하여 FACS Vantage Flow cytometry를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. 그 정보의 분석은 Cell Quest software(Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.)를 이용하였으며, 세포고사를 동반한 세포생존율을 측정하여 백분율(%)로 나타내었다.

7) Western blotting analysis

배양된 정상세포에 시료를 처리하여 세포를 포집한 후, 파쇄용액(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 2 mM Na₃VO₄, 100 μ M phenylarsine oxide)으로 4 $^{\circ}$ C에서 파쇄하였고, 이와 마찬가지로 BCA 용액에 의하여 동량으로 정량하여 2배의 sample buffer(5 mM EDTA, 4% SDS(sodium dodesyl sulfate), 20% glycerol, 200 mM Tris, pH 6.8, 0.06% bromophenol blue)를 섞어 100 $^{\circ}$ C에서 3분 끓여 단백질 변성을 유도하고, 10% SDS-PAGE(sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 0.8 mA/cm²의 전기를 걸어주면서 이동시킨 후, blocking buffer(5% skim milk)로 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. 특이적인 항체를 TBS에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated HRP(TBS로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)와 상온에서 1시간 반응 후 ECL kit(Amersham Co., England)를 사용하여 ECL film에 현상하였다.

8) 통계처리

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의 평균(mean)과 표준편차(S.D.)를 산출하여 결과를 표시하였다. 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였으며, p-value가 0.005 이하의 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

Table 1. Prescription of *Gwibitang*

韓藥名	生藥名(學名)	重量(g)
當歸	Radix Angelicae gigantis (<i>Angelica gigas</i> Nakai)	3.750
龍眼肉	Arillus Longanaex (<i>Euphoria longan</i> Steud)	3.750
酸棗仁	Semen Zizyphi spinosae (<i>Zizyphus spinosa</i> Hu)	3.750
遠志	Radix Polygalae (<i>Polygala tatarinowi</i> Regel)	3.750
人蔘	Radix Ginseng (<i>Panax schinseng</i> Ness)	3.750
黃芪	Radix Astragali (<i>Astragalus Membranaceus</i> Bunge)	3.750
白朮	Rhizoma Atractylodis macrocephala (<i>Atractylodus macrocephala</i> Koidz)	3.750
白茯苓	Poria (<i>Poria cocos</i> Wolf)	3.750
木香	Radix Saussurea (<i>Saussurea lappa</i> Clarke)	1.875
甘草	Radix Glycyrrhizae (<i>Glycyrrhizae uralensis</i> Fisch)	1.125
生薑	Rhizoma Zingiberis (<i>Zingiber officinale</i> Rose)	6.500
大棗	Fructus Zizyohi jujubae (<i>Zizyphus jujubae</i> Mill)	3.000
Total amount		42.500

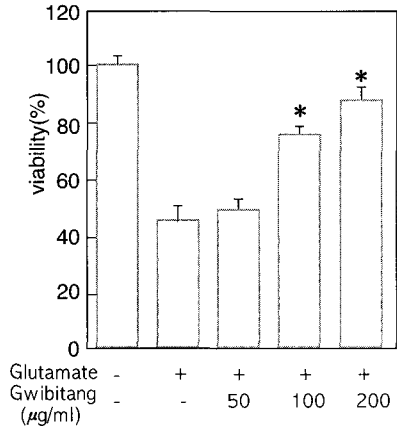


Fig. 1. *Gwibitang*(GBT) Protected Astrocytes from Glutamate Toxicity in a Dose-dependent Manner.

Cells were treated with various concentration of *Gwibitang* for 1 hr and followed by the addition of 10 mM glutamate for 24 hrs. Then, the viability was measured by MTT assay. Results represented as the mean(%)±S.D. of three experiments.

*, $p < 0.005$ by student's *t*-test, compared to only glutamate-treated group

1. 歸脾湯이 glutamate에 의한 세포독성에 미치는 영향

생후 3일 이전의 rat의 뇌로부터 일차 배양한 정상 세포에서 歸脾湯이 glutamate에 의한 세포독성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 세포에 다양한 농도의 歸脾湯을 1시간 전처리하고, 10 mM의 glutamate를 24 시간 처리한 후 세포생존율을 관찰하였다. Glutamate에 의해 50% 이하로 감소되었던 세포생존율이 歸脾湯의 농도에 의존적으로 유의하게 증가되었으며, 200 µg/ml의 歸脾湯 전처리에서는 90% 수준의 세포생존율이 유지됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

이러한 독성이 세포고사 현상임을 확인하기 위하여 PI 염색 후 유식세포기 분석한 결과, 세포고사 현상의 하나인 genomic DNA의 분절을 동반하였으며 (Fig. 2B), 歸脾湯을 전처리한 후 genomic DNA의 분절은 완전히 억제되었다(Fig. 2C).

또한 glutamate에 의한 정상세포 자극시 59.11%의

세포고사 DNA 분절을 유발하였으나 歸脾湯은 이를 대조군 수준으로 억제하였다(Fig. 2D).

2. 歸脾湯이 glutamate에 의한 형태학적 변화에 미치는 영향

Rat의 정상세포에서 歸脾湯이 glutamate의 독성에 의한 형태학적인 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 정상세포에 歸脾湯과 10 mM의 glutamate를 처리하고 24시간이 경과한 후 핵염색을 시행하였다. 세포고사 현상에 의한 핵 형태의 이상을 관찰하고자 세포를 slide에 4% formaldehyde로 고정하고, Hoechst 33258로 핵 염색을 시행하였다. 정상 대조군에서는 타원형이고 둥근 형태의 핵이 관찰되었으나(Fig. 3A), glutamate 처리시 세포고사의 형태학적 특징의 하나로 알려진 염색사 응축(chromatin condensation) 현상이 관찰되었다(Fig. 3B). 그러나 200 µg/ml의 歸脾湯을 1시간 전처리시 세포고사의 염색사 응축 현상이 완

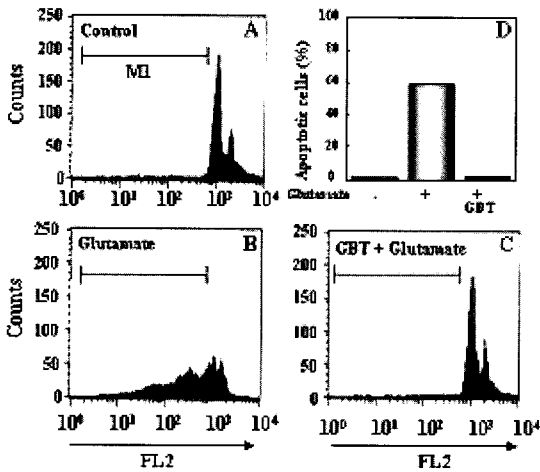


Fig. 2. *Gwibitang*(GBT) Inhibited Glutamate-induced Apoptosis in Primary Rat Astrocytes.

Cells were treated with 200 $\mu\text{g/ml}$ *Gwibitang* for 1 hr and followed by the addition of 10 mM glutamate for 24 hrs. Cells were washed and stained with PI solution for 20 min, analyzed by flow cytometry. A: control cells, B: glutamate-treated cells, C: *Gwibitang*-pretreated cells with glutamate and D: Gated apoptotic cell population (M1) (%)

전히 억제되었다(Fig. 3C).

3. 歸脾湯이 glutamate에 의한 mitochondria의 변화에 미치는 영향

앞의 실험에서 관찰한 세포의 고사현상에 따른 정상세포내 mitochondria의 변화를 알아보기 위하여 JC-1과 Rhodamine123으로 염색한 후, 형광현미경으로 mitochondria의 막전위차를 관찰하였다. 먼저, 각각의 조건에 따른 시료를 처리한 세포에 JC-1 과 Rhodamine123을 반응시켜 mitochondria의 이상현상을 관찰하였다. 정상 세포의 경우 mitochondria는 핵 주위로 분포되어 있었으며, Rhodamine123과 JC-1으로 염색시 모두 정상적인 색깔인 녹색과 오렌지색을 띠고 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4A, Fig. 5A). 그러나, glutamate를 처리한 세포군에서는 mitochondria가 핵 방향으로 많이 이동하여 존재하였으며, Rhodamine123 염색시 노란색으로, JC-1 염색시 녹색으로 변화하였음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4B, Fig. 5B).

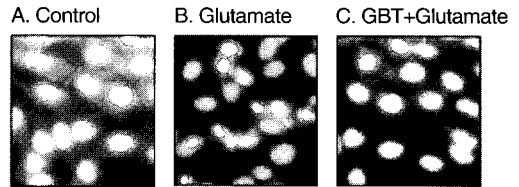


Fig. 3. *Gwibitang*(GBT) Inhibited the Glutamate-induced Nuclear Condensation of Primary Rat Astrocytes.

Cells were preincubated with *Gwibitang* (200 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hr and followed by the addition of 10 mM glutamate for 24 hrs. After washing the cells with PBS, cells were fixed with 3.7% formaldehyde and stained with 10 μM Hoechst 33258. Morphology of nuclei from the cells was observed under fluorescent microscope ($\times 100$). A: control cells, B: glutamate-treated cells and C: *Gwibitang*-pretreated cells with glutamate.

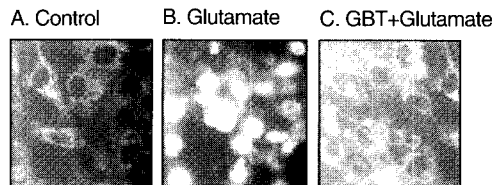


Fig. 4. *Gwibitang*(GBT) Inhibited the Glutamate-induced Mitochondrial Dysfunction of Primary Rat Astrocytes: Rhodamine Staining.

Cells were preincubated with *Gwibitang* (200 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hr and followed by the addition of 10 mM glutamate for 24 hrs and stained with mitochondria-specific potentiometric fluorescent dye, Rhodamine123. A: control cells, B: glutamate-treated cells and C: *Gwibitang*-pretreated cells with glutamate.

歸脾湯 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 1시간 전처리하고 10 mM의 glutamate를 처리한 세포군에서는 정상세포와 가깝게 mitochondria의 위치가 선명하였으며 Rhodamine123 염색시 녹색, JC-1 염색시 오렌지색에 가깝게 관찰되었다(Fig. 4C, Fig. 5C). 이러한 JC-1의 형광값을 유식세포기에서 분석시 glutamate 처리한 세포군은 JC-1의 고유색인 오렌지 빛깔을 점점 상실하였으나 歸脾湯은 이를 대조군 수준으로 회복시킴을 알 수 있었다(Fig. 6).

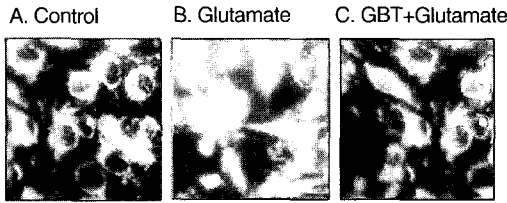


Fig. 5. *Gwibitang*(GBT) Inhibited the Glutamate-induced Mitochondrial Dysfunction of Primary Rat Astrocytes: JC-1 Staining.

Cells were preincubated with *Gwibitang* (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 1 hr and followed by the addition of 10 mM glutamate for 24 hrs and stained with mitochondria specific potentiometric fluorescent dye JC-1 (μM). A: control cells, B: glutamate-treated cells and C: *Gwibitang*-pretreated cells with glutamate.

4. 歸脾湯이 glutamate에 의한 Bcl-2 단백질 변화에 미치는 영향

Glutamate의 세포독성으로 인한 정상세포의 고사 과정에 있어서 mitochondria의 막에 존재하면서 기능 조절을 통하여 세포고사를 억제한다고 알려진 Bcl-2 단백질의 변화를 관찰하기 위하여 총 세포단백질에 대한 Bcl-2의 Western blotting을 시행하였다. 정상세포에 시간별로 10 mM의 glutamate를 처리하고, 시간별로 Bcl-2 단백질의 발현 정도를 측정하였다. Glutamate를 처리시 Bcl-2 단백질의 분해(degradation)는 6시간이 경과하면서부터 나타나기 시작하였으며, 12시간 이후 조금 더 진행되어 처리 24시간 이후 상당히 감소하였음을 관찰할 수 있었다(Fig. 7A).

이에 歸脾湯 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 각각 전처리하여 Bcl-2 단백질의 변화를 관찰한 결과, Bcl-2 단백질의 분해가 회복되어 歸脾湯이 정상세포의 고사현상을 억제함을 확인하였다(Fig. 7B).

5. 歸脾湯이 glutamate에 의한 ICAD와 poly(ADP)-ribose polymerase(PARP)의 분절에 미치는 영향

핵염색과 glutamate의 세포독성 효과는 핵분절과 DNA 분절에 의해 세포고사 현상을 매개함을 확인할 수 있었으므로 glutamate에 의한 세포 내부 세포고사

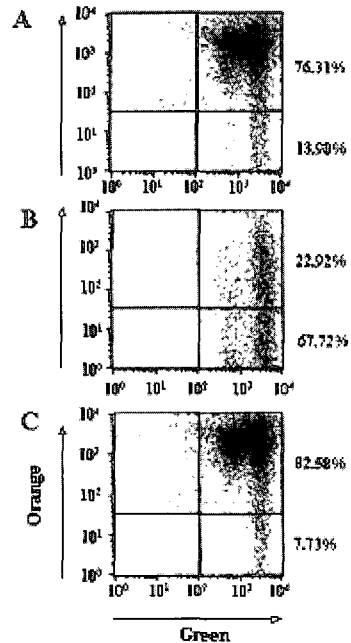


Fig. 6. *Gwibitang*(GBT) Inhibited the Glutamate-induced Mitochondrial Dysfunction of Primary Rat Astrocytes: Flow Cytometric Analysis.

Cells were preincubated with *Gwibitang* (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 1 hr and followed by the addition of 10 mM glutamate for 24 hrs and stained with mitochondria specific potentiometric fluorescent dye JC-1. Movement of mitochondria from the cells was observed under fluorescent microscope. A: control cells, B: glutamate-treated cells and C: *Gwibitang*-pretreated cells with glutamate.

신호전달현상을 관찰하였다.

세포고사의 대표적 활성 단백질 분해효소인 caspase-3의 참여를 간접적으로 알아볼 수 있는 정상적인 40kD의 ICAD는 정상세포에 10 mM의 glutamate를 처리했을 경우, 시간 의존적으로 분해되었으며, 그 발현정도가 비교적 약하게 나타났다(Fig. 8A). 또한 DNA 손상 회복에 관여하는 PARP에 대하여 정상세포에 10 mM의 glutamate를 처리했을 경우 비정상적으로 분자량 85kD에서 약하게 발현됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 8B). 그러나 歸脾湯을 전처리시 glutamate에 의한 85kD PARP의 분절현상이 억제됨을 확인하였다(Fig. 8C).

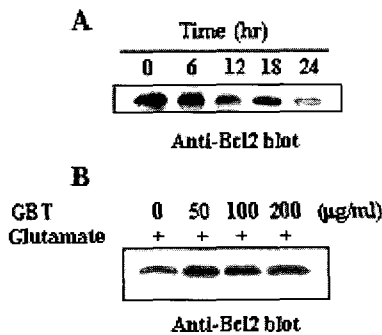


Fig. 7. *Gwibitang*(GBT) protected the degradation of Bcl-2 in glutamate-treated primary astrocytes. A. Cells were treated with 10 mM glutamate for various periods. B. Cells were pretreated with 200 µg/ml *Gwibitang* and treated with 10 mM glutamate. Cell lysate was separated on 12.5% SDS-PAGE. The nitrocellulose membrane was probed by anti-Bcl-2 antibody (Santa Cruz Co.) and the immunoreactive band was visualized by ECL kit.

고찰

중추신경세포의 손상기전은 일반적으로 급격한 외부 자극에 의한 손상을 입었을 경우에는 세포괴사의 형태로 나타나지만 노인성 치매, Parkinson 병 등의 퇴행성 신경계질환에서는 생체내의 다양한 생화학적 인 요인들이 작용하여 신경세포와 신경교세포의 고사를 유발한다고 알려져 있다²⁾.

신경세포의 허혈성 손상 후 신경조직에 산소 및 포도당의 공급이 줄어들면 ATP-dependent ion channels의 기능 손실에 의한 Ca²⁺과 같은 양이온의 세포내 유입으로 신경세포 탈분극이 발생하며, 신경 말단에서 glutamate 등을 포함하는 신경전달물질의 유리가 증가하고 신경교세포에 의한 glutamate 재흡수가 감소하여 결과적으로 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 신경연접부위에 축적된다. glutamate의 과도한 축적은 AMPA(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 수용체, NMDA(N-methyl-D-aspartate) 수용체 등의 활성을 유도하여 신경세포의 손상을 초래한다^{1,6,7)}. 특히 glutamate 수송체(transporter)

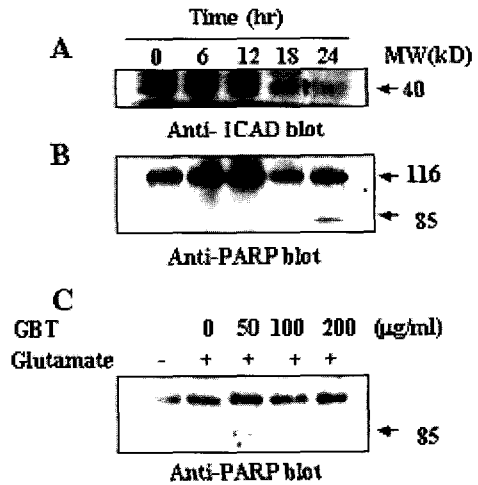


Fig. 8. *Gwibitang*(GBT) protected the cleavage of poly(ADP)-ribose polymerase(PARP) in glutamate-treated astrocytes. Cells were treated with 10 mM glutamate for various periods (A, B) and in the presence of *Gwibitang* (C). Lysate from the cells was separated on 12.5% SDS-PAGE. The nitrocellulose membrane was probed by anti-ICAD, PARP antibodies (Santa Cruz Co.) and the immunoreactive band was visualized by ECL kit.

와 수용체(receptor)에 작용하여 세포의 팽창(swelling)을 일으키는데, 그 중에서도 대교세포(astroglia)에 민감하게 반응하며 정상세포(astrocyte) 성장에 변성을 가져와 신경조직에 손상을 유도한다²⁾.

과도한 양의 glutamate가 세포 안에서 어떠한 대사적 경로를 통하여 신경세포의 고사 기전을 일으키는 지 정확히 알려져 있지는 않지만, 아마도 free radical 생성에 의한 산화성 손상이 중요한 기전으로 여겨져 이러한 세포손상 기전들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{24,25)}.

歸脾湯은宋代嚴의《濟生方》에“治思慮過度 勞傷心脾 健忘怔忡”이라고 기록된 이래 心脾兩虛로 인한 健忘, 怔忡을 포함한 失眠, 不安, 眩暈, 全身倦怠, 食慾低下, 驚悸 等症을 치료하는데 사용되어 왔으며⁶⁾, 최근에는 치매, Alzheimer 병, Parkinson 병 등의 중추신경계질환, 제반 출혈 등의 혈액질환, 면역기능 저하, 부인과 질환 및 심인성 질환 등에 응용되고 있다^{12,15)}.

歸脾湯의 구성을 살펴 보면 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草 등 健脾補氣의 대표적인 처방인 <四君子湯>에 當歸, 黃芪 등 補血補氣를 겸하는 처방인 <當歸補血湯>을 加하였고, 補心安神의 작용을 하는 龍眼肉, 酸棗仁, 遠志를 加하였다. 理氣작용을 하는 木香은 補而不滯, 生薑과 大棗는 調和營衛의 작용을 하여 健脾益氣, 補血安神的 효능을 나타낸다^{12,14)}.

이에 저자는 歸脾湯이 glutamate에 의한 정상세포의 손상에 미치는 효과를 실험적으로 구명하기 위하여 rat에서 추출한 일차배양 정상세포에 과량의 glutamate를 처리하여 세포손상을 유도한 후 MTT assay, 형광현미경적 조사, 유식 세포 분석, Western blotting 등의 방법을 이용하여 歸脾湯이 세포생존율, mitochondria, Bcl-2 단백질, ICAD와 PARP 분절에 미치는 영향을 관찰하였다.

그 결과, 세포생존율 측정과 핵 염색을 통하여 glutamate의 세포독성을 확인하였고, 이러한 glutamate의 세포독성을 歸脾湯이 농도 의존적으로 방어하였으며, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 歸脾湯 처리시에는 정상세포 수준인 90%의 생존율을 보였다. 또한 glutamate의 세포독성은 mitochondria의 막전위의 상실을 유도하였으나 여기에 歸脾湯을 전처리한 세포군에서는 정상세포 수준으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 歸脾湯은 glutamate에 의한 H_2O_2 의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다. 歸脾湯이 glutamate의 세포독성을 방어하는 것을 항산화적인 역할과 관련하여 GSH 같은 대표적인 항산화제들을 전처리한 결과, 역시 glutamate의 세포독성을 방어하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 정상세포에 미치는 glutamate의 세포독성이 산화적 손상과 관련한 활성산소종의 생성에 기인하며, 또한 그 결과로 mitochondria의 막전위에 영향을 미쳤음을 알 수 있었다.

세포고사의 조절에 중요한 역할을 담당하고 있는 mitochondria에 대한 최근 보고에 의하면, mitochondria의 기능조절은 세포질로 방출되는 cytochrome c와 같이 caspase activators, 막전위차의 변화 그리고 Bcl-2 family 단백질 등이 관여하는 것으로 알려져 있다^{26,27)}. Bcl-2 단백질은 대표적인 세포고사

억제 단백질로서 mitochondria의 막에 존재하면서 세포의 운명을 결정하게 된다²⁸⁾. 세포고사를 억제하는 Bcl-2 나 Bcl-XL 단백질 등은 세포고사 촉진 단백질인 Bax와 heterodimer를 형성하거나 암세포에서 항암제 처리시 인산화되어 그 기능을 상실하게 된다. 그러나 Bax, Bak, Bad 그리고 Bcl-Xs같은 세포고사 촉진 단백질은 mitochondria로 이동되어 cytochrome c를 방출할 수 있는 pore를 형성하게 하여 세포고사를 촉진시키는 역할을 하는 것으로 추정되고 있다²⁹⁾. 따라서 glutamate에 의한 Bcl-2 단백질의 발현을 감소시키는 것은 mitochondria의 막전위 변화와 세포고사 현상을 설명하는데 중요한 기전들 가운데 하나임을 예상할 수 있다. 그러나 歸脾湯이 이러한 Bcl-2 단백질의 발현을 농도 의존적으로 회복시키는 것은 歸脾湯이 mitochondria의 막전위차 변화 억제와 마찬가지로 glutamate가 mitochondria에 영향을 미치기 이전에 작용했을 가능성을 내포한다.

Glutamate에 의한 정상세포의 고사현상은 전형적인 핵과 DNA 분절 현상을 수반하였으며 세포 내부의 신호전달자인 PARP와 ICAD의 분절을 유도하였다. 세포고사를 대표적으로 유도시키는 자극제인 Fas/Apo와 TNF에 의한 세포고사의 경우 caspase-3의 활성을 수반하는데²⁹⁾ 이 때 활성화된 caspase-3는 PARP, DNA-dependent protein kinase(DNA-PK), actin, fodrin, lamin, ICAD 등 기질의 절단을 일으키는 cysteine protease이며 이들의 활성은 결과적으로 DNA 분절을 진행시키게 된다^{30,31)}.

PARP 등은 caspase-3의 직접적인 기질로서 caspase 활성의 척도가 되고 있으며³⁰⁾, ICAD의 경우 CAD와 결합하여 chaperone을 형성하면서 caspase의 활성화에 의한 DNase의 활성을 억제하는데 세포고사 신호전달을 받은 caspase는 ICAD를 1차적으로 분절시켜 CAD를 자유롭게 만들며 핵으로 CAD의 이동을 원활하게 함으로써 chromosomal DNA를 분해하기에 이른다³¹⁾. 歸脾湯은 이러한 glutamate에 의한 세포고사 신호전달자인 PARP의 분해작용을 억제함으로써 세포독성을 억제함을 알 수 있었다. 그러나 glutamate에 의한 caspase-3 like protease의 활성은 미약하게 나타

났으며, PARP와 ICAD의 분절현상은 세포생존율에 비하여 적게 나타남을 알 수 있었다. 이는 glutamate에 의한 세포고사 현상에 있어서 caspase-3의 활성화 정도가 많지 않았으며, 또 다른 세포고사 기전이 존재할 가능성을 보여준다.

이상의 결과를 종합하면 歸脾湯은 glutamate에 의한 성상세포의 손상에 보호효과가 있으므로 중추신경계의 산화적 손상으로 인한 Alzheimer 병, Parkinson 병 및 뇌졸중 등의 질환에 활용할 수 있을 것으로 여겨지며, 歸脾湯 구성 약물들의 작용기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

歸脾湯이 중추신경계의 손상에 미치는 방어 효과를 구명하기 위하여 과량의 glutamate에 의해 유도된 rat의 성상세포 손상에서 歸脾湯을 전처리한 후 세포 생존율, 염색사 응축, mitochondria, Bcl-2 단백질, ICAD와 PARP 분절 등에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 歸脾湯은 glutamate에 의해 감소된 세포생존율을 농도 의존적으로 증가시켰다.
2. 歸脾湯은 glutamate에 의한 세포고사 현상을 억제하였다.
3. 歸脾湯은 glutamate에 의한 염색사 응축을 억제하였다.
4. 歸脾湯은 glutamate에 의한 mitochondria의 막전위차 상실현상을 억제하였다.
5. 歸脾湯은 glutamate에 의한 Bcl-2 단백질의 분해를 억제하였다.
6. 歸脾湯은 glutamate에 의한 PARP 분절을 억제하였다.

이상의 결과로 보아 歸脾湯은 glutamate에 의한 성상세포의 산화적 손상을 억제하는 항산화 작용이 있으며, 단백질 발현에 영향을 미쳐 성상세포의 보호효과를 나타내고 있으므로 중추신경계의 손상으로 인한 각종 질환에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. 嚴用和. 定四庫全書. 醫家類. 서울:대성문화사. 1995;11:487.
2. 彭懷仁. 中國處方大辭典. 서울:영신문화사. 1990:364-367.
3. 危亦林. 世醫得效方. 서울:의성당. 1990:236.
4. 龔廷賢. 萬病回春. 서울:醫聖堂. 1993:229.
5. 汪詡庵. 醫方集解. 中國 台北:문광도서유한공사. 1986:149-150.
6. 黃度淵. 證脈 方藥合編. 서울:南山堂. 2000:197-198.
7. 강순수. 바른방제학. 서울:대성문화사. 1996:190-191.
8. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:의성당. 2002:631-635.
9. 윤길영. 동의임상방제학. 서울:명보출판사. 1992:516.
10. Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. J. Neurosci. 1987;7:357-368.
11. Cho Y, Bannai S. Uptake of glutamate and cysteine in C6 glioma cells and in cultured astrocytes. J. Neurochem. 1990;55:2091-2097.
12. Kato S, Negishi K, Mawatari K, and Kuo C. A mechanism for glutamate toxicity in the C6 glioma cells involving inhibition of cysteine uptake leading to glutathione depletion. J. Neurosci. 1992;48:903-914.
13. Derick H, Chandan S, Sashwati R. Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiols antioxidants. Am. J. Physiol. 1997;273:1771-1778.
14. Gotz M, Freyberger A, and Riederer P. Oxidative stress: a role in the pathogenesis of Parkinson's disease, J. Neural Transm. Suppl. 1990;29:241-249.
15. Coyle J, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. Science. 1993;262: 689-695.
16. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:대성출판사. 1992:56.
17. Fischer G, Kettenmann H. Cultured astrocytes form a syncytium after maturation. Exp. Cell Res. 1985;159:273-279.
18. Yuzaki M, Mikoshiba K and Kagawa Y. Cerebellar astrocytes specifically support the survival of Purkinje cells in culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993;197: 123-129.
19. Ju C, Yoon KN, Oh YK, Kim HC, Shin CY, Ryu JR, Ko KH and Kim WK. Synergistic depletion of astrocytic

- glutathione by glucose deprivation and peroxynitrite: correlation with mitochondrial dysfunction and subsequent cell death. *J. Neurochem.* 2000;74:1989-1998.
20. Kim YM, Talanian RV and Billiar TR. Nitric Oxide Inhibits Apoptosis by Preventing increase in Caspase-3 like Activity via Distinct Mechanism. *J. Biol. Chem.* 1997;272:311-338.
 21. 鄭遇悅, 安圭錫. 東醫臨床病理學. 서울:永林社. 1998:614-615.
 22. Peter L. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol. Review.*1999;70:1499.
 23. 고재영. 신경계 질환에서의 apoptosis. *유전.* 1998;2:147-165.
 24. 金都煥. Nitric Oxide에 의해 유발된 C6 glial 세포독성에 대한 四物湯의 방어효과. *대한한방내과학회지.* 2000;21(4):535-542.
 25. 李英九. 右歸丸이 Zinc에 의한 神經膠細胞의 고사에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 2000.
 26. S Desagher and JC Martinou. Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trends. Cell. Biol.* 2000;10(9):369-77.
 27. I Budihardjo, H Oliver, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1999;15:269-90.
 28. Martin SJ and Green DR. Protease activation during apoptosis. Death by a thousand cuts. *Cell.* 1995;82:349.
 29. Henkart PA. ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death. *Immunity.* 1996;4:195.
 30. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG and Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.* 1994;371:346.
 31. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998;391(6662):43-50.