

베타 아밀로이드 유도성 Neuro 2A 細胞毒性에 대한 聰明湯의 效果

국윤재 · 최 혁 · 김태현 · 강형원* · 유영수

원광대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Chongmyung-tang Inhibits the Cytotoxicity of Beta-amyloid in Neuro 2A Neuroblastoma Cells

Yun Jai Gug, Hyuk Choi, Tae Heon Kim, Hyung Won Kang*, Young Su Lyu

Department of Neuropsychology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea

The water extract of Chongmyung-tang has been traditionally used for treatment of memory-disorder in oriental medicine. This study was designed to investigate the protective mechanisms of Chongmyung-tang on β -amyloid or H_2O_2 -induced cytotoxicity in Neuro 2A cells. The water extract of Chongmyung-tang significantly reduced both β -amyloid or H_2O_2 -induced cell death and apoptotic characteristics through reduction of intracellular peroxide generation. Also, it inhibited the mitochondrial dysfunction including the disruption of mitochondria membrane permeability transition(MPT) and the modulation in expression of Bcl-2 family proteins in H_2O_2 -treated H9c2 cells. Furthermore, pretreatment of quercetin inhibited the activation of caspase-3, in turn, degradation of ICAD/DEF45 were completely abolished in H_2O_2 -treated cells. Taken together, that data suggest that the protective effects of the water extract of Chongmyung-tang against β -amyloid induced oxidative injuries may be achieved through modulation of mitochondrial dysfunction.

Key words : Chongmyung-tang(聰明湯), β -amyloid, H_2O_2 , MPT, Apoptosis, Bcl-2, ICAD/DEF45

서 론

痴呆는 보통 뇌의 만성, 또는 진행성 질환에서 생긴 뇌 증후군(syndrome)으로 기억·사고·지남력·이해·계산·학습능력·언어와 판단력을 포함하는 여러 가지 고위대뇌피질기능의 장애가 있는 것을 말한다^{1,2)}. 이러한痴呆 중에서도 대표적 노인성 질환인 Alzheimer's disease(AD)는 진행성痴呆로 점진적인 뇌위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 하는 원발성 퇴행성 대뇌질환으로, 거의 모든 연령에서 생길 수 있으며 나이가 들면서 점차 그 빈도가 증가한다고 알려져 있다^{3,4)}.

AD는 CT나 MRI 검사상 전반적인 뇌위축과 대뇌피질 및 피질하 백질에 산재하는 老人斑(senile plaque), 그리고 신경섬유다발의 구조가 침착되며 老人斑 주변에 활성화된 교세포들이 발견

되는 병리학적 변화가 특징으로^{2,5,6)}, 생화학적으로는 아세틸콜린 합성 효소의 活性이 저하되어 있고, 老人斑과 뇌혈관에서 아포리포단백질 또는 베타 아밀로이드 단백질이 분리되어 있으며, 21번 염색체에 그 유전자가 위치하고 있는 것도 확인되었다⁷⁾. 그 원인에 대해서는 다양한 가설들이 있으며 그 중에 베타 아밀로이드 단백질이 중요한 원인적 인자로 알려져 있으나 AD가 왜 생기는지 그 발생기전은 아직 잘 모르는 상태이다.

한의학에서痴呆는 呆病과 유사한 용어로, 明代 張⁸⁾의 <景岳全書·雜病謬>에 처음 언급된 이후, 呆病^{9,10)}, 癡狂¹¹⁾, 健忘¹¹⁻¹³⁾, 虛勞¹⁴⁾ 등의 범주에서 다루어져 왔으며 여기에 많이 쓰이는 처방으로 聰明湯이 있는데, 이는 許浚¹⁵⁾의 <東醫寶鑑·內景篇>에서 “多忘”을, <醫部全錄>¹⁶⁾에서는 “不善記而多忘者”를 치료하는 것으로 기재되어 있으며, 歷代醫家들¹⁷⁾에 의해 記憶力 減退, 健忘 등의 病症을 치료하는 데에 활용되어 왔다.

痴呆에 대한 연구는 한의학에서도 활발히 진행되고 있는데, 문헌적^{18,19)}, 임상적 연구²⁰⁾ 외에 실험적 연구²¹⁾도 다수 보고되어

* 교신저자 : 강형원, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대군포산본병원

· E-mail : antialz@empas.com · Tel : 031-390-2762

· 접수 : 2004/06/28 · 수정 : 2004/08/09 · 채택 : 2004/09/09

있으며, 聰明湯에 관한 실험적 연구^{22,23)}도 보고되었지만 아직은 그리 많지 않은 실정이다. 이에 저자는 聰明湯이 AD에 유효하리라 생각되어 본 실험에 착수하였다.

본 연구에서는 AD의 주요 病因 중의 하나인 베타 아밀로이드 펩타이드(β -amyloid)를 신경아종 세포인 Neuro 2A 세포주에 직접 처리하여 세포사멸 현상의 기전을 밝히고, 이때 발현되는 표적 단백질 등을 2-D gel 전기영동을 통하여 조사하였으며, 베타 아밀로이드에 의한 세포사멸을 방어할 것으로 사료되는 聰明湯의 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

Rat에서 유래한 신경아종 Neuro 2A 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하여 계대 배양하면서 실험을 실시하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 약재는 東醫寶鑑¹⁵⁾에 기재된 구성내용을 바탕으로 하여 원광대학교 전주한방병원에서 정선한 것으로 한 접 분량은 다음과 같다.

Table 1. Composition of Chongmyung-tang

韓藥名	生藥名(學名)	重量(g)
白茯苓	Hoelen	37.5
遠志	Polygalae Radix	37.5
石菖蒲	Acori Rhizoma	37.5
Total amount		112.5

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 Duplecco's modified Eagle's medium(DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며 배양 용기(24-well plate, 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Methylthiozyl-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide(이하 MTT), crystal violet은 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Bcl-XL/S, ICAD/DFF45, HO-1 등의 항체들은 모두 Santa Cruz 사(San Diego, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 Enhanced chemiluminescence kit(이하 ELC kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) Neuro 2A 세포주 배양

Rat에서 유래한 신경아종 세포주인 Neuro 2A(ATCC, CRL1446)는 CO₂ 세포배양기에서(37°C, 5% CO₂) 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM에서 배양하였다. 48시간 주기로 0.05% Trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid(이하 EDTA)를 사용하여 계대 배양하였으며, 분주 12시간 후에 약재를 처리하여, 세포

죽음과 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

2) 세포생존율 측정

세포생존율은 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10⁵ cells/ml)를 1ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, 배양액 최종 부피의 1/10 MTT 용액(5mg/ml in phosphate-buffered saline(이하 PBS))을 첨가하여 4시간 반응하였다. 생존 세포에 의해 형성된 보라색 formazan은 10% sodium dodesyl sulfate(이하 SDS)가 포함된 0.01N HCl 용액 100 μ l/well을 세포에 첨가하여 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) 세포의 형태적 변화 측정

세포의 형태적 변화를 조사하기 위하여 Neuro 2A 세포에 聰明湯을 처리한 후, PBS(pH 7.4)로 2회 세척하였다. 세포는 포름 알데히드(3.7%)가 포함된 0.5% crystal violet 용액으로 실온에서 5분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 위상차 현미경(Phase contrast microscope, Nikon, TE300, Japan)으로 관찰하였다.

4) H₂O₂ 생성의 측정

Neuro 2A 세포는 50 μ M의 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate(이하 DCF-DA)와 30분간 반응한 후, PBS로 세척하여 형광 현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다. DCF-DA는 세포내 H₂O₂에 의해서 deacetylation되어 dichlorofluorescein이 형광을 내는 물질로 전환되었다.

5) Western blot analysis

세포는 聰明湯을 처리한 후 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH7.4)으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(이하 PMSF), 1 μ g/ml aprotinin)과 4°C에서 30분간 반응하였다. 세포 파쇄액은 13,000rpm에서 20분간 원심분리하여, 상층액은 bicinoninic acid(이하 BCA) 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질 : 200 μ g)은 2× sample buffer와 혼합하여 100°C에서 5분간 가열한 후에 12.5% sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(이하 SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane 상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응하여 비특이적 항체결합을 예방하였다. Bcl-XL/S, ICAD/DFF45 및 HO-1에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/tris-buffered saline(이하 TBS)에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응한 후 이차항체(anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase)와 1시간 반응하였다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3회 세척한 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 현상하였다.

6) JC-1 염색

세포내 소기관 하나의 미토콘드리아의 막전위(membrane potential)의 변화를 조사하기 위하여 JC-1 염색을 시행하였다.

聰明湯으로 처리된 세포들은 PBS로 2회 세척하였다. JC-1(10 μ g/ml)은 DMEM 배지에 희석하여 20분 CO₂ 배양기에서 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

7) 2-D gel 전기영동

(1) 시료 준비와 등전위 전기영동(IEF)

Neuro 2A 세포에 聰明湯을 처리한 후 포집하여, 세포 파쇄 용액과 4℃에서 30분간 반응시켰다. 세포 파쇄액은 12,000rpm에서 20분간 원심분리 후 Bradford 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질은 등전점(isoelectric point)에 기초하여 분리하기 위하여 immobiline dry strip(Phamacia, Buckinghamshire, England)을 사용하였다. Strip은 IEF를 시행하기 전에 rehydration solution(8M urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG ampolyte, 0.3% dithiothreitol(이하 DTT), bromophenol blue)에 단백질(250 μ g)과 함께 넣고 12시간 rehydration을 시행하였다. Rehydration을 시행한 strip은 MultiphorII(Phamacia)에서 100kVh로 focussing하였다(0-300V : 1min, 300-3500V : 1hr 30min, 3500V : 10hr). 등전위 전기영동을 끝낸 strip은 평형화 용액(30% glycerol, 6M urea, 2% SDS, 50mM Tris-HCl, 65mM DTT, bromophenol blue)으로 평형화하였다.

(2) SDS-PAGE

단백질은 분자량에 기초하여 분리하기 위하여 단일 12% acrylamide gel(180 \times 200 \times 1.0mm)을 사용하였다. 평형화된 strips은 gel 상단에 옮기고 1% agarose sealing solution으로 고정한 후, proean II XI cell(BIO-RAD, CA, USA)로 각 gel당 40mA로 전기영동하였다. Gel의 단백질은 silver staining으로 확인하였다.

8) 결과 산출

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이며 실험결과와 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였으며 p-value가 최대치 0.05(p <0.05)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

실험성적

1. 베타 아밀로이드 및 H₂O₂에 의한 Neuro 2A 세포주의 생존율 변화

다양한 농도의 베타 아밀로이드와 H₂O₂를 각각 12시간 처리한 후 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정한 결과 세포의 생존율은 0.1 μ M 베타 아밀로이드 처리군에서는 대조군의 79%, 1 μ M 농도에서는 58%로 현저히 감소하였으며, 20 μ M의 농도에서는 38% 미만으로 감소하였다(Fig. 1A). 또한 H₂O₂의 세포독성에 있어서 세포독성은 150 μ M H₂O₂ 처리군에서 대조군의 71%, 400 μ M 농도에서는 23% 미만으로 현저히 감소하여(Fig. 1B) 베타 아밀로이드 및 H₂O₂에 의한 Neuro 2A의 세포독성은 농도의존적으로 축적됨을 알 수 있었다.

2. 베타 아밀로이드에 의한 Neuro 2A 세포사멸에서 H₂O₂ 생성 변화

먼저 H₂O₂ 처리에 의한 DCF-DA의 형광 변화를 알아보기 위하여 300 μ M 농도의 H₂O₂를 2시간 처리한 후 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 대조군에 비하여 현저한 형광의 변화가 관

찰되었으며, 1 μ M 베타 아밀로이드에 의해서도 처리 4시간 이후부터 DCF-DA의 형광 변화가 관찰되기 시작하여 처리 6시간 이후에 최대의 형광변화를 보였다. 이상의 결과로 베타 아밀로이드에 의한 세포사멸은 세포내 H₂O₂의 생성에 의한 것으로 판단된다.

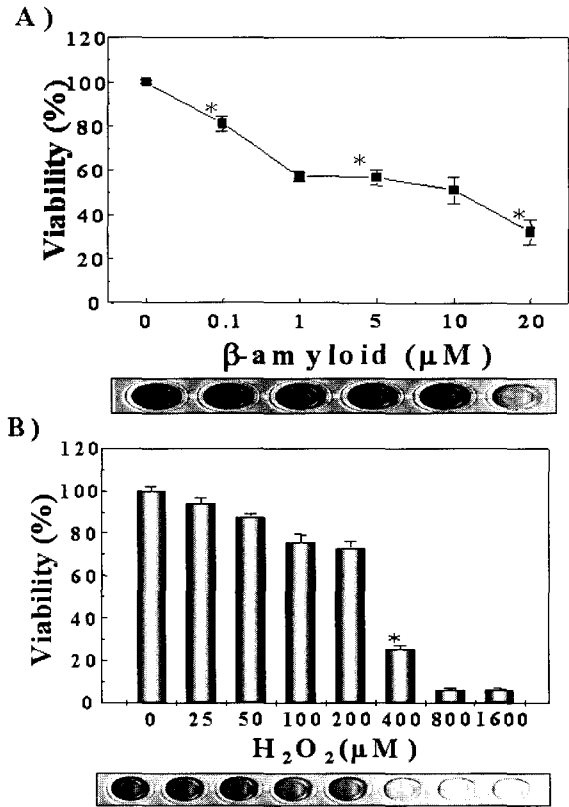


Fig. 1. Effects of β -amyloid and H₂O₂ on viability of Neuro 2A cells in a dose-dependent manner. Cells were treated with various concentrations of β -amyloid for 12 hr(A), or added with 150 μ M H₂O₂ for 12 hr(B). Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean \pm S.D. of quadruplicates. * p<0.001 by student's t-test, compared with control group.

3. 聰明湯의 베타 아밀로이드 및 H₂O₂에 의한 Neuro 2A 세포사멸에 대한 효과

Neuro 2A 세포 손상에 대한 한약 처방의 보호효과를 알아보기 위하여 聰明湯, 地黃飮子 및 洗心湯 등의 한약 처방을 다양한 농도로 30분 전처리한 후 300 μ M의 H₂O₂를 12시간 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 세포생존율은 H₂O₂ 단독 처리군에서 대조군의 41%를 보였으나 聰明湯 전처리 실험군은 75 μ g/ml의 농도에서는 58%, 150 μ g/ml의 농도에서는 63%, 300 μ g/ml의 농도에서는 68%, 그리고 600 μ g/ml에서는 75%의 세포생존율을 보였다. 이때 세포내 H₂O₂의 변화를 DCF-DA 염색을 통해 형광현미경으로 관찰한 결과 聰明湯의 전처리에 의해서 세포내 H₂O₂의 생성이 감소되었으며, 베타 아밀로이드에 의해 생성된 H₂O₂도 뚜렷하게 감소하였다. 또한 이때 聰明湯 단독처리에 의해서는 아무런 영향을 받지 않았다. 그러나 洗心湯의 한약처방은 자체 독성을 보였으며, 地黃飮子도 마찬가지로 H₂O₂에 의한 Neuro 2A의 세포독성에 보호효과를 나타내지 못하였다.

4. 聰明湯의 H₂O₂에 의한 Neuro 2A 세포의 형태적 변화에 대한 효과
crystal violet 염색을 통해 위상차 현미경으로 세포의 형태 변화를 관찰한 결과 Neuro 2A 세포는 H₂O₂(300μM) 6시간 단독 처리시 세포수의 현저한 감소와 세포막의 수포화 등의 변화가 관찰되었으나, 聰明湯(600μg/ml)을 30분간 전처리한 실험군에서는 대조군 수준으로 세포수와 형태가 유지되는 것을 확인하였다. 또한, 聰明湯 단독처리군의 세포수 및 형태는 대조군과 유사하여 聰明湯 자체의 세포독성은 확인할 수 없었다.

5. 聰明湯의 Neuro 2A 세포사멸에서 HO-1 단백질 발현에 대한 효과
산화적 손상에 의해서 세포내 발현이 증가되는 HO-1 단백질에 대한 聰明湯의 효과를 Western blot 방법으로 조사하였다. Neuro 2A 세포의 HO-1 단백질 발현은 300μM H₂O₂ 처리 6시간 이후에 발현이 최대로 증가하였다. 또한 베타 아밀로이드 처리 6시간 이후에 발현이 증가하였던 HO-1 단백질은 聰明湯 600μg/ml를 30분 전처리한 실험군에서는 대조군 수준으로 뚜렷하게 감소하였다. 이때 단백질은 β-actin을 통하여 동량임을 확인하였다.

6. 聰明湯의 H₂O₂에 의한 Bcl-XL, Bcl-XS 및 ICAD/DFF45 단백질 발현에 대한 효과

세포고사 신호전달계에서 caspase-3의 활성화에 중요한 기관인 미토콘드리아에 연관된 Bcl-2 family 단백질군 즉, Bcl-XL와 Bcl-XS의 발현을 조사하였다. Neuro 2A 세포에 600μg/ml 聰明湯을 30분 전처리한 후 300μM H₂O₂를 처리하여 세포부유액으로부터 이들 단백질의 발현을 Western blot 방법으로 조사하였다. Neuro 2A 세포의 anti-apoptotic Bcl-XL 단백질의 발현은 300μM H₂O₂를 6시간 처리시 대조군에 비교하여 현저히 감소하였지만 600μg/ml 聰明湯을 30분간 전처리한 실험군에서는 대조군 수준이었다. 또한 H₂O₂는 pro-apoptotic Bcl-XS 단백질의 발현을 현저히 증가시켰으나 聰明湯 전처리에 의해서는 대조군 수준이었다. 또한 세포고사 신호전달계의 잘 알려진 effector 분자로서 caspase-3의 세포내 표적 분자인 ICAD/DFF45의 발현을 조사하였다. 150μM의 H₂O₂를 8시간 단독 처리시 ICAD/DFF45는 분해되어 이들 밴드가 사라진 형태로 나타났다. 그러나 600μg/ml 聰明湯을 전처리한 실험군에서는 H₂O₂에 의한 이들 효소의 분해가 억제되어 대조군 수준의 발현을 나타냈다. 이상의 결과는 聰明湯이 H₂O₂에 의한 Neuro 2A 세포의 caspase-3 활성을 방해하는 효과를 시사한다. 이때 β-actin 단백질 발현을 통해 동량임을 확인하였다.

7. 聰明湯의 H₂O₂에 의한 미토콘드리아 막전위 변화에 대한 효과

300μM H₂O₂ 처리에 의한 Neuro 2A의 세포사멸은 caspase-3의 활성을 시사하였고, 또한 Bcl-2 family 단백질의 발현 변화가 미토콘드리아의 기능 변화 가능성을 간접적으로 시사하였다. 이에 미토콘드리아의 막전위차 변화(membrane potential transition; MPT)를 확인하기 위하여 JC-1 형광염색을 시행하였다. 300μM H₂O₂ 단독 처리군에서는 형태학적인 변화와 함께 정상 대조군의 오렌지 형광이 녹색 형광으로 변하였으나(Fig. 2B), 600μg/ml 聰明湯 전처리 실험군에서는 대조군 수준(Fig. 2A)의 오렌지 형광

으로 회복되었다(Fig. 2D).

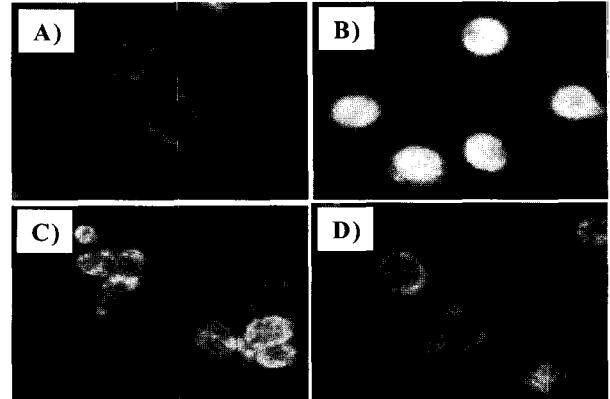


Fig. 2. Chongmyung-tang inhibited the disruption of mitochondrial membrane potential transition in H₂O₂-treated Neuro 2A cells. Cells were treated with 300 μM H₂O₂ in the absence and presence of 600 μg/ml Chongmyung-tang for 6 hr. Cells were stained with 10μg/ml of JC-1(A, B, C and ×50) and visualized under a fluorescent microscope. The data were one of three independent experiments. Control cells (A), 300 μM H₂O₂ (B), 600 μg/ml Chongmyung-tang only (C) and 300 μM H₂O₂ with 600 μg/ml Chongmyung-tang treated Neuro 2A cells (D).

8. 2-D를 통한 단백질의 발현 비교

Neuro 2A 세포에 8시간 H₂O₂(300μM), 베타 아밀로이드(1μM)를 각각 단독처리한 실험군과 聰明湯(600μg/ml)을 30분 전처리한 실험군의 세포를 포집하여, 파쇄한 후 단백질 추출물(250μg)의 2-D 전기영동을 시행하였고, 단백질 spots은 silver staining으로 가시화하였다. Fig. 3에서는 단백질 250μg을 2-D gel 상에서 전개하여 약 200여개의 spots을 비교하였다. 이때 H₂O₂ 처리군(Fig. 3B)과 베타 아밀로이드 처리군(Fig. 3C)에서는 대조군과 비교시 1, 2, 3 및 4번 spot의 발현이 증가하였고, gate #B, C, D, G 및 F의 spots 발현 변화가 뚜렷하였으며(Fig. 4), 특히 gate #A와 E의 spots은 베타 아밀로이드 처리군에서만 유의한 발현 변화가 관찰되었다(Fig. 5A). 그러나 聰明湯을 전처리한 실험군에서는 베타 아밀로이드 처리에 의해 발현이 증가하였던 1, 2 및 3번 spots이 대조군 수준으로 감소하였으나, 4번 spot은 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 5B). 또한 gate #A, B, C, D, E, G 및 F 각각의 spots은 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 5B).

고 찰

현대사회에 접어들면서 나름대로의 삶을 누리는 사람들의 최대 관심사는 건강으로 쏠리고 있으며, 특히 인구증가와 평균수명 연장으로 노령인구가 점점 증가하게 됨에 따라 뇌의 퇴행성 변화로 인한 질환을 비롯한 여러 가지 의학적 문제점들이 사회 문제로까지 대두되고 있다²⁴⁾. 이러한 뇌의 퇴행성 변화로 인한 질환 중에 뇌졸중이나 뇌 손상, 척수 손상 및 癱瘓은 신경성 퇴행 질환으로서 신경 세포의 손상에 의하며, 이러한 癱瘓 중에서도 대표적 노인성 질환인 Alzheimer's disease(AD)는 진행성 癱瘓으로 점진적인 뇌위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 하는 원발성 퇴행성 대뇌질환으로, 처음에는 初老期(65세 이전)에서만

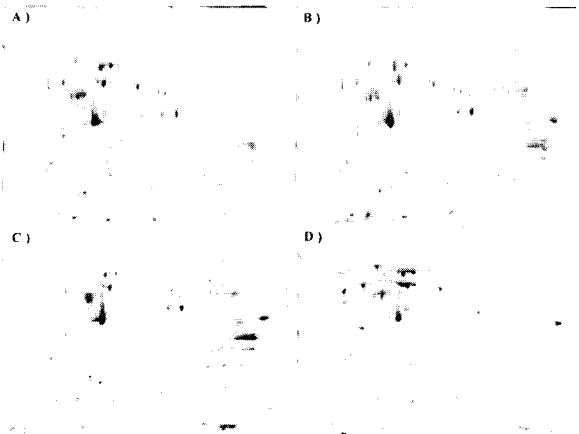


Fig. 3. Silver staining of 2-D gel in Neuro 2A cells. (A) Control cells, (B) cells treated with H₂O₂, (C) cells treated with β -amyloid and (D) cells pretreated with Chongmyung-tang before β -amyloid

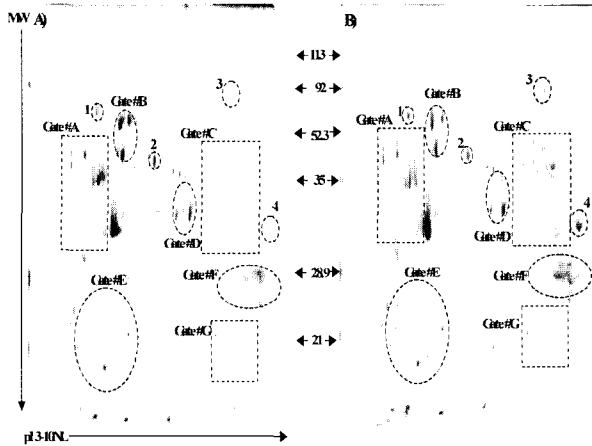


Fig. 4. Schematic representation of silver stained 2-D gel in Neuro 2A cells treated with 300 μ M H₂O₂ for 8hr. Molecular weight (MW) and isoelectric point(pI) of a set of proteins identified in the pattern. Lysate was subject on 2-D electrophoresis and stained with silver staining. (A), control and (B), cells treated with H₂O₂.

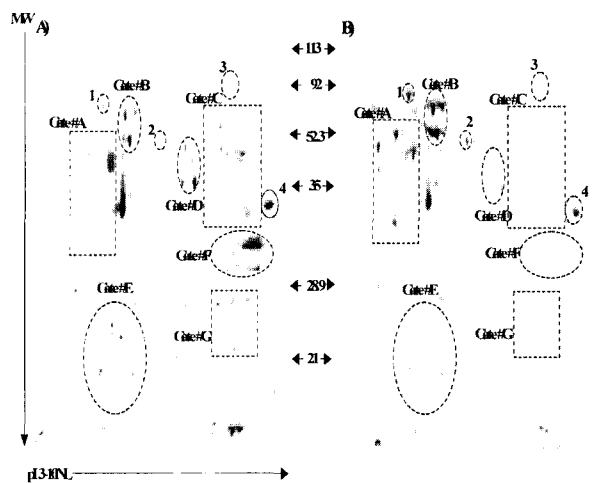


Fig. 5. Schematic representation of silver stained 2-D gel in Neuro 2A cells treated with 1 μ M β -amyloid for 8hr. Molecular weight (MW) and isoelectric point(pI) of a set of proteins identified in the pattern. Lysate was subject on 2-D electrophoresis and stained with silver staining. (A), cells treated with β -amyloid and (B), cells pretreated with Chongmyung-tang before β -amyloid.

생기는 질환으로 생각하였으나 현재는 모든 연령에서 생길 수 있으며 나이가 들면서 점차 그 빈도가 증가한다고 알려져 있다³⁴⁾.

AD는 1907년 독일의 알로이스 알츠하이머가 급격한 기억력 장애와 실어증 및 편집증을 보인 51세 환자를 처음 보고함으로써 알려졌다고, 이를 65세 이후 발병하는 노인성 癡呆와 달리 65세 이전에 발병하는 初老期 癡呆(presenile dementia, early-onset)라고 하였다. 이러한 AD는 병리학적으로 老人斑(senile plaque)을 특징으로 하는데, 이 老人斑은 이형성 neurite로서 세포 밖에 베타 아밀로이드 펩티드가 핵을 이루면서 쌓인 것으로, 펩티드 병변은 비례적으로 신경원의 진행적인 소실을 동반하여 해마, 신피질(neocortex), 편도(amygdala), 뇌간핵 및 전뇌 뇌저부의 콜린성 신경계에서 신경회로의 선택적인 손상을 일으켜 癡呆를 일으키는 가장 중요한 원인 중의 하나이다.

AD의 원인은 아직 밝혀져 있지 않으나 5~10%는 유전자 변이에 의한 가족형이고 나머지 대부분은 후천성인 산발형으로 추정되고 있다. AD로 사망한 환자의 뇌를 현미경으로 관찰하면 아밀로이드라는 물질이 쌓여 老人斑(senile plaque)을 형성하고, 뇌 신경세포 내에는 신경원섬유 변화(neurofibrillary tangle)가 있는 것을 관찰할 수 있다. 정상인은 아밀로이드 전구단백질에서 P3이라는 아밀로이드 단백질이 만들어지는데 AD 환자들에서는 베타 아밀로이드가 만들어진다. 이 베타 아밀로이드는 자기들끼리 뭉쳐 아밀로이드판(amyloid plaque)을 형성하고, 염증반응을 일으키며 신경세포에 유해한 결과를 가져온다. 그러나 아직까지 왜 아밀로이드라는 물질이 뇌세포 안에 쌓이는지에 대해서는 충분히 밝혀지지 않았다. 다만 환경적인 요인과 유전적인 요인이 대두되고 있는데 여러 요인이 복합적으로 작용하여 병을 일으키는 것으로 추정하고 있을 따름이다.

최근의 연구에서는 유전자적인 요인에 더 비중을 두고 있다. 즉 잘못된 유전자로부터 잘못된 단백질이 만들어져 뇌세포가 제 기능을 하지 못하고 죽어가는 것으로 설명하고 있는데 잘못된 유전자가 있는 위치는 상염색체 1, 14, 19, 21 등으로 매우 다양한 것으로 알려져 있다.

한의학에서 뇌에 대한 논의는 예전부터 있어 왔다. 內經의 <素問·五臟別論篇>²⁵⁾에서는 “或而腦髓爲臟 或而爲腑..... 故藏而不瀉, 名曰奇恒之腑”라고 하여 뇌를 여섯 개의 奇恒之腑 중의 하나로 보았고, “腎生骨髓”²⁵⁾ “腦爲髓之海”²⁶⁾라 하여 뇌의 발생학적인 연관성을 말하였으며, 腎의 生理作用의 발현 장소로 인식하였다^{27,28)}. 後世에 이르러 뇌의 기능에 대한 인식이 進一步하여 李²⁹⁾가 “腦爲元神之府”라 하여 뇌가 神을 총괄하는 주체적인 기관임을 처음으로 주창한 이래²⁷⁾, 王³⁰⁾은 “人之記性 皆屬腦中”이라 하여 뇌의 기억작용을 말하여 오늘날 서양의학적인 뇌와 유사한 개념으로 인식하였다.

뇌의 病理에 대해서는 <靈樞·海論篇>²⁶⁾에 “髓海有餘 輕徑多力 自過其度 髓海不足 腦轉耳鳴 脛痠眩冒 目無所見 懶怠安臥”라고 하여 腦髓의 充足與否에 따라 인체의 五臟六腑와 四肢百骸 그리고 五官九竅活動의 盛衰도 관계됨을 말하였고, 구체적인 病症으로 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘, 知能低下, 癡呆 등³¹⁾이 나타나며 그 주요 원인으로는 肝腎虛弱과 痰瘀라고 하였다³²⁾.

뇌와 관련된 病症 중에 痴呆에 대한 최초의 기록은 明代 張⁸⁾의 <景岳全書·雜病模, 癡狂痴呆篇>에 痴呆란 病名으로 처음 언급되었으며 이후 呆病^{9,10)}, 癡狂¹¹⁾, 健忘¹¹⁻¹³⁾, 虛勞¹⁴⁾ 등의 범주에서 다루어졌는데, 清代의 陳¹⁰⁾은 그의 저서 <石室秘錄>에서 呆의 증상과 함께 치료에서 治痰의 중요성을, 錢⁹⁾은 <辨證奇聞全書>에서 呆病의 病因病機와 증상에 관하여 비교적 자세한 설명을, 黃³³⁾ 등의 <實用中醫內科學>에서는 “痴呆于稱呆病..... 數日不之飢餓等 此類患者多不能獨自處理日常生活 甚至不能 抵禦危險傷害”라 정의하였다. 주된 원인으로 陳¹⁰⁾은 呆病의 주요원인을 痰으로 보았고, 錢⁹⁾은 肝氣鬱結과 胃氣衰退로 胸中の 痰이 鬱滯되어 痴呆가 發한다고 하였으며, 黃³³⁾ 등은 肝腎不足을 老年 痴呆의 주요한 病因으로 보았다. 이와 같이 인간의 老化和 뇌의 퇴행성 병변과 깊이 관련되어 있는 痴呆의 病因病機는 痰의 생성이 뇌에 停滯됨으로 인해 각종 증상이 나타나고 臟腑적으로는 肝腎不足이 중요하게 작용하고 있음을 알 수 있다.

聰明湯은 許浚¹⁵⁾의 <東醫寶鑑·內景篇>에서 “多忘”을, <醫部全錄>¹⁶⁾에서는 “不善記而多忘者”를 치료하는 것으로 기재되어 있으며, 歷代醫家들¹⁷⁾에 의해 記憶力 減退, 健忘 등의 病症을 치료하는 데에 활용되어 왔다. 本方은 白茯苓, 遠志, 石菖蒲 등 세 가지 약물로 구성되어 있는데, 白茯苓은 甘平하여 寧神安神, 利水滲濕, 健脾補中시키고, 遠志는 苦辛溫하여 安神益智, 鎮心, 祛痰利竅시키는 效能이 있으며, 石菖蒲는 辛溫하여 開竅安神, 化痰濕, 和中辟濁의 효능이 있다^{34,35)}. 따라서 本方은 安神定志시키는 處方으로 神志類 疾患에 다용하고 있는 바, 기억력 감퇴를 위주한 정신활동장애의 증상이 나타나는 痴呆 등 뇌의 퇴행성 질환에 활용할 수 있을 것이다. 聰明湯에 관한 실험적 연구로는 徐²²⁾ 및 金²³⁾ 등의 논문이 다수 보고되어 있지만 아직은 그리 많지 않은 실정이다. 이에 저자는 聰明湯이 AD에 유효하리라 생각되어 본 실험에 착수하게 되었다.

본 연구에서는 AD에서 뇌 실질세포의 직접적인 손상기전을 밝히면서 정상적으로 신경세포의 노화 과정에서 형성된 베타 아밀로이드가 세포내에 축적되어 일어나는 세포사멸 현상을 조사하기 위해, 신경아종 세포 Neuro 2A에 베타 아밀로이드 펩타이드를 처리하여 세포사멸 기전과 세포독성을 예방할 수 있는 聰明湯의 가능성을 조사하고, 작용 기전 및 작용 표적 단백질을 발견하고자 하였다.

먼저 베타 아밀로이드 펩타이드는 신경아종 세포주 Neuro 2A 세포에 농도 의존적인 세포독성을 보였으며, 이때 베타 아밀로이드에 의한 세포독성은 세포내 H₂O₂ 생성에 의한 것임을 확인하였다. 이렇게 유발된 Neuro 2A 세포사멸에 대한 聰明湯의 보호효과는 처리 농도에 의존적으로 세포독성을 억제하였다. 즉 이 연구에서 聰明湯은 H₂O₂(300μM) 처리시 나타나는 특징적인 세포고사 현상의 세포막 수포화 현상을 억제하였다.

신체의 각 臟器는 환경에서 오는 다양한 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위하여 즉각적으로 반응한다. 대표적인 예로 헤모글로빈을 비롯한 heme 단백질의 보결분자체인 heme을 담즙 색소(biliverdin, bilirubin)와 일산화탄소와 환원철(Fe²⁺)로 분해하는 Heme Oxygenase(HO)를 들 수 있다. Heme Oxygenase는

최소 두가지의 isozyme(HO-1과 HO-2)이 보고되고 있는데, HO-2는 구성형 효소이고, HO-1은 각종 스트레스원에 반응하여 세포내에서 유도 발현되는 효소로 이 효소의 반응을 조사하여 스트레스 검출에 이용할 수 있다. 이 연구에서 베타 아밀로이드 처리는 Neuro 2A 세포의 HO-1 단백질 발현을 증가시켰는데, 이러한 결과는 베타 아밀로이드에 의한 Neuro 2A의 세포독성이 세포내 H₂O₂ 생성에 의한 것임을 시사한 것이다. 그러나 聰明湯으로 전처리한 것은 베타 아밀로이드에 의한 HO-1 발현을 억제하였다.

세포고사를 조절하는 Bcl-2는 사람의 림프종(human follicular lymphoma)과 관련된 유전자로서 크게 세포사멸 촉진 단백질과 세포사멸 억제 단백질의 두 부류가 존재한다^{36,37)}. H₂O₂는 Neuro 2A 세포사멸에서는 Bcl-XS 발현의 증가 그리고 Bcl-XL의 발현 감소를 초래하였다. 또한 이러한 apoptogenic Bcl-XS의 발현 증가와 비교된 antiapoptotic Bcl-XL 발현 감소에 따른 비율의 감소가 초래되어 H₂O₂에 의한 Neuro 2A 세포사멸을 촉진하였을 것으로 판단된다. 聰明湯은 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-XL의 발현 증가와 세포사멸 촉진 단백질인 Bcl-XS의 발현 감소를 유도하여 H₂O₂ 세포독성을 방어하였다. 이 연구 결과에서는 H₂O₂는 caspase-3의 세포내 표적 단백질인 ICAD/DFF45의 분해를 초래하였으며, 미토콘드리아 막전위차 감소가 발생하여 기능장애를 유도하였다. 이는 Bcl-2 단백질군의 발현 변화에 따른 미토콘드리아 기능장애에 의해 caspase가 활성화되어 세포고사가 촉진되었다고 판단된다. 이러한 결과는 1960년대부터 보고되었던 알츠하이머형 痴呆에서 미토콘드리아의 구조 혹은 기능의 이상과 일치하는 것으로, 聰明湯의 Neuro 2A 세포사멸 방어효과는 미토콘드리아 막전위차 감소를 억제하는 현상과 연관함을 확인할 수 있었다.

1980년 이래 20년 동안 유전자 조작 기술의 발달과 더불어 DNA 및 RNA를 포함한 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되어 high-throughput 유전자 분석 기술이 크게 발달하였으며³⁸⁾, 이를 이용하여 인간 게놈 프로젝트가 진행되어 전체 인간 유전자의 염기 서열이 모두 밝혀졌으나, 그 유전자가 발현하는 단백질의 기능에 대한 연구는 현재 진행 중이다³⁹⁾. 이 연구에서는 베타 아밀로이드에 의한 세포 손상을 방어하는 聰明湯의 표적 단백질을 발굴하여 그 기능을 규명하기 위하여 2-D gel 전기영동을 시행하였다⁴⁰⁾. 그 결과 2-D gel 전기영동을 이용하여 세포 단백질을 분리, 전개하여 약 200여개의 spots 중에서 베타 아밀로이드 처리와 H₂O₂ 처리시 발현 변화를 비교하였다.

이상의 연구 결과를 종합하면 베타 아밀로이드에 의해 유도된 Neuro 2A 신경아종 세포의 사멸은 세포내에서 생성된 H₂O₂에 의한 세포의 형태적 변화를 동반한 세포막 수포화 현상, caspase-3의 활성화에 따른 ICAD/DFF45의 분해, Bcl-XL의 발현 감소, Bcl-XS 단백질의 발현 증가 및 미토콘드리아 막전위차 감소를 보이는 전형적인 세포고사 현상이었다. 그러나 聰明湯은 이러한 산화적 손상으로부터 세포막 수포화 및 세포고사성 단백질의 발현 조절을 통해 Neuro 2A 세포를 보호하였다. 2-D 전기영동을 통해 확인된 여러 단백질은 추후에 matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer(이하

MALDI-TOF) 등의 아미노산 서열에 대한 정확한 분석 및 기능 연구 등을 통하여 베타 아밀로이드 및 산화적 손상에 의한 퇴행성 신경질환에서의 역할에 대해 연구되어야 할 것으로 생각된다. 또한 聰明湯의 작용 표적인자로서 단백질의 발현 기전, post-translational modification 및 단백질-단백질 상호결합 등의 연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다. 그리고 이러한 high-throughput 분석법은 AD의 산화적 손상 기전의 연구와 방어제제의 개발에 관련된 표적인자의 발견, 규명, 선별 및 분석에 사용됨으로써 질환의 진단, 예방 및 치료에 기여할 것으로 사료된다.

결론

베타 아밀로이드에 의한 Neuro 2A 신경아중 세포의 산화적 손상에 대한 聰明湯의 보호 효과를 확인하기 위하여 세포생존율 변화, 세포의 형태적 변화, HO-1, Bcl-XL, Bcl-Xs 단백질의 발현, 미토콘드리아 막전위차 감소, caspase-3의 활성화 및 2-D를 통한 단백질의 발현을 비교, 분석하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

聰明湯은 베타 아밀로이드 및 H₂O₂에 의한 Neuro 2A 신경아중 세포주의 세포사멸을 농도 의존적으로 감소시켰다. 聰明湯은 베타 아밀로이드에 의한 H₂O₂의 세포내 생성을 억제하였다. 聰明湯은 베타 아밀로이드 및 H₂O₂에 의한 세포막 수포화 현상을 감소시켰다. 聰明湯은 베타 아밀로이드에 의한 HO-1 단백질의 발현 증가를 억제하였다. 聰明湯은 proapoptotic Bcl-XS의 발현을 감소, antiapoptotic Bcl-XL의 발현을 증가시켰으며 미토콘드리아 막전위 감소를 억제하였다. 聰明湯은 H₂O₂에 의한 caspase-3의 활성화를 억제하여 ICAD/DFP45의 분해를 방지하였다. 7. 베타 아밀로이드 및 H₂O₂에 의한 spots의 변화는 일치하였으며, 聰明湯은 베타 아밀로이드에 의해 발현이 증가된 4개의 spots과 7개 gate의 spots 변화를 대조군 수준으로 회복시켰다.

이상의 결과에서 聰明湯은 베타 아밀로이드에 의해 생성된 H₂O₂에 의한 산화적 손상으로부터 신경아중 세포를 보호하는 효과를 나타냈으므로 AD 등의 퇴행성 신경질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료되며, 2-D 전기영동으로 발현 변화를 확인한 각 spots은 MALDI-TOF 분석을 통해 후추에 아미노산 서열 분석 및 기능 분석을 통하여 베타 아밀로이드에 의한 AD의 병인과 聰明湯과 같은 산화적 손상 예방 물질을 개발하는데 응용될 수 있으리라 생각된다.

참고문헌

1. 李符永 譯 : ICD-10 정신 및 행동장애 분류, 서울, 一潮閣, pp.63-66, 1994.
2. 黃義完外 : 東醫精神醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp.256-271, 327-330, 1992.
3. 서순규: 成人病·老人病, 서울, 高麗醫, pp.225-228, 230-232, 1992.
4. 大韓神經精神醫學會 : 神經精神科學, 서울, 하나의학사, pp.211- 220, 1997.
5. Reznik-Wolf H, Machado J, Haroutuian V, DeMacro L,

- Walter GF, Goldman B, Davidson M, Johnston JA, Lannfelt L, Dani SU, Friedman E. Somatic mutation analysis of the APP and Presenilin 1 and 2 genes in Alzheimer's disease brain. J Neurogenet. 12(1):55-65, 1998.
6. Alzheimer's disease collaborative group. The structure of the presenilin 1(S182) gene and identification of six novel mutation in early onset AD families. Nat Genet. 11(2):219-222, 1995.
7. Tabaton M, Cammarata S, Mandybur T, Richy P, Kawai M, Perry G, Gambetti P. Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities. Brain Res. 593(2): 299-303, 1992.
8. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp.610-611, 1978.
9. 錢鏡湖 : 辨證奇門全書, 서울, 甘地出版社, pp.233-235, 1990.
10. 洪元植 譯 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, pp.102, 1984.
11. 李樅 : 編註醫學入門(卷二), 서울, 大星文化社, pp.180-182, 1984.
12. 龔廷賢 : 增補萬病回春, 서울, 一中社, pp.229-230, 1994.
13. 李仲梓 : 醫宗必讀, 서울, 一中社, pp.323-324, 1991.
14. 孫思邈 : 備急千金要方(卷四十), 서울, 杏林出版社, pp.12-13, 1976.
15. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.98-99, 1987.
16. 陳羅雷 등 : 古今圖書集成醫部全錄(第7冊), 北京, 人民衛生出版社, pp.2150, 1983.
17. 彭懷仁 : 中華明醫方劑大全, 北京, 金盾出版社, pp.748, 1990.
18. 金賢兒 : 老人性 痴呆에 대한 文獻의 考察, 大韓韓方內科學會誌, 13(2):57-68, 1992.
19. 徐政烈 외 : 痴呆에 대한 東西醫學의 文獻의 考察, 서울, 大韓針灸學會誌, 14(1):226-238, 1997.
20. 黃義完 외 : 痴呆에 대한 韓醫學의 臨床研究, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 7(1):1-13, 1996.
21. 姜亨沅 : 天門冬에 의한 腦神經膠細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制 效果, 圓光大學校 大學院 碩士論文, 1997.
22. 徐敏華 외 : 聰明湯이 老化白鼠 腦組織의 生化學的 變化和 神經細胞의 損傷에 미치는 영향, 圓光大學校 大學院 博士論文, 1996.
23. 김인재 외 : 加味歸脾聰明湯이 老化白鼠의 血液變化 및 血清과 腦組織의 抗氧化物 活性에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 9(2):53-69, 1998.
24. 이근후 : 최신임상정신의학, 서울, 하나의학사, pp.138, 216-228, 1988.
25. 楊維傑編 : 黃帝內經解釋(素問), 서울, 成輔社, pp.1-2, 42-61, 100-103, 131-145, 206-211, 455-468, 701-704, 1980.
26. 楊維傑編 : 黃帝內經解釋(靈樞), 서울, 成輔社, pp.84-89, 104-145, 280-283, 1980.
27. 成彊慶 : 腦의 機能에 대한 臟象論의 考察, 서울, 大韓韓醫學會誌, 16(1):468-474, 1995.
28. 金完熙 외 編著 : 東醫生理學, 서울, 慶熙大學校 出版局, pp.384, 1993.
29. 李時珍 : 本草綱目, 서울, 高文社, pp.603-604, 1973.
30. 王清任 : 醫林改錯, 臺聯, 國風出版社, pp.22-25, 1975.

31. 王乃石 : 益氣聰明湯治療腦血管神經性病變的體會, 湖北中醫雜誌, 18(124):41, 1996.
32. 張明准 외 : 心-腦-神志病辨證論治, 黑龍江科學技術出版社, pp.5-10, 100-112, 1988.
33. 黃大東 외 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.378-381, 1989.
34. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 永林社, pp.166-167, 250-251, 370-371, 374-375, 1991.
35. 李商仁 외 : 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp.151-153, 308-313, 419-420, 426-428, 1990.
36. Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13:1899-1911, 1999.
37. Vander Heiden, M.G., and Thompson, C.B. Bcl-2 proteins: inhibitors of apoptosis or regulators of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol.* 1:E209-E216, 1999.
38. Mills PB, Mills K, Johnson AW, Clayton PT, Winchester BG. Analysis by matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry of the post-translational modifications of alpha 1- antitrypsin isoforms separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics.* 1(6):778-786, 2001.
39. Wulfschuhle JD, McLean KC, Paweletz CP, Sgroi DC, Trock BJ, Steeg PS, Petricoin EF 3rd. New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics.* 1(10):1205-1215, 2001.
40. Sandra S, Cristine L. G, John JL, Andrew ML, Angel MA, Anthony JM, Maria CR, and Anderson NL : Proteomics to display lovastatin-induced protein and pathway regulation in rat liver. *Electrophoresis.* 21:2129-2137, 2000.