대한한의학회지 제31권 제2호(2010년 3월)
J Korean Oriental Med 2010;31(2):1-18

Original article

Glucose deprivation으로 유발된 Neuro 2A 세포의 산화적 손상에 대한 七氣湯의 보호효과

성기호[1], 이정섭[2], 신선호[1]

[1]원광대학교 한의과대학 내과학교실, [2]한국한의학연구원

The Protective Effects of *Chilgi-tang* on Oxidative Stress by Glucose Deprivation in Neuro 2A Cells

Ki-Ho Seong[1], Jung-Sup Lee[2], Sun-Ho Shin[1]

[1]Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University
[2]Korean Institute of Oriental Medicine

Objective: The water extract of *Chilgi-tang* (CGT) has been traditionally used in treatment of heart diseases caused by stress in Oriental Medicine. However, little is known about the mechanism by which CGT rescues neuronal cells from injury damage. Therefore, this study was designed to evaluate the protective effects of CGT on Neuro-2A cells by glucose deprivation-induced cell death.
Methods: We investigated how cell death induced by glucose deprivation was associated with increased reactive oxygen species (ROS) generation.
Result: The CGT treatment prior to glucose deprivation insult significantly reduced the number of cell deaths and the glucose deprivation-induced increase in ROS. Nitric oxide (NO) was also attenuated by CGT treatment. In addition, we demonstrated that the anti-cell death effect of CGT was blocked by heme oxygenase-1 (HO-1) activation. Finally, pretreatment of cells with a hemin, HO-1 inducer, reduced glucose deprivation-induced cell death. In contrast, pretreatment of cells with a ZnPP, HO-1 activity inhibitor, attenuated CGT-induced inhibition of cell death.
Conclusions: These findings indicate that ROS plays an important role in glucose deprivation-induced cell death and that CGT may prevent glucose deprivation-induced cell death by inhibiting the ROS generation through HO-1 activation in Neuro-2A cells.

Key Words : *Chilgi-tang*, Neuro-2A cells, glucose deprivation, oxidative stress

서 론

七氣湯은 宋代 陳師文의 ≪太平惠民和劑局方≫에 처음으로 수록된 이래 虛冷上氣, 寒氣, 熱氣, 怒氣, 恚氣, 喜氣, 憂氣, 愁氣, 內結積聚, 心腹絞痛 등을 치료하는데 사용되었으며 七情鬱結로 인한 心腹絞痛, 특히 心痛 중에서도 七情의 損傷으로 氣鬱하여 怔忡, 驚悸하는 悸心痛의 治療에 사용된다고 하였다[1,2]. 한의학에서 '心'은 해부학적인 구조의 心臟만을 의미하는 것이 아니라 정신, 의식, 감정활동 및 생리적 본능 등 腦와 신경계의 기능과도 밀접한 연관성을 보인다[3]. 이것으로 보아 七情으로 인한 제반 증

・Received : 31 August 2009 ・Revised : 14 October 2009 ・Accepted : 14 October 2009
・Correspondence to : 신선호(Sun-Ho Shin)
전북 전주시 덕진구 덕진동 2가 142-1 원광대학교 전주한방병원
Tel : +82-63-270-1013, Fax : +82-63-270-1594, E-mail : shshin@wonkwang.ac.kr

상을 치료하는 七氣湯이 신경세포를 보호하는 기능이 있을 것으로 생각할 수 있다.

중추 신경계 손상을 일으키는 원인 중의 하나로 허혈을 예로 들 수 있는데 뇌에 허혈이 유발되면 세포에 산소나 glucose의 공급 감소에 의해 미토콘드리아의 기능장애와 세포 내에 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)의 증가가 일어나며 활성산소종의 증가는 세포자멸사를 유도한다. 최근 연구에서는 이러한 세포자멸사를 억제시키는 화합물이 신경세포 손상에 도움을 줄 것으로 보고하였다[4,5].

七氣湯에 관한 실험적 연구로 白鼠의 스트레스성 胃潰瘍과 胃腸管損傷에 대한 치료효과[6], 항산화 효과에 대한 보고가 있었으나[7], 七氣湯이 신경세포 보호에 대한 연구는 보고된 바 없다.

따라서 이 연구에서는 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 독성 모델에서 七氣湯의 보호효과 및 그 기전을 규명하기 위하여 세포 생존율, ROS의 증가, NO의 증가 및 HO-1 단백질 발현 변화를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

세포는 mouse에서 유래된 Neuro 2A 세포주를 ATCC(American Type Culture Collection)에서 분양받았으며, 5% CO_2, 95% 대기 공기 및 37℃ 환경의 세포 배양기에서 계대 배양하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 七氣湯의 처방 내용은 ≪方藥合編≫[2]에 의거하여 사용하였다. 약재는 원광대학교 전주 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며 그 구성은 Table 1과 같다.

3) 시약 및 기기

세포배양에 필요한 minimum essential medium (MEM), L-glutamine, sodium bicarbonate, non-essential amino acids, sodium pyruvate, 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Gibco BRL사(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 세포배양용기(24, 48-well plate, 6 ㎝ dish, 10 ㎝ dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. MTT(methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl, tetrazolium bromide), glucose, cPTIO, hemin, ZnPP는 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하였다. 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), 4,5-diaminofluorescein diacetate(DAF-DA)와 hydroethidium (HE), trizol은 Invitrogen사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. Western blotting에 사용된 HO-1, iNOS, β-actin에 대한 항체들은 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)로부터 구입하였으며, Enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)은 Amersham사(Buckinghamshire, England)제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제

실험에 사용된 藥材는 물을 용매로 사용한 추출

Table1. Prescription of *Chilgi-tang*(CGT)

Herbal Name	Scientific Name	Dose (g)
半夏	*Pinelliae Rhizoma*	12.0
人蔘	*Ginseng Radix*	2.8
肉桂	*Ciniamomi Cortex*	2.8
甘草	*Glycyrrhizae Radix*	2.8
生薑	*Zingiberis Rhizoma*	4.0
Total amount		24.4

방법을 이용하여 본 실험에 사용하였다. 물 추출물(H_2O extract)은 七氣湯 4첩(98.2 g)에 증류수 1 ℓ를 가하여 냉각기를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하였고, 3200 rpm으로 20분 동안 원심분리 후 감압농축기(rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃(deep freezer)에서 12시간 이상 동결시키고, freeze dryer로 동결 건조하여 15.1 g의 시료를 얻었다. 시료는 eppendort tube에 100 ㎎/㎖가 되도록 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 녹여 4℃에서 보관하고 실험 시에는 DMEM 배지에 희석하여 사용하였다.

2) 세포주 배양

Neuro 2A 세포주는 세포 배양기(37℃, 5% CO_2)에서 10% FBS가 포함된 MEM으로 배양하였으며, 2-3일 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포를 이용하였다. Trypsin을 이용하여 계대 배양을 하였으며 각 실험 조건에 따라 glucose과 우태아 혈청을 차단하였다.

한약재 등을 전처리한 후 세포 손상에 대한 보호효과를 확인하였으며 이에 따른 생화학 및 분자생물학적 실험을 수행하였다.

3) 세포생존율 측정

세포생존율 측정은 MTT 방법을 이용하였다. 세포 배양판(48-well plate)에 세포(1×10^5 세포수/㎖)를 500 ㎕ 분주하여 12시간 이상 세포 배양기 안에서 안정화하였으며, 각 조건에 따라 처리한 후 배양기 안에서 일정 시간 배양하였다. 七氣湯과 hemin, ZnPP, cPTIO는 각각 1시간 전 처리하여 실험을 진행하였으며 배양 완료 4시간 전에 MTT 용액(5 ㎎/㎖ in PBS)을 배양액 부피의 1/10이 되도록 50 ㎕씩 첨가한 다음, 4시간 후 상층액을 제거하여 바닥에 부착된 불용성의 보라색 formazan을 완전히 건조하였다. 불용성 formazan은 DMSO(dimethyl sulfoxide) 용액으로 충분히 용해한 다음, 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 545 ㎚ 파장에서 흡광도를 측정하였고, 정상 대조군의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) 활성산소종 측정

세포 내 활성산소종의 생성을 측정하기 위하여 형광 probe DCF-DA, DAF-DA와 HE를 반응시킨 후 flow cytometry(FACS)로 측정하였다. 비형광물질인 DCF-DA는 세포 내 과산화수와 관련된 peroxides 존재 시 형광의 DCF로 변환되어 녹색의 형광을 발한다. DAF-DA는 NO와 결합되지 않은 조건에서는 비형광물질로 존재한다. 세포 내로 통과하게 되면 esterase에 의해서 DAF-FM으로 변환되며, NO와 결합하게 되면 형광을 발한다. 또한 파란색의 HE는 superoxide 존재 시 산화되어 붉은 색의 형광을 발하게 된다. 이 형광 정도는 생성되는 세포 내 활성산소종의 양에 비례하여 증가한다. 각 시약 처리 후 세포를 얻기 전에 5 μM 농도의 DCF-DA, DAF-DA 혹은 HE를 각각 처리하여 37℃에서 30분간 배양한 후 PBS(pH 7.4)로 세척하고, 1% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 포획한 후 다시 PBS로 세척하여 FACS를 이용하여 측정하였다.

5) Western blotting

Neuro 2A 세포를 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 2회 세척하였다. 세척 후 얻은 세포의 단백질을 얻기 위하여 RIPA 용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSH, 1 ㎍/㎖ aprotinin)으로 4℃에서 용해하였다. 용해 세포 부유액에 2 X sample buffer를 섞어 98℃에서 5분 동안 끓인 후 8%와 15% SDS-PAGE(sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 50 V에서 2시간 동안 transfer한 후 blocking(5% skim milk)하여 상온에서 1시간 반응시켜 비 특이적 항체 결합을 예방하였다. HO-1, iNOS(inducible Nitric Oxide Synthesis) 및 β-actin 등에 대한 항체는 antibody solution(TBST with 3% skim milk : tris-buffered saline + Tween 20 + 3% skim milk)에 1:1,000으로 각각 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서

2시간 반응시켰다. 이어서 2차 항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase, anti-goat IgG conjugated horse-radish peroxidase(Amersham사, Antibody solution 1:2,000으로 희석)와 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 TBST(tris-buffered saline + Tween 20)로 3회 세척한 후 ECL kit을 사용하여 필름에 노출하였다.

6) Total RNA의 분리

배양 세포로부터 total RNA의 분리는 trizol을 이용하여 제조회사가 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 세포는 냉 PBS로 세척한 후 1.5 ㎖ 튜브에 포집하여 3,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후 1 ㎖ trizol로 용해한 후 200 ㎕ chloroform을 첨가하여 13,000 rpm, 4℃에서 15분 동안 원심 분리하여 상층액 500 ㎕를 새로운 튜브에 옮겼다. 500 ㎕의 isopropanol을 첨가하여 잘 섞어준 후 13,000 rpm, 4℃에서 15분 동안 원심 분리하고 침전물을 80% 에탄올로 세척하였다. 세척된 RNA는 건조 후 DEPC(diethyl pyrocarbonate)를 함유한 증류수로 용해하여 분광광도계에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

7) 역전사 중합 효소 연쇄 반응

역전사 중합 효소 연쇄 반응(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)은 2 ㎍ total RNA와 reverse transcriptase(Invitrogen)를 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라서 수행하였다. Total RNA를 65℃에서 5분 변성한 후 4℃에서 급랭하여 사용하였다. 역전사 반응은 total RNA, oligo dT(1㎍), 2 ㎕ dNTP(10mM), reverse transcriptase(200 U), DTT(10 mM), RNasin(1 ㎕)을 10 ㎕ 완충용액과 42℃에서 60분 동안 반응시켰다. 합성된 cDNA를 이용하여 iNOS, HO-1, β-actin 그리고 GAPDH에 대한 PCR을 수행하였다.

8) 통계처리

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이며, 실험결과의 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였고, p-value가 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. Glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포의 생존율 변화

세포 배양액에서 우태아 혈청과 glucose를 제거하여 허혈 상태를 유도하고 세포생존율의 변화를 MTT assay를 통하여 측정하였다. 먼저 우태아 혈청을 제거한 배지로 배양한 Neuro 2A 세포는 3시간

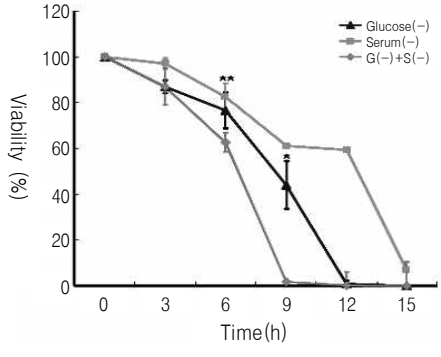

Fig. 1. Cell viability of glucose and serum free condition on neuro 2A cells

Cells were treated with a glucose and serum free condition for several times. Cell viability was measured by MTT assay. Results were represented as the means ± S.D. of three experiments. *p 〈0.05, **p 〈0.01 compared to control cells.

이후부터 세포생존율이 감소하기 시작하여 24시간 후에는 59.1%의 세포생존율을 보였으며, 36시간 후에는 7.9%의 세포생존율을 보여 급격한 감소를 나타내었다. 또한 glucose를 제거한 배지로 Neuro 2A 세포를 배양한 실험군에서는 3시간 후에는 86.5%, 6시간 후에는 77.3%, 12시간 후에는 43.1%의 세포생존율을 나타내었으며, 24시간 후에는 0.2%로 세포생존율을 보여 모든 세포가 사멸하였다. 특히 glucose와 우태아 혈청 모두를 제거한 배지로 배양한 Neuro 2A 세포에서는 glucose나 우태아 혈청 단독 제거군보다 이른 시간에 세포 독성이 관찰되었다. glucose와 우태아 혈청이 제거된 배지에서 Neuro 2A 세포를 배양 시 3시간 후에는 86.1%의 세포생존율을 보여 glucose 단독 제거군에 비해 0.4% 감소하였지만 6시간 후에는 61.9%의 세포생존율로 glucose 단독 제거군보다 15.4% 더 감소하였다. 12시간 후에는 2.5%의 세포생존율로서 glucose 단독 제거군에 비해 40.6% 더 감소하여 모든 세포가 사멸하였다(Fig. 1). 이상의 결과로 glucose의 유무가 허혈 상태에서의 세포생존율을 결정하는데 있어서 우태아 혈청보다 더 큰 영향을 미치고 있다고 판단되었다. 따라서 Neuro 2A 세포에서 glucose가 제거된 조건에서 다음 실험을 진행하였다.

2. Glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 활성산소종의 생성에 미치는 영향

Glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 독성에서 활성산소종의 생성을 조사하였다. 생성되는 활성산소종의 특성은 H_2O_2와 연관된 peroxidase 생성을 인지하는 DCF-DA 염색과 NO 생성을 인지하는 DAF-DA 염색 및 superoxide anion 생성을 인지하는 HE 염색을 각각 실시하여 활성산소종의 종류를 규명하고, 생성 정도를 FACS를 이용하여 분석하였다. Glucose가 제거된 배지로 Neuro 2A 세포를 배양하여 시간별로 측정하였다. 24시간 후에는 세포생존율이 급격히 감소하여 본 실험에서는 측정하지 않았다. 활성산소종의 하나인 H_2O_2의 생성을 측정한 결과 대조군 51.02%에 비해 glucose를 제거한 배지로 3시간 배양 시 71.56%로 20.54%의 증가를 보였으며, 12시간 후에는 87.67%로 36.65%의 증가를 보였다(Fig. 2).

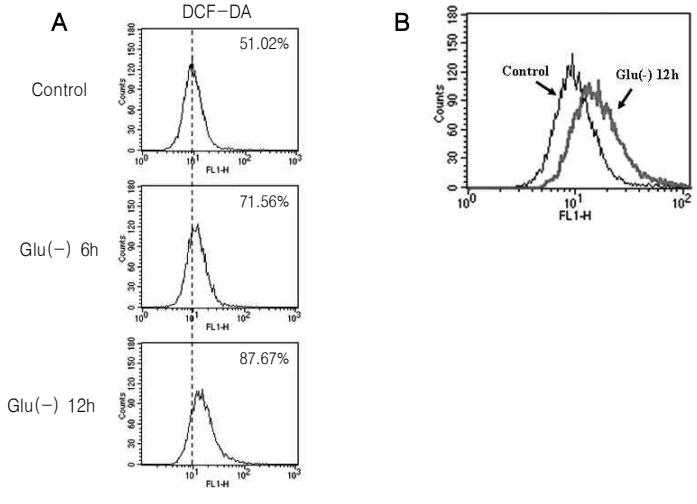

Fig. 2. Flow cytometric analysis of ROS production on glucose deprivation in neuro 2A cells

Neuro 2A cells were treated with glucose deprivation for 6h and 12h. Cells were harvested after treatment, and then stained with DCF-DA dye. After washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular ROS levels.

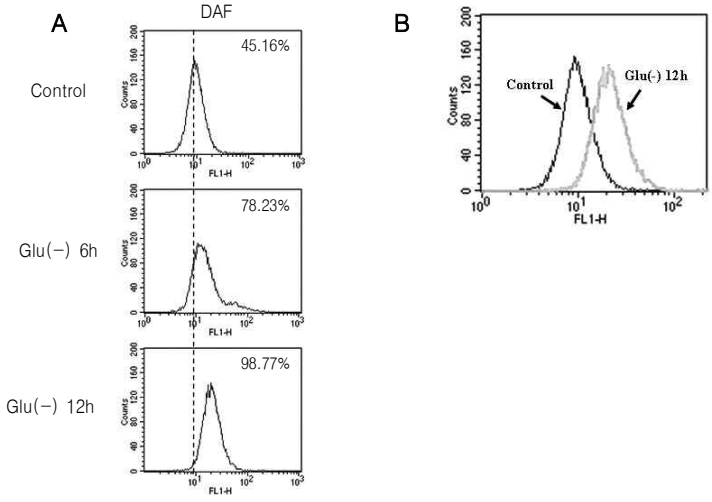

Fig. 3. Flow cytometric analysis of NO production on glucose deprivation in neuro 2A cells

Neuro 2A cells were treated with glucose deprivation for 6h and 12h. Cells were harvested after treatment, and then stained with DAF-DA dye. After washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular NO levels.

NO의 생성은 DAF로 확인한 결과 대조군 45.16%에 비해 glucose를 제거한 배지로 Neuro 2A 세포를 배양 시 6시간에는 78.23%로 33.07%가 증가하였고, 12시간 후에는 98.77%로 53.61%가 증가하였다(Fig. 3).

Superoxide는 HE 염색을 통해 조사하였으나 유의한 생성 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4).

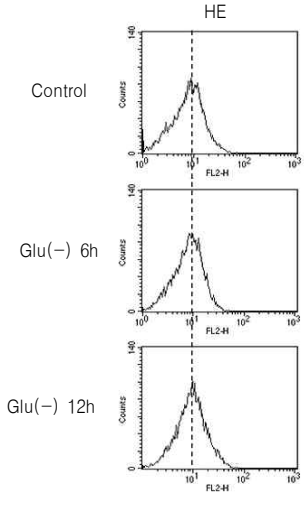

Fig. 4. Flow cytometric analysis of superoxide production on glucose deprivation in neuro 2A cells

Neuro 2A cells were treated with glucose deprivation for 6h and 12h. Cells were harvested after treatment, and then stained with HE dye. After washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular superoxide levels.

3. 七氣湯이 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 세포생존율의 변화에 미치는 영향

Glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에 대한 七氣湯의 보호효과를 알아보기 위하여 MTT assay로 세포생존율의 변화를 조사하였다. 먼저 七氣湯의 Neuro 2A 세포에 대한 독성을 조사하기 위하여 다양한 농도의 七氣湯을 Neuro 2A 세포에 24시간 처리하였다. 500 ㎍/㎖, 600 ㎍/㎖, 그리고 700 ㎍/㎖ 농도의 七氣湯은 Neuro 2A 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았지만 800 ㎍/㎖ 농도의 七氣湯 처리군에서는 대조군에 비해 9.53%의 세포생존율 감소를 보였다(Fig. 5. B). 따라서 七氣湯의 보호효과에 대한 실험은 최고 농도를 700 ㎍/㎖ 까지 선정하였다. 다음은 七氣湯을 glucose가 제거된 배지에 각각의 농도로 희석하여 Neuro 2A 세포에 처리하였다. 500 ㎍/㎖ 농도의 七氣湯을 처리한 실험군에서는 대조군에 비해 유의성 있는 세포생존율의 변화를 보이지 않았으나 600 ㎍/㎖ 농도의 七氣湯 처리군에서는 대조군에 비해 19.44%의 세포생존율 증가를 보였고, 700 ㎍/㎖ 농도의 七氣湯 처리군에서는 대조군에 비해 28.54%의 유의한 세포생존율의 증가를 보였다(Fig. 5. A). 따라서 본 연구에서는 700 ㎍/㎖ 농도의 七氣湯을 처리하여 실험을 진행하였다.

4. 七氣湯이 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 H_2O_2의 생성에 미치는 영향

앞의 실험에서 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 독성에서 활성산소종 H_2O_2의 생성이 증가하는 것을 확인하였으므로, 이때 七氣湯의 보호효과를 조사하고자 하였다. 700 ㎍/㎖ 농도의 七氣湯을 glucose를 제거한 배지에 첨가한 후 12시간 배양하고, DCF-DA로 염색하여 flow cytometry로 조사하였다. Glucose deprivation 실험군의 H_2O_2 생성양은 대조군 35.42%에 비하여 49.81% 증가한 85.23%이었으나 七氣湯을 처리한 실험군에서는 61.16%로 24.07%가 감소하였다(Fig. 6). 또한, 대표적인 항산화제인 GSH와 NAC와 七氣湯의 효과를 비교하고자 하였다. GSH와 NAC의 자체 독성이 없는 각각 10 mM로 처리하였다. GSH와 NAC를 각각 glucose가 제거된 배지에 첨가하여 Neuro 2A 세포에 처리하여 배양한 후 MTT assay를 통해 세포생존율의 변화를 조사하였다. 그 결과 glucose deprivation 실험군에서는 48.11%의 세포생존율을 나타내었으며, GSH를

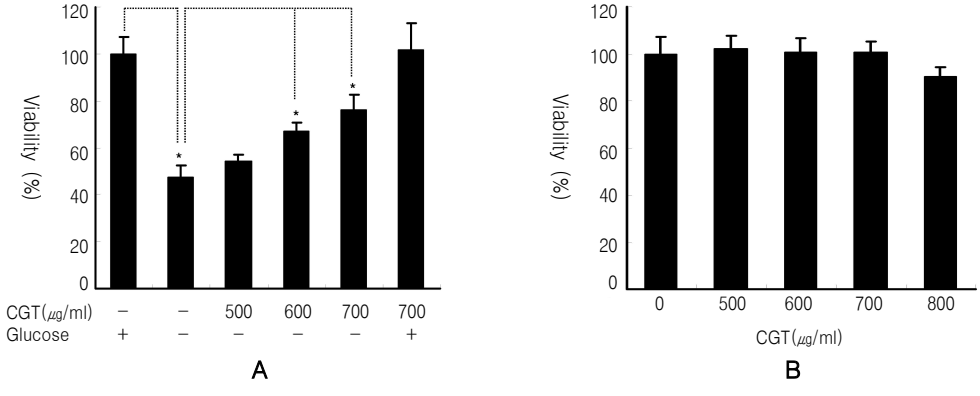

Fig. 5. Treatment of *Chilgi-tang* inhibited the glucose deprivation-induced cell death in neuro 2A cells

Cells were treated with the various concentrations of *Chilgi-tang* and the cells were exposed to glucose deprivation for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay method. Results were represented as the means ± S.D. of three experiments. *p < 0.05 compared to control cells.

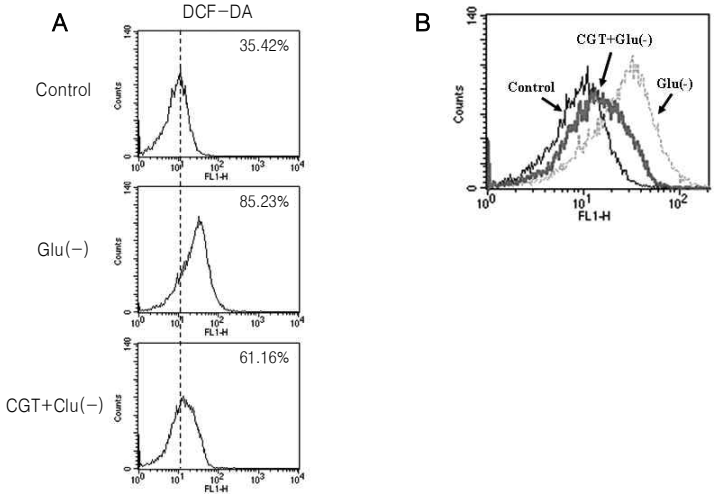

Fig. 6. Treatment of *Chilgi-tang* decreased the H_2O_2 production by the glucose deprivation in neuro 2A cells

Neuro 2A cells were pretreated with *Chilgi-tang* for 1 hr, and then treated glucose deprivation for 12 hr. Cells were harvested after treatment, and then stained with DCF-DA dye. After washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular H_2O_2 levels.

처리한 실험군에서는 72.16%, NAC를 처리한 실험군에서는 67.80%의 세포생존율을 나타내어 각각 24.05%와 19.69%의 세포생존율 증가를 나타내었다 (Fig. 7).

5. 七氣湯이 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 NO의 생성에 미치는 영향

앞의 실험에서 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 독성에서 NO의 생성이 증가하는 것을 확

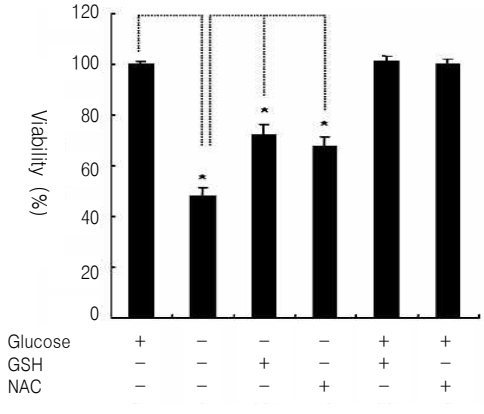

Fig. 7. The effects of antioxidant on the glucose deprivation induced neuro 2A cell death

Neuro 2A Cells were pre-treated with GSH 10mM and NAC 10mM. Then, cells were treated with a glucose deprivation for 12 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results were represented as the means ± S.D. of three experiments. ＊p 〈0.05 compared to control cells.

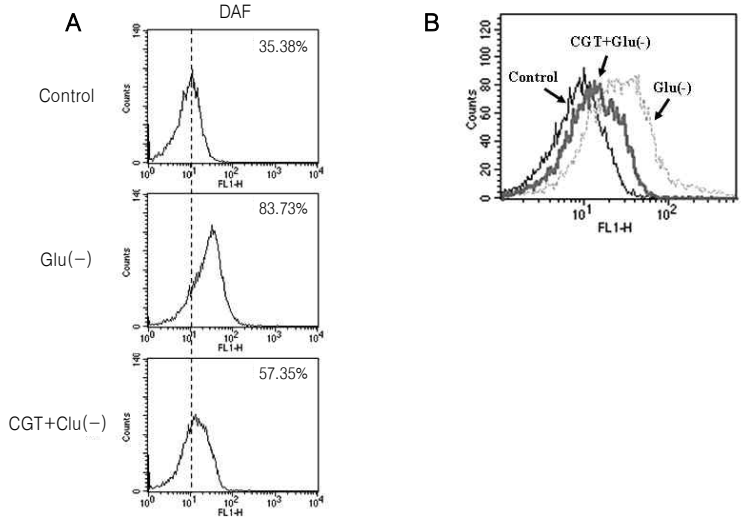

Fig. 8. Treatment of *Chilgi-tang* decreased the NO production by the glucose deprivation induced neuro 2A cell death

Neuro 2A cells were pretreated with *Chilgi-tang* for 1 hr, and then treated glucose deprivation for 12 hr. Cells were harvested after treatment, and then stained with DAF-DA dye. After washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular NO levels.

인하였으므로, 이때 七氣湯의 보호효과를 조사하고자 하였다. 700 ㎍/㎖ 농도의 七氣湯을 glucose를 제거한 배지에 첨가한 후 12시간 동안 배양하고, DAF-DA로 각각 염색하여 flow cytometry로 조사하였다. Glucose deprivation 실험군의 NO 생성양은 대조군 34.38%에 비해 83.73%로 49.35%가 증가하였다. 그러나 七氣湯을 처리한 실험군에서는 57.35%로 26.38%가 감소하였다(Fig. 8).

6. Glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 iNOS의 발현 변화

Glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 iNOS의 발현 변화를 조사하기 위하여 RT-PCR과 western blot을 실시하였다. 먼저 glucose를 제거한 배지로 1시간, 3시간, 6시간, 그리고 12시간 Neuro 2A 세포를 배양한 후 total RNA와 단백질을 각각 추출하여 RT-PCR과 western blot를 시행하였다. Neuro 2A 세포에서 iNOS의 mRNA의 발현은 glucose을 제거하여 배양한 1시간에 최대의 발현증

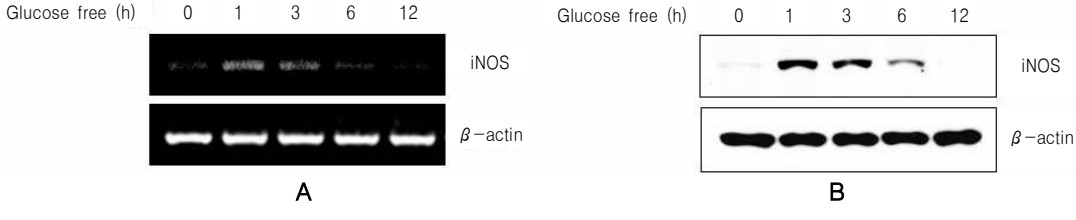

Fig. 9. The expression of iNOS on the glucose deprivation induced neuro 2A cell death

Neuro 2A cells were treated glucose deprivation with 0, 1, 3, 6, and 12 hr. mRNA of iNOS and β-actin was amplified by RT-PCR(A). The cell lysates were separated on 8% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane an immunoblotted with anti iNOS and β-actin antibody. The immunoreactive signals were visualized by ECL kit(B).

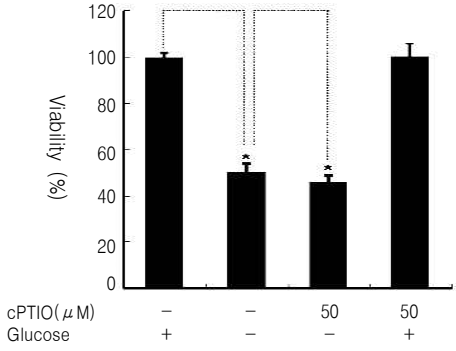

Fig. 10. The effect of NOS inhibitor, cPTIO on the glucose deprivation induced neuro 2A cell death

Neuro 2A Cells were treated with cPTIO in the absence of glucose. Then, cell viability was measured by MTT assay. Results were represented as the means ± S.D. of three experiments. ＊p 〈0.05 compared to control cells.

가를 보였으며, 3시간부터 감소하는 경향을 보였다. 또한 iNOS 단백질의 발현은 glucose 제거 배지로 배양한 1시간에 최대의 발현증가를 보였으며, 3시간부터 시간의존적인 감소를 보였다. 이때 mRNA의 양은 GAPDH, 단백질양은 β-actin을 통하여 동일한 양임을 각각 확인하였다(Fig. 9).

또한, NO 합성효소 Nitric Oxide Synthesis(NOS)의 억제제인 cPTIO를 처리하여 七氣湯의 효과와 비교하였다. 먼저 세포 내 독성을 일으키지 않는 농도인 50 μM의 cPTIO를 glucose가 제거된 배지에 첨가하여 Neuro 2A 세포에 처리하여 세포생존율을 비교하였다. 그러나, NOS의 억제제인 cPTIO 처리 시 glucose deprivation 실험군에 비해 세포생존율의 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 10).

7. Glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 HO-1의 발현 변화

Glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 항산화, 항염증과 관련된 효소인 HO-1의 발현을 western blot으로 조사하였다. 먼저 glucose를 제거한 배지로 3시간, 6시간, 그리고 12시간 Neuro 2A 세포를 배양한 후 단백질을 추출하여 western blot를 시행하였다. Neuro 2A 세포에서 HO-1의 단백질의 발현은 glucose 제거 배지로 배양한 12시간 동안 대조군에 비해 증가하는 양상을 보였으며, 이때 단백질양은 β-actin을 통하여 동일한 양임을 각각 확인하였다(Fig. 11).

8. 七氣湯이 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 HO-1의 발현에 미치는 영향

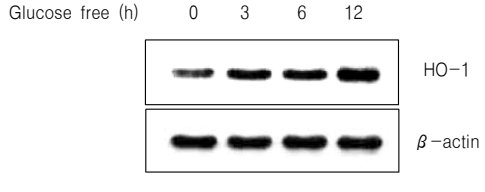

Fig. 11. The expression of HO-1 protein on the glucose deprivation induced neuro 2A cell death

Neuro 2A cells were treated with Glucose deprivation. The cell lysates were separated on 15% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane an immunoblotted with anti HO-1 and β-actin antibody.

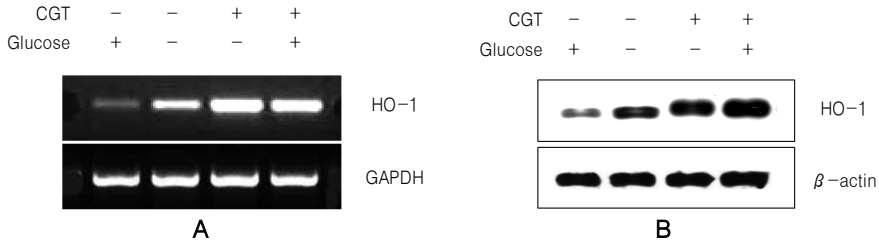

Fig. 12. *Chilgi-tang* regulated the expression of HO-1 protein on glucose deprivation in neuro 2A cells.

Neuro 2A cells were pre-treated with CGT and then, exposed with glucose deprivation. mRNA of HO-1 and GAPDH were amplified by RT-PCR(A). The cell lysates were separated on 15% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane an immunoblotted with anti HO-1 and β-actin antibody(B).

Glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 七氣湯의 세포 보호효과가 세포 내 항산화 및 항염증 효소인 HO-1의 발현 변화에 미치는 영향을 RT-PCR과 western blot으로 조사하였다. Glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸 실험군에서 HO-1의 mRNA는 대조군에 비하여 증가 양상을 보였으나 glucose가 제거된 배지에 七氣湯을 처리하였을 경우 HO-1 mRNA의 발현양이 현저하게 증가되었다(Fig. 12. A). Western blot을 통해 조사한 HO-1 단백질 발현양상도 동일하게 증가하였다(Fig. 12. B). 다음으로 七氣湯 단독 처리 시 세포 내의 HO-1의 발현 변화를 조사하였다. 700 ㎍/㎖ 농도의 七氣湯을 Neuro 2A 세포에 1시간, 3시간, 6시간 및 12시간 처리하여 RT-PCR과 western blot을 시행하였다. 그 결과 HO-1의 mRNA 발현은 七氣湯 처리 1시간 후부터 현저하게 증가하여 시간 의존적인 발현 증가를 보였으며, HO-1 단백질의 발현 또한 七氣湯 처리 1시간부터 시간 의존적인 증가를 보였다. 이때 mRNA의 양은 GAPDH, 단백질양은 β-actin을 통하여 동일한 양임을 각각 확인하였다(Fig. 13).

또한, HO-1 단백질의 유도제인 hemin을 다양한 농도로 glucose가 제거된 배지에 희석하여 Neuro 2A 세포에 처리하여 세포생존율을 확인하였다. 10 μM 농도의 hemin을 처리한 실험군에서는 대조군 47.87%에 비하여 53.09%의 세포생존율을 보였으며, 20 μM 농도의 hemin을 처리한 실험군에서는 57.82%의 세포생존율을, 그리고 40 μM 농도의 hemin 처리군에서는 70.05%의 유의한 세포 생존율 증가를 보였다(Fig. 14).

반대로 HO-1 단백질의 활성 억제제인 ZnPP를 glucose가 제거된 배지에 희석하여 Neuro 2A 세포에 처리한 결과, glucose deprivation 실험군은 47.87%의 세포생존율을 보였고, 七氣湯을 첨가한 실험군에서는 74.39%의 세포생존율을 보여 26.52%의 세

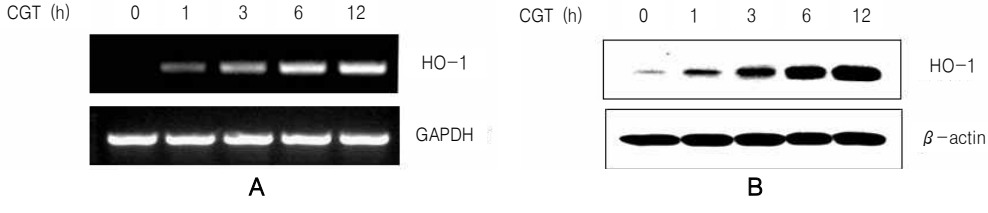

Fig. 13. *Chilgi-tang* upregulated the HO-1 (heme oxygenase 1) protein in neuro 2A cells

Neuro 2A cells were treated with CGT. mRNA of HO-1 and GAPDH were amplified by RT-PCR(A). The cell lysates were separated on 15% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane an immunoblotted with anti HO-1 and β-actin antibody. The immunoreactive signals were visualized by ECL kit(B).

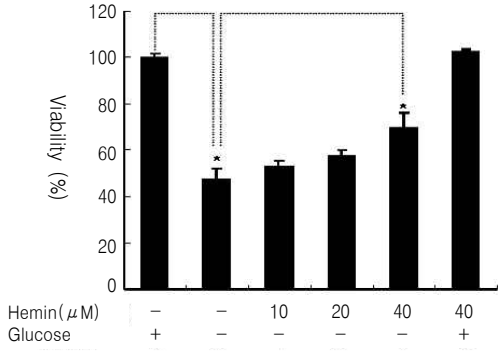

Fig. 14. The effect of HO-1 inducer on glucose deprivation in neuro 2A cells

Neuro 2A cells were pre-treated with hemin, HO-1 inducer, for 1 hr and cells were exposed to glucose deprivation for 12 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results were represented as the means ± S.D. of three experiments. ＊p 〈0.05 compared to control cells.

포생존율 증가를 나타내었다. 그러나 20 μM 농도의 ZnPP를 전처리한 후 七氣湯을 첨가하여 glucose이 제거된 배지로 Neuro 2A 세포를 배양하였을 경우 50.35%의 세포생존율을 보여 glucose deprivation 상태와 유사한 생존율을 나타내었다. 이때 20 μM ZnPP 단독 및 ZnPP와 七氣湯을 동시 처리 시 세포 독성은 관찰되지 않았다(Fig. 15).

고 찰

현대 사회는 경제 사회적 여건의 변화와 위생 및 의료 수준의 발달로 고령화 사회에 이르고 있으며, 그에 따른 각종 노인성 질환의 증가는 사회적, 경제적 손실을 초래한다. 특히 퇴행성 신경계 질환은 근본적 치료가 불가능하기 때문에 이를 예방하는 방법 및 발병기전에 대한 연구가 필요하다[8]. 최근에는 허혈성 뇌졸중 및 치매 등의 신경계 퇴행성 질환에 관

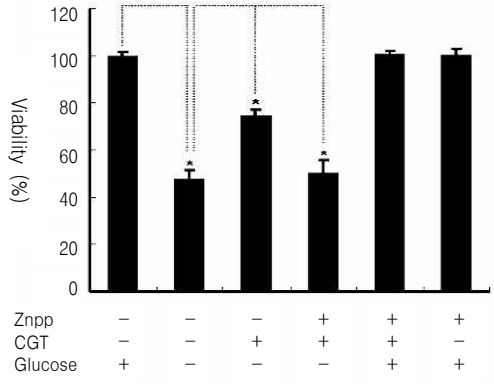

Fig. 15. *Chilgi-tang* inhibited the glucose deprivation-induced cell death in neuro 2A through HO-1 activation

Neuro 2A cells were pre-treated with ZnPP, HO-1 activity inhibitor, for 1 hr and with CGT for 1 hr. Then, Cells were exposed glucose deprivation for 12 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results were represented as the means ± S.D. of three experiments. ＊p 〈0.05 compared to control cells.

련된 연구가 활발히 진행되고 있으며, 허혈성 뇌졸중, Alzheimer's diseae, Parkinson's disease 와 같은 신경계 퇴행성 질환들은 세포의 사멸과 깊은 관련이 있다고 알려져 있다[9].

한의학에서 心이란 단순히 실질장기로서의 심장만을 의미하는 것이 아니라, 機能系로서의 心을 의미한다. 心의 주요기능은 "心主血脈"과 "心主神志"로 요약되며, 전자는 심혈관계의 기능을 의미하며, 후자는 意識, 思惟, 情志 등을 주관하는 정신 및 신경계의 기능을 의미한다. 한의학에서 말하는 心의 작용 중 상당부분이 현대의학에서 말하는 腦 및 신경계와 연관을 가지고 있다[3]. 따라서 임상에서 신경계 질환을 연구하기 위해서는 腦뿐만 아니라 心에 대한 연구가 반드시 필요하며, 한의학에서 心의 병증에 사용되는 처방들은 현대 의학적 관점의 신경계 질환에 응용할 수 있을 것이다.

七氣湯은 宋代 陳師文의 ≪太平惠民和劑局方≫에 처음으로 수록된 이래 心腹部에 痰飮이 울체되어 나타나는 怔忡, 驚悸, 胸痛, 胸痞, 眩暈, 惡心, 嘔吐, 梅核氣 등에 응용되어 왔으며, 半夏, 人蔘, 肉桂, 甘草, 生薑으로 구성되어 있다[1,2]. 七氣湯의 각각 구성 약물 중 신경세포에 대한 실험적 연구를 살펴보면 대뇌피질 신경세포사 억제 효능과 유전자 발현에 대한 半夏의 영향에 대한 보고가 있고[10], 신경아 세포에서 과산화수소의 세포사멸에서 人蔘의 보호작용에 대한 보고[11], 세포사멸과 신경세포에서 人蔘의 보호작용에 대한 보고가 있다[12].

신경계 질환은 신경세포와 신경교세포의 사멸에 따른 질환으로 인지능력, 운동기능 등의 퇴행과 상실을 초래하여 사망에 이르게 하는데 이러한 신경계 세포 사멸 과정은 아직 명확히 밝혀지지 않았다. 가장 유력한 연구 결과는 산화적 손상과 미토콘드리아의 기능 이상의 과정들이며[13], 이 외에도 복합적인 기전으로 신경세포 자멸사를 초래하여 신경계 질환들이 유발한다고 보고되고 있다[14].

최근 허혈성 뇌질환, 퇴행성 신경계 질환에 대한 관심이 커지면서 신경세포 손상에 대한 한약재의 방어기전 연구가 활발히 진행되고 있는데 차[15], 이[16]는 각각 烏藥順氣散과 導痰湯加味方이 Neuro 2A 세포의 산화적 손상을 방어한다고 하였고, 이[17]는 溫膽湯이 C6 신경아교세포에서 glutamate의 세포고사를 보호한다고 하였고, 송[18]은 Rotenone으로 유발된 Neuro 2A 세포의 산화적 손상에 대한 釣藤散의 방어효과를, 김[19]은 黃連解毒湯이 glucose deprivation으로 유발된 PC-12 cell의 세포 고사 보호효과를, 정[20]은 산화적 스트레스에 대한 六鬱湯의 뇌세포 보호효과 등을 보고하였다. 또한 합성물의 보호효과를 실험적으로 연구한 논문으로 Kao[21]의 PC 12 세포에서 glycyrrhizic acid와 18β-glycyrrhetinic acid의 PI3K/Akt 경로를 통한 신경세포 보호효과 등이 있으나 한약재로 사용 중인 七氣湯이 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 신경 세포 자멸사에 대한 보호효과는 보고된 바가 없다.

이 연구에서는 七情으로 인해 痰飮이 심장 및 순환기에 울체되어 나타나는 병증에 사용되는 七氣湯이 心과 신경계와의 연관성, 病因이 七情에 있는 것을 생각했을 때 七氣湯이 신경계 질환에도 응용할 수 있고 신경세포의 보호효과가 있을 것으로 착안하여 Neuro 2A 세포에서 glucose deprivation을 유발하였으며 이에 대한 七氣湯의 보호 효과 기전을 확인하였다.

본 연구 결과에서 Neuro 2A 세포에 glucose deprivation을 유발하였을 경우 시간 의존적으로 세포생존율이 감소하였다. 3, 6, 12, 24 및 36시간에서 세포생존율을 검사한 결과 86.5%, 77.3%, 43.1%, 2.9% 및 0.2%의 세포생존율을 나타내었다. 이러한 결과는 세포 내 에너지원의 고갈에 의한 세포자멸사 효과로 생각된다. 우태아 혈청의 고갈을 유발한 경우에서도 시간 의존적인 세포생존율의 감소가 확인되었으나 glucose deprivation에 의한 세포 사멸보다 효과는 미비하였으며, 6, 12, 24 및 36시간에서 97.3%, 82.9%, 61.0%, 59.1% 및 7.9%의 세포 생존율을 나타내었다. 또한 glucose과 우태아 혈청 모두를 고갈시킨 실험군에서는 세포 사멸이 급격하게 일어났으며, 각각 6, 12, 24 및 36시간에서 86.1%, 61.9%, 2.5%, 0.9% 및 0.8%의 세포생존율을 나타내

었다. 이상의 결과로 Neuro 2A의 세포 사멸에는 glucose deprivation이 더 치명적임을 확인하였으며, 이 후 실험부터는 glucose deprivation에 의한 실험을 진행하였다.

파킨슨병이나 헌팅턴병은 신경세포의 활성산소종 증가에 의한 세포자멸사로 알려져 있고22, Zhou[23]는 OGD(oxygen glucose deprivation)를 유발한 hippocampal neuron에서 활성산소종이 증가하였음을 보고하였다. 본 실험에서는 glucose deprivation을 유발하였을 때 세포 내 활성산소종이 증가하는지 그리고 어떤 종류의 활성산소종이 세포 내 독성을 일으키는지 확인하고자 하였다. H_2O_2와 연관된 peroxidase 생성을 인지하는 DCF-DA 염색과 NO 생성을 인지하는 DAF-DA 그리고 superoxide anion 생성을 인지하는 HE 염색을 실시한 후 FACS를 통하여 세포 내 활성산소종 증가를 백분율로 환산하였다. 먼저 H_2O_2는 세포 내에 glucose가 고갈되면서 시간 의존적으로 증가하였다. 6시간에서는 71.56%, 12시간에서는 87.67%를 나타내었으며 이는 대조군에 비해서 각각 20.54%, 36.65%의 증가를 나타내었다. NO의 형성은 6시간에서 78.23%, 12시간에서 98.77%로 대조군에 비해서 33.07%, 53.61%의 증가를 나타내었다. OGD를 유발하면 hippocampus neuron에서 초기 시간부터 활성산소종의 하나인 NO가 증가한다고 보고되어 있으며[24], Suh[25]는 OGD를 유발한 neuronal cell에서 superoxide가 NADPH oxidase에 의해 생성된다고 보고하였다. 하지만 본 연구에서는 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A의 세포 사멸에서 superoxide는 증가하지 않았다. 따라서 glucose deprivation에 의한 ROS의 종류는 H_2O_2와 NO이며, superoxide는 무관함을 알 수 있었다.

Glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포의 생존율에 七氣湯이 미치는 영향을 조사하기 위하여 glucose가 제거된 배지에 七氣湯을 처리한 후 MTT assay를 실시하였다. 七氣湯의 최고 농도는 700 ㎍/㎖로 처리 하였으며 600 ㎍/㎖와 700 ㎍/㎖에서 유의한 보호효과를 확인하였다. 800 ㎍/㎖은 자체 독성이 나타났기 때문에 실험에 사용하지는 않았다. Glucose deprivation 단독에서는 47.61%의 세포생존율을 나타내었고, 500 ㎍/㎖에서 54.17%의 세포생존율을 나타내어 6.56%가 증가하였지만 유의하게 증가하지는 않았다. 600 ㎍/㎖에서는 67.05%, 700 ㎍/㎖에서는 76.15%로 증가하여 각각 19.44%, 28.54%의 세포생존율 증가를 나타내었다. 이 실험결과로 七氣湯이 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸을 보호하는 것을 확인할 수 있었고, 七氣湯의 농도는 700 ㎍/㎖에서 효과가 극대화 된다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 다음 실험부터는 보호효과가 가장 극대화 된 700 ㎍/㎖ 의 농도에서 실험을 진행하였다.

본 실험에서는 七氣湯의 세포생존율의 증가효과가 glucose deprivation에 의한 ROS 증가에 대해 미치는 영향과 보호기전을 확인하고자 다음 실험을 진행하였다. 700 ㎍/㎖농도의 七氣湯을 glucose가 제거된 배지에 희석하고, Neuro 2A 세포에 처리하여 H_2O_2의 생성을 FACS로 확인하였다. 대조군에서는 35.42%의 H_2O_2가 측정되었지만 glucose deprivation 실험군에서는 85.23%로 49.81%의 증가율을 나타내었으며, 七氣湯을 처리한 실험군에서는 61.16%로 23.07% 감소하였다. 이 실험결과로 七氣湯이 활성산소종인 H_2O_2의 생성을 억제한다고 볼 수 있다.

다음 실험으로 H_2O_2가 Neuro 2A 세포의 사멸에 직접적인 연관성을 갖는지에 대한 실험을 진행하였다. 대표적 항산화제로 알려진 GSH와 NAC를 실험에 사용하였으며, GSH와 NAC의 자체 독성이 없는 각각 10 mM로 처리하였다. GSH와 NAC를 glucose가 제거된 배지에 처리한 후 Neuro 2A 세포의 생존율을 조사하였다. Glucose deprivation 실험군에서는 48.11%의 세포생존율을 나타내었으며 GSH를 처리한 실험군에서는 72.16%, NAC를 전처리한 실험군에서는 67.80%의 세포생존율을 나타내었다. 이상의 결과는 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸은 활성산소종 H_2O_2의 생성증가에 의해 매개되었으며, 이때 七氣湯은 H_2O_2의 생성 조절을 통해 세포독성으로부터 Neuro 2A 세포 보호 효과가 있음을 시사하였다.

七氣湯의 세포생존율의 증가효과가 glucose deprivation에 의한 또 다른 신경 독성 물질인 NO 증가에 대해 미치는 영향과 보호기전을 확인하고자 다음 실험을 진행하였다. 700 ㎍/㎖ 농도의 七氣湯을 glucose가 제거된 배지에 희석하고, Neuro 2A 세포에 처리하여 NO의 생성을 FACS로 확인하였다. 그 결과 대조군에서 34.38%의 NO가 측정되었고, glucose deprivation 실험군에서는 87.73%이었으나 七氣湯을 처리한 실험군에서는 57.35%로 26.38% 감소하였다. OGD에 의해 유발되는 hippocampal neuron에서 NO의 기능에 대한 연구결과가 발표되었으며[26], NO는 신호전달 물질로도 작용하지만 신경 독성 물질로도 작용할 수 있다[27]. NOS는 endothelial NOS(eNOS), neuronal NOS(nNOS) 그리고 inducible NOS(iNOS)의 세 가지 아형이 존재하는데 eNOS에 의해 생성된 NO와는 반대로 nNOS나 iNOS에 의해 생성된 NO는 신경 독성 물질로 작용할 수 있고[28], nNOS에 의해 생성된 NO는 허혈성 뇌질환 모델에 중요한 매개인자가 될 수 있다[29]. 이에 본 저자는 glucose deprivation에 의해 유발된 H_2O_2와 NO가 Neuro 2A 세포에 독성을 일을 킬 수 있는지 검증하였다. NOS의 저해제인 cPTIO를 이용하였으며, cPTIO의 자체 독성이 없는 조건에서 시행하였다. 먼저 glucose deprivation에 의한 NOS의 생성을 관찰하였다. glucose deprivation을 유발한 후 1시간, 3시간, 6시간, 12시간 후에 세포를 포집하였으며, RT-PCR로 mRNA 수준에서 발현 변화를 관찰하였고, western blot으로 단백질 발현의 변화를 관찰하였다. 그 결과 glucose deprivation이 세포 독성을 일으킬 수 있는 iNOS의 mRNA와 단백질의 발현은 증가하였다. Glucose deprivation 1시간, 3시간에서 최대의 발현증가를 보였으며, 이는 glucose deprivation에 의해 이른 시간에 세포 내 NO가 증가됨을 시사한다.

iNOS에 의해 생성된 NO에 의한 세포 독성을 재검증하기 위하여 cPTIO를 처리하여 NOS의 활성을 억제하고 glucose deprivation을 유발한 후 MTT assay를 시행하였다. glucose deprivation 실험군에서 49.98%의 세포생존율을 보였으나 cPTIO를 처리한 실험군에서는 46.17% 세포생존율을 나타내었다. 따라서 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 七氣湯의 보호효과는 NOS의 활성 조절보다는 생성된 NO의 소거능에 의한 것으로 생각되며, NOS의 활성에 대한 七氣湯의 효과에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

HO-1은 스트레스 반응 단백질로 산화적 손상에 의한 세포 독성을 보호할 수 있으며[30], glucose deprivation에 의한 신경세포에서 HO-1이 증가된다고 보고되었다[31]. 신경세포에서 허혈을 유발하였을 경우 astrocyte에서 HO-1과 carbon monoxide(CO)의 생성은 증가한다고 하였고, astrocyte에서 HO-1과 CO는 세포자멸사를 억제한다고 하였다[32]. HO-1의 효과는 신경세포뿐만 아니라 human dopaminergic neurons에서의 보호효과, 폐에서의 보호 효과, macrophage에서의 조절 기능, vascular smooth muscle cells에서의 조절 기능 등이 있는데 최근 수년간의 논문은 HO-1의 항산화 기능에 초점을 두고 있으며, 대부분의 실험적 모델에서 ROS의 증가와 HO-1의 항산화 기능을 밝히는데 역점을 두고 있다[33-36].

본 연구에서는 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸 시 12시간 동안에 HO-1 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 七氣湯이 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 HO-1의 발현에 영향을 미치는지 확인한 결과 HO-1의 발현은 mRNA와 단백질 수준에서 모두 증가하였으며, 특히 HO-1의 발현은 七氣湯 단독 처리 시 1시간부터 시간 의존적으로 증가하여 12시간에 최대의 발현증가를 보였다. 또한 세포 내 증가된 HO-1의 항산화 기능으로 인한 Neuro 2A 세포 보호효과를 재확인하기 위하여 HO-1 유도제로 잘 알려진 hemin을 실험에 사용하였는데 hemin을 농도별로 처리하여 glucose deprivation을 유발하였다. 처리한 hemin의 농도 의존적인 세포 보호효과를 확인하였으며, 40 μM 농도의 hemin 처리 시 유의한 세포 보호효과를 관찰하였다. 또한 HO-1 활성 억제제인 ZnPP를 처리하여 七氣湯에 의해 증가된 HO-1의 기능을 억제하여 세포생존율의 변화를 조사한 결과

glucose deprivation 실험군은 47.87%의 세포생존율을 나타내었으며, 七氣湯을 처리한 glucose deprivation 실험군은 74.39%의 세포생존율을 보였다. 그러나 ZnPP를 전처리한 후 七氣湯을 처리한 glucose deprivation 실험군에서는 50.35%의 세포생존율을 보였다. 따라서 본 실험 결과로 七氣湯은 항산화 효소인 HO-1의 발현 증가 및 HO-1의 활성화를 통해 glucose deprivation에 의한 세포 손상으로부터 세포를 보호한다고 볼 수 있다.

이상의 결과를 종합하면 七氣湯은 Neuro 2A 세포의 glucose deprivation에 의한 세포 사멸에서 ROS를 억제하는 HO-1에 관여하여 세포 사멸 보호효과를 나타내었다. 이 결과로 보아 七氣湯은 glucose 결핍에 의한 허혈성 뇌졸중 및 퇴행성 뇌 질환을 치료하는데 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료되며, 앞으로 七氣湯과 NO 및 HO-1이 연관된 작용기전에 대해서는 보다 세밀한 연구가 계속되어야 할 것이다.

결 론

七氣湯이 Neuro 2A 세포에서 glucose deprivation에 의한 세포손상에 미치는 보호효과 및 기전을 구명하기 위하여 glucose가 제거된 배지로 세포 손상을 유발하고, Neuro 2A 세포에 七氣湯을 전처리하고 glucose deprivation을 유발 시킨 후 세포생존율 변화, ROS, NO, superoxide 생성 변화, HO-1 단백질 발현에 미치는 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Glucose와 혈청이 고갈된 배지에서 Neuro 2A 세포는 시간 의존적인 세포생존율의 감소를 초래하였다.
2. 七氣湯은 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 세포생존율의 감소를 억제하였다.
3. 七氣湯은 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 H_2O_2의 생성 증가를 억제하였다.
4. 七氣湯은 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 NO의 생성 증가를 억제하였다.
5. 七氣湯은 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포 사멸에서 HO-1의 발현 증가를 통해 세포를 보호하였다.

이상의 결과에서 七氣湯은 glucose deprivation에 의한 Neuro 2A 세포에서 ROS를 억제하는 HO-1에 관여하여 세포 사멸 보호효과를 나타내었다. 따라서 七氣湯은 glucose 결핍에 의한 허혈성 뇌졸중 및 퇴행성 뇌 질환의 예방 및 치료에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 원광대학교 교비연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Chen SW. Prescriptions from the Great Peace Imperial Grace Pharmacy. Beijing:China Press of Traditional Chinese Medicine. 1996:63.
2. Hwang DY. Compilation of Formulas and Medicinals. Seoul:Younglim Publishing Inc. 2002:219.
3. Jo HJ. Study on the relationship of brain and heart based on oriental medicine. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2005;19(3): 1496-503.
4. Fujimura M, Tominaga T, Chan PH. Neuroprotective effect of an antioxidant in ischemic brain injury: involvement of neuronal apoptosis. Neurocrit Care. 2005;2(1):59-66.
5. Lindsten T, Zong WX, Thompson CB. Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. Neuroscientist. 2005;11(1):10-5.
6. Byun JS. Effects of Chilgitang on the gastroiontestinal mucosa of rats stressed by heating and

immobilization. The Journal of East-West Medicines. 1998;23(1):10-20.
7. Shin JS, Moon JY. Effect of Chilgitang extract for herb-acupuncture on ROS, RNS, lipid peroxidation and LDL oxidation. Journal of Meridian & Acupoint. 2008;25(4):89-104.
8. Yoon SW. A Study on the Chronically Ill elders in a university hospital[master's thesis]. Yongin: Dankook Univ.; 2001.
9. Polster BM, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. J Neurochem. 2004; 90:1281-9.
10. Kwon GR. Effects of Pinelliae rhizoma on prevention of cortical neuronal cell death and gene expression[dissertation]. Kyeongju: Dongguk univ.; 2005.
11. Kang SI. Protective effect of Ginseng radix against hydrogen peroxide-induced apoptosis on SK-N-MC neuroblastoma cells[dissertation]. Seongnam: Kyungwon univ.; 2004.
12. Choi SW. Ginseng radix reduces ischemia-induced apoptosis and cell proliferation in the dentate gyrus of gerbils[master's thesis]. Seongnam: Kyungwon univ.; 2004.
13. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. Eur J Biochem. 2000;267(16):4904-11.
14. Greene LA, Tischler AS. PC12 pheochromocytoma cells in neurobiological research. Adv. Cell Neurobiol. 1982;3:373-414.
15. Cha YS. Protective effects of Oyaksunkisan on oxidative stress-induced injury of Neuro 2A cells[dissertation]. Iksan: Wonkwang univ.; 2003.
16. Lee KS. Protective effects of Dodamtanggami on retenone-induced oxidative injury of Neuro 2A cells[master's thesis]. Iksan: Wonkwang univ.; 2004.
17. Lee JS. Protective effects of Ondamtang on glutamate-induced apoptosis C6 glial cells [dissertation]. Iksan: Wonkwang univ.; 2007.
18. Song YJ. Protective effects of Chodeungsan on retenone-induced oxidative damage of Neuro 2A cells[master's thesis]. Iksan: Wonkwang univ.; 2004.
19. Kim HY, Shin SH, Lee I. Neuroprotective effect of hwangryunhaedok-tang against glucose-deprivation induced cytotoxicity in PC-12 cells. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(6):1462-9.
20. Jung SH, Lee JM, Lee CH, Cho JH, Jang JB, Lee KS, et al. Neuroprotective effect of Yukul-tang against the oxidative stress. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2009;22(1):15-30.
21. Kao TC, Shyu MH, Yen GC. Neuroprotective effects of glycyrrhizic acid and 18beta-glycyrrhetinic acid in PC12 cells via modulation of the PI3K/Akt pathway. J Agric Food Chem. 2009; 57(2):754-61.
22. Benmoyal-Segal L, Soreq H. Gene-environment interactions in sporadic Parkinson's disease. J Neurochem. 2006;97(6):1740-55.
23. Zhou M, Baudry M. EUK-207, A superoxide dismutase/catalase mimetic, is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation-induced neuronal death in cultured hippocampal slices. Brain Res. 2009;1247:28-37.
24. Zhang ZG, Chopp M, Bailey F, Malinski T. Nitric oxide changes in the rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. J Neurol Sci. 1995;128:22-7.
25. Suh SW, Shin BS, Ma H, Van Hoecke M, Brennan AM, Yenari MA, et al. Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke. Ann Neurol. 2008;64(6): 654-63.
26. Zhang L, Deng T, Sun Y, Liu K, Yang Y, Zheng X. Role for nitric oxide in permeability of hippocampal neuronal hemichannels during oxygen glucose deprivation. J Neurosci Res.

2008;86:2281-91.
27. Keynes RG, Garthwaite J. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. Curr Mol Med. 2004;4:179-91.
28. Willmot M, Gibson C, Gray L, Murphy S, Bath P. Nitric oxide synthase inhibitors in experimental ischemic stroke and their effects on infarct size and cerebral blood flow: a systematic review. Free Radic Biol Med. 2005;39:412-25.
29. Jiang MH, Kaku T, Hada J, Hayashi Y. Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia. Brain Res. 2002;946:139-47.
30. Choi BM, Kim HJ, Oh GS, Pae HO, Oh H, Jeong S, et al. 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose protects rat neuronal cells (Neuro 2A) from hydrogen peroxide-mediated cell death via the induction of heme oxygenase-1. Neurosci Lett. 2002;328(2):185-9.
31. Moon MK, Choi BM, Oh GS, Pae HO, Kim JD, Oh H, et al. Catalposide protects Neuro 2A cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity via the expression of heme oxygenase-1. Toxicol Lett. 2003;145(1):46-54.
32. Imuta N, Hori O, Kitao Y, Tabata Y, Yoshimoto T, Matsuyama T, et al. Hypoxia-mediated induction of heme oxygenase type I and carbon monoxide release from astrocytes protects nearby cerebral neurons from hypoxia-mediated apoptosis. Antioxid Redox Signal. 2007;9(5):543-52.
33. Hwang YP, Jeong HG. The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 via the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine-derived oxidative stress. FEBS Lett. 2008;582 (17):2655-62.
34. Lee JC, Bhora F, Sun J, Cheng G, Arguiri E, Solomides CC, et al. Dietary flaxseed enhances antioxidant defenses and is protective in a mouse model of lung ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008;294(2): L255-65.
35. Orozco LD, Kapturczak MH, Barajas B, Wang X, Weinstein MM, Wong J, et al. Heme oxygenase-1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis. Circ Res. 2007;100(12):1703-11.
36. Cheng PY, Lee YM, Shih NL, Chen YC, Yen MH. Heme oxygenase-1 contributes to the cytoprotection of alpha-lipoic acid via activation of p44/42 mitogen-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells. Free Radic Biol Med. 2006;40(8):1313-22.