대한예방한의학회지 제16권 제2호(2012년 8월)
Kor. J. Oriental Preventive Medical Society 2012 ; 16(2) : 95-111

當歸龍薈丸의 glutamate에 의한 聽神經細胞 損傷 保護效果

유동희[1] · 박래길[2] · 소홍섭[2] · 이기남[3] · 정명수[3]*
[1]원광대학교 한의학전문대학원
[2]원광대학교 의과대학 미생물학교실 및 전정와우기관 연구센터
[3]원광대학교 한의과대학 예방의학교실

Protective Effects of *Danguiyonghoihwan* on Glutamate-induced Auditory Sensorineuronal Cell Death

Dong-Hee Yu,[1] Rae-Gil Park,[2] Hong-Seob So,[2] Ki-Nam Lee[3] & Myong-Soo Chong[3]*
[1]Dept. of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine
[2]Dept. of Microbiology & Vestibulocochlear Research Center, College of Medicine
[3]Dept. of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Abstract

Objective : The water extract of *Danguiyonghoihwan* (DGYHW) has been traditionally used in treatment of tinnitus in Oriental Medicine. However, little is known about the mechanism by which DGYHW rescues auditory neuronal cells from injury damages. Therefore, in this study I effort to elucidate the mechanism of the cytoprotective effect of the DGYHW extract on glutamate-induced auditory sensorineuronal cell death.

Methods : I determined the elevated cell viability by DGYHW extract on glutamate-induced auditory sensorineuronal cell death. Glutamate induced neuronal damage in oranotypic explant culture also, glutamate decreased cell viability on VOT-33 cells but pretreatment with DGYHW inhibited cell death.

Results : One of the main mediator of glutamate-induced cytotoxicity was known to generation of reactive oxygen species (ROS). Pretreatment with DGYHW inhibited this ROS generation from glutamated-stimulated VOT-33 cells. Also, I identified that the ROS-induced DCF-DA green fluorescence is reduced by DGYHW pretreatment. The critical markers of apoptotic cell death were cleavages of procaspase-3 protease protein. So I checked the expression level and cleavage of procaspase-3 protease

· 접수 : 2012년 4월 18일 · 수정접수 : 2012년 5월 22일 · 채택 : 2012년 5월 23일
* 교신저자 : 정명수, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 예방의학교실
전화 : 063-850-6912, 팩스 : 063-852-5594, 전자우편 : neurokid@wku.ac.kr

protein. Glutamate-treated VOT-33 cells were shown to have cleavage of procaspase-3 protease proteins and following reduction of expression of these proteins. But I found that pre-treatment with DGYHW protects glutamate-induced changes of biochemical marker protein, caspase-3.

Conclusion : These findings indicated that DGYHW may prevent cell death from glutamate induced VOT-33 cell death by inhibiting the ROS generation and modulation of protein expressions in procaspase-3, catalase and Bcl-2.

Key words : Danguiyonghoihwan(當歸龍薈丸), glutamate, auditory sensorineuronal cell death

I. 緖 論

耳鳴은 耳鼻咽喉科 영역에서 흔한 질환으로 聲原이 없이 耳竅 내에서 자각 또는 타각적으로 소리를 느끼는 포괄적인 증후이며 자신의 착각으로 귀울음을 일으키는 환청과는 다른 것이다.[1, 2)]

耳鳴의 원인은 여러 가지가 있으며 심각하지 않은 원인부터 종양에 이르기까지 다양한데 그 가운데 85%의 耳鳴은 특정 질병과 관련되지 않고 內耳의 聽神經 細胞의 損傷으로부터 기인한다. 聽神經細胞 損傷은 강한 騷音, 老化, 스트레스, 일부 藥物(耳毒性, 抗癌劑, 利尿劑, 아스피린, 消炎劑, 向精神性), 알레르기, 外耳道炎 및 中耳炎, 心血官系 疾病(高血壓, 低血壓), 일부 腫瘍, 甲狀腺 疾患, 頭頸部 外傷 등에 의해 발생하며 聽神經細胞 損傷기전은 최종적으로 聽神經細胞의 自滅死를 유도하는 活性酸素種(reactive oxygen species : ROS)이다. 이러한 酸化的 스트레스의 원인으로는 細胞成長因子의 결핍, 虛血/再灌流, 一酸化窒素, 글루타메이트에 의한 興奮毒性 등이 알려져 있다.[3-5)]

글루타메이트는 척추동물의 中樞聽覺神經系에서도 중요한 興奮性 神經傳達物質로 聽覺傳達經路의 신경조직에 존재하는 수용체에 작용하며 다양한 생리작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 소음이나 스트레스와 같은 자극에 의하여 글루타메이트의 유리가 증가되면 神經連接部位에 축적되어 細胞毒性을 유발하고, 炎症性 사이토카인의 증가, 活性酸素種의 생성을 유도하여 궁극적으로 神經細胞의 損傷을 초래하게 된다.[3, 4, 6)]

當歸龍薈丸은 金代 劉完素의 《宣明方論(風論)》[7)]에 처음 수록되었으며, "宣通血氣, 調順陰陽, 治腎水陰虛"라 하여 肝膽火熱證狀 즉, 上焦有熱하여 神志不寧하고 中焦有熱하여 胸膈灼通하고 下焦有熱하여 大便秘訣, 小便赤澁한 三焦에서 일어나는 모든 熱證에 활용되어 왔다. 當歸龍薈丸은 三焦의 實火를 제거하는 동시에 腎水를 보충하는 효능으로 耳鳴, 耳聾, 難聽, 頭痛, 不眠 등에 효과를 보인다.[8)]

當歸龍薈丸에 대한 실험적 연구에서 當歸龍薈丸의 抗癌作用과 構成藥材인 黃蓮의 강한 抗細胞 毒性效果를 확인하였고[9)] 當歸龍薈丸의 免疫調節 작용에 관한 연구[10)]도 보고되었으나 耳毒性으로 인해 損傷된 神經細胞에 미치는 연구는 보고된 바 없다.

이에 이 연구에서는 耳鳴에 대한 當歸龍薈丸의 保護效果를 알아보기 위하여 글루타메이트에 의한 內耳 코르티기관의 聽神經細胞의 損傷과 VOT-33 細胞의 損傷에서 當歸龍薈丸을 전 처리한 후 細胞生存率의 변화, DNA의 분절, procaspase-3 단백질, 活性酸素種의 생성 및 Bcl-2 family 蛋白質의 發顯變化 등을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

표 1. Prescription of *Danguiyonghoihwan*

Herbal name	Scientific name	Dosage(g)
當歸	ANGELICAE GIGANTIS RADIX	7.5 g
龍膽草	GENTIANAE RADIX	7.5 g
山梔子	GARDENIAE FRUCTUS	7.5 g
黃連	COPTIDIS RIZOMA	7.5 g
黃柏	PHELLODEBDRU CORTEX	7.5 g
黃芩	SCUTELLARIAE RADIX	7.5 g
大黃	RHEI RADIX ET RHIZOMAHG	3.75 g
蘆薈	ALOE	3.75 g
靑黛	INDIGO NATURALIS	3.75 g
木香	AUCKLANDIAE RADIX	1.85 g
麝香	MOSCHUS	0.35 g
Total amount		58.45 g

Ⅱ. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

본 실험에 사용된 當歸龍薈丸의 처방 내용은 《宣明方論》[7]에 의거하였으며 한 첩의 내용과 분량은 표 1과 같다.

2) 細胞株

마우스 聽神經細胞株 VOT-33은 영국 Mattew Holly(Institute of Molecular Physiology, UK) 박사로부터 분양받아 계대배양하면서 실험을 실시하였다.

3) 試藥 및 器具

실험에 필요한 Dulbeccos modified Eagles medium(DMEM), trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였으며, 배양용기(24 well plate와 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Procaspase-3 protease, catalase, Bcl-2, Bax 및 β-actin 등의 antibodies는 Santa Cruz사(San Joes, CA, USA)에서 구입하였다. Bicinchoninic acid, (BCA), 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphe-nyltetrazolium bromide(MTT), 4′, 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI), dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)에서 구입하였다.

2. 方法

1) 試料 및 檢液의 調製

실험에 사용된 藥材는 물을 용매로 사용한 추출방법을 사용하여 본 실험에 이용하였다. 물 추출물은 음건된 當歸龍薈丸 100g을 물 1ℓ와 함께 냉각기를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하고 3200 rpm으로 20분간 원심분리 후 회전감압농축기(Rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃(Deep Freezer)에서 12시

간 이상 동결시키고 Freeze Dryer로 동결건조하여 시료로 사용하였다. 시료는 증류수에 100 ㎎/㎖ 농도의 저장용액을 조제하여 사용하였다.

2) 實驗動物

실험에 사용한 동물은 250g의 Sprague Dawley계의 임신한 렛트를 샘타코(오산, 경기)에서 구입하여 사용하였다. 물과 사료를 충분히 주면서 온도 25℃ 습도 50% 전후의 항온항습 장치(Three Shine Co, 서울) 내에서 명암을 12시간 주기로 조정하여 사육하였다. 동물실험은 원광대학교 실험동물 윤리위원회 가이드라인을 준수하여 수행하였다.

3) 코르티기관의 分離

생후 3일이 지난 렛트를 70% 알코올로 소독한 후 clean bench에서 모든 분리 작업을 수행하였다. 실험도구는 알코올에 소독한 후 사용하였으며, 렛트 두경부를 통하여 두개골을 절단하고 내이를 노출 시킨 후 냉 PBS로 세척 후에 cochlea를 분리하였다. Cochlea의 뼈를 조심스럽게 핀셋을 이용하여 벗긴 후 spiral ligament와 stria vascularis를 제거한 후 modiolus를 중심으로 base, middle, apex의 세 부분으로 잘라내었다. Cochlear explant를 조심스럽게 정리한 후 배양하였다. 분리한 cochlear explant의 배양은 0.1% gelatin으로 코팅한 cover slip을 이용하였다. Cover slip을 100% 알코올로 소독 및 화염 멸균한 후에 4 well plate에 넣고 gelatin으로 충분히 적신 후 실온에서 30분 반응하였다. Cochlear explant는 하룻밤 동안 배양기에서 안정화 단계를 거친 후 다음날 실험에 사용하였다.

4) Phalloidin-TRITC 染色

실험을 마친 cochlear explants를 PBS로 세척한 후 4% paraformaldehyde로 실온에서 15분 고정하였다. 고정을 마친 cochlear explants는 PBS로 3번 세척을 한 후 0.1% Triton X-100으로 10분 실온에서 반응하였다. TRITC-labelled phalloidin을 1:3000의 비율로 PBS에 희석하여 30분 동안 실온에서 반응하였다. PBS로 3회 세척한 후 mounting하여 형광현미경으로 관찰하였다.

5) NF-200 染色

배양한 cochlear explants를 PBS로 세척한 후 4% paraformaldehyde로 15분 고정한 후 PBS로 3번 세척하였다. 비특이적 항원, 항체 결합을 억제하기 위하여 blocking solution(1㎖ of normal goat serum, 1㎖ of 10% Triton X-100, 8㎖ of PBS)과 1시간 실온에서 반응하였다. Cochlear explants는 1차 항체 anti-NF 200을 antibody solution(6 ㎕ of goat serum, 2 ㎕ of 10% Triton X-100, 192 ㎕ PBS)에 1:500의 비율로 희석하여 4℃에서 12시간 반응하였다. 1차 항체 반응 후 PBS로 3번 세척한 후 2차 항체는 Allexa 488 anti-rabbit IgG를 antibody solution에 1:500으로 희석하여 상온에서 90분 반응하였다. TRITC-labelled phalloidin은 1:3,000의 비율로 PBS에 희석하여 30분 실온에서 반응하였고, DAPI는 1 ㎍/㎖로 5분 실온에서 반응하고 PBS로 3번 세척하였다. 염색을 마친 조직은 50% glycerol을 이용하여 slide에 mounting하여 형광 현미경으로 관찰하였다.

6) VOT-33 細胞培養

세포는 33℃, 5% CO_2 세포 배양기에서 열에 의해서 비활성 된 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 배양하여 실험 목적에 따라 사용하였다.

7) 細胞生存率 測定

세포의 활성도 측정은 MTT 분석법으로 측정하였다. 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10^5 세포수/㎖)를 1㎖ 씩 분주하여 3시간 이상 CO_2 세포배양기 안에서 안정한 후 시료를 각각의 조건에 따라 처리하였다. MTT 용액(5㎎/㎖, phosphate buffered saline : PBS, pH7.4)은 각각의 배양세포에 배양액의 1/10을 첨가하여 4시간 반응하였다. 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan은 10% SDS가 포함된 0.01N HCl 용액을 1㎖/well에 첨가하여 용해시킨 후, 분광광도계(THERMO max, USA)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포활성도는 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

8) 流細胞分析(Flow cytometry)을 이용한 細胞週期分析

細胞死滅에 미치는 영향을 알아보기 위해 propidium iodide(PI)로 DNA를 염색한 후에 유세포분석기(FACSCalibur, BD Biosciences)를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. 세포에 시약을 처리하여 시간별로 포집하여 PBS로 두 번 세척하였다. 세척한 세포(1×10^6)의 DNA는 PI 용액(0.1% Triton X-100, 20 ㎍/㎖ PI, 200 ㎍/㎖ RNase) 600 ㎕로 20분 반응하였다. 유식세포분석에서 얻은 정보의 분석은 CellQuest software (Becton Dickinson)를 이용하였다.

9) 細胞內 活性酸素種(ROS) 生成 測定

세포내 活性酸素種의 생성을 측정하기 위하여 형광 probe 2′, 7′-dichlorofluore scein diacetate (DCF-DA, Sigma사)과 hydroethidium(HE ; Molecular probe)를 이용하였다. 비형광물질인 DCF-DA는 세포내 hydrogen peroxide와 관련된 peroxides 존재 시 형광의 DCF로 변환되어 녹색의 형광을 발한다. 또한 HE는 세포내 superoxide anion 존재시 적색 형광을 발한다. 따라서 세포에 當歸龍薈丸 등을 처리한 후 세포를 수확하기 전에 5 μM DCF-DA 및 10 ㎛M HE를 각각 처리하여 33℃에서 30분 배양하였다. 배양한 세포는 PBS(pH 7.4)로 세척하여 1% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하고, 다시 PBS로 세척하여 유세포분석기로 형광을 측정하고 CellQuest software를 이용하여 분석하였다.

10) Western blot analysis

세포는 포집하여, 냉 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μg/㎖ aprotinin)과 4℃에서 30분 반응하였다. 동량의 세포파쇄액(200 ㎍)과 2X sample buffer를 혼합하여 100℃에서 3분 가열하여 단백질의 변성을 유도한 후에 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 electrotransfer system(Ellard Inc, Seattle, WA, USA)을 이용(0.8 mA/cm)하여 nitrocellulose membrane으로 이동시키고, blocking buffer (5% skim milk)와 상온에서 2시간 반응하였다. Procaspase-3 protease, catalase, Bcl-2, Bax 및 β-actin에 대한 각각의 항체는 0.05%(v/v)의 tween-20이 함유된 Tris-buffered saline(TBS-T)에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응하였으며, 각 항체에 대한 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse radish peroxidase(HRP)와 anti-mouse IgG conjugated HRP는 TBS-T로 희석(1:3,000)하여 상온에서 1시간 반응한 후, enhanced chemiluminescence(ECL) kit(Amersham, England)를 이용하여 현상하였다.

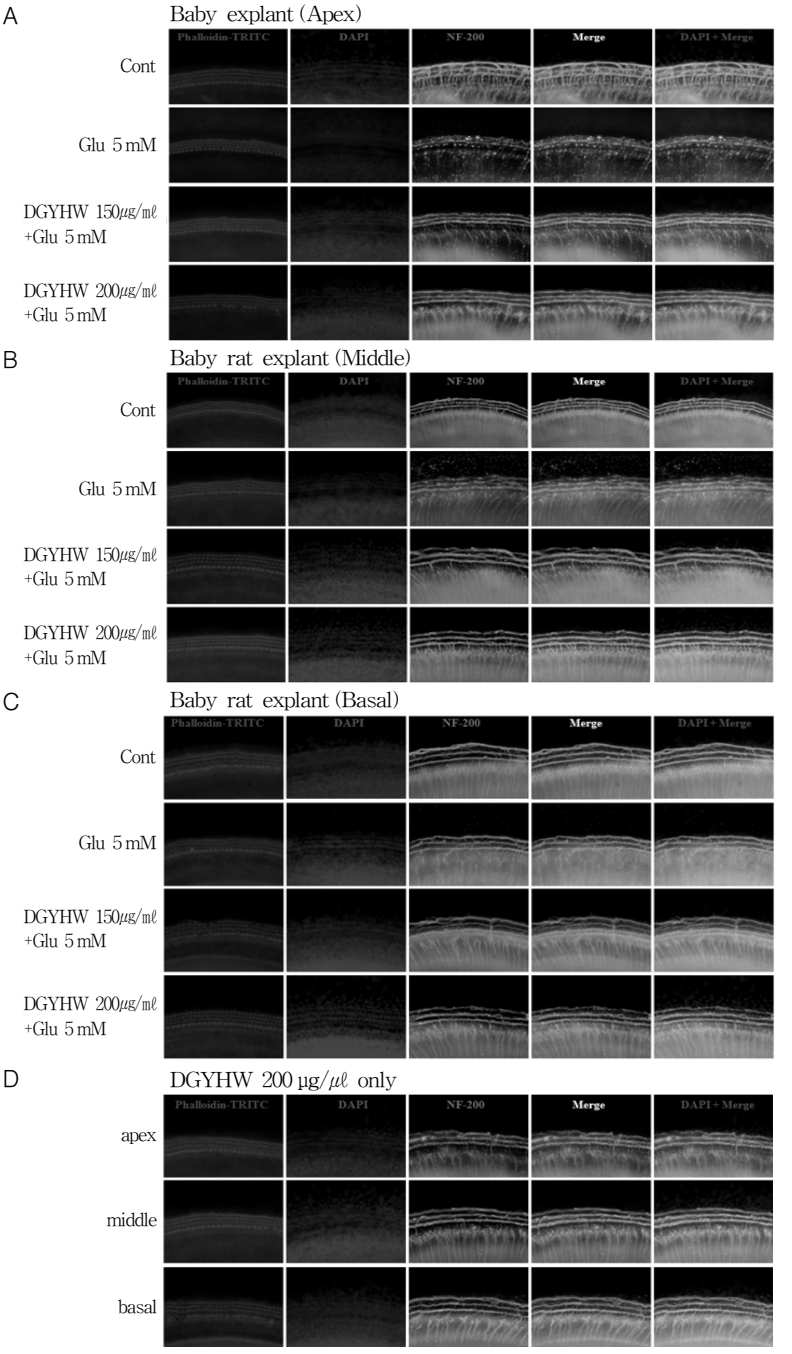

Figure 1. Protective effect of DGYHW on glutamate-induced sensorineural cell death in rat primary organ of Corti explant. The organ of Corti explants were dissected into three parts, the basal, middle, and apical turns and were treated with media alone, 10 mM glutamate alone, DGYHW and glutamate, or DGYHW alone for 24 hr. The cultures were stained with TRITC-conjugated phalloidin, FITC-conjugated NF 200 and DAPI and then observed under a fluorescence microscope.

11) 統計處理

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 실험결과의 통계처리는 Origin 7.5의 one way ANOVA에 준하여 처리하였고, p-value가 최대치 0.05 미만($p<0.05$)인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 結 果

1. 當歸龍薈丸의 글루타메이트에 의한 聽神經細胞 損傷에서 保護效果

글루타메이트에 의한 聽神經細胞의 損傷 및 當歸龍薈丸의 효과를 Ex Vivo로 조사하였다. 생후 3일된 내이의 와우에서 분리한 코르티기관은 각 회전별로 분획하여 배양하였다. 코르티기관에 5 mM 농도의 글루타메이트를 48시간 처리한 후 청감각 유모세포는 phalloidin-TRITC로, 신경세포는 NF 200-FITC 그리고 세포핵은 DAPI로 각각 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 글루타메이트를 처리한 코르티기관의 신경세포(green)는 대조군에 비하여 손상되었으나, 150 ㎍/㎖과 200 ㎍/㎖ 농도의 當歸龍薈丸을 각각 30분 전처리 한 후 글루타메이트를 처리한 실험군에서는 當歸龍薈丸의 농도에 의존적으로 聽神經細胞의 損傷이 현저히 감소하였다. 그러나 글루타메이트 처리시 코르티기관의 3열의 외유모세포와 1열의 내유모세포(red)는 형태 및 배열이 대조군과 동일하게 유지되어 손상은 관찰되지 않았다(Fig. 1A, B, C). 이때 200 ㎍/㎖ 농도의 當歸龍薈丸을 48 시간 동안 처리한 결과 코르티기관에 대한 자체독성은 관찰되지 않았다(Fig. 1D).

2. 當歸龍薈丸이 글루타메이트에 의한 聽神經細胞株 VOT-33 細胞生存率의 變化에 미치는 效果

글루타메이트에 의한 聽神經細胞 VOT-33 細胞 死滅에서 當歸龍薈丸의 효과를 조사하기 위하여 다양한 농도의 當歸龍薈丸을 30분 전 처리한 후 15 mM의 글루타메이트를 처리하여 24시간 배양한 후 細胞生存率을 MTT 방법으로 조사하였다. VOT-33 세포에 15 mM 농도의 글루타메이트 처리 시 49.1%의 細胞生存率을 보였으나 150 ㎍/㎖ 농도의 當歸龍薈丸을 전 처리하였을 경우 92.0%의 細胞生存率을 나타냈으며, 200 ㎍/㎖ 농도의 當歸龍薈丸 전처리 시 94.67%의 細胞生存率을 나타냈다. 또한 20 mM 농도의 글루타메이트를 24시간 처리 시 29%의 細胞生存

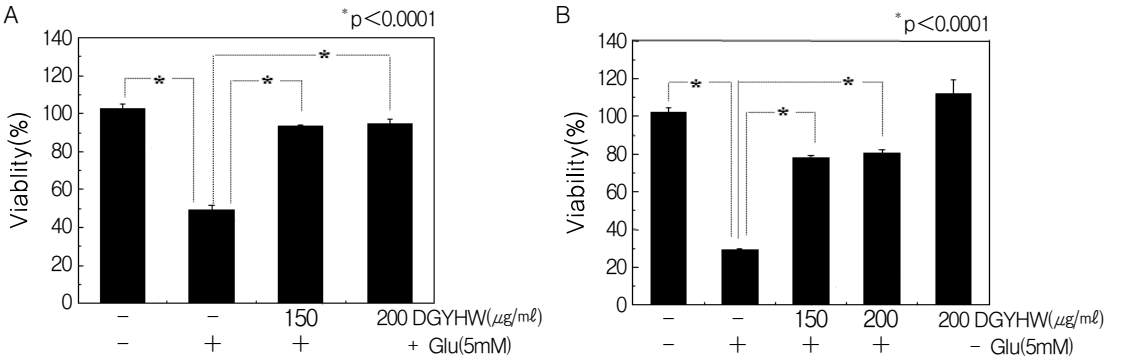

Figure 2. DGYHW proteced VOT-33 cell death by glutamate in a dose dependent manner. DGYHW treated 30 min before treating glutamate and incubated for 24 hr. The cell viability was assessed by MTT assay. Data represent the mean ± S.E.M. of three individual experiments.

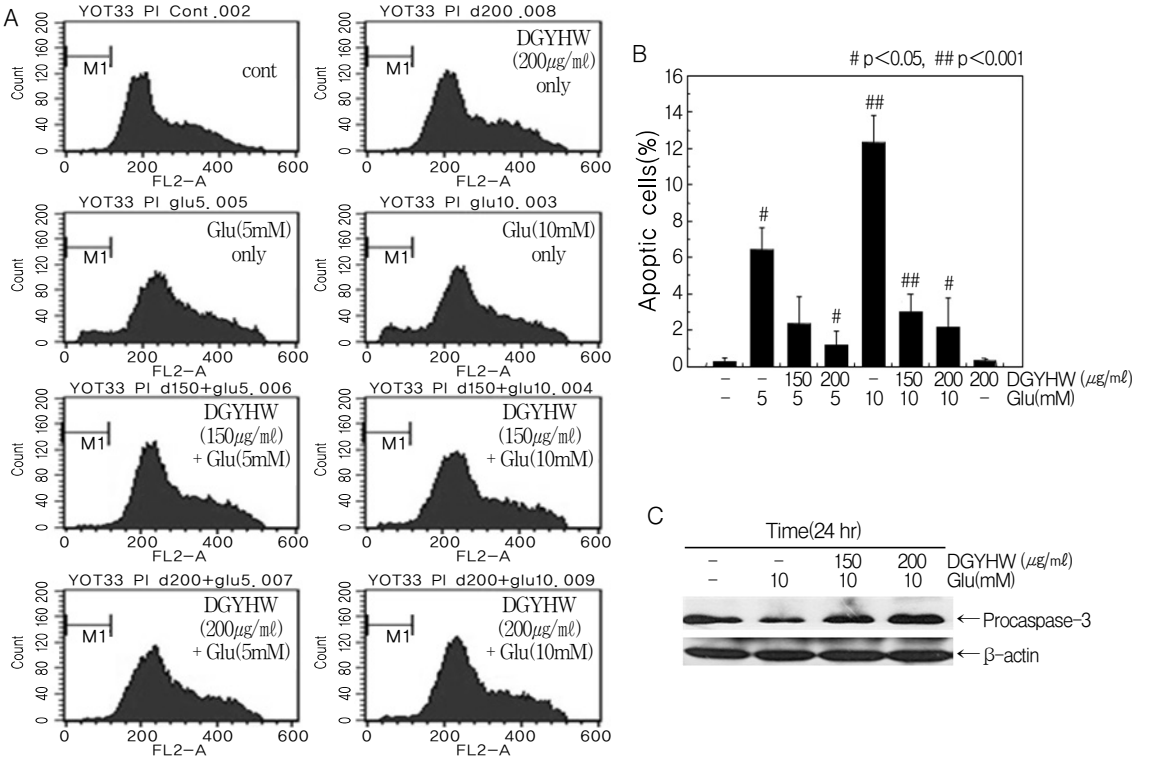

Figure 3. Protective effect of DGYHW on glutamate-induced apoptosis in VOT-33 cells.

VOT-33 cells were pre-treated with DGYHW and glutamate was stimulated for 24 hr. DNA fragmentation was assessed by PI staining and FACS analysis (A and B). Expression of procaspase-3 was measured by Western blotting. Cell lysates were quantified in protein concentration and subjected on 10% SDS-PAGE. The transferred membrane was immunoblotted with anti-procasepase-3 and anti-β actin antibodies. The immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence kit (C).

率을 보여 현저한 감소를 보였으나 150 μg/mℓ 농도의 當歸龍薈丸을 전 처리 하였을 경우 77.67%의 細胞生存率을, 200 μg/mℓ 농도의 當歸龍薈丸 전처리 시 80.67%의 細胞生存率을 나타냈다(Fig. 2A와 B). 또한 當歸龍薈丸 단독처리에 의한 VOT-33 세포의 독성은 나타나지 않았다(Fig. 2B).

3. 當歸龍薈丸이 글루타메이트에 의한 聽神經細胞株 VOT-33 細胞自滅死에 미치는 效果

글루타메이트에 의한 VOT-33 細胞 死滅에서 PI 염색에 의한 Flow cytometry 분석을 통해 Sub-G0 분획의 변화를 조사하였다. 정상 세포 핵의 DNA는 G1, S 및 G2/M기로 나타내어지며 細胞自滅死 유도시 분절된 DNA가 sub G0/G1 분획으로 증가된다. VOT-33 세포에 다양한 농도의 當歸龍薈丸을 30분 전 처리한 후 글루타메이트를 24시간 처리하였다. 그 결과 대조군 세포의 sub G0/G1은 0.2±0.2%였으며 5 mM 농도의 글루타메이트 처리 시 sub G0/G1은 6.4±1.22%로 유의한 증가를 나타냈으나 150 μg/mℓ 농도의 當歸龍薈丸을 전 처리 하였을 경우 2.53±1.53%, 200 μg/mℓ 농도의 當歸龍薈丸 전처리 시 1.71±0.76%

의 sub G0/G1를 나타내어 통계적으로 유의한 감소를 보였다. 또한 10 mM 농도의 글루타메이트를 VOT-33 세포에 처리 시 sub G0/G1은 12.3±1.53%로 유의한 증가를 나타냈으며 150 ㎍/㎖ 농도의 當歸龍薈丸을 전 처리 하였을 경우 3.12±0.01%, 200 ㎍/㎖ 농도의 當歸龍薈丸 전처리 시 2.17±1.6%의 sub G0/G1 분획을 보여 當歸龍薈丸의 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3A). 이러한 sub G0/G1 수치는 그래프로 나타내면 Figure 3B와 같으며 이상의 결과는 통계적으로 유의하였다(Fig. 3B).

當歸龍薈丸이 글루타메이트에 의한 VOT-33 細胞自滅死에 대한 保護效果에서 세포사멸의 신호전달 기전에 관여하는 procaspase-3 단백질의 발현 변화를 Western blot 분석법으로 조사하기 위하여 VOT-33 세포에 當歸龍薈丸을 30분 전처리 한 후 10 mM 농도의 글루타메이트를 24시간 처리하였다. 그 결과 글루타메이트에 의해 procaspase-3 단백질의 발현이 감소하여 분절되었으나 當歸龍薈丸을 전처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 procaspase-3 단백질의 발현이 대조군 수준으로 증가되었다. 이때 단백질양은 β-actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다(Fig. 3C).

4. 當歸龍薈丸이 글루타메이트에 의한 聽神經細胞株 VOT-33 細胞內 活性酸素種(peroxide)의 生成 變化에 미치는 效果

글루타메이트에 의한 VOT-33 細胞自滅死에서 當歸龍薈丸의 保護效果에 대한 기전연구를

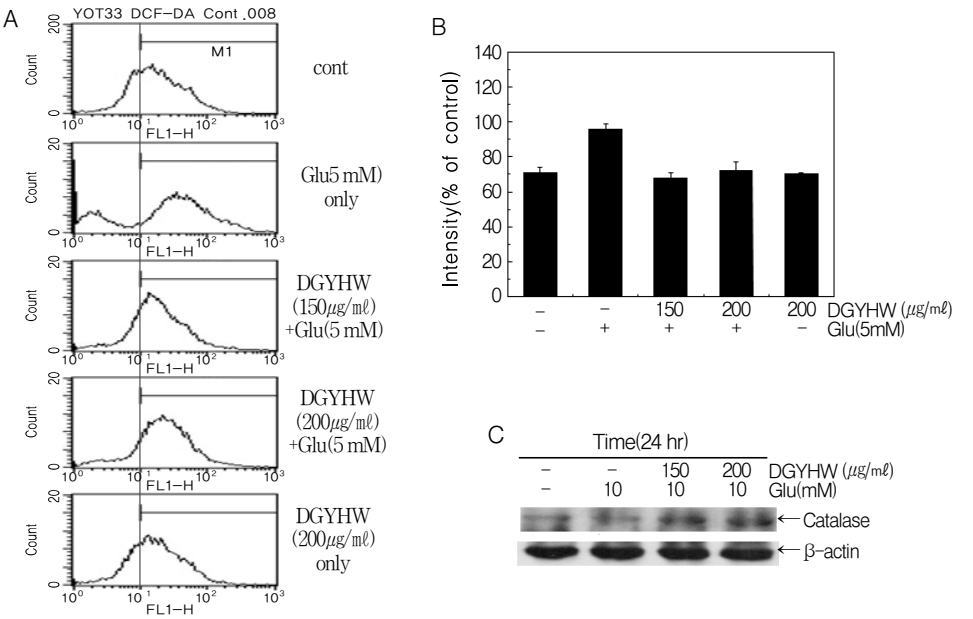

Figure 4. Potective effect of ROS generation in glutamate-induced VOT-33 cell death.

DGYHW and/or glutamate were treated at the indicated concentrations and incubated for 24 hr. Fluorescent dye DCF-DA was stained and FACS analysis was performed (A and B). Expression of catalase was measured by Western blotting. Cell lysates were quantified in protein concentration and subjected on 10% SDS-PAGE. The transferred membrane was immunoblotted with anti-catalase and anti-β actin antibodies. The immunoreactive bands were visualized by enhanced chemilluminescence kit (C).

위하여 세포내 活性酸素種의 생성을 형광염색을 통해 조사하였다. DCF-DA는 活性酸素種 중 세포내 과산화수소(H_2O_2)와 반응하여 녹색형광이 증가한다. 따라서 세포내 活性酸素種인 H_2O_2의 생성은 DCF-DA로 염색하여 Flow cytometry를 통하여 조사하고 변화량을 %로 표시하였다. VOT-33 세포에 5 mM 농도의 글루타메이트를 24시간 처리 시 그래프가 오른쪽으로 이동(shift)하여 형광이 증가하였으므로 세포내 H_2O_2가 생성되었음을 알 수 있었다. 그러나 當歸龍薈丸을 30분 전 처리하고 글루타메이트를 처리하였을 경우 다시 왼쪽으로 이동하여 세포내 H_2O_2의 양이 감소하였다. 이때 當歸龍薈丸 단독처리군은 대조군과 유사한 형광세기를 나타내었다(Fig. 4A). 이상의 결과는 정량화하여 대조군에 비해 증가된 H_2O_2의 양을 히스토그램으로 표현하였다(Fig. 4B).

當歸龍薈丸이 글루타메이트에 의한 VOT-33 細胞自滅死에 대한 保護效果에서 세포내 活性酸素種 조절 효소인 catalase 단백질의 발현 변화를 Western blot 분석법으로 조사하기 위하여 VOT-33 세포에 當歸龍薈丸을 30분 전 처리 한 후 10 mM 농도의 글루타메이트를 24시간 처리하였다. 그 결과 글루타메이트에 의해 catalase 단백질의 발현이 감소하였으나 當歸龍薈丸을 전처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 catalase 단백질의 발현이 현저히 증가되었다. 이때 단백질양은 β-actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다(Fig. 4C).

5. 當歸龍薈丸이 글루타메이트에 의한 聽神經細胞株 VOT-33 細胞內 活性酸素種(superoxide anion)의 生成變化에 미치는 效果

글루타메이트에 의한 VOT-33 細胞自滅死에서 當歸龍薈丸의 保護效果에 대한 기전연구를 위하여 세포내 活性酸素種의 생성을 형광염색을 통해 조사하였다. HE는 活性酸素種 중 세포내 산소음이온과 반응하여 적색형광이 증가한다. 따라서 세포내 活性酸素種인 O_2^-의 생성은 HE로 염색하여 Flow cytometry를 통하여 조사하고 변화량을 %로 표시하였다. VOT-33 세포에 5 mM 농도의 글루타메이트를 24시간 처리 시 그래프가 이동(shift) 되지 않아 세포내 O_2^-의 생성변화가 없음을 알 수 있었다. 또한 當歸龍薈丸 처리군에서도 대조군에 비하여 유의한 증감은 관찰되지 않았다(Fig. 5A). 이상의 결과는 정량화하여 대조군에 비해 증가된 O_2^-의 양을 히스토그램으로 표현하였다(Fig. 5B).

6. 當歸龍薈丸이 글루타메이트에 의한 聽神經細胞株 VOT-33 細胞自滅死에서 Bcl-2 및 Bax 蛋白質의 發顯變化에 미치는 效果

글루타메이트에 의한 VOT-33 細胞自滅死에서 當歸龍薈丸의 保護效果에 대한 세포사멸 신호전달계의 중요 신호전달 분자인 Bcl-2 family 단백질군 즉, Bcl-2 및 Bax 단백질의 발현 변화를 Western blot 분석법으로 조사하였다. VOT-33 세포에 當歸龍薈丸을 30분 전 처리 한 후질군 mM 농도의 글루타메이트를 24시간 처리한 결과, 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-2의 발현이 글루타메이트 처리시 감소하였으나 當歸龍薈丸 처리시 농도 의존적으로 발현이 현저히 증가하였다(Fig. 5A). 그러나 세포사멸 촉진 단백질인 Bax의 발현은 글루타메이트 처리시 미미한 증가를 보였으나 當歸龍薈丸에 의한 단백질의 발현 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 5B). 이때 단백질양은 β-actin을 통하여 확인하였다(Fig. 5C).

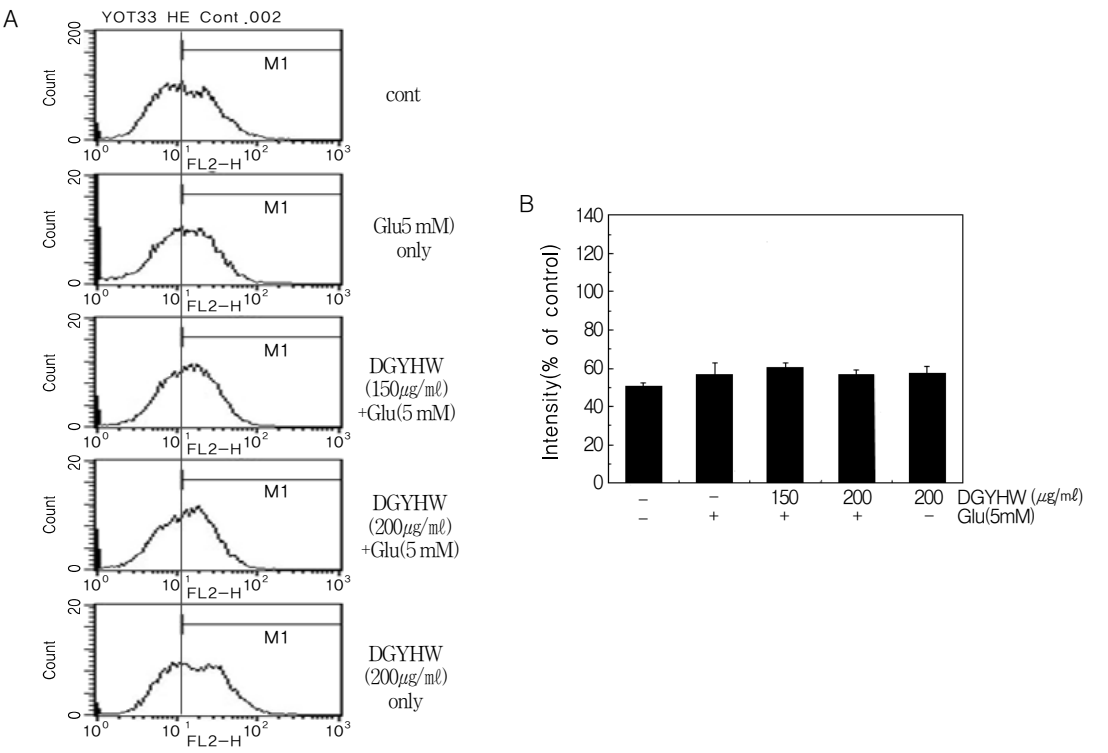

Figure 5. Potective effect of ROS generation in glutamate-induced VOT-33 cell death.

DGYHW and/or glutamate were treated at the indicated concentrations and incubated for 24 hr. Fluorescent dye HE was stained and FACS analysis was performed.

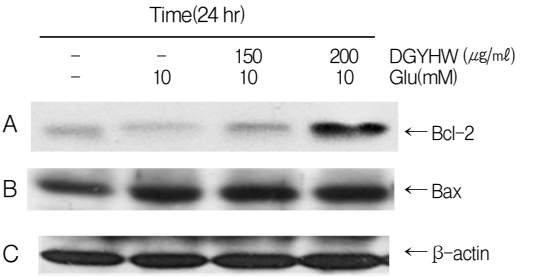

Fig. 6 Expression of Bcl-2 family protein in glutamate-treated VOT-33 cells.

Expression of Bcl-2 and Bax was measured by Western blotting. Cell lysates were quantified in protein concentration and subjected on 12.5% SDS-PAGE. The transferred membrane was immunoblotted with anti-Bcl-2, anti-Bax and anti-β actin antibodies. The immunoreactive bands were visualized by enhanced chemilluminescence kit.

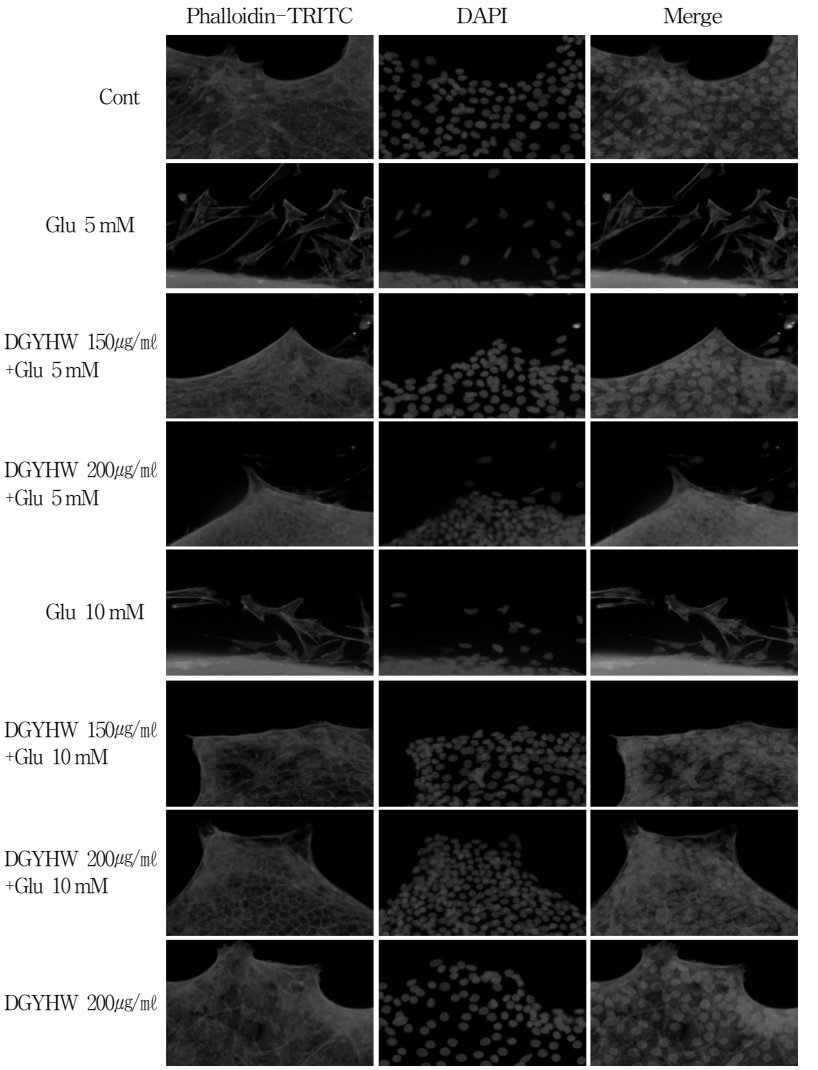

Figure 7. Protective effect of DGYHW on glutamate-induced supporting cell death in rat primary Organ of Corti explant.

The organ of Corti explants were dissected into three parts, the basal, middle, and apical turns and were treated with media alone, 10 mM glutamate alone, DGYHW and glutamate, or DGYHW alone for 24 hr. The cultures were stained with TRITC-conjugated phalloidin and DAPI and then observed under a fluorescence microscope.

7. 當歸龍薈丸이 글루타메이트에 의한 聽感覺 支持細胞의 損傷에 미치는 效果

글루타메이트에 의한 聽感覺 支持細胞의 損傷 및 當歸龍薈丸의 효과를 Ex Vivo로 조사하였다. 생후 3일된 내이의 와우에서 분리하여 배양한 코르티기관에 5 mM, 10 mM 농도의 글루타메이트를 48시간 각각 처리한 후 청감각 유모세포는 phalloidin-TRITC로, 그리고 세포핵은

DAPI로 각각 염색하여 외유모세포 외곽의 支持細胞들을 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 글루타메이트를 처리한 코르티기관의 支持細胞는 대조군에 비하여 현저하게 세포수가 감소하였으나 150 ㎍/㎖과 200 ㎍/㎖ 농도의 當歸龍薈丸을 각각 30분 전 처리 한 후 글루타메이트를 처리한 실험군에서는 當歸龍薈丸의 농도에 의존적으로 支持細胞의 損傷이 현저히 감소하였다. 이때 200 ㎍/㎖ 농도의 當歸龍薈丸을 48시간 동안 처리한 결과 支持細胞에 대한 자체독성은 관찰되지 않았다(Fig. 7).

Ⅳ. 考 察

當歸龍薈丸은 火, 熱로 인해 발생하는 耳鳴治療에 활용하는 처방이다. 火, 熱로 인한 耳鳴의 발생은 腎氣가 이미 虛한데 風邪가 침범하고 다시 思慮勞心하게 되면 氣가 脈內에서 結하여 유통이 되지 않아서 일어나거나 痰火가 상승하여 귀에 울체되기 때문이다. 虛實이 복합된 水虛火實而熱傷心이 耳鳴의 대체적인 원인으로 여겨진다.[11, 12]

當歸龍薈丸은 金代 劉完素의 《宣明方論》[7]에 최초로 수록되어 肝經의 實火로 발생하는 모든 證과 腎水陰虛로 인한 風熱의 諸證狀을 治하는데 활용되어온 처방이다. 當歸龍薈丸의 구성 약물은 《宣明方論》에 의하면 當歸, 龍膽草, 山梔子, 黃蓮, 黃柏, 黃芩, 大黃, 蘆檜, 靑黛, 木香, 麝香으로 되어 있는데, 11종 약물 중 淸熱瀉火, 涼血解毒, 淸熱燥濕 시키는 약물이 龍膽草, 山梔子, 黃蓮, 黃柏, 黃芩, 蘆檜, 靑黛 등 8종으로 主를 이루고 있다. 특히 방제중의 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子는 實熱의 사기를 없애는 苦寒無毒한 약물로 黃連解毒湯을 구성한다. 여기에 龍膽草가 더해져 心, 肝火를 瀉하고 大寒한 성미의 푸른색 靑黛도 肝의 實火를 瀉한다. 肝火가 왕성할 때 혈이 허해지므로 當歸로 補血하고 검은색의 蘆薈도 水를 보한다. 氣血陰陽을 宣通시키는 理氣之劑인 麝香, 木香 등이 佐使의 역할을 하여 전체를 완성하는 처방이다.[9] 따라서 當歸龍檜丸은 淸熱, 瀉火, 燥濕, 解毒, 補陰, 疏通시키는 치법을 가진 방제로 극심한 스트레스나 소음에 의한 충격에 의하여 발생하는 耳鳴의 악화를 방지하고 치료하는 효능이 있다.

근래에 들어 산업의 발달과 더불어 소음의 증가, 날로 복잡해져 가는 정신생활, 노령인구의 증가, 약물의 남용, 무절제하고 불규칙적인 생활, 무절제한 식습관 등 耳鳴의 유발인자는 점차 증가하는 추세[13, 14]에 있으며 통계에 따르면 국내 전체 인구의 17%, 노인인구의 1/3이 耳鳴과 難聽으로 고생하고 있다.[15] 그 결과 耳鳴환자의 대다수가 개인적, 사회적 불편을 겪고 있고 삶의 질에까지 영향을 미치고 있으나[16] 耳鳴 발생의 정확한 원인이나 기전은 밝혀지지 않아 치료가 쉽지 않은 상황이다. 聽神經 장애는 청각과 평형기능을 담당하는 내이의 신경에 이상이 생기는 질환이며, 聽神經細胞의 損傷에 의해 심각한 難聽 및 耳鳴, 머리에서 소리가 들리는 등 여러 가지 증상으로 나타난다.[17]

聽神經 계통의 損傷기전은 외부 자극에 의해 기계적 損傷으로 세포가 損傷되거나 조직 내의 腫瘍이나 高血壓과 같은 다양한 신경계 질환들은 조직 및 세포수준의 다양한 생화학적 기전들을 통하여 여러 유관세포들의 自滅死를 통하여 진행되는 것으로 알려져 있다.[5, 18] 특히 聽神經細胞 損傷에 기여하는 인자들은 여러 가지가 있으나 그 중 대표적인 것은 聽覺傳達經路에 관여하는 아미노산계의 興奮性 神經傳達物質인 글루타메이트이다. 글루타메이트는 척추동물의 中樞神經系에서 중요한 神經傳達物質이며 뇌에 분포되어 있는 여러 수용체에 작용하여 여러 다양한 생리작용에 관여한다. 소리 자극시 효율적인 소리 전달을 위해 청각 기능 유지에 필수적이지만 노화나 소음 및 질환 발병시 다량의 글루타메이트가 유리되어 여러 병리적 작용의 원인이

된다.[3-5, 19-21] 다량의 글루타메이트가 유리되거나 혹은 글루타메이트 수용체의 감도가 상승하면 神經細胞에 損傷을 주게 되는데, 이것은 酸化的 스트레스의 증가, 세포내 여러 이온들의 농도증가 등에 의하여 매개된다. 酸化的 스트레스는 핵산, 蛋白質 및 脂質에 損傷을 주고 미토콘드리아에도 영향을 주어 세포내 活性酸素種의 농도 증가를 유도한다.[22] 또한, 고농도의 活性酸素種은 抗酸化 메카니즘을 억제하여 神經細胞의 死滅을 유도한다.[23] 특히 耳鳴을 유발하는 聽神經細胞 損傷의 중요한 원인인 글루타메이트에 의한 聽神經細胞 損傷에서 한약재가 가지는 保護效果에 대한 보고는 거의 없다. 이에 이 연구에서는 聽神經細胞 損傷에서 當歸龍薈丸의 보호 효과를 알아보기 위하여 글루타메이트로 유도된 聽神經細胞死滅에서 當歸龍薈丸을 전 처리한 후 ex vivo 및 in vitro에서 細胞生存率의 변화 및 細胞自滅死, procaspase-3, catalase 및 Bcl-2 family 蛋白質, 活性酸素種의 생성 등을 조사하였다.

먼저, 글루타메이트에 의한 聽神經細胞 毒性을 조사하기 위하여 렛드의 내이 코르티기관을 분리하고 배양하였다. 내이의 청각기관은 2와 1/2 바퀴 회전하는 달팽이관 모양으로 이 연구에서는 각 회전별로 절단하여 5 mM 농도의 글루타메이트를 48시간 처리하고 코르티기관내의 각 구성세포들을 특정 시약으로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. Phalloidin-TRITC로 염색된 3열의 외유모세포와 1열의 내유모세포는 글루타메이트 처리시 대조군과 비교하여 전혀 損傷이 없었으나 NF-200으로 염색된 聽神經細胞는 각 회전별로 글루타메이트에 의하여 損傷되었다. 그러나 當歸龍薈丸 전 처리시 글루타메이트에 의한 聽神經細胞 損傷이 현저히 감소하였다. 또한 聽神經細胞株인 VOT-33에서도 細胞生存率을 조사한 결과 글루타메이트 농도 의존적으로 細胞 死滅이 증가하였으나 當歸龍薈丸은 이를 유의하게 보호하였다.

細胞自滅死(apoptosis)는 다세포 생물의 정상적인 기관 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 계획된 세포의 사멸로 빠른 세포탈수 현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상, 세포질 내의 칼슘농도의 증가, 염색체의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절, transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 아폽토틱 소체(apoptotic body)의 형성이 특징적이다.[24] 이 연구에서도 細胞自滅死의 전형적인 특성인 핵산의 분절현상은 PI 염색 후 유식세포분석을 통하여 확인하였다. 그 결과 VOT-33 세포는 글루타메이트 농도에 의존적으로 DNA의 분절이 증가되는 전형적인 細胞自滅死였으나 當歸龍薈丸은 농도 의존적으로 이를 보호하였다.

細胞自滅死의 작용기전으로는 Fas/Fas L system, sphingomyelin/ceramide 경로, 초기발현유전자(early immediate gene)의 활성화, Bcl-2 family proteins, caspase family cysteine protease, 그리고 endonuclease 등이 관여하는 것으로 보고되었다.[25-27] 이 실험에서도 VOT-33 세포에서 글루타메이트에 의해서 DNA의 분절과 subG0/G1 분획이 증가하는 細胞自滅死의 특징을 보였으므로 신호전달계인 caspase family cysteine protease의 발현변화를 조사하였다. Caspase-3 protease의 활성을 procaspase-3 protease의 분해를 통하여 확인할 수 있었으며 當歸龍薈丸을 전처리하였을 경우 procasepase-3의 분해와 PARP 단백질의 분절은 나타나지 않았다. 또한 상방 신호전달계인 caspase-8과 caspase-9의 발현은 조사하지 않았으나 이에 대한 연구가 요구된다. 특히 세포사멸 억제단백질인 Bcl-2의 발현이 글루타메이트 처리시 감소하였고, 반대로 Bax 단백질의 발현은 감소하였으나 當歸龍薈丸 처리시 Bcl-2 단백질의 발현 증가를 유도하였다. 따라서 글루타메이트에 의한 聽神經細胞 自滅死는 caspase-3의 상방 신호 전달 인자인 미토콘드리아 기능 장애 및 caspase-9 단백질의 활성

화와 관련이 있을 것으로 판단된다.

반응성 산소의 생성과 소거의 평형 유지는 생체의 항상성 유지에 대단히 중요하다.[28] 산소가 불안정하게 산화되어 생성되는 活性酸素種은 사립체 호흡 사슬의 효소반응이나, 해독반응, 유리방사선, 가시광선 및 자외선 조사 등에 의한 세포병리반응에도 연관이 있는 것으로 알려져 있으며, 생체에는 유리기에 의한 細胞損傷을 방지하는 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase (GPX) 등과 같은 抗酸化酵素系와 요산, glutathione, sulphydryl groups 및 melanine 등과 같은 抗酸化 物質이 있다.[29] 이 연구에서도 글루타메이트 처리 시 VOT-33 세포에서 농도 의존적으로 活性酸素種의 생성이 증가하였고, 이때 當歸龍薈丸은 活性酸素種의 생성을 억제하였다. 그러나 細胞內 活性酸素를 제거하는 SOD나 GPX 단백질 등의 발현변화는 측정하기가 어려웠다. 따라서 추가 연구를 통해 抗酸化 蛋白質의 발현변화에 대한 연구가 요구된다.

이상의 결과를 요약하면 當歸龍薈丸의 글루타메이트 誘導性 聽神經細胞 死滅에 대한 保護效果는 活性酸素種 생성 억제, procaspase-3 protease의 분해 및 PARP 단백질의 분절 억제를 통한 細胞自滅死 경로의 비활성화를 통해 細胞 保護效果를 나타내었다.

V. 結 論

글루타메이트에 의한 聽神經細胞 毒性에 대한 當歸龍薈丸의 保護效果를 알아보기 위하여 聽神經細胞에 글루타메이트를 처리하였고, 當歸龍薈丸을 전처리하여 細胞 生存率을 조사하였다. 또한 글루타메이트에 의하여 유도되는 세포의 형태학적 및 생화학적 현상들, 핵산의 절편이나 活性酸素種의 생성 및 細胞自滅死 관련 蛋白質의 변화 등을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

글루타메이트는 聽神經細胞의 細胞生存率의 감소를 농도의존적으로 유도하였으며, 當歸龍薈丸은 글루타메이트에 의한 聽神經細胞 生存率의 감소를 억제하였다. 아울러 當歸龍薈丸은 글루타메이트에 의한 聽神經細胞의 Sub-G0 분획의 증가와 DNA 응축, procaspase-3 protease의 분해, ROS의 생성증가를 억제하였으며, catalase 단백질의 발현증가를 유도하였다. 또한 當歸龍薈丸은 글루타메이트에 의한 聽神經細胞 損傷에서 細胞死滅 억제단백질인 Bcl-2 단백질의 발현증가를 유도하였고 支持細胞의 損傷을 농도의존적으로 억제하였다.

以上의 결과에서 當歸龍薈丸은 글루타메이트에 의한 聽神經細胞 自滅死에서 세포내 活性酸素種 생성 및 細胞自滅死 관련 蛋白質의 발현조절을 통해 保護效果를 나타내었다. 따라서 보호기전에 대한 정확한 연구를 통해 聽神經細胞 損傷에 의한 耳鳴의 豫防 및 治療에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 楊醫亞 主編 : 中醫學問答, 北京, 人民衛生出版社, 1985, pp.561-595.
2. Meyerhoff : Diagnosis and management of hearing loss. Philladelphia, WB Saunders Co. 1984, pp.95-104.
3. Landucci E, Boscia F, Gerace E, Scartabelli T, Cozzi A, Moroni F, Mannaioni G, Pellegrini-Giampietro DE : Involvement of endocannabinoid signaling in the neuroprotective effects of subtype 1 metabotropic glutamate receptor antagonists in models of cerebral ischemia. Int Rev Neurobiol. 2009 ; 85 : 337-350.
4. Dean OM, van den Buuse M, Bush AI,

Copolov DL, Ng F, Dodd S, Berk M: A role for glutathione in the pathophysiology of bipolar disorder and schizophrenia: Animal models and relevance to clinical practice. Curr Med Chem. 2009; 16(23): 2965-2976.
5. Steinbach S, Lutz J: Glutamate induces apoptosis in cultured spiral ganglion explants. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 357(1): 14-19.
6. Milanese M, Bonifacino T, Zappettini S, Usai C, Tacchetti C, Nobile M, Bonanno G: Glutamate release from astrocytic gliosomes under physiological and pathological conditions. Int Rev Neurobiol. 2009; 85: 295-318.
7. 劉完素: 劉河間三六書, 서울, 成補社, 1975. pp. 157.
8. 盧石善: 眼耳卑咽喉科學, 서울, 周珉出版社, 2003. p.447.
9. 文鐘肆, 李昌炫, 李光揆: 當歸龍薈丸의 抗癌作用에 관한 실험적 연구, 大韓東醫病理學會誌, 1999; 13(2): 108-116.
10. 文鐘肆, 李昌炫, 李基商, 李光揆: 當歸龍薈丸의 免疫調節作用에 관한 실험적 연구, 大韓東醫病理學會誌, 2000; 14(1): 70-81.
11. 徐春甫: 古今醫統秘方大全(8), 中國, 新文風出判公司, 1982. pp.4140-4162.
12. 陳伯未: 實用中醫學, 中國, 新文風出判公司, 1977. pp.15-16.
13. 백무진, 황문섭: 耳鳴에 의한 障碍 程度와 삶의 질에 미치는 影響, 임상이비인후과, 2002; 13(1): 50-55.
14. Pawel J. Jastreboff, William C. Gray, Susan L. Gold: Neurophysiological Approach to Tinnitus Patients. The American Journal of Otology. 1996; 17: 36-240.
15. 정연훈, 박홍준, 송정환, 유상준, 문성균, 박기현: 耳鳴에 대한 glutamate 拮抗劑의 治療效果, 대한이비인후과학회지, 2003; 46: 935-939.
16. 김자혜, 김민희, 신상호, 윤화정, 고우신, 김규곤: 耳鳴의 韓方治療에 의한 삶의 질 改善效果, 한방안이비인후피부과학회지 2006; 19(3): 158-170.
17. Pessin AB, Martins RH, Pimenta Wde P, Simões AC, Marsiglia A, Amaral AV: Auditory evaluation in patients with type 1 diabetes. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2008; 117(5): 366-370.
18. Pai N, Zdanski CJ, Gregory CW, Prazma J, Carrasco V: Sodium nitroprusside/nitric oxide causes apoptosis in spiral ganglion cells. Otolaryngol Head Neck Surg. 1998; 119(4): 323-330.
19. Milanese M, Bonifacino T, Zappettini S, Usai C, Tacchetti C, Nobile M, Bonanno G: Glutamate release from astrocytic gliosomes under physiological and pathological conditions. Int Rev Neurobiol. 2009; 85: 295-318.
20. Gao Z, Huang K, Xu H: Protective effects of flavonoids in the roots of Scutellaria baicalensis Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells. Pharmacol Res. 2001; 43(2): 173-178.
21. Halliwell B, Gutteridge J.M.C: Protection aganist oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In Free radicals in biology and medicine, 2nd Ed., Clarendon Press, Oxford. 1999. pp. 86-89.
22. Nicholls DG: Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. Curr Mol Med. 2004; 4: 149-177.

23. Farooqui T, Farooqui AA : Aging : an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Mech Ageing Dev. 2009 ; 130 : 203-215.
24. Cohen JJ : Apoptosis : the physiologic pathway of cell death. Hosp Pract 1993 ; 28(12) : 35-43.
25. Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z, Kolesnick R : Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis : an alternative mechanism for generating death signals. Cell. 1995 ; 85 : 405-414.
26. Brown DG, Sun XM, Cohen GM : Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. J Biol Chem. 1993 ; 268 : 3037-3039.
27. Budijardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X : Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol. 1999 ; 15 : 269-290.
28. Atalay M, Laaksonen DE, Niskanen L, Uusitupa M, Hanninen O, Sen CK : Altered antioxidant enzyme defences in insulin-dependent diabetic men with increased resting and exercise-induced oxidative stress. Acta Physiol Scand. 1997 ; 161(2) : 195-201.
29. Halliwell B, Gutteridge JM : Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : an overview. Methods Enzymol. 1990 ; 186 : 1-85.