

사람 신경모세포종 SH-SY5Y 세포주의 파킨슨 모델에 대한 小續命湯의 보호효과

우 찬, 유주연, 장철용, 김효린, 신용진, 문아지, 신선호
원광대학교 한의과대학 내과학교실

Protective Effects of *Sosokmyoung-tang* Against Parkinson's Model in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells

Chan Woo, Ju-yeon You, Chul-yong Jang, Hyo-rin Kim, Yong-jeen Shin, A-ji Moon, Sun-ho Shin
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Won-Kwang University

ABSTRACT

Objectives: In this study we made an effort to investigate the protective effect of SSMT on the N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced cytotoxicity of SH-SY5Y cells.

Methods: The cell viability was assessed by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The fluorescence intensity was measured by using a dye and then with propidium iodide (PI) DNA flow cytometry analysis of the effects on the cell cycle of the SH-SY5Y cells and were used to measure the fluorescence of intracellular reactive oxygen species generation by MPTP.

Results: Pretreatment of SSMT significantly suppressed MPTP-induced cytotoxicity, which was revealed as apoptosis characterized by the reduction of cell viability, the increase of ROS production, and the loss of mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y cells.

Conclusions: These findings suggest that SSMT exerts neuroprotective effects on human neuroblastoma SH-SY5Y cells by MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration.

Key words: SH-SY5Y cell, neuroprotective effect, *Sosokmyoung-tang* (SSMT)

1. 서론

파킨슨병(Parkinson's disease, PD)은 병인학적으로 중뇌 흑질부위의 도파민성 신경세포의 사멸에 의해 발생하는 가장 흔한 신경계 퇴행성 질환의 한 종류이다¹⁻³. 파킨슨병 환자에 대한 사후연구는 극히 어렵기 때문에 이 질병에 대한 여러 연구 모

델이 개발되었는데, 그 중 MPTP(N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)라는 물질을 이용한 모델이 가장 많이 사용되고 있다^{4,6}. 도파민과 화학구조가 유사한 MPTP는 도파민 운반체를 통해 도파민성 신경세포로 유입되어 이의 선택적인 사멸을 일으킴으로써 파킨슨병을 유발시킨다.

小續命湯은 唐代 孫思邈의 《千金要方》⁷에 '治卒中風, 人事不省, 喎斜, 癱瘓, 瘖瘡, 癱木, 眩暈'이라고 최초로 수록된 이후 여러 醫書에 인용된 처방으로 초기 중풍의 無汗表實證 및 一切風症을 치료하는데 활용되어 왔다⁸⁻¹⁰.

· 교신저자: 신선호 전북 전주시 덕진구 덕진동 2가 142-1번지
원광대학교 전주한방병원 심계내과학교실
TEL: 063-270-1013 FAX: 063-270-1594
E-mail: shshin@wonkwang.ac.kr

최근에는 小續命湯이 뇌출혈로 인한 부종을 감소시키고 뇌출혈 주변부위에서 염증반응을 억제하여 초기 중풍 환자에 효과가 있는 것으로 보고되는 등 뇌신경세포 손상에 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹¹⁻¹³. 이에 주로 허혈 및 염증으로 인한 뇌신경세포 손상에 효과가 있다고 보고되고 있는 小續命湯이 도파민성 뇌신경세포의 손상에도 효과가 있을 것으로 생각되어 본 연구를 시행하였다.

파킨슨병 모델인 MPTP에 의해 유도된 SH-SY5Y 세포주에서 小續命湯을 전처리한 후 세포생존율, 활성산소종 생성, GSK3 활성화, 항산화효과, 세포 내 에너지원에 미치는 영향 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 小續命湯의 처방 내용은 《東醫寶鑑》⁸에 수록된 약재의 구성과 용량을 기준으로 하였다. 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였으며, 4貼의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Sosokmyoung-tang*

Herbal name	Scientific name	Dosage (g)
防 風	<i>Ledebouriella seseloides</i>	24
防 己	<i>Sinomenium acutum</i>	16
肉 桂	<i>Cinnamomum loureirii</i>	16
杏 仁	<i>Prunus sibirica L.</i>	16
黃 芩	<i>Scutellaria baicalensis</i>	16
白芍藥	<i>Paeonia japonica</i>	16
人 蔘	<i>Panax ginseng C.A.Meyer</i>	16
川 芎	<i>Cnidium officinale Makino</i>	16
麻 黃	<i>Ephedra sinica</i>	16
甘 草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	16
附 子	<i>Aconitum carmichaeli Debeaux</i>	8
生 薑	<i>Zingiber officinale</i>	16
大 棗	<i>Zizyphus jujuba var. inermis</i>	16
Total amount		208

2) 시약 및 기기

RPMI 1640, FBS(fetal bovine serum), 항생제 및 trypsin 등의 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL Co.(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 배양용기(24 well plate와 10 cm dish)는 Falcon Co.(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 및 핵 염색과 관찰에 이용한 slide chamber는 Thermo scientific Nunclon Surface (Thermo scientific Nunc, Rochester, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. MTT(methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazoliumbromide), MPTP(N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), SDS(sodium dodesyl sulfate), DMSO(dimethyl sulfoxide), PI(propidium iodide) 및 Ponceus S solution은 Sigma Co.(St. Louis, USA)로부터 구입하였고, DCF-DA, DHE, Fluo-3 AM 및 JC-1은 Molecular probes (Invitrogen, Eugene, OR, USA)로부터 구입하였다. Nitrocellulose paper(Hybond-C, RPN303C)는 Amersham Biosciences Co.(Amersham, UK)에서 구입하였다. 실험에 사용된 일차항체 중 β -actin, Caspase-3, Catalase, Cox 2, GSK3 β , iNOS, Nrf2, PARP, PGC-1 α , PMP70은 Santa Cruz Co.(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, β -catenin, phospho- β -catenin, phospho-GSK3 α/β (s-21/s-9), phospho-p53(s-15)은 Cell Signaling (Cell Signaling Technology Inc, Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 2차 항체는 각각 Goat-IgG(Dako, P0449, Japan), Mouse-IgG(Bethyl, A90-116P, Montgomery, TX, USA) 및 Rabbit-IgG(Bethyl, A120-101P, Montgomery, TX, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3) 세포주

실험에 사용한 사람 신경모세포종 SH-SY5Y 세포주는 ATCC(American Type Cell Culture, VA, USA)에서 구입하였고, 세포 배양에 필요한 10% FBS와 RPMI 1640 배지는 Gibco Co.(Gibco, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 제조

검액은 小續命湯 4貼 분량인 208 g을 3,000 ml 환저 플라스크에 증류수 2,000 ml와 함께 넣은 다음, 150분간 가열하여 얻은 전탕액을 여과지에 여과한 후 5,000 rpm으로 30분간 원심분리하고 감압 농축기(rotary vacuum evaporator)에 넣어 감압 농축한 후 동결건조기로 완전히 건조하여 26.47 g을 얻었다. 시료는 15 ml 튜브에 100 mg/ml를 PBS용액에 용해하여 2500 rpm으로 20분간 원심분리 후 25 µm filter로 필터링하고 1.5 ml eppendorf tube에 분주하여 냉동 보관하고 사용 시 RPMI 1640 배지와 혼합하여 사용하였다.

2) 세포 배양

사람 신경모세포종 SH-SY5Y 세포는 ATCC (American Type Cell Culture, VA, USA)에서 구입하여 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 세포배양액으로 세포 배양기 (5% CO₂ 및 37 °C)에서 10 cm 세포 배양판에 배양하였다. 일주일에 2번 간격으로 0.05% trypsin-EDTA를 사용하여 계대배양 하였으며, 배양액을 교체한 후 log phase에 있는 세포를 사용하였다.

3) 세포 생존율 측정

세포생존율은 MTT assay (Mosmann, 1983)를 이용하였다. SH-SY5Y 세포를 24-wells 세포 배양액에 1×10^5 cells/ml씩 분주하여 24시간 배양판에 부착시키고, MPTP와 小續命湯을 농도 및 시간별로 처리하고 MTT(0.25 mg/ml)를 첨가하고 37 °C에서 4시간 반응시켰다. 상등액을 주의 깊게 제거하고 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 570 nm 파장에서 분광광도계(THERMO max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) 세포주기 분석(Cell Cycle Analysis)

MPTP가 SH-SY5Y 세포의 세포주기에 미치는 영향에 대한 분석은 propidium iodide(PI)로 DNA

를 염색한 후 flow cytometry(FACS Calibur, BD Biosciences, USA)를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. SH-SY5Y 세포에 MPTP와 小續命湯을 처리한 다음, 24시간 후에 trypsin-EDTA(0.05%/ml)로 처리하고 RPMI 1640 배지로 교환한 다음, 포집하여 원심분리하고 PBS로 2번 세척하였다. 세척된 세포에 PBS 300 µl를 넣고 PI용액(0.1% Triton X-100, PI 20 µg/ml, RNase 200 µg/ml) 500 µl를 첨가하고 20분간 반응시킨 후 1×10^4 세포를 flow cytometry를 이용하여 세포주기를 분석하였다. 얻어진 정보의 분석은 Cell Quest Software(Becton Dickinson Biosciences, USA)를 이용하여 분석하였다.

5) 세포 내 ROS(Reactive Oxygen Species) 측정

MPTP에 의한 세포 내 활성산소종의 생성을 측정하기 위하여 형광 probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA: Molecular probe)와 dihydroethidium (DHE: Molecular probe)을 이용하였다. 비 형광 물질인 DCF-DA는 세포 내 hydroxyl radical 및 과산화수소 등과 반응하여 형광을 발하는 DCF로 변환되어 녹색의 형광을 나타낸다. 세포 내 활성산소종의 양을 측정하기 위하여 SH-SY5Y 세포를 배양하고 MPTP와 小續命湯을 처리하고 24시간 후 세포를 수확하기 전에 5 µM DCF-DA를 처리하고 37 °C에서 30분간 배양 후 PBS(pH 7.4)로 세척하고 0.05% trypsin-EDTA용액으로 처리하여 세포를 수확하고 원심분리 후 PBS로 세척하여 flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences, USA)를 이용하여 형광의 세기를 Cell Quest Software(Becton Dickinson Biosciences, USA)를 이용하여 정보를 분석하였다. DHE는 세포 내 superoxide anion에 의해서 ethidium으로 전환되고 세포 내 DNA에 삽입되어 형광(488 nm excitation/ 510 nm emission)을 나타낸다(Bindokas et al. 1996). 세포 내 순수한 superoxide anion을 측정하기 위하여 DHE를 배양된 SH-SY5Y에 MPTP와 小續命湯을 처리하고 24시간 후 배지를 제거하고 PBS(pH 7.4)용액으로 세척한 다음, DHE용액을 1 µg/ml 농도로 처리하여 세포 배양기에서 45

분간 배양하였고 PBS로 세척 후 형광현미경에서 검경하였다.

6) 미토콘드리아 막전위 측정

미토콘드리아의 막전위 변화를 조사하기 위하여 JC-1(10 µg/ml) 염색을 수행하였다. 세포는 차가운 PBS로 2회 세척하고 RMPI-1640 배지에 희석한 JC-1 (10 µg/ml)을 처리하고 20분간 세포 배양기에서 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. Flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences, USA)를 이용하여 형광의 세기를 측정하였으며, Cell Quest Software (Becton Dickinson Biosciences, USA)를 이용하여 정보를 분석하였다.

7) 세포 내 유리 칼슘 농도 측정

SH-SY5Y 세포를 6 cm 세포 배양판에 1×10^5 cells/ml 씩 분주한 다음, 24시간 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. MPTP와 小續命湯을 처리하고 24시간 배양한 후 세포 내 칼슘이온의 축적을 측정하기 위하여 형광 probe Fluo-3 AM(Molecular Probes, Eugene, OS)을 이용하였다. 처리된 세포에 5 µM Fluo-3 AM을 처리하고 세포 배양기에서 30분간 배양 후 PBS로 세척하고 4% paraformaldehyde로 상온에서 15분간 고정하였다. 고정된 세포에서 세포 내 칼슘 농도를 Flow cytometry(FACS Calibur, BD Biosciences, USA)를 이용하여 형광의 세기를 측정하였으며, Cell Quest Software(Becton Dickinson Biosciences, USA)를 이용하여 정보를 분석하였다.

8) 통계처리

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과로서 통계 처리는 Student's t-test에 준하여 처리하였으며, p-value가 최대치 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. MPTP와 小續命湯에 의한 SH-SY5Y 세포생존율의 변화

파킨슨병을 유발하는 MPTP가 SH-SY5Y 세포

에 미치는 독성을 알아보기 위하여 다양한 농도의 MPTP를 24시간 처리하여 MTT assay로 세포생존율을 측정하였다. MPTP 농도가 증가할수록 농도의존적으로 유의하게(p<0.05) 세포생존율이 감소되었다. 특히 2.5 mM 이상의 고농도에서는 41.9% 이하의 세포생존율을 보였다(Fig. 1A).

마찬가지로 小續命湯이 단독으로 투여되었을 경우 SH-SY5Y 세포생존율에 미치는 영향을 알아보고자 같은 방법으로 세포생존율을 측정하였다. 300 µg/ml까지는 92.7% 이상의 생존율을 보였으나 그 이상의 고농도에서는 세포생존율이 감소하였다(Fig. 1B).

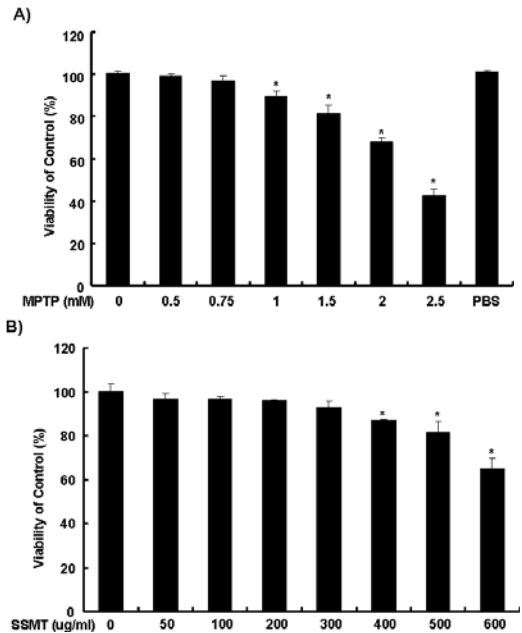


Fig. 1. MPTP and SSMT-treatment increases cytotoxicity of SH-SY5Y cells in dose-dependent manner.

Cells were treated with various concentrations of MPTP and SSMT for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results represented as the mean (%)±S.D. of three independent experiments. * p<0.05 by student's t-test, compared to control group.

2. 小續命湯이 세포생존율에 미치는 영향

MPTP에 의해 유도된 SH-SY5Y 세포사멸에서

세포생존율에 미치는 小續命湯의 효과를 알아보기 위해 SH-SY5Y 세포에 다양한 농도의 小續命湯을 4시간 전처리하고 2 mM 농도의 MPTP를 24시간 처리하여 세포생존율을 측정하였다.

MPTP에 의해 71.6% 이하로 감소되었던 세포생존율이 小續命湯을 농도별로 전처리한 경우에 200 µg/ml의 농도에서는 약 92.8%에 가까운 생존율을 나타내었으나 300 µg/ml(86.4%) 이상의 농도에서는 세포생존율이 감소되어 500 µg/ml에서는 60.7%로 나타났다. 따라서 본 연구의 최적 조건으로 小續命湯 150 µg/ml을 선택하여 이후의 실험을 진행하였다(Fig. 2A).

또한 시간에 따른 세포생존율 변화를 알아보기 위해 MPTP를 24시간과 48시간으로 나누어 처리한 후 세포생존율을 분석하였다. 그 결과 시간의 존적으로 세포생존율이 감소하는 것으로 나타났다. MPTP처리 후 24시간에 64.8%, 48시간에 39.9%의 세포생존율을 나타내어 향후 SH-SY5Y세포에서 MPTP처리 후 24시간을 최적의 조건으로 선택하여 이후의 실험을 진행하였다(Fig. 2B).

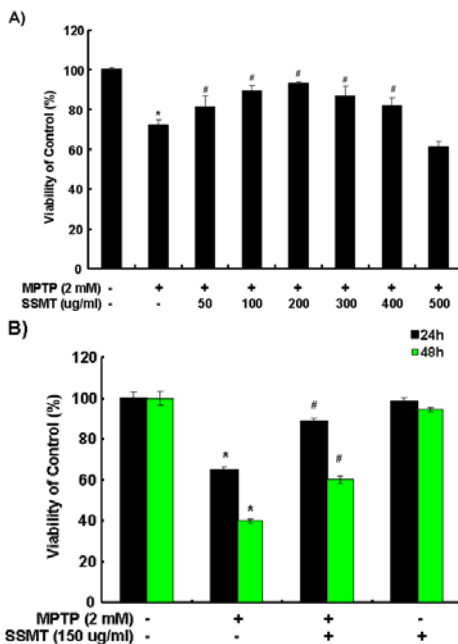


Fig. 2. Action of different effects in accordance

with concentration of SSMT in Human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Low dose of SSMT protects MPTP-induced cytotoxicity of SH-SY5Y cells but not high-concentration treatment. Cells were treated with various concentrations of SSMT for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results represented as the mean (%)±S.D. of three independent experiments. * p<0.05 by student's t-test, compared to control group and # p<0.05 by student's t-test, compared to MPTP-treated group.

3. 小續命湯이 MPTP에 의한 세포주기에 미치는 영향
파킨슨병을 유발하는 것으로 알려진 MPTP에 의한 세포주기의 변화를 확인하고자 PI염색법을 이용하여 핵을 염색하고 FACS 분석을 통하여 세포주기를 분석하였다. 그 결과 SH-SY5Y 세포에서 MPTP에 의해 G1 arrest가 진행되는 것으로 나타났으며, 小續命湯을 전처리한 결과, G1 arrest가 다소 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

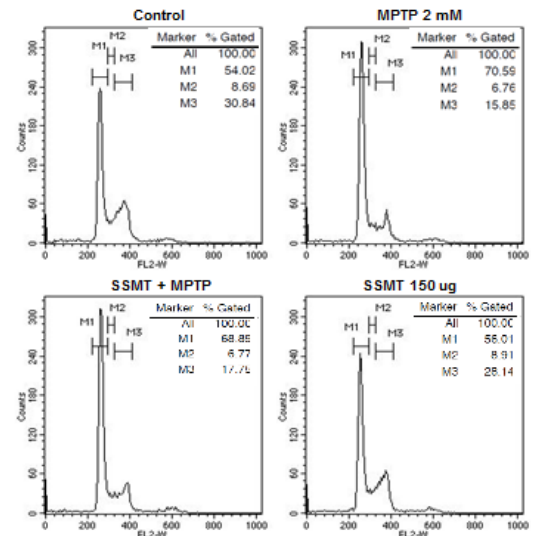


Fig. 3. SSMT protects MPTP-induced G1 arrest in Human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Cells were treated with 2mM MPTP and 150 µg/ml SSMT for 24 hr. Then, cells were stained with PI staining solution and analyzed by flow cytometry.

4. 小續命湯이 MPTP에 의한 ROS 생성에 미치는 영향

파킨슨병을 유도한 모델에 이용되는 MPTP는 세포 내 oxidative stress를 유발하는 것으로 알려져 있다. oxidative stress에 대한 小續命湯의 보호효과를 확인하기 위하여 hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical 계열을 검출하는데 이용되는 DCF-DA를 통해 염색하고 FACS 장비를 이용하여 분석하였다. 그 결과, MPTP에 의해 증가된 ROS가 小續命湯을 전처리함으로써 72.65%에서 54.72%로 현저히 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

또한 세포 내 또 다른 ROS인 superoxide anion (O₂⁻)에 특이적으로 반응하는 DHE를 이용하여 MPTP 처리군과 小續命湯 전처리군에서 세포 내 superoxide anion을 형광현미경을 이용하여 확인하였다. 그 결과, superoxide anion이 MPTP를 처리한 세포에서 현저히 증가된 반면, 小續命湯을 전처리한 경우에 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

MPTP는 미토콘드리아에 작용하여 다량의 ROS를 생성하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 MPTP를 처리한 경우와 小續命湯을 전처리한 경우에서 미토콘드리아의 막전위 변화에 특이적인 JC-1을 이용하여 미토콘드리아의 막전위 변화를 FACS 분석으로 측정하였다. 그 결과, 小續命湯 전처리군에서의 막전위 변화가 MPTP를 처리한 경우보다 다소 감소하는 것으로 측정되었다(Fig. 6).

세포 내 oxidative stress는 calcium reservoir로 잘 알려진 세포 내 소기관인 미토콘드리아 및 소포체(endoplasmic reticulum)로부터 칼슘을 방출한다. 이를 확인하기 위하여 Flu-3 AM을 이용하여 intracellular free calcium을 측정하였다. 형광현미경을 이용하여 검측한 결과, MPTP에 의해 세포 내 소기관으로부터 칼슘 방출이 증가하였으나 小續命湯 전처리를 한 경우에는 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 7).

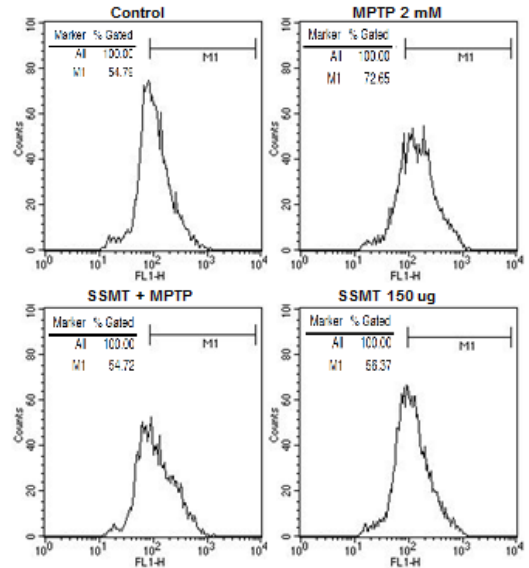


Fig. 4. SSMT suppresses MPTP-induced reactive oxygen species production in Human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Cells were treated with 2mM MPTP and 150 µg/ml SSMT for 24hr. After harvesting, cells were stained with DCF-DA staining solution for detection of various hydroxyl radicals and hydrogen peroxide and subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular specific reactive oxygen species.

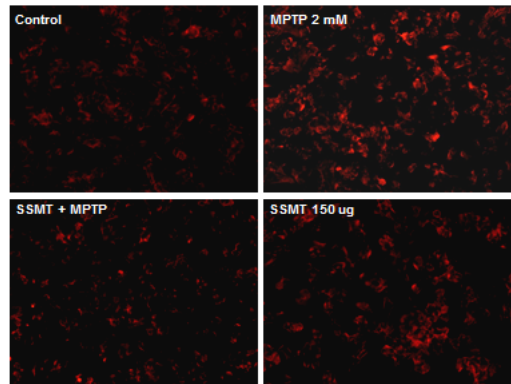


Fig. 5. SSMT reduces production of superoxide anion with MPTP treatment in Human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Cells were treated with 2 mM MPTP and 150 µg/ml SSMT for 24 hr. Cells were stained with DHE dye and estimated to the productive levels of intracellular specific superoxide anion under the fluorescence microscope.

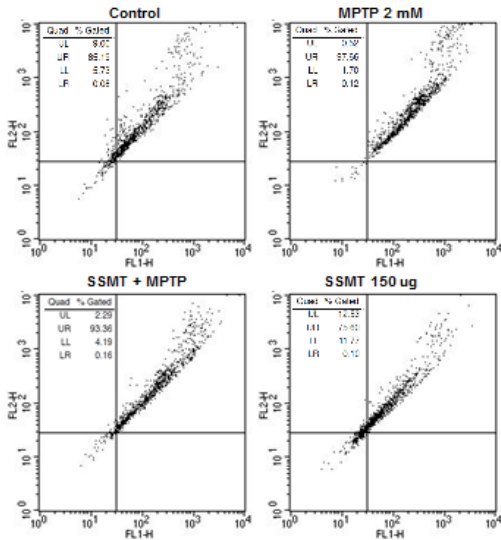


Fig. 6. SSMT reduces MPTP-induced mitochondrial membrane potential shift ($m\Psi$) in Human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Cells were treated with 2 mM MPTP and 150 μ g/ml SSMT for 24 hr. After harvesting, cells were stained with JC-1 staining solution and subjected on flow cytometric analysis to estimate the mitochondrial membrane potential shift ($m\Psi$).

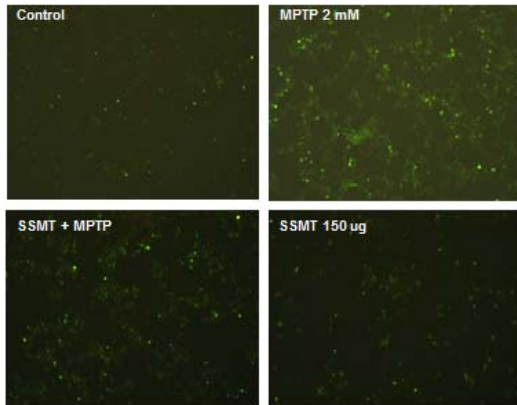


Fig. 7. SSMT reduces release of intracellular calcium with MPTP treatment in Human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Cells were treated with 2 mM MPTP and 150 μ g/ml SSMT for 24 hr. Cells were stained with Flu-3 AM dye and analyzed to the productive levels of intracellular free calcium under the fluorescence microscope.

IV. 고찰

小續命湯은 孫思邈이 저술한 《千金要方》, 《千金翼方》에 기록되어 있으며, 그 후 《醫學入門》 등에 수록되어 사용된 처방으로 中風의 人事不省, 神氣混亂, 半身不隨, 筋急拘攣, 口眼喎斜 등의 症을 치료한다고 알려져 있다.^{7,9}

小續命湯은 防風, 防己, 肉桂, 杏仁, 黃芩, 白芍藥, 人蔘, 川芎, 麻黃, 甘草, 附子, 生薑, 大棗로 구성되어 있다. 본 방의 麻黃, 防風, 防己, 杏仁, 甘草, 生薑 등의 약재는 祛風通絡시킴으로써 腠理를 開하여 治風한다. 邪氣가 人體에 침입하면 正氣가 반드시 虛해지므로 人蔘과 附子, 肉桂 등을 이용하여 益氣助陽시키며, 川芎과 芍藥으로 氣血을 調和시키고 正氣를 회복시켜 邪氣를 祛하게 한다. 또한 風邪가 外表로 凝滯하고 裏氣가 不宣하면 열을 生하게 하므로 黃芩의 苦寒한 性을 취하여 表熱을 祛하는 佐藥으로 하였다. 이와 같이 本方은 辛溫發散하여 發汗시킴으로써 邪氣를 밖으로 배출시켜 營衛를 調和시키고, 氣血을 通하게 하며 表氣를 通하게 하여 裏氣 역시 調和롭게 하는 扶正祛邪의 효과가 있어 ‘行血即 風自滅’하는 원리를 갖는 처방으로 卒中風 초기와 一切風症에 사용된다고 하였다.^{7,10}

《靈樞·海論篇》¹¹에 “髓海有餘 則輕勁多力 自過其度 髓海不足 則腦轉耳鳴 脛痠眩暈 目無所見 懶怠安臥...”라고 하여 腦髓의 充足여부가 정신 및 신체활동의 성쇠와 관련되어 있음을 기술하고 있으며, 腦髓의 기능이 실조되거나 감퇴되면 失眠, 知能低下, 癡呆, 頭痛, 眩暈, 耳鳴 등의 임상증상이 나타난다고 하였고^{12,13}, 그 원인으로는 心脾兩虛, 肝腎虛弱, 稟受不足, 痰瘀 등이 제시되고 있다¹⁴.

일반적으로 세포가 외부 자극에 의해 심각한 손상을 입었을 경우에는 세포막의 파괴, 세포의 팽창, 용해를 동반하는 괴사를 일으키지만 파킨슨병, 허혈성 뇌졸중 등과 같은 뇌신경계 질환에 있어서는 생체 내의 다양한 생화학적 기전들이 작용하여 신경세포와 신경교세포의 괴사를 초래하게 되는 것

으로 알려져 있다¹⁵⁻¹⁹. 이러한 대사성 또는 허혈성 뇌질환에서 신경세포 손상에 기여하는 물질은 여러 가지가 있으나 그 중 대표적인 것은 아미노산계의 흥분성 신경전달물질인 MPTP이다^{20,21}.

허혈성 손상 등의 병리적 외부 자극에 의해 신경 조직에 산소 및 포도당의 공급이 줄어들면 ATP 관련 이온채널의 기능 손실에 의한 Ca^{2+} 과 같은 양이온의 세포 내 유입으로 신경세포 탈분극이 발생하며, 신경말단에서 MPTP 등을 포함하는 신경전달물질의 유리가 증가하고 신경교세포에 의한 MPTP 재흡수가 감소하여 결과적으로 흥분성 신경전달물질인 MPTP가 신경연접부위에 축적된다. MPTP의 과도한 축적은 이온성 수용체인 AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-iso-azolepropionic acid) 및 NMDA(N-methyl-D- aspartate) 수용체 등의 활성을 유도하며, 이로 인하여 신경세포의 고사가 초래된다^{22,23}. 또한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 산화적 손상이 신경독성 및 특정 유전자의 작용을 유도하여 세포고사를 일으키는 것으로 밝혀지고 있다²⁴⁻²⁶.

세포고사(apoptosis)는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 계획된 죽음(programmed cell death)을 말하는 것으로, 괴사(necrosis)와는 다른 독특한 형태와 생화학적인 특징을 동반하는 생리·병리과정이다²⁷⁻²⁹. 이러한 세포고사가 과소하게 발현되는 경우에는 암, 자가면역질환 등이 발생하고, 과다하게 발현되면 후천성 면역결핍증, 중추신경계의 퇴행성 질환이 발생하게 된다²⁷⁻³⁰. 최근 이러한 고사의 기전들이 점차 밝혀지고 있으며 중추신경계 세포고사에서 MPTP에 의한 흥분독성과 산화성 손상이 중요한 기전으로 연구되고 있다²⁴⁻²⁶.

근래 생약을 이용한 신경세포 보호효과에 대하여 보고된 연구들이 있다. 천연 폴리페놀 플라보노이드 및 인삼추출물을 처리한 신경세포에서의 보호효과에 대한 연구와 마우스의 striatal neuron에 oxidized low density lipoprotein(oxLDL)에 의한

세포독성을 epicatechin을 처리하여 억제효과를 보여준 연구가 있다³¹.

최근까지 이러한 여러 연구의 결과 항산화 물질 및 천연 폴리페놀 추출물이 파킨슨병 모델을 유발하는 MPTP에 의한 세포독성을 효율적으로 억제 또는 보호한다는 것이 보고되었다. 이에 본 연구에서는 아직 MPTP에 의한 보호효과가 보고되지 않았으나 허혈성 뇌손상에 주로 사용되는 小續命湯이 마찬가지로 MPTP에 의한 세포독성을 억제할 것이라 판단하여 실험을 진행하였다.

본 실험에서는 MPTP로 유도된 인간 신경모세포종인 SH-SY5Y 세포주에서 小續命湯 추출물에 의한 세포 보호효과 및 기전을 규명하고자 하였으며, 이를 유도하기 위해 N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)를 사용하였다. MPTP가 SH-SY5Y 세포에 미치는 독성을 확인하기 위하여 농도별(0.5~2.5 mM)로 MPTP를 SH-SY5Y 세포에 24시간 처리하여 MTT 방법으로 세포생존율을 조사하였다. 그 결과, MPTP에 의해 농도 의존적으로 유의하게 세포생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 2.5 mM에서는 41.9% 이하의 세포생존율을 보였다(Fig. 1A). 또한 MPTP가 처리된 SH-SY5Y 세포주에서 小續命湯 추출물에 의한 세포 보호효과를 조사하기 위하여 小續命湯을 농도별(50~500 μ g/ml)로 처리한 후 세포생존율을 조사한 결과, 小續命湯 200 μ g/ml 농도에서 92.8%에 가까운 세포생존율을 나타내었으며, 오히려 300 μ g/ml 이상의 농도에서는 세포생존율이 감소함을 볼 수 있었다(Fig. 2A). 이를 토대로 이후의 실험에서는 150 μ g/ml 농도의 小續命湯을 처리한 연구를 진행하였다.

세포주기는 세포의 생존과 분열에 있어서 중요한 개념이다. 체세포가 분열을 거듭함에 따라 세포 주기를 정지시킬 수 있는 염색체의 텔로미어가 특정 길이 이하로 짧아지면 분열능을 상실하고 G1 phase에 멈추게 된다(G1 arrest). 이러한 기전은 DNA가 손상되었을 때 p53에 의해 매개되는 세포주기 정지

와 비슷하다. 이 상태를 mortality phase 1(M1)이라고 하며, 이 시기의 세포는 불가역적인 세포 노화 상태에 빠지게 된다. 이러한 세포주기의 변화를 관찰하기 위해 핵을 염색하고 관찰한 결과, MPTP에 의해 M1 시기가 70.59%로 증가된 SH-SY5Y 세포주의 세포주기가 小續命湯에 의해 68.89%로 다소 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

정상적인 세포들은 호흡과정 동안 다양한 활성산소종(O₂⁻, H₂O₂, OH⁻ 등)을 내지만 이는 세포 자체가 갖고 있는 항산화시스템(GSH, SOD, catalase 등)에 의해 조절된다. 그러나 다양한 자극에 의해 과량의 활성산소종이 발현되었을 경우에는 활성산소종이 세포 자체에 해로운 신호전달의 시발점이 되어 결국 세포사멸로 이어지게 되고, 분자생물학적 변화와 세포 손상을 일으킨다. 과량의 활성산소종은 세포막의 인지질을 자극하여 지질 과산화(lipid peroxidation) 반응을 유도하여 세포막을 파괴하는 한편, DNA 손상을 유도한다. 이것을 oxidative stress라고 하는데 이에 대한 小續命湯의 보호효과를 확인하기 위해 활성산소종의 하나인 hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical 계열을 검출하는데 이용되는 DCF-DA 염색법을 통해 MPTP 및 小續命湯 처리에 의한 SH-SY5Y 세포를 분석하였다. 그 결과, 小續命湯을 처리함으로써 활성산소종 비율이 MPTP 군에서 측정된 72.65%에서 54.72%로 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한 세포 내 또 다른 활성산소종인 superoxide anion(O₂²⁻)에 특이적으로 반응하는 DHE를 이용한 관찰에서는 MPTP에 의해 증가된 superoxide anion이 小續命湯 전처리에 의해 감소되었음을 알 수 있었다(Fig. 5).

활성산소종을 확인하는 또 다른 방법으로 막전위 변화와 칼슘이온 관찰이 있다. MPTP는 미토콘드리아에 작용하여 다량의 활성산소종을 생성하는데 이 때 막전위변화에 특이적인 JC-1을 이용하여 그 변화를 분석 및 측정된 결과, 小續命湯 처리군에서 다소 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 또한 세포 내 oxidative stress가 발생하면 미토콘드리아

아 및 소포체로부터 칼슘이온이 방출되는데 이를 형광현미경을 이용하여 검측한 결과, MPTP에 의해 방출되었던 칼슘이온들이 小續命湯을 전처리한 경우에는 현저히 감소되었다(Fig. 7).

이상의 결과들을 보면, 小續命湯은 MPTP로 유도된 파킨슨모델인 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포주의 사멸을 억제하였으며, 활성산소종의 생성을 억제하여 산화적 손상에 대해 보호효과를 나타내었다. 이러한 小續命湯의 세포 보호효과는 뇌졸중 뿐만 아니라 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환을 치료하는 데 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

MPTP에 의해 파킨슨 모델로 유발된 신경모세포종에 대한 小續命湯의 보호효과를 규명하고자 세포주기 조사, 형광현미경적 조사, DCF-DA 염색 등의 방법으로 小續命湯이 세포생존율, 미토콘드리아의 막전위 변화, caspase 활성화도, GSK3의 활성화, ROS의 활성화에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 小續命湯은 MPTP에 의한 SH-SY5Y 세포생존율의 감소를 200 µg/ml까지 농도 의존적으로 유의하게 억제시켰다.
2. 小續命湯은 MPTP에 의한 G1 arrest의 진행을 억제시켰다.
3. 小續命湯은 MPTP에 의한 ROS의 생성을 억제시켰다.
4. 小續命湯은 MPTP에 의한 미토콘드리아의 막전위 변화를 감소시켰으며, 세포 내 소기관으로부터 칼슘 방출증가를 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 小續命湯은 MPTP로 유발된 SH-SY5Y 세포주의 세포사멸에 대하여 활성산소종의 생성을 억제하고, 세포 내 항산화제의 감소

를 억제함으로써 산화적 손상을 방어하는 효과를 나타내었으며, 세포고사와 관련된 인자들을 억제시켰다. 따라서 小續命湯은 파킨슨병 등 뇌신경세포 손상으로 인한 질환에 유효하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 원광대학교 교내 학술연구비 지원을 받아 수행하였음.

참고문헌

1. Ma J, Shaw Ve, Mitrofanis J. Does melatonin help save dopaminergic cells in MPTP-treated mice?. *Parkinsonism & Relat Disord* 2008;13:1-8.
2. Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2000;62:70.
3. Ferger B, Leng A, Mura A, Hengerer B, Feldon J. Genetic ablation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. *J Neurochem* 2004;89:822.
4. Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. MPTP neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 1987;7:357-68.
5. Cho Y, Bannai S. Uptake of MPTP and cysteine in C6 glioma cells and in cultured astrocytes. *J Neurochem* 1990;55:2091-7.
6. Weiss J, Hartley D, Koh J, Choi D. AMPA receptor activation potentiates zinc neurotoxicity. *Neuron* 1993;10:43-9.
7. 孫思邈. 備急千金要方. 서울: 대성출판사; 1984. p. 155.
8. 許浚. 新對譯 東醫寶鑑. 서울: 법인문화사; 2007.

p. 1023.

9. 李旻. 國譯 編註醫學入門. 서울: 남산당; 2001. Vol. 6 p. 355.
10. 최은정, 정승현, 신길조, 이원철. 千金方에 記載된 中風에 관한 考察. 대한한의학회지 1997;17(2):117-32.
11. 楊維傑. 內經靈樞譯解. 서울: 대성문화사; 1990. p. 104, 281-2.
12. 李京燮. 東醫心系內科學(上). 서울: 서원당; 1995. p. 36-7, 43-4.
13. 黃義完. 東醫精神科學. 서울: 현대의학서적사; 1987. p. 256-7, 262-4, 266, 269-71, 920.
14. 金利和. 癡呆治療의 最近 研究動向에 關한 考察. 대한침구학회지 1997;14(2):115-26.
15. 서순규. 성인병 · 노인의학. 서울: 고려의학; 1992. p. 10-5, 28-30, 225-9.
16. 지제근. 치매의 병리. 대한신경과학회지 1985; 3(1):5-9.
17. 최진호. 노화의 메커니즘과 연구방향. 생화학뉴스. 한국생화학회 1985;5(3):39-53.
18. 고재영. 신경계 질환에서의 아포토시스. 유전 1998;2:147-65.
19. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Progress in Brain Res* 1985;63:39-58.
20. 서유현. 신경전달물질. 서울: 민음사; 1992. p. 55-63.
21. Kurt J. Isselbacher. HARRISSON' 내과학. 서울: 정담; 1997. p. 2384-5.
22. Simon R, Swan J, Griffiths T, Meldrum B. Blockade of N-methyl- D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 1984;226:850-2.
23. Duga LL, Sensi SL, Canzoniero LMT, Choi DW. Mitochondria production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure

- to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 1995;15:6377-88.
24. Coyle J and Puttfarecken P. Oxidative stress, MPTP and neurodegenerative disorders. *Science* 1993;262:689-95.
25. Gotz M, Freyberger A and Riederer P Oxidative stress: a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 1990;29:241-9.
26. Buttke T and Sandstrom P. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol* 1994;15:7-10.
27. Behl C, Dabis JB, Killer FG, Schubert D. Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res* 1994;645:253-64.
28. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol* 1993;14:126-30.
29. Savitz S, Rosenbaum D. Apoptosis in neurological disease. *J Neurosurgery* 1998;42:555-74.
30. 김진수. Alzheimer's disease의 신경화학적 변화에 관한 고찰. *대한신경과학회지* 1985;3(1):10-5.
31. Stéphane Bastianetto, Jonathan Brouillette, Rémi Quirion. Neuroprotective Effects of Natural Products: Interaction with Intracellular Kinases, Amyloid Peptides and a Possible Role for Transthyretin. *Neurochemical Research* 2007;32:1720-5.