

# 熱多寒少湯 加減方の 自家食食 유도 활성과 관련 단백질 탐색

김희주 · 배나영\* · 장문희† · 양현옥 · 안택원†

한국과학기술연구원 강릉분원 천연의약센터, \*부산대학교 한의전원 사상체질과  
†대전대학교 한의과대학 사상체질과

## Abstract

### Autophagy inducing Effect of modified Yeoldahanso-tang and its related Proteins in SH-SY5Y cells

Hee-Ju Kim, Na-Young Bae\*, Moon-Hee Jang†, Hyun-Ok Yang, Taek-Won Ahn†

Natural Medicine Center, Korea Institute of Science and Technology

\*Dept. of Sasang Constitution Medicine, Pusan National University School of Korean Medicine

†Dept. of Sasang Constitution Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon Univ

#### Objectives

Modified Yeolda-Hanso tang (MYH) is a traditional herbal formula in Korea for various diseases. MYH is containing the 10 herbs : *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi, *Angelica tenuissima* Nakai, *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Platycodon grandiflorum* (Jacq), *Angelicae Dahurica*, *Cimicifuga heracleifolia* Kom, *Raphanus sativa* L., *Polygala tenuifolia* (Willd), *Acorus gramineus* Soland and *Dimocarpus longan* Lour. The 10 herbs is constituted as a ratio of the 6:4:2:1:2:2:2:4:6:6. We investigated neuroprotective effects of MYH on human neuroblastoma SH-SY5Y cells and evaluated the ability of MYH to prevent and treat for neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease via basal autophagy enhancement.

#### Methods

Pharmacological induction of Autophagy by MYH in SH-SY5Y cells:

Induction of autophagy by MYH in human neuroblastoma SH-SY5Y cells was carried out by immunoblot analysis with several autophagy markers. SH-SY5Y cells were treated with MYH at the concentration of 400 and 800 µg/ml for 24 hr. Specifically, the autophagosome proteins LC3 II and Atg5 levels were increased and autophagy pathway related proteins such as beclin-1, PI3 Kinase class III protein, ULK1, mTOR and AMPK were activated.

#### Conclusions

MYH can enhance the induction of autophagy through key regulator AMPK, mTOR, and Beclin-1 and it should be considered as a possible candidate of neuroprotective agents for such as Parkinson's disease.

**Key Words:** Modified Yeolda-Hanso tang (MYH), Neuroprotection, Parkinson's disease, Autophagy

Received July 01, 2013 Revised July 03, 2013 Accepted July 29, 2013

Corresponding Author 1, 2 Hyun Ok Yang, Taek-Won Ahn

Author 1 Natural Medicine Center, Korea Institute of Science and Technology, Gangneung, GangWondo, South Korea

Tel : +82-33-650-3501 Fax : +82-33-650-3529 E-mail : hoyang@kist.re.kr

Author 2 Dept. of Sasang Constitution Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon Univ, Dugungdong 621, Cheonan, ChungNam, South Korea

Tel : +82-41-521-7535 Fax : +82-41-521-7007 E-mail : twahn@dju.kr

© The Society of Sasang Constitutional Medicine. All rights reserved. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons attribution Non-commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>)

## I. 緒論

파킨슨병은 치매와 함께 대표적인 퇴행성뇌신경질환으로 알려져 있으며, 중뇌 흑색 치밀부 (substantia nigra par compacta ; SNpc)에 분포하는 도파민 신경세포의 진행성 비가역적 사멸이 나타나는 질병이다.<sup>1</sup> 파킨슨병은 여러 가지 요인에 의해서 발병하게 되는데 병리학 적으로 도파민 뉴런의 사멸, 유전자 기형 (alpha-synuclein)의 축적으로 인한 lewy body 생성의 결과로 나타나고, 그 요소들의 원인은 환경적 독소, 미토콘드리아의 기능이상, 유전적 기형, 세포 사멸 등이 그 원인으로 지목되고 있다.<sup>2,4</sup> 최근 단백질을 분해하는 기전 중의 하나로 알려진 自家食食 (autophagy) 이상조절이 파킨슨병 환자의 뇌와 동물모델에서 관찰됨으로써, 파킨슨병에 있어서 自家食食의 역할이 중요하다는 것이 밝혀졌다.<sup>5</sup> 실로, 自家食食은 병리생리학에서 그 중요성이 점점 증가하고 있으며, 알츠하이머병, 헌팅톤병 같은 다양한 뇌질환에 관련되고 있음이 보고되고 있고, 특히 최근 급증하는 노인의 인구를 보았을 때, 퇴행성뇌질환의 연구는 필히 진행될 필요성이 있다고 여긴다.<sup>5</sup> 自家食食은 에너지 결핍 시 ATP합성을 위해 오래된 단백질을 분해 또는 제거하는 일종의 세포 내 house-keeping 작용을 한다. 이러한 불필요 산물을 이중막으로 둘러싸 세포 내부에서 lysosome과 융합하여 lysosome에서 분비되는 단백질 분해효소에 의해 분해시키는 것으로 보고 되고 있다. 自家食食은 세포의 죽음과 생존에서 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 제 2형 프로그램화된 세포 사멸 (programmed cell death)이라고도 알려져 있다. 그러나, 최근에는 세포사멸이라는 의미를 넘어서 세포가 끊임없이 죽고 재생되는 과정을 조절하는 세포 항상성에 관여하는 중요 기작으로 주목받고 있다.<sup>6-8</sup>

熱多寒少湯은 『東醫壽世保元』<sup>9</sup>에 기재된 太陰人 肝受熱裏熱病을 치료하도록 만들어진 처방이다. 임상에서는 太陰人의 대사증후군을 비롯한 성인병에 유효한 처방으로 활용되고 있으며, 특히 熱多寒少湯 및 그 加味方 들은 태음인의 증풍초기단계

에서 뇌세포의 손상을 보호하는 등 활용빈도가 높은 처방으로 알려져 있다.<sup>10</sup>

熱多寒少湯을 활용한 연구로는 배 등<sup>2</sup>의 熱多寒少湯 加味方을 활용하여 베타-아밀로이드가 유발한 독성에 대한 뇌신경 세포 보호 효과와 自家食食 활성화를 통한 뇌세포 보호 기작을 확인한 연구가 있었으며, 배 등<sup>3</sup>의 熱多寒少湯 加味方을 활용하여 MPTP가 유발한 독성으로부터 세포 증식 및 보호 효과, 自家食食 유도 효과, 이상단백질의 응집 분해를 도와주는 효과 등을 확인한 연구 등이 있다. 하지만 아직 自家食食이 어떠한 기전으로 유도되는지에 대한 연구는 미미한 실정이다.

이에 본 연구에서는 배 등<sup>3</sup>의 연구를 통하여 알려진 熱多寒少湯 加味方(modified Yeoldahanso-tang ; MYH)을 이용하여 MYH가 뇌세포를 보호하고 세포 내의 항상성을 조절 하는 自家食食을 유도할 수 있는지 구체적으로 어떤 효과를 보이는지 확인하여 파킨슨병을 비롯한 퇴행성뇌신경질환의 치료 가능성을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다.

## II. 研究材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대전대학교 천안한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 熱多寒少湯 加減方, MYH는 『東醫壽世保元』에 근거하였으며, 그 구성비는 이전의 연구에서와 같은 방법으로 조제되었다.<sup>2,3</sup> (Table 1)

#### 2) 검액조제

약재를 식물전체, 잎 또는 열매를 깨끗이 세척하고 잘게 절단한 후 증량비를 대로 혼합하고, 증량의 4배의 물을 가하여 옹기 약탕기에서 95℃에서 4시간동안 1차 추출한 후, 여과 하고 남은 고형분에 다시 물을

Table 1. Plant Constituents of MYH<sup>3</sup>

N0.	Scientific name	Contents(g)
1	<i>Puerarialobata</i> (Willd.) <i>Obwi</i>	12
2	<i>Angelica tenuissima</i> <i>Nakai</i>	8
3	<i>Scutellaria baicalensis</i> <i>Georgi</i>	4
4	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq)	2
5	<i>Angelicae Daburica</i>	4
6	<i>Cimicifuga beracleifolia</i> <i>Kom</i>	4
7	<i>Rapbanus sativa</i> <i>L.</i>	4
8	<i>Polygala tenuifolia</i> (Willd.)	8
9	<i>Acorus gramineus</i> <i>Soland.</i>	12
10	<i>Dimocarpus longan</i> <i>Lour</i>	12
total		70

절반량 추가하여 상기와 동일한 조건에 따라 2차 추출하였다. 1, 2차 추출액을 여과하여 합한 후 고형분을 제거한 후, 3200 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상등액을 수집하였다. 다시 상등액을 2.0  $\mu$ m 마이크로 필터를 사용하여 필터링한 액체만을 수집하여 사용하였다

### 3) 시약 및 기기

#### (1) 시약

세포주를 배양한 배지인 Dulbecco's modified eagle medium nutrient mixture F-12 (Ham) 1x (DMEM/F12) 과 우태아혈청(fetal bovine serum : FBS), penicillin/streptomycin, trypsin 은 Gibco 에서 구입하였다. p-AKT, p-Erk1/2, TSC1, p-AMPK, mTOR, p-ULK, PI3 Kinase class III, Beclin-1, ATG5, LC3B, GapDH에 대한 항체는 Cell Signal사 (Beverly, MA)에서 구입하였다. 또한 protease inhibitor cocktail는 Roche사 (Roche, Penzberg, Germany), cell lysis buffer는 Cell Signal사 (Cell signaling technology®)에서 각각 구입하였다.

#### (2) 기기

PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad, California, USA), PowerPac HC<sup>TM</sup> (Bio-Rad, California, USA), Trans-Blot@Turbo<sup>TM</sup> Transfer system (Bio-Rad, California, USA), LAS-4000 Luminescent Image Analyzer (Fujifilm, Tokyo, Japan)을 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) 세포 배양 및 처리

Human neuroblastoma cells인 SH-SY5Y 세포는 ATCC (CRL-2266<sup>TM</sup>, Manassas, VA 20108 USA)로부터 구입하였다. 세포배양은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 10% heat-inactivated fetal bovine serum (이하 FBS라 함, Gibco), 1% penicillin/streptomycin (이하 P/S라 함, Gibco)이 포함된 Dulbecco's modified eagle medium nutrient mixture F-12 (Ham) 1x ; DMEM/F12 (Gibco) 배양액으로 배양하였다. 배양액은 3일 간격으로 갈아 주었으며, 세포가 배양접시 면적의 80% 이상 자라게 되면 계대해 주었다. 세포에 MYH를 처리한 후, 自家食에 관련된 분자생물학적 변화 실험을 수행하였다.

### 2) 自家食 유도 경로 확인

#### (1) 단백질 정량

SH-SY5Y 세포를 6 well plate에 1.5 x 10<sup>6</sup>개의 밀도로 24시간 동안 평판 배양하여, MYH를 농도의존적으로 24시간 처리하였다. 24시간 후, Dulbecco's phosphate buffered saline (이하 PBS, Welgene, Korea) 1 ml로 세포를 세척하고 다시 1 ml의 PBS를 넣고 스크래퍼를 이용하여 세포를 모은 후 13.2 x 1000 rpm에서 5분동안 원심분리 한 뒤 세포 pellets를 확보하였다. Lysis solution (Protease inhibitor cocktail x 20, cell lysis buffer 1 x) 을 50  $\mu$ l씩 가한 후 10분간 얼음에서 반응시켰다.

이를 완벽히 lysis시키기 위해 다시 4°C에서 20분간 반응시킨 후, 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 취해 단백질 정량을 위한 시료로 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford method (Bio-rad laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하였다.

(2) 전기영동

모든 sample은 30 µg/lane의 농도로 만들고, 10~15% SDSpolyacrylamide gel (Bio-rad)에서 전기영동을 한 후, semi dry transfer방법으로 polyvinylidene fluoride (이하 PVDF라 함) membrane에 transfer하였다. TNT buffer (Trizma base, NaCl, Tween 20)로 1회당 5분간 3회 세척하였다. Transfer된 PVDF membrane을 5% nonfat dry milk 용액으로 희석한 primary 항체 (1:1000, LC3,

mTOR, Beclin-1 그 외 다른 항체)에 넣어 4°C에서 하룻 밤 동안 반응시켰다. 다음날 다시 5분간 3회 세척한 뒤 secondary 항체 (1 : 2000, anti rabbit IgG)를 이용해 1시간 동안 반응시키고, ECL Advance Western blotting detection reagents (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)로 형광발색 시킨 후 LAS 4000 film (Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용해 현상하였다. 여기서 사용한 GapDH 항체는 loading control로 사용되었다.

3. 통계분석

모든 실험 결과는 평균±표준편차 (mean±S.D.)로 나타내었고, student's t-test를 이용하여 분석하였다. p

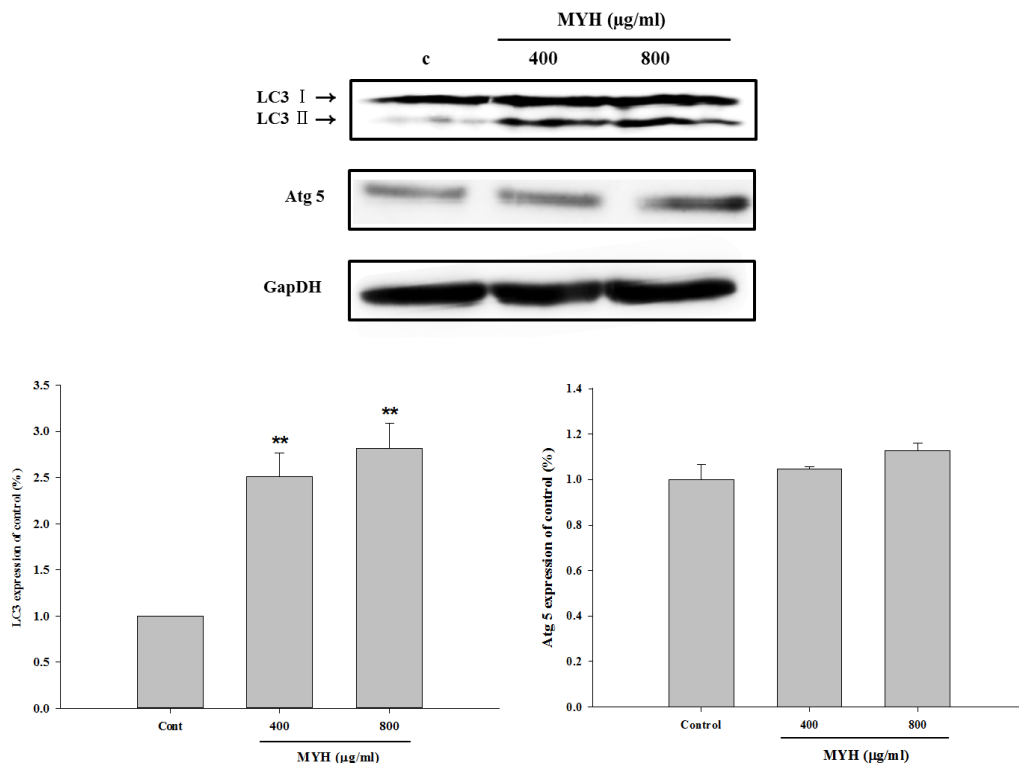


Figure 1. MYH induced autophagy - lysosomal pathway in SH-SY5Y cells.

SH-SY5Y cells were treated with MYH at the concentration of 400 and 800 µg/ml for 24 hr. SH-SY5Y cells were determined by measuring the autophagosome marker LC3 protein and autophagy related gene 5 expression levels using an immunoblotting assay. The ratio of LC3II/I and Atg 5 was evaluated by densitometric analysis and data was expressed as folds of the control. GapDH was used as an equal loading control (n=3). \*\*p<0.01

values가 5% 미만일 때를 “유의적인 차이가 있음”으로 판정하였다.

### III. 研究結果

#### 1. MYH의 自家食食 유도활성

SH-SY5Y 세포에서 MYH를 400, 800 µg/ml 두 군의 농도로 처리한 후 自家食食소체 유도작용이 있는지 알아보기 위해 western blot 분석법으로 대표적인 自家食食소체 막 단백질로 알려진 LC3 단백질을 정량 하였다. MYH를 처리하였을 때, LC3 I 단백질이 LC3 II로 전이된 비율이 농도 의존적으로 증가<sup>11,12</sup> 한 것이 확인 됨으로써 MYH는 自家食食소체 유도 활성이 있는 것을 알 수 있었다. 또한 自家食食소체 막을 형성하

기 위해 필요한 단백질이라 알려진 autophagy related gene-5 (ATG5)를 정량을 해보았을 때 유의적으로 증가 하는 것으로 보아 MYH로 인한 自家食食소체가 증가한 다는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 1).

#### 2. MYH의 mTOR 억제를 통한 自家食食 유도 활성

MYH가 自家食食소체를 형성할 수 있다는 사실이 확인 되면서 自家食食을 유도하는 활성 경로를 알아보기 위하여 mTOR 및 mTOR 상위, 하위 경로를 탐색을 해보았다. 지금까지 연구된 自家食食 작용에 관련되는 단백질들의 신호 경로에 의하면 mTOR 하위 단계에 속하는 Beclin-1은 PI3 Kinase class III의 활성화 및 自家食食을 유도하는 필수적인 물질로 알려져

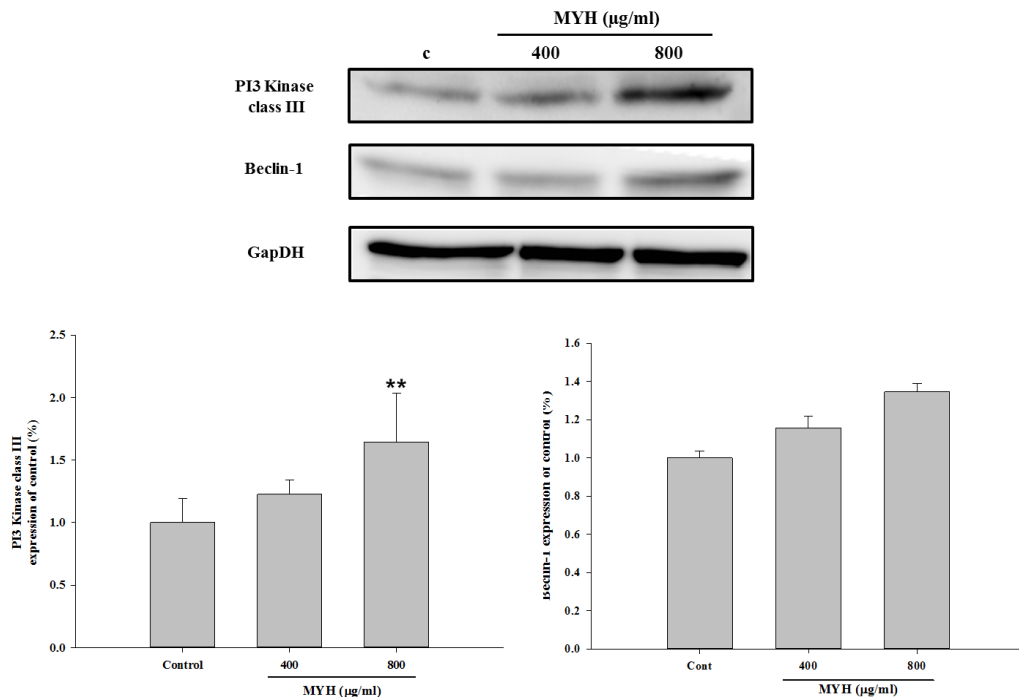


Figure 2. Induction of autophagy – lysosomal mTOR downstream pathway by MYH in SH-SY5Y cells.

The autophagy inducing effect of MYH by dose dependent manner in SH-SY5Y cells. The PI3 Kinase class III and Beclin-1 protein levels were increased by MYH using an immunoblotting assay with antibody against PI3 Kinase class III and Beclin-1. The PI3Kinase class III and Beclin-1 expression were evaluated by densitometric analysis and data was expressed as folds of the control. GapDH was used as an equal loading control (n=3). \*\* $p < 0.01$

있다.<sup>14-16</sup> 또한 에너지 대사에 관여하는 mTOR 상위 단계의 단백질로 알려진 AMPK의 활성화가 mTOR를 억제하고 NGF (Neuronal growth factor)같은 신경 증진 인자에 관련된 ULK1 단백질을 활성화 시키기 때문에 自家食食 기전을 유도할 수 있을 것이라는 사실을 알 수 있었다.<sup>16-18</sup> 그 결과 SH-SY5Y 세포에 MYH를 400 및 800 µg/ml로 처리하였을 때, MYH에 의해 beclin-1과 PI3 Kinase class III 가 증가하였고 (Figure 2), AMPK가 활성화 되어 mTOR의 억제현상이 나타났으며, ULK1 단백질이 농도 의존적으로 증가하는 사실을 확인하였다 (Figure 3). 결과적으로 MYH는 AMPK를 활성화 시킴으로써 mTOR를 억제하고, 이는 곧 beclin-1을 활성화 시키는 경로를 찾을 수 있음이 확인되어 MYH가 自家食食을 유도 할 수 있다는 사실을 밝혀낼 수 있었다.

### 3. MYH의 AMPK 활성화를 통한 自家食食유도 활성

mTOR를 기준으로 MYH가 상, 하위 경로에서 自

家食食 반응을 유도한다는 사실을 확인함에 따라 mTOR를 조절하는 여러 경로를 탐색하였다. mTOR는 대부분의 종양이나 질병에서 PI3K 및 AKT, Erk1/2-mTOR 신호전달 경로가 다양한 기질들을 인산화하여 세포성장, 증식과 생존을 촉진하는 핵심 작용을 한다는 것이 밝혀졌다.<sup>19,20,23</sup> 이러한 결과들을 바탕으로 PI3K-AKT, Erk1/2 그리고 mTOR 억제를 표적으로 치료제를 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>20,21,23</sup> 그리하여 본 저자는 앞선 과정과 마찬가지로 MYH 400 및 800 µg/ml을 SH-SY5Y 세포에 처리한 후 24시간 배양시키고 난 뒤 mTOR 상위 조절신호인 AKT와 Erk1/2를 확인해 보았다. MYH는 Figure. 3에서 보여준 바와 같이 mTOR를 억제하는 것이 관찰되었지만, AKT와 Erk1/2 단백질의 인산화를 증가시키미 관찰되었다 (Figure 4). 또한, 종양 억제 인자로 알려진 AKT 하위 단계 단백질인 TSC1 발현이 증가 되어야만 mTOR 발현의 억제가 이루어 진다고 다른 선행연구 결과에서 알려진바 있어<sup>25</sup> MYH에 의한 TSC1 단백질을 확인해 보았지만 발현이 억제된 것을 알 수 있었다. 이로써 MYH는 AKT의 인산화를 촉진시키고 또한

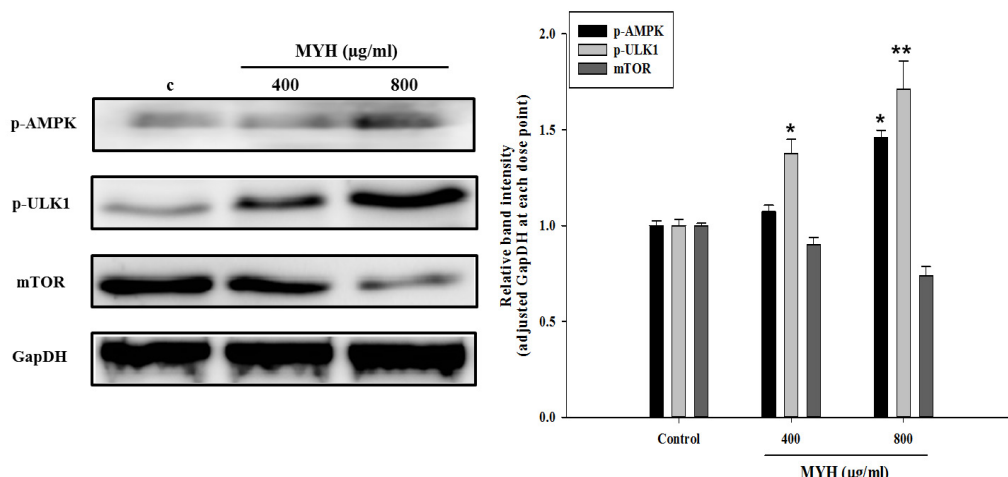


Figure 3. MYH induced autophagy - lysosomal mTOR upstream pathway in SH-SY5Y cells.

SH-SY5Y cells were treated with MYH at the concentration of 400 and 800 µg/ml for 24 hr. SH-SY5Y cells were determined by measuring the p-AMPK, p-ULK1 and mTOR expression levels using an immunoblotting assay. That protein expression was evaluated by densitometric analysis and data was expressed as folds of the control. GapDH was used as an equal loading control (n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01

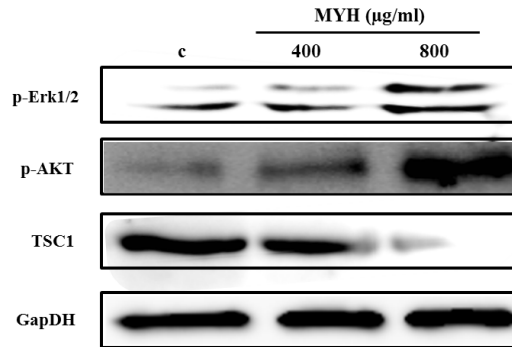


Figure 4. MYH did not induced AKT-Erk1/2-mTOR pathway

SH-SY5Y cells were treated with MYH at the concentration of 400 and 800  $\mu\text{g/ml}$  for 24 hr. MYH inhibited mTOR expression. However, MYH did not inhibit the mTOR upstream pathway signals, p-Erk1/2 and p-AKT, and did not increase TSC1. GapDH was used as an equal loading control (n=3).

TSC1 단백질을 억제하여 mTOR의 발현 경로와 맞지 않는 결과를 나타냄으로써 MYH는 AMPK, mTOR 경로를 통하여 자가포식 유도활성을 나타냄을 입증할 수 있었다 (Figure 4).

#### IV. 考察 및 結論

파킨슨병은 뇌 일부분 중 흑색질 (substantia nigra) 이라 불리는 부분의 신경세포에서 사멸이 일어날 때 발생한다. 신경세포에 사멸이 일어나는 원인은 다양한데 여러 유전요소의 돌연변이, 환경적 독소, 노화로 인해 미토콘드리아의 기능에 이상이 생기게 되면 자유라디칼이 증가해 ATP가 감소하게 된다.<sup>24</sup> 결정적으로 alpha-synuclein 단백질에 변이가 생기게 된다. 이 단백질에 돌연변이가 생겨 축적이 되면 lewy body라는 소체가 생기게 되는데 이 경우 UPS (Ubiquitin proteasome system)와 ALP (Autophagy lysosome pathway)라는 단백질 분해기관에 이상이 생기게 되며 단백질들의 이상 접합이 일어나 분해가 안되게 되어 결국 도파민 신경이 사멸하게 되는 일이 발생한다.<sup>4,11,12</sup> 세포는 이상 단백질들을 제거하는 두 가지 기전에 의하여 세포 내의 항상성을 유지하는데 UPS와 ALP가 있다. UPS는

우리 몸 모든 부분에 존재하며 수명이 다한 단백질에 꼬리표처럼 달라붙어 proteasome으로 이동한 뒤 ubiquitin이 붙은 단백질을 분해해 제거하게 된다.<sup>4</sup> 自家飮食은 이상 단백질 또는 불순물 들을 원형의 이중막으로 감싼 뒤 세포 내부에서 lysosome과 융합하여 단백질 분해 효소에 의해 분해시키는 기작이다. 自家飮食 현상은 제 2형 프로그램화 된 세포 사멸과정으로도 불리고 있으나 세포가 자기 자신에게 에너지와 대사산물을 제공하고 재생과정을 조정하는 점에서 세포 생존에 기여할 수 있는 중요 시스템으로 부각되고 있다.<sup>6,13</sup> 최근 自家飮食 은 퇴행성 뇌질환, 암, 종양 등 각종 질환들과 관련이 있다는 사실이 알려짐에 따라 自家飮食 현상의 발현은 좋은 타겟으로 주목되고 있기에 본 저자는 MYH가 自家飮食 기작에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 하였다. 또한 『東醫四象新編』의 내용에 근거하여 여러 태음인 약재의 신경 보호 효과를 관찰했다는 이전연구의 결과를 바탕으로 自家飮食 유도에 중점을 두었다.<sup>2,3</sup>

본 연구에서는 먼저 MYH를 SH-SY5Y 세포에 처리하였을 경우 自家飮食 현상이 증가 되는지에 대한 연구를 수행하였다. 세포에 MYH를 400 및 800  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 후 대표적인 自家飮食 현상을 확인 할 수 있는 표지인 LC3 단백질을 이용해 western blot analy-

sis를 수행하였을 때 발현이 증가 된 것을 확인할 수 있었다. 여기서 LC3는 LC3I인 ATG (autophagy related gene)8이 PE (phosphatidylethanolamine)와 결합하여 ATG8-PE인 LC3II를 형성하게 되며 自家食食 소체를 형성하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>4,7,12</sup> 自家食食 현상의 조절은 몇 가지 신호전달 체계를 통해 조절된다.<sup>14,15,24</sup> Lipophilic과 macrolide 항생제로 알려진 rapamycin은 대표적인 自家食食 유도 물질이다. 이 중 가장 중요한 신호전달체계 경로로 뽑히는 것은 mTOR (mammalian target of rapamycin)인데, 이 대표적인 自家食食 유도물질인 rapamycin이 mTOR의 활성을 억제함으로써 自家食食 은 활성화 된다.<sup>20-22</sup> 선행연구에 따르면 mTOR는 phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)와 AKT, MAPK와 Erk1/2로 이루어진 kinase을 통해 조절이 되기도 하고, 세포내 AMP 농도의 변화를 유발하는 AMP-activated protein kinase (AMPK)/ULK1 경로를 통해서도 mTOR 활성을 조절할 수 있다고 연구 되어왔다.<sup>22,25,26</sup> 최근 연구에서는 AMPK 경로가 自家食食 유도에 필수적 요소임을 제시하고 있으며,<sup>27-29</sup> 많은 연구에서 mTOR 조절을 통한 autophagy의 활성화는 다양한 신경질환에서 뇌신경 보호효과를 한다고 알려져 있다.<sup>30,31</sup> 하여 본 연구에서 MYH가 自家食食 소체의 형성을 촉진한다는 사실이 관찰됨에 따라 自家食食 유도기전을 알아보기 위해 mTOR 하, 상위 경로의 활성을 측정하였다. AMPK는 mTOR 활성을 억제하며, 自家食食 현상 조절에서 가장 중요한 경로인 mTOR 역시 MYH로 인해 억제가 됨으로써 自家食食 현상이 활성화 된다는 사실을

어진 kinase을 통해 조절이 되기도 하고, 세포내 AMP 농도의 변화를 유발하는 AMP-activated protein kinase (AMPK)/ULK1 경로를 통해서도 mTOR 활성을 조절할 수 있다고 연구 되어왔다.<sup>22,25,26</sup> 최근 연구에서는 AMPK 경로가 自家食食 유도에 필수적 요소임을 제시하고 있으며,<sup>27-29</sup> 많은 연구에서 mTOR 조절을 통한 autophagy의 활성화는 다양한 신경질환에서 뇌신경 보호효과를 한다고 알려져 있다.<sup>30,31</sup> 하여 본 연구에서 MYH가 自家食食 소체의 형성을 촉진한다는 사실이 관찰됨에 따라 自家食食 유도기전을 알아보기 위해 mTOR 하, 상위 경로의 활성을 측정하였다. AMPK는 mTOR 활성을 억제하며, 自家食食 현상 조절에서 가장 중요한 경로인 mTOR 역시 MYH로 인해 억제가 됨으로써 自家食食 현상이 활성화 된다는 사실을

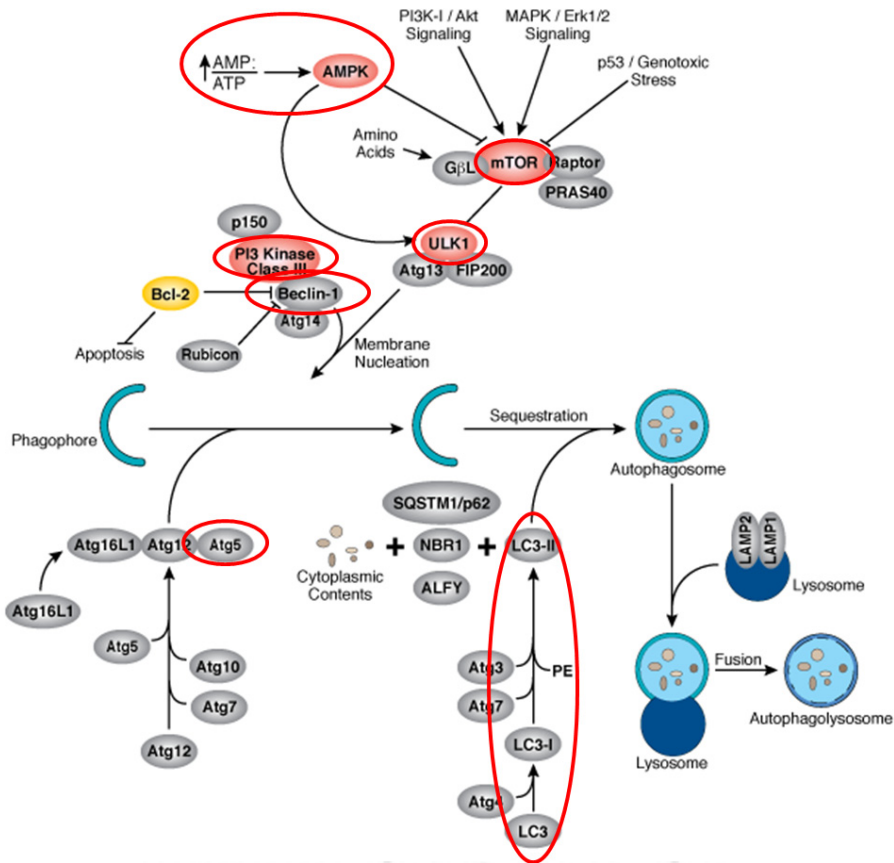


Figure 5. MYH can induced autophagy in SH-SY5Y cells<sup>31</sup>

알 수 있었고, mTOR 하위 경로를 살펴보았을 때 ATG6의 포유류 동종체로서 인산화 활성형으로 anti-apoptosis 단백질들의 복합체에서 활성화되어 class III PI3K 활성화 및 自家食食 소체 현상을 유도하는 필수적인 단백질로 알려져 있는 Beclin-1 또한 발현이 증가한 것을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합해 보면, 熱多寒少湯 구성 약재 중 뇌신경 세포독성이 있을 것으로 추정되는 약재를 감량하고 뇌신경세포보호 효과가 좋은 약재를 가미하여 만든 MYH는 세포의 재생 과정을 일으키는 단백질 분해 기작인 自家食食 작용을 활성화하는 효과가 있음을 확인하였고, 주요 조절 인자인 AMPK, mTOR, Beclin-1을 통해 自家食食 작용을 증가 시킴을 알 수 있었다 (Figure 5)<sup>31</sup>. 이를 바탕으로 MYH는 파킨슨병을 비롯한 퇴행성 뇌신경질환의 치료와 예방에 유의한 효과가 있을 것으로 예상할 수 있고 앞으로 질환 치료 효과에 대한 좀더 다각도의 연구와 *in vitro* 실험 결과를 바탕으로 하는 *in vivo* 실험 및 임상 시험으로의 연계가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## V. 感謝의 말

본 논문은 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 과제(과제번호, 2010-0024561)와 백두대간 그린마인 비즈니스 구축사업 (과제번호, R0000474)의 연구비 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사 드립니다.

## VI. 參考文獻

- Pan T, Kondo S, Zhu W, Xie W, Jankovic J, Le W. Neuroprotection of rapamycin in lactacystin-induced neurodegeneration via autophagy enhancement. *Neurobiology of Disease*. 2008;32:16 - 25.
- Bae NY, Yang HO, Ahn TW. Protection effect of New-Yeolda-Hanso tang against  $\beta$ -Amyloid Induced Cytotoxicity in NGF-differentiated PC12 Cells. *J Sasang Constitut Med*. 2009;21:138-153. (Korean)
- Bae NY, Ahn TK, Chung SK, Oh MS, Ko HS, Oh HG et al. The neuroprotective effect of modified Yeoldahanso-tang via autophagy enhancement in models of Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;134:313-322.
- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39:889-909.
- Pan T, Kondo S, Le W and Jankovic J. The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain*. 2008;131:1969-1978.
- Lee J. A. Neuronal Autophagy: A Housekeeper or a Fighter in Neuronal Cell Survival?. 2012;21:1-8.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006;441:15.
- Pan T, Rawal P, Wu Y, Xie W, Jankovic J, Le W. Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience*. 2009;164:541 - 551.
- National federation of department of sasang constitutional medicine, colleges of oriental medicine. *Sasang constitutional medicine*. 2nd Ed. Seoul:Jipmoondang. 2004:419-421.
- Song IB. The Clinical Study on the Effect of Sasang Constitutional Medical Therapy for Stroke. *J Sasang Constitut Med*. 1996;8(2):117-130. (Korean)
- Eisenberg-Lerner A, Bialik s, Simon H-U, Kimchi A. Life and death partners : apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death and Differentiation*. 2009;16:966-975.
- Mauthe M, Jacob A, Freiburger S, Hentschel K, Stierhof Y. D, Codogno P et al. Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in

- the absence of induced phagophore formation. *Autophagy*. 2011;1448 - 1461.
13. Underwood B. R, Imarisio S, Fleming A, Rose C, Krishna G, Heard P et al. Antioxidants can inhibit basal autophagy and enhance neurodegeneration in models of polyglutamine disease. *Human Molecular Genetics*. 2010;17:3413 - 3429.
  14. Kim HS, Choi JS, Ryu JH, Park SG, Cho SY, Park BC et al. Activation of autophagy during glutamate-induced HT22 cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;388:339 - 344.
  15. Shin HY, Chu SH, Lee HK, Lee JW. mTOR Inhibitor as a Potential Drug of Age-related Disease. *Korean J Clin Geri*. 2011;12:149-159.
  16. Liang J, Shao S. H, ZX X. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2007;9:218-24.
  17. Williams T, Forsberg L. J, Viollet B., Brenman J. E. Basal autophagy induction without AMP-activated protein kinase under low glucose conditions. *Autophagy*. 2009;5:1155-1165.
  18. Wu Y, Li X, Zhu J. X, Xie W, Le W, Fan Z et al. Resveratrol-Activated AMPK/SIRT1/Autophagy in Cellular Models of Parkinson's Disease. *Neurosignals*. 2011;19:163 - 174.
  19. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004;18:1926-45.
  20. Slomovitz B. M, Coleman R. L. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;21:5856-64.
  21. Jaelyn L. P, Gideon M. B, Wendy B. B, Phillip A. D. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. *Drug Resistance Updates*. 2008;32 - 50.
  22. Sebastian A, Antje S. L, Sebastian W, Björn S. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *MCB*. 2011;06159-11.
  23. Qin L, Wang Z, Tao L, Wang Y. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. *Autophagy*. 2010;(2):239-47.
  24. Pan T, Rawal P, Wu Y, Xie W, Jankovic J, Le W. Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience*. 2009;164: 541 - 551.
  25. Wang R. C, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science*. 2012;338(6109):956-9.
  26. Ralph A, Nixon, Yang D. S. Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect. *Neurobiology of Disease*. 2011;43:38 - 45.
  27. Alirezaei M, Kembal C. C, Flynn C. T, Wood M. R, Whitton J. L., Kiosses W. B. Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy*. 1998;6:702-710.
  28. Dadakhujaev S, Noh HS, Jung EJ, Cha JY, Baek SM, Ha JH et al. Autophagy protects the rotenone-induced cell death in alpha-synuclein overexpressing SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*. 2010;472:47 - 52.
  29. Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Curr Pharm Des*. 2007;13:1925-8.
  30. Ravikumar B, Berger Z, Vacher C, O'Kane C. J, Rubinsztein D. C. Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Human Molecular Genetics*. 2008;7:1209 - 1216.
  31. Cell signaling Technology (<http://www.cellsignal.com/pathways/autophagy-signaling.jsp>)