

排風湯 煎湯液이 XO/HX에 의해 損傷된 培養
脊髓感覺神經細胞에 미치는 效果

Effects of *Baepungtang* water extract on
Cultured Spinal Sensory neurons Damaged
by Xanthine Oxidase/Hypoxanthine

유진덕, 윤용갑
원광대학교 대학원 한의학과

- I. 서론
- II. 실험재료 및 방법
- III. 실험성적
- IV. 고찰
- V. 결론

ABSTRACT

Effects of *Baepungtang* water extract on Cultured Spinal Sensory neurons Damaged by Xanthine Oxidase/Hypoxanthine

To evaluate the effect of *Baepungtang*(*BPT*) water extract on cultured mouse spinal sensory neuron which was inhibited by xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX)-induced oxygen radicals, MTT assay, NR assay, Neurofilament enzymeimmuno assay and LDH activity/assay were carried out after the cultured mouse spinal sensory neuron were preincubated with various concentrations of *BPT* water extract for 3 hours prior to exposure of XO/HX.

The results obtained were as follows:

1. XO/HX, a oxygen radical, decreased the survival rate of the cultured mouse spinal sensory neuron cells on NR assay and MTT assay.
2. MTT₅₀ value and NR₅₀ value of XO/HX were 30 mU/ml XO/0.2 mM HX.
3. *BPT water extract* have efficacy of increasing neurofilament.
4. *BPT water extract* have efficacy of increasing LDH activity.

From above the results, It is concluded that *BPT* has marked efficacy as a treatment for the damages caused in the XO/HX-mediated oxidative process.

Key word : Xanthine Oxidase(XO), Hypoxanthine(HX), MTT, NR, *Baepungtang*(*BPT*), Neurofilament, LDH activity

I. 緒 論

神經組織에 損傷이 발생되면 神經學的 症狀이 나타나는데¹⁻⁴⁾, 이의 病態生理를 살펴보면 神經組織 損傷에 따른 局所 腦血流의 減少로 인한 一連의 代謝物質에 의해 酸素自由基, 글루탐산 등의 毒物物質이 生成되거나 沈着되는데 이들의 相互作用에 의해 神經細胞는 사망하게 되어 運動麻痺를 포함한 神經學的인 證候를 나타내게 된다¹⁻³⁾.

특히 酸素自由基는 中樞神經系를 비롯하여 末梢神經系에 影響을 미쳐 근위축성측삭경화증이나 파킨스씨병과 같은 神經疾患을 유발하는 病因으로 밝혀지고 있다⁵⁻⁷⁾.

최근에 酸素自由基의 酸化의 損傷에 대하여 韓藥材가 효과적인 抗酸化作用을 나타낸다는 研究報告⁸⁻¹¹⁾들이 있다.

本 實驗은 酸素自由基를 誘發하기 위하여 Xanthine Oxidase/Hypoxanthine을 培養한 脊髓感覺神經細胞에 처리한 후 細胞毒性을 MTT assay, NR assay 측면에서 조사하였으

며, 排風湯의 防禦效果를 관찰하기 위하여 排風湯 煎湯液을 培養 脊髓感覺神經細胞에 처리한 후 Neurofilament enzymeimmuno assay, LDH activity assay를 한 결과 유의한 防禦效果를 관찰하여 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗動物 및 藥材

1) 實驗動物

本 實驗에 使用한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강상태가 양호한 생쥐를 使用하였다.

2) 藥材

(1) 藥材

本 實驗에서 使用된 排風湯은 ?¹²⁾에 依據하였으며, 藥材는 圓光大學校 附屬益山韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였고, 內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription of Baepungtang(BPT)

韓 藥 名	生 藥 名	총重量(g)
獨活	RADIX ANGELICAE PUBESCENTIS	3.75(g)
麻黃	HERBA EPHEDRAE	3.75(g)
赤茯苓	PORIA	3.75(g)
白朮	RHIZOMA ATRACTYLODIS MACRO CEPHALAE	3(g)
肉桂	CORTEX CINNAMONI	3(g)
川芎	RHIZOMA CHUANXIONG	3(g)
杏仁	SEMEN ARMENIACAE AMARUM	3(g)
白芍藥	RADIX PAEONIAE ALBA	3(g)
防風	RADIX SAPOSHNIKOVIAE	3(g)
當歸	RADIX ANGELICAE SINENSIS	3(g)
甘草	RADIX GLYCYRRHIZAE	3(g)
白鮮皮	CORTEX DICTAMNI	1.875(g)
大棗	FRUCTUS JUJUBAE	3.75(g)
生薑	RHIZOMA ZINGIBERIS RECENS	3.75(g)

2. 實驗方法

1) 檢液의 調製

排風湯 200g을 각각 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 3시간동안 電熱器로 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 凍結乾燥器에서 乾燥하여 28.56g의 분말 시료를 얻었다.

2) 藥劑 製造

本 實驗에 사용한 약제로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypo-xanthine(HX, Sigma)로서 XO는 100 mU/ml, 10 mU/ml, 1 mU/ml의 저장액을, HX는 100 mM, 10 mM, 1 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 實驗 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 培養液에 첨가하여 사용하였다.

3) 細胞培養

脊髓感覺神經細胞의 분리는 Michikawa 등¹³⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생후 1~3 일된 생쥐에서 적출한 척수조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36°C, 5% CO₂/95%air로 조절된 항온기 내에서 培養하였다. 培養완료후 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)으로 3회 세척 후 Pasteur 피펫으로 세포를 분리시켰다. 분리된 세포들은 Poly-L-lysine (Sigma)으로 전처리된 96-multiwell에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 培養液으로 교환하여 주었으며 7일 동안 培養後 本 實驗에 사용하였다.

4) 酸素自由基 處理

酸素自由基가 생쥐의 脊髓感覺神經細胞에

미치는 影響을 調査하기 위하여 일정시간 培養한 神經細胞를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 여러 농도의 xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)이 포함된 培養液에서 1-7시간 동안 처리후 分析하였다.

5) 細胞毒性 및 防禦效果 檢定

(1) 細胞生存率 分析

① MTT 定量

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide(Sigma)> 定量은 Mosmann¹⁴⁾의 방법에 의하여었다. 酸素自由基나 항산화제를 처리한 培養 神經細胞를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well당 최종濃度로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료후 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk)를 처리한 다음 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정후 대조군과 比較 調査하였다.

② NR 定量

Neutral red(NR, Sinma)의 定量은 Borenfreud와 Puerner¹⁵⁾의 방법에 따랐다. 즉 여러 濃度의 Xanthine Oxidase(XO)를 처리한 培養 神經細胞를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5 mg/ml의 NR을 well당 최종 濃度로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료후 PBS로 3회 세척후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 比較 調査하였다.

③Neurofilament enzymeimmuno assay(EI)

培養중인 神經細胞를 PBS로 3회 세척하여 알콜로 고정시킨 다음 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료후 NE14(1:100, Sigma)로 1시간 동안 반응시킨 후 0.04% O-phenylenediamine(OPD, Sigma) 과 0.02% hydrogen peroxide로 처리한 다음 Dynatech Microelisa reader로 490nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 比較 調査하였다.

④ Lactate Dehydrogenase(LDH) 活性 調査
LDH활성의 측정은 kit(Japan)의 효소 기질액 1.0 ml를 tube(Palcon)에 넣은 후 검체인 배양액을 넣어 잘 혼합한 후 37°C로 조절된 정온기에서 반응시켰다. 반응 완료후 희석반응 정지액을 3.0 ml를 넣고 잘 혼합한 후 spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 統計 處理

實驗 結果에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

III. 實驗 成績

1. 酸素自由基의 毒性效果

1) 細胞生存率 分析(1) MTT 定量

酸素自由基가 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 xanthine oxidase(XO)가 1 mU/ml에서 50 mU/ml 까지의 각각의 濃度로 포함된 培養液에서 5시간 동안 培養한 후 xanthine oxidase(XO)의 毒性效果를 MTT assay법에 의하여 調査한 結果 처리한 XO의 농도에 비례하여 세포생존율이 감소하였으며 특히 30 mU/ml, 50 mU/ml XO 처리에서 세포의 생존율이 대조군 100%에 비하여 51.2%($p < 0.05$), 26.8%($p < 0.01$)로 유의한 감소를 나타냈다. MCV (Midcytotoxicity value)값은 30 mU/ml XO 처리에서 나타났다(Table 1, Fig. 1).

Xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)이 시간에 따라 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 0.2 mM HX에 MCV값인 30 mU/ml XO가 포함된 培養液에서 脊髓感覺神經細胞를 각각 1~7시간 동안 培養한 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 대조군과 比較 調査한 結果 XO를 처리한 후 바로 측정한 결과 시간이 지남에 따라 세포생존율이 감소하였으며 특히 5시간, 7시간 후에 대조군에 비하여 유의한 감소($p < 0.01$)를 나타냈다(Table 2, Fig. 2).

Table. 1. Absorbance (% of control) at 570nm wavelength for the MTT assay on xanthine oxidase(XO) in cultured mouse spinal sensory neurons

XO(mU/ml)	MTT absorbance(570nm)	Decrease rate of cell viability(%)
0(control)	0.41±0.06	-
1	0.31±0.04	24.4
10	0.24±0.03	41.5
30	0.21±0.02*	48.8
50	0.11±0.01**	73.2

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with various concentrations of xanthine oxidase(XO) for 5 hours. The values are the mean ±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

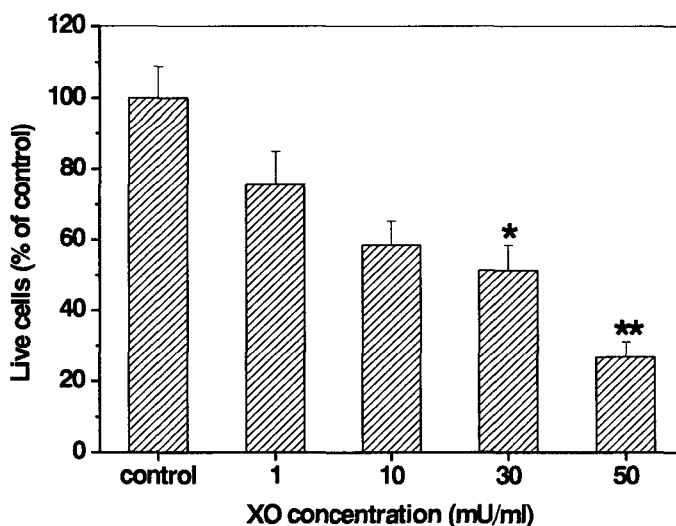


Fig. 1. Dose-dependency of xanthine oxidase(XO). XO-induced neutotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 1, 10, 30 and 50 mU/ml XO for 5 hours, respectively. Other legends are the same as table 1. *p<0.05; **p<0.01

Table 2. Time-response relationship of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) by MTT assay in cultured mouse spinal sensory neurons

XO/HX (mU/ml/mM)	MTT absorbance(570nm)				
	0 hr	1 hr	3 hr	5 hr	7 hr
0	0.57±0.07	0.52±0.06	0.46±0.03	0.48±0.05	0.43±0.04
30	0.54±0.05	0.35±0.03	0.27±0.02	0.23±0.04**	0.15±0.01**

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with 30 mU/ml XO and 0.2 mM HX for various time intervals. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. **p<0.01

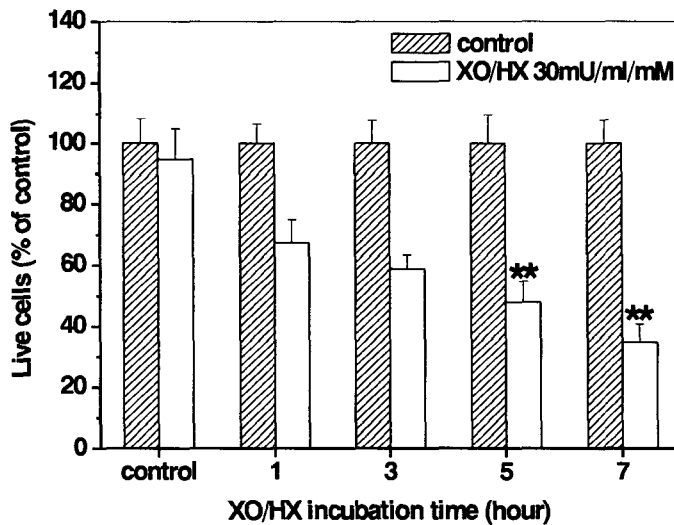


Fig. 2. Time-dependancy of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 30 mU/ml XO and 0.2 mM HX for 1, 3, 5 and 7 hours, respectively. Other legends are the same as table 2. **p<0.01

(2) NR 定量

培養中인 脊髓感覺神經細胞를 Ca^{2+} , Mg^{2+} free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 xanthine oxidase(XO)가 1 mU/ml에서 60 mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 5시간 培養한 다음 이의 影響을 調査한 結果 처리한 濃도에 의존적으로 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 30 mU/ml, 60 mU/ml XO의 濃度로 처리한 群에서 대조군 100%에 비하여 각각 51.2%($p<0.05$), 46.3%($p<0.01$)로 유의한 감소를 나타냈으며 MCV(midcytotoxicity value)값은 30 mU/ml XO 처리에서 나타났

다(Table 3, Fig. 3).

Xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)가 培養時間에 따라 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 0.2 mM HX에 MCV값인 30 mU/ml XO 濃度에서 1~7시간 동안 培養한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 調査한 結果 처리한 시간에 비례하여 세포생존율이 감소하였으며 특히 5시간, 7시간에서는 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다.(Table 4, Fig. 4).

Table. 3. Absorbance (% of control) at 540nm wavelength for the NR assay on xanthine oxidase(XO) in cultured mouse spinal sensory neurons

XO(mU/ml)	NR absorbance(540nm)	Decrease rate of cell viability(%)
0(control)	0.41 ± 0.06	-
1	0.28 ± 0.04	31.7
15	0.26 ± 0.05	36.6
30	0.21 ± 0.02*	48.8
60	0.19 ± 0.01**	53.7

Cultured mouse spinal sensory neurons were grown in media containing various concentrations of xanthine oxidase(XO) for 5 hours. The values represent the mean ± SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

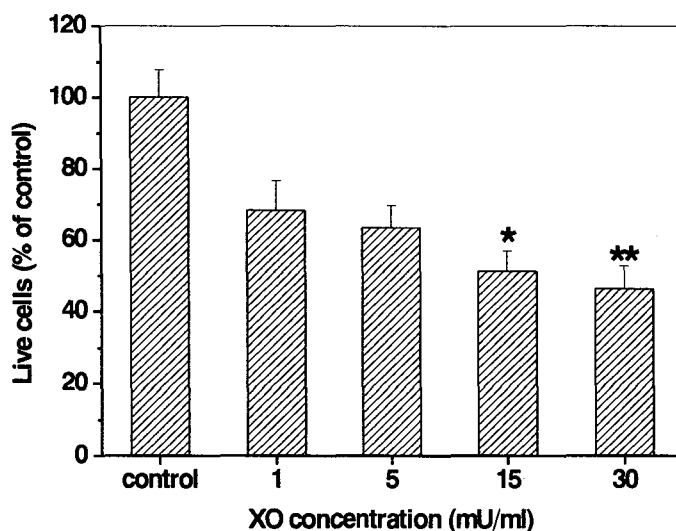


Fig. 3. Dose-response relationship of xanthine oxidase(XO) in cultured mouse spinal sensory neurons. Cytotoxicity was measured by NR assay. Cultures were exposed to 0(control), 1, 5, 15 and 30 mU/ml XO for 5 hours, respectively. Other legends are the same as table 3. *p<0.05; **p<0.01

Table 4. Time-response relationship of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) by NR assay in cultured mouse spinal sensory neurons

XO/HX (mU/ml/mM)	NR absorbance(540nm)				
	0 hr	1 hr	3 hr	5 hr	7 hr
0	0.56±0.06	0.55±0.04	0.53±0.07	0.48±0.05	0.47±0.03
30	0.52±0.02	0.46±0.05	0.36±0.04	0.24±0.01*	0.11±0.02**

Cultured mouse spinal sensory neurons were incubated with 30 mU/ml XO and 0.2 mM HX for various time intervals. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

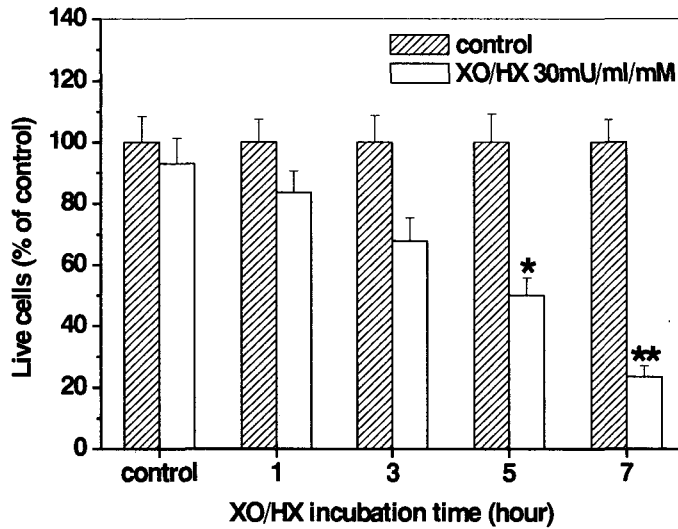


Fig. 4. Time-dependency of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 30 mU/ml XO and 0.2 mM HX for 1, 3, 5 and 7 hours, respectively. Cell viability was measured by NR assay. Other legends are the same as table 4. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$