

加味鎮肝熄風湯이 損傷된 培養脊髓運動神經細胞에 미치는 影響

이재익, 김성환, 심정섭, 김강산, 강병기

원광대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of Gamijingsikpungtang on Cultured Spinal Motor Neurons

Lee Jae Ik, Seong Hwan Kim, Jeong Sub Sim, Kang San Kim, Byung Ki Kang

Department of Internal Medicine, college of Oriental Medicine Wonkwang University

The purpose of this study is to examine the toxic effects caused by xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX) and the effects of herbal extracts such as Jingansikpungtang(JST) and Gamijingsikpungtang(GJST) on the treatment of the toxic effects. For this purpose, experiments with the cultured nerve cells from the spinal motor neurons of new born mice were done.

The results of these experiments were as follows.

XO/HX, a oxygen radical-generating system, decreased the survival rate of the cultured cells on NR assay, MTT assay, the amount of neurofilaments and increased the amount of total protein and increased the lipid peroxidation and the amount of LDH. JST has the efficacy of increasing the amount of neurofilaments and total protein, and decreasing the lipid peroxidation and the amount of LDH. GJST has efficacy of increasing the amount of neurofilaments and total protein, and decreasing lipid peroxidation and the amount of LDH.

From the above results, It is concluded that JST and GJST have marked efficacy as a treatment for the damages caused in the XO/HX-mediated oxidative stress. And JST and GJST are thought to have certain pharmacological effects. Further clinical study of this pharmacological effects of JST and GJST should be complemented.

Key Word : Gamijingsikpungtang, xanthine oxidase, lipid peroxidation, LDH, neurofilaments.

1. 緒 論

運動神經細胞의 損傷은 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)과 같은 운동신경원질환(motor neuron disease, MND)의 病變을 招來하게 된다¹⁾. 이러한 운동신경을 阻害하는 病인은 많이 있겠지만 지금까지 알려진 바에 의하면 酸素自由基²⁾와 excitotoxic amino acids(EAAs)³⁾ 및 신경영양인자 (neurotrophic factor, NTF)의 결핍⁴⁾ 등이다. 특히 NTF는 MND를 비롯한 각종 신경세포의 분화

를 촉진시킬 뿐만 아니라 세포의 손상으로부터의 방어가 보고된 바 있으며, 이에 관한 연구의 하나로 산소 자유기에 의하여 손상된 해마신경원의 퇴화가 NTF에 의하여 방어되었다는 보고가 이를 뒷받침해주고 있다. 따라서 신경세포의 손상에 대한 NTF의 방어효과에 대한 자세한 기전에 대해서는 아직까지 밝혀진 바가 없기 때문에 국내외 학자들은 이를 위하여 많은 연구를 진행하고 있다⁵⁾.

脊髓運動神經細胞에 대한 연구로 李⁶⁾는 四君子湯이, 崔⁷⁾는 加味馬錢子湯이,

李⁸⁾는 附子半夏湯이, 李¹⁰⁾는 加味十全大補湯이 산소자유기에 의해 손상된 脊髓運動神經細胞에 미치는 영향에 대해 보고하였다.

鎮肝熄風湯에 관한 연구로 金¹¹⁾, 金¹²⁾ 등의 연구가 있어서 中風初期의 肝風內動症의 臨床症狀을 완하시키고 中風初期의 意識障礙, 嚥下障礙, 言語障礙, 運動障礙 등을 抑制하고 好轉시킨다고 보고하였으나 酸素自由基에 의해 損傷된 脊髓運動神經細胞에 대한 研究는 없었다.

이에 著者는 鎮肝熄風湯 및 加味鎮肝熄風湯을 이용하여 酸素自由基에 의해 損傷된 脊髓運動神經細胞에 대한 防禦效果를 연구하여 유의성 있는 결과를

얻었기에 보고하는 바이다.

II. 對象 및 方法

1. 材料

1) 動物

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

2) 藥材

本實驗에 使用한 鎮肝熄風湯의 處方 內容은 《醫學衷中參書錄》¹³⁾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, 鎮肝熄風湯, 加味鎮肝熄風湯 각각의 內容과 分量은 다음과 같다.

2. 方法

1) 檢液의 調劑

鎮肝熄風湯 3.2貼 分量인 203.2g, 加味鎮肝熄風湯은 鎮肝熄風湯 2.5貼 分量에 木瓜, 海桐皮, 각 15g을 加한 203.75g을 각각 9배용량의 증류수와 함께 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 2시간동안 電熱器로 煎湯한 다음 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 회전 농축기로 감압농축한 후 凍結 乾燥器에서 24시간 凍結乾燥하여 각각 46.04g, 40.62g의 분말 시료를 얻었다.

2) 試藥 製造

本實驗에 使用한 試藥으로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypoxanthine(HX, Sigma)으로 XO의 경우 100mU/ml, 10mU/ml, 1mU/ml의 저장액을, HX의 경우 1M, 100mM, 10mM의 저장액을 만들어 實驗 당일 適當한 양으로 희석하여 직접 培養液에 첨가하여 使用하였다.

3) 細胞培養

척수운동신경세포의 분리는 Zeman 등¹⁶⁾의 방법에 따라 시행하였다.

4) 酸素自由基 處理

산소자유기가 생쥐의 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 척수운동신경세포를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한

Prescription of Jingansikpungtang(JST)

韓藥名	生藥名	重量(g) (한침량×3.2침)
牛 膝	Radix Achyranthis	32
代 赭 石	Haematitum	32
龍 骨	Fossilia Ossis Mastodi	19.2
牡 蠣	Concha Ostreae	19.2
龜 板	Carapax Testudinis	19.2
白 芍 藥	Radix Paeoniae Lactiflorae	19.2
玄 參	Radix Scrophulariae	19.2
天 門 冬	Radix Asparagi	19.2
川 楝 子	Fructus Meliae Tooserdan	6.4
麥 芽	Fructus Hordei Germinatus	6.4
茵 陳	Herba Artemisiae Capillaris	6.4
甘 草	Radix Glycyrrhizae	4.8
總 計		203.2

Prescription of Gamijingansikpungtang(GJST)

韓藥名	生藥名	重量(g) (한침량×2.5침)
牛 膝	Radix achyranthis	25
代 赭 石	Haematitum	25
龍 骨	Fossilia Ossis Mastodi	15
牡 蠣	Concha Ostreae	15
龜 板	Carapax Testudinis	15
白 芍 藥	Radix Paeoniae Lactiflorae	15
玄 參	Radix Scrophulariae	15
天 門 冬	Radix Asparagi	15
川 楝 子	Fructus Meliae Toosendan	5
麥 芽	Fructus Hordei Germinatus	5
茵 陳	Herba Artemisiae Capillaris	5
甘 草	Radix Glycyrrhizae	3.75
木 瓜	Fructus Chaenomelis	15
海 桐 皮	Cortex Erythrinae	15
	Herba Siegesbeckiae	15
總 計		203.75

후 1~200mU/ml xanthine oxidase(XO)에 0.1~50mM hypoxanthine(HX)을 여러 농도로 조합하여 혼합한 다음 이들 각각의 배양액에서 1-24시간 동안 처리한 후 분석하였다.

5) 細胞毒性 및 防禦效果 檢定

(1) 細胞生存率 分析

① NR定량

Neutral red(NR, Sigma)의 정량은 Borenfreud와 Puerner¹⁵⁾의 방법에 따랐다.

② MTT定량

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma) 정량은 Mosmann¹⁶⁾의 방법에 따랐다.

③ Neurofilament enzymeimmuno assay(EIA)

여러 농도의 XO나 XO/HX 및 한약추출물에 배양한 척수운동신경세포를 PBS로 3회 세척하여 고정시킨 다음 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 세척하였다. 세척완료 후 NE14(1:100, Sigma)로 1시간 동안 반응시킨 다음 0.04% O-phenylenediamine(OPD, Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide로 처리한 후 microelisa reader로 490nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

④ LDH 定量

세포막의 손상정도를 조사하기 위한 LDH활성의 측정은 변형된 Takahashi 등¹⁷⁾의 방법에 의하여 행하였다. 즉, LDH kit(Atron lab, Japan)의 효소기질액 1.0ml를 직경 10cm인 튜브에 넣은 후 여기에 검체인 배양액을 넣어 잘 혼합한 다음 37℃에서 10분간 반응시켰다. 10분 후 희석반응 정지액 3.0ml를 넣어 혼합한 다음 spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 측정하여 대조군

과 비교 조사하였다. 이때 효소활성은 reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)의 산화양으로 표시된다.

⑤ Lipid peroxidation 定量

XO나 XO/HX 및 한약추출물을 여러 농도로 처리한 후 Lipid peroxidation의 측정은 일정시간 동안 처리한 척수운동신경세포의 상층액과 세포용해액내의 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)를 측정함으로써, 위의 액에 12N H2SO4와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0ml와 0.3ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응완료 후 TBA를 1.0ml를 가하고 다음 90도에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각 후 n-butanol로 처리하였다. n-butanol 처리완료 후 원침하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 측정하였다.

6) 統計 處理

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

III. 結果

1. 韓藥抽出物의 效果

1) Neurofilament 定量

(1) XO/HX의 影響

XO/HX농도에 따른 neurofilament의 양적 측정을 위한 neurofilament EIA에 있어서 0.1mM HX에 XO가 1~50mU/ml까지의 농도로 각각 포함된 培養液에서 脊髓運動神經細胞를 4시간 동안 처리한 후 세포의 생존율을 대조군과 비교 조사한 결과 Fig.1과 같이 나타났다

(2) 鎮肝熄風湯(jingansikpungtang, JST)의 效果

XO/HX에 의하여 손상된 培養 脊髓運動神經細胞에 대한 JST의 효과를 neurofilament의 양적변화측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값(midcytotoxicity value)인 25mU/ml XO/0.1mMHX농도에서 培養 脊髓運

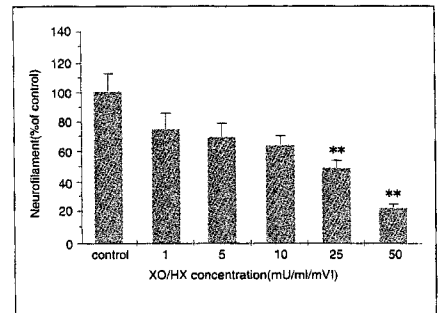


Fig. 1. Dose-dependency of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) in cultured mouse motor neurons. Cultures were exposed to 1, 5, 10, 25 and 50 mU/ml XO with 0.1mM HX for 4 hours, respectively. Amount of neurofilament was measured at wavelength of 490nm. The results indicate the mean ± SE(n=6). **p<0.01

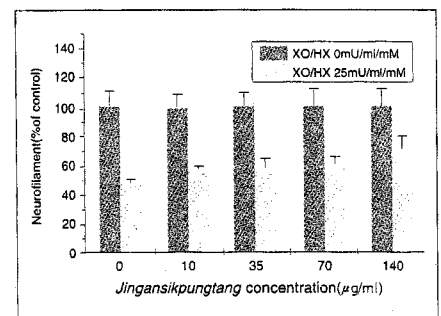


Fig. 2. Dose-dependency of Jingsikpungtang (JST) for its protective effect on xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) in cultured mouse motor neurons. Cultures were preincubated with 10, 35, 70 and 140 μg/ml Jingsikpungtang(JST) for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 25mU/ml xanthine oxidase(XO) and 0.1mM hypoxanthine(HX) for 4 hours. Amount of neuro filament was measured at wavelength of 490nm. The results indicate the mean ± SE(n=6).

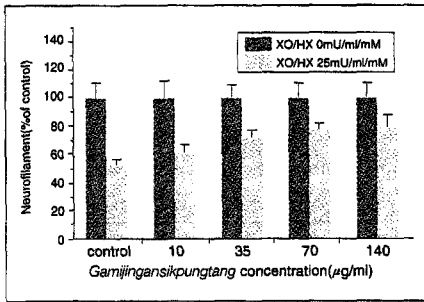


Fig. 3. Dose-dependency of Gamijiangsikapung tang(GJST) for its protective effect on xanthine oxidase(XO) and hypoxan thine(HX) in cultured mouse motor neurons. Cultures were preincubated with 10, 35, 70 and 140 µg/ml Gamijiangsikapung tang(GJST) for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 25mU/ml xanthine oxidase(XO) and 0.1mM hypoxan thine(HX) for 4 hours. Amount of neurofilament was measured at wavelength of 490nm. The results indicate the mean ± SE(n=6).

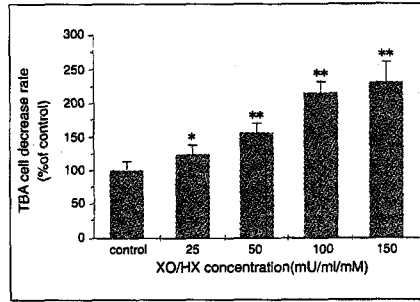


Fig. 4. Dose-dependency of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) in cultured mouse motor neurons. Cultures were exposed to 25, 50, 100 and 150mU/ml xanthine oxidase(XO) and 0.1mM hypoxanthine(HX) for 4 hours, respectively. Cell viability was determined as % of control. The results represent the mean ± SE(n=6). *p<0.05; **p<0.01

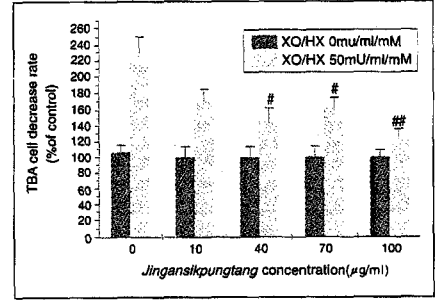


Fig. 5. Dose-response relationship of Jingsikapungtang(JST) for its protective effect on xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine(HX) in lipid peroxidation. # p<0.05; ## p<0.01

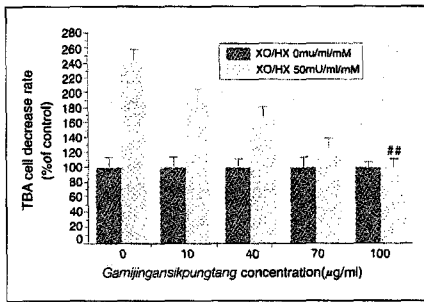


Fig. 6. Dose-response relationship of Gamijiangsikapungtang(GJST) for its protective effect on xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine(HX) in lipid peroxidation. ## p<0.01

動神經細胞를 4시간 동안 노출시키기 3 시간 전에 10~140µg/ml JST가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 neurofilament EIA법으로 조사한 결과 Fig. 2와 같이 나타났다.

(3) 加味鎮肝熄風湯 (Gamijiangsikapungtang GJST)의 效果
XO/HX에 의하여 손상된 培養 脊髄 運動神經細胞에 대한 GJST의 효과를 neurofilament의 양적변화측면에서 조

사하기 위하여 XO/HX의 MCV 값 (midcytotoxicity value)인 25mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 培養 脊髄 運動神經細胞를 4시간 동안 노출시키기 3 시간 전에 10-140µg/ml GJST가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 neurofilament EIA법으로 조사한 결과 Fig. 3과 같이 나타났다.

2) Lipid peroxidation 定量

(1) XO/HX의 影響

XO/HX의 농도에 따른 lipid peroxidation의 측정하기 위하여 0.1mM HX에 XO가 25-150mU/ml까지의 농도로 각각 포함된 培養液에서 脊髄運動神經細胞를 4시간 동안 처리한 후 세포의 생존율을 대조군과 비교 조사한 결과 Fig. 4와 같이 나타났다.

(2) 鎮肝熄風湯(GST)의 效果

XO/HX에 의하여 손상된 培養 脊髄 運動神經細胞에 대한 JST의 효과를 lipid peroxidation측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV 값 (midcytotoxicity value)인 50mU/ml XO/0.1mM HX농

도에서 4시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10~100µg/ml JST가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사한 결과 Fig. 5와 같이 나타났다.

(3) 加味鎮肝熄風湯(GJST)의 效果

XO/HX에 의하여 손상된 培養 脊髄 運動神經細胞에 대한 GJST의 효과를 lipid peroxidation측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV 값 (midcytotoxicity value) 50mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 4시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10-100µg/ml JST나 GJST가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사한 결과 Fig. 6과 같이 나타났다.

3) LDH 定量

(1) XO/HX의 影響

培養 脊髄運動神經細胞에 있어서 XO/HX농도에 따른 LDH 활성도를 측정하기 위하여 0.1mM HX에 XO가 15-90mU/ml까지의 농도로 각각 포함된 培養液에서 신경세포를 4시간 동안 처리한 후 세포培養液내로 유출된 LDH양을 대조군과 비교 조사한 결과 Fig. 7과 같이 나타났다.

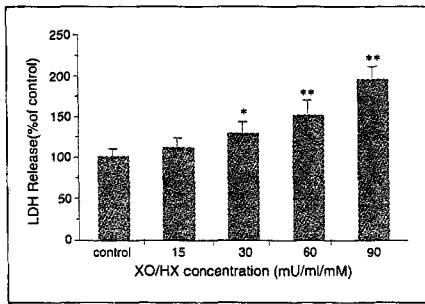


Fig. 7. Dose-dependency of xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine(HX) in cul tured mouse motor neurons. Cultures were exposed to 15, 30, 60 and 90mU/ml xanthine oxidase(XO) and 0.1mM hypoxanthine(HX) for 4 hours, respectively. Cell viability was deter mined as % of control. The results represent the mean \pm SE(n=6). *p<0.05; **p<0.01

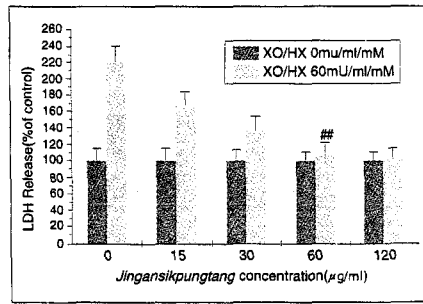


Fig. 8. Dose-response relationship of Jingansikpungtang(JST) for its protective effect on xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine (HX) in lactate dehydrogenase (LDH) release. ## p<0.01

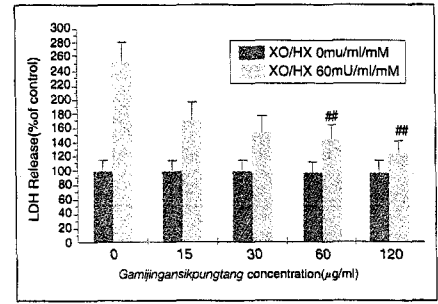


Fig. 9. Dose-response relationship of Gamijingsikpungtang(GJST) for its protective effect on xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) in lactate dehydrogenase(LDH) release. ## p<0.01

(2) 鎮肝熄風湯(GST)의 效果

XO/HX에 의하여 손상된 培養 脊髓 運動神經細胞에 대한 JST의 效果를 LDH활성도측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값(midcytotoxicity value)인 60mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 4시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15-120μg/ml JST가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사한 결과 Fig. 8과 같이 나타났다.

(3) 加味鎮肝熄風湯(GJST)의 效果

XO/HX에 의하여 손상된 培養 脊髓 運動神經細胞에 대한 GJST의 效果를 LDH활성도측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값(midcytotoxicity value)인 60mU/ml XO/0.1mM HX 농도에서 4시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15~120μg/ml GJST가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어 효과를 조사한 결과 Fig. 9와 같이 나타났다.

IV. 考 察

鎮肝熄風湯은 清代末期 張錫純의 <

醫學衷中參書錄>¹³⁾에 최초로 수록된 處方으로 牛膝, 代赭石, 龍骨, 牡蠣, 龜板, 玄蔘, 天門冬, 白芍藥, 茵陳, 川棟子, 麥芽, 甘草로 구성되어져 있으며, 鎮肝熄風法을 구체적으로 응용한 것으로 引血下行하는 牛膝을 重用하여 肝陽上亢을 막고, 代赭石의 味苦質重한 성질을 이용하여 平肝潛陽하고 龍骨, 牡蠣 역시 平肝潛陽하는 效力이 강력하다^{18,19)}. 따라서 위 4가지 藥物을 응용하여 表를 治療하고 龜板, 玄蔘, 天門冬, 白芍藥을 사용하여 肝의 逆氣를 가라앉히게 하였다^{20,21)}. 근래의 實驗報告에서 본 處方의 降血壓作用과 抗痙攣作用 및 心筋抑制作用이 보고된 바 있다²²⁾.

酸素自由基는 차매나 중풍, 뇌허혈뿐만 아니라 근위축성측삭경화증과 같은 신경병변의 병리학적 원인으로 밝혀지면서 이들 병변에 대한 치료적 측면에서 酸素自由基에 의한 신경세포의 산화적 손상에 대한 작용유형과 병리적 현상을 밝히기 위하여 많은 연구가 이루어져 왔다²³⁾. 본 실험에서 여러 농도의 xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)을 생쥐에서 순수분리 培養한 脊髓運動神經細胞에 노출시킨 후 XO와 HX가 신경세포에 미치는 영향을 NR과 MTT

분석법으로 분석한 결과 XO/HX는 脊髓運動神經細胞에 처리한 농도와 시간에 비례하여 脊髓運動神經細胞의 생존율을 현저하게 감소시켰다. 이 같은 결과는 XO/HX가 培養 생쥐의 척수감각 신경절세포에 독성을 나타냈다는 보고나²³⁾, 소의 뇌조직에서 순수분리 培養한 회소돌기야교세포에 XO/HX가 농도에 비례하여 세포의 생존율을 현저하게 감소시켰다는 연구결과와 일치함을 알 수 있으며²⁴⁾. 이는 酸素自由基가 증추나 말초신경계를 구성하고 있는 신경세포에 직접적으로 산화적 손상을 준다는 것을 제시한다고 하겠다. 본 실험에 있어서 XO/HX가 생쥐의 培養 脊髓運動神經細胞에 독성을 나타낸 것은 XO가 단독으로 또는 HX와 상호작용함에 의한 결과일 것으로 생각된다. 특히 XO/HX는 신경세포내의 catalase 나 gluta thione peroxidase와 같은 항산화효소에 손상을 줌으로서 항산화효소에 의하여 제거되지 못한 酸素自由基들의 축적에 의한 가능성이 매우 높다.

이러한 이유로 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral scleriosis, ALS)의 연구에서 SOD-1 유전자의 돌연변이에 의해 항산화효소에 의하여 제거되

어저야 할 酸素自由基들이 환자의 뇌속에 축적됨으로서 병변을 가속화시킨다고 보고된 바 있다²⁵. 특히 이같이 축적된 酸素自由基는 세포막의 지질과산화반응(lipid peroxidation)을 촉진시킬 뿐만 아니라²⁶, 흥분성 아미노산을 분비케 함으로서 세포내 자유칼슘의 항상성을 깨뜨린다. 본 실험에 있어서도 XO/HX는 脊髄運動神經細胞에 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포의 LDH의 활성증가와 lipid peroxidation을 유의하게 증가시켰는데 이는 위의 현상을 증명한다고 하겠다²⁷. 그밖에도 본 실험의 NR 분석법이나 MTT 분석법을 비롯하여 lipid peroxidation 정량분석이나 신경세사(neurofilament)의 양적변화분석, 단백질합성의 정량분석 및 LDH활성도 분석의 결과를 볼 때 XO와 HX는 세포막의 지질과산화반응을 비롯하여 신경세사의 손상, 세포막의 손상 및 단백질 합성계를 억제한 것으로 생각된다²⁸.

XO나 또는 XO/HX의 신경세포에 대한 세포독성을 조사하기 위하여 0.1mM HX와 10-90mU/ml의 XO가 각각 여러 농도로 포함된 培養液에서 脊髄運動神經細胞를 1-8시간 동안 培養한 후 NR이나 MTT 분석법에 의하여 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 XO/HX의 처리농도에 비례하여 유의하게 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 MTT분석법에서 45mU/ml XO/0.1mM HX에서 4시간 동안 처리에서 MCV값(midcytotoxicity value)이 나왔으며, NR분석법에서는 30mU/ml XO/0.1mM HX에서 4시간 동안 처리에서 MCV값이 나왔다. 최근에는 한약 추출물을 비롯한 천연추출물들이 항산화효과나 세포성장인자 등의 약리적 활성을 가지고 있어 뇌나 척수의 중추신

경계나 또는 말초신경계를 구성하고 있는 신경세포가 손상을 입었을 경우 이를 보호하는 효과가 있음이 규명되면서 이를 병변의 치료에 적용하려는 연구가 활발히 진행중이다²⁹. 본 실험에서는 XO/HX의 산화적 손상에 의한 한약추출물의 효과를 조사하기 위하여 생쥐에서 순수분리하여 培養한 脊髄運動神經細胞에 XO/HX를 처리한 후 한약추출물인 鎮肝熄風湯 및 加味鎮肝熄風湯의 효과를 neurofilament 정량을 비롯하여 lipid peroxidation 측정, LDH활성측정 및 총단백질량측정 등에 의하여 조사하였다.

鎮肝熄風湯에 대한 neurofilament의 측정을 위한 neurofilament enzyme immunoassay(EIA)에 있어서 XO/HX는 培養 脊髄運動神經細胞에 처리한 농도에 비례하여 neurofilament의 양적 감소를 보였으며 25mU/ml XO/0.1mM HX처리에서 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다(Fig. 1).

그러나 25mU/ml XO/0.1mM HX를 4시간 동안 운동신경세포에 처리하기 전 10~140 μ g/ml의 鎮肝熄風湯이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 다소 neurofilament의 양적증가를 보였다(Figs. 2). 또한 加味鎮肝熄風湯의 경우 처리한 농도에 비례하여 neurofilament의 증가양상을 보였으며 鎮肝熄風湯과 비슷한 양상을 나타냈다(Fig. 3).

총단백질 조사를 위한 SRB 분석에 있어서 0.1mM HX에 XO가 10-80mU/ml의 농도로 각각 포함된 培養液에서 培養 脊髄運動神經細胞를 4시간 동안 培養한 다음 총단백질량을 조사한 결과 XO/HX의 처리농도에 비례하여 감소하였으며 MCV는 40mU/ml XO/0.1mM HX 처리에서 나타났다.

한편 40mU/ml XO/0.1mM HX를 4시간 동안 신경세포에 처리하기 전 20~160 μ g/ml의 鎮肝熄風湯이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 다소 단백질양의 증가를 보였다. 또한 加味鎮肝熄風湯의 경우 처리한 농도에 비례하여 다소 단백질양의 증가양상을 보였으며 鎮肝熄風湯과 같이 비슷한 양상을 보였다.

XO/HX가 지질과산화반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.1mM HX에 25-150mU/ml XO가 여러 농도로 각각 포함된 培養液에서 脊髄運動神經細胞를 4시간 동안 培養후 lipid peroxidation의 조사를 하였다. XO/HX는 신경세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 TBARS 농도의 유의한 증가를 보였으며 50mU/ml XO/ 0.1mM HX처리에서 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다(Fig. 4). 鎮肝熄風湯이 脊髄運動神經細胞의 lipid peroxidation에 미치는 영향에 있어서 50mU/ml XO/0.1mM HX를 4시간 동안 신경세포에 처리하기 전 10~100 μ g/ml의 鎮肝熄風湯이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 TBARS 농도의 감소를 매우 유의하게 감소시켰다(Fig. 5). 또한 加味鎮肝熄風湯의 경우 처리한 농도에 비례하여 TBARS의 유의한 감소현상을 나타냈다(Fig. 6).

XO/HX가 脊髄運動神經細胞에 미치는 영향에 대한 LDH활성조사를 위하여 0.1mM HX에 15~90mU/ml의 XO가 각각 포함된 培養液에서 4시간 동안 培養한 다음 LDH 활성도를 조사하였다.

XO/HX는 培養 脊髄運動神經細胞에 처리한 농도와 시간에 비례하여 LDH

의 양적 증가를 보였으며 60mU/ml XO/0.1mM HX처리에서 MCV값 (midcytotoxicity value)을 나타냈다 (Fig. 7). 한편 60mU/ml XO/0.1mM HX를 4시간 동안 신경세포에 처리하기 전 15~120µg/ml의 鎮肝熄風湯이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH의 유의한 양적감소를 보였다 (Fig. 8). 또한 加味鎮肝熄風湯의 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH의 유의한 양적감소를 보였다(Figs. 9).

이와 같은 實驗 結果를 綜合해보면, XO/HX와 같은 酸素自由基는 酸化의 損傷에 의해 細胞 生存率을 減少시키고 神經細胞에 대하여 毒性을 나타내며, 이에 대한 鎮肝熄風湯과 加味鎮肝熄風湯煎湯液의 投與가 neurofilament의 量的 增加, 總 단백질量의 增加, lipid peroxidation의 減少 및 LDH量의 減少를 보였다. 또한 鎮肝熄風湯과 加味鎮肝熄風湯은 運動神經細胞損傷에 대하여 豫防的 防禦效果는 있었으나, 두 處方間의 有意한 差異는 發見할 수 없었다. 또한 두 處方은 韓醫學的으로 風과 相關된 運動神經損傷으로 인한 運動障礙에 一定한 藥理的 效果가 있음을 알 수 있었으며 이에 대한 精確한 機轉說明을 위해서는 免疫學的, 生理學的 및 藥理學的인 側面에서 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

Xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)의 산화적 손상에 대한 기전을 규명하기 위하여 신생 생쥐의 척수조직에서 순수 분리 培養한 운동신경세포에 여러 농도의 XO/HX가 포함된 培養液에서 4시간 동안 처리한 다

음 XO/HX가 培養 脊髓運動神經細胞에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 XO/HX의 독성효과에 대한 한약추출물인 鎮肝熄風湯(Jingansik pungtang, JST) 및 加味鎮肝熄風湯(Gamijin gansikpungtang, GJST)의 효과를 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. XO/HX의 신경독성에 대하여 鎮肝熄風湯 및 加味鎮肝熄風湯은 XO/HX만의 처리에 비하여 다소의 neurofilament의 양적증가에 있어서 유의성을 보였다.

2. XO/HX의 신경독성에 대하여 鎮肝熄風湯 및 加味鎮肝熄風湯은 XO/HX만의 처리에 비하여 총단백질 양의 증가에 있어서 유의성을 보였다.

3. XO/HX의 신경독성에 대하여 鎮肝熄風湯 및 加味鎮肝熄風湯은 XO/HX만의 처리에 비하여 lipid peroxidation 활성화에 있어서 유의한 감소를 보였다.

4. XO/HX의 신경독성에 대하여 鎮肝熄風湯 및 加味鎮肝熄風湯은 XO/HX만의 처리에 비하여 LDH활성에 있어서 유의한 감소를 보였다.

以上的 結果로 부터 XO/HX는 생쥐에서 분리한 培養 脊髓運動神經細胞에 신경독성을 나타냈으며, 동시에 鎮肝熄風湯이나 加味鎮肝熄風湯과 같은 한약추출물이 XO/HX의 산화적 손상으로 부터 lipid peroxidation과 LDH활성을 유의하게 감소시킴으로서 XO/HX의 독성을 효과적으로 방어한 것으로 생각된다.

VI. 參考文獻

1. 張錫純 : 醫學衷中參西錄(上). 石家莊:河北科學技術出版社, 1985;307-327.
2. 王顯明 : 中醫辨證內科學. 北京:人民衛生出版社, 1984;356-386.
3. 上海中醫學院 編 : 中醫內科學. 香港:商務

- 印書館, 1975; 150, 152, 155, 159, 160, 168-170, 297.
4. 李尙仁 : 天真處方解說. 서울:成輔社, 1987; 421-422.
5. 上海中醫學院 編 : 方劑學. 香港:商務印書館, 1975; 144-145.
6. 文濬典 外 : 東醫病理學. 서울: 高文社, 1990; 32-33.
7. 金秉雲 外 : 肝系內科學. 서울: 東洋醫學研究院出版部, 1992; 438-439.
8. Rosen D, Siddique T, Patterson D, et al : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 1993; 362:59-62.
9. Rothstein J. D, Tsai G, Kunel R. W, et al : Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Neurol 1990; 28:18-25.
10. Jackson G. R, Apfell L, Wenbach-Perex K, Perex-Polo J. R : Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balanced and neuronal infury. 1. Stimulation of hydrogen peroxide resistance. J. Neurosci. Res 1990; 25:360-368.
11. Michikawa M, Lim K. T, McLamon J. G, Kim S. U : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J. Neurosci. Res 1994; 37:62-70.
12. Park S. T, Kim S. U : Study of neurotrophic factor for spinal motoneurons. Kor. J. Anat 1995; 28 : 381-389.
13. 이광우, 정희원 : 임상 신경학. 서울: 고려의학, 1997; 900-906.
14. 金剛山, 沈廷燮 : 中風急性期에 活用되는 鎮肝熄風湯에 관한 臨牀的 考察, 대한동의병리학회지 1998; 12(1): 19-27.
15. 辛民教 : 原色臨牀本草學, 서울: 永林出版社, 1986; 668-671.
16. 尹吉榮 : 東醫學의 方法論研究, 서울: 成輔社, 1983; 107.
17. Zeman S, Lioyd C, Meldrum B, Leigh P. N. : Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neurons disease. Neuropathol. Appl. Neurobiol 1994; 20 : 219-231.
18. Borenfreund E, Puerner J. A. : A Simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). J. Tiss. Cult. Meth 1984; 9 : 7-9.
19. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay

- for cellular growth and survival, Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* 1983;65: 55-63.
20. Takahashi K, Fujita T, Mayum T, Kish T. : Effect of Adriamycin on Cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem. Pharm* 1987;35(1): 326-334.
21. 圓光大18期卒準委 : 譯釋中醫方劑問答, 益山: 圓光大學校出版局, 1995;286-289, 408, 545-546.
22. 陳傳外 : 方劑學. 上海: 上海中醫學院出版社, 1990; 447, 449-451.
23. 金希俊 外 : 鎮肝熄風湯이 家兎의 血壓 및 血清 Total Cholesterol에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌 1990;11(1): 109-119.
24. 孫孝洪 : 中醫治療學原理, 成都: 四川科學技術出版社, 1990;476-504.
25. Kim, Y. S, Kim, S. U. : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and it's protection by catalase. *J. Neurosci. Res* 1991;29:100-106.
26. Michikawa M, Lim K. T, McLarnon J. G, Kim S. U. : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J. Neurosci. Res* 1994;37:62-70.
27. Rosen D, Siddique T, Patterson D, et al : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol* 1993;28: 18-25.
28. Kim S. U, Osborn D, Kim M. W, Spigelman I, Puil E, Shin D. : Longterm culture of human fetal spinal cord neurons, Morphological immunocytochemical and electrophysiological characteristics. *Neuroscience* 1988;25: 659-670.
29. Mattson M. P, Cheng B, Smith-Swintosky V. L. : Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium-and free radical mediated excitotoxic injury: Implications for treating neurogenerative disorders. *J. Exp. Neurol* 1993;124: 89-95.