

원 저

# 省風湯이 미세아교세포의 NO 생성에 미치는 影響

成 彊 慶, 林 昌 勇, 李 相 觀

원광대학교 광주 한방병원 2내과

## Effects of *Seongpung-tang* on the NO Production of Primary Microglial Cell

Gang-Kyung Sung, Chang-Yong Lim, Sang-Kwan Lee

Oriental Medicine Center of Wonkwang University

The water extract of *Seongpungtang*(SPT) has commonly been used for treatment of ischemic brain damage in Oriental traditional medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of SPT rescues brain cells from ischemic damage.

To elucidate the protective mechanism of ischemic induced cytotoxicity, the regulation of Lipopolysaccharide (LPS) and PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) induced iNOS expression in microglial cells was investigated. LPS and PMA treatment for 48 hr in microglial cells markedly induced nitric oxide (NO), but treatment of the cells with the water extract of SPT decreased nitrite formation. In addition, LPS and PMA treatment for 48 hr induced severe cell death in microglial cells. However treatment of the cells with the water extract of SPT did not induce significant changes compared to the control cells. Furthermore, NO production was markedly decreased by treatment of nuclear factor kappa B(NF-kB) inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC).

According to the above results, it is suggested that the protective effects of the water extract of SPT against ischemic brain damage may be mediated by regulation of iNOS during ischemic condition. (J Korean Oriental Med 2000;21(1):91-98)

**Key Words:** Seongpungtang(SPT), Nitric oxide (NO), Ischemic brain damages

### 緒 論

省風湯은 《太平惠民和劑局方》<sup>1)</sup>에 “治卒急中風, 口噤不語, 口眼喎斜, 筋脈攣急, 風盛痰實, 旋暈僵仆, 頭目眩重, 胸膈煩滿, 左癱右瘓, 手足麻痺, 骨節煩疼, 步履艱辛, 神志昏憤方.”이라 하여 最初로 記錄된 이래 歷代醫家<sup>2-4)</sup>에 의해 散風·豁痰·降火의 效能으로 卒中風에 活用되어 왔다.

腦卒中은 急激하게 발생하고 意識障碍를 同伴하며, 運動麻痺를 포함한 嚥下障碍, 言語障碍, 視覺障碍, 排泄障碍 등의 多樣한 症狀들을 나타내는 神經學的인 症候群에 대한 臨床的 概念이다<sup>5,6)</sup>.

中樞神經系는 계속되는 血液供給을 통하여 營養分과 산소를 供給받고 있으며 血液供給이 차단되면 ATP를 1분이상 유지하기가 힘들 정도로 血液供給에 매우 민감한 組織이다<sup>7,8)</sup>. 따라서 腦의 虛血狀態에서의 病理生理學的

機轉이 최근 광범위하게 研究되고 있고 nitric oxide(NO)가 虛血狀態에서 細胞毒성에 매우 重要하게 作用한다는 많은 보고가 있다<sup>9,22)</sup>.

腦虛血시 神經세포와 神經아교세포에서 nNOS와 iNOS 발현에 의해 生成되는 NO는 심각한 神經細胞損傷을 일으키는데 비하여 虛血性 疾患의 초기에 혈관내피세포에서 生成되어지는 eNOS에 의해 生成되는 NO는 血管을 擴張시켜 血流量을 增加시킴으로써 산소와 營養分의 供給을 원활하게 하여 虛血에 의한 細胞損傷을 줄여준다<sup>22)</sup>.

최근 韓藥材의 神經細胞保護作用에 대한 研究에서 太陰調胃湯은 大뇌피질세포에서 Glucose Oxidase에 의하여 유발된 細胞毒성을 效果적으로 防禦하였으며<sup>23)</sup>, 淸心蓮子湯은 Hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 노출되어 損傷된 뇌神經세포에 대한 防禦效果를 나타낸 바 있다<sup>24)</sup>.

이에 著者는 中風 急性期에 使用하는 省風湯이 腦虛血시 發生하는 細胞損傷에 대한 防禦作用에 미치는 影響을 알아보고자 미세아교세포에서 LPS와 PMA로 NO의 유발을 促進시키고, 增加된 NO 生成과 NO 細胞毒성에 대한 省風湯의 防禦 效果, NF-kB inhibitor 처리에 의한 NO

· 접수 : 2000년 5월 3일 · 수정 : 5월 27일 · 채택 : 5월 29일  
· 교신저자 : 임창용, 광주시 남구 주월동 543-8 원광대학교 광주 한방병원 (Tel. 062-670-6413)

生成效果, 미세아교세포의 形態學的 觀察을 하였던 바 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

### 實驗材料 및 方法

#### 1. 材料

##### 1) 細胞

본 實驗에 使用한 動物은 Sprague-Dawley계 新生白鼠로, 생후 1-3일된 白鼠의 腦를 摘出하여 미세아교세포를 분리하여 實驗에 使用하였다.

##### 2) 藥材

본 實驗에 使用된 藥材는 圓光大學校 韓醫科大學 光州 韓方病院에서 購入 精選하여 使用하였으며, 處方은 東醫寶鑑<sup>2)</sup>에 따라 準하였으며 1貼의 內容과 分量은 아래와 같다.

#### 2. 方法

##### 1) 試料調製

省風湯 5貼分量 160g을 蒸溜水 1.5 l 에 넣고 3시간 동안 끓인 다음 거즈로 濾過하고 3,200 rpm으로 30分間 遠心分離하여 上等액만을 취하였다. 上等액은 -70℃에서 Freeze Dryer로 凍結乾燥 시킨 후 40, 5, 8 g의 試料를 얻어 使用하였으며, 試料는 細胞에 投與하기 전 0.22 μm pore 의 濾過紙로 濾過 滅菌하여 濃度를 調整한 다음 使用하였다.

##### 2) 일차 미세아교세포(Primary microglial cell) 培養

일차 미세아교세포는 新生白鼠의 腦를 摘出하여 0.25% trypsin과 DNase(Sigma, 1mg/ml)로 15分間 處理하고, trypsin inhibitor(Sigma, 1mg/ml)로 trypsin의 作用을 停止시켜 細胞를 分離한 後 mixed glial cell을 Dulbecco's minimum essential medim(DMEM)에서 14日間 培養하였다. 미세아교세포는 mixed glial cell을 200rpm으로 shaking incubator에서 2時間 煎湯하여 浮游된 細胞를 分離하여 培養하였다.

##### 3) MTT 定量

對照群과 實驗群들을 각각 3개의 well을 한 群으로 하

였으며, MTT [3 - (4,5-di-methylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma] 定量은 Mosmann<sup>10)</sup>의 方法에 따랐다. 즉 미세아교세포를 培養한 後 上層液을 버리고 使用當日 製造한 500μg/ml MTT를 培養容器당 200μl 씩 넣어 銀箔紙로 포장한 後 3時間 동안 37℃, 5% CO2 로 維持된 定溫機內에서 培養하였다. 培養 完了 후 細胞內의 formazan을 溶解시키기 위하여 上層液을 버리고 dimethyl sulfoxide(DMSO, Merck)를 培養容器당 1ml씩 넣고 15分間 室溫에서 방치한 후 吸光度計로 540nm에서 吸光度를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다.

##### 4) NO 濃度 測定

미세아교세포를 새로운 serum free 培養液으로 交換하여 3時間 동안 細胞를 安靜시킨 후 藥劑를 處理하고 培養液으로 遊離되어 나온 NO의 量을 24, 48時間에 測定하여 對照群과 實驗群의 NO 生成濃度를 比較하였다. 腦虛血시 神經細胞와 미세아교세포의 iNOS가 活性化되어 NO가 增加되는 現象을 誘導하기 위하여 LPS(1μg/ml)와 PMA(100nM)를 處理하여 미세아교세포에서 NO 生成을 增加시키고 省風湯의 影響을 調査하였다.

먼저 알고 있는 濃度의 sodium nitrite를 利用하여 標準曲線을 求하고, 對照群과 實驗群의 培養液을 各各 150μl 씩 얻어 4℃에서 1,500g의 速度로 15分間 遠心分離를 한 후 細胞成分들을 沈澱시키고 浮游液만을 취하여 Griess reagent와 同量으로 混合하여 室溫에서 10分間 反應시키고 550nm의 波長으로 吸收度를 測定하였다.

##### 5) 光學顯微鏡的 觀察

細胞의 形態學的 變化를 調査하기 위하여 培養中인 培養容器(well plate)를 도립위상차 현미경(Nikon)에서 觀察하였고, 필요시 부착된 사진기로 撮影하였다.

##### 6) NF-kB 저해제(Nuclear factor kappa B inhibitor) 處理

NF-kB의 活性에 의해 iNOS 발현이 增加되고, iNOS에 의해 NO가 生成되므로 NF-kB의 活性을 저해하여 活性化된 미세아교세포에서 NO의 生成을 確認하였다. NF-kB 저해제로는 PDTC를 100μM濃度로 藥劑處理 30分 전 에 培養液에 處理하였다.

#### Prescription of Seongpung-tang

藥物名	生藥名	重量(g)
防風	<i>Radix Ledebouriellae</i>	8.00
南星	<i>Rhizoma Arisaematis</i>	8.00
半夏	<i>Tuber Pinelliae</i>	4.00
黃芩	<i>Radix Scutellariae</i>	4.00
甘草	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	4.00
Total amount		32.00

## 實驗成績

### 1. 미세아교세포에 대한 省風湯의 效果濃度

미세아교세포에서 省風湯 물추출물의 效果濃度を 決定하기 위해 MTT assay로 細胞의 生存率을 測定하였다. 미세아교세포에 省風湯 추출물을 0.1, 0.5, 1, 2mg/ml 濃度로 處理하고 24, 48時間 후에 細胞의 生存率을 調査하였다. 미세아교세포에 省風湯 추출물을 24時間 處理한 경우 省風湯 0.1mg/ml에서 1mg/ml群까지 對照群에 比하여 細胞生存率이 增加하여 1mg/ml群에서는 155.66±9%에 달하였고, 48時間 處理한 경우 0.5mg/ml群에서 225.27±9%로 약 2倍 以上 增加하였으며, 그 以上の 濃度에서부터 점차 減少하였다(Table 1).

### 2. 省風湯 자체의 NO 生成有無

省風湯이 자체적으로 미세아교세포의 NO 生成에 어떠한 影響을 미치는지 알아보기 위하여 미세아교세포를 省風湯 추출물이 각각 0.1, 0.5, 1, 2 mg/ml 씩 포함된 배지에 培養하면서 24, 48時間 후의 NO 生成量을 觀察하였다.

省風湯을 單獨으로 處理한 경우 24時間 후부터 NO가 生成되었고 48時間 후에는 0.5mg/ml 處理群에서 10.61±0.1μM이 生成되었다(Table 2).

### 3. NO 生成에 대한 省風湯의 防禦 效果

腦虛血시 神經細胞와 神經아교세포의 iNOS가 活性化

되어 NO가 增加되는 현상을 誘導하기 위하여 LPS(1μg/ml)와 PMA(100nM)를 處理하여 미세아교세포에서 iNOS 活性을 增加시킨 후 省風湯의 影響을 調査하였다. 미세아교세포에 LPS만으로 刺戟하였을 때나 LPS와 PMA로 刺戟하였을 때 24時間부터 NO生成이 有意하게 增加하여 48時間에는 對照群과 比較하여 현저히 增加하였다.

미세아교세포를 LPS만으로 刺戟하였을 때 48時間 후 14.1±0.5μM의 NO가 生成되었고, LPS와 PMA로 刺戟하였을 때는 16.41±0.7μM로 刺戟받지 않은 對照群의 2.75±0.2μM에 比하여 NO 生成量이 많이 增加하였다. 그러나 省風湯 0.5mg/ml를 LPS와 PMA에 함께 處理한 경우 LPS와 PMA에 의하여 增加된 NO의 量인 16.41±0.7μM에서 6.63±0.6μM로 有意性 있게 減少시켜 LPS와 PMA로 活性化된 미세아교세포에서 NO의 生成을 效果的으로 抑制하였다(Table 3).

### 4. NO 細胞毒성에 대한 省風湯의 防禦效果

LPS와 PMA로 活性化된 미세아교세포의 細胞毒성에 대한 省風湯의 防禦效果를 觀察하였다. 미세아교세포에 LPS를 48시간 동안 처리한 경우 細胞生存率이 對照群의 120.05±9%이었으나, LPS와 PMA 處理群에서는 87.36±5%로 減少하였다. 그러나 LPS에 省風湯 0.5mg/ml를 처리한 群에서 細胞生存率이 183.51±11%, LPS와 PMA에 省風湯 0.5mg/ml를 처리한 群에서는 190.93±11%로 현저

**Table 1.** Effect of the Water Extract of Seongpung-tang(SPT) on Viability in Microglial Cell

SPT(mg/ml)	Viability(% of control)	
	24 hr	48 hr
0(Control)	100±3	100±3
0.1mg	120.52±5	139.56±5
0.5mg	127.09±8	225.27±9*
1mg	155.66±9	214.01±8*
2mg	126.27±6	198.35±6*

The cells were treated with various concentrations of the extract up to SPT 2mg/ml for 48hr. The cell viability was measured by MTT assays described in Materials and Methods. Each value stands for mean±SE. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*p<0.05(n=3)

**Table 2.** Nitrite Formation by Seongpung-tang(SPT) only in Microglial Cell

SPT(mg/ml)	Nitrite Production(μM)	
	24 hr	48 hr
0(Control)	2.71±0.3	2.75±0.2
0.1	4.89±0.3	11.73±0.3*
0.5	4.13±0.5	10.61±0.1*
1	2.60±0.1	8.36±0.3*
2	2.28±0.2	3.69±0.2

The cells were treated with various concentrations of water extract of SPT only. The values stand for the mean±SE of three independent experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*p<0.05

**Table 3.** Effect of the Water Extract of Seongpung-tang(SPT) on Suppression of Nitrite Formation by LPS Combined PMA in Microglial Cell

Group	Nitrite Production( $\mu$ M)	
	24hr	48hr
Control	2.71 $\pm$ 0.1	2.75 $\pm$ 0.2
LPS	7.60 $\pm$ 0.6	14.1 $\pm$ 0.5*
LPS+PMA	9.78 $\pm$ 0.5	16.41 $\pm$ 0.7*
LPS+SPT	4.34 $\pm$ 0.2	9.56 $\pm$ 0.5*
LPS+PMA+SPT	2.28 $\pm$ 0.1	6.63 $\pm$ 0.6*

The cells were treated with water extract of SPT(0.5mg/ml) and LPS combined PMA. Concentrations of different stimuli were ; LPS, 1 $\mu$ g/ml ; PMA, 100nM ; SPT, 0.5mg/ml. Results were expressed the mean and standard deviation (SD) of three independent experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*p<0.05(n=3)

Control : no treated group

LPS : LPS alone treated group

LPS+PMA : LPS combined PMA treated group

LPS+SPT : LPS and SPT treated group

LPS+PMA+SPT : LPS combined PMA and SPT treated group

**Table 4.** Effect of the Water Extract of Seongpungtang(SPT) on the Viability of Microglial Cell Damaged by LPS Combined PMA

Group	Viability(% of control)	
	24hr	48hr
Control	100 $\pm$ 3	100 $\pm$ 4
LPS	115.3 $\pm$ 4	120.05 $\pm$ 9
LPS+PMA	79.31 $\pm$ 4	87.36 $\pm$ 5
LPS+SPT	118.22 $\pm$ 8	183.51 $\pm$ 11*
LPS+PMA+SPT	133.16 $\pm$ 9	190.93 $\pm$ 11*

The cells were treated with LPS combined PMA, with LPS combined PMA and SPT for 48hr. Then, The cell viability was measured by MTT assay. Concentrations of different stimuli were; LPS, 1 $\mu$ g/ml; PMA, 100nM; SPT, 0.5mg/ml. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*p<0.05(n=3)

Control : no treated group

LPS : LPS alone treated group

LPS+PMA : LPS combined PMA treated group

LPS+SPT : LPS and SPT treated group

LPS+PMA+SPT : LPS combined PMA and SPT treated group

히 증가하여(Table 4), LPS와 PMA에 의한 細胞毒性을 省風湯이 막아주었다. 이상의 결과 LPS와 PMA에 의한 細胞毒性은 NO에 의한 것으로 省風湯이 NO의 生成을 줄임으로써 細胞毒性을 막아주는 것으로 생각된다.

5. NF-kB inhibitor 處理에 의한 NO 生成效果 確認

LPS 單獨 또는 LPS와 PMA에 의해 刺戟된 미세아교 세포에서는 nuclear factor kappa B(NF-kB)가 活性化 되고 NF-kB에 의하여 iNOS 발현이 유도되며, iNOS에 의해 NO가 生成된다. 본 實驗에서 LPS와 PMA의 細胞毒性이 NO의 生成에 의한 것인지를 確認하기 위하여 NF-kB inhibitor인 PDTC를 處理하여 NO의 生成을 確認하였다. LPS와 PMA 處理群에서 16.41 $\pm$ 1.5 $\mu$ M의 NO가 生成되었고, LPS와 PMA에 省風湯을 處理한 경우 6.63 $\pm$ 0.6 $\mu$ M로 NO의 生成이 減少되었는데, 각 實驗群에 NF-kB inhibitor인 PDTC를 處理한 結果, LPS와 PMA 處理群과 LPS와 PMA에 省風湯을 處理한 모든 群에서 對照群과 같이 NO 生成이 완전히 抑制되었다(Table 5).

6. 미세아교세포의 形態學的 觀察

細胞의 形態的 觀察에서도 對照群에 比하여 LPS와 PMA 處理群은 미세아교세포의 特徵인 세포돌기들이 萎縮되고 退化되었다(Fig.1, A와 B).

그러나 LPS와 PMA군에 省風湯 0.5mg/ml을 處理한 경우 對照群과 같이 細胞의 돌기들이 잘 形成이 되었으며 細胞 退化現狀도 줄어들었다(Fig.1, C).

考 察

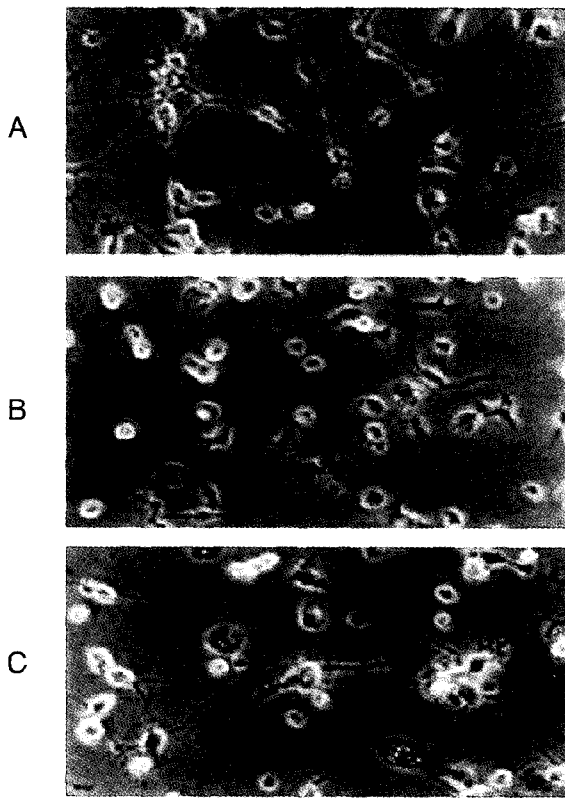
中風은 精神的 stress, 肉體的 過勞, 過度한 性生活, 飲食失節 및 體質的 素因 등이 發病的 要因이 되어 元氣의 虧損, 精血의 衰耗 등으로 表現되고, 人體의 陰陽平衡과 臟腑氣血의 調和가 깨지게 되어 身體內에서 風·火·氣虛·濕痰 및 瘀血 등으로 進行되고 이들 原因들이 長期的으로 相互作用하여 氣血上逆 病期를 거쳐 發病된다<sup>25,26</sup>.

中風卒中期는 症狀發顯의 初期狀態을 말하는데, 意識障礙·半身不遂를 主症으로 하는 中臟腑證에는 清熱·熄

**Table 5.** Effect of the Water Extract of Seongpung-tang(SPT) on the Inhibition of Nitrite Production by NF-kB Inhibitor(PDTC) in Microglial Cell

Group	Nitrite Production( $\mu$ M)	
	PDTC(-)	PDTC(+)
Control	2.71 $\pm$ 0.5	2.608 $\pm$ 0.8
LPS	14.13 $\pm$ 1.1*	2.5 $\pm$ 0.6
LPS+PMA	16.41 $\pm$ 1.5*	2.608 $\pm$ 0.5
LPS+SPT	9.56 $\pm$ 0.9*	2.608 $\pm$ 0.8
LPS+PMA+SPT	6.63 $\pm$ 0.6*	2.391 $\pm$ 0.5

Microglial cells were preincubated in 100 $\mu$ M PDTC for 30 min. Concentrations of different stimuli were; LPS, 1 $\mu$ g/ml; PMA, 100nM; SPT, 0.5mg/ml. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*p<0.05(n=3)  
 PMA, 100nM; SPT, 0.5mg/ml.  
 Control : no treated group  
 LPS : LPS alone treated group  
 LPS+PMA : LPS combined PMA treated group  
 LPS+SPT : LPS and SPT treated group  
 LPS+PMA+SPT : LPS combined PMA and SPT treated group



**Fig. 1.** Effect of the water extract of Seongpungtang(SPT) on the morphological changes of microglial cells damaged by LPS and PMA. The cells were cultured without(A), with LPS combined PMA (B) and with LPS combined PMA and SPT(C) for 48hr. The morphological changes were observed in light microscope (200 X)

省風湯은 散風·豁痰·降火의 效能이 있어 口噤不語, 口眼渦斜, 筋脈攣急, 風盛痰實, 旋暈僵仆, 頭目眩重, 胸膈煩滿, 左癱右瘓, 手足麻木, 骨節煩疼, 步履艱辛, 神志昏憤 등의 卒中期的 中臟腑證 治療에 活用되고 있는 處方이다<sup>4)</sup>.

腦卒中은 腦에 血液을 보내는 血管의 異常으로 發生하는 疾患으로 血液을 통한 持續的인 산소 및 포도당 供給이 필요한 局所 腦組織에 代謝異常을 일으켜, 그에 따른 局所 腦組織의 機能障礙가 臨床症狀으로 나타나는 疾患이다<sup>29)</sup>.

急性 腦卒中 治療에 있어서 虛血性 腦卒中이 發生한 경우 急性期에 그 梗塞部位를 減少 시키는 形態의 治療가 있는데, 이러한 治療法에는 虛血 部位에 血液供給을 원활히 하는 方法과 虛血現象으로 發生되는 生化學的인 變化를 調節하는 方法으로 크게 나누어볼 수 있다. 여기에는 抗凝固劑, 抗血小板製材, 血栓溶解劑, 血液粘度 降下 및 기타 虛血進行의 遮斷製材 등이 있는데 최근 虛血性 生化學的 瀑布現象(ischemic biochemical cascade)의 機轉이 많이 밝혀짐에 따라 이를 中間에서 차단하려는 여러 가지 시도, 즉 Ca++길항제의 사용, 활동성 산소 라디칼 제거제, 神經傳達物質 調節에 관한 藥物 등이 시도되고 있다<sup>29-31)</sup>.

腦虛血에 따른 腦組織의 病態生理는 腦細胞가 細胞活動을 하기 위해서는 多量의 에너지가 필요하고 이것은 血液을 통해 腦로 포도당과 산소가 持續的으로 供給됨으로 可能하다. ATP는 주된 에너지원으로 포도당代謝에 의해 供給되는데 산소가 충분한 상황에서 포도당이 分解되어 ATP를 生産하게 된다. 正常狀態下에서 腦細胞의 活動程度와 代謝率은 매우 밀접하게 맞물려 있는데 腦虛血時에는 이러한 相互作用의 平衡이 깨지게 된다. 즉 어떤 原因에 의하여 腦血流가 차단 또는 臨界限界值 以下の 減少가 發生된다면 해당되는 部位의 腦細胞에 산소와 포도당 供

風·滌痰 爲主의 治法이 使用되고, 口眼渦斜, 手足麻木을 主症으로 하는 中經絡證에는 平肝·化痰·益氣·活血 爲主의 治法이 活用되고 있다<sup>6,27,28)</sup>.

給이 원활치 못함으로써 細胞내 ATP의 枯渴을 일으키고, 따라서 細胞의 에너지원의 消失로 인해 細胞膜 内外의 이온 환경의 不均衡을 招來하여 이에 따른 여러 神經傳導의 變調와 효소들의 活性變動과 산소 자유기 등의 增加에 따라 非可逆的 細胞損傷을 招來하는 過程이다. 즉, ATP의 消失은 우선  $Na^+ - K^+$ pump,  $Ca^{2+}$  ATPase 등을 抑制함으로써 細胞내  $Ca^{2+}$ 과  $Na^+$ 濃度を 增加시키고, 반면 細胞外  $K^+$ 濃度を 增加시켜 細胞의 탈분극을 일으키게 되고, 이 탈분극은 glutamated性 神經細胞에서 glutamate의 급격한 遊離를 일으키고 遊離된 glutamate에 의하여 N-methyl -D - aspartic acid(NMDA)에 선택적인 전압의존성 이온통로가 열리며 칼슘이 細胞내에 축적된다. 이 增加된 칼슘은 NOS를 過度하게 活性化시키고 NO의 유도를 급격하게 增加시키는 바 이 NO가 腦虛血時 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌는데, 過度하게 增加된 NO는 미토콘드리아의 機能障碍를 일으켜 이로 인한 에너지고갈을 야기하며, 지방과 단백질의 peroxidation 및 nitrosylation, DNA 損傷등 神經毒性을 야기시키고 退行性 神經疾患에 관련한다<sup>32-39)</sup>.

腦虛血시 虛血 초기에 흥분성 아미노산에 의해서 칼슘에 의존적인 nNOS와 eNOS가 수 시간내에 活性化되는데, 과발현된 nNOS에 의해 生成된 NO에 의해 腦細胞損傷을 초래한다<sup>40)</sup>. 虛血 12시간 후 부터 活性化되는 iNOS는 神經아교세포인 astrocyte나 microglial 細胞등에서 生成되며 iNOS 발현에 의해 生成되는 NO는 미토콘드리아의 機能不全이나 에너지고갈을 야기시켜 腦細胞損傷을 주로 매개한다<sup>32-36)</sup>. 그러므로 虛血 초기의 nNOS를 抑制하고 eNOS의 活性를 促進시키고 수 시간 이후부터 유도되는 iNOS의 발현을 抑制하여야 虛血에 의한 腦細胞損傷을 줄일 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 實驗에서는 虛血性 疾患에 오래전부터 사용되어온 省風湯이 虛血性 腦疾患에 어떠한 細胞毒性 防禦作用이 있는지를 糾明하기 위해서 시행되어졌다.

虛血性 腦疾患시에는 tumor necrosis factor-alpha(TNF- $\alpha$ )가 增加하며, TNF- $\alpha$ 는 다른 cytokine과 더불어 神經아교세포에서 NF-kB에 의한 iNOS의 발현에 깊이 관련하고 있다<sup>11)</sup>. 일차배양 astrocyte와 microglial 세포에서 LPS는 단독 또는 다른 cytokine이나 phorbol ester(PMA)와 더불어 TNF- $\alpha$  신호전달계를 활성화시킨다고 잘 알려져 있다<sup>11)</sup>. 따라서 본 實驗에서 腦虛血時 iNOS 발현증가에 의한 NO 生成을 유도하기 위하여 LPS와 PMA를 사용하였으며 省風湯 추출물은 LPS와 PMA에 의해서 유도되어진 NO 生成을 效果的으로 減少시켰다(Table. 2). 細胞生存率 조사 결과 LPS와 PMA에 의해서 유도되어지는 細胞毒性을 省風湯 추출물이 현저히 抑制하였는데(Table. 3), 이는

虛血기간이 15분 이상 지속되면 腦損傷 정도가 增加되고 iNOS 活性가 增加되며 NO synthase의 저해제인 L-Nw-nitro- L-arginine methyl ester(L-NAME) 投與에 의해 腦損傷 정도가 減少한다는 報告와 일치하였다<sup>15,19)</sup>.

NF-kB는 p50, p65, C-rel, B-rel 및 p52 등의 subunit로 이루어진 단백질로, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF등 염증반응에 관련된 유전자의 전사적 활성을 조절하며, iNOS 발현을 조절하는 중요한 역할을 하고 있다<sup>19,20,41)</sup>. NF-kB는 자극이 없을 때는 억제 단백질 I $\kappa$ B- $\alpha$ 나 I $\kappa$ B- $\beta$ 와 결합한 불활성 상태로 핵안으로 이동하지 못하지만, 적절한 신호가 전달되면 I $\kappa$ B- $\alpha$ 나 I $\kappa$ B- $\beta$ 의 특정 serine기가 떨어져 나가 활성화 되는데 NF-kB의 활성화에 의해서 iNOS 발현이 유도되고, 이 iNOS에 의해 NO가 生成된다. 본 實驗에서 LPS와 PMA로 活性化된 미세아교세포의 細胞毒性에 대한 省風湯의 防禦效果를 미세아교세포의 細胞生存率로 觀察한 결과 省風湯이 LPS와 PMA에 의한 細胞毒性을 막아주었다(Table 4). 또한 LPS와 PMA의 細胞毒性이 NO의 生成에 의한 것인지를 확인하기 위하여 NF-kB inhibitor인 PDTC를 처리하여 NO의 生成을 확인한 결과, LPS와 PMA 처리군과 LPS와 PMA에 省風湯을 처리한 모든 群에서 對照群과 같이 NO 生成이 완전히 抑制되어(Table 5), 省風湯은 iNOS를 抑制하여 NO 生成을 減少 시킴으로써 LPS와 PMA의 細胞毒性을 減少 시키는 것으로 생각된다.

細胞의 形態學的 관찰에서 LPS와 PMA 處理群은 미세아교세포의 特徵인 細胞突起들이 萎縮되고 退化되었으나, LPS와 PMA群에 省風湯을 처리한 경우에는 細胞의 突起들이 잘 형성되었으며 細胞 退化現象도 줄어들었다 (Fig. 1. C).

以上の 結果로 보아 省風湯은 iNOS 발현을 抑制하여 NO 生成을 줄임으로써 LPS와 PMA의 細胞毒性을 막으며, 나아가 虛血時 腦細胞損傷을 防禦하는 效果가 있으므로 腦卒中 急性期에 救急方으로 적극 應用할수 있을 것으로 사료된다.

## 結 論

中風 急性期에 使用하는 省風湯이 腦虛血시 發生하는 NO에 의한 細胞損傷에 미치는 影響을 알아보고자, 新生白鼠의 腦組織에서 미세아교세포를 분리 배양한 다음 LPS와 PMA로 NO의 유발을 촉진시키고, 增加된 NO 生成에 대한 省風湯의 防禦效果를 觀察하였던 바 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

1. 省風湯은 실험 최고농도인 2mg/ml 에서도 細胞의

生存率에 變化를 주지 않았다.

2. 省風湯은 LPS와 PMA에 의해서 增加되는 NO 生成을 抑制하였다.
3. 省風湯은 LPS와 PMA에 의해서 유도되어지는 細胞毒性을 유의성 있게 抑制하였다.
4. 省風湯은 LPS와 PMA에 의하여 發生되는 NO의 生成을 抑制하여 細胞毒性 防禦效果를 나타냈다.
5. 省風湯은 LPS와 PMA에 의한 미세아교세포의 形態學的 變化를 막아주었다.

以上的 結果를 綜合하여 볼 때, 省風湯은 虛血性 腦疾患시 미세아교세포의 iNOS 活性을 抑制함으로써 NO에 의한 神經細胞損傷을 막아주는 것으로 생각된다.

### 參考文獻

1. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北:旋風出版社. 1964:1097.
2. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:大星文化社. 1996:63.
3. 王肯堂. 六科準繩. 서울:翰成社. 1982:40-41.
4. 張介賓. 景岳全書. 北京:中國中醫藥出版社. 1996:795.
5. 金東雄 外. 意識障礙를 同伴한 卒中風 急性期 患者에서 牛黃清心元 投與에 關한 考察. 大韓韓醫學會誌. 1994; 15(1):204,207-208.
6. 全國韓醫科大學心系內科學教室. 心系內科學. 서울:書苑堂. 1999:420, 425-430.
7. Hawkins, R. Cerebral energy metabolism, in D.W. McCandless. ed., Cerebral Energy Metabolism and Metabolic Encephalopathy. New York:Plenum Press. 1985:3-17.
8. Lust, W.D., Yasumoto, Y., Wittingham, T.S., Djuricic, B., Mrsulja, B.B., Passonneau, J. Ischemic encephalopathy, in D.W. McCandless. ed., Cerebral Energy Metabolism and Metabolic Encephalopathy. New York:Plenum Press. 1985:79-112.
9. Garthwaite, J., Chales, S.L., Chess-Williams, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intercellular messenger in the brain. Nature. 1988:336,385-387.
10. Vincent, S.R. Nitric oxide a radical neurotransmitter in the central nervous system, Progr. Neurobiol. 1998;42: 129-160.
11. Sato, S., Tominaga, T., Ohnishi, S.T. EPR spintrapping study of nitric-oxide formation during bilateral carotid occlusion in the rat, Biochim. Biophys. Acta. 1993;1181: 195-197.
12. Tominaga, T., Sato, S., Ohnishi, S.T. Potentiation of nitric oxide formation following bilateral carotid occlusion and focal cerebral-ischemia in the rat. In vivo detection of nitric oxide radial by electron-paramagnetic-resonance spin trapping. Brain Res. 1993;614:342-346.
13. Sato, S., Tominaga, T., Ohnishi, S.T. Electron- paramagnetic-resonance study on nitric oxide production during brain focal ischemia and reperfusion in the rat. Brain Res. 1994;647:91-96.
14. Kuppusamy, P., Ohnishi, S.T., Numagami, Y., Ohnishi, T., Zweier, J.L. 3-Dimension imaging of nitric-oxide production in the rat brain subjected to ischemia-hypoxia, J. Cereb. Blood Flow Metab. 1995;15:899-903.
15. Olesen, S.P., Moller, A., Mordvintcev, P.I., Busse, R., Mulsch, A. Regional measurements of NO formed in vivo during brain ischemia, Acta Neurol. Scand. 1997;95:219-224.
16. Shibata, M., Araki, N., Shinmazu, K., Fukuuchi, Y. Brain nitrite production during global ischemia and reperfusion. An in vivo microdialysis study. Brain Res. 1996;734:86-90.
17. Kader, A., Frazzini, V.I., Solomon, R.A., Triffiletti, R.R. nitric-oxide production during focal cerebral-ischemia in rat. Stroke. 1993;24:1709-1716.
18. Endoh, M., Maiese, K., Pulsinelli, W.A., Wager, J.A. Reactive astrocytes express NADPH diaphorase in vivo after transient ischemia. Neurosci. Lett. 1993;154:125-128.
19. McElhaney, M.R., Chandler, L.J., Streit, W.J. Astrocytes but not microglia express NADPH diaphorase activity after motor- neuron injury in the rat, Neurosci. Lett. 1994;180:67-70.
20. Endoh, M., Maiese, K., Wanger, J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. Brain Res. 1994;651:92-100.
21. Yoshida, T., Limmroth, V., Irikura, K., Moskowitz, M.A. The NOS inhibitor, 7-nitroindazole, decrease focal infarct volume but not the response to topical acetylcholine in pial vessels, J. Cereb. Blood Flow Metab. 1994;14:924-929.
22. Wagner, B.P., Stinglele, R., Williams, M.A., Wilson, D.A., Traystman, R.J., Hanley, D.F. NO contributes to neuro-hypophysial but not other regional cerebral fluorocarbon induced hyperemia in cats, Am. J. Physiol. 1997;42:H1994-H2000.
23. 金鍾寬. 太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質細胞에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院. 1999.
24. 玉潤榮. 太陰人 清心蓮子湯이 Hydrogen Peroxide에 損傷된 白鼠의 大腦神經細胞에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院. 1998.
25. 劉完素. 劉河間三六書. 서울:成輔社. 1976:37-44, 323-330.
26. 王清任. 醫林改錯. 臺灣:東方書店. 1960:49.
27. 金世吉. 風의 病理的 意味糾明과 中風의 原因 및 治療에 대한 東西醫學的 比較. 대한한의학회지. 1995;16(1):113.

28. 許沛虎. 中醫腦病學. 北京:中國醫藥科技出版社. 1998:352-354.
29. 서울대학교의과대학. 神經學原論. 서울대학교출판부. 1997:521,522,526-543.
30. 大韓神經外科學會. 神經外科學. 서울:중앙문화사. 1998:276-279, 285.
31. 金東燦. 白鼠 大腦 皮質, 해마와 선조체 절편에서 虛血의 神經 傳導 物質 유효효과. 원광대학교 대학원. 1993:27-28.
32. Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Brecht, D.S., Snyder, S.H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993:63-68,71,88.
33. Dawson, V.L., Dawson, T.M., Bartley, D.A., Uhl, G.R., Snyder, S.H. Mechanism of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures, J. Neurosci. 1993;13:2651-2661.
34. Dawson, V.L., Dawson, T.M. Nitric oxide neurotoxicity, J. Chem. Neuroanat. 1996;10:179-190.
35. Turski, L., Turski, L. Towards an understanding of the role of glutamate in neurodegenerative disorders, energy metabolism and neuropathology. Experientia. 1993;49:1064-1072.
36. Ikonomidou, C., Turski, L. Excitotoxicity and neurodegenerative diseases, Curr. Opin. Neurol. 1995;8:487-497.
37. Schulz, J.B., Matthews, R.T., Beal, M.F. Role of nitric oxide in neurodegenerative diseases, Curr. Opin. Neurol. 1995;8:480-486.
38. Bolaos, J.P., Almeida, A., Steward, V., Peuchen, S., Land, J.M., Clark, J.B., Heales, S.J.R. Nitric oxidemediated mitochondrial damage in the brain mechanisms and implications for neurodegenerative diseases, J. neurochem. 1997;68:2227-2240.
39. Almeida, A., Heales, S.J.R., Bolaos, J.P., Medina, J.M. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxidemediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion, Brain Res. 1998;790:209-216.
40. Brecht, D.S., Snyder, S.H. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990;87:682-685.
41. Iadecola, C., Zhang, F.Y., Casey, R., Clark, H.B., Ross, M.E. Inducible nitric oxide synthase gene-expression in vascular cells after transient focal cerebral-ischemia, Stroke. 1996;27:1373-1380.