

원 저

丹川丸이 사람신경세포의 산화적 손상에 미치는 영향

한상혁¹⁾, 김명선²⁾, 이지현^{1,2)}, 김도환¹⁾, 나영훈¹⁾, 조광호¹⁾, 박래길^{1,2)}, 문병순¹⁾

원광대학교 한의학 전문대학원¹⁾, 의과대학 미생물학교실²⁾

Effects of *Danchun-hwan* on Oxidative Damage of Human Neural Cell

Sang-Hyok Han¹⁾, Myung-Sunny Kim²⁾, Jienny Lee^{1,2)}, Do-Hwan Kim¹⁾, Young-Hoon Na¹⁾, Kwang-Ho Cho¹⁾, Rae-kil Park^{1,2)}, Byung-Soon Moon¹⁾

Professional Graduate School of Oriental Medicine¹⁾ and Department of Microbiology, School of Medicine²⁾, Wonkwang University

Objectives : The present study was carried out to investigate the effects of *Danchun-hwan*(*DCH*) on the peroxynitrite-induced neural cell death in human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y.

Methods : The cultured cells were pretreated with *DCH* and exposed to 3-morpholinosydnonimine(SIN-1) that simultaneously generates NO and superoxide, thus possibly forming peroxynitrite. The cell damage was assessed by using MTT assay and crystal violet staining.

Results : Exposure of the cells to SIN-1 for 24hr induced 75% apoptotic cell death, as evaluated by the occurrence of morphological nuclear changes characteristic of apoptosis using 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI). However, pretreatment of SH-SY5Y with the water extracts of *DCH*, inhibited the apoptotic cell death in a dose-dependent manner. *DCH* also inhibited SIN-1-induced apoptotic caspase 3-like protease activity in a dose-dependent manner. *DCH* recovered the depleted glutathione levels by SIN-1.

Conclusions : Taken together, it is suggested that *DCH* protected human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y, from the free radical injury mediated by peroxynitrite by a mechanism of elevating antioxidant, GSH. (*J Korean Oriental Med* 2000;21(4):183-192)

Key Words: *Danchun-hwan*, apoptosis, peroxynitrite, caspase 3-like protease

서 론

丹川丸은 丹蓼과 川芎으로 구성된 처방으로서 원

광대학교 부속 한방병원에서 뇌졸중, 치매 등 뇌세포 손상으로 인한 질환의 예방 및 치료제로 활용되고 있다.

丹蓼(*Radix Salviae miltiorrhizae*)은 꿀풀과(脣形科, *Labiatae*)의 다년생초본인 丹蓼의 根과 根莖으로 活血祛瘀, 生新, 寧心安神, 排膿, 止痛 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다¹⁻⁶⁾.

川芎(*Rhizoma Cnidii*)은 미나리과(繖形科, *Umbel-*

· 접수 : 2000년 11월 11일 · 채택 : 12월 11일
· 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한
의과대학 심계내과학교실
(Tel. 063-850-2102, Fax. 063-841-0033, E-mail.
moonbs58@hanmail.net)
· 본 논문은 BK21 한의학 전문대학원(2000)에서 지원하는 연
구비에 의하여 지원되었음.

liferae)에 속한 다년생초본인 川芎의 根莖으로 活血止痛, 行氣開鬱, 祛風止痛 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다⁴⁾.

뇌세포를 포함한 중추신경계세포들은 대사성 손상을 비롯한 여러 종류의 물리·화학적 손상에 아주 민감하다는 것이 잘 알려져 있다⁵⁾. 이러한 중추신경세포의 손상에 대한 민감성은 아미노산 글루타메이트에 의해 매개되는 흥분성 신경전달계의 발견을 통하여 점차 설명이 가능해지기 시작하였는데 이는 글루타메이트의 과다한 방출 또는 글루타메이트 수용체의 과다한 흥분에 의하여 비교적 짧은 시간에 신경세포의 비가역적 손상이 초래된다는 것이다. 이를 흥분독성(excitotoxicity)이라 한다. 흥분독성의 기전으로는 이온통로를 통한 칼슘의 세포내 유입이 중요하다고 알려져 있고⁶⁾, 산소 자유기(free radical)에 의한 산화성 손상도 관여하는 것으로 보고되어 있다^{9,10)}. 흥분독성 이외에 직접적인 "산화성 손상(free radical injury)"도 여러 경우에서 중추신경세포사의 중요한 기전의 하나로 논의되고 있다. 최근 유전적인 amyotrophic lateral sclerosis(ALS)의 일부에서 항산화대사와 관계된 superoxide dismutase (SOD)-1유전자의 이상이 발견됨으로 인하여^{11,12)} 여러 만성 신경퇴행성 질환에서 산화성 손상의 가능성이 대두되고 있고 노인성 치매의 원인으로 여겨지는 β -amyloid에 의한 신경세포사도 역시 산화성 손상이 그 주된 기전으로 주장되고 있다^{13,14)}.

이러한 여러 신경세포 손상기전들이 단독 또는 상호작용하여 신경세포사를 초래하여 신경계 질환들이 유발되리라 여겨지는데, 최근에는 이러한 기전 이외에 아포토시스(apoptosis)가 신경계질환의 신경세포사에 관련되어 있다는 증거들이 빠른 속도로 축적되고 있다¹⁵⁾. 특히, 아포토시스 현상이 허혈성 뇌졸중(brain ischemia), 간질(seizure), 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 등에서 일어나고 있다는 보고들이 증가하고 있다¹⁶⁻¹⁸⁾.

최근 한약재를 이용하여 신경세포의 산화적 손상에 미치는 영향에 관한 연구로는 金¹⁹⁾의 太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 손상된 대뇌피질 신경세

포에 미치는 영향, 玉²⁰⁾의 太陰人 清心蓮子湯이 Hydrogen Peroxide에 손상된 백서의 대뇌신경세포에 미치는 영향 등^{21,22)}의 많은 연구가 보고되고 있으나 丹川丸이 사람 신경세포의 산화적 손상에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 찾아볼 수 없었다.

따라서 본 저자는 丹川丸이 사람 신경세포인 SH-SY5Y 세포의 산화적 손상에 미치는 효과를 구명하고자 peroxynitrite에 의한 신경세포의 산화적 손상, 아포토시스 과정에서 나타나는 chromatin의 응축과 분절, caspase 활성화, 신경세포내의 항산화제인 GSH에 미치는 영향을 실험적으로 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

사람 신경세포인 SH-SY5Y 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하여 배양기 안에서 계대배양 하면서 실험을 실시하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 丹川丸은 원광대학교 부속한방병원에서 사용하고 있는 처방에 근거하였으며 약재는 원광대학교 부속 익산한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였다.

Prescription of Danchunhwan

韓藥名	生藥名	重量(g)
丹 蓼	<i>Radix Salviae miltiorrhizae</i>	10.00
川 芎	<i>Rhizoma Cnidii</i>	10.00
Total amount		20.00

2. 방법

1) 검액의 조제

丹川丸 5첩 분량인 100g을 3,000ml 환저 플라스크에 증류수 1,500ml와 함께 넣은 다음, 120분간 전탕하여 여과한 여액을 5,000rpm으로 30분간 원심분리하고 rotary vacuum evaporator에 넣어 감압 농축한 다음 동결건조기로 완전히 건조하여 시료 17.5g을

조제하였으며, DMSO로 녹여 냉장 보관하면서 사용 시에 RPMI에 희석하여 사용하였다.

2) 세포주 배양

세포주는 CO₂ 세포배양기(37°C, 5%CO₂)에서 10% fetal bovine serum(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)이 포함된 RPMI 1640(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배양액에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 RPMI 1640 배양액을 교체해 주며 log phase에 있는 세포에 丹川丸을 처리한 후 세포의 아포토시스 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 시행하였다.

3) 세포 생존율 측정

세포의 생존율은 MTT assay 방법을 이용하였다²³⁾. 세포 배양용기(24-well plate)에 세포를 1x10⁵씩 1ml의 배양액에 넣어 분주한 후, 실험에 필요한 각 조건의 丹川丸을 처리한 다음 1mM의 SIN-1을 처리한 후 배양, MTT를 최종농도가 100 μ g/ml이 되도록 넣어주었다. 생존율은 MTT 처리 후 4시간 후에 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 불용성의 formazan을 100 μ l의 10% SDS가 포함된 0.01N HCl 용액으로 24시간 동안 37°C 5% CO₂ 세포배양기에서 방치하여 녹인 다음, ELISA reader로 540nm의 파장 하에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 항산화제 실험의 경우 MTT와의 반응으로 결과가 차이를 보이므로 이 경우에는 crystal violet으로 생존율을 결정하였다. 실험이 끝나는 시간에 배양액을 버리고 30% ethanol, 3% formaldehyde에 녹여진 0.2% crystal violet 용액으로 고정과 염색을 5분간 실시한 후 건조하여 1% SDS 용액으로 세포에 염색된 crystal violet을 녹여낸 후 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 얻은 값은 평균을 내어 대조군에 비교한 %로 나타내었다.

4) Caspase 3-like protease 활성화 측정

신경세포(2 x 10⁶ cells)를 파쇄완충용액(1% TritonX-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol(DTT), 10 mM Tris/HCl, pH8.0)으로 4°C, 15분 파쇄하고 14,000 rpm으로 15분 원심분리시켰다. 상청액은 bicinchoninic acid(BCA)법으로 정량하여 분석용 완

충용액(100 mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH7.5, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2 mM DTT)에 희석한 형광기질 50 μ M DEVD-AMC와 37°C에서 30분간 반응시켜 이들의 proteolytic cleavage를 형광분광계(fluorometer; Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하여 caspase 3-like protease 활성을 조사하였다.

5) 세포의 관찰 및 DAPI 염색

약제와 SIN-1으로 자극한 세포는 3.7% formaldehyde 용액으로 고정시키고 phosphate buffered saline(PBS)로 세척, 10 μ M DAPI로 10분 동안 염색하고, 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(fluorescence microscope, Leica, Germany)하에서 100배의 배율로 촬영하였다.

6) GSH의 측정

세포내의 GSH양의 측정은 Tietze(1969)²⁴⁾의 방법에 따랐다. 먼저 사람 신경세포를 6mm dish에 24시간 동안 정치시키고 丹川丸을 전처리한 후 SIN-1을 가한 20시간 후 세포를 차가운 PBS로 세척하고 10% trichloroacetic acid(TCA)를 400 μ l 분주하여 10분 진탕하여 산에 의해 용출된 분획만을 모아서 21,000 x g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 모아진 상청액을 다시 중성의 pH로 맞추고 이중 50 μ l 용액에 0.1 M phosphate buffer, pH7.4, 5 mM EDTA에 녹여진 250 μ l의 5,5'-dithionitrobenzoic acid(0.96 mg/ml), 250 μ l의 NADPH(0.59 mg/ml)과 450 μ l의 glutathione reductase(5 U/ml)를 혼합하여 실온에서 20분 반응시키고 412 nm에서 분광광도계(Toyo Instruments, Inc., Japan)로 흡광도를 측정하여 처리하지 않은 세포의 양을 기준으로 %로 나타내었다.

7) 통계 처리

실험결과와 통계 처리는 student's t-test에 준하여 처리하였으며 P-value가 최대치 0.01(P<0.01)이 아닌 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

Table 1. The Neuroprotective Effects of *Danchun-hwan*(DCH) in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells from Peroxynitrite in a Dose-dependent Manner

SIN-1(1mM)	DCH(μ g/ml)	Viability(%)
-	0	100 \pm 2
+	0	25 \pm 6
+	50	46 \pm 4
+	100	58 \pm 2
+	200	91 \pm 3*

Cells(3×10^5 cells/well) were seeded in 24-well plate for 20 hr and pretreated with various concentrations of DCH(50, 100, 200 μ g/ml as indicated) for 30min and followed by stimulation with 1mM of SIN-1 for 24hr. The viability of cells was measured by MTT assay. Results represented as the mean \pm S. D. of three different experiments.

* P<0.01 by student' s t-test, compared to only SIN-1 treated group

Table 3. *Danchun-hwan* Recovered the Depletion of Intracellular GSH by SIN-1

SIN-1(1mM)	DCH(μ g/ml)	Viability(%)
-		100 \pm 1.7
+	0	63 \pm 3
+	100	72 \pm 4
+	200	83 \pm 3*

Cells (3×10^5 cells/well) were pretreated with DCH (0, 100, 200 μ g/ml as indicated) for 30 min and followed by SIN-1 for 20 hr. After then, cells were washed with PBS and incubated 400 μ l of ice-cold 10% trichloroacetic acid. From acid soluble fractions, the concentration of GSH was determined by the change in absorbance induced by the addition of NADPH (250 μ l, 0.59 mg/ml) and glutathione reductase (450 μ l, 5 U/ml) at 412 nm in spectrofluorometer. Results represented as means \pm S. D. (%) of three different experiments.

* P<0.01 by student' s t-test, compared to controlled group

실험 성적

1. 丹川丸이 peroxynitrite에 의한 산화적 손상에 미치는 영향

Peroxynitrite의 공여제인 SIN-1과 丹川丸을 SH-SY5Y 세포에 처리하여 생존율을 MTT assay 방법으로 측정하였다. 1mM의 SIN-1을 처리하고 24시간 후의 세포생존율은 25 \pm 6%이었다. 반면에 단천환을 SIN-1을 처리하기 30분 전에 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml로 전처리하였을 때 각각 46 \pm 4%, 58 \pm 2%, 91 \pm 3%의 생존율을 보였으며, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml의 경우에는 유의성을 나타내었다(P<0.01)(Table 1). 또한 丹川丸을 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml 전처리시

Table 2. The Neuroprotective Effects of *Danchun-hwan* in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells from Nitric Oxide in a Dose-dependent Manner

SIN-1(1mM)	DCH(μ g/ml)	Viability(%)
-	0	100 \pm 2
+	0	48.6 \pm 2.1
+	50	72 \pm 1.4
+	100	84 \pm 1.43
+	200	91 \pm 1.99*

Cells (3×10^5 cells/well) were seeded in 24-well plate for 20 hr and pretreated with various concentrations of DCH (50, 100, 200 μ g/ml as indicated) for 30min and followed by stimulation with 1 mM of SNP for 24 hr. The viability of cells was measured by MTT assay. Results represented as the mean \pm S. D. (%) of three different experiments.

* P<0.01 by student' s t-test, compared to only SNP treated group

Nitric Oxide의 공여제인 Sodiumnitroprusside(SNP)에 의한 48.6 \pm 2.1%의 세포생존율을 각각 72 \pm 1.4%, 84 \pm 1.4%, 91 \pm 2.0%로 회복시켰다(Table 2).

2. 丹川丸이 산화적 손상에 의한 chromatin의 응축과 분절에 미치는 영향

SH-SY5Y 세포의 핵을 DAPI로 염색하고 형광현미경을 통하여 100배로 확대하여 관찰하였다. 정상 세포의 핵은 타원형이고 일정한 크기로 염색되었으나(Fig. 1A), 1mM의 SIN-1로 18시간 동안 산화적 손상을 입은 세포는 핵의 chromatin이 응축현상과 분절현상을 나타내었다(Fig. 1B). 丹川丸을 200 μ g/ml의 농도로 전처리한 경우에는 핵의 형태가 원형이었고 형광염색된 chromatin이 정상세포와 동일한 강도를 유지하였으며 분절현상이 감소하였다(Fig. 1C).

3. 丹川丸이 caspase 활성화에 미치는 영향

Caspase계 cysteine proteases에 속한 caspase 3-like cysteine protease의 활성변화 정도를 조사하였다. 1mM의 SIN-1을 처리한 12시간 후의 caspase 3-like protease의 활성도는 대조군에 비하여 8 \pm 0.4배 증가하였으나(Fig. 2A). SIN-1으로 산화적 손상을 가하기 30분 전에 丹川丸을 100 μ g/ml, 200 μ g/ml로 전처리한 경우에는 각각 5.1 \pm 0.5, 2.5 \pm 0.6배로 활성도를 유의성있게 감소시켰다(P<0.01, P<0.005)(Fig. 2B).

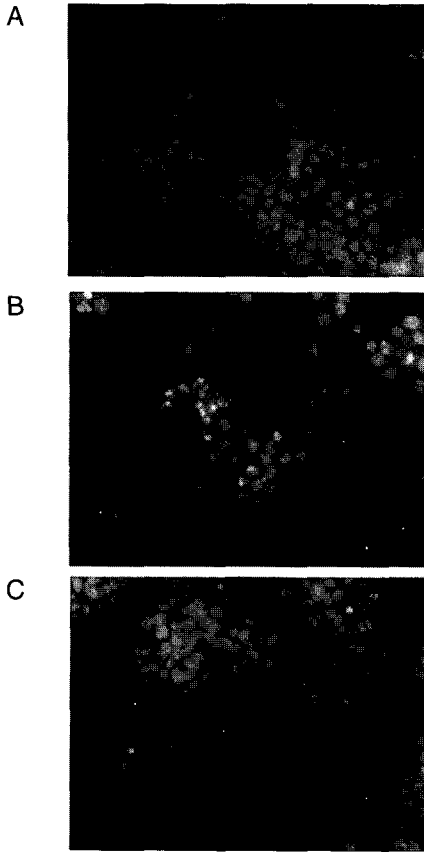


Fig. 1. Inhibitory effects of *Danchun-hwan* on apoptotic features by SIN-1. Control cells (A) were treated with 1 mM of SIN-1 for 20 hr (B) in the absence and presence of 200 μg/ml *Danchun-hwan* (C). Then, fixed with 4% formaldehyde, stained with DAPI to observe fluorescent microscope (100 X). Fragmented cells was indicated by arrows.

4. 丹川丸이 세포내의 항산화제인 GSH 양에 미치는 영향

세포내부에서 만들어지는 항산화제인 글루타치온의 양을 직접 측정시 1mM SIN-1은 대조군의 글루타치온 생성을 63% 수준으로 감소시켰다. 이때 丹川丸을 전처리하고 1mM의 SIN-1을 처리한 후 세포내부에 존재하는 GSH의 양을 측정시 丹川丸을 100, 200 μg/ml 전처리한 경우 SIN-1 처리군에 비하여 GSH의 양이 72 ± 4%, 83 ± 3%로 각각 증가하였으며, 200 μ

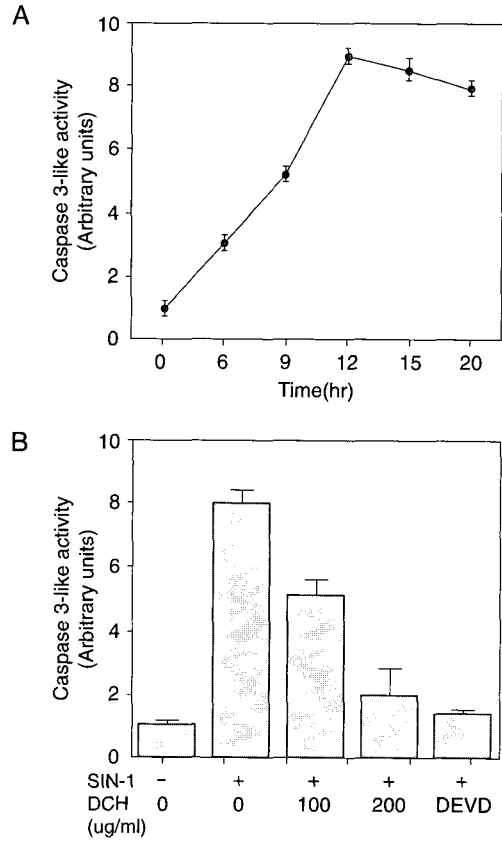


Fig. 2. *Danchun-hwan* reduced the enzymatic activation of caspase 3-like protease in SIN-1-induced apoptosis of SH-SY5Y in a dose dependent manner. Lysates from the cells used to measure the activity of caspase 3-like protease by using fluorogenic peptide DEVD-AMC (50 μM).

g/ml의 경우에는 유의성을 보였다(P<0.01)(Table 3).

이러한 결과는 신경계에서 발생하는 산소 및 질소 자유라디칼들이 세포내부의 항산화기능을 저하시켜서 신경세포 손상을 촉진시킬 수 있는 가능성과 丹川丸의 보호효과를 입증할 수 있음을 보여준다.

고 찰

한의학에서 뇌는 《靈樞·海論》²⁵⁾에 “腦爲髓之

海”라 하였고, 《素問·五臟生成論》²⁶⁾에서는 “諸髓者皆屬於腦”라 하였으며, 《素問·奇病論篇》에서는 “髓者以腦為主”라 하여髓液이 모여 이루어진髓海라 하였으며, 그 기능에 대해서는 《類經·失守失强者死篇》²⁷⁾에서 “五臟六腑之精氣皆上升于頭以成七竅之用故為精明之府”라 하여 정신, 의식, 사유, 총명 등의 정신활동을 주관하는 중추로 인식하였다^{28,29)}.

뇌의 발생에 있어서는 《靈樞·經脈篇》²⁵⁾에서 “人始生先成精精成而腦髓生”이라 하였고 《醫林改錯·腦髓論》³⁰⁾에서는 “小兒無記性者腦髓未滿高年無記性者腦髓漸空”이라 하여 뇌의 생리적인 기능이 뇌髓와 밀접하게 관련되어 있는 것으로 인식하였다²⁹⁾.

뇌의 병태생리로는 《靈樞·海論篇》²⁵⁾에 “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懈怠安臥...”라고 하여腦髓의 충족여부가 정신 및 신체활동의 성쇠와 관련되어 있음을 기술하고 있으며²⁹⁾,腦髓의 기능이 실조되거나 감퇴되면 두통, 현훈, 이명, 실면, 건망, 지능저하, 치매 등의 임상증상이 나타난다고 하였고²⁸⁾, 그 원인은 肝腎虛弱, 稟受不足, 心脾陽虛, 痰癆³¹⁾ 등이 제시되고 있다.

그러나 清代 王³⁰⁾이 瘀血에 의한 병인론을 주장한 이래로 活血化癥法에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며^{31,32)}, 본 원광대학교 한방병원에서도 活血化癥의 효능을 가진 丹川丸을 뇌졸중이나 치매 등의 뇌세포손상질환의 예방과 치료에 활용하여 좋은 성과를 거두고 있다.

丹川丸은 丹蔘과 川芎 구성되어 있는 처방으로 구성약물의 효과와 주치 및 약리작용에 관해 살펴보면 丹蔘(*Radix Salviae miltiorrhizae*)은 赤蔘, 山蔘, 木羊乳 등의 異名을 가지고 있는 꿀풀과(唇形科, *Labiatae*)의 다년생 초본식물의 根과 根莖으로 性味는 苦微寒無毒하고 心, 肝經에 작용하며 活血祛瘀, 生新, 寧心安神, 排膿, 止痛 등의 효능이 있고¹⁻⁶⁾ 약리작용으로는 심혈관혈류량증가, 혈청지질감소, 미세순환개선, 항혈전작용, 진정작용, 항균작용, 면역증강, 항암작용, 혈당강하 등이 있는 것으로 보고되어 있다^{4,5)}.

川芎(*Rhizoma Cnidii*)은 芎藭, 杜窮, 胡窮 등의 異名을 가지고 있는 미나리과(繖形科, *Umbelliferae*)의 다

년생초본인 川芎의 根莖으로 性味는 辛溫無毒하고 肝, 膽, 心包經에 작용하며 活血止痛, 行氣開鬱, 祛風止痛 등의 효능이 있고¹⁻⁴⁾, 약리작용으로는 중추신경계의 진정작용, 관상동맥혈류증강작용, 혈압강하작용, 혈소판 응집억제, 말초혈관확장작용, 항균작용 등이 있는 것으로 보고되어 있다⁴⁾.

이와 같이 丹川丸은 丹蔘의 活血祛瘀하는 효능과 川芎의 活血祛風하는 효능이 합용되어 活血化癥祛風의 작용을 가지고 있으므로 뇌세포손상질환의 예방 및 치료제로서 광범위하게 사용되고 있다.

많은 신경계 질환의 증상 발현에는 중추신경세포의 사멸이 그 궁극적 원인이다. 예를 들어 뇌졸중의 경우 주요 증상인 운동, 감각, 인지기능의 소실 등은 신경세포의 사멸이 원인이며 노인성 치매의 경우에도 기억, 인지 등에 관여하는 뇌의 대뇌피질, 해마 등의 부위에서 신경세포들이 소실됨으로써 기억상실 증상들이 나타난다. 파킨슨씨병의 경우에는 운동기능 장애가 중뇌 흑질(substantia nigra)의 도파민성 신경세포들이 선택적으로 퇴행, 사멸함으로써 운동기능 조절에 관여하는 기저핵의 기능이상이 초래되어 유발된다고 알려져 있다. 이러한 중추신경세포들은 현재까지는 한번 사멸이 되면 다시 재생이 불가능하므로 신경세포사의 분자생물학적 기전을 이해하고 예방 및 치료방법을 모색하는 것이 매우 중요한 의학적 과제이다^{7,33)}.

이에 저자는 丹川丸의 신경세포 보호효과를 실험적으로 구명하기 위해서 사람 신경세포종인 SH-SY5Y를 대상으로 산화적 손상의 기전과 관련시켜서 丹川丸이 peroxynitrite에 의한 산화적 손상, 산화적 손상시 chromatin의 응축과 분절, caspase 활성화, 세포내 항산화제인 GSH의 생성에 미치는 영향을 연구하고자 본 실험을 시행하였다.

뇌에서 발생하는 활성산소는 뇌세포에 아주 강한 독성을 보이게 되는데, 이 중 Nitric Oxide와 O₂⁻가 일시적으로 반응하여 생성되는 peroxynitrite가 강한 독성을 보인다. 본 실험에서도 사람 신경세포종인 SH-SY5Y에 peroxynitrite를 발생시키는 화학물질인 SIN-1을 처리시 세포의 죽음을 초래하였으며 여기에

丹川丸이 신경세포의 생존율에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 배양액에 첨가되는 우태아혈청(FBS)을 제거한 상태에서 농도를 변화시키면서 배양한 후 SIN-1을 처리하였다. 丹川丸으로 30분전에 전처리한 경우에는 peroxynitrite에 의한 세포독성을 丹川丸이 농도의존적으로 유효하게 방지할 수 있었다. 반면에 SIN-1과 丹川丸을 동시에 처리한 경우의 세포생존율과 SIN-1을 처리하고 30분 후에 丹川丸을 처리한 경우의 생존율은 유의한 변화가 나타나지 않았다.

따라서 丹川丸의 세포손상 방지효과는 전처리할 경우에 더욱 효과적이라는 점을 알 수 있었다.

Peroxynitrite의 공여제인 SIN-1에 의한 신경세포의 산화적 손상은 아포토시스를 통해 이루어진다.

아포토시스는 1980년대 후반기부터 중요 관심분야로 세포생물학 영역에 도입되면서 많은 분야에 혁명적인 변화를 가져 왔으며 특히 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능 발현 등에 매우 중요하다는 사실이 밝혀졌다³⁴.

아포토시스는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 세포의 계획된 죽음(programmed cell death)을 말하는 것으로³⁵ 괴사(necrosis)와는 다른 독특한 형태와 생화학적 특성을 동반하는 유전자 활성화에 의해 조절되는 생리과정으로 빠른 세포탈수현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상(blebbing), 세포질내의 칼슘(calcium) 농도의 증가, chromatin의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절(ladder pattern DNA fragmentation, 200 base pairs)형성, transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 아포토틱 소체(apoptotic body)의 형성을 동반한다³⁶.

이러한 일련의 과정을 실험을 통해 관찰하여 peroxynitrite에 의한 세포의 죽음 기전이 아포토시스성 또는 괴사(necrosis)성 과정에 의하여 이루어졌는지를 확인하고 여기에 미치는 丹川丸의 효과를 확인하기 위하여 형광염색물질인 DAPI 염색에 의한 핵의 염색을 실시하였다.

정상세포의 핵은 타원형이고 일정한 크기로 염색

되었으나 산화적 손상을 입은 세포는 핵의 응축현상과 분절현상을 나타내었다. 그러나 丹川丸을 200 μ g/ml의 농도로 전처리시 핵의 응축현상과 분절현상을 현저히 감소시킴을 형광현미경을 통하여 확인하였고, DNA의 ladder현상도 역시 방해하는 것으로 나타났다.

Caspase family는 염증반응이나 포유동물의 아포토시스 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 정상적으로는 세포내에 불활성화 효소형태로 존재하다가 아포토시스 유도 자극시에 활성화된다. 아포토시스의 특징적인 현상을 초래하는 세포내 신호전달기전에서 caspase의 중요성은 이미 잘 알려져 있다³⁷. 이러한 caspase는 cysteine protease로서 지금까지 14개가 알려져 있으며 이중 caspase-3(CPP32, yama)의 역할에 대해서 많은 연구가 진행되고 있다. Caspase 작용은 표적기질(substrate)에 따라 아미노산 배열 중 DEVD를 인식해서 절단하는 CPP32-like caspase(caspase-3)와 YVAD를 인식해서 절단하는 ICE-like caspase로 대별된다. 일단 caspase-3이 활성화가 되면 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP), lamin, MEKK 및 다른 caspases 등의 여러 표적 단백질에 작용해서 기능적 활성화나 불활성화를 유도하며 세포내의 여러 신호전달활성을 조절하여³⁸ 아포토시스에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 최근 보고에 의하면 death suppressor 단백질 중의 하나인 Bcl-2 단백질 역시 caspase-3에 의해 분열된다는 사실이 보고되고 있다³⁹.

본 연구에서 peroxynitrite에 의한 산화적 손상시 발생하는 신경세포의 아포토시스가 caspase의 활성화와 관계가 있는지 여부와 이에 대한 丹川丸의 효과를 확인하기 위하여 caspase 3-like protease의 활성화 정도를 조사하였다.

Peroxynitrite에 의한 신경세포의 아포토시스에서 caspase 3-like protease의 활성화도가 증가하였고 특히 caspase-3는 1mM의 SIN-1을 처리한 12시간 후에 활성화도가 8배 증가하였다. 이는 caspase-3가 아포토시스의 신호를 전달받아 직접적인 세포붕괴 작업을 수행하였기 때문에 그 활성화도가 현저하게 증가한 것이다.

반면에 丹川丸을 전처리한 경우에는 이러한 활성이 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 丹川丸이 아포토시스의 기전을 caspase 3보다 상위에서 신호를 전달하여 예방효과를 보이기 때문이라고 생각되며 丹川丸이 어떠한 기전으로 작용하는지는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

신경세포의 산화적 손상이나 뇌허혈시의 손상을 줄이기 위하여 뇌내부의 항산화제의 역할은 매우 중요하다.

본 실험에서는 신경세포에 가해진 산화적 손상과 정에서 항산화제의 역할을 알아보기 위하여 외부에서 reduced glutathione(GSH)과 N-acetylcysteine(NAC)을 가한 다음 SIN-1을 처리하여 세포생존율을 검사하였다.

신경세포에 항산화제인 GSH를 처리한 경우에는 직접적인 scavenging에 의하여 peroxynitrite의 독성을 방지하였으며, 다른 항산화제인 NAC를 처리하였을 경우에도 세포손상을 막아내는 것을 알 수 있었다.

또한 본 실험에서는 丹川丸의 뇌세포 보호작용이 세포내부의 항산화제의 생성을 증가시키는지의 여부를 확인하고자 丹川丸을 처리한 후 세포내부에서 만들어지는 대표적인 항산화제인 GSH의 양을 직접 측정하였다.

丹川丸을 처리한 경우에 GSH의 양이 모두 증가하였으며, 특히 200 μ g/ml로 처리한 경우에는 대조군에 비해 83%까지 증가하였다.

이러한 결과는 丹川丸의 신경세포 보호작용이 세포내부의 항산화기능을 증가시키는 신호를 전달하여 외부에서 가해지는 산화적 손상에 세포가 더욱 저항성을 가지게 함으로써 신경세포 사멸을 예방하는 것으로 사료된다.

이상의 실험결과를 종합해 보면 丹川丸은 peroxynitrite에 의한 산화적 손상을 특히 전처리한 경우에 농도의존적으로 유효하게 억제시켰고 핵의 chromatin의 응축현상과 분절현상을 감소시켰으며 caspase-3의 활성을 현저히 감소시켰고 peroxynitrite에 의한 GSH 감소현상을 억제하였다.

따라서 丹川丸은 뇌졸중이나 치매와 같은 뇌세포 손상질환의 예방 및 치료제로 활용될 수 있으며 그 작용기전에 대해서는 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

신경세포의 산화적 손상으로 일어나는 질환의 예방 및 치료제로 활용되는 丹川丸의 효능을 증명하기 위하여 사람 신경세포종인 SH-SY5Y를 대상으로 peroxynitrite에 의한 신경세포의 산화적 손상, 아포토시스 과정에서 나타나는 chromatin의 응축과 분절, caspase 활성화, 신경세포내의 항산화제인 GSH에 丹川丸이 미치는 영향을 실험적으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 丹川丸을 30분 전처리하고 SIN-1을 처리하였을 경우에는 세포생존율이 유의성있게 증가하였다.
2. 丹川丸은 SIN-1로 산화적 손상을 입은 세포의 chromatin의 응축현상과 분절현상을 감소시켰다.
3. 丹川丸은 caspase-3의 활성도를 유의성있게 감소시켰다.
4. 丹川丸은 SIN-1에 의한 세포내 GSH 감소현상을 유의성있게 억제하였다.

이상의 결과로 보아 丹川丸은 peroxynitrite에 의한 신경세포의 산화적 손상을 억제하였으며 caspase 3-like protease의 활성을 억제하고 GSH의 양을 증가시켜 아포토시스의 과정을 억제하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 吳 普. 神農本草經. 서울: 醫聖堂. 1994:24-25,29-30.
2. 辛民教. 臨床本草學. 서울: 永林社. 1997:519-521,530-532.
3. 中華人民共和國衛生部藥典委員會. 中華人民共和國藥典. 北京: 人民衛生出版社. 1985:26,58-59.

4. 新文豊出版公司 編. 新編中藥大辭典. 臺北: 新文豊出版公司. 1982:261-264,302-306.
5. 周 孜. 丹麥的藥理作用及臨床運用. 中西醫結合雜誌. 1990;10(4):242-243.
6. 李治平. 丹麥在腦血管病中的運用及藥理作用研究概況. 新中醫. 1994;6:62-63.
7. 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.
8. Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 1987;7:357-368.
9. Monyer H, Hartley DM, Choi DW. 21-Aminosteroids attenuate excitotoxic neuronal injury in cortical cell cultures. *Neuron.* 1990;5:121-126.
10. Dugan 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;15:6377-6388.
11. Brown RH Jr. Amyotrophic lateral sclerosis: recent insights from genetics and transgenic mice. *Cell.* 1995;80:687-692.
12. Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrisoh JH, Gordon JW. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1995;92:689-693.
13. Behl C, Davis JB, Klier FG, Schubert D. Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res.* 1994;645:253-264.
14. Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, Mullan M. beta-amyloid- mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature.* 1996;380:168-171.
15. Savitz SI, Rosenbaum DM. Apoptosis in neurological disease. *Neurosurgery.* 1998;42: 555-574.
16. Shigeno T, Yamasaki Y, Kato G, Kusaka K, Mima T, Takakura K, Graham DI, Eurukawa S. Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis. *Neurosci. Lett.* 1990;120:117-119.
17. Dichter MA. Mechanisms of Epileptogenesis. The Transition to Seizure. New York: NY. Plenum Press. 1988.
18. Goedert M, Sisodia SS, Price DL. Neurofibrillary tangles and beta-amyloid deposits in Alzheimer' disease. *Curr. Opin. in Neurobiol.* 1991;1:441-447.
19. 金鍾寬. 太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院. 1998.
20. 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.
21. 崔公瀚. 七福飲加味方이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院. 1999.
22. 金永洙. 酸素自由基에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 壯元丸의 影響. 圓光大學校 大學院. 1999.
23. Kim YM, Talanian RV and Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increase in caspase 3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1997;272: 31138.
24. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione, applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 1969;27:502-522.
25. 楊維傑. 內經靈樞譯解. 서울: 大成文化社. 1990:104, 281-282.
26. 楊維傑. 內經素問譯解. 서울: 大成文化社. 1990:356-361.
27. 張介賓. 類經(下). 서울: 大成文化社. 1990:411.
28. 金完熙 · 崔達永 共編. 臟腑辨證論治. 서울: 成輔社. 1985:286,298-304.
29. 成彊慶. 腦의 機能에 對한 臟象論의 考察. 大韓韓醫學會誌. 1995;16(1):468-474.
30. 王清任. 醫林改錯. 臺北: 臺聯國風出版社. 1975:22-25.
31. 김이화, 남상수, 이재동, 최도영, 안병철, 박동석, 이운호, 최용태. 癡呆治療의 最近 研究動向에 關한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1997;14(2):115-126.
32. 楊志良. 丹麥注射液治療神經系統病變82例. 上海中醫藥雜誌. 1987;(2):28.
33. Kurt J. Isselbacher. HARRISON' S 내과학. 서울: 정담. 1997:2377-2380,2409-2410,2451-2463.
34. Raff MC, Bares BA, Bume JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programed cell death and the control of cell survival. *Science.* 1993;262:695-700.
35. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol. Today.* 1993;14:126-130.

36. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis. distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.* 1982;17:229-259.
37. Klaus SO, Davide F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 1998;254: 439-459.
38. Xia Z, Dickens M, Raingaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effect of ERK and JNK-p38 Map kinase on apoptosis. *Science.* 1995;270:1326-1331.
39. Cheng EHY, Kirsh DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K and Hardwick JM . Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science.* 1997;278:1966-1968.