

저산소상태에서 육미지황원의 뇌신경세포 보호효과에 대한 연구

강봉주·홍성길*·조동욱

한국한의학회지 연구원 의료연구부, *BioLab 연구소

Abstract

Effects of Yukmijihwangwon on Hypoxia of Neuronal Cells

Kang Bong-Joo, Hong Seong-Gil*, Cho Dong-Wuk

Korea Institute of Oriental Medicine, * Institute of BioLab

Yukmijihwangwon (YM) has been known to reinforce the vital essence and have antioxidant activities. This study was designed to examine the inhibitory effects of YM against in vitro hypoxia/reperfusion-induced inflammatory response. We have characterized the production of prostaglandin E₂ and arachidonic acid during hypoxia/reperfusion in the human neuroblastoma SK-N-MC and human monocytic macrophage U937 cells and the inhibitory effect of YM on these inflammation-related substance formation has been found out in this study. To investigate inhibition of COX expression by YM during hypoxia in vitro. This result suggested that YM used in this experiment reinforced antiinflammatory potentials and protected cells against hypoxia/reperfusion induced inflammatory response.

Key words :Yukmijihwangwon, antiinflammation, COX-2, prostaglandin E₂

I. 서 론

뇌졸중은 그 발생 빈도가 높아질 뿐만 아니라 발병 연령층도 넓어져 가는 경향을 보이고 있으나 불행하게도 많은 환자들이 적시에 적절한 치료를 받지 못해 광범위한 불가역적 뇌경색의 후유증에 시달리고 있다. 뇌졸중에 의한 뇌허혈 상태에서는 excitatory amino

acids가 활성화되고 산소라디칼의 생산으로 직접적인 neurotoxicity의 가중과 혈류부전에 의한 뇌 산소 공급/소모 균형이 깨져 뇌 신경세포의 비가역적 파괴의 악순환에 빠지게 된다.

뇌혈관의 경색으로 인한 뇌허혈등으로 인한 저산소 상태에서 신경 세포의 손상은 1차적으로 산소 및 영양소 공급 결핍에 따른 부작용이 주원인을 이루며, 혈관

이 재개통되었을 때 산소의 공급으로 인한 활성 산소의 다량 발생과 무감염성 염증반응에 의한 신경 세포의 손상이 2차적으로 발생한다.¹⁾ 허혈/재관류 환경에서 발생하는 신경 세포의 손상 원인 중 하나로 지목되는 활성 산소는 고반응성의 산소 화합물로서 주변의 세포 구성 물질들로부터 전자를 빼앗아 자신을 안정화하려는 성질이 강하여 주변 물질을 산화시키게 된다. 이 과정에서 전자를 빼앗긴 주변 물질 또한 활성 산소의 변형물로서 되어 다시 주변 물질로부터 전자를 빼앗는 과정을 되풀이 하며 손상은 연쇄적으로 증폭 된다. 따라서 허혈/재관류 환경에서 이러한 활성 산소의 독성을 억제하는 항산화력은 허혈/재관류로 인한 세포 손상에서 매우 중요한 인자라 할 수 있다.²⁻³⁾

그리고 허혈/재관류 세포 손상에서 2차적 염증 반응은 뇌허혈에서 중요한 세포 손상 인자라 할 수 있다. 염증 반응은 외부 반응에 의해서 세포막의 변화가 일어나 세포내로의 칼슘 이온 유입이 증가되면서 나타나며 세포내로의 칼슘 이온의 유입으로 세포질내의 칼슘 이온 농도가 증가하면서 칼슘 의존성 phospholipase A2 (PLA2)가 활성화되어 세포막으로부터 다중 불포화 지방산인 arachidonic acid를 유리하는 것으로부터 개시된다. 이때 arachidonic acid의 유리는 일반적으로 PLA2의 활성화에 의존적인 것으로 알려져 있으며, 이 효소는 arachidonic acid에 특이적인 반응을 보이는 것으로 보고되었다. 유리된 arachidonic acid는 cyclooxygenase, lipoygenase 등의 활성으로 prostaglandin, leukotriene 및 thromboxane 등의 지질 유래 호르몬인 eicosanoid로 합성되어 면역 및 염증 반응에 참여하게 된다.⁴⁾

Cyclooxygenase는 두가지 형태로 생체내에 존재하고 있는데 첫 번째는 구성적 효소인 cyclooxygenase-1 (COX-1, PGHS-1)이며, 핵막에 연결된 G-protein 연결 수용체를 통하여 신호 전달을 하고 세포의 배출 기구인 endoplasmic reticulum에서 eicosanoid를 합성하는 것으로 보고되어 있으며, 이 효소에 의해서 합성된

prostanoid는 위장관 보호 작용, 신장 분화에 중대한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 두 번째는 유도형 효소인 cyclooxygenase-2 (COX-2, PGHS-2)이며, 일반적인 상황에서는 검출할 수 없을 정도의 미량만이 발견되어 있으나 외부적 환경 변화 등에 의해서 유도되어지는 형태이며, 염증 조직에 다량 발견되고 있어 염증 및 면역 반응 조절에 관여하고 있는 것으로 생각된다.⁵⁻⁶⁾

Prostanoids는 prostaglandin H synthase(PGHS, cyclooxygenase)에 의해서 arachidonic acid가 일반적 매개체인 PGH2로 합성되면서 형성된다. PGHS는 효소 활성을 가지고 있는 효소 복합체로서 두가지 상이한 생화학적 반응을 수행한다.⁷⁻¹⁰⁾ 허혈/재관류 환경에서 prostanoid의 증가는 면역 반응을 촉발시켜 염증과 유사한 형태를 띠기 때문에 무감염성 염증으로 구분되기도 한다. 염증 반응이 발생하게 되면 면역 세포들이 응집하고 이들로부터 다량의 활성 산소와 lysosomal enzyme들이 배출된다. 또한, 염증 삼출액들은 주변 pH를 4.0 부근의 산성으로 변화시키게 되어 산성 pH에서 최적의 활성을 가지게 되는 lysosomal protease 등의 활성을 강화시키고, ferritin으로부터 철 이온을 분리하여 활성 산소의 독성을 더욱 높이는 효과를 보이게 되며, 이런 작용이 주변 세포들을 손상시켜 조직 괴사를 유도하는 것으로 보고 되어 있다. 따라서, 허혈성 뇌질환의 발생시 빠른 뇌혈관의 개통과 더불어서 혈관 재개통후 발생할 수 있는 활성 산소 및 염증 반응에 의한 이차적 조직 손상을 경감시키는 것도 매우 중요한 문제라 할 수 있다.¹¹⁾

본 연구에서는 현재 중풍 발생 후 치료제로 사용되고 있거나 본 연구원에서 전년도에 활성 산소의 독성으로부터 허혈 상태의 세포를 보호하는 효과를 조사한 7가지의 한약탕제를 이용하여 이러한 염증 반응을 소거할 수 있는 능력을 검증하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. Cell line 및 배양

허혈성 실험에 사용된 cell line은 human neuroblastoma 인 SK-N-MC cell line(ATCC No. HTB-10)과 human monocytic macrophage U937 (ATCC No. CRL-1620)을 이용하였다. SK-N-MC cell line 및 U937 cell line의 계대배양은 10% fetal bovine serum(FBS)을 첨가한 RPMI media로 행하였다. 또한, 세포 독성을 알아보기 위해서 human fibroblast L929 cell line을 동일한 방법으로 배양했다.

2. 탕제의 준비 및 추출

탕제로는 육미지황원을 사용했다. 탕제의 구성은 Table 1과 같다. 이들의 추출물 제조는 400g의 약재를 증류수에 1일 상온 방치한 후, 약탕기에서 30분간 진탕한 후, 다시 2시간 동안 재탕했다. 그 후 채로 여과 후, 감압농축한 뒤 원심 분리하여 상층액을 수거했다. 이 상층액을 3MM filter paper로 여과한 후 동결 건조한 후 -20℃에서 보관하며 사용했다. 이 추출물의 항산화 활성 검색을 위해 각 분말을 phosphate buffered saline (PBS, pH7.4)에 10mg/ml의 농도로 용해하여 이용했다.

Table 1. Components of Yungmijhwangwon.

| Component | Weight(g) |
|---------------------------|-----------|
| Rehmanniae radix preparat | 15.0 |
| Dioscoreae rhizoma | 5.63 |
| Corni fructus | 5.63 |
| Alismatis rhizoma | 5.63 |
| Moutan Cortex | 5.63 |
| Poria | 5.63 |

3. 탕제의 세포 독성 측정

두 가지 cell line에 대한 세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 방법을 이용하여 측정했다.

세포 생육도의 조사는 배양 상정액을 제거하고 3차례 PBS로 washing 한 후, DME media로 희석된 MTT solution 200 μl를 첨가하고 3시간동안 추가 배양한 뒤, 상정액을 다시 제거하고 200 μl의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 succinate dehydrogenase의 활성으로 생성되는 불용성의 formazane crystal을 용해했다. 이 용해액을 540nm에서 흡광도를 측정하여 cell viability를 결정했다. 측정 결과는 무처리군에 대한 상대적 세포 생육도(relative cell viability, % control)로 표기했다.¹²⁾

4. Hypoxia/reperfusion 환경의 조성

RPMI media로부터 glucose가 제거된 glucose-free RPMI media를 Gibco BRL사로부터 구입하여 사용했다. 배양된 cell을 0.05% trypsin-EDTA로 부유시킨 후 96 well plate에 2×10⁵cell/well 농도로 loading한 후 200 μl의 배지를 넣어 24시간동안 추가 배양했다. 그 후 배지를 제거한 후 glucose-free media를 넣고 배양기내의 대기 조성을 95% N₂ / 5% CO₂로 조성하여 hypoxia/hypoglycemia 환경에서 일차 배양한 뒤, hypoxia 환경에서 배양된 세포를 다시 정상 배지와 정상 대기 조성(95% Air / 5% CO₂)하에서 추가적으로 배양을 실시하여 reperfusion 환경을 조성하여, hypoxia/reperfusion 환경을 의태했다.

5. Arachidonic acid 의 함량 측정

Arachidonic acid의 함량은 gas chromatography

(GC)를 이용하여 정량 분석했다. 배양된 세포를 원심 분리하여 수거한 뒤, phosphate buffered saline (PBS) 로 2회 세척한 뒤, 1ml 의 PBS에 현탁하고, 여기에 CH₃CH:MeOH (2:1, v/v) 용액을 넣고 24시간 냉장 방치한 후 filtration을 한 후 saline solution을 2-3ml을 가하고 3000rpm에서 원심 분리하여 하층액을 취했다. 이 하층액을 N₂ gas로 농축하여 총지질을 추출했다.¹³⁾

추출된 지질은 methylation reagent (BF₃:MeOH:n-hexane, 25:50:20, v/v/v)을 5ml을 넣고 N₂ gas로 충전한 다음 끓는 물에서 60분간 중탕시켜 methylation 반응을 진행했다. 그 후 n-hexane 0.5ml과 증류수 2ml을 첨가한 뒤, 3000rpm에서 원심분리하여 상층액인 hexane층을 취한 뒤 다시 N₂ gas로 농축한 뒤 0.5ml의 hexane에 용해하여 arachidonic acid 분석에 사용했다. Arachidonic acid 분석을 위한 GC 조건 설정은 아래와 같이 행했다.¹⁴⁾

Instrument : Shimazu GC-14B
 Column : BPX 5
 Column Temp. : 140 °C - 260 °C programed rated 4 °C /min
 Injector Temp. : 250 °C
 Detector Temp. : 250 °C
 Detector Type : Flame ionization detector (FID)
 Flow rate : 200 kPa
 Carrier Gas : N₂

6. Prostaglandin E₂ 함량의 측정

Prostaglandin E₂ 함량의 측정은 세포 배양액을 회수하여 Cayman (U.S.A)사의 Prostaglandin E₂ 측정용 monoclonal-EIA kit(CAT. No. 514010)를 이용하여 정량했다.

7. Total RNA의 분리

Total RNA의 분리는 Bioneer사의 RNA isolation kit를 이용하여 실시했다. 260nm에서 흡광도를 측정하여 분리된 RNA의 양을 측정하여 실험에 사용했다.

8. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

분리된 total RNA를 이용하여 RT-PCR 과정을 통해 cyclooxygenase의 발현양을 확인했으며, housekeeping gene으로는 glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH)을 이용했다.

RT-PCR에 사용되어진 각 primer는 Table 2와 같으며¹⁵⁾ RT-PCR은 Bioneer(주)사의 AccuPower RT-PCR kit을 이용하여 수행했다. 추출된 total RNA 1μg과 sense 및 antisense primer 각 20pmol을 각 반응 tube에 첨가한 뒤 반응 volume을 20μl로 조정하면 PCR thermal cycler (Perkin Elmer)를 이용하여 반응을 수행했다. RT반응은 42 °C에서 60분, 74 °C에서 40분간 반응했고, 곧 이어서 denaturing 94 °C, annealing 55 °C 60초 (COX-2 및 COX-1), 63 °C 60초(GAPDH), reaction 72 °C에서 25cycle을 수행했다.

9. 통계처리

각 실험 결과는 평균±표준 편차의 형태로 도시했으며, 통계적 유의성 검사는 student t-test를 통하여 행했다.

Table 2. Primer sequence of human GAPDH, COX-1 and COX-2 for RT-PCR reactions

| Primer | Sequence (5' → 3') | |
|--------|-----------------------------|-----------|
| GAPDH | CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA | sense |
| | TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC | antisense |
| COX-1 | GTGCATCAACAGGCGCCTCTTC | sense |
| | TGCCCAGCTCCTGGCCCCGCGCTT | antisense |
| COX-2 | TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT | sense |
| | AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTTT | antisense |

III. 연구결과

1. 당제의 세포 독성

실험에 사용되어진 YM 을 이용하여 독성 실험에 널리 이용되고 있는 L929 cell line 을 이용하여 세포 독성을 관찰했으며, 결과는 Figure 1 과 같다.

본 실험에서 사용된 육미지황원(YM) 모두 500 µg/ml 이하의 농도에서 특이한 세포 독성을 나타내지 않았으나, 1000 µg/ml에서 25% 정도의 세포가 사멸하여 세포 독성이 나타났다. (Figure 1)

U937 및 SK-N-MC cell line 모두에서 500 µg/ml미만의 농도에서는 큰 세포 독성이 나타나지 않았기에 hypoxia/reperfusion 환경에서 당제의 효능을 관찰하기 위한 당제의 농도는 세포 독성이 나타나지 않은 500 µg/ml 미만의 농도에서 실험을 행했다.

2. Arachidonic acid 함량의 측정

Hypoxia/reperfusion 환경에서 당제의 효능을 관찰하기 위해서 reperfusion 을 수행하기 전에 각 당제를

50 µg/ml, 250 µg/ml의 농도로 첨가한 후 arachidonic acid의 유리가 최대로 발생하는 hypoxia 8시간, reperfusion 16시간째에 각 cell line에서 arachidonic acid의 유리 정도를 살펴본 결과는 Figure 2에 나타내었다.

Human neuroblastoma인 SK-N-MC cell line에서 당제에 의한 arachidonic acid 유리 억제 효과를 관찰한 결과 육미지황원은 50 µg/ml 및 250 µg/ml 농도의 당제 첨가에서 가장 높은 arachidonic acid 유리 억제능을 보인 것으로 나타났다. Human monocytic macrophage cell line인 U973에서 arachidonic acid 유리에 대한 당제의 효능은 SK-N-MC에서와 유사한 경향을 보여주었으나 전체적으로는 SK-N-MC에 대한 당제의 효능보다 낮은 것으로 나타났다. 당제에 대해 농도 의존적인 arachidonic acid의 함량 감소는 나타났지만 250 µg/ml의 농도에서만 대조군에 비하여 유의적으로 낮은 arachidonic acid 함량 감소를 나타내었다.

3. Prostaglandin E₂의 측정

당제의 PGE₂ 분비 억제능을 측정하기 위하여 각 cell

line의 최고 PGE₂ 분비 시점을 잡아 실험했다. 즉, U937은 hypoxia 8시간, reperfusion 16시간째에 PGE₂ 농도를 측정했으며, SK-N-MC은 hypoxia 8시간, reperfusion 12시간째에 PGE₂ 농도를 측정하여 당제의 PGE₂ 분비 억제능을 관찰했으며, Figure 3에 결과를 나타내었다.

SK-N-MC에서 PGE₂ 함량 측정 결과 대조군에 대하여 유의적인 PGE₂ 농도 감소는 보여지지 않았으나, 농도 의존적인 PGE₂ 함량이 관찰되었다. 250 µg/ml 농도에서 대조군에 대한 유의적인 PGE₂ 활성 변화가 나타나 육미지황원이 arachidonic acid의 유리 및 PGE₂ 분비에 대해서 모두 유효한 약효를 보여주어, hypoxia/reperfusion 환경에서 나타나는 2차적 염증 반응에 의한 조직 괴사에 대해서 효과적 보호제로서 작용할 수 있을 것으로 판단되었다. U937 cell line에서 PGE₂의 함량 변화를 측정한 결과에서는 50 µg/ml과 250 µg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 유의적으로 PGE₂의 분비를 억제하고 있는 것으로 나타났다.

4. Cyclooxygenase-2의 발현양 측정

COX의 기질인 arachidonic acid와 산물인 PGE₂의 측정 결과에서 육미지황원이 높은 활성을 보였기에 육미지황원을 투여하여 hypoxia/reperfusion 환경에서 SK-N-MC과 U937의 COX-1 및 COX-2의 mRNA 변화를 RT-PCR을 통해서 관찰한 결과는 Figure 4와 같다.

SK-N-MC에서는 8시간 hypoxia, 16시간 reperfusion 환경에서 세포를 배양한 후 COX-2의 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 동일한 환경에서 육미지황원 250 µg/ml의 농도로 첨가한 후 COX-2의 발현정도에서 육미지황원의 경우 대조군에 대비하여 매우 낮은 COX-2 발현을 보여주어 육미지황원의 첨가는 arachidonic acid 및 PGE₂의 함량뿐 아니라 COX-2의 발현 자체를 억제할 수 있는 효과가 있을 것으로 추측되었으며, COX-2 발현 억제와 arachidonic acid의 감소가 PGE₂의 감소로 나타난 것으로 추측되었다. U937 cell line의 경우는 hypoxia/reperfusion에 의한 COX-2의 발현 증가가 SK-N-MC cell에서와 같이 나타나지는 않았으나 미약하나마 증가는 관찰되었다.

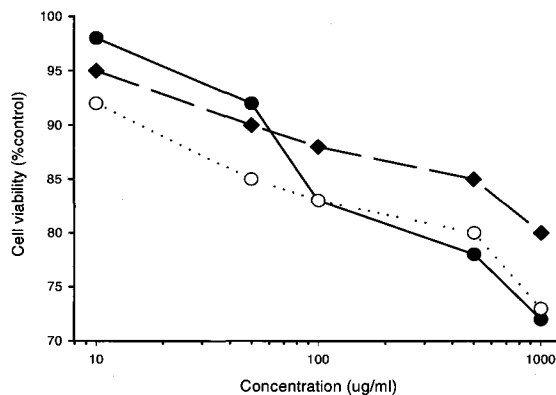


Figure 1. Cytotoxicity of YM on human fibroblast L929 cell line(◆) and human neuroblastoma SK-N-MC cell line (●) human monocytic macrophage U937 cell line (○).

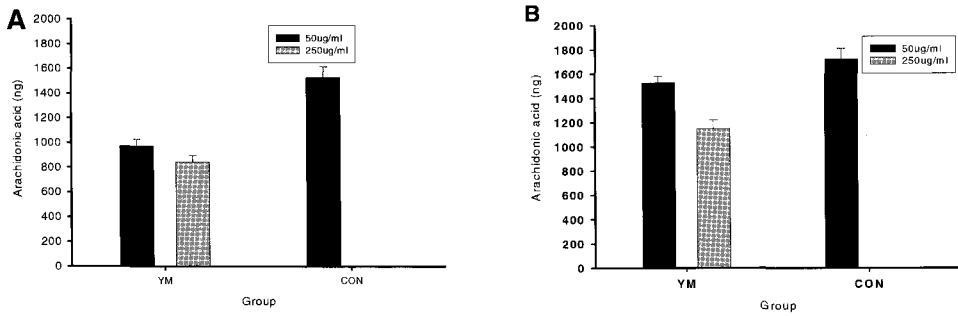


Figure 2. Inhibitory effects of traditional Korean prescriptions on arachidonic acid production under hypoxia/reperfusion conditions in human neuroblastoma SK-N-MC cell line (A) and human monocytic macrophage U937 cell line (B). Cells were treated for 8 hours under ischemic condition and 24 hours under reperfusion condition.

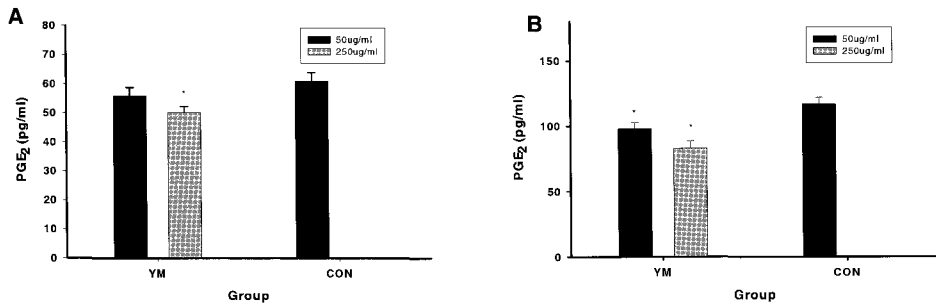


Figure 3. Inhibitory effects of traditional Korean prescriptions on prostaglandin E2 release in human neuroblastoma SK-N-MC cell line(A) and human monocytic macrophage U937 cell line under hypoxia/reperfusion conditions. Cells were treated for 8 hours under ischemic condition and 24 hours under reperfusion condition.

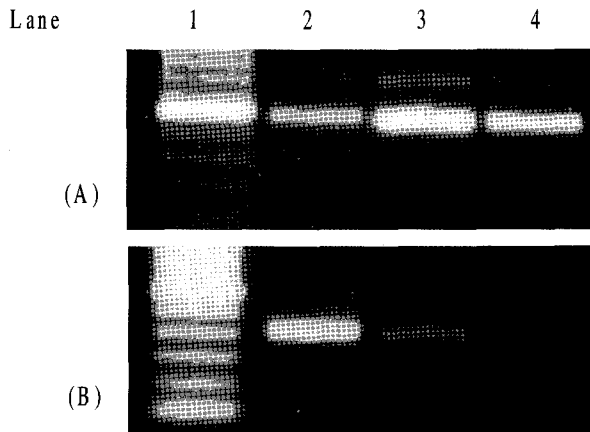


Figure 4. Amplified products of glyceroldehyde- 3-phosphate dehydrogenase(A) and cyclooxygenase-2(B) with RT-PCR from human neuroblastoma SK-N-MC cell lines. Lane 1: 1kb ladder marker, lane 2: hypoxia/reperfusion condition only, lane 3: hypoxia/reperfusion conditions plus YM, lane 4: not treated hypoxia/reperfusion conditions

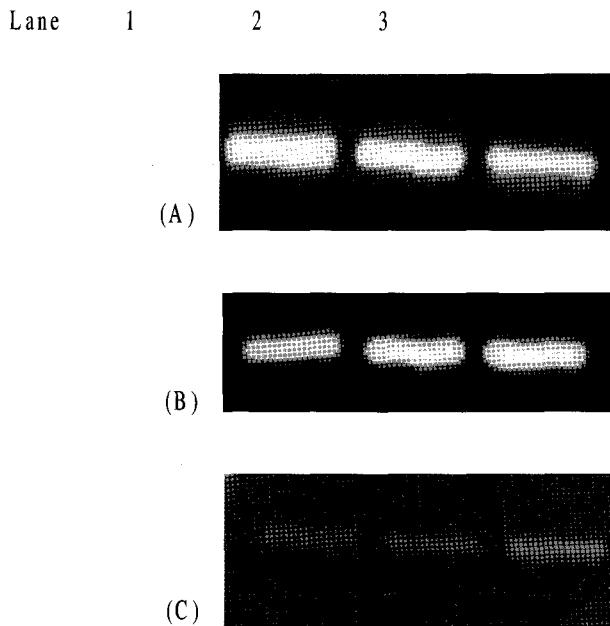


Figure 5. Amplified products of glyceroldehyde- 3-phosphate dehydrogenase (A) and cyclooxygenase-1 (B), cyclooxygenase-2 (C) with RT-PCR from human monocytic macrophage U937 cell lines. lane 1: not treated hypoxia/reperfusion conditions lane 2: hypoxia/reperfusion condition plus YM lane 3: hypoxia/reperfusion condition only

IV. 고찰

뇌허혈/재관류시에 신경 세포의 손상은 1차적으로 산소 및 영양소 공급 결핍에 따른 에너지 부족이 발생하며, 이에 따라서 다량의 활성 산소의 발생, 염증 관련 경로의 작용, apoptosis 유전자의 발현등이 또 다른 신경 세포 손상을 유도한다. 이중 활성 산소는 반응성이 매우 높은 산소화합물이기에 혈관 재관류시에 산소의 공급과 더불어 신경 세포 손상의 중요한 원인으로 받아들여지고 있으며, 이의 독성 억제를 위한 많은 방법이 응용되고 있다.

염증 반응은 세균등 외부 이물질의 침입시 이를 효과적으로 방어하기 위한 생체내 방어기작의 하나이다. 이러한 염증 반응은 aspirin과 같은 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs)가 효과적으로 작용을 하며, 이러한 비스테로이드성 항염증제의 기작 연구에서 염증 반응을 유발하는 key enzyme 으로서 cyclooxygenase 가 위치하고 있음이 밝혀졌다. Cyclooxygenase는 prostaglandin H synthase라고도 불리어지며 기질로서 세포막에서 분리된 C20:4 인 arachidonic acid를 사용하여 지질 유래 호르몬으로 분류되는 prostaglandin H (PGH)를 합성해내며, PGH는 이후 다양한 prostaglandin 변형체와 thromboxane으로 변형되어 다양한 생체 반응을 유도하게 된다. Cyclooxygenase는 활면 소포체에 우세적으로 위치하고 있는 것으로 알려진 구성형 형태의 cyclooxygenase-1 (COX-1, PGHS-1)과 염증 및 각종 생리적 반응에 의하여 발현이 유도되어지는 유도형의 cyclooxygenase-2 (COX-2, PGHS-2)로 나누어진다. 이 두 가지 효소는 서로 다른 유전자에 암호화 되어 있으며 단백질 구조 또한 다르지만 동일한 기질로 동일한 반응을 하여 동일한 산물을 생산하는 완벽하게 같은 작용을 하는 효소이지만 COX-1은 기본적 생리적 기능을, COX-2는 염증 반응과 같은 생리적 변화에 대처하는 기능을 지원한다고 추정되고 있다.

염증 반응의 개시에서 세포막의 phospholipase A₂가 세포막으로부터 arachidonic acid를 유리시키고, 이를 COX-1 또는 COX-2가 다시 생리적 활성을 가지는 prostanoid로의 합성으로 전환시키게 되며, 이러한 prostanoid 중에서 염증과 깊은 관련을 맺고 있는 것은 prostaglandin E₂로 추측되고 있다.

본 연구에서는 이러한 염증 관련 산물과 효소의 발현 정도를 확인하고 육미지황원을 이용하여 이들 염증 반응에 대한 효과를 관찰하기 위하여 인간 신경세포종인 SK-N-MC cell line과 대식세포인 U937 cell line을 이용하여 허혈/재관류 환경을 배양기내에서 의태하여 실험했다.

본 연구에서는 항산화효과가 높다고 알려진 육미지황원을 선별하여 이러한 염증 반응의 진행을 늦출 수 있는 가능성을 검증해 보았다. 그 결과 arachidonic acid의 유리가 최고점에 달하는 16시간 후에 육미지황원의 추출물을 cell line의 재관류 시점에 각기 50 µg/ml 과 250 µg/ml의 농도로 첨가했을 때 대조군에 비하여 유의적으로 arachidonic acid의 분비가 억제되고 있음이 SK-N-MC cell line에서 관찰되었다. U937에서도 250 µg/ml의 농도로 육미지황원을 첨가했을 때 역시 유의적인 arachidonic acid 유리 억제 결과가 나타났으며, 모두 50 µg/ml과 250 µg/ml의 농도에서 농도 의존적인 억제력을 보여주었다. 이와 연관된 PGE₂ 합량 측정 결과에서도 arachidonic acid 유리 억제 능력과 유사한 결과를 보여주었다. SK-N-MC cell line에서는 250 µg/ml의 농도에서 유의적인 억제 모습을 보여주었다. Arachidonic acid와 PGE₂의 증가가 염증 반응을 개시시킬 수 있으며, 이러한 염증 반응의 결과로 세포의 손상 및 조직의 괴사가 나타날 수 있다는 점을 생각할 때, 이상의 결과에서 육미지황원은 허혈/재관류 환경에서 염증 관련 물질인 arachidonic acid와 PGE₂의 분비를 억제하여 이차적으로 가해지는 염증성 세포 손상으로부터 세포를 보호할 수 있는 능력이 있다고 사료된다.

두 가지 cell line에서 arachidonic acid 및 PGE₂의 분비량이 최고점으로 올라가는 시점인 16시간 재관류 환경에서 COX-2의 발현양을 확인했다. COX-2는 정상적인 상황에서는 발현양이 극히 적어 검출해 낼 수 없는 것으로 알려져 있는데, 이 결과에서도 정상적인 상태의 SK-N-MC 과 U937에서 모두 COX-2의 발현양은 거의 검출되지 않았다. 그러나 hypoxia/reperfusion 환경이 종료된 시점에서의 COX-2의 발현양은 SK-N-MC에서는 COX-2의 발현양이 극도로 증가했으며 U937에서는 발현양이 hypoxia/reperfusion 환경을 처리하지 않은 군에 비하여 증가한 것으로 나타나 hypoxia/reperfusion 환경에서 COX-2 유전자의 발현양의 증가, 즉 arachidonic acid의 turnover가 증가하여 PGE₂로의 변화를 유도하여 염증 반응을 증폭시킬 것으로 생각되었다. 육미지황원을 첨가했을 때 SK-N-MC

cell line에서 COX-2의 발현양은 감소했다. 육미지황원의 경우 arachidonic acid의 합성 저해와 더불어 COX-2 유전자 발현도 동시에 억제하고 있어 이러한 염증 반응을 억제함에 있어서 매우 효과적인 약물로 사용 가능성이 높다고 추측되었다.

염증 반응은 과도한 면역 반응의 결과로 세포의 산화적 손상을 유도한다고 보고되고 있으며, 실제로 관절의 염증 반응의 결과로 발병되는 류마티스성 관절염 환자들에게 항산화제인 vitamin E와 항염증제인 NSAIDs의 공동 투여가 좋은 효과를 보인다고 보고 되어 있다. 즉, 허혈성 뇌질환에서도 산화적 손상과 더불어서 염증 반응이 발생하기 때문에 항산화 능력과 항염증 능력이 뛰어난 처방의 개발이 필요하다고 생각된다.

〈색인어〉 육미지황원, 항염증, COX-2, prostaglandin E₂

참고 문헌

1. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA 「Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view」. 『Trends Neurosci』 1999; Vol. 22 No. 9:391-397.
2. Albers GW, Goldberg MP, Choi DW. 「Related Articles N-methyl-D-aspartate antagonists: ready for clinical trial in brain ischemia?」 『Ann Neurol』, 1989; Vol. 25 No. 4:398-403.
3. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber, FE, Portera-Cailliau C. 「Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis」 『Brain Res Bull』 1998; Vol. 46:281-309, 1998.
4. Lefkowitz JB 「Cyclooxygenase-2 specificity and its clinical implications」 『Am J Med』 1999; Vol. 31;106(5B):43S-50S.
5. Varfolomeyev SD, Mevkh AT 「Prostaglandin H synthase as a limiting enzyme of prostaglandin synthesis: substrate-induced inactivation as a new kind of enzyme activity regulation」 『Biotechnol Appl Biochem』 1993; Vol. 17 (Pt 3):291-304.
6. Crofford LJ 「COX-1 and COX-2 tissue expression: Implication and predictions」 『J Rheumatol』 1997; Vol. 49 (suppl 49): 15-19.
7. Fletcher JR 「Eicosanoids. Critical agents in the physiological process and cellular injury」. 『Arch Surg』 1993; Vol. 128 No. 11:1192-1196.
8. 민현기 『臨床内分泌學』 고려의학 1990.
9. Samuelsson B. 「Leukotriene - Mediators of immediate hypersensitivity reaction and inflammation」 『Science』 1983; Vol. 220: 568-575.
10. Erik AP, Fouke WT, Wilma CS 「Prostaglandins-biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids」 『Churchill』 1998: 381-411.
11. Blackham A, Norris AA, Woods FA 「Models for evaluating the anti-inflammatory effects of inhibitors of arachidonic acid metabolism」 『J Pharm Pharmacol』 1985; Vol. 37 No. 11: 787-793.
12. Mossaman T. 「Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay」 『J Immuno Method』 1983; Vol. 65; 55-63.
13. Baugh, PJ 「Gas chromatography a practical approach」 『Oxford Univ. Press』 1993.
14. 박미현 「스트레스에 의한 체내 산화적 손상과 항산화비타민의 효과」 『한양대학교 식품공학과 박사학위 청구 논문』 1995.
15. Gary PO, Anthony WF 「Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissue」 『FEBS』 1993; Vol. 330 No. 2; 156-160.