

身痛逐瘀湯이 Hydrogen Peroxide에 의해 損傷된 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響

이계승, 나영훈, 차용석, 허 윤, 김도환, 한상혁, 박병민*, 이 인, 문병순
원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 원광대학교 한의과대학 폐계내과학교실*

Effects of Sintongchukeo-tang on the Cultured Spinal Sensory Neurons Injured by Hydrogen Peroxide

Lee, Kye Seung, Na, Young Hoon, Cha, Yong Suk, Heo, Yun, Kim, Do Hwan,
Han, Sang Hyok, Park, Byong Min*, Lee, In, Moon, Byung Soon

Dept. of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang Univ.
Dept. of Respiratory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang Univ.*

Objectives : This study was carried out to examine toxic effect of Sintongchukeo-tang on cultured mouse spinal sensory neurons inhibited by neurotoxicity induced by hydrogen peroxide.

Methods : MTT assay, NR assay, LDH and neurofilament assay were performed after spinal sensory neurons were preincubated with various concentrations of Sintongchukeo-tang water extract before treatment of cells with hydrogen peroxide.

Results : Hydrogen peroxide induced cell degeneration such as the decrease of cell viability was measured by MTT and NR assay in the cultured mouse spinal sensory neurons. Sintongchukeo-tang water extract was effective in the decrease of LDH activities of neurons produced by hydrogen peroxide. Sintongchukeo-tang water extract was effective in the increase of amount of neurofilaments damaged by hydrogen peroxide.

Conclusions : From the above results, it is suggested that hydrogen peroxide induces the inhibition of cell viability in cultured mouse spinal sensory neurons and Sintongchukeo-tang water extract was effective in cultured neurons damaged by hydrogen peroxide.

Key Word : Sintongchukeo-tang(shentongzhuyutang), Spinal Sensory Neurons, Hydrogen Peroxide, H₂O₂

1. 緒 論

신경조직에 손상이 발생하면 운동마비, 지각이상, 저린감 등을 포함한 신경학적 증상이 나타나는데, 신경조직이 손상되는 원인은 여러 가지가 있지만 병태생리학적으로 신경조직으로의 혈류량 감소에 따른 일련의 대사물질에 의해 산소자유기, 글루타민산 등의 독성물질이 생성되거나 침착되며 이들의 상호

작용에 의해 신경세포가 사망하게 되어 통증이나 마비와 같은 신경학적인 임상 증상을 나타내게 된다.¹⁻³

이는 한의학적으로 痺症의 범주에 속할 것으로 사료되며, '痺'는 막혀서 통하지 않는다는 뜻으로 風, 寒, 濕에 의한 外邪의 感觸이나 正氣의 損傷, 居處와 飲食 등에 의해 氣血의 運行이 순조롭지 못하여 筋肉, 肌肉, 關節 등에 疼痛, 麻木, 重着, 關節腫大灼熱, 屈伸不利 등의

증상을 일으키게 되는 질환이다.^{4,5}

身痛逐瘀湯은 清代 王⁶의 《醫林改錯》에 "凡肩痛, 臂痛, 腰痛, 腿痛, 或周身疼痛, 總名曰痺症.治痺症何難. 古方頗多 如古方治之无效 用身痛逐瘀湯"이라고 최초로 수록된 이래, 瘀血을 동반한 근육의 등통, 운동장애, 관절의 변형, 부종, 굴신시 통증이 발생하는 데 사용되어 왔으며, 근래에는 타박, 류머티스 관절염, 건관절주위염 및 좌골신경통 등에 응용되고 있다.⁷⁻¹³

身痛逐瘀湯에 대한 실험적 연구로는 金¹⁴의 血栓症에 미치는 影響, 卣의 高血

접수 : 2001년 9월 20일 채택 : 2001년 10월 16일

교신저자 : 문병순 (전북 익산시 신용동 원광대 부속 익산한방병원 2내과 원광대학교 한의대학 심계내과학교실, 전화 : 063-850-2102, 팩스 : 063-841-0033, E-mail : moonbs53@hanmail.net)

壓 및 高脂血症에 미치는 影響, 柳⁶의 抗炎, 鎮痛 및 抗血栓效果에 관한 研究, 孫¹⁷의 鎮痛, 消炎, 解熱 作用에 관한 研究, 李¹⁸의 壓迫으로 인한 外傷瘀血病態 模型에 미치는 影響에 대한 研究 등이 報告되었다.

이에 저자는 身痛逐瘀湯이 산소자유기에 의해 손상된 척수감각신경세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 순수 분리 배양한 척수감각신경세포에 여러 농도의 hydrogen peroxide(H₂O₂)를 처리하여 세포생존율을 분석하고, hydrogen peroxide에 의한 신경세포의 산화적 손상에 대한 身痛逐瘀湯의 방어 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 실험재료

1) 동물

본 실험에 사용한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강상태가 양호한 생쥐를 사용하였다.

2) 약제

본 실험에 사용한 身痛逐瘀湯의 처방은 王⁶의 《醫林改錯》에 의거하였으며,

약제는 圓光大學校 益山韓方病院에서 구입한 후 엄선하여 사용하였고, 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

2. 방법

1) 검액의 조제

身痛逐瘀湯 2첩 분량인 200g을 증류수와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 39.69g의 분말 시료를 얻었다.

2) 약제 제조

본 실험에 사용한 약제로는 hydrogen peroxide(H₂O₂, Sigma)로서 각각 100mM/ml, 10mM/ml, 1mM/ml의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3) 세포배양

척수감각신경세포의 분리는 Michikawa 등¹⁹의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생후 1-3일된 생쥐에서 적출한 척수신경절을 0.25% trypsin이 포함된

phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36℃, 5% CO₂/95% air로 조절된 항온기 내에서 배양하였다. 배양 완료 후 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-multiwell 에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양한 후 본 실험에 사용하였다.

4) 산소자유기 처리

산소자유기가 생쥐의 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 척수감각신경세포를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 5-40μM hydrogen peroxide가 포함된 배양액에서 2-12시간 동안 처리 후 분석하였다.

5) 세포독성 및 방어효과 검정

(1) 세포생존율 분석

① NR 정량

Neutral red(NR, Sigma)의 정량은 Borenfreud와 Puerner(1984)의 방법²⁰에 따랐다. 즉 여러 농도의 hydrogen peroxide를 처리한 배양 척수감각신경세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5mg/ml의 NR을 well당 최종농도로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37℃, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 PBS로 3회 세척 후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 측정하

Table 1. Prescription of Sintongchukeo-tang(STCET)

韓藥名	生藥名	重量(g)
秦 芩	Radix Gentianae Macrophyllae	4
川 芎	Rhizoma Chuanxiong	8
桃 仁	Semen Persicae	12
紅 花	Flos Carthami	12
甘 草	Radix Glycyrrhizae	8
羌 活	Rhizoma Seu Radix Notopterygii	4
沒 藥	Oil of Myrrha	8
當 歸	Radix Angelicae Gigantis	12
五 靈 脂	Faeces Trogopteroni	8
香 附 子	Rhizoma Cyperi	4
牛 膝	Radix Achyranthis Bidentatae	12
地 龍	Lumbricus	8
Total amount		100

여 대조군과 비교 조사하였다.

② MTT 정량

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma) 정량은 Mosmann²¹의 방법에 의하였다. 산소자유기나 항산화제를 처리한 배양 척수감각신경세포를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37℃, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 dimethylsulfoxide(DMSO, Merk)를 처리한 다음 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교 조사하였다.

③ LDH 정량

LDH활성의 측정은 변형된 Takahashi 등²²의 방법에 의하여 행하였다. 즉, LDH kit(Atron lab, Japan)의 효소 기질액 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 후 570nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

④ Neurofilament enzyme immuno assay(EIA)

배양중인 척수감각신경세포를 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 비교 조사하였다.

(6) 통계 처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA 후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

III. 實驗 成績

1. 산소자유기의 독성효과

1) 세포생존율 분석

(1) MTT 정량

산소자유기가 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 hydrogen peroxide 1μM에서 50μM까지의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 3시간 동안 배양한 후 hydrogen peroxide의 독성효과를 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 1μM hydrogen peroxide 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 83.7%로 나타났다. 그러나 15μM의 처리에서는 76.7%로 이보다 다소 낮게 나타났다. 또한 25와 50μM hydrogen peroxide

를 처리한 경우의 생존율은 각각 53.5(p<0.05)과 41.9%(p<0.01)로 대조군에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났다(Fig 1).

Hydrogen peroxide가 시간에 따라 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MCV(midpoint cytotoxicity value)값인 25μM hydrogen peroxide 농도의 배양액에서 척수감각신경세포를 각각 3~18시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 3시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 77.1%의 세포생존율을 보였다. 또한 6시간 배양에 있어서는 63.6%로 대조군에 비하여 다소 낮은 생존율을 나타냈으며, 9시간 배양에서는 대조군에 비하여 46.7%(P<0.05)의 생존율을, 18시간 배양에 있어서는 38.7%(p<0.01)의 생존율을 각각 나타냈다(Fig 2).

(2) NR 정량

배양 중인 척수감각신경세포를 Ca²⁺,

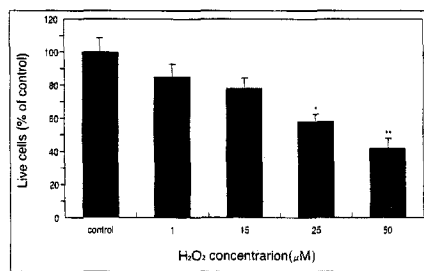


Fig. 1. Dose-dependency of hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 1, 15, 25 and 50μM hydrogen peroxide for 3 hours, respectively. The results indicate the mean ± SE(n=6). Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

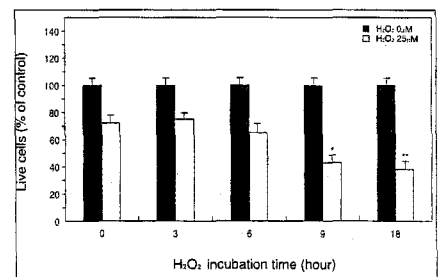


Fig. 2. Time-dependency of hydrogen peroxide in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 25μM hydrogen peroxide for 3, 6, 9 and 18 hours, respectively. Cell viability was measured by MTT assay. The results represent the mean ± SE(n=6). Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

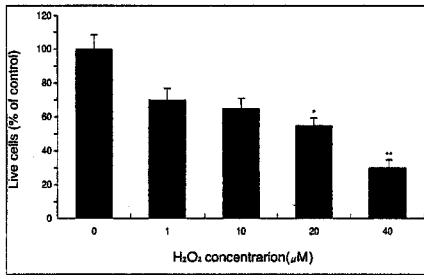


Fig. 3. Dose-response relationship of hydrogen peroxide in cultured mouse spinal sensory neurons. Cytotoxicity was measured by NR assay. Cultures were exposed to 1, 10, 20 and 40 μM hydrogen peroxide for 3 hours, respectively. The results indicate the mean ± SE (n=6). Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

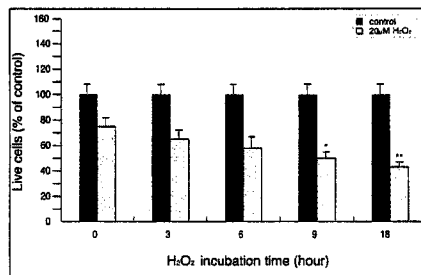


Fig. 4. Time-dependency of hydrogen peroxide in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 20 μM hydrogen peroxide for 3, 6, 9 and 12 hours, respectively. Cell viability was measured by NR assay. The results represent the mean ± SE (n=6). Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

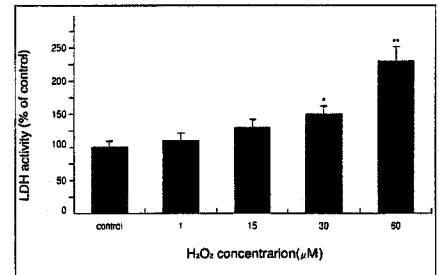


Fig. 5. Dose-dependency of hydrogen peroxide on LDH activity in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 1, 15, 30 and 60 μM hydrogen peroxide for 3 hours, respectively. Amount of LDH release was represented as % of control, and measured at wavelength of 570 nm. The results indicate the mean ± SE (n=6). Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

Mg²⁺ free인 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 hydrogen peroxide가 1 μM 에서 40 μM 의 농도로 각각 포함된 배양액에서 3시간 배양한 다음 이의 영향을 조사한 결과 1 μM 의 처리에서 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 68.1%로 나타났으며, 10 μM 의 처리에서는 61.7%로 나타났다. 또한 20 μM hydrogen peroxide에서는 48.9% (p<0.05)로, 40 μM hydrogen peroxide에서는 29.8% (p<0.01)로 나타났다 (Fig 3).

Hydrogen peroxide가 배양시간에 따라 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MCV값인 20 μM hydrogen peroxide 농도에서 3~18시간 동안 배양한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 조사한 결과 3시간 및 6시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 각각 66.6, 56.8%로 나타났으며 9시간과 18시간에는 각각 50.0(p<0.05), 41.5% (p<0.01)로 나타났다(Fig 4).

2. 身痛逐瘀湯의 효과

1) LDH 정량

(1) Hydrogen peroxide의 영향

Hydrogen peroxide 농도에 따른 LDH 활성도를 측정하기 위하여 hydrogen peroxide가 1-60 μM 까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 척수감각신경세포를 3시간 동안 처리한 후 세포 배양액내로 유출된 LDH양을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 1 μM, 15 μM hydrogen peroxide 처리에서는 대조군 100%에 비하여 각각 106.6%, 117.9%로 나타났다. 또한 30 μM, 60 μM hydrogen peroxide 처리에서는 각각 대조군에 비하여 150.3(p<0.05), 223.8%(p<0.01)로 나타났다. LDH 활성도의 MCV값은 30 μM hydrogen peroxide의 처리에서 나타났다(Fig 5).

(2) 身痛逐瘀湯의 효과

배양 척수감각신경세포에 대한 hydrogen peroxide의 산화적 손상에 있어서 身痛逐瘀湯의 효과를 LDH활성도 측면에서 조사하기 위하여 hydro-

gen peroxide의 MCV값인 30 μM hydrogen peroxide 농도에서 3시간 동안 노출시키기 3시간 전에 20-160 μg/ml 身痛逐瘀湯이 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 30 μM hydrogen peroxide만을 처리한 경우 대조군 15.8 ± 1.6에 비하여 38.6 ± 3.5로 나타났다. 그러나 20 μg/ml 身痛逐瘀湯 처리에서는 대조군 15.3 ± 1.4에 비하여 29.4 ± 2.7로 나타났다. 또한 40 μg/ml 身痛逐瘀湯 처리에 있어서는 대조군 15.1 ± 1.1에 비하여 26.4 ± 2.3로 나타났다. 또한 80 μg/ml 身痛逐瘀湯의 처리에서는 대조군 14.8 ± 1.8에 비하여 24.7 ± 3.1로 나타났으며 특히 160 μg/ml 身痛逐瘀湯의 처리에서는 대조군 14.3 ± 1.3에 비하여 19.9 ± 1.6(P<0.05)로 hydrogen peroxide만의 처리에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig 6).

2) neurofilament 정량

(1) Hydrogen peroxide의 영향

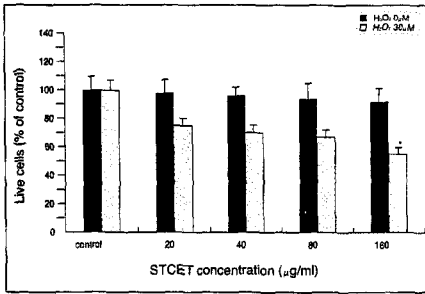


Fig. 6. Dose-dependency of Sintongchukeo-tang(STCET) for its neuroprotective effect on hydrogen peroxide in LDH release. Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with Sintongchukeo-tang. Cultures were preincubated with 20, 40, 80 and 160 $\mu\text{g/ml}$ Sintongchukeo-tang for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 30 μM hydrogen peroxide for 3 hours. LDH release was measured at wavelength of 570 nm. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p < 0.05$

Hydrogen peroxide 농도에 따른 neurofilament의 양적 측정을 위한 neurofilament EIA에 있어서 hydrogen peroxide가 5-40 μM 까지 각각 포함된 배양액에서 척수감각신경세포를 3 시간 동안 처리한 후 세포의 생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 5 μM hydrogen peroxide 처리에서는 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 75.4%로 나타났으며, 10 μM hydrogen peroxide 처리에서는 67.0%로 나타났다. 또한 20 μM , 40 μM hydrogen peroxide 처리에서는 각각 47.8% ($p < 0.05$), 27.5% ($p < 0.01$)의 생존율을 보여 유의한 감소를 나타냈다. MCV값은 20 μM hydrogen peroxide의 처리에서 나타났

(2) 身痛逐瘀湯의 효과

배양 척수감각신경세포에 대한

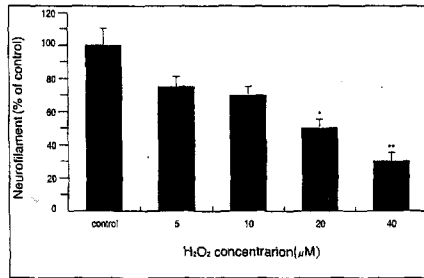


Fig. 7. Dose-response relationship of hydrogen peroxide by neurofilament enzyme immuno assay (EIA) in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 5, 10, 20 and 40 μM hydrogen peroxide for 3 hours, respectively. Amount of neurofilament was measured at wavelength of 490 nm. The results indicate the mean \pm SE ($n=6$). Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

hydrogen peroxide의 산화적 손상에 있어서 身痛逐瘀湯의 효과를 neurofilament의 양적변화 측면에서 조사하기 위하여 hydrogen peroxide의 MCV 값인 20 μM hydrogen peroxide 농도에서 3시간 동안 노출시키기 3시간 전에 20-160 $\mu\text{g/ml}$ 身痛逐瘀湯이 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어 효과를 neurofilament EIA법으로 조사하였다. 그 결과 20 μM hydrogen peroxide만을 처리한 경우 세포의 neurofilament의 양적변화는 대조군(100%)에 비하여 47.8%로 나타났

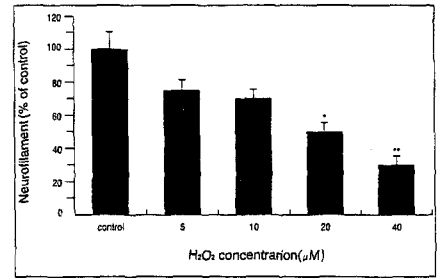


Fig. 8. Dose-dependency of Sintongchukeo-tang(STCET) for its protective effect on hydrogen peroxide in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultured mouse spinal sensory neurons were preincubated with various concentrations of Sintongchukeo-tang for 3 hours, and then exposed to 20 μM hydrogen peroxide for 3 hours. Amount of neurofilament was measured by enzyme immuno assay (EIA). The values represent the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p < 0.05$

IV. 考 察

痺症의 임상특징은 四肢軀體의 關節肌肉이 疼痛하거나, 冷感 또는 灼熱感이 있거나, 無汗 또는 多汗 등의 증상이 있고, 발병부위가 四肢뿐 아니라 肩, 背, 脊, 腰 등 身體軀幹에도 발생한다.²³ 그 밖에도 신체에 감각이 없어지거나 痛痒 또는 癱痺의 증상이 있고 손발이 萎弱하여지기도 하며, 현대의학적으로는 류머티스 관절염, 건관절주위염 및 좌골신경통 등뿐만 아니라 신경계통질환 등을 포괄하고 있다.^{4,5,7-13}

身痛逐瘀湯의 구성약물에 대한 효능을 살펴보면, 當歸는 溫中止痛, 養新血, 和血, 行血, 散內寒, 祛瘀生新함으로써 除惡瘡, 金瘡, 癥瘕, 積聚 등 一切血症에 응용되며, 桃仁은 活血, 破血, 祛瘀함으로써 血滯經閉, 通經, 產後瘀滯腹痛, 積聚, 打撲損傷 등의 瘀血證을 치료하

며, 紅花는 活血, 祛瘀, 通經함으로써 血滯經閉, 通經, 癥瘕積聚, 跌撲損傷 등의 瘀滯作痛症을 치료하고, 牛膝은 散惡血, 破癥結, 通經함으로써 婦人血滯經閉, 通經, 月經不調, 跌撲損傷 등의 瘀滯作痛症을 치료하며, 川芎은 行氣開鬱, 活血止痛, 消瘀血함으로써 月經不調, 經閉, 通經, 產後瘀滯腹痛, 跌撲損傷, 癰疽瘡瘍 등 症을 치료하고 五靈脂는 散瘀止痛하여 血滯經閉, 通經, 產後惡露不下, 腹部疼痛, 胃痛, 一切血滯疼痛症에 利血脈 消散瘀血하여 止痛效果가 매우 우수하며, 地龍은 清熱, 息風, 通絡, 平喘, 利尿 등의 작용이 있어 息風定驚, 風濕痺痛, 半身不隨, 平定氣喘, 小便不利, 水腫 등 症에 응용되어 진다. 沒藥은 活血, 止痛, 生氣하여 經閉, 通經, 跌撲損傷, 脘腹疼痛, 風濕痺痛, 瘡癤作痛, 筋骨疼痛, 心腹瘀血, 定痛生肌, 散瘀消腫 등에 사용되고 甘草는 補中益氣, 通經絡, 利血氣, 瀉火, 解毒함으로써 十二經을 通行시키고 諸藥을 協和하며, 秦艽는 祛風濕, 退黃疸, 除虛熱함으로써 風濕痺痛, 肢節疼痛, 黃疸, 骨蒸潮熱, 變急不遂 등에 응용하고, 羌活은 祛風解表, 止痛함으로써 惡寒發熱, 頭痛, 身痛, 風濕痺痛, 中風失音, 手足不遂, 口眼喎斜, 頸項強痛 등에 응용되어지고 香附子는 通行十二經, 行氣開鬱, 疎肝理氣, 調經止痛함으로써 一切氣滯, 六鬱積聚, 胸悶脇痛, 胃痛, 腹痛 등에 응용되어진다.²⁴⁻²⁶

따라서 본 방은 活血化瘀, 通絡止痛, 祛風濕하는 효능으로 瘀血로 인한 관절 및 근육동통 등을 치료하는 데 활용되는 처방이다.

Superoxide나 hydrogen peroxide와 같은 酸素自由基는 정상적인 代謝過程에서 사립체의 전자전달계에 의한 산화인산화작용에 의하여 형성되며, 이는 superoxide dismutase(SOD)나 catalase

에 의하여 물로 변환되어 소실되어 진다.²⁷ 그러나 低酸素症이나 虛血 및 中風과 같은 이상적인 상태에서는 酸素自由基가 비정상적으로 형성되어,²⁸ 그 결과 세포막의 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐만 아니라²⁹ protein kinase C(PKC)나 lipidphosphatase A2와 같은 이차전달자를 비롯하여 각종 酵素나 蛋白質을 불활성시킴으로써 細胞의 損傷 및 組織의 壞死를 초래한다.³⁰ 酸素自由基는 노인성치매의 병인을 비롯하여 중풍, 근위축경화증(amyotrophic lateral sclerosis. ALS)³¹ 및 뇌허혈과 같은 각종 질환의 병인으로 밝혀지고 있다.³² 최근 酸素自由基에 의한 酸化的 損傷에 대한 한 연구에서 酸素自由基는 흥분성 아미노산(excitotoxic amino acid, EAA)을 분비케 한다고 하며, 세포내의 NOS에 의하여 생성된 nitric oxide (NO)와 상호작용함으로써 毒性이 강한 peroxynitrite를 만들어 細胞의 損傷을 촉진시킨다고 한다.³³ 그러나 지금까지 酸素自由基의 毒性效果에 대한 기전에 관해서는 자세히 정립되어 있지 않다. 특히 선택적으로 感覺神經細胞만 損傷을 주는 感覺神經질환에 있어서 酸素自由基가 주요한 병인임을 보고한 바 있다.³⁴

이에 저자는 痺症에 사용하는 身痛逐瘀湯의 hydrogen peroxide에 의한 산화적 손상에 대한 방어효과를 구명하기 위하여, 신생생쥐에서 분리배양한 척수 감각신경세포를 여러 농도의 hydrogen peroxide가 포함된 배양액에서 3시간 동안 처리한 다음 hydrogen peroxide가 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하였고, hydrogen peroxide의 독성효과에 대하여 한약추출물인 신통축어탕의 방어효과를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었다.

본 실험에서 MTT assay와 NR

assay의 분석 결과 산소자유기는 배양 척수감각신경세포에 처리한 시간과 농도에 비례하여 신경세포의 생존율을 현저히 감소시켰다. 이와 같은 결과는 산소자유기가 척수감각신경세포에 독성을 가지고 있음을 말해주고 있으며, Michikawa 등¹⁹이 산소자유기가 생쥐의 배양척수신경세포에 각각 독성을 나타냈다는 보고가 이를 증명해 준다 하겠다. 따라서 이 같은 연구 결과들은 산화적 손상이 신경독성에 관여하고 있음을 말해주고 있을 뿐만 아니라, 동시에 세포내 항산화계에도 영향을 준다³⁵⁻³⁷는 것을 제시하고 있다.

따라서 본 연구에서는 산소자유기가 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 hydrogen peroxide가 1 μ M에서 50 μ M까지의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 3시간 동안 배양한 후 hydrogen peroxide의 독성효과를 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 1 μ M hydrogen peroxide 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 83.7%로 나타났다. 그러나 15 μ M의 처리에서는 76.7%로 이보다 다소 낮게 나타났다. 또한 25과 50 μ M hydrogen peroxide를 처리한 경우 이의 생존율은 각각 53.5과 41.9%로 대조군에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났다.

Hydrogen peroxide가 시간에 따라 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사한 결과 3시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 77.1%의 세포생존율을 보였다. 또한 6시간 배양에 있어서는 63.6%로 대조군에 비하여 다소 낮은 생존율을 나타냈으며 9시간 배양에서는 대조군에 비하여 46.7%의 생존율을, 18시간 배양에 있어서는 38.7%의 생존율을 각각 나타냈다.

NR 정량법에서는 hydrogen peroxide 1 μ M의 처리에서 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 68.1%로 나타났으며 10 μ M의 처리에서는 61.7%로 나타났다. 또한 20 μ M hydrogen peroxide에서는 48.9%로, 40 μ M hydrogen peroxide에서는 29.8%로 나타났다.

Hydrogen peroxide가 배양시간에 따라 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사한 결과 3시간 및 6시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 각각 66.6, 56.8%로 나타났으며 9시간과 18시간에는 각각 50.0%, 41.5%로 나타났다.

이러한 실험결과로 보아 Hydrogen peroxide와 같은 산소자유기가 척수감각세포에 농도의 증가와 시간이 경과함에 따라 세포의 손상정도가 증가함을 알 수 있었다. 그런데 최근에는 한약추출물을 비롯한 천연추출물들이 항산화 효과나 세포성장인자 등의 약리적 활성을 가지고 있어 뇌나 척수의 신경병변을 비롯하여 중풍이나 압과 같은 각종 난치성질환의 치료에 매우 효과가 뛰어나다는 연구들이 보고되고 있다.³⁸⁻⁴⁰ 그러므로 본 실험에서는 여러 신경손상의 원인이라고 밝혀진 산소자유기에 대하여 이의 산화적 손상에 의한 身痛逐瘀湯의 효과를 조사하기 위하여 생쥐에서 순수분리하여 배양한 척수감각신경세포에 산소자유기의 하나인 Hydrogen peroxide를 처리한 후 身痛逐瘀湯의 효과를 LDH 활성도 측정 및 neurofilament 측정 등에 의하여 조사하였다.

Hydrogen peroxide농도에 따른 LDH 활성도를 측정하기 위하여 세포 배양액내로 유출된 LDH양을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 1 μ M, 15 μ M hydrogen peroxide 처리에서는 대조군

100%에 비하여 각각 106.6%, 117.9%로 나타났다. 또한 30, 60 μ M hydrogen peroxide 처리에서는 각각 대조군에 비하여 150.3%, 223.8%로 나타났다. LDH 활성도의 MCV값은 30 μ M hydrogen peroxide의 처리에서 나타났다.

배양 척수감각신경세포에 대한 hydrogen peroxide의 산화적 손상에 있어서 身痛逐瘀湯의 효과를 LDH 활성도 측면에서 조사하였다. 그 결과 30 μ M hydrogen peroxide만을 처리한 경우 대조군 15.8 \pm 1.6에 비하여 38.6 \pm 3.5로 나타났다. 그러나 20 μ g/ml 身痛逐瘀湯 처리에서는 대조군 15.3 \pm 1.4에 비하여 29.4 \pm 2.7로 나타났다. 또한 40 μ g/ml 身痛逐瘀湯 처리에 있어서는 대조군 15.1 \pm 1.1에 비하여 26.4 \pm 2.3로 나타났다. 또한 80 μ g/ml 身痛逐瘀湯의 처리에서는 대조군 14.8 \pm 1.8에 비하여 24.7 \pm 3.1로 나타났으며 특히 160 μ g/ml 身痛逐瘀湯의 처리에서는 대조군 14.3 \pm 1.3에 비하여 19.9 \pm 1.6로 hydrogen peroxide만의 처리에 비하여 유의하게 감소하였다.

Hydrogen peroxide농도에 따른 neurofilament의 양적 측정을 위한 neurofilament EIA에 있어서 세포의 생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 5 μ M hydrogen peroxide 처리에서는 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 75.4%로 나타났으며, 10 μ M hydrogen peroxide 처리에서는 67.0%로 나타났다. 또한 20 μ M, 40 μ M hydrogen peroxide 처리에서는 각각 47.8%, 27.5%의 생존율을 보여 유의한 감소를 나타냈다. MCV값은 20 μ M hydrogen peroxide의 처리에서 나타났다.

배양 척수감각신경세포에 대한 hydrogen peroxide의 산화적 손상에 있어서 身痛逐瘀湯의 효과를 neuro-

filament의 양적변화측면에서 조사하였다. 그 결과 20 μ M hydrogen peroxide만을 처리한 경우 세포의 neurofilament의 양적변화는 대조군(100%)에 비하여 47.8%로 나타났다. 그러나 20 μ g/ml 身痛逐瘀湯의 처리에서는 20 μ M hydrogen peroxide만을 처리한 대조군에 비하여 112.3%로 나타났으며, 40 μ g/ml, 80 μ g/ml hydrogen peroxide의 처리에서는 각각 hydrogen peroxide만을 처리한 대조군에 비하여 각각 120.0%, 132.3%로 나타나 증가하였으나 유의성은 보이지 않았다. 그러나 160 μ g/ml 身痛逐瘀湯처리에서는 152.3%로 유의한 증가를 나타냈다.

이상의 결과를 종합해 보면, 산소자유기인 hydrogen peroxide는 산화적 손상에 의해 세포생존율을 감소시키고 신경세포에 대하여 독성을 나타내며, 이에 대한 身痛逐瘀湯의 투여로 神經細絲(neurofilament)의 증가, LDH 양의 감소를 보여 산소자유기에 의하여 손상된 척수감각신경세포의 생존율을 증가시킨 것으로 생각되며, 이의 작용기전에 대한 연구는 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

身痛逐瘀湯이 Hydrogen peroxide의 산화적 손상에 의한 신경독성을 방어하는 효과를 구명하기 위하여 신생 생쥐에서 분리 배양한 척수감각신경세포에 여러 농도의 hydrogen peroxide가 포함된 배양액에서 3시간 동안 처리한 다음 hydrogen peroxide가 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 hydrogen peroxide의 독성 효과에 대한 한약추출물인 身痛逐瘀湯의 영향을 조사한 결과, 다음과 같은 결

론을 얻었다.

1. 산소자유기인 hydrogen peroxide 는 NR assay와 MTT assay에 의한 세포생존율을 유의성있게 감소시켰고, 神經細絲의 감소 및 LDH양의 증가에 의하여 생쥐의 배양 척수감각신경세포에 독성을 나타냈다.

2. 身痛逐瘀湯은 hydrogen peroxide 의 산화적 손상에 의한 신경독성에 대하여 神經細絲를 유의성 있게 증가시켰다.

3. 身痛逐瘀湯은 hydrogen peroxide 의 산화적 손상에 의한 신경독성에 대하여 LDH양을 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 실험결과로 보아 身痛逐瘀湯은 산소자유기에 의한 척수감각신경세포의 산화적 손상에 대하여 유의한 방어효과를 나타냈으므로, 척수감각신경세포의 손상으로 인한 痺症 치료에 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 大韓神經外科學會. 神經外科學. 서울:中央文化社;1997, 276-9, 284-5, 299.
2. 이광우 外. 臨床 神經學. 서울:고려의학;1997, 394-9.
3. 피터두스. 신경국소진단학. 서울:과학서적센터;1992, 29-30.
4. 李京燮 外. 東醫心系內科學(下). 서울:書苑堂;1995, 89, 99.
5. 張伯興 主編. 中醫內科學. 北京:人民衛生出版社;1988, 627-38.
6. 王濟任. 醫林改錯. 서울:醫聖堂;1975, 65.
7. 王冰. 新編黃帝內經素問. 서울:大星文化社;1994, 265-71.
8. 王青堂. 證治準繩. 서울:柳林社;1975, 224-5.
9. 王顯明. 中醫內科辨證學. 北京:人民衛生出版社;1984, 393-408.

10. 金賢濟 外. 漢醫學辭典. 서울:成輔社;1990, 482, 652.
11. 黃文東 外. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社;1986, 554.
12. 宋峰根. 痺證의 形證과 病域에 관한 文獻의 考察. 圓光大學校大學院 1985.
13. 姜仁守. 痺症治療의 用藥에 관한 小考. 大韓韓醫學會誌 1990;11(1):245-52.
14. 金東秀. Endotoxin으로 誘發된 白鼠의 血栓症에 身痛逐瘀湯이 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院 1988.
15. 全熙景. 身痛逐瘀湯이 高血壓 및 高血脂症에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院 1993.
16. 柳志容. 身痛逐瘀湯의 抗炎, 鎮痛 및 抗血栓效果에 관한 研究. 圓光大學校 大學院 1996.
17. 孫宗坤. 身痛逐瘀湯 및 身痛逐瘀湯加味方의 鎮痛, 消炎, 解熱 作用에 관한 研究. 慶熙大學校 大學院 1996.
18. 李庚昊. 身痛逐瘀湯이 壓迫으로 인한 外傷瘀血病態模型에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院 1997.
19. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J Neurosci Res 1994;37:62-70.
20. Borenfreund E, Puerner JA. A Simple quantitative proced monolayer culture for cytotoxicity assay(HTD/NR-90). J Tiss Cu 1984;9:7-9.
21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival Application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.
22. Takahashi K, Fujita T, Mayum T, Kish T. Effect of Adramycin on mouse embryo myocardial cells. Chem Pharm 1987;35(1):326-34.
23. 張仲景. 金匱要略方論. 北京:人民衛生出版社;1972, 5-18.
24. 王浴生. 中藥藥理與應用. 北京:人民衛生出版社;1983, 119-27, 198-201, 264-75, 395-9, 424-34, 462-9, 790-3, 853-6.
25. 辛民教. 臨床本草學. 서울:永林出版社;1988, 176-7, 221-2, 249-50, 385-6, 455, 464-7, 469, 504-6, 511, 662.
26. 김창민 外. 완역중약대사전. 서울:정담출판사;1998, 88-103, 135-40, 592-9, 1159-68, 1353-8, 1819-23, 3945-9, 4177-86, 5171-7, 5258-65, 6124-30, 6357-62.
27. Park ST. Effect of iron-chelator on the neurotoxicity induced by oxygen radicals. Korean JPhys Anthrop 1995;8:113-21.
28. Jesberger JA, Richardson JS. Oxygen free radicals and brain dysfunction. Int J Neurosci 1991;57:1-17.
29. Zhang Y, Tatsuno T, Carney JM, Mattson MP. Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. J Cereb Blood Flow Metab 1993;13:378-88.
30. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J 1990;4:2587-97.
31. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewix D, Sapp P, Hentati A, Deng H, Rahmani Z, Krizus A. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature London 1993;362:59-62.
32. Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpatocopherol administration. Stroke 1983;14:977-82.
33. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiami M, Carrla V, Moroni F. Excitatory amino acid and free radicals formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. J Neurosci 1990;10:1035-41.
34. Conradi S, Ronnevi L, Norris F. Amyotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP(ed) : Human Motor Neuron Diseases. New York Raven Press 1982;35-56.
35. Park ST, Mun YJ, Kim BH, Kim JJ, Choi MK, Chung YT. Study on the effect of allopurinol against oxidant-induced neurotoxicity in cultured spinal sensory ganglion cells. The Korean J Anato 1996;29:65-71.
36. Elison GB, Kovensky A, Hitchings GH, Metz E, Rundles RW. Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthins oxide. Biochem Pharmacol 1996;15:863-80.
37. Kim SU, Osborne D, Kim MW,

Spigelman I, Puil E, Shin D. Long-term culture of human fetal spinal cord neurons : Morphological immunocytochemical and electrophysiological characteristics. Neuroscience 1988;25:

659-70.

38. 金賢奎. 苦蔘煎湯液이 培養心筋細胞에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院 1998.

39. 金鍾寬. 太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미

치는 影響. 圓光大學校 大學院 1998.

40. 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.