

원 저

LPS와 PMA에 손상된 신경교세포에 대한 腦血栓方의 방어효과

서관수, 문병순, 성장경, 임규상¹⁾, 신신희
원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 외관과학교실²⁾

Protective Effects of *Nueihyuljunbang* on LPS Combined PMA Induced Cytotoxicity in C6 Glial Cell

Kwan-Soo Seo, Byung-Sun Mun, Gang-Kyung Sung, Kyu-Sang Lim¹⁾, Sun-Ho Sin

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Department of Oriental Medical Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University²⁾

Objectives : The water extract of *Nueihyuljunbang* (NHJB) has long been used for treatment of ischemic brain damage in Oriental Medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of NHJB recovers brain cells from ischemic damage.

Methods : To elucidate the protective mechanism on ischemic induced cytotoxicity, we investigated the regulation of lipopolysaccharide (LPS) and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in C6 glial cells.

Results : LPS combined PMA treatment for 72 hours in C6 glial cells markedly induced nitric oxide (NO), but treatment of the cells with the water extract of NHJB decreased dose-dependently nitrite formation. In addition, LPS combined PMA treatment for 72 hours induced severe cell death and lactate dehydrogenase (LDH) release in C6 glial cells. However, treatment of the cells with the water extract of NHJB did not induce significant change compared to control cells. Furthermore, the protective effects of the water extract of NHJB were mimicked by the treatment of NGMMA, a specific inhibitor of NOS. LPS combined PMA induced iNOS activation in C6 glial cells caused chromosomal condensation and fragmentation of the nuclei by caspase activation. The treatment of C6 glial cells with the water extract of NHJB might suppress apoptosis via caspase inhibition by regulation of iNOS expression.

Conclusions : From the results, we suggest that the protective effects of the water extract of NHJB against ischemic brain damage may be mediated by regulation of iNOS during ischemic condition. (*J Korean Oriental Med* 2001;22(3):1-10)

Key Words: *Nueihyuljunbang*(NHJB), Nitric oxide (NO), Ischemic brain damage, C6 Glial Cell

서 론

中風은 突然昏倒, 人事不省, 言語不利, 口眼喎斜, 半身不遂 등의 증상을 특징으로 하는¹⁾, 뇌혈관의 파열이나 폐쇄와 같은 순환장애로 인한 신경계통의 질환이다^{2,3)}. 中風의 원인은 風, 火, 痰, 瘀血, 虛 등이 위주

· 접수 : 2001년 5월 2일 · 채택 : 6월 14일
· 교신저자 : 서관수, 전주 덕진구 덕진동 2가 142-1 원광대 전주한방병원
(Tel. 063-270-1531, Fax. 063-270-1199, E-mail: seokwansoo@hanmail.net)
· 본 논문은 원광대학교 교비 연구비지원에 의해 이루어짐

가 되고 이에 대한 치법은 疏風, 清熱化痰, 理氣祛痰, 活血化癥 및 補氣 등이 사용되고 있으며²³⁾, 최근에는 癥血이 中風의 주된 원인임을 강조하여 국내외에서 活血化癥法에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

癥血은 혈액순행이 장애를 받아 국부의 脈管 또는 臟腑중에 癥滯되거나 脈管을 벗어나 특정부위에 혈액이 癥滯된 것으로⁴⁾, 中風 초기에 “氣爲血之帥, 血爲氣之配, 氣行則血行, 氣滯則血滯”의 病機⁵⁾에 따라 혈액순환장애가 생기면, 氣滯血癥 및 癥血阻絡의 癥血 病理가 나타나므로 活血化癥 및 疏通經絡의 치법이 사용되고 있다⁶⁾.

허혈성 뇌졸중은 혈류의 지연과 울체, 혈액구성성분의 변화 및 미세혈관의 활성산소에 의한 내피세포 손상 등 혈류공급의 차단에 따른 뇌세포의 손상에 이르는 병태생리학적 기전을 가지고 있는데^{7,8)}, 최근 NO(nitric oxide)가 허혈상태에서 세포독성에 작용한다는 보고가 있고⁹⁾, 吳¹⁰⁾는 NO와 ‘氣行則血行, 氣滯則血滯’의 病機와의 연관성을 보고하였으며, 廖¹¹⁾는 補氣活血의 효과를 가진 補陽還五湯으로 척수신경세포의 NO생성억제에 대한 연구를 보고하였다.

腦血栓方은 원광대학교 부속 한방병원에서 뇌졸중, 심근경색, 협심증 및 혈전성 정맥염 등의 질환에 사용하여 왔던 처방으로 活血化癥 및 疏通經絡의 효능이 있는 葛根, 山楂, 三七根, 川芎, 紅花로 구성되어 있다.

이에 저자는 活血化癥 및 疏通經絡의 효능이 있는 腦血栓方을 선택하여 뇌허혈 초기에 신경세포 손상에 대한 방어효과를 立證하고자 lipopolysaccharide (LPS)와 phorhol 12 - myristate 13 - acetate(PMA)에 의해 손상된 C6 glial 세포에서 腦血栓方의 NO생성에 대한 방어효과 및 MTT assay, LDH분비측정, 광학현미경조사, Hoechst staining, caspase 활성도 측정에 의한 방법으로 세포손상 방어기전에 대하여 실험적으로 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 細胞柱

쥐의 심근모세포주(rat myoblast cell line)를 America Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하여 사용하였다. C6 glial 세포(ATCC)는 CO₂ 세포배양기(37℃, 5% CO₂)에서 10% fetal bovine serum (Hyclones)이 포함된 DMEM(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포를 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 腦血栓方의 약재는 원광대학교 한의과대학 부속 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

腦血栓方處方構成
(Prescription of Nueihyuljunbang)

韓藥名	生藥名	重量(g)
葛根	<i>Radix Puerariae</i>	8.00
山楂	<i>Fructus Crataegi</i>	8.00
三七根	<i>Radix Notoginseng</i>	8.00
川芎	<i>Rhizoma Cnidii</i>	8.00
紅花	<i>Flos Carthami</i>	8.00
Total amount		40.00

2. 방법

1) 검액의 조제

腦血栓方 10첩 분량인 400g을 증류수 2,000ml와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 煎湯한 후, 3000rpm에서 20분간 원심 분리하여 上淸液을 취한 다음, 여과지로 여과한 용액을 감압회전증발기를 이용하여 감압농축한 후 동결 건조기에서 24시간 동결건조하여 건조엑기스 47.8g을 얻었다. 건조한 엑기스는 분말로 만들어 증류수로 희석하여 원심분리한 후 취한 上淸液을 여과하여 검액으로 사용하였다.

2) Nitrite 농도 측정

C6 glial 세포를 새로운 배양액으로 교환한 후 90분

간 배양하면서 배양액으로 유리되어 나온 nitrite의 양을 15분마다 6회에 걸쳐 측정하므로써 대조군과 실험군의 iNOS의 활성도를 비교하였다. 먼저 알고 있는 농도의 sodium nitrite를 이용하여 표준곡선을 구하고, 대조군과 실험군의 배양액을 각각 150 μ l씩 얻어 4 $^{\circ}$ C에서 1,500g의 속도로 15분간 원심분리를 한 후 세포 성분들을 침전시키고 부유액만을 취하여 Griess reagent와 동량으로 혼합하여 실온에서 10분간 반응시키고 550nm의 파장으로 흡수도를 측정하였다.

3) 광학현미경적 관찰

세포의 형태학적 변화를 조사하기 위하여 배양중인 배양용기(well plate)를 도립위상차 현미경(Nikon)에서 관찰하였고, 필요시 부착된 사진기로 촬영하였다.

4) Hoechst staining

약제가 처리된 세포들을 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 씻어주고 Hoechst 33342 (Sigma Biosciences, St. Louis, Missouri, USA) 염색약을 PBS에 10 μ M이 되게 희석하여 10분간 염색한 후 다시 PBS에서 씻어서 형광현미경으로 관찰하였다.

5) MTT 정량

대조군과 실험군들을 각각 8개의 well을 한 군으로 하였으며, MTT [3-(4,5-di -methylthiazol-2-yl) - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromide, Sigma] 정량은 Mosmann의 방법에 따랐다. 즉 C6 glial 세포를 배양한 후 상층액을 버리고 사용당일 제조한 500 μ g/ml MTT를 배양용기당 1ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂로 유지된 정온기내에서 배양하였다. 배양 완료 후 세포내의 formazan을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck)를 배양용기당 1ml씩 넣고 15분간 실온에서 방치한 후 흡광도계로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

6) Lactate dehydrogenase(LDH) 활성도 측정

대조군과 실험군들을 각각 8개의 well을 한 군으로 하여 각 well의 상층액을 tube에 담아 1,000rpm으로 7분간 원심분리시킨 후, tube의 부유액을 검체량 50 μ l와 효소기질액 kit인 LD-D 1.0ml를 섞어 30 $^{\circ}$ C, 340nm에서 Gilford-Impact 400E로 setting하여 측정하

였다.

7) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

C6 glial 세포(2 \times 10⁶ cells)를 4 $^{\circ}$ C에서 15분동안 lysing buffer(1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml eupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 용해하고 14,000rpm으로 15분 동안 원심분리 시켰다. 원심분리하여 얻은 상층액은 BCA (Bicinchoninic acid, Sigma Co, St. Louis, MO)법으로 정량하여 assay buffer(100mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM DTT)에 희석되어 형광표지된 기질과 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer (Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA)로 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(380nm) 와 emission wavelength(460nm)를 사용하였다.

8) 통계처리

실험결과의 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였고 P-value가 0.05(P < 0.05)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

실험성적

1. C6 glial 세포에 대한 腦血栓方의 독성

C6 glial 세포에 대한 腦血栓方 추출물 자체의 세포 독성을 알아보기 위하여 腦血栓方 추출물만을 72시간동안 10mg/ml까지 증량시켜 각각 C6 glial 세포에 처리하였다.

MTT assay에 의한 방법으로 대조군에 대한 viability를 측정한 결과 腦血栓方 추출물을 1mg/ml, 2.5mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml까지 증량시켜 투여했을 시 각각의 군에서는 유의한 변화가 없었다(Fig. 1(A)). 또한 세포의 비가역적인 손상의 지표로서 C6 glial 세포에서 배양액내로 유출된 LDH의 양을 측정한 결과 MTT assay에 의해 측정된 결과와 마찬가지로 각각의 군에서는 유의한 변화가 없었다(Fig. 1(B)).

腦血栓方 추출물은 10mg/ml에서도 미토콘드리아나 세포막에 어떠한 손상도 입히지 않았고, 또한 腦血栓

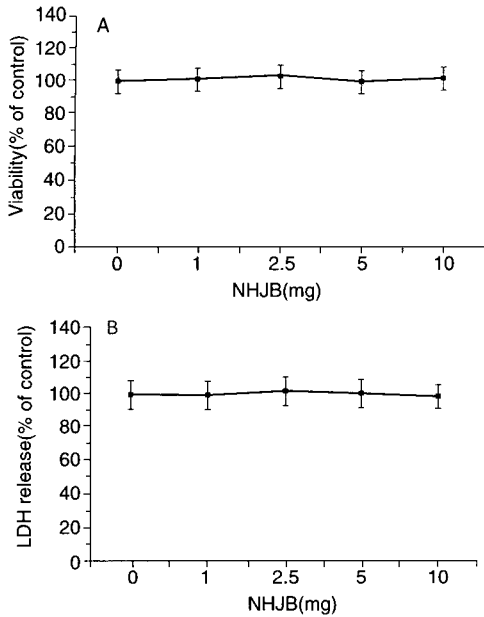


Fig. 1. Effect of the water extracts of NHJB on viability of C6 glial cells. The cells were treated with various concentrations of the extract up to 10mg/ml for 72h. The cell viability was measured by MTT assay(A) and LDH release from cell into media(B) as described in Materials and Methods. Results were expressed the mean and standard deviation(SD).

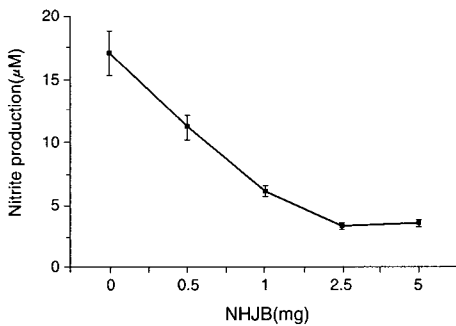


Fig. 3. Effect of the water extracts of NHJB on suppression of nitrite formation by LPS combined PMA in C6 glial cells. The cells treated with LPS combined PMA and water extracts of NHJB. Released NO was enzymatically measured by using Griss reagents. Results were expressed the mean and standard deviation(SD).

方 추출물이 처리된 C6 glial 세포는 어떠한 형태적 변화도 없었다.

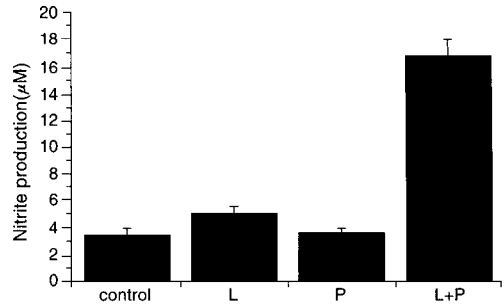


Fig. 2. Nitrite formation by LPS combined PMA in C6 glial cells. The cells were treated with LPS alone(1µg/ml), PMA alone(100nm) and LPS combined PMA. The cells treated with LPS combined PMA significantly product nitrite compare to cells treated LPS alone or PMA alone. Results were expressed the mean and standard deviation(SD) of four independent experiments.

CONT : no treated group
L : LPS alone treated group
P : PMA alone treated group
L+P : LPS combined PMA treated group

2. LPS와 PMA에 의해서 활성화된 C6 glial 세포에서 NO 생성에 대한 腦血栓方의 효과

C6 glial 세포에 LPS를 단독으로 72시간 처리하였을 때 생성되어지는 NO의 양은 $4.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$ 로 대조군 $3.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 에 비하여 증가하였으나($P < 0.05$) PMA단독 처리군은 $3.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 로 대조군과 차이가 없었다. 그러나 LPS와 PMA를 같이 처리하였을 때는 $17 \pm 1.2 \mu\text{M}$ 로 대조군에 비하여 NO의 생성이 증가하였다($P < 0.01$)(Fig. 2).

이렇게 LPS와 PMA에 의해 유발된 NO의 생성($17 \pm 1.2 \mu\text{M}$)이 腦血栓方을 같이 처리한 군에서는 유의한 감소를 보였다. 즉, 0.5mg/ml 을 처리한 군에서는 $11 \pm 0.9 \mu\text{M}$ 로 유의한 감소를 보였고($P < 0.05$), 1mg/ml 에서는 $6 \pm 0.4 \mu\text{M}$, 2.5mg/ml 에서는 $3.2 \pm 0.3 \mu\text{M}$, 5mg/ml 에서는 $3.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 로 NO의 생성이 2.5mg/ml 까지 농도의존적으로 감소하였다($P < 0.01$)(Fig. 3).

3. LPS와 PMA에 의해 유발된 C6 glial 세포독성에 대한 腦血栓方의 방어효과

C6 glial 세포에 LPS와 PMA를 72시간 처리하였을

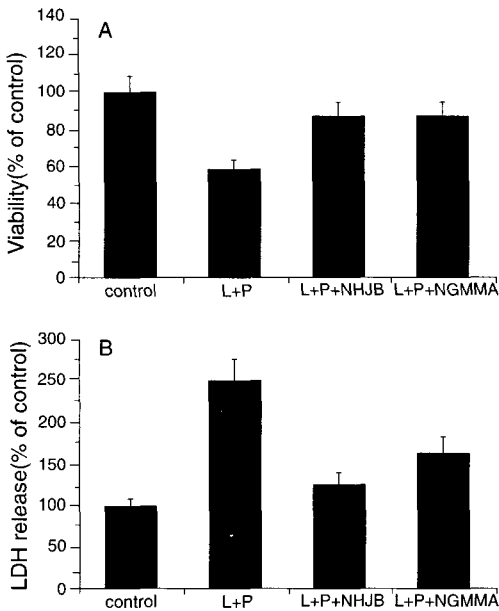


Fig. 4. Effect of NHJB on the viability of C6 glial cells damaged by LPS combined PMA. The cells were treated with LPS combined PMA, with LPS combined PMA and NHJB for 72h. In addition, the cells were treated with LPS combined PMA and NGMMA(10 μ M). Then, The cell viability were measured by MTT assay(A) and LDH release into media(B). Results were expressed the mean and standard deviation(SD) of four independent experiments.

때 세포의 형태학적 변화를 조사하기 위해 광학현미경으로 관찰한 결과 세포막은 응축되고 세포돌기도 현저히 감소하였으나, LPS와 PMA를 腦血栓方과 같이 처리하였을 때는 대조군과 큰 차이가 없었다.

또한 미토콘드리아의 succinic dehydrogenase의 활성을 나타내는 MTT assay에서 대조군에 대한 viability가 LPS와 PMA만을 처리한 군은 58 \pm 7%로 LPS와 PMA를 腦血栓方과 같이 처리한 군의 90 \pm 7%에 비하여 현저히 감소하였다(P < 0.01)(Fig. 4(A)).

세포의 비가역적인 손상의 지표로서 C6 glial 세포에서 배양액내로 유출된 LDH의 양을 측정된 결과 미토콘드리아의 succinic dehydrogenase의 활성을 측정된 결과와 마찬가지로 LPS와 PMA만을 처리한 군은 250 \pm 18%로 LPS와 PMA를 腦血栓方과 같이 처

리한 군의 110 \pm 10%와 비교해서 배양액내로의 LDH의 유출이 현저히 증가하였다. 이러한 腦血栓方의 효과는 NO 생성 저해제인 NGMMA(10 μ M)를 처리하였을 때도 유사하게 나타났다(P < 0.01)(Fig. 4(B)).

4. C6 glial 세포에서 LPS와 PMA에 의한 DNA 분절과 caspase 활성화에 대한 腦血栓方의 효과

C6 glial 세포에 LPS와 PMA를 72시간 처리하였을 때 Hoechst staining에 의해 apoptosis의 전형적인 양상인 염색사의 응축과 DNA의 분절양상을 관찰할 수 있었으나, LPS와 PMA를 腦血栓方과 같이 처리하였을 때는 염색사의 응축이나 DNA의 분절양상을 전혀 관찰할 수 없었다.

또한 apoptosis와 가장 밀접하게 관련되어 있는 효소인 caspase는 LPS와 PMA를 72시간 처리하였을 때 caspase 1, caspase 3, caspase 9가 대조군에 비하여 증가된 양상을 관찰할 수 있었으나 LPS와 PMA를 腦血栓方과 같이 처리하였을 때는 LPS와 PMA에 의한 caspase 활성의 증가를 관찰 할 수 없었다(Fig. 5(A), 5(B), 5(C)).

고 찰

中風은 卒中, 偏枯, 偏風이라고도 하며 突然昏倒, 人事不省, 言語不利, 口眼喎斜, 半身不隨 등의 증상을 특징으로 하는 疾患이다¹⁾.

中風의 원인은 제가들의 학설과 시대적 변천에 따라 다양하게 형성되었는데, 《內經》에서는 주로 外感風邪를 제시하였고¹⁾, 이후 宋代까지 中風을 外感風邪로 인한 虛證으로 인식하였으며²⁾, 金元時代에 이르러 劉完素의 主火說, 李東垣의 主氣說, 朱丹溪의 主濕痰說 등 內傷之病으로 인식하여 中風病因學說에 큰 전환점이 되었다³⁾. 이후 王安道는 眞中風과 類中風을 구별하였고¹²⁾, 葉天士은 陰虛陽亢의 病機로 內風說을 주장하였으며¹³⁾, 張 등^{14,15)}은 《內經》의 ‘血之與氣, 并走于上’의 病機를 바탕으로 內風에 의한 病因을 發展시켰다. 또한 王¹⁶⁾은 ‘元氣既虛, 必不能達於血管, 血

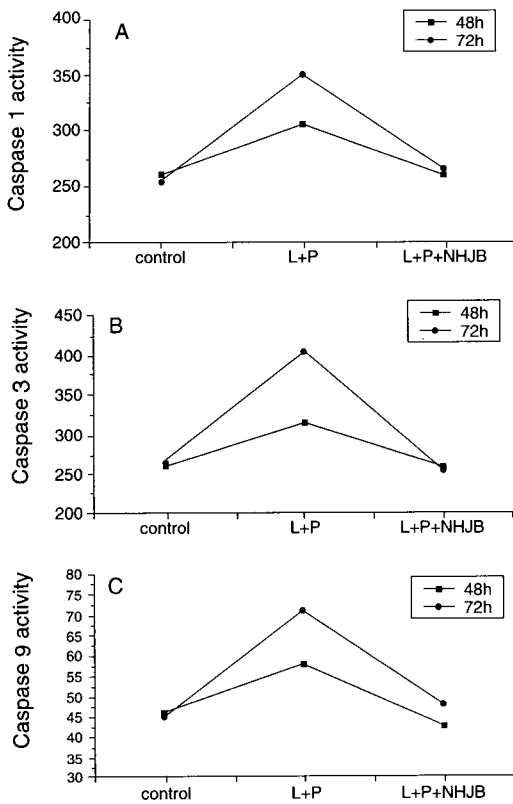


Fig. 5. Protective effect of the water extracts of NHJB on apoptosis of C6 glial cells by LPS combined PMA. The cells were treated with LPS combined PMA, with LPS combined PMA and NHJB for 48h and 72h. The caspases 1(A), 3(B), 9(C) activity were measured.

管無氣, 必停留而瘀'라 하여 氣虛에 의한 瘀血로 설명하였다.

中風은 발병초기에 急則治其標 緩則治其本에 基礎하여 風, 火, 痰, 瘀血 등의 標實證을 치료하는데¹⁶⁾, 최근에는 瘀血이 中風의 주된 원인임을 강조하여 活血祛瘀法에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁷⁾.

腦卒中은 뇌의 급격한 순환장애로 인하여 갑자기 意識障礙와 運動障礙, 感覺障礙 등의 증상을 일으키는 뇌혈관 질환을 말하며¹⁸⁾, 뇌혈관 질환은 혈전이나 색전으로 인한 혈관의 막힘, 혈관의 파열, 혈관벽의 병리적인 변화, 혈관투과성의 변화, 혈액내의 점성증

가 및 이상변화가 일어나는 등의 혈관병리학적 변화로부터 초래되는 뇌의 이상상태를 말한다^{6,7)}. 뇌졸중은 크게 허혈성 뇌졸중과 출혈성 뇌졸중으로 분류될 수 있는데, 더욱 세분하여 허혈성 뇌졸중은 뇌혈전증과 뇌전색증 등으로, 출혈성 뇌졸중은 뇌실질내출혈과 뇌지주막하출혈 등으로 분류된다^{6,18)}.

허혈성 뇌졸중은 뇌를 관류하는 혈관에 협착이나 폐색이 일어나며, 이로 인해 뇌순환장애가 발생하여 뇌기능장애를 초래하는 것을 말하는데¹⁹⁾, 대부분의 원인이 뇌동맥경화증 및 심장질환이고, 위험인자로 고혈압이 주된 원인이 되나, 심질환, 당뇨병, 고지혈증 등이 복합적으로 작용하는 것으로 알려졌다^{3,6)}. 허혈성 뇌졸중의 기전은 혈류변화, 혈액 구성성분의 변화 및 혈관내피의 손상 등을 들 수 있으며, 이에 대한 치료로 혈전용해제, 항응고제, 혈소판응집억제제, 뇌혈관확장제 등을 사용하고 있으나, 실제 임상에서는 이들 치료제의 사용에도 불구하고 초기 급성기를 경과하면서 뇌신경장애 증상이 점차로 악화되는 것을 완전히 방지하지 못할 뿐만 아니라 뇌출혈 등의 부작용이 뒤따르는 경우도 있다¹⁸⁾.

瘀血은 혈액운행이 장애를 받아 국부의 脈管 또는 臟腑중에 瘀滯되거나 脈管을 벗어나 특정부위에 혈액이 瘀滯된 것으로²⁰⁾, 《內經》에서 瘀血이라는 병명이 직접적으로 언급되지는 않았지만 血凝泣, 留血, 惡血, 凝血 등의 표현으로 나타나 있다²⁰⁾. 이후 張²¹⁾이 처음으로 瘀血 및 蓄血을 언급한 이래, 瘀血은 여러가지 의미와 病機로서 그 의미를 구체화시키고 발전해 왔는데, 王²²⁾은 血瘀滯不行, 唐²³⁾은 離經之血, 謝²⁴⁾는 血之停滯者, 尹²⁵⁾은 內生毒 등으로 瘀血의 개념을 설명하였다.

瘀血을 현대의학적 관점에서 보면 혈액의 유체역학적 이상, 미세순환장애, 외상성이나 염증성의 출혈, 조직에서의 혈류정체, 혈액의 정류 혹은 골반강내의 울혈, 혈관투과성의 증대, 부종, 조직의 변성, 세포의 증식 등 복잡한 病態를 나타내고 있는데, 허혈성 뇌세포의 손상에 따른 瘀血의 개념은 혈액의 유체역학적 이상에 따른 혈전의 형성과 미세순환장애에 따른 혈류역학적 저항이 증가하여 혈류가 지연·울체하

고, 미세혈관의 활성산소에 의한 내피세포의 손상 등과 밀접한 관계가 있다⁸⁾.

허혈성 뇌졸중에서 氣의 운행이 鬱滯되고 不暢하면 “氣爲血之帥, 血爲氣之配, 氣行則血行, 氣滯則血滯”의 病機⁹⁾에 따라 혈액순환장애가 생겨 瘀血의 病理가 나타나므로, 活血通絡 및 調氣活血의 치법이 사용되고 있다⁹⁾. 그러므로, 氣滯血瘀 및 瘀血阻絡에 의한 中風의 方劑組成에는 活血化瘀藥과 함께 증상과 징후에 따라 氣機不暢을 疏通시키는 化瘀通絡 및 行氣活血의 효능이 있는 약을 가미해야 하는데, 馬^{26,27)}은 活血化瘀의 효능이 있는 약물과 처방으로 혈전증에 유효한 실험결과를 발표하였고, 王²⁸⁾은 活血化瘀의 작용이 있는 川芎이 혈관을 확장시켜 뇌혈류를 증가시키며, 혈전형성을 방지한다고 보고하였으며, 吳¹⁰⁾는 NO와 ‘氣行則血行, 氣滯則血滯’의 病機와의 연관성을 보고하는 등 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

腦血栓方은 원광대학교 부속 한방병원에서 뇌졸중 및 심근경색, 협심증 및 혈전성 정맥염 등의 질환에 사용하여 왔던 처방으로 活血化瘀 및 疏通經絡의 효능이 있는 葛根, 山楂, 三七根, 川芎, 紅花로 구성되어 있으며, 개별 약물에 대한 효능과 약리작용을 보면 다음과 같다.

葛根은 發表解肌, 透發麻疹, 生津止渴, 升陽止瀉 등의 작용이 있어 感冒, 頭項強痛, 麻疹透發不暢, 熱病煩渴, 消渴, 濕熱瀉痢, 脾虛久瀉 등에 사용하며 뇌 및 관상동맥의 혈류를 증가시키고, 진경작용, 혈당강하작용이 보고된 바 있고, 山楂는 消食肉積, 活血散瘀하는 작용이 있어 食肉積滯, 腹痛, 泄瀉, 產後瘀血腹痛, 惡露不盡, 高血壓, 高脂血症 등에 사용하며 실험성 죽상동맥경화증에서 레시틴을 증가시키고 콜레스테롤을 저하시키며, 三七根은 化瘀止血, 活血定痛 등의 효능이 있어 內外各種出血, 跌打損傷, 瘀滯腹痛 등에 사용하며 지혈작용과 관상동맥혈류량의 증가작용 및 혈압을 낮추는 작용이 있다^{29,30)}. 川芎은 活血行氣, 祛風止痛의 效能이 있어 月經不調, 經閉, 產後瘀血腹痛, 脇肋疼痛, 肢體麻痺, 頭痛, 風濕痺痛에 사용하며 중추신경계의 진정작용, 심장혈관에 작용하

여 혈압을 낮추는 작용, 평활근에 대한 작용 및 항균 작용이 보고되었으며, 紅花는 活血通絡, 祛瘀止痛 등의 효능이 있어 痛經, 經閉, 產後瘀阻腹痛, 積聚, 關節疼痛, 斑疹 등에 사용하며 자궁 및 순환계에 작용하는 것으로 보고되고 있다^{29,30)}.

허혈성 뇌졸중 초기에 뇌신경장애 증상이 점차로 악화되는 것을 설명하는 기전으로 허혈상태의 뇌의 병리학적 반응에 NO의 생성이 중요하게 관여한다는 연구가 활발히 진행되고 있다⁹⁾. NO는 NOS(nitric oxide synthase)에 의하여 L-arginine으로부터 L-citrulline으로 전환되면서 생성되는데, 뇌세포에는 3 종류의 NOS가 있다³¹⁾. 신경원세포에서는 칼슘의존적으로 활성화되는 신경원세포의 NOS(nNOS, type 1 NOS)가 항상 발현되고 있고, 교세포(별아교세포, 희소돌기 아교세포, 미세교세포)들은 LPS, interferon gamma, TNF- α (tumor necrosis factor alpha), 그리고 interleukin 1 beta 등, 각종 cytokine 등에 의해서 칼슘에 비의존적으로 합성되는 NOS(iNOS, type 2 NOS), 그리고 마지막으로 혈관내피세포와 별아교세포 등에서 칼슘의존적으로 항상 합성되고 있는 혈관내피세포의 NOS(eNOS, type 3 NOS)가 있다³²⁾.

뇌허혈시 신경원세포와 교세포들에서는 신경세포막이 탈분극되어 흥분성 신경 전달물질인 glutamate가 유리되는데 이에 의하여 N-methyl-D- aspartic acid (NMDA)에 선택적인 전압의존성 이온통로가 열리며 칼슘이 세포내에 축적된다. 이 증가된 칼슘은 NOS를 과도하게 활성화시키고 NO의 유도를 급격하게 증가시킨다. 이에 따라 과도하게 증가된 NO는 미토콘드리아의 기능장애를 일으켜 이로 인한 에너지고갈을 야기하며, 지방과 단백질의 peroxidation 및 nitrosylation, DNA 손상 등 신경독성을 야기시키고 퇴행성 신경질환에 관여한다³³⁾.

iNOS와 nNOS가 심각한 신경세포손상을 일으키는데 비하여 허혈성 질환의 초기에 혈관 내피세포에서 생성되어지는 eNOS는 혈관을 확장시켜 혈류량을 증가시킴으로써 산소와 영양분의 공급을 원활하게 하여 허혈에 의한 세포손상을 줄여준다³⁴⁾. 또한 허혈 12시간 후에 활성화되는 iNOS는 미토콘드리아의 기

능부전이나 에너지고갈을 야기시켜 뇌세포손상을 주로 매개한다³⁵⁾. 따라서 허혈성 뇌졸환의 치료방향은 허혈초기의 nNOS를 억제하고 eNOS의 활성을 촉진시켜야하고 수시간 이후부터 유도되는 iNOS의 발현을 억제하는데 치료의 초점이 맞추어져야 할 것으로 사료된다.

세포독성을 얻기 위해서 사용된 LPS와 PMA는 신경세포에서 NO를 활성화시키는 작용을 하며 특히, LPS는 중추신경계에서 TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) 신호전달계를 활성화시킨다고 알려져 있다. TNF- α 는 허혈성 뇌졸환에서 증가하는데, 이 증가된 TNF- α 는 다른 cytokine과 더불어 신경교세포에서 NF- κ B(nuclear factor kappa B)에 의한 iNOS의 발현에 깊이 관여하고 있다³⁶⁾.

본 실험에서 腦血栓方이 생존력과 LDH release를 통하여 신경교세포에 독성작용을 나타내는가 하는 안정성실험에서 대조군과 비교하여 농도변화에 따라 의미없는 결과를 보여 독성이 없는 것으로 나타났고, 신경교세포에 독성을 나타내게 하는 LPS와 PMA에 의해 유발된 NO를 腦血栓方이 농도의존적으로 감소시킴으로써 LPS와 PMA에 의해 유발된 세포막손상이나 미토콘드리아의 손상을 의미있게 억제하였다. 이는 허혈모델의 배양 교세포와 중간대뇌동맥(middle cerebral artery, MCA)을 폐쇄시킨 쥐모델에서 칼슘에 비의존적으로 발현되는 iNOS의 활성이 증가하였고³⁷⁾, 이러한 조건에서 선택적인 iNOS의 저해제인 aminoguanidine이 세포손상을 현저히 억제하였다는 보고와 일치하였다³⁸⁾. 그러므로 허혈상태에서 腦血栓方이 세포독성을 막는 기전중의 하나인 iNOS의 생성을 억제함으로써 세포손상을 감소시키는 것으로 생각된다.

Apoptosis란 세포의 분해를 위해 세포내의 효소들이 활발하게 관여하는 능동적인 죽음의 기전이다. 이 과정은 형태적으로 세포의 비중감소, 염색사의 응축, DNA의 분절 등과 더불어 세포내부의 물질들이 사멸체(apoptotic body)라는 포낭을 형성하면서 식세포 작용을 거치는 작용과 함께 진행되는데 caspase(cystein aspartase)와 매우 밀접하게 관계되어져 있다

³⁹⁾ 본 실험에서도 LPS와 PMA에 의해서 apoptosis의 전형적인 양상인 caspase의 활성의 증가나 염색사의 응축이나 DNA의 분절이 나타났는데, 腦血栓方을 LPS와 PMA와 함께 처리하였을 때는 caspase의 활성의 증가, 염색사의 응축, DNA의 분절 등이 의미있게 억제되었다. 이는 腦血栓方이 뇌세포에서 iNOS의 발현을 억제하므로써 뇌세포의 caspase 1, 3, 9의 활성을 억제하여 apoptosis를 억제하는 것으로 생각한다. 이러한 결과는 C6 glial 세포에 LPS와 IF- γ (interferon gamma)를 처리하여 iNOS의 발현이 증가되었을 때 caspase 3의 활성을 증가시키지만 이때 caspase 3의 활성저해제인 Ac-DEVD-MCA를 처리하였을 때 뇌세포의 apoptosis를 억제한다는 결과⁴⁰⁾와 깊은 연관성이 있는 것 같다.

따라서, 活血化癥 및 疏通經絡의 목적으로 허혈성 뇌졸환에 사용되어 왔던 腦血栓方은 허혈성 iNOS의 활성을 저해하므로써 세포막의 독성이나 미토콘드리아의 독성을 억제하고 caspase의 활성을 억제하므로써 염색사의 응축이나 DNA의 분절 등의 apoptosis를 억제하는 결과를 나타내었으므로 허혈성 뇌졸환의 초기에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

결론

活血化癥 및 疏通經絡의 목적으로 中風에 사용된 腦血栓方의 뇌허혈 초기 신경세포손상에 대한 방어기전을 입증하고자 LPS와 PMA에 의해 손상된 C6 glial 세포에서 腦血栓方의 NO생성에 대한 방어효과 및 MTT assay, LDH 분비 측정, Nitrite formation 측정, 광학현미경 조사, Hoechst staining, caspase 활성을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 腦血栓方은 10mg/ml까지 농도를 증가시켜도 정상적인 C6 glial 세포에 손상을 주지 않았다.
2. 腦血栓方은 2.5mg/ml까지 LPS와 PMA에 의해서 유발된 Nitrite생성을 농도의존적으로 억제하였다.
3. 腦血栓方은 LPS와 PMA에 의해서 유발된 세포막독성과 미토콘드리아독성을 의미있게 억제하였다.

또한 이러한 腦血栓方의 방어효과는 NOS의 저해제인 NGMMA를 투여하였을 때도 비슷하게 나타났다.

4. 腦血栓方은 LPS와 PMA에 의해서 유발된 iNOS의 활성을 억제하므로써 염색사의 응축이나 DNA의 분절 등을 억제하였고, caspase 1, 3, 9의 활성을 억제하였다.

이상의 결과로 보아, 腦血栓方은 허혈에 의한 세포독성에 대해 iNOS의 활성을 억제하므로써 세포막독성 및 미토콘드리아의 독성을 억제할 뿐만 아니라 caspase 1, 3, 9의 활성을 억제하여 apoptosis를 억제하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 張伯兒. 中醫內科學. 北京:人民衛生出版社. 1988:451-468.
2. 全國韓醫科大學心系內科學教室. 心系內科學. 서울:書苑堂. 1999:420-435.
3. 金永錫. 臨床中風學. 서울:書苑堂. 1997:303-304,345-348.
4. 金完熙. 臟腑辨證論治. 서울:成輔社. 1985:59,371-375,444.
5. 印會河, 張伯訥. 中醫基礎理論. 北京:人民衛生出版社. 1989:167-169,264-265.
6. 鄭遇悅, 安圭錫. 韓方臨床病理學. 서울:永林社. 1998:350-364,454.
7. Kurt J. Isselbacher. Harrison's 내과학. 서울:도서출판정담. 1997:2409-2411.
8. 東西醫學融合研究會編. 臨床東西醫學, 서울:永林社, 1997:116-124,147-153,165-179.
9. 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.
10. 吳靜. 一氧化氮與氣. 中國中西醫結合雜誌. 1997; 17(8): 498-500.
11. 廖柏松 외. 補陽還五湯逆轉NO對SC和DRG神經元毒性作用的研究. 實用中西醫結合雜誌. 1997;10(4):318-319.
12. 徐木林. 中風之古與今. 遙寧中醫雜誌. 1996;23(6): 253-254.
13. 葉天士. 臨指南醫案. 서울:도서출판정담. 1998:56-57.
14. 張錫純. 醫學衷中參西錄. 河北:河北科學技術出版社. 1985:312-318.
15. 張山雷. 中風辯證. 서울:大星文化社. 1994:14,232-233,251,266.
16. 王清任. 醫林改錯. 익산:圓光大學校出版局. 1998:135.
17. 陳進. 中風後遺症辨治之我見. 浙江中醫雜誌. 1988;23:195-196.
18. James B. Wyngaarden. Cecil Testbook of Medicine (19th edition). Philadelphia U.S.A. 1992:2063-2073.
19. 郭隆燦. 圖解腦神經外科學. 서울:제일의학사. 1992:394-411.
20. 임준식, 이진섭. 中風治法에 있어서 活血化瘀法에 대한 文獻的 考察. 惠和醫學. 1996;5(1):115-128.
21. 張機. 仲景全書. 台北:集文書局. 1972:172-173,228,236.
22. 王肯堂. 六科准繩(證治). 서울:유림사. 1982:176, 181,188.
23. 唐容川. 中西匯通醫書五種. 서울:東南出版社. 1978:1097,1198-1204.
24. 謝觀. 東洋醫學大辭典. 서울:高文社. 1987:961.
25. 尹吉榮. 東醫學의 方法論研究. 서울:成輔社. 1983:102.
26. 馬崩鍾 外. 通脈飲合用赤芍801注射液治療33例腦血栓形成的臨床觀察. 中醫雜誌. 1994;35(7):421.
27. 田炳薰, 禹元洪, 鄭遇悅. 韓國의 瘀血發展過程과 最近의 研究動向. 大韓東醫病理學會誌. 1996;10(1):1-4.
28. 王京 外. 川芎對腦血管血液動力學參數作用的實驗研究. 中國中西醫結合雜誌. 1993;13(7):417-419.
29. 辛民教. 臨床本草學. 서울:永林社. 1997:341-343,497-498,530-532,534-535,585-586.
30. 江蘇新醫中醫學院. 中藥大辭典. 서울:도서출판정담. 1998:45-54,2658-2663,2769-2775,5258-5264, 6357-6362.
31. Vincent S.R.. Nitric oxide;a radical neurotransmitter in the central nervous system. Progr. Neurobiol.. 1994;42:129-160.
32. Bredt D.S., Snyder S.H.. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci.. 1990;87:682-685.
33. Almeida A., Heales S.J.R., Bolaos J.P., Medina J.M.. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. Brain Res.. 1998;790:209-216.

34. Wagner B.P., Stingle R., Williams M.A., Wilson D.A., Traystman R.J., Hanley D.F.. NO contributes to neurohypophysial but not other regional cerebral fluorocarbon-induced hyperemia in cats. *Am. J. Physiol.* 1997;42:H1994-H2000.
35. 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.
36. Sacco S., Agnello D., Sottocorno M., Lozza G., Monopoli A., Villa P., Ghezzi P.. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs increase tumor necrosis factor production in the periphery but not in the central nervous system in mice and rats. *J. Neurochem.* 1998;71(5):2063-2070.
37. Iadecola C., Xu X.H., Ahang F.Y., Elfakahany E.E., Ross M.E.. Marked induction of Calcium-independent nitric-oxide synthase activity after focal cerebral-ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1995;15:52-59.
38. Zhang F.Y., Casey R.M., Ross M.E., Iadecola C.. Amino-guanidine ameliorates and L-arginine worsens brain-damage from intraluminal middle cerebral-artery occlusion. *Stroke*; 1996;27:317-323.
39. Alnemri E.S., Livingston D.J., Nocholson D.w., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J.. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *cell*. 1996;87:171-176.
40. Nomura Y.. A transient brain ischemia and bacterial endotoxin-induced glial iNOS expression and NO-induced neuronal apoptosis. *Toxicol. Lett.* 1998;28: 65-697.