

# 羌活愈風湯이 腦虛血로 유도된 大腦神經細胞損傷에 미치는 영향

이성근\*, 문병순, 황충연, 김경요, 이견목, 성강경, 이대용\*  
원광대학교 한의과대학, 원광대학교 군포한방병원 한방내과\*

## Effects of *Kangwhalyupung-tang* on the Cerebral Neuronal Damage induced by Ischemia

Seoung-geun Lee\*, Beong-sun Mun, Chung-yeon Hwang, Keong-yo Kim, Geon-mok Lee,  
Kang-keong Sung, Dae-yong Lee\*

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University  
Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Kunpo Hospital\*

**Objective** : Experimental studies have been done to elucidate the effect of *kangwhalyupung-tang*(KWYPT) on neuronal cell damage induced by brain ischemia.

**Method** : The cytotoxic effect of ischemia was measured in the MTS assay cultures. MTS assay, INT assay, neurofilament(NF) enzymeimmuno assay(EIA). And the KWYPT on ischemia-induced neurotoxicity were examined by in vitro assays.

**Results** :

1. The KWYPT protected effectively neuronal cell-death resulted from brain ischemia induced by the treatment of 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> for 10 min in those dependent fashion.
2. The KWYPT effectively increased the amount of NF resulting from brain ischemia , induced by the treatment of 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> for 15 min in those dependent fashions.

**Conclusions** : KWYPT protects the brain ischemia-induced neurotoxicity through the increase of cell viability and of neurofilament in dose-dependent manner.

**Key Words**: *Kangwhalyupung-tang*, Cerebral Neuronal Damage

## 1. 緒 論

羌活愈風湯은 朱<sup>1</sup>의《丹溪心法》에 “治肝腎虛 筋骨弱 語言難 精神昏聩 及治風濕內弱 風熱體重 或瘦而一肢偏枯 或肥而半身不遂 心亂即百病生 靜即萬病息 此藥能安心 養神 調陰陽 無偏勝”이라고 처음 기재된

이후, 역대 의가들에 의해 중풍발생의 전후에 예방약과 조리약으로 사용되고 있는 처방이다<sup>1,3</sup>.

뇌허혈 발작시에 초래되는 생리적·임상적 결과는 혈류량 감소의 정도와 지속시간 등에 의해 결정되는데 어느 정도의 뇌혈류량 감소는 보상기전이 작용되어 신경조직 내에 공급되는 혈류부족에 따른 영향을 조절할 수도 있으나 지속적이면서 뇌허혈 부위가 확대되는 경우에는 뇌조직의 대사작용에 장애를 초래하게 된다<sup>4</sup>. 국소뇌혈류의 감소에 따른 일련의 대사과정 중에 산소자유기(free radical), 글루탄산염

· 접수 : 2002년 9월 23일 · 채택 : 2002년 10월 23일  
· 교신저자 : 이성근, 경기도 군포시 산본동 1126-1 원광대 군포한방병원 한방2내과  
(Tel: 031-390-2755 Fax: 031-390-2517, E-mail: starrooty@hanmail.net)

(glutamate) 등의 독성물질이 생성되거나 침착되고 이들의 상호작용에 의해 신경세포는 사망하게 되어 운동마비를 포함한 신경학적 증후를 나타내게 된다<sup>45</sup>. 따라서 신경조직에 해가 되는 신경전달물질과 신경조직 내에서 일어나는 일련의 연쇄대사과정을 경감시키기 위한 여러가지 방어적 약물제재에 많은 관심이 집중되고 있다<sup>6</sup>.

羌活愈風湯에 관한 실험적 연구로는 權의 고지혈증에 미치는 영향, 文의 고혈압에 미치는 영향 등이 보고되고 있으나, 대사과정 중 생성되는 산소자유기의 관점에서 羌活愈風湯이 대뇌신경세포에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

이에 저자는 중풍의 예방약과 조리약으로 활용되고 있는 羌活愈風湯이 허혈로 손상된 뇌세포에 미치는 영향을 구명하기 위하여 대뇌신경세포를 배양하여 뇌허혈을 유도한 후, 羌活愈風湯이 산소자유기에 의한 세포독성에 미치는 영향을 MTS assay를 비롯하여 INT assay, Neurofilament enzymeimmuno assay (NF-EIA)를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 재료

#### 1) 동물

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

#### 2) 약재

본 실험에 사용한 羌活愈風湯의 처방은 《東醫寶鑑》<sup>3)</sup>에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 1첩의 내용과 분량은 Table 1과 같다.

### 2. 방법

#### 1) 검액의 조제

羌活愈風湯 4첩 분량을 3,000 ml 환저플라스크에 증류수 1,500 ml와 함께 넣은 다음 SOD각기를 부착하여 2시간동안 전열기로 煎湯한 후, 여과액을 3,000

rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압 농축한 후, 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 25g의 분말 시료를 조제하였으며 실험시 증류수로 희석하여 사용하였다.

#### 2) 시료 제조

본 실험에 사용한 시료의 제조는 glutathione (Sigma)을 각각 1M, 100mM, 10mM의 저장액으로 만들어 냉암소에 보관한 후, 실험 당일 적당한 양으로 희석하여 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

#### 3) 세포배양

대뇌신경세포의 분리는 Michikawa<sup>9)</sup>등(1994)의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생후 3일된 생쥐에서 적출한 신경조직을 0.25% trypsin이 포함된 phosphate

Table 1. Composition and Dosage of kangwhalyupung-tang per pack

Herb	Scientific name	Dose(g)
蒼朮	<i>Atractyodis Rhizoma</i>	2.25
石膏	<i>Gypsum</i>	2.25
生地黄	<i>Rehmanniae Radix</i>	2.25
羌活	<i>Angelicae Koreanae Radix</i>	2.25
防風	<i>Ledebouriellae Radix</i>	1.50
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	1.50
蔓荊子	<i>Vitidis Fructus</i>	1.50
川芎	<i>Cnidium officinale</i>	1.50
細辛	<i>Asiasari Radix</i>	1.50
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	1.50
枳殼	<i>Ponciri Fructus</i>	1.50
人蔘	<i>Gingseng Radix</i>	1.50
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	1.50
白芷	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	1.50
甘菊	<i>Chrysanthemi Flos</i>	1.50
薄荷	<i>Menthae Herba</i>	1.50
枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	1.50
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	1.50
知母	<i>Anemarrhenae Rhizoma</i>	1.50
地骨皮	<i>Lycii Cortex Radicis</i>	1.50
獨活	<i>Araliae Cordatae Radix</i>	1.50
杜沖	<i>Eucommiae Cortex</i>	1.50
秦芫	<i>Gentianae Macrophyllae Radix</i>	1.50
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	1.50
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	1.50
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	1.50
肉桂	<i>Cinnamomi Cortex Spissus</i>	1.50
Total Amount		43.5

buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36℃, 5% CO<sub>2</sub>/95%air로 조절된 정온기 내에서 배양하였다. 세포배양 완료 후 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Gibco)으로 3회 세척한 다음 Pasteur 피펫으로 세포를 분리시켰다. 분리된 세포들은 poly-L-lysine(Sigma)으로 전처리된 96-multiwell에 3×10<sup>4</sup>cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 5일 동안 배양한 후 본 실험에 사용하였다.

#### 4) 뇌허혈 유도

뇌허혈을 유도하기 위하여 대뇌신경세포를 glucose-free Hanks' balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 교환한 다음 nitrogen과 CO<sub>2</sub>가 여러 농도로 혼합된 용기 속에 일정시간 동안 노출시킨 후, 세포생존율이 MCV인 값을 측정하여 허혈을 유도하였다. 허혈이 완료된 후 다시 정상배양액으로 교환하여 5%CO<sub>2</sub>/95% air로 조절된 정온기 내에 옮긴 다음 분석에 사용하였다.

#### 5) 항산화제 처리

뇌허혈을 유도하기 2시간 전에 항산화제인 glutathione이 4-10mM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양한 다음 다시 ischemic condition인 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>가 포함된 용기 내에서 10분 동안 처리한 후, 뇌허혈에 대한 glutathione의 영향을 MTS에 의한 세포생존율을 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

#### 6) 뇌허혈의 세포독성 및 약제의 방어효과 분석

##### (1) 항산화제의 효과

항산화제인 glutathione이 뇌허혈에 의하여 손상된 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 4-10mM의 glutathione이 각각 포함된 배양액에서 뇌허혈유도 2시간 전에 배양한 후, MTS assay에 의한 세포생존율을 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

##### (2) 羌活愈風湯(kangwhalyupung-tang)의 방어효과

羌活愈風湯(KWYPT)이 뇌허혈에 의하여 손상된 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 15~90μg/ml의 KWYPT이 각각 포함된 배양액에서 뇌허혈유도 2시간 전에 배양한 후, MTS assay에 의한

세포생존율을 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

#### (3) 세포생존율 분석

##### ① MTS 측정

MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) 定量을 위하여 뇌허혈이나 강활유풍탕을 처리한 배양 신경세포를 PBS로 3회 세척한 후, 전날 제조한 4 mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37℃, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양완료후 dimethylsulfoxide(DMSO, Merk)를 처리한 다음, spectrophotometer로 520nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

##### ② INT 측정

INT(P-iodonitrotetrazolium violet)의 定量은 Mosmann(1983)의 방법에 따라 시행하였다. 즉 뇌허혈유도나 강활유풍탕을 처리한 배양 대뇌신경세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척한 후 전날 제조한 2 mg/ml의 NR을 well당 최종 농도로 희석하여 넣은 다음, 3시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양완료 후 PBS로 3회 세척한 다음 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 후, spectrophotometer로 202nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

##### ③ NF 면역화학 측정

Neurofilament enzymeimmuno assay(NF-EIA)에 의한 NF측정을 위하여 일정 시간동안 배양한 신경세포를 PBS로 3회 세척하여 알코올로 고정시킨 다음, 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척완료 후 NE14(1:100, Sigma)로 1시간 동안 반응시킨 다음 0.04% O-phenylenediamine(OPD, Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide로 처리한 후, Dynatech Microelisa reader로 490nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

#### 7) 통계 처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA 후에 Student-t test에 의하였으며, p값이 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 인정하였다.

### III. 實驗成績

#### 1. 뇌허혈의 세포독성

##### 1) 세포 생존율 분석

##### (1) MTS 측정

N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(%)가 각각 75/25~99/1의 비율로 혼합된 배양용기에 세포를 10분 동안 처리한 후 이들이 세포생존율에 미치는 영향을 조사한 결과, 75/25의 처리에서는 세포생존율이 대조군(100%)에 비하여 79.7%로 나타났고, 85/15의 처리에서는 68.1%로 나타났다. 95/5과 99/1를 처리한 경우 세포생존율은 각각 49.3%(p<0.05)와 11.4%(p<0.01)로 나타나 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났으며, 이 때 MTS50 값이 95/5에서 나타남으로써 뇌허혈유도의 MCV로 측정되었다(Table 2).

MCV인 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>가 포함된 용기에 신경세포를 각각 1분에서 20분간 노출시킨 후 세포생존율을 MTS assay에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과, 1분간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 73.3%의 세포생존율을 보였다. 5분간 배양에 있어서는 59.6%로 대조군보다 낮게 나타났으며 10분간 배양에서는

**Table 2.** Absorbance (% of control) at 520nm wavelength for the MTS assay on brain ischemic condition in cultured mouse cerebral neurons

Ischemic condition (N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , %)	MTS absorbance (520nm)	Decrease rate of cell viability(%)
0	0.69±0.09	-
75/25	0.55±0.05	20.3
85/15	0.47±0.03	31.9
95/5	0.34±0.04*	50.7
99/1	0.08±0.07**	88.6

Cultured mouse cerebral neurons were treated with various combinations of N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> for 10 min. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*p<0.05; \*\*p<0.01

**Table 3.** Time-response relationship of ischemia by MTS assay in cultured mouse cerebral neurons

Ischemia (%) [N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ]	MTS absorbance(520nm)				
	0min	1min	5min	10min	20min
0	0.49±0.08	0.45±0.06	0.47±0.03	0.43±0.05	0.41±0.04
95/5	0.47±0.05	0.33±0.02	0.28±0.03	0.21±0.01*	0.09±0.06**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with ischemia for various time intervals. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. \*p<0.05; \*\*p<0.01

대조군에 비하여 48.8%(P<0.05)로, 20분간 배양에서는 22.0%(p<0.01)로 각각 나타났다. 이 때 10분간 배양에서 MCV를 나타내었다(Table 3).

##### (2) INT 측정

일정시간 동안 배양한 대뇌신경세포를 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(%)가 각각 75/25~99/1의 비율로 혼합된 배양용기에 세포를 20분 동안 처리한 다음 이들이 세포생존율에 미치는 영향을 조사한 결과, 75/25의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 81.9%로 나타났고, 85/15의 처리에서는 74.7%로 나타났다. 95/5과 99/1를 처리한 경우 세포생존율은 각각 52.4%(p<0.05)와 16.9%(p<0.01)로 나타나 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났으며, 이 때 INT50 값이 95/5에서 나타남으로써 뇌허혈유도의 MCV로 측정되었다(Table 4).

MCV인 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>가 포함된 용기에 신경세포를 각각 5분에서 40분간 노출시킨 후 세포생존율을 INT assay에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과, 5분간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 86.7%의 세포생존율을 보였다. 10분간 배양에 있어서는 62.2%로 대조군보다 낮게 나타났으며 20분간 배양에서는 대조군에 비하여 52.6%(P<0.05)로, 40분간 배양에서는 26.0%(p<0.01)로 각각 나타났다. 이 때 20분간 배양에서 MCV를 나타내었다(Table 5).

#### 2. 항산화제의 방어효과

4~10mM의 glutathione이 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 처리한 다음, 이를 다시 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>가 포함된 배양 용기에 신경세포를 10분 동안 노출시킨 후 세포생존율에 미치는 영향을 MTS assay에

의하여 조사하였다. 그 결과 glutathione 4mM의 처리에서는 세포생존율이 뇌허혈유도(37.3%)에 비하여 53.7%로 나타났고, 6mM과 8mM의 처리에서는 각각 69.0%와 74.6%로 나타났다. 10mM의 처리에 있어서는 88.5%( $p<0.05$ )로 세포생존율이 유의하게 증가한 것으로 나타났다(Table 6).

3. 羌活愈風湯(kangwhalyupungtang)의 방어효과  
羌活愈風湯(KWYPT)이 각각 15~90 $\mu$ g/ml의 농도로 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 다음, 이를 다시 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>에 의하여 유도된 뇌허혈에 10분 동안 처리하여 KWYPT이 세포생존율에 미치는 영향을 MTS assay에 의하여 조사하였다. 그 결과 허혈의 유도에서는 세포생존율이 대조군(100%)에 비하여 50.0%로 나타났고, KWYPT을 15 $\mu$ g/ml의 농도로 전처리한 경우 56.3%로 나타났으며, 또한 25 $\mu$

g/ml와 45 $\mu$ g/ml 농도의 처리에서는 각각 64.7%와 71.7%로 나타났다. 90 $\mu$ g/ml 농도의 처리에서는 82.5%( $p<0.05$ )로 나타남으로써 이는 뇌허혈만을 유도한 경우에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Table 7).

1) Neurofilament 측정

(1) 뇌허혈의 영향

95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>가 포함된 배양용기에 세포를 5분에서 20분간 노출시켜 뇌허혈을 유도한 다음 neurofilament EIA에 의하여 NF의 양적 변화를 대조군과 비교 조사하였다. 뇌허혈에 5분간 노출한 경우 neurofilament의 양적 변화는 대조군(100%)에 비하여 71.4%로 나타났으며, 10분간 노출한 경우는 66.7%로 나타났다. 15분과 20분간의 노출에서는 52.7%( $p<0.05$ )와 32.3%( $p<0.01$ )로 나타났으며, 이 때 EIA50 값인 MCV는 15분 배양에서 나타났다(Table 8).

(2) 羌活愈風湯(kangwhalyupungtang)의 효과

羌活愈風湯(KWYPT)이 각각 10~80mg/ml의 농도로 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 다음, 이를 다시 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>에 의하여 유도된 뇌허혈에 15분 동안 처리하여 KWYPT이 NF의 양적 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 뇌허혈의 유도에서는 NF의 양적 변화가 대조군(100%)에 비하여 46.1%로 나타났고, KWYPT을 10 $\mu$ g/ml의 농도로 전처리한 경우 61.5%로 나타났으며, 20 $\mu$ g/ml와 40 $\mu$ g/ml 농도의 처리에서는 각각 66.0%와 75.5%로 나타났다. 80 $\mu$ g/ml 농

**Table 4.** Absorbance (% of control) at 202nm wavelength for the INT assay on ischemic condition in cultured mouse cerebral neurons

Ischemic condition (%) [N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ]	INT absorbance (202nm)	Decrease rate of cell viability(%)
0	0.83±0.07	-
75/25	0.68±0.08	18.1
85/15	0.62±0.06	25.3
95/5	0.44±0.03*	47.6
99/1	0.14±0.01**	83.1

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to various combination of N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> for 20 min. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

**Table 5.** Time-response relationship of ischemia by INT assay in cultured mouse cerebral neurons

Ischemia(%) [N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ]	INT absorbance(202nm)				
	0min	5min	10min	20min	40min
0	0.78±0.06	0.75±0.08	0.74±0.05	0.76±0.07	0.73±0.04
95/5	0.76±0.08	0.65±0.07	0.46±0.04	0.40±0.03*	0.19±0.02**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with ischemia for various time intervals. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

**Table 6.** Dose-response relationship of glutathione ischemia by MTS assay in cultured mouse cerebral neurons

Ischemia(%) [N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ]	MTS absorbance(520nm) concentration of glutathione(mM)				
	0	4	6	8	10
0	0.51±0.04	0.54±0.02	0.58±0.03	0.63±0.07	0.61±0.06
95/5	0.19±0.01	0.29±0.03	0.40±0.05	0.47±0.04	0.54±0.08*

Cultured mouse cerebral neurons were treated with glutathione against ischemia for 10 min. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. \* $p<0.05$

**Table 7.** Dose-response relationship of KWYPT for its neuroprotective effect on ischemia by MTS assay in cultured mouse cerebral neurons

Ischemia(%) [N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ]	MTS absorbance(520nm) concentration of KWYPT(ug/ml)				
	0	15	25	45	90
0	0.46±0.03	0.48±0.05	0.51±0.06	0.53±0.04	0.57±0.07
95/5	0.23±0.01	0.27±0.02	0.33±0.04	0.38±0.04	0.47±0.06*

Cultured mouse cerebral neurons were preincubated with various concentrations of KWYPT for 2 hours before treatment with ischemia for 10 min. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. \*p<0.05

**Table 8.** Time-response relationship of ischemia by neurofilament enzymeimmuno assay(EIA) in cultured mouse cerebral neurons

Ischemia exposed time(min) [95%N <sub>2</sub> /5%CO <sub>2</sub> ]	EI absorbance(490nm)	Decrease of neurofilament(%)
0	1.67±0.17	-
5	1.19±0.14	28.6
10	1.13±0.12	33.3
15	0.88±0.07*	47.3
20	0.54±0.03**	67.7

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to ischemia for 5~20 min. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*p<0.05; \*\*p<0.01

**Table 9.** Dose-response relationship of KWYPT for its neuroprotective effect on ischemia by neurofilament EIA assay in cultured mouse cerebral neurons

Ischemia(%) [N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ]	EI absorbance(490nm) concentration of KWYPT(ug/ml)				
	0	10	20	40	80
0	1.52±0.16	1.56±0.14	1.59±0.15	1.63±0.17	1.65±0.18
95/5	0.70±0.06	0.96±0.08	1.05±0.09	1.23±0.13	1.36±0.15*

Cultured mouse cerebral neurons were preincubated with various concentrations of KWYPT for 2 hours before treatment with ischemia for 15 min. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. \*p<0.05

도의 처리에서는 82.4%(p<0.05)로 나타남으로써 이는 뇌허혈만을 유도한 경우에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Table 9).

#### IV. 考 察

뇌허혈은 뇌혈류의 감소로 인하여 산소와 당분의 공급이 차단되는 현상을 말하며, 관류압의 감소, 혈관 저항의 증가, 혹은 산소나 당분 공급의 감소 등에 의하여 뇌기능에 장애가 발생하는 현상을 일으킨다<sup>4,5</sup>.

뇌혈류량(cerebral blood flow)은 관류압과 뇌혈관의 저항에 의해 결정되며(CBF=perfusion pressure/vascular resistance) 정상적인 상태에서 관류압은 평균 동맥혈압(mean arterial pressure)과 비슷하고 혈압의 변화에도 자가조절기능에 의해 뇌혈류량은 일정하게 유지된다<sup>4</sup>. 휴식시 정상적 뇌의 혈류량은

50~55ml/뇌조직100g/min으로 뇌에 20ml /100g/min 이하의 혈류공급은 뇌세포의 전기생리학적 기능이상을 초래하게 되고, 15~18ml/100g/min에서는 시냅스 전달의 소실이 발생되며, 10ml/100g/min이하가 되면 세포막의 동적 평형이 파괴되어 세포외액의 K<sup>+</sup>농도가 증가되고 세포내로의 Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup> 및 H<sub>2</sub>O가 유입됨으로써 뇌부종 및 신경조직의 손상이 초래되어 결국 신경세포는 괴사하게 된다<sup>5</sup>. 그리고 뇌혈류량이 10~20ml/100g/min로 유지되는 부위는 전기생리학적 기능과 시냅스전달 등의 장애가 있으나 뉴런(neuron)들은 다만 그들의 기능이 정지되어 있을 뿐 죽지않은 상태를 지속하고 있으므로, 만약 재관류에 의한 혈류가 정상치로 회복된다면 이들은 기능을 회복할 수 있다<sup>4,5</sup>.

최근에 뇌허혈에 의한 뇌졸중이나 치태와 같은 난치성 질환의 병인적 요인의 하나로 산소자유기가 제

시되면서<sup>11,12</sup> 산소자유기의 산화적 손상측면에서 이들 병변에 대한 기전규명을 비롯하여 효과적인 치료 방법을 제시하기 위하여 많은 학자들에 의하여 꾸준한 연구가 진행되고 있다.<sup>10,13,14</sup>

산소자유기는 정상적으로 인체의 대사과정에서 소량 만들어지나 인체내의 항산화계에 속하는 superoxide dismutase(SOD)나 catalase와 같은 항산화제들이 소량으로 생성된 산소자유기를 물로 변환시킴으로써 인체에는 아무런 영향을 주지 않는다.<sup>15,16</sup> 한편 뇌허혈이나 저산소시 다량의 산소자유기가 생성되어<sup>17,18</sup> 이들이 곧 세포를 손상시키고 세포의 퇴화는 물론 나아가서 세포의 고사를 촉진시킴으로써 병변을 더욱 악화시키는 원인이 된다.<sup>9</sup>

뇌허혈이나 저산소시 산소자유기에 의한 세포고사의 기전으로, 산소자유기는 phosphoinositide-specific phospholipase C(PI-PLC)를 활성화시키고 이러한 결과로 생성된 diacylglycerol(DAG)이 calcium-phospholipid dependent PKC를 활성화시키는데, 더욱이 PKC의 활성화는 세포내 c-fos gene의 발현을 유도케하여 세포의 고사를 촉진시키며, 그 외에도 투과성의 증가를 비롯하여 세포증식의 변화 및 성장인자와 호르몬조절 등에 영향을 미친다고 보고되고 있다.<sup>19,20</sup> 그리고 PKA나 PKG는 cAMP와 cGMP를 활성화시키는데, 한편 PKC도 cAMP를 활성화시킨다는 주장이 대두되면서 이에 대한 관심이 높아가고 있다.<sup>24,25</sup>

이에 대한 최근의 연구로 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)의 경우 산소자유기가 뇌병변의 원인으로 밝혀졌는데<sup>22,23</sup> 이는 과도하게 생성된 산소자유기가 항산화효소에 의하여 미처 처리되지 못하여 환자의 뇌속에 축적됨으로써 신경계를 구성하고 있는 신경세포가 손상되어 발병되는 질환으로, 이것은 SOD-1 gene의 점돌연변이에 의한 다.<sup>24,25</sup>

또한 산소자유기는 죽상경화증에서 혈관내피세포에 reactive oxygen 중간산물을 발생시킴으로써<sup>26</sup> 이차신호전달물질이 생성되어 이로 인해 세포의 기능장애를 초래하는데, 이들은 세포로 하여금 vascular adhesion molecule(VCAM)-1이나 intercellular

adhesion molecule(ICAM)-1과 같은 물질을 생성하게 한다.<sup>27,28</sup>

한편 산소자유기와 흥분성아미노산과의 관계를 규명하기 위한 연구에서, 산소자유기는 흥분성아미노산을 분비케 함으로써 세포에 위치하고 있는 N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptor를 과활성시키고<sup>9,29</sup> NMDA receptor의 과활성은 Ca<sup>2+</sup>-ion channel을 통하여 결국 세포내의 칼슘의 균형을 깨뜨림으로써 세포를 퇴화시키거나 사멸케 한다.<sup>30</sup> 또한 세포내 과량 축적된 산소자유기는 phospholipase A2를 자극함으로써 새로운 산소자유기의 생성을 유도하고, 이는 세포에 존재하는 nitric oxide(NO)와 결합하여 peroxynitrate라는 맹독성물질을 생성함으로써 세포의 고사를 더욱 촉진시키게 된다.<sup>21,31</sup>

羌活愈風湯은 一名 愈風湯으로 龔<sup>3</sup>은 “初覺風動服此不致倒仆 此乃治未病之聖藥也 又治中風症 內邪已除 外邪已盡 當服此藥 以行導諸經 久服大風盡去”라 하였고, 또한 許<sup>3</sup>는 “中風內邪已除 外邪已盡 當服此藥而行導諸經 久即大風悉去 清濁自分 營衛自和矣”라 하여 風을 치료하는데 中腑中臟에 먼저 本藥으로 다스리고 이후에 羌活愈風湯으로 調理한다고 하였다. 또한 羌活愈風湯의 효능에 대해 “治肝腎虛筋骨弱 言語難 精神昏喎 或瘦而偏枯 或肥而不遂 或恐而健忘 或喜而多思 思忘之道 皆精不足也 能安心養神 調陰陽 使無偏勝”이라 하여, 歷代 醫家들에 의해 中風의 調理藥과 豫防藥으로 使用되고 있다.<sup>3</sup>

최근 羌活愈風湯에 관한 실험적 연구를 살펴보면, 文<sup>8</sup>은 KCN유발 저산소성 뇌장애의 보호효과와 家兔와 흰쥐에서 혈압강하작용 및 개구리의 심장운동을 억제시켰다고 보고하였고, 權<sup>9</sup>은 Cholesterol 負荷에 유발된 고콜레스테롤혈증 흰쥐에서 실험군의 혈청중 총콜레스테롤 함량, 중성지방함량과 인지질함량을 저하시키고 혈청중 HDL-cholesterol 함량을 상승시킴으로, 羌活愈風湯은 고지혈증으로 유발되는 허혈성 심질환, 고혈압, 동맥경화증 및 중풍 등을 예방할 수 있다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 중풍의 예방약과 조리약으로 사용되고 있는 羌活愈風湯이 뇌허혈에 의한 신경

세포손상에 미치는 영향을 구명하기 위하여 뇌허혈이 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하고, 또한 뇌허혈과 산소자유기와 관련된성을 조사하였다. 먼저 뇌허혈의 MCV인 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>에서 배양한 대뇌신경세포를 시간별로 노출시킨 결과, 세포생존율이 처리 시간에 의존적으로 감소하였다. 특히 10분과 20분간 뇌허혈 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 20-40%이상 유의하게 감소함으로써 뇌허혈이 대뇌신경세포에 독성을 나타내었다(Table 2). 이러한 결과는 뇌허혈시 산소자유기와 흥분성아미노산의 생성으로 인하여 신경세포를 손상함으로써 세포독성을 나타냈다는 Pelligrini Giampietro<sup>28</sup> 등의 연구결과 및 신생쥐에 저산소-뇌허혈을 유발시킨 결과 신경세포의 수적인 감소를 관찰하여 허혈에 의한 신경독성을 보고한 석<sup>18</sup> 등의 연구결과와 일치한다. 본 실험에서와 같이 뇌허혈이 신경독성을 보인 것은 허혈로 인한 혈류의 감소와 이로 인한 산소공급의 부족 등이 생체에 있어서 뇌세포의 대사이상을 유발시킨 이유도 배제할 수 없지만, 한편 뇌허혈 시 과다한 산소자유기의 생성으로 인하여 이들의 산화적 손상으로 세포의 퇴화를 촉진함을 시사한다<sup>9</sup>.

따라서 본 연구에서는 뇌허혈에 산화적 손상이 관여하는지 알아보기 위하여 허혈유도 전 항산화제인 glutathione을 대뇌신경세포에 처리한 결과, glutathione의 처리 농도에 비례하여 세포생존율을 증가시켰으며, 특히 10mM glutathione의 처리에서는 뇌허혈유도의 생존율(37.3%)에 비하여 88.5%(p<0.05)로 나타나 약 2배 이상의 생존율의 증가를 나타내었다(Table 6). 이러한 결과는 산소자유기에 의한 산화적 손상이 관여하고 있음을 제시하고 있으며 Yamamoto<sup>32</sup>등도 뇌허혈이 유도된 생쥐에 항산화제인 alphatocopherol을 투여한 결과 허혈로부터 뇌세포의 손상이 방어되었다고 보고하였다. 그리고 허혈유도에 대한 강활유평탕의 영향을 항산화제의 영향과 비교 조사하기 위하여, 15~90ug/ml의 羌活愈風湯이 각각 포함된 배양액에서 대뇌신경세포를 2시간 동안 전처리한 후 MTS assay에 의해 세포생존율을 조사한 결과, 羌活愈風湯은 처리한 농도에 비례하여 세포

생존율을 증가시켰으며 특히 90ug/ml 羌活愈風湯의 처리에서는 뇌허혈유도의 세포생존율(50.0%)에 비하여 82.5%(p<0.05)로 유의하게 높게 나타남으로써 허혈유도에 대한 항산화제인 glutathione의 세포생존율인 88.5%(p<0.05)와 거의 비슷하게 나타났다(Table 7). 이러한 결과는 羌活愈風湯이 항산화작용이 있음을 시사한다.

허혈유도에 있어서 신경세포에 대한 neurofilament (NF)의 양적 변화의 조사에서는 허혈의 노출시간에 비례하여 NF의 양이 대조군에 비하여 유의하게 감소되었다(Table 8). 이러한 결과는 허혈이 단백질합성계에 영향을 미침으로써 세포골격에 필요한 NF의 합성이 저해된 원인으로, 이것은 허혈을 유도한 대뇌신경세포에서 NF의 양적 감소를 보고한 이<sup>30</sup> 등의 연구결과와 일치하였다. 한편 뇌허혈에 의한 NF의 감소에 있어서 羌活愈風湯의 영향을 조사하기 위하여 10~80ug/ml의 각각의 농도로 대뇌신경세포를 전처리한 후 NF의 양적 변화를 조사한 결과, 羌活愈風湯의 처리 농도에 비례하여 NF의 양이 증가되었으며, 특히 80ug/ml 羌活愈風湯 처리에서는 허혈유도(46.1%)에 비하여 82.4%(p<0.05)로 유의하게 증가하였다(Table 9). 이는 羌活愈風湯이 세포내 단백질합성에 관여하는 내형질세망이나 리보솜 등과 같은 단백질 합성계에 영향을 주어 NF의 양적 증가를 나타낸 결과이다<sup>17,24</sup>. 그러나 NF의 감소현상에 대한 더욱 자세한 정보를 위해서는 단백질합성에 관한 분석이 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 뇌허혈에 의한 신경독성은 산소자유기에 의한 산화적 손상과 밀접한 관련이 있으며, 羌活愈風湯은 뇌허혈로 유도된 대뇌신경세포에 항산화작용에 의한 신경독성을 방어하는 것으로 보아, 중풍의 전조증에 예방약으로 또한 회복기 이후에 조리약으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 結 論

羌活愈風湯이 뇌허혈에 의하여 유발되는 신경세포 손상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 뇌허혈에 의

한 신경세포손상에 대한 독성효과를 MTS assay를 비롯하여 INT assay, neurofilament enzymeimmunoassay(NF-EIA)의 측정 및 이에 대한 羌活愈風湯의 영향을 in vitro assay에 의하여 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 羌活愈風湯은 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>에 의하여 유도된 뇌허혈에 10분 동안 처리한 대뇌신경세포에서 세포생존율을 농도의존적으로 유의하게 증가시켰다.
2. 羌活愈風湯은 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>에 의하여 유도된 뇌허혈에 15분 동안 처리한 대뇌신경세포에서 NF의 양을 농도의존적으로 유의하게 증가시켰다.

이상의 실험결과로 보아, 羌活愈風湯은 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 대하여 뇌허혈에 의한 신경독성을 방어하여 세포생존을 및 NF의 양을 농도에 의존하여 증가시켰으며, 그 기전과 관련하여 cAMP, LDH, PKC의 활성과의 관련성에 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

### 參考文獻

1. 朱震亨. 新編 丹溪心法附餘(卷之一), 서울: 大星文化社; 1993, p. 54-5.
2. 龔廷賢. 萬病回春, 서울: 醫聖堂; 1993, p.62-3.
3. 許浚. 東醫寶鑑, 서울: 南山堂; 1987, p.361..
4. 김진수, 최경규, 이명식. 최신신경학, 서울: 과학서적센터; 2000, p.307-9.
5. 대한신경외과학회. 신경외과학, 서울: 중앙문화진흥출판사; 1996, p.275-9.
6. 醫學教育研修院. 藥物療法, 서울: 서울大學校出版部; 1996, p.399, 402.
7. 權浚哲. 羌活愈風湯이 實驗의 高脂血症의 豫防에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院, 1997.
8. 文亨權. 羌活愈風湯의 效能에 關한 研究, 慶熙大學校 大學院, 1990.
9. Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 1994;37: 62-70.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Ap plication to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.

11. Dario G, Antonio C, Giuseppe P. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19: 257-67.
12. Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature(London)* 1988;336: 68-70.
13. Erencinska M, Silver IA. ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9: 2-19.
14. Ase K, Berry N, Kikawa U, Kishimoto A, Nishizuka Y. Differential down- regulation of protein kinase C subspecies in KM3 cells. *PEBS Lett* 1988;236: 396-401.
15. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* 1997;4: 2587-97.
16. Kham BV, Pathasarathy SS, Alexander RW, Medford RM. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;95: 1262-70.
17. Kontos H, Wei E, Ellis E Jenkins L, Povlishock J, Rowe G, Hess M. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cat. *Circ Res* 1985;57: 142-51.
18. 석정은, 오연균, 박승택 . 저산소성 뇌허혈 유발 신생쥐에 대한 vitamin E의 영향. *소아과*, 2001;44(7): 764-71.
19. Mattson MP, Cheng B, Smith-Swintosky VL. Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium and free radical mediated excitotoxic injury : Implications for treating neurogenerative disorders. *J Exp Neurol* 1993;124: 89-95.
20. 이소라, 오연균, 박승택 . 허혈 유도에 의해 손상된 신생쥐의 배양 대뇌신경세포에 대한 vitamin E와 Desferrioxamine의 보호효과. *소아과* 1999;42(10): 1426-33.
21. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992;258: 607-14.
22. Mayer ML, Westbrook GL. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cautions in mouse cultured central neurons. *J Physiol*

- 1987;394: 501-27.
23. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krrizus A et al. Mutation in Cu /Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature(London)* 1993; 362: 59-62.
  24. Michelon AM, Puget K. Cell penetration by exogenous superoxide dismutase. *Acta Physiol Scand Suppl* 1980;492: 67-77.
  25. Jackson GR, Apfell L, Werrbach-Perex K, Perex-Polo JR . Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balanced and neuronal injury in stimulation of hydrogen peroxide resistance. *J Neurosci Res* 1990;25: 360-8.
  26. Alexander RW. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: A new perspective. *Hypertension* 1995;25: 155-61.
  27. Borgers M, Vandeplassche G, van Reempts J. Cytochemical markers of ischemia in the heart and brain. *Histochem J* 1990;22: 125-33.
  28. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla V, Moroni F. Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 1990;10: 1035-41.
  29. Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology* 1996;17: 37-46.
  30. Choi DW .Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1987;7: 369-79.
  31. 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 alphatocopherol administration. *Stroke* 1983;977-82.
  32. Borenfreund E, Puerner JA. A Simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay(HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth* 1984;9:7-9.