

熱多寒少湯이 低酸素性 大腦神經細胞 손상에 미치는 影響

박수정* · 김형순* · 배영춘* · 이상민* · 김경요* · 원경숙** · 심규현***

Abstract

Influence of Yeoldahanso-tang on the Hypoxic Damage of Cultured Cerebral Neurons from mouse and SK-N-MC cells

Park Su-jeong* · Kim Hyoung-soon* · Bae Young-chun* · Lee Sang-min* · Kim Kyung-yo*
Won Kyoung-sook · Shim Gyue-hearn***

* Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang Univ.

** Dept. of Nuclear Medicine, College of Medicine, Keimyung Univ.

*** Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Sang-ji Univ.

To elucidate the neuroprotective effect of Yeoldahanso-tang(YHT) on nerve cells damaged by hypoxia, the cytotoxic effects of exposure to hypoxia were determined by XTT(SODIUM3,3'-{1-[(PHENYLAMINO) CARBONYL]-3,4-TETRAZOLIUM}- BIS (4-METHOXY-6-NITRO) BENZENE SULFONIC ACID HYDRATE), NR(Neutral red), MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and SRB(Sulforhodamin B) assay. The activity of catalase and SOD(Superoxide dismutase) was measured by spectrophotometry, and TNF- α (Tumor cell necrosis factor- α) and PKC(Protein kinase C) activity was measured after exposure to hypoxia and treatment of YHTWE. Also the neuroprotective effect of YHTWE was researched for the elucidation of neuroprotective mechanism. The results were as follows;

1. Hypoxia decreased cell viability measured by XTT, NR assay when cultured cerebral neurons were exposed to 95% N₂/5% CO₂ for 2~26 minutes in these cultures and YHTWE inhibited the decrease of cell viability.
2. H₂O₂ treatment decreased cell viability measured by MTT, and SRB assay when cultured cerebral neurons were exposed to 1-80 μ M for 6 hours, but YHTWE inhibited the decrease of cell viability.
3. Hypoxia decreased catalase and SOD activity, and also TNF- α and PKC activity in these cultured cerebral neurons, but YHTWE inhibited the decrease of the catalase and SOD activity in these cultures.
4. Hypoxia triggered the apoptosis via caspase activation and internucleosomal DNA fragmentation. Also hypoxia stimulate the release of cytochrome c from mitochondria. YHTWE inhibited the apoptosis via caspase activation induced by hypoxia.

From these results, it can be suggested that brain ischemia model induced hypoxia showed neurotoxicity on cultured mouse cerebral neurons, and the YHTWE has the neuroprotective effect in blocking the neurotoxicity induced by hypoxia in cultured mouse cerebral neurons.

Key word : Yeoldahanso-tang, Hypoxic Damage

* 원광대학교 한의과대학 사상체질과 ** 계명대학교 의과대학 핵의학과 ***상지대학교 사상체질의학과 대학원
교신처 : 박수정 주소) 전남 해남군 해남읍 우리한의원 전화) 061-536-9977
E-mail) taorgi@hanmail.net

I. 緒 論

뇌허혈로 인한 혈류 감소는 현기증, 기억상실, 지남력상실, 학습능력의 저하 등의 치매, 마비, 의식불명과 같은 치명적인 증상을 초래한다. 최근에 뇌허혈을 비롯한 중풍 및 치매와 같은 뇌질환에 산소자유기가 관여한다는 것이 밝혀지면서 뇌허혈을 비롯한 뇌병변의 기전을 산소자유기의 산화적 손상측면에서 규명하려는 연구가 많이 진행되고 있다. 뇌허혈시 세포 내의 산소결핍은 세포내 산화적인산화 반응을 차단하고, mitochondria의 ATP 생성 작용을 둔화시키며, 이로 인한 세포독성으로 뇌조직의 괴사나 세포의 손상을 초래하게 된다¹⁻²⁾. 또한 호기성세포에서는 mitochondria 내의 전자전달계에 의하여 산소자유기가 과량 생성되며, 이들이 세포 내의 glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase(SOD) 등에 의하여 치환되지 못하여 축적되면 뇌세포의 손상을 유발하게 된다³⁻⁵⁾. 따라서 뇌허혈은 산소자유기에 의한 산화적 손상과 밀접한 관련이 있으며, 산소자유기는 뇌졸중을 비롯한 여러 가지 신경의 퇴행성 병변과 밀접한 관련 있다고 보고되고 있다^{6,7)}. 특히, 과량 생성된 산소자유기는 세포막의 지질과산화반응을 촉진시켜 세포의 노화와 사멸을 초래하게 되며, phospholipase A2의 활성을 촉진시켜 새로운 산소자유기의 생성을 유도하고, 세포 내의 칼슘의 양을 증가시켜 세포손상을 가속화시킨다고 한다^{8,9)}. 또한 산소자유기는 nitric oxide(NO)와 작용하여 peroxy-nitrite라는 독성물질을 만들며, aspartate와 같은 흥분성 아미노산을 분비한다고 보고되었다¹⁰⁾. 세포내의 glutamate 수용체중의 하나인 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체는 Ca^{2+} 의 ion-channel과 밀접한 관계가 있으며, NMDA 수용체는 여러가지 흥분성아미노산의 자극에 의해 활성화되고³⁾, 세포 내 Ca^{2+} influx를 증가시키며, 이차적으로 세포 내 각종 효소나 이차 신호전달물질에 영향을 주고, 특히 세포내

칼슘의 증가는 이차전달자인 Ca^{2+} -dependent protein kinase C(PKC)의 활성을 촉진시킴으로서 결국 세포를 팽창시키거나 변형시켜 세포의 고사를 초래하고, 세포의 퇴행성 변화를 유발하며 신경병변을 가속화 시킨다¹¹⁾. 또한 산소자유기가 혈관내피세포에서 cytokine이나 intracellular adhesion molecule(ICAM)과 같은 물질들을 생성하여 동맥질환을 유발하고, 허혈시 생성된 산소자유기가 TNF- α 의 활성을 촉진시킬 것으로 보고된 바 있다. 이러한 이유로 최근에 산소자유기의 산화적 손상과 관련된 병변의 치료에 항산화제를 비롯한 NMDA 수용체의 길항제²⁾나, Ca^{2+} 의 길항제를 사용한 치료법이 모색되고 있다¹²⁾. 특히, 항산화제나 산소자유기의 제거제 등은 직접 과량 생성된 산소자유기를 제거함으로써 병변을 회복시키는데 중요한 역할을 한다는 연구결과에 의하여¹³⁾, 산소자유기의 산화적 손상과 이에 대한 산소자유기 제거제의 퇴행성 병변의 회복 및 손상방어효과에 대한 기전을 밝히려는 연구가 진행되어 왔다^{4, 14)}.

이러한 연구와 관련하여 최근에 뇌허혈이나 치매와 같은 각종 뇌질환에 한약이 뇌질환 치료에 유효하다는 연구가 보고되고 있으며 최근의 四象醫學 연구에서는 四象處方의 효과를 과학적으로 입증하고자 하는 여러 가지 시도가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 太陰人의 腦硬塞症 초기에 熱多寒少湯의 加味方들이 활용되고 있다는 점에 착안하여, 흰쥐의 大脳神經細胞를 배양하여 일정시간 저산소증으로 인한 in vitro 허혈 상태를 유도하여 발생하는 신경세포독성과 이에 대한 熱多寒少湯의 신경세포보호효과를 확인하였으며, 산소자유기의 일종인 Hydrogen peroxide(H_2O_2)로 유발되는 독성효과와 熱多寒少湯의 신경세포 보호효과를 관찰하였다. 또한 熱多寒少湯의 신경세포 보호효과와 기전을 분석해보기 위하여 SK-N-MC 세포를 이용하여 저산소증에 의한 신경세포의 세포고사에 미치는 熱多寒少湯의 효과를 분석하였기에 그 결과를 보고하

는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 實驗動物

本 實驗에 使用한 동물은 ICR 계통의 건강상태가 양호한 생후 3 일 된 생쥐를 使用하였다.

2) 藥材

本 實驗에 使用한 熱多寒少湯의 處方은 李濟馬의 東醫壽世保元¹⁵⁾에 근거하였으며, 1 칩의 분량은 다음과 같다.

Prescription of Yeoldahanso-tang(YHT)

Herbal Name	Scientific Name	Weight(g)
葛根	Radix Puerariae	16
黃芩	Radix Scutellariae	8
藁本	Rhizoma Ligustici	8
蘿蔔子	Semen Raphani	4
桔梗	Radix Platycodi	4
升麻	Rhozoma Cimicifugae	4
白芷	Radix Angelicae Dahuricae	4
Total amount		48

2. 實驗方法

1) 檢液의 調劑

檢液의 調劑를 위하여 熱多寒少湯의 구성 성분 100 g을 증류수 1L와 함께 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 2 시간 동안 電熱器로 煎湯한 후 煎湯液을 3,000 rpm에서 20분 간 원심분리하여 여과지로 여과하고, 진공 농축기로 감압농축한 후 凍結乾燥器에서

24 시간 凍結乾燥하여 분말 시료를 얻었다.

2) 藥劑 製造

本 實驗에 使用한 약제로는 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk), XTT (Sigma), NR (Sigma), trypsin (Sigma) 등은 각각 증류수에 녹여 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 實驗 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 培養液에 첨가하여 使用하였다. 熱多寒少湯 추출물의 투여는 분말을 증류수에 녹여 0.22 μ m의 micropore filter를 이용하여 멸균하여 使用하였다.

3) 細胞 培養

대뇌神經細胞의 분리는 田 등(1998)¹⁶⁾의 方法에 따라 施行하였다. 즉, 생후 3일 된 생쥐에서 적출한 뇌조직을 trypsin을 이용한 해리술에 의하여 분리한 다음 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하였다. 세척완료 후 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Gibco)으로 3회 세척 후 분리된 세포들은 poly-L-lysine (Sigma)으로 코팅된 96-multiwell에 3×10^6 cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 36°C, 95% air/5% CO₂로 조절된 정온기 내에서 培養하였으며 3 일 간격으로 새로운 培養液으로 교환하여 주었으며 7 일 동안 培養後 本 實驗에 使用하였다. 또한 SK-N-MC 세포는 37°C, 습도 CO₂ 5%, 95% air, FCS 10%의 DMEM에서 유지시켰다.

4) 虛血 誘導

허혈유도를 위하여 세포를 glucose-free Hanks' balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 교환후 95% nitrogen/5% CO₂로 조절된 정온기 내에서 일정시간 동안 노출시킨 후 허혈을 유도하였다. 대뇌신경세포나 SK-N-MC 세포가 80 % 차게될 때 세포는 자유산소를 제거하기 위해 혐기성 glove cabinet 이 봉해져 있는 습도가 있는 37°C incubator 에 5% CO₂와 95% N₂ 균형상태에서 배양했다. 산소농도는 blood gas analyzer로 측정하

였으며, chamber 내의 산소 농도는 배양 기간 동안 10 ppm 이내로 유지했으며, 반면 medium 의 산소분압은 hypoxic chamber 로 옮긴후 15 분, 30 분, 1 시간, 6 시간, 48 시간에서 4.3, 3.0, 2.2, 2.0 그리고 $2.0 \pm 0.2\%$ 까지 각각 떨어지는 상태를 유지했다.

5) 산소자유기 처리

H_2O_2 가 생쥐의 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정 시간 배양한 대뇌신경세포를 0.6% D-glucose가 함유된 MEM으로 3 회 세척한 다음 10~80 μM 을 여러 농도로 조합하여 혼합한 다음 이들 각각의 배양액에서 2-16 시간 동안 처리한 후 분석하였다.

6) 虛血의 細胞毒性 측정 및 熱多寒少湯추출물의 防禦效果 分析

① XTT, NR assay

XTT의 定量을 위하여 뇌허혈이나 한약추출물을 處理한 培養 대뇌神經細胞를 PBS로 3 회 세척한 후 전날 제조한 3 mg/ml의 XTT를 well당 最終濃度로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO_2 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養이 完了된 후 이를 DMSO로 處理한 다음 spectrophotometer로 530 nm에서 흡광도를 測定 後 對照群과 比較 調査하였다. NR의 定量은 Mosmann(1983)의 방법에 따랐다. 즉 허혈이나 한약추출물을 처리한 培養 대뇌神經細胞를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3 회 세척 후 전날 제조한 5 mg/ml의 NR을 well당 最終濃度로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37°C, 5% CO_2 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료 후 PBS로 3 회 세척후 1% formalin으로 處理한 다음 spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다.

② MTT, SRB assay

MTT 定量은 Mosmann³⁾의 방법에 의하였다. H_2O_2 나 약재추출물을 처리한 배양 신경세포

포를 PBS로 3 회 세척한 후 전날 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well당 最終濃度로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO_2 로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk)를 처리한 다음 spectrophotometer로 590 nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교 조사하였다. 산소자유기나 한약재 추출물로 일정시간 동안 처리한 대뇌신경세포에 0.4% sulforhodamine B를 200 μl 씩 첨가하여 1 시간 동안 실온에 방치한 다음 1.0% acetic acid로 3 회 세척하였다. 세척 완료후 10 mM Tris base를 이용하여 SRB-bound protein을 녹인 후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

③ catalase 및 SOD 활성측정

catalase 활성의 分析은 130 mM phosphate buffer(pH 7.0)와 12 mM H_2O_2 로 구성된 반응액에 효소액을 40 μl 를 가하여 잘 혼합하였다. 혼합완료후 반응을 정지시킨 후 catalase의 양적변화를 흡광광도계로 240 nm에서 측정을 하였으며 효소의 활성은 백 분율로 환산하였다.

허혈이나 한약추출물에 대한 SOD 활성의 測定은 1.5 ml Tris-buffer에 0.1 ml 효소용액과 효소반응액을 넣고 25°C에서 10 분 동안 반응시켰다. 반응완료 후 0.05 ml 1N-HCl을 가하여 잘 혼합한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

④ PKC 및 TNF- α 활성측정

저산소나 한약추출물을 일정 시간 동안 처리한 대뇌신경세포에서 TNF- α 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대뇌신경세포를 일정 시간 동안 처리한 후 anti-rabbit TNF- α 와 phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG 및 2,2'-azinobis를 처리한 다음 450 nm에서 정량 분석하였다. 또한 저산소나 한약추출물을 일정 시간 동안 처리한 대뇌신경세포를 변형된 Hu, Chakravarthy 등(1990)의 방법에 따라 분석하였다. 세포

를 냉각한 PBS로 세척하고 0.5 ml 의 냉각한 hypotonic lysis medium (1 mM NaHCO₃, 5 mM MgCl₂, and 100 μM phenylmethyl sulfonyl fluoride)에 2 분 동안 현탁하고 다시 2분 동안 vortexing하여 용해시킨다. 이러한 반응은 4°C 하에서 실시한다. 핵과 용해되지 않은 세포는 600 × g에서 5 동안 침전시킨다. Membrane과 cytosol 분획은 100,000 × g에서 10 분 동안 초원심 분리(Beckman TL-100 ultracentrifuge) 한다. 막의 PKC 활성은 MARCKS protein에 특이적인 PKC-인산화에 해당하는 peptide substrate인 Ac-FKKKSFKL-NH₂을 이용하여 측정하였다.

이 기질 peptide는 모든 주요한 PKC isoforms에 의해 동등하게 인산화되는 것으로 밝혀졌다. assay를 위한 반응액에는 assay buffer(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 μM CaCl₂, 100 μM sodium vanadate, 100 μM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium fluoride, and 100 μM phenylmethylsulfonyl fluoride)에 3-8 μg의 단백질을 포함하는 20-50 μl의 membrane suspension 용액과 10 μl의 750 μM PKC 기질 peptide (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)를 가하고 총 용량을 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 90 μl가 되게 최종적으로 조정하였다. 반응은 10μl의 500μM [³²P]ATP (220 cpm/pmol in Tris buffer; 0.5 mCi/tube)로 시작하여, 25°C에서 10분 동안 반응하고, 10μl의 5% acetic acid로 반응을 정지시켰다. 반응액을 16,000 × g에서 5 분 동안 원심분리하였다. 90 μl의 상청액을 P81 Whatman paper에 옮기고 건조하였다. 그것을 5% acetic acid로 10분 동안 가볍게 stirring 하여 세척하였다. P81 종이에 부착한 radioactivity는 섬광계수기에 의하여 측정하였다. 기질 peptide에 환합된 radioactivity를 계산하기 위하여 비특이적 결합은 peptide가 없는 상태의 결

과로서 결정하였다.

⑤ LDH 측정 및 DNA 분절현상

LDH 활성은 200 mM Tris-HCl buffer, 1.5 mM NAD, 0.32 mM HCl과 시료를 혼합한 후 37°C에서 5 분 동안 처리한 다음 0.1 N HCl을 넣어 잘 혼합한다. 혼합 후 반응이 완료된 다음 500nm에서 흡광도를測定하여 對照群과 比較 調査하였다. DNA 분절현상을 관찰하기 위하여 세포들은 PBS로 세척하고, lysis buffer(10mM Tris-HCl; pH7.4, 5mM EDTA, 0.5% Triton X-100)를 이용하여 4°C에서 20분 간 용해시킨 후 4°C에서 15 분 간 27000×g 에서 원심분리 하였다. 상층액의 DNA는 페놀, 페놀/클로로포름(1:1,v/v), 그리고 클로로포름의 세 단계로 추출되었다. 그리고 DNA는 0.1 vol. 3M sodium acetate (pH 5.2)와 2 vol. ethanol로 침전되었다.

DNA는 TE buffer(10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA)로 용해하였고 37°C에서 1 시간 동안 40 μg/ml RNase A를 처리했다. DNA 농도는 260 nm 에서 흡광도로 확인하고, 20 mg DNA를 TAE buffer(40mM Tris-Hcl; pH 8.5, 2mM EDTA)로 1.5% gel 상에서 전기 영동 하였다. 전기영동 후 15 분 간 0.5 mg/ml ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator를 통하여 확인하였다.

⑥ 형태학적 변화

DNA의 염색은 5 x 10⁵ 개의 세포를 2 μg/ml DAPI (Sigma)로 30 분 동안 37°C에서 시행하고, 형광현미경으로 관찰하였다. DAPI 염색은 원형질막을 투과하여 염색체를 푸르게 염색한다. 살아있는 세포는 정상적인 핵 크기와 푸른 형광을 보이고, 반면에 세포 고사가 일어난 세포는 응축된 염색체와 분절된 핵을 관찰할 수 있다.

⑦ Caspase 활성 측정 및 Western Blot 측정법

SK-N-MC 세포는 60 mm plates 에서 지정된 시간 동안 저산소증 상태의 chamber에

서 배양되었다. 저산소증 처치 후 배양액을 제거하고 세포를 PBS로 씻은 후 50 μ l lysis buffer(50mM Tris-HCl; pH7.4, 1mM EDTA, 10 mM digitonin)을 첨가했다. 그 세포들을 37°C에서 10분 간 배양했다. 배양 후, 부유물을 10분 간 15,000 rpm에서 원심분리했다. 다음으로 분리한 lysate (50 μ g protein)를 30분 간 50 uM Ac-DEVD-MCA나 60 분 간 Ac-YVAD-MCA와 함께 배양했다. 분비된 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) 의 양은 380 nm 에서 excitation 하고 460 nm에서는 emission 하는 spectrofluorometer 를 이용하여 측정했다. 한 단위는 37°C에서 분당 AMC 1 pmol 분비하는 것을 효소 요구량으로 정의되었다. Western Blot 측정법에 의해 5×10^5 세포를 냉각된 PBS로 두 번 씻고, buffer A 500 μ l (50 mM Tris; pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM sucrose, 2 mg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, and 1 mg/ml pepstatin)를 첨가 했다. 세포들은 Dounce homogenizer를 이용하여 분쇄하였으며, 분쇄물은 초원심분리에 의해 cytosol과 membrane 조각으로 분리되었다. 분해물과 membrane은 SDS sample buffer와 함께 5 분 간 끓였다. 동량의 각각의 샘플들은(20 μ g) 4°C에서 1 시간 동안 100 V로 12% SDS-PAGE를 했고, nitrocellulose filter에 transfer 했다. filter는 상온에서 1 시간 동안 5% non-fat milk가 들어있는 TBST(10mM Tris-HCl; pH 7.5, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 처리하였다. Human anti-Ich-1 (caspase-2, Santa Cruz), anti-caspase-3(PharMingen), anti-PARP (Clontech)를 1 차 항체로 사용하였고, horseradish peroxidase

-labeled goat 또는 mouse Ig를 2 차 항체로 사용하였다. 항체반응 밴드는 chemiluminescence (ECL Western detection kit)로 보여졌다. Cytochrome c 단백질은 mouse 단일클론성 anti-cytochrome c 항체를 이용하여 Western blot 분석을 하였다.

7) 統計 處理

實驗 結果에 대한 유의성의 검정은 Student-t test에 의하였으며 p 값이 0.05와 0.01 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

III. 實驗成績

1. 저산소증에 의한 대뇌신경세포의 손상과 熱多寒少湯의 보호작용

저산소증에 따른 in vitro ischemia에 노출된 시간 및 熱多寒少湯의 처리가 배양된 대 뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 저산소 상태로 조절된 정온기에서 세포를 각각 2시간에서 16시간 동안 노출시켰다. 그 후 세포의 생존율을 XTT 법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 2 분 간 노출군에서는 정상군에 비하여 세포생존율이 10.9% 감소하였으며, 또한 4시간, 8시간, 16시간 노출군에서는 각각 30.9, 47.3(p<0.05), 76.4% (p<0.01)로 감소하였다. 특히 8시간 간 노출군에서 XTT₅₀ 값을 나타냈다. 또한 NR 정량으로 측정된 결과도 이와 유사한 결과를 보였다(Table 1A). 熱多寒少湯을 투여한 실험에서는 이러한 세포 생존률의 감소가 농도 의존적으로 억제되는 경향을 보였다((Table 1B). 이러한 결과는 저산소증의 세포독성효과를 보여주는 것이며 熱多寒少湯가 저산소증 세포독성을 완화하는 효과를 나타낸 것이다.

Table 1. Analysis of hypoxic injury after in vitro ischemia in cultured mouse cerebral neurons and the neuroprotective effect of YHTWE

(A) Time-dependent relationship of cell viability after exposure to in vitro ischemia

Experimental Group	Time of exposure to in vitro ischemia (hour)				
	0	2	4	8	16
XTT absorbance (U/ml)	0.55±0.06	0.49±0.03	0.38±0.05	0.29±0.03*	0.13±0.01**
NR absorbance (U/ml)	0.56±0.06	0.47±0.03	0.36±0.03	0.28±0.02*	0.14±0.02**

(B) YHTWE dose-dependent relationship of cell viability after exposure to in vitro ischemia

Experimental Group	Concentration of YHTWE(μg/ml)				
	0	25	50	100	200
XTT absorbance (U/ml)	0.59±0.05	0.51±0.04	0.43±0.04	0.49±0.03*	0.42±0.03**
NR absorbance (U/ml)	0.60±0.04	0.53±0.06	0.42±0.05	0.39±0.03*	0.35±0.04**

Cultured cerebral neurons were treated with hypoxia with various time intervals and various concentration. YHTWE: Yeoldahanso-tang water extract. Data of (A) and (B) were measured by XTT and NR assay. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value, *p<0.05; **p<0.01.

2. 산소자유기 처리로 인한 대뇌신경세포의 손상과 熱多寒少湯의 보호작용

H₂O₂ 로 유도된 산소자유기가 배양된 대뇌 신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 H₂O₂가 10 μM에서 80 μM 까지의 농도로 조절된 배양액에서 대뇌신경세포를 6 시간 동안 배양한 후 H₂O₂의 독성효과를 MTT assay 법에 의하여 조사한 결과 10, 20 μM의 H₂O₂ 처리군에서는 세포의 생존율이 정상군(100%)에 비하여 각각 72.4, 63.5%로 나타났다. 40, 80 μM의 H₂O₂ 처리군에서는 세포의 생존율이 46.7(p<0.05), 34.8%(p<0.01)로 정상군과 비교하여 유의성있는 감소 결과를 보였으며, SRB 법으로 결과도 이것과 유사한 경향을 보였다(Table 2A). H₂O₂ 처리시간에 따른 영향도 역시 8 시간 이상 처리한 실험군에서는 유의성있는 세포생존률의 감소를 확인할 수 있었다(Table 2B). MTT₅₀ 값에 준하는 40 μM의 H₂O₂, 8 시간을 처리하고 熱多寒少湯을 투여한 실험군에서는 100 μg/ml를 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 유의성있는 세포생존률의 감소가 억제되는 결과를 보였다(Table 3C).

Table 2. Analysis of H₂O₂-induced neurotoxicity in cultured mouse cerebral neurons and the neuroprotective effect of YHTWE

(A) Concentration-dependent relationship of cell viability by H₂O₂-induced neurotoxicity

Assay Method	H ₂ O ₂ Concentration(μM)				
	0	10	20	40	80
MTT absorbance (% of control)	100	72.4±6.3	63.5±5.1	46.7±4.3*	34.8±3.9**
SRB assay (% of control)	100	71.1±6.5	61.3±6.5	48.5±3.8*	36.9±3.3**

(B) Time-dependent relationship of cell viability by H₂O₂-induced neurotoxicity

Assay Method	H ₂ O ₂ Incubation Time (hour)				
	0	2	4	8	16
MTT absorbance (% of control)	100	80.3±7.1	61.4±5.6	43.6±4.1*	22.5±1.9**
SRB assay (% of control)	100	74.9±6.4	60.1±5.5	41.4±4.0*	29.5±3.1**

(C) YHTWE dose-dependent relationship of cell viability by H₂O₂-induced neurotoxicity

Assay Method	Concentration of YHTWE(μg/ml)				
	0	CONT	50	100	200
MTT absorbance (% of control)	100	42.8±3.3	51.7±5.5	65.8±4.3*	59.7±3.9
SRB assay (% of control)	100	44.4±4.7	59.2±5.6	69.5±4.1*	62.6±6.8

Cultured cerebral neurons were treated with hydrogen peroxide(H₂O₂) and YHTWE with various time intervals and various concentration. YHTWE: Yeoldahanso-tang water extract. Data of (A), (B), and (C) were measured by MTT and SRB assay. (A) Cultured cells were exposed to 10, 20, 40, 80 μM for 6 hours, respectively. (B) Cultured cells were exposed to 40 μM for 1, 3, 6, 12 hours, respectively. (C) The cultured cells were preincubated with various concentration of YHTWE, 25, 50, 100, and 200 μg/ml, respectively, for 2 hours before exposure to 40 μM H₂O₂ for 8 hours. All values represented the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value, * p<0.05; ** p<0.01.

3. 항산화효소(Catalase, SOD)의 활성 측정

저산소증이 catalase와 SOD 등의 항산화 효소에 미치는 영향을 관찰하였다. 저산소증 처리 시간이 30 분 이상 경과하면 catalase는 정상군에 비하여 53.7(p<0.01), 46.7(p<0.01), 27.6(p<0.01)%로 활성이 유의성있게 감소하는 경향을 보였으며, SOD는 57.8(p<0.05), 43.2(p<0.01), 32.6(p<0.01)%로 활성이 유의성 있게 감소하는 경향을 보였다(Table 3A). 세포생존률₅₀에 준하는 값인 저산소증의 30 분 처리와 熱多寒少湯을 2 시간 동안 전처리한 실험군에서 熱多寒少湯 추출물을 100 μg/ml 이상 투여한 실험군에서 catalase는 정상군에 비하여 63.1, 82.1(p<0.01), 78.4(p<0.05)%로 증가하는 경향을 보였으며, SOD는 68.3, 85.1(p<0.01), 77.3(p<0.05)%로 활성이 증가하여 유의성있는 감소의 억제를 관찰할 수 있었다(Table 3B).

Table 3. Analysis of antioxidant enzyme activation in cultured mouse cerebral neurons exposed to in vitro ischemia and the neuroprotective effect of YHTWE

(A) Time-dependent change of catalase and SOD activation in hypoxia-induced neurotoxicity

Enzyme Activation	Exposure time to hypoxia(min)				
	0	10	30	60	120
Catalase activation (% of control)	100	83.6±7.8	53.7±6.6**	46.7±8.4**	27.6±4.6**
SOD activation (% of control)	100	79.4±8.3	57.8±7.7*	43.2±4.8**	32.6±4.6**

(B) YHTWE dose-dependent change of catalase and SOD activation in hypoxia-induced neurotoxicity

Assay Method	Concentration of YHTWE($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	0	CONT	50	100	200
Catalase activation (% of control)	100	52.8 \pm 6.1	63.1 \pm 5.4	82.1 \pm 6.6**	78.4 \pm 7.1*
SOD activation (% of control)	100	51.1 \pm 5.4	68.3 \pm 7.5	85.1 \pm 7.5**	77.3 \pm 6.9*

Cultured cerebral neurons were exposed to hypoxia and YHTWE with various time intervals and various concentration. YHTWE: Yeoldahanso-tang water extract. The activation of catalase and SOD was measured by spectrophotometry. (A) Cultured cells were exposed to hypoxia for 5 to 40 minutes. (B) Cultured cells were exposed to hypoxia for 20 minutes and preincubated for 2 hours with various concentration of YHTWE before it was exposed to hypoxia for 30 minutes. All values represented the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value, * p<0.05; ** p<0.01

4. TNF- α 와 PKC 활성 측정

저산소증 처리 및 熱多寒少湯이 배양된 대뇌신경세포에 미치는 영향을 TNF- α 및 PKC의 활성의 측면에서 조사하기 위하여 신경세포를 저산소증 상태에 각각 10분에서 120 분까지 노출시킨 후 저산소증의 처리시간에 따른 TNF- α 와 PKC의 양적 변화를 정상군과 비교하였으며, 각각의 값은 pg/ml(TNF- α)와 다. 1×10^3 cpm/ μg protein(PKC)으로 표시하였다. 60 분 이상을 저산소에 노출한 실험군에서 TNF- α 값이 정상군에 비하여 49.0%의 유의성있는 증가가 관찰되었으며,

PKC의 값은 저산소증 처리가 30 분 이상되는 실험군에서 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었다(Table 4A). 熱多寒少湯이 TNF- α 와 PKC 활성화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 3 시간동안 熱多寒少湯을 전처리하고 60 분 동안 저산소증에 노출한 결과 저산소 처리로 각각 73.7%와 51.4%로 증가한 TNF- α 와 PKC 활성이 熱多寒少湯 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 실험군에서 TNF- α 와 PKC 활성 증가되는 경향을 보였으며, 특히 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 熱多寒少湯를 투여한 실험군에서는 TNF- α 의 값이 대조군에 비하여 30.7%로 유의성있는 감소의 결과를 보였다(Table 4B).

Table 4. Analysis of TNF- α and PKC activity in cultured mouse cerebral neurons exposed to in vitro ischemia and the neuroprotective effect of YHTWE

(A) Time-dependent change of TNF- α and PKC activity in hypoxia-induced neurotoxicity

Enzyme Activation	Exposure time to hypoxia(min)				
	0	10	30	60	120
TNF- α (pg/ml)	313.6 \pm 25.7	339.5 \pm 31.7	387.9 \pm 43.5	467.4 \pm 44.2*	543.6 \pm 37.5**
PKC activity (1×10^3 cpm/ μg protein)	4.9 \pm 0.5	4.4 \pm 0.5	5.9 \pm 0.6	5.5 \pm 0.7	5.1 \pm 0.7

(B) YHTWE dose-dependent change of TNF- α and PKC activity in hypoxia-induced neurotoxicity

Enzyme Activation	Concentration of YHTWE($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	0	CONT	50	100	200
TNF- α (pg/ml)	295.6 \pm 37.2	513.6 \pm 28.5	432.6 \pm 38.8	355.7 \pm 27.5*	432.6 \pm 51.4
PKC activity (1×10^3 cpm/ μg protein)	3.5 \pm 0.5	5.3 \pm 0.4	5.1 \pm 0.6	4.7 \pm 0.04	4.6 \pm 0.7

Cultured cerebral neurons were exposed to hypoxia and YHTWE with various time intervals and various concentration. YHTWE; Yeoldahanso-tang water extract. The activation of PKC and TNF- α was measured by radioactivity using liquid scintillation counter immunobersent assay. (A) Cultured cells were exposed to hypoxia for 10 to 120 minutes. (B) Cultured cells were exposed to hypoxia for 60 minutes and preincubated for 3 hours with various concentration of YHTWE before it was exposed to hypoxia for 60 minutes. All values represented the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value, * p<0.05; ** p<0.01

5. 저산소증으로 유도되는 신경세포고사와 熱多寒少湯의 항세포고사 작용

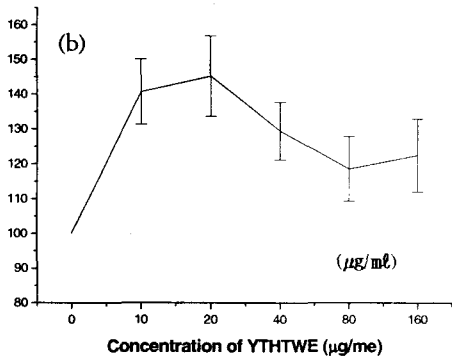
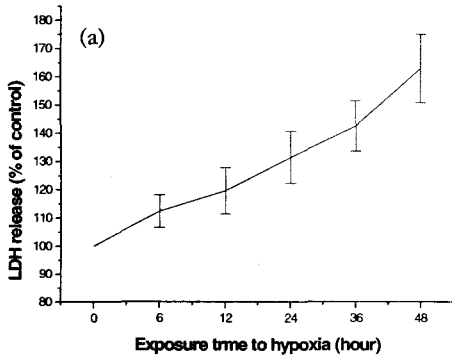
저산소 처리가 SK-N-MC 세포의 세포사멸을 유도하는지를 확인하기 위하여 저산소 처리 후 SK-N-MC 세포에서 LDH 유리를 세포배양액에서 측정하여 세포손상을 확인하였다. 6 시간 동안 저산소 처리를 하면 LDH 유리가 10% 증가하였으며 24 시간 이상 처리하면 저산소처리를 하지 않은 정상군에 비하여 LDH 유리가 30%(24hr), 40%(36hr), 60%(48hr)로 유의성있는 증가를 보여 시간의존적으로 저산소 처리에 의한 LDH의 증가를 나타냈다(Fig. 1Aa). 24 시간 동안 저산소 처리하는 동안 熱多寒少湯을 10, 20, 40, 80, 160 μ g/ml 씩 처리하고 배양액 내로의 LDH의 유리를 측정한 결과 40 μ g/ml 이상의 熱多寒少湯을 처리한 실험군에서 LDH의 유리가 감소하는 경향을 나타냈으며, 특히 80 μ g/ml의 熱多寒少湯을 투여한 실험군에서 저산소만을 처리한 대조군에 비하여 유의성있는 LDH의 감소가 관찰되었다(Fig. 1Ab). 이러한 세포사멸이 세포고사(apoptosis)에 의한

것인지 세포괴사(necrosis)에 의한 것인지 구별하기 위하여 추가 실험을 시행하였다. 즉 internucleosomal DNA 단편화 실험과 chromatin dye를 이용하여 핵의 형태 관찰을 시행했다. 저산소 처리한 세포에서 DNA는 아가로스 젤 전기영동을 이용해 oligonucleosomal fragmentation을 확인한 결과 저산소 처리한 SK-N-MC 세포에서 추출한 낮은 분자량(180 base)의 DNA는 LDH 유리의 증가와 유사하게 나타났다. 즉 ethidium bromide로 염색된 아가로스 젤 상에서 시간의존적으로 oligosomal DNA ladder가 생성됐다(Fig. 1Ba). 熱多寒少湯가 DNA 단편화에 미치는 실험을 한 결과 24 시간 저산소 처리를 하면서 熱多寒少湯을 50, 100, 150 μ g/ml를 처리한 실험군에서는 DNA의 단편화 현상이 나타나지 않은 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1Ab). 또한 DAPI 염색을 통하여 핵의 형태학적 변화를 관찰한 결과 저산소처리를 하지 않은 정상군에서는 핵 응축이 관찰되지 않았으며, 저산소 처리 시간의존적으로 핵의 응축과 염색체의 단편화 양상 및 apoptotic body를 관찰할 수 있었으며, 24 시간 저산소 처리를 하면서 熱多寒少湯을 투여한 실험군에서는 핵의 응축과 염색체의 절편이 보이는 하지만 핵의 응축 및 염색체의 단편화가 억제되는 핵의 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

이러한 저산소 처리로 인한 SK-N-MC 세포의 세포고사 현상에 관여하는 기전을 알아보기 위하여 핵의 단편화의 최종 경로인 caspase-3의 활성화 양상을 형광분석법과 Western blotting을 통하여 확인하였고, caspase의 기질인 PARP 단백질의 분절화로 인한 현상을 관찰하였다. 즉 저산소 처리를 시행한 결과 시간의존적으로 caspase-3의 활성화를 관찰할 수 있었으며, 24 시간 저산소 처리 후 유의성있는 증가를 나타냈으며(Fig. 3Aa), 24 시간 저산소 처리와 함께 熱多寒少湯을 투여한 결과 caspase-3의 활성이 억제되는 경향을 보였고, 특히 熱多寒少湯 80 μ g/ml의 처리군에서는 현저한 감소 현상을 보였다(Fig. 3Ab).

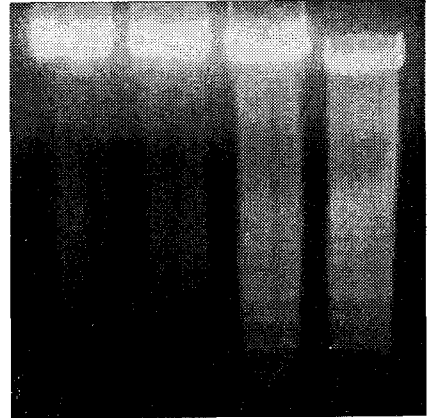
그리고 caspase-3의 기질 중의 하나인 PARP가 caspase의 활성화와 함께 가수분해되는 양상을 보였으며, 熱多寒少湯를 투여한 실험군에서는 이러한 가수분해 양상이 억제되는 것을 보였다(Fig. 3B). 그리고 cytochrome c의 유리를 관찰하기 위하여 세포질과 membrane에서 cytochrome c의 양을 Western blot 분석에 의해 측정 하였다. 저산소 처리 후 세포질에서의 cytochrome c의 양은 증가되는 경향을 보여 막손상으로 인하여 유리되는 결과를 보였으며, 이것 또한 熱多寒少湯의 처리로 이러한 양상이 감소되는 결과를 보였다(Fig. 3B). membrane 조각에서의 cytochrome c의 양은 시간 의존적 방식에 상응한 감소를 보였으며, 이러한 경향은 熱多寒少湯의 투여로 억제되는 경향을 나타냈다(Fig. 3B).

(A) LDH release



(B) DNA Fragmentation

Exposure to hypoxia (hour)
0 12 24 48



Concentration of YHTWE (μg/ml)
0 10 50 100 150

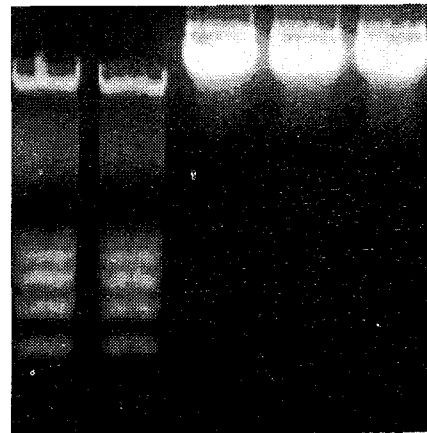
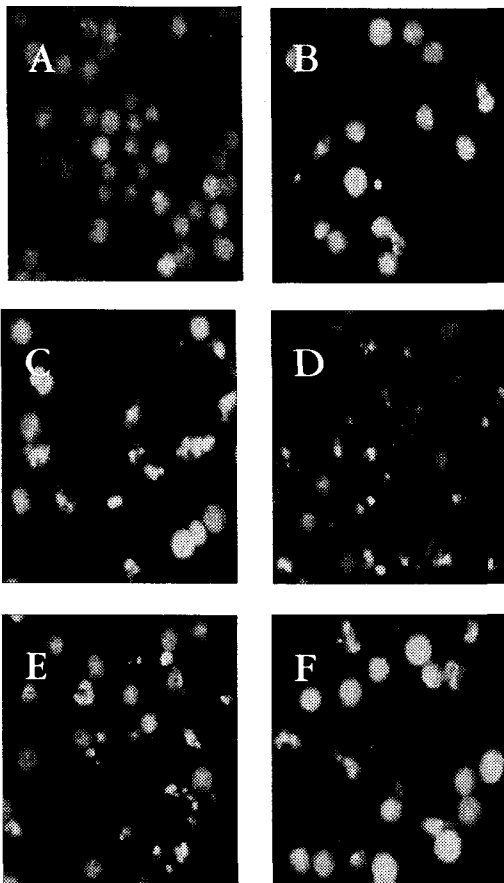


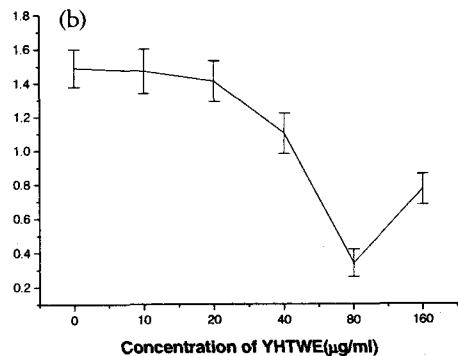
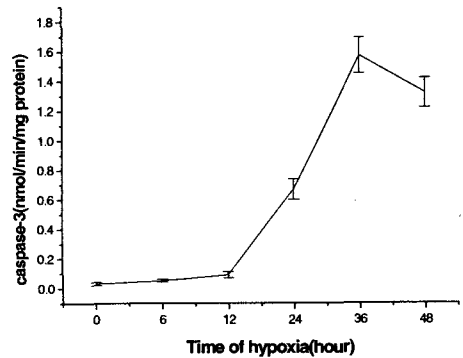
Fig. 1. Apoptosis induced by exposure to hypoxia in SK-N-MC cells and antiapoptotic properties of YHTWE. A: Time-dependent change of LDH leakage during hypoxia and YHTWE treatment. The cells were exposed to hypoxia for the indicated periods, 6,

12, 24, 36 and 48 hours and treated with various concentration of YHTWE, 10, 20, 40, 80, and 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 24 hours of exposure to hypoxia. The LDH leakage was measured by spectrophotometry at 570 nm wavelength. B: Time course of DNA fragmentation in response to hypoxia and effect of YHTWE on hypoxia-induced DNA fragmentation. (a); SK-N-MC cells were exposed to hypoxia for various periods (0, 12, 24, and 48 hours). (b); The cells were exposed to hypoxia for 24 hours and treated with various concentration of YHTWE, 10, 50, 100, and 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 24 hours of exposure to hypoxia.

Fig. 2. Morphologic changes of apoptotic nucleus of SK-N-MC cells exposed to hypoxia and antiapoptotic effect of YHTWE. Hypoxia induced nuclear DNA condensation and fragmentation. Fluorescence micrographs were taken of cells stained with DAPI. Cultured cells incubated with normoxia (A), hypoxia (B) 6 hours, (C) 24 hours, (D) 48 hours, and YHTWE (E) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and (F) 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 24 hypoxia. DNA condensation and fragmentation were observed in (C) and (D), and DNA condensation and fragmentation was rarely observed in (E) and (F).



(A) Effect of hypoxia and YHTWE on caspase activation



(B) Western blot analysis of caspase-3, PARP, and cytochrome c

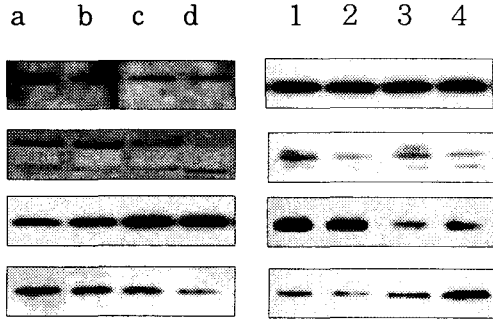


Fig. 3. The change of caspase-3 activation and decrease in proforms of capase-3, PARP, and cytochrome c release induced by hypoxia and treatment of YHTWE in SK-N-MC cells. A: The activation of caspase-3 in SK-N-MC cells were observed after exposure to hypoxia for the periods indicated and treatment of YHTWE for 36 hours. The caspase-3 activity was measured as described in Materials and Methods. Data represented the mean±SE of triplicate reactions. B: Representative Western blot analysis demonstrating the response to hypoxia and YHTWE treatment. Expressions of caspase-3, PARP, and release of cytochrome c. Lane a: normoxia, b: exposure to hypoxia for 12 hours, c: 24 hours, d: 48 hours. Lane 1: hypoxia for 36 hours, 2: treatment of YHTWE 40 μg/ml during exposure to hypoxia, 3: treatment of YHTWE 80 μg/ml during exposure to hypoxia, 4: treatment of YHTWE 160 μg/ml during exposure to hypoxia

IV. 考 察

韓醫學에서 저산소증에 의한 대뇌신경세포 손상을 운동마비나 지각마비를 나타내는 中風의 범주에서 다루었다고 볼 수 있다.

四象醫學에서는 기존의 辨證施治의 이론과는 달리 모든 사람은 大小의 臟局이 있으며, 이들 간의 相互 均衡과 調和가 깨질 때에 病理 反應이 나타나게 된다고 보고 있다¹⁷⁾. 예를 들면 太陰人의 경우 中風·高血壓·高脂血症 등 성인병의 발생율이 다른 체질에 비해 높게 나타나는데¹⁸⁻²⁰⁾ 이런 현상은 太陰人의 臟局이 肝大肺小하여 이런 불균형이 심화되면 呼散之氣는 不足하고 吸取之氣는 太過하게 되기 때문이라고 보고 있다. 따라서 이러한 병적 변화에 수반되는 臟局間의 不均衡을 시정하여 주는 것이 치료의 주된 방향이라 할 수 있다. 太陰人 肝受熱裏熱病을 치료하도록 開發된 熱多寒少湯은 『東醫壽世保元』 「新定太陰人應用要藥二十方」에 그 내용이 소개되어 있다²¹⁾. 李濟馬는 이 處方으로 癩病, 燥熱病, 夢泄病 등을 치료하였는데, 근래에 熱多寒少湯 및 그 加味方들은 太陰人 處方들 중 太陰人의 中風 初期 段階에 가장 사용빈도가 높은 것으로 알려져 있다²²⁾. 따라서 허혈로 인한 뇌경색증의 치료에 熱多寒少湯을 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 이에 근거하여 대뇌신경세포를 *in vitro* 허혈모델에 노출하고 이 세포의 손상정도와 기전을 확인하고 熱多寒少湯의 신경세포 보호작용을 확인하였다.

최근 뇌허혈이나 저산소증에 산화적 손상이 관여한다는 보고가 많이 되고 있다^{2,23)}. 따라서 뇌질환에 대하여 많은 연구자들은 이들의 병인적 현상에 대한 기전규명과 효과적인 치료방법에 대하여 꾸준히 연구를 진행하여 왔다^{6,10,13,16,24)}. 세포에 충분한 산소공급이 이루어지지 않으면 신경계의 가장 급성적인 세포손상을 받게 된다^{6,9,25)}. 특히, 뇌세포는 잠시라도 산소공급이 부족하게 되면 크게 손상을 받는 저산소증에 가장 민감하게 반응하는

세포이다. 따라서 저산소증은 뇌질환의 중요한 병인의 하나로 인식된다^{5,11,26}. 만성적인 저산소증은 뇌세포의 손상으로 인하여 언어장애를 비롯하여 학습장애, 기억력 상실 등을 가져오며 심하면 간질이나 치매와 같은 증후를 야기하기도 한다^{27,28}. 특히, 저산소증 노출의 초기에는 세포 내의 다양한 생화학적 변화를 초래하게 되는데 그 중 하나가 활성산소의 생성이다^{1,16,29}. 즉, 저산소증이나 이로 인한 허혈은 세포 내 산화적 인산화반응의 차단으로 인하여 ATP의 생산 저하가 유발되며 이로 인한 ATP의 대사과정에서 xanthine oxidase에 의해 활성산소가 생성된다^{1,14,29}.

산소자유기는 정상적인 대사과정에서도 소량이 생성되나 인체내의 항산화효소인 catalase나 superoxide dismutase(SOD)에 의하여 물로 변환되어 인체에는 별다른 영향을 주지 못한다. 그러나 근위축성측삭경화증이나 파킨슨씨병과 같은 질환에서는 제거되지 못한 산소자유기가 뇌에 축적되어 뇌신경세포를 손상하거나 사멸시켜 병변을 가속화시킨다고 알려져 있다. 따라서 산소자유기의 산화적 손상으로 매개된 뇌질환의 치료방법의 하나로 glutathione이나 vitamin E와 같은 항산화제들을 투여함으로써 많은 치료적 효과를 얻고 있다. 따라서 항산화제들은 과다한 산소자유기를 제거해줌으로써 병변을 회복시켜 주는데 중요한 역할을 한다는 보고에 근거하여^{1,9} 산소자유기의 독성효과와 이에 대한 방어 및 회복작용에 대한 기전을 밝히려는 연구가 꾸준히 진행되어 왔다^{3,6}.

또한 산소자유기와 glutamate 수용체에 대한 연구에서 산소자유기는 흥분성아미노산(excitatory amino acids, EAAs)의 분비를 촉진시킨다는 보고에 따라 신경세포의 손상에 산소자유기와 EAA는 여러 신경성질환의 주된 병리적 요인으로 제시되었다^{8,13}. 최근 소수의 연구에서 산소자유기는 glutamate 수용체의 하나인 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 통하여 세포내 Ca^{2+} 의 농도를 증가

시킴으로써 신경세포의 손상이나 퇴화를 초래한다고 보고된 바 있다^{1,6,7}. 특히, 인체의 뇌에 존재하고 있는 NMDA 수용체는 α -amino-3-hydroxy-5-methyl isoxazole-4-propionic acid(AMPA) 및 kainate receptor와 같은 수용체와 함께 이온 전해질의 항상성을 조절하는 중요한 역할을 하고 있다^{4,9}. 그 중에서 Ca^{2+} 의 ion-channel과 밀접한 관계가 있는 NMDA receptor는 흥분성아미노산의 과 자극에 의하여 활성화 됨으로써 그 결과 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시키거나¹ 또는 세포 내 각종 효소나 protein kinase C(PKC)와 같은 신호전달체계에 영향을 미쳐 세포를 손상하며⁸ 신경병변을 가속화시킨다. 최근에 한약재나 동식물 등에서 유래한 천연물이 산소자유기의 산화적 손상이나 독성물질에 의해 야기되는 각종 신경병변의 치료에 매우 효과적이라는 임상보고가 많이 이루어지고 있다^{1,6,7}. 특히, 한약재는 합성 화학약물에 비하여 적은 독성과 이로 인한 부작용이 적기 때문에 천연물의 연구가 많이 이루어지고 있다^{6,10}. 이러한 연구를 위하여 경제적이고 효율적인 병태모델이 개발되었으며, 특히 배양 세포를 이용한 병태모델이 동물의 실험모델을 대신하여 많이 이루어지고 있다^{3,8-9,11}. 본 연구는 저산소에 의한 허혈상태에서 산소자유기의 신경독성에 대한 효과와 熱多寒少湯의 신경세포 보호기전을 연구하고자 한 것이다. 따라서 저산소증으로 유도한 in vitro 허혈이 대뇌 신경세포와 신경세포 종양세포인 SK-N-MC 세포에 미치는 영향을 조사하였다. 저산소증에 따른 in vitro 허혈에 노출된 시간 및 熱多寒少湯의 처리가 배양된 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 저산소 상태로 조절된 정온기에서 세포를 각각 2 분에서 16 분 동안 노출시켰다. 그 후 세포의 생존율을 XTT과 NR 법에 의하여 정상군과 熱多寒少湯을 처리한 실험군에서 노출 시간의존적으로 세포 생존율이 감소하는 것을 관찰하였다(Table 1A). 또한 熱多寒少湯을 투여한 실험에서는 이러한 세포 생존율의 감소가 농도

의존적으로 억제되는 경향을 나타내었으며 (Table 1B), 이러한 결과는 저산소증의 세포독성과 熱多寒少湯가 저산소증 세포독성완화 효과를 보여준 것이다. 이 같은 실험결과는 Borgers등(1990)²⁾이 보고한 허혈이 심근세포와 뇌세포에 손상을 초래하였다는 연구결과와 일치하는 것이며, 그 원인이 허혈시 형성된 산소자유기가 세포를 손상시킨 결과일 것으로 생각된다^{6,23-24)}. 즉 허혈시 생성된 산소자유기에 의한 세포막의 지질과산화반응에 의한 손상 및 단백질합성저해 등 복합적인 세포손상의 요인의 결과라고 생각할 수 있을 것이며^{1,23,25)}, 熱多寒少湯이 이러한 신경세포 손상의 억제효과를 나타내는 것을 확인하였다. 또한 H₂O₂로 유도한 산소자유기 생성으로 발생한 세포 손상에 熱多寒少湯이 미치는 영향을 관찰한 결과 산소자유기치리는 농도와 시간의존적으로 세포손상을 유발하였으며, 熱多寒少湯 처리시 산소자유기로 유발된 세포손상을 억제하는 효과를 관찰하였다(Table 2). 또한 저산소 처리에 의한 허혈상태가 유발하는 신경세포 손상이 산화적 손상 기전과 관계가 있는가를 알아보기 위하여 저산소증으로 허혈을 유도하고 catalase와 SOD의 항산화효소의 활성을 조사하였다. 저산소 시간에 비례하여 catalase와 SOD의 활성이 감소되었으며(Table 3A), 이러한 결과로서 허혈이 산화적 손상과 밀접한 관련이 있는 것으로 확인하였고, 허혈시 생성된 산소자유기가 세포막을 투과하여 세포내 항산화효소의 활성을 억제함으로써 세포손상을 초래한 것으로 생각된다^{4,9,23)}. 한편, 熱多寒少湯 추출물을 투여한 결과 저산소 처리로 감소한 catalase와 SOD의 활성이 증가하는 결과를 보였다(Table 3B). 이러한 결과는 熱多寒少湯 추출물의 구성성분중 산소자유기의 산화적 손상에 대하여 신경세포의 보호작용은 항산화효소 활성을 통하여 이루어지는 것으로 생각된다^{16,25,30)}. 이러한 결과는 최근 한약재의 산화적 손상으로 인해 영향을 받은 신경세포를 방어 내지는 보

호하였다는 연구결과와 일치함을 알 수 있었다^{16,30)}.

한편, 허혈이 신경세포 손상과 관련된 기전의 하나로 TNF- α 및 PKC의 활성화에 미치는 영향을 조사하였으며, 熱多寒少湯 추출물을 처리하고 그 결과를 확인하였다. 저산소 처리시 TNF- α 및 PKC의 활성이 증가하는 것을 보였고(Table 4A), 熱多寒少湯 처리시 활성의 증가가 억제되는 양상을 보였다(Table 4B). Kham등⁷⁾이 산소자유기가 혈관내피세포에서 cytokine과 intracellular adhesion molecule(ICAM)과 같은 물질들을 생성하여 동맥질환을 유발한다는 연구결과를 보고하였으며, 이러한 결과는 허혈시 생성된 산소자유기가 TNF- α 의 활성을 촉진시켰을 가능성이 클 것으로 생각된다^{7,28)}. 따라서 본 실험 결과는 허혈에 의해 생성된 산소자유기에 의한 지질막의 과산화반응과 cytokine의 분비증가를 熱多寒少湯 추출물이 항산화효과를 나타냄으로서 산화적 손상으로부터 신경세포를 보호한 것으로 생각된다^{16,24,30,31)}. 또한 저산소 처리시 생성된 활성산소가 흥분성아미노산의 분비를 촉진시켜 NMDA receptor를 과자극함으로써 세포 내 칼슘증가를 초래하고 동시에 세포 내 칼슘증가는 Ca²⁺- dependent PKC의 활성을 증가시켰을 가능성이 높을 것으로 생각한다^{27,32)}.

이러한 저산소증의 신경세포 손상의 기전으로 세포고사가 관여하는 지를 확인하고 熱多寒少湯이 세포고사기전에 미치는 효과를 관찰하여 신경세포 손상에 미치는 熱多寒少湯의 효과를 세포고사의 측면에서 관찰하고자 했다. 저산소 처리가 SK-N-MC 세포의 세포사멸을 유도하는 지를 확인하기 위하여 저산소 처리 후 SK-N-MC 세포에서 LDH 유리를 세포배양액에서 측정하여 세포손상을 확인한 결과 시간 의존적으로 저산소 처리에 의한 LDH의 증가를 나타냈으며(Fig. 1Aa), 24 시간 동안 저산소 처리하는 동안 熱多寒少湯을 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 처리하

고 배양액 내로의 LDH의 유리를 측정 한 결과 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 熱多寒少湯을 투여한 실험군에서 저산소만을 처리한 대조군에 비하여 유의성있는 LDH의 감소가 관찰되었다(Fig. 1Ab). 이러한 결과는 앞의 배양한 대뇌신경 세포를 이용한 실험과 같은 것이다. 이러한 세포사멸이 세포고사(apoptosis)에 의한 것인지 세포괴사(necrosis)에 의한 것인지 구별하기 위하여 internucleosomal DNA 단편화 실험과 chromatin dye를 이용하여 핵의 형태 관찰을 시행했다. DNA 단편화를 확인한 결과 저산소 처리한 SK-N-MC 세포에서 DNA 단편화는 LDH 유리의 증가와 유사하게 나타났다(Fig. 1Ba). 또한 熱多寒少湯을 처리한 실험군에서는 DNA의 단편화 현상이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1Ab). 또한 저산소증 처리로 인한 핵응축과 염색체의 단편화 양상 및 apoptotic body를 관찰할 수 있었으며, 熱多寒少湯을 투여한 실험군에서는 핵의 응축과 염색체의 절편이 보이는 하지만 핵의 응축 및 염색체의 단편화가 억제되는 핵의 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

이러한 저산소 처리로 인한 SK-N-MC 세포의 세포고사 현상에 관여하는 기전을 알아 보기 위하여 핵의 단편화의 최종 경로인 caspase-3의 활성화 양상을 분석한 결과 저산소 처리후 시간의존적으로 caspase-3의 활성화의 증가를 관찰할 수 있었으며, (Fig. 3Aa), 熱多寒少湯의 투여로 caspase-3의 활성이 억제되는 경향을 보였다(Fig. 3Ab). 그리고 caspase-3의 기질 중의 하나인 PARP가 caspase의 활성화와 함께 가수분해되는 양상을 보였으며, 熱多寒少湯을 투여한 실험군에서는 이러한 가수분해 양상이 억제되는 것을 보였다(Fig. 3B). 또한 저산소 처리 후 세포질에서의 cytochrome c의 양은 증가되는 경향을 보여 막손상으로 인하여 유리되는 결과를 보였으며, 이것 또한 熱多寒少湯의 처리로 이러한 양상이 감소되는 결과를 보였다(Fig. 3B). 그리

고 membrane 분획에서의 cytochrome c의 양은 시간 의존적 방식에 상응한 감소를 보였으며, 이러한 경향은 熱多寒少湯의 투여로 억제되는 경향을 나타냈다(Fig. 3B). 이러한 결과는 저산소 처리가 SK-N-MC 신경아세포종양 세포에서 caspase 활성화를 통하여 세포고사를 유도하고 DNA 단편화 결과를 초래하였으며, 또한 mitochondria로부터 cytochrome c의 유리를 자극하였다. 즉 저산소처리로 유도되는 세포고사는 cytochrome c의 유리를 동반하는 caspase의 활성을 통하여 발생한다는 것을 다시 확인하였고, 熱多寒少湯의 신경세포고사의 억제는 caspase의 활성 억제 기전을 통하여 이루어지는 것으로 생각된다.

이상의 연구에서 저자는 熱多寒少湯이 저산소증에 의해 손상된 배양 대뇌신경세포에 대한 보호효과에 유의한 결과를 관찰하였다. 앞으로 상세한 연구가 이루어져야 하겠지만, 저자는 熱多寒少湯이 부분적으로 생체의 생물학적, 생화학적 균형을 정상화시키는 치료효과를 갖고 있다는 것을 예측할 수 있었으며, 이에 대한 다른 효소들의 관찰과 아울러 형태학적인 변화 등의 심도 있는 연구를 통한 그 기전의 규명이 지속되어야 한다고 사료된다.

V. 結 論

허혈에 의하여 유발되는 신경세포손상에 대한 독성기전과 熱多寒少湯의 신경세포보호효과를 관찰하기 위하여 생쥐의 대뇌신경세포와 신경아세포종양세포인 SK-N-MC 세포를 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 저산소 처리로 in vitro 허혈을 유도하여 2~16 분 동안 노출시킨 결과 허혈을 처리한 시간에 비례하여 세포생존율이 감소하였으며, 熱多寒少湯을 처리한 실험군에서는 이러한 세포생존율의 감소가 억제되는 결과를 보였다. 또한 H_2O_2 를 이용하여 산소자유기를 처리한 후 세포생존율은 감소하였으며, 熱多寒少湯의 투여가

신경세포 생존율의 감소를 억제하는 효과를 보였다.

2. 저산소 처리시 catalase와 SOD의 항산화효소의 활성은 감소하였고, 熱多寒少湯의 투여는 이러한 활성의 감소를 억제하는 효과를 보였다. 또한 저산소 처리시 TNF- α 와 PKC의 활성이 증가하였으나 熱多寒少湯을 투여한 결과 이러한 경향이 억제되었다.

3. 저산소처리로 유도되는 세포고사는 cytochrome c의 유리를 동반하는 caspase의 활성을 통하여 이루어졌고, 熱多寒少湯의 신경세포고사의 억제는 caspase의 활성 억제 기전을 통하여 이루어졌다.

이상의 결과로 보아 저산소증은 쥐에서 분리한 배양 대뇌신경세포에 산화적 손상에 의한 신경독성을 나타냈으며 熱多寒少湯이 저산소증과 같은 산소자유기의 산화적 손상에 대한 방어에 효과적인 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. Dario G, Antonio C, Giuseppe P: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267, 1996.

2. Borgers M, Vandeplassche G, van Reempts J : *Cytochemical markers of ischemia in the heart and brain. Histochem J* 22:125-133, 1990.

3. Mosmann T., : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods*, 65:55-63, 1983.

4. Borenfreund E., Puerner J. A., : A Simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay

(HTD/NR-90). *J. Tiss. Cult. Meth.*, 9:7-9, 1984.

5. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A *et al.* : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature(London)* 362:59-62, 1993.

6. Floyd RA : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* 4:2587-2597, 1997.

7. 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* 95:1262-1270, 1995.

8. Mattson MP, Cheng B, Smith-Swintosky VL : Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium- and free radical mediated excitotoxic injury : Implications for treating neurodegenerative disorders. *J Exp Neurol* 124:89-95, 1993.

9. Mayer ML, Westbrook GL : Permeation and block of N-methyl -D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons, *J. Physiol.*, 394:501-527, 1987.

10. Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU : Oxygen radical- induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 37:62~70, 1994.

11. Alexander RW: Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. *Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: A new perspective. Hypertension* 25:155-161, 1995.

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)* 336:68-70, 1988.
13. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623, 1992.
14. Jackson GR, Apfell L, Werrbach-Perex K, Perex-Polo JR : Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balanced and neuronal injury. 1. Stimulation of hydrogen peroxide resistance. *J Neurosci Res* 25 : 360-368, 1990.
15. 李濟馬 : 東醫壽世保元, 서울, 여강출판사, p.272, 1992.
16. 田炳薰, 姜益賢, 文炳淳 : 人蔘이 산소유리기로 손상된 척수신경세포의 손상에 미치는 영향, 대한동의병리학회지, 12(1):96-101, 1998.
17. 洪순용 · 이을호 : 四象醫學原論, 서울, 행림출판사 pp.50-55, 1989.
18. 金敬堯 : 고혈압의 사상의학적 치료법, 대한한의학회지 14(2) : 24-29, 1993.
19. 김영석 : 고혈압에 대한 관찰. 대한한의학회지 4(2) : 5-15. 1983.
20. 김달래 : 체질별 혈청지질 성분의 분석에 관한 실험적 고찰. 사상의학회지 5(1): 150. 1993.
21. 전국한의학대학교 사상의학교실 : 四象醫學, 서울, 집문당, pp.410-414, 1997.
22. 송일병 : 사상의학적 중풍관리의 임상적 연구, 사상의학회지 8(2) 117-130. 1992.
23. Vannucci RC : Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia : relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 27:317-326, 1990.
24. Silverstein FS, Buckanan K, Hudson C, Johnsten MV : Flunarizine limits hypoxia-ischemia induced morphologic injury in immature rat brain. *Stroke* 117:477-482, 1986.
25. 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* 14:977-982, 1983
26. Nishizuka Y : Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614, 1992.
27. Takahashi K., Fujita T., Mayum T., Kish T., : Effect of Adriamycin on Cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem. Pharm.*, 35(1): 326-334, 1987.
28. Nowak TS, Jr, Ikeda J, Nakajima T : 70-kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. *Stroke Suppl III* 21:107-111, 1990.
29. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla V, Moroni F : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J. Neurochem.*, 51:1960-1963, 1988.
30. 林泰榮 : 獨活類의 效能에 關한 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌, 8(2):97-98, 1987.
31. Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU : Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology* 17:37~46, 1996.
32. Zeman S, Liloyd C, Meldrum B, Leigh PN : Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease, *Neuropathol. Appl Neurobiol.*, 20:219-231, 1994.