

補陽還五湯이 영양혈청결핍에 의한 PC12 세포의 枯死에 미치는 영향

김종길, 정승원¹⁾, 임준모¹⁾, 장호현, 윤종민¹⁾, 이기상, 문병순¹⁾

원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 원광대학교 한의학전문대학원¹⁾

Protective Effects of *Boyanghwanoh-tang* on Serum and Glucose Deprivation-induced Apoptosis of PC12 Cells

Jong-Gil Kim, Seung-Won Jeong¹⁾, Jun-Mo Im¹⁾, Ho-Hyun Jang, Jong-Min Yun¹⁾,
Ki-Sang Lee, Byung-Soon Moon¹⁾

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University¹⁾

Objectives : *Boyanghwanoh-tang* (*Buyanhaiwu-tang*) has been used as a prescription for stroke, senile and vascular dementia, ischemic brain and heart damage in Oriental traditional medicine. However, there is little known about the mechanism by which the water extracts of *Boyanghwanoh-tang* (*Buyanhaiwu-tang*) rescue cells from these damages, and little is known about the protective mechanisms of *Boyanghwanoh-tang* (*Buyanhaiwu-tang*) on oxidative stress in neuronal cells. Therefore, we have investigated the role of *Boyanghwanoh-tang* (*Buyanhaiwu-tang*) on serum and glucose deprived apoptosis in PC12 cells.

Methods : PC12 Cells have been used extensively as a model for studying the cellular and molecular effects of neuronal cells. The viability of cells was measured by MTT assay. We used DNA fragmentation and caspase 1, 2, 3, 6, 9-like proteases activation assay.

Transcriptional activation of NF- κ B was assessed by using electrophoretic mobility shift assay.

Results : *Boyanghwanoh-tang* (*Buyanhaiwu-tang*) rescued PC12 cells from apoptotic death by serum and glucose deprivation in a dose-dependent manner. The nuclear staining of PC12 cells clearly showed that *Boyanghwanoh-tang* (*Buyanhaiwu-tang*) attenuated nuclear condensation and fragmentation, which represent typical neuronal apoptotic characteristics. *Boyanghwanoh-tang* (*Buyanhaiwu-tang*) also prevents fragmentation of genomic DNA and activation of caspase 3-like protease in serum and glucose deprived PC12 cells. Furthermore, *Boyanghwanoh-tang* (*Buyanhaiwu-tang*) reduced the activation of NF- κ B by serum and glucose-deprived apoptosis.

Conclusions : These findings suggest that serum and glucose deprivation induces reduced glutathione (GSH) depletion, and consequently, apoptosis through endogenously produced reactive oxygen species in PC12 cells. Also, our data indicated that *Boyanghwanoh-tang* (*Buyanhaiwu-tang*) has protective effects against the serum and glucose deprived deaths of PC12 cells, which are mediated by the generation of GSH that, in turn, can reduce oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide. (*J Korean Oriental Med* 2003;24(2):179-192)

Key Words: *Boyanghwanoh-tang* (*Buyanhaiwu-tang*), Apoptosis, PC12 Cells

· 접수 : 2003년 3월 17일 · 논문심사 : 2003년 4월 12일 · 채택 : 2003년 5월 3일
· 교신저자 : 문병순, 원광대학교 한의과대학 익산한방병원 전북 익산시 신용동 344-2
(Tel. 063-850-2102, Fax. 063-841-0033, E-mail: moonbs58@hanmail.net)
· 본 연구는 원광대학교 학술연구비 지원에 의해 이루어졌습니다.

서 론

補陽還五湯은 王¹⁾의 《醫林改錯》에 처음 수록된 이래 中風 半身不遂의 치료에 활용되어 왔으며^{2,3)}, 최근에는 허혈성 뇌혈관 질환뿐만 아니라 협심증, 심근경색, 다발성 신경염, 혈전성 정맥염 등의 질환에도 응용되고 있다^{5,6)}.

뇌혈관 질환시 혈류장애로 인한 허혈은 산소, glucose 및 대사물질의 부적절한 공급에 의한 조직관류의 감소로 인하여 발생하는데, 수분간의 허혈로도 대사성 손상 및 물리화학적 손상을 받아 非可逆의 상태를 초래하여 신경세포 손상을 유발한다⁷⁾. 또한, 산소자유기에 의한 酸化性 損傷도 관여하는 것으로 보고되었으며, 최근에는 이러한 기전 외에 細胞枯死가 허혈성 뇌질환, 간질, 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 등 신경계질환의 신경세포사에 관여되어 있다는 보고들이 증가하고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

補陽還五湯은 黃芪, 當歸, 赤芍藥, 川芎, 桃仁, 紅花, 地龍으로 구성되어 있으며 補氣, 活血祛瘀의 효능으로 氣虛血虛로 인한 질환에 활용되고 있으며¹¹⁾, 특히 王¹⁾은 論藥立方에 있어서 中風 半身不遂, 癱腿偏枯, 抽搐筋攣 等の 원인이 元氣虧虛에 의한 瘀血에 있다고 주장하여 補陽還五湯을 立方하였다¹¹⁾.

이에 저자는 氣虛血瘀로 인한 中風에 활용되는 補陽還五湯이 뇌허혈 초기에 신경세포 손상에 미치는 방어효과를 알아보기 위하여 신경세포의 특징을 나타내는 PC12세포에 허혈상태와 유사한 조건인 serum과 glucose 공급을 중단한 상태에서 補陽還五湯을 처리한 후 PC12세포의 생존율, Hoechst 핵 염색, 세포 내 GSH 함유량, H₂O₂의 생성량, caspase계 cysteine protease의 활성도, NF-κB의 활성도를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

본 실험에 사용한 백서의 부신수질 암세포(rat

adrenal pheochromocytoma)인 PC12세포는 신경세포의 특성을 나타내는 세포로 한국 세포주 은행에서 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS)과 5% horse serum이 포함된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 세포배양액으로 5% CO₂, 95% 대기공기 및 37℃ 세포배양기에서 배양하였다.

2) 약제

본 실험에 사용한 補陽還五湯의 처방내용은 《醫林改錯》¹¹⁾에 의거하였고, 약제는 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입한 후 精選하여 사용하였으며, 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

補陽還五湯 處方構成 (Prescription of Boyangwanoh-tang (Buyanhaiwu-tang))		
韓藥名	生藥名	重量(g)
黃芪	Radix Astragali	40.00
當歸	Radix Angelicae Gigantis	8.00
赤芍藥	Radix Paeoniae Rubra	6.00
川芎	Rhizoma Cnidii	4.00
桃仁	Semen Persicae	4.00
紅花	Flos Carthami	4.00
地龍	Lumbricus	4.00
Total amount		70.00

3) 시약 및 기기

GSH는 Sigma (St. Louis, USA)사로부터 구입하여 phosphate buffered saline (PBS)으로 용해하였으며, 이 용액을 0.2µm filter (Millipore, Bedford, MA)로 여과시켜 사용하였다. 세포 및 핵 염색 관찰에 이용한 세포 배양판은 Falcon (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)사로부터 구입하였고, dimethyl sulfoxide (DMSO)와 염색시약 Hoechst 33258, 7-Hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one (scopoletin), peroxidase (HRP), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium blomide (MTT) 등은 Sigma (St. Louis, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. DMEM, glucose-free DMEM, FBS, horse serum, 항생제 등은 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA)사로부터 구입하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제

補陽還五湯 5첩 분량인 350 g을 증류수 2,000ml와 함께 3,000ml 환저 플라스크에서 2시간 동안 가열 추출하고 여과지로 여과한 다음 5,000rpm으로 30분간 원심분리하였다. 이 중 상청액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하고 동결건조기로 건조하여 122.5 g(收得率 35%)의 시료를 얻었으며, 시료는 eppendorf tube에 100mg/ml가 되도록 DMSO로 녹여 4℃ 냉장 보관하고 실험시에는 세포배양액인 DMEM에 희석하여 사용하였다.

2) 세포 배양 및 자극

백서의 PC12 세포는 10% FBS와 5% horse serum이 포함된 DMEM 세포배양액으로 5% CO₂, 95% 대기공기 및 37℃ 세포배양기에서 배양하여 24시간 간격으로 세포배양액을 교체하였으며, 배양액을 교체한 후 log phase에 있는 세포에서 serum과 glucose를 제거한 상태에서 補陽還五湯을 농도별로 처리하고 세포고사(apoptosis)현상과 함께 補陽還五湯의 보호효과와 관련한 분자생물학적인 실험을 수행하였다.

3) 세포의 허혈조건

정상적인 PC12 세포를 세포배양판에 1×10⁵cells/ml씩 분주하고 serum과 glucose를 제거한 세포배양액으로 교체한 후 24시간동안 배양하였다.

4) 세포생존율 측정

세포생존율 측정은 24wells 세포배양판에 PC12 세포를 1×10⁵cells/ml씩 분주하고 serum과 glucose를 제거한 세포배양액으로 교체한 후 세포생존율과 補陽還五湯을 농도별로 처리한 세포군의 생존율을 관찰하였다. 시간별로 관찰하면서 MTT로 3시간을 반응시켰다. 살아있는 세포는 MTT로부터 보라색 불용성 formazan을 형성하므로 이를 DMSO로 용해하여 540nm 파장에서 ELISA reader (THERMO max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정한 formazan 생성 정도는 정상적인 세포의 활성도와 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

5) DNA 분절현상

DNA 분절현상을 알아보기 위한 genomic DNA 추

출은 Wizard genomic DNA purification kit (Promega Co., Medison, USA)를 이용하여 추출하였다. 정상세포, serum과 glucose가 제거된 상태하의 세포 및 補陽還五湯을 농도별로 처리한 세포에 nuclei lysis buffer를 첨가하여 세포를 파쇄하고 RNase를 37℃에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) pH8.0)을 가하여 DNA를 용해한 후 260nm와 280nm의 spectrophotometer (Beckman Co., Du-7 Model, Palo Alto, CA, USA)하에서 흡광도를 측정하여 DNA를 정량 하였다. DNA 5μg을 1.8% agarose gel에서 전기영동(50voltage, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

6) 핵 염색(Hoechst staining)

정상세포, serum과 glucose가 제거된 상태하의 세포 및 補陽還五湯을 농도별로 처리한 세포를 비교하기 위하여 형광 현미경으로 DNA 분절현상을 관찰하였다. 먼저 4% formaldehyde 용액으로 정상세포와 serum과 glucose가 제거된 상태하의 세포를 10분 동안 고정시켜 PBS로 2번 세척한 후 Hoechst 33258 염색약을 10μM로 10분 동안 염색하고 다시 PBS로 세척한 다음, 실험에 따른 사진은 역상 광학 현미경 (Nikon Eclipse TE 300, Japan)을 이용하여 10×10의 배율로 관찰하였다.

7) GSH 함유량 측정

PC12 세포를 6cm 세포배양판에 2×10⁶cells/ml씩 분주한 다음 세포배양기에서 24시간 배양시킨 후 serum과 glucose가 제거된 상태하의 세포배양액으로 교체한 다음 시간별로 GSH 함유량을 측정하였고, 여기에 補陽還五湯을 농도별로 처리하여 GSH 함유량을 측정하였다.

먼저 배양액을 조심스럽게 제거하고 차가운 10% trichloroacetic acid (TCA)를 400μl씩 분주한 후 세포 배양판을 10분간 조심스럽게 흔들어 주었다. TCA에

의해서 용출된 분획을 모아 원심 분리한 다음 상청액을 3M NaOH를 사용하여 중성 pH로 조정하였다. 상청액 50 μ l에 250 μ l의 5,5'-dithionitrobenzoic acid (0.96mg/ml in 0.1M phosphate buffer pH7.4, 5mM EDTA)와 250 μ l의 NADPH (0.59mg/ml)와 450 μ l의 glutathione reductase (5U/ml)를 첨가하고 실온에서 10-15분 동안 반응시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 412nm에서 GSH 함유량을 측정하였다.

8) H₂O₂ 생성량 측정

PC12 세포를 6cm 세포배양판에 2 \times 10⁶cells/ml 씩 분주한 다음 세포배양기에서 24시간 배양시킨 후 serum과 glucose를 제거한 상태에서 시간별로 상청액만을 모은다. 상청액을 96wells 세포배양판에 각각 100 μ l씩 분주한 다음 0.2-0.4 μ M HRP, 1-2 μ M scopoletin을 처리한 후 10분 동안 반응을 시켰다. 생성된 H₂O₂에 의해 감소된 scopoletin의 형광을 fluorometer (Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA)를 이용하여 450nm의 파장에서 측정하고 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다. Serum과 glucose를 제거한 허혈상태로 24시간 동안 동시 처리한 다양한 농도의 補陽還五湯도 역시 위와 같은 방법으로 H₂O₂의 생성량을 측정하였다.

9) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

Serum과 glucose를 제거한 PC12 세포와 여기에 補陽還五湯을 농도별로 처리한 PC12 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 lysis buffer (1% triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol (DTT), 10mM Tris/HCl, pH8.0)에서 용해하여 14,000rpm으로 15분 동안 원심분리한 후 얻은 상청액은 bicinchoninic acid (BCA)용액에 30분간 반응시켜 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 정량 하였다. 동량의 단백질로 정량한 다음 caspase assay buffer (100mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM DTT, pH7.5)에 희석되어 형광표지된 기질과 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer (Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여

caspase activity를 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength (380nm)와 emission wavelength (460nm)를 사용하였다. 기질은 caspase-3 protease의 경우는 fluorogenic substrate인 Ac-DEVD-AMC 50 μ M을 사용하여 이들의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase activity를 측정하였다.

10) 전사활성인자 NF- κ B의 활성 측정

Serum과 glucose를 제거한 상태하의 PC12 세포와 여기에 補陽還五湯을 농도별로 처리한 PC12 세포를 포집하여 핵 추출물(nuclear extracts)만을 모아 0.2mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 20 μ M pepstatin A, 0.1mM antipain이 들어있는 저삼투압 용해용액과 10분간 얼음에서 팽창시킨 후 0.1% Nonidet P-40와 반응시킨 다음 세포질액만을 버리고 핵에서 핵단백질만을 모았다. NF- κ B의 consensus binding site를 가진 oligonucleotide probe는 transferase로 3' 말단에 ³²P를 표지하였다. 5 μ g의 핵단백질과 동위원소에 표지된 probe는 실온에서 30분 반응시킨 후 0.5 \times TBE buffer안에서 4% polyacrylamide gel로 전기영동시킨 다음 이 gel을 말리고 X-ray 필름에 노출하여 autoradiography를 이용하여 NF- κ B의 활성도를 판정하였다.

11) 통계처리

실험결과와 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였고, p-value가 0.05이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

실험성적

1. 補陽還五湯이 PC12 세포의 생존율에 미치는 효과 허혈상태와 유사한 상태를 만들기 위하여 serum과 glucose를 제거한 다음 PC12 세포를 배양하고 6시간, 12시간, 18시간, 24시간이 지난 후에 MTT assay 방법으로 세포생존율을 측정한 결과, PC12 세포의 생존율은 정상세포군에 비해 각각 95 \pm 2.5%, 80 \pm 3.0%, 76 \pm 3.5%, 45 \pm 2.0%의 세포생존율을 나타내었다 (Fig. 1).

補陽還五湯의 PC12 세포에 대한 보호효과를 알아

보기 위하여 補陽還五湯을 PC12 세포에 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml를 처리하고 동시에 serum과 glucose가 제거된 세포배양액으로 배양한 다음 24시간이 경과된 후 세포생존율을 측정하였다. 補陽還五湯 50 μ g/ml를 처리한 경우 PC12 세포의 생존율은 56 \pm 3.0%를 나타내었으며, 補陽還五湯 100 μ g/ml를 처리한 경우 80 \pm 2.5%의 생존율을 나타내었다. 補陽還五湯 200 μ g/ml의 처리한 경우 PC12 세포의 생존율은 88 \pm 1.0%로 serum과 glucose를 제거한 후 24시간 배양한 세포생존율과 비교하여 유의성 있게 증가되어 나타났으며, 補陽還五湯 400 μ g/ml를 처리한 경우는 78 \pm 3.0%의 세포생존율을 나타내었다(Fig. 2).

2. 補陽還五湯이 PC12 세포의 형태학적인 변화에 미치는 효과

DNA 분절현상을 형태학적으로 관찰하기 위하여 Hoechst 염색을 시행한 결과, serum과 glucose를 제거한 후 24시간 배양한 PC12 세포는 정상세포에 비해 세포고사의 형태학적인 특징중 하나인 염색사의 응축과 핵분절 현상이 관찰되었고, 補陽還五湯 200 μ g/ml를 동시 처리하고 serum과 glucose를 제거한 후 24시간 배양한 PC12 세포는 염색사의 응축현상이나 핵

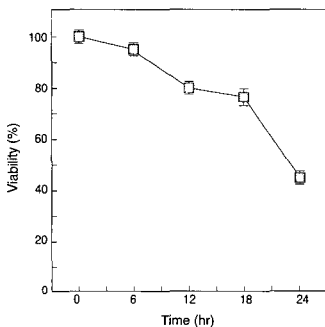


Fig. 1. Serum and glucose deprivation decreased the viability of PC12 cells in a time-dependent manner. Cells were washed with serum and glucose-free DMEM and incubated with serum and glucose-free DMEM for 24hr. The viability of cells was measured by MTT assay. Results were represented as the means \pm S.D. of four experiments.

분절 현상이 거의 나타나지 않았다(Fig. 3).

또한 DNA 분절현상을 agarose gel을 이용한 전기영동방법으로 확인하기 위하여 genomic DNA를 분리하고 전기영동을 시행한 결과, serum과 glucose를 제거한 세포배양액에서 24시간 배양한 PC12 세포는 사다리 모양의 DNA 분절현상을 관찰할 수 있었으나 補陽還五湯 50, 100, 200 μ g/ml를 처리하고 동시에 serum과 glucose를 제거한 세포배양액에서 24시간 배양한 PC12 세포에서는 농도의존적으로 DNA 분절 현상이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

3. 補陽還五湯이 PC12 세포의 GSH 함유량에 미치는 효과

세포 내 중요한 항산화제로서 작용하는 GSH의 함유량이 serum과 glucose가 제거된 허혈상태와는 어떤 상관성이 있는지를 알아 보기 위하여 정상상태로 배양한 PC12 세포와 비교하여 serum과 glucose가 제거된 배양액에서 배양한 PC12 세포의 세포 내 GSH 함유량을 측정하였다. 정상세포 수준에 비해 serum과 glucose가 제거된 배양액에서 배양한 PC12 세포를 6시간 간격으로 세포 내 GSH 함유량을 측정하였

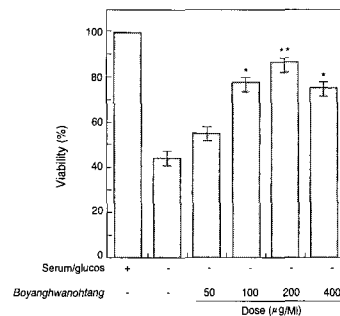


Fig. 2. Boyanghwanoh-tang inhibited the cell death of serum and glucose-deprived PC12 cells.

Cells were washed with serum and glucose-free DMEM, treated with various concentrations of Boyanghwanoh-tang (50, 100, 200, 400 μ g/ml) for 24hr or not. The viability of cells was measured by MTT assay. Results were represented as the means \pm S.D. of three experiments. **, $p < 0.01$ *, $p < 0.05$ compared to only serum and glucose-deprived group.

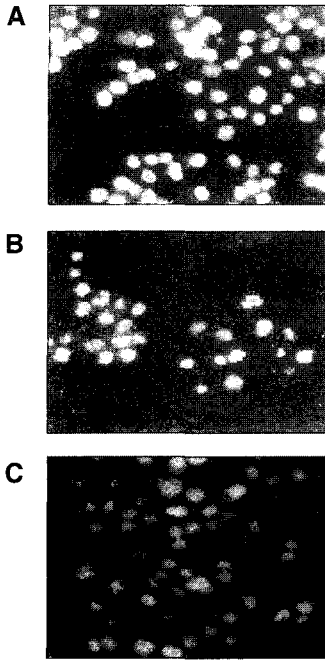


Fig. 3. *Boyanghwanoh-tang* attenuated the nuclear fragmentation in serum and glucose-deprived apoptosis.

Cells (1×10^6 cells/ml) were seeded for 24hr (A) and washed with serum and glucose-free DMEM, in the absence (B) and presence (C) of $200 \mu\text{g/ml}$ *Boyanghwanoh-tang* for 24hr. Cells were fixed with 4% formaldehyde, stained with Hoechst 33258 and observed under the fluorescent microscope ($100\times$).

다. 실험직전 PC12 세포의 GSH 함유량을 기준으로 6 시간 후에는 GSH 함유량이 $96 \pm 3.0\%$ 를 나타내었으며, 12시간 후에는 $90 \pm 2.9\%$, 18시간 후에는 $86 \pm 3.0\%$, 24시간 후에는 $80 \pm 3.1\%$, 30시간 후에는 $82 \pm 3.0\%$ 로 PC12 세포 배양 24시간까지는 시간의존적으로 GSH 함유량이 일정하게 감소되는 것이 확인되었다(Fig. 5).

PC12 세포의 GSH 함유량에 미치는 補陽還五湯의 효과를 알아보기 위하여 PC12 세포에 補陽還五湯을 농도별로 처리하고 동시에 serum과 glucose가 제거된 세포배양액으로 24시간 동안 배양한 후 세포 내 GSH 함유량을 측정하였다. 그 결과 補陽還五湯의 농도가 $50 \mu\text{g/ml}$ 인 경우에는 $84 \pm 3.0\%$ 의 GSH 함유량을

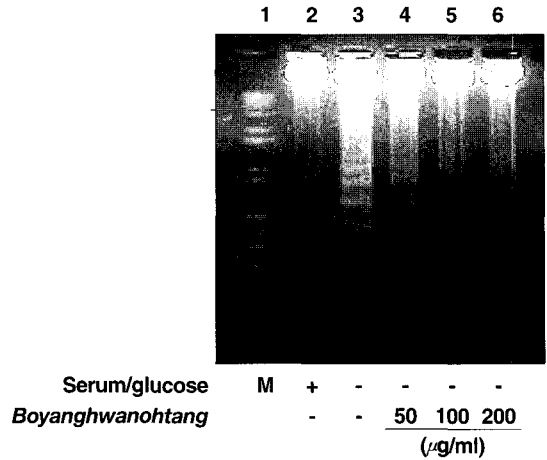


Fig. 4. *Boyanghwanoh-tang* inhibited DNA fragmentation of serum and glucose deprived PC12 cells.

Ladder pattern of DNA fragmentation on serum and glucose deprivation-induced apoptosis: lane 1) standard DNA size marker, 2) control cells, 3) serum and glucose deprivation, 4-6) treatment of *Boyanghwanoh-tang* (50, 100, $200 \mu\text{g/ml}$) in serum and glucose-deprived cells. Genomic DNA was isolated and separated on 1.5% agarose gels. DNA was stained with ethidium bromide and visualized under U.V. light.

나타내었으며, $100 \mu\text{g/ml}$ 인 경우에는 $89 \pm 2.9\%$, $200 \mu\text{g/ml}$ 인 경우는 $94 \pm 2.7\%$ 의 GSH 함유량이 측정되어 補陽還五湯은 serum과 glucose가 제거된 PC12 세포의 GSH 함유량을 농도의존적으로 증가시켰다(Fig. 6).

4. 補陽還五湯이 PC12 세포의 H_2O_2 생성량에 미치는 효과

허혈상태와 유사한 상태를 만들기 위하여 serum과 glucose를 제거한 다음 PC12 세포를 배양한 경우 Fig. 6에서 보는 바와 같이 GSH 함유량은 시간의존적으로 감소하였다. 세포 내 중요한 항산화물질인 GSH 함유량의 감소가 산화성 손상과 관련한 활성산소의 생성에는 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 직접 H_2O_2 의 생성량을 측정하였다. Serum과 glucose를 제거한 상태에서 2시간 간격으로 30시간 동안 PC12 세포의 H_2O_2 생성량을 측정하였던 바 Fig.

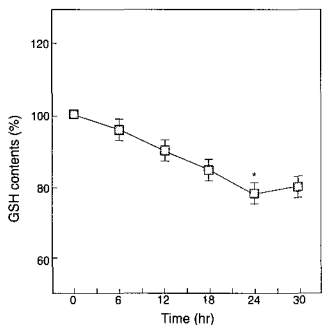


Fig. 5. Serum and glucose deprivation decreased the intracellular contents of GSH in PC12 cells.

Cells (1×10^5 cells/ml) were seeded for 24hr and deprived serum and glucose for various periods(0, 6, 12, 18, 24, 30hr). GSH contents were measured from acid-soluble fraction of cells as described in Materials and Methods. Cellular GSH levels are expressed as % of control cells. The data are mean values of results obtained from four sets of experiments. Results represented as the means \pm S.D. of three experiments. *, $p < 0.05$ compared to control cells.

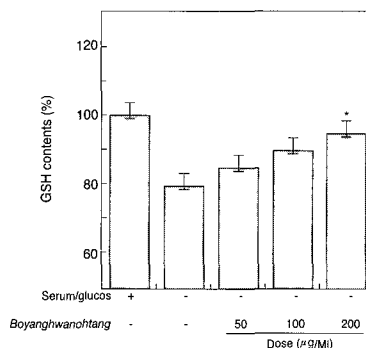


Fig. 6. *Boyanghwanoh-tang* attenuated the GSH depletion of serum and glucose-deprived PC12 cells in a dose-dependent manner.

Cells (1×10^5 cells/ml) were washed with serum and glucose-free DMEM, treated with *Boyanghwanotang* (50, 100, 200 μ g/ml) in serum and glucose-free DMEM for 24hr. GSH contents were measured from acid-soluble fraction of cells as described in Materials and Methods. Cellular GSH levels are expressed as % of control cells. The data are mean values of results obtained from four sets of experiments. Results represented as the means \pm S.D. of three experiments. *, $p < 0.05$ compared to only serum and glucose-deprived group.

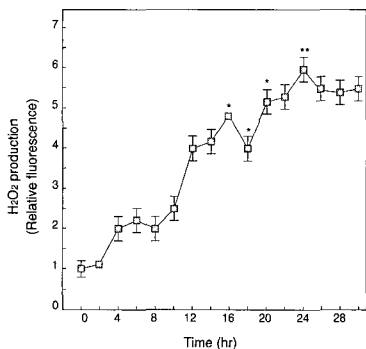


Fig. 7. Hydrogen peroxide was generated in serum-deprived apoptosis of PC12 cells.

Cells (1×10^5 cells/ml) were seeded for 24hr and treated with serum and glucose-free DMEM for indicated periods (0-30hr). Generation of H_2O_2 from cultured supernatant was measured using scopoletin-HRP assay. Data were represented as a relative fluorescence to the control values. Results were represented as the means \pm S.D. of three experiments. Results represented as the means \pm S.D. of three experiments. **, $p < 0.01$ *, $p < 0.05$ compared to only control cells.

8에서 보는 바와 같이 시간이 경과함에 따라 시간의 존적으로 H_2O_2 의 생성량이 점차 증가되었으며, 12시

간이 경과한 후에는 정상세포군에 비해 4배 정도의 H_2O_2 가 생성되었고, 24시간이 경과한 후에는 6배 이상의 H_2O_2 가 생성되었다(Fig. 7).

補陽還五湯이 PC12 세포의 H_2O_2 의 생성량에 미치는 효과를 알아보기 위하여 補陽還五湯을 농도별로 처리하고 동시에 serum과 glucose가 제거된 배양액에서 PC12 세포를 배양하고 24시간 후에 H_2O_2 의 생성량을 측정하였다. Serum과 glucose가 제거되지 않은 정상배양액에서 배양한 PC12 세포의 24시간 후 H_2O_2 의 생성량은 1.0 ± 0.02 에 비해 補陽還五湯 50 μ g/ml를 처리하고 동시에 serum과 glucose가 제거된 배양액에서 배양한 24 시간 후 PC12 세포의 H_2O_2 생성량은 4.9 ± 0.02 배를 나타내었으며, 補陽還五湯 100 μ g/ml를 처리한 경우에는 1.7 ± 0.05 배를 나타내었다. 특히 補陽還五湯 200 μ g/ml를 처리한 경우, PC12 세포의 H_2O_2 생성량이 1.2 ± 0.03 배로 나타나 serum과 glucose가 제거된 배양액에 의하여 증가된 H_2O_2 의 생성량을

유의성 있게 감소시켰음을 알 수 있었다(Fig. 8).

5. 補陽還五湯이 PC12 세포의 Caspase 활성 변화에 미치는 효과

Serum과 glucose가 제거된 상태하의 PC12 세포의 세포고사가 단백질을 분해하여 세포고사를 유도하는데 중요한 매개체로 작용하는 caspase계 cysteine protease의 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 Caspase-1을 비롯하여 여러 caspase군의 활성을 측정하였다. Caspase-3 protease의 활성을 3 시간 간격으로 측정한 결과, 시간이 경과함에 따라 증가하기 시작하여 24시간이 경과한 후에는 정상세포군에 비해 7배 이상의 caspase-3 protease 활성이 증가되었다(Fig. 9 A). 반면에 PC12 세포에 serum과 glucose가 제거된 상태에서 補陽還五湯을 농도별로 동시 처리한 결과, 補陽還五湯 50 μ g/ml를 처리한 경우 6.8 \pm 0.2배 증가하였고, 補陽還五湯 100 μ g/ml를 처리한 경우에는 4 \pm 0.4배, 補陽還五湯 200 μ g/ml를 처리한 경우에는 2.3 \pm

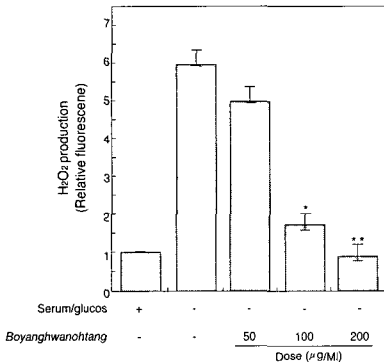


Fig. 8. Boyanghwantang decreased the generation of H₂O₂ by serum deprivation in PC12 cells. Cells (1 \times 10⁶ cells/ml) were seeded for 24hr and treated with Boyanghwantang (50, 100, 200 μ g/ml) in serum and glucose-deprived PC12 cells for 24hr. Generation of H₂O₂ from cultured supernatant was measured using scopoletin-HRP assay. Data were represented as a relative fluorescence to the control values. Results were represented as the means \pm S.D. of three experiments. Results represented as the means \pm S.D. of three experiments. **, p<0.01 * , p<0.05 compared to only serum and glucose-deprived group.

0.5배로 나타나 serum과 glucose가 제거된 상태에서 배양된 PC12 세포의 caspase-3 protease의 활성증가를 유의성 있게 감소시켰음을 관찰하였다(Fig. 9 B).

아울러 serum과 glucose가 제거된 상태에서 배양된 PC12 세포의 시간별 caspase-1, caspase-2, caspase-6 및 caspase-9 protease의 활성 변화를 측정하였으나 정상세포군에 비해 유의성있는 활성변화를 나타내지 않았다(Fig. 10).

6. 補陽還五湯이 전사활성인자인 NF- κ B의 활성에 미치는 효과

Serum과 glucose가 제거된 상태하의 PC12 세포의 세포고사가 전사활성인자인 NF- κ B의 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 시간별로 NF- κ B의 활성을 측정하였다. 전사활성인자인 NF- κ B는 서서히 활성화되기 시작하여 1시간 후에 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 11).

또한 補陽還五湯이 serum과 glucose가 제거된 상태에서 배양된 PC12 세포의 NF- κ B의 활성증가에 미치는 영향을 알아보기 위하여 serum과 glucose가 제거된 세포배양액에 補陽還五湯을 50, 100, 200, 400 μ g/ml 씩 처리하고 serum과 glucose가 제거된 상태에서 NF- κ B가 높은 활성을 보였던 1시간에 같은 조건으로 NF- κ B의 활성을 측정하였다. Fig. 11에서 보였던 NF- κ B의 활성이 Fig. 14에서 補陽還五湯의 농도에 의존적으로 감소되었음을 확인할 수 있었다. 이 결과로 전사활성인자 NF- κ B의 활성을 補陽還五湯이 농도의존적으로 감소시켜 허혈상태로 인한 PC12 세포의 세포고사를 유의성 있게 방어하고 있음을 알 수 있다(Fig. 12).

고 찰

補陽還五湯은 黃芪, 當歸, 赤芍藥, 川芎, 桃仁, 紅花, 地龍으로 구성되어 있으며 각 약물의 효능과 약리작용을 살펴보면, 黃芪는 補氣升陽·固表止汗·托毒排膿·生肌·利水退腫의 효능이 있으며, 강심작용, 말초혈관확장, 혈압강하, 부종감소 및 이뇨작용 등이 있

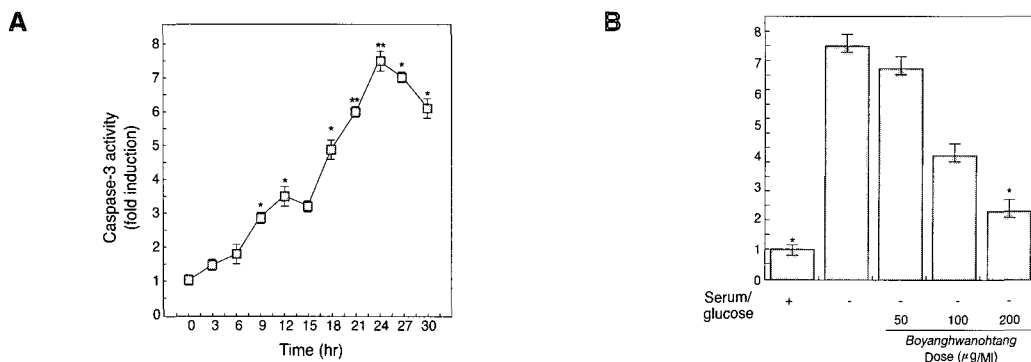


Fig. 9. *Boyanghwanoh-tang* inhibited activation of caspase 3-like proteases by serum and glucose deprivation in PC12 cells. A. Cells were deprived serum in the absence or presence each periods indicated. Lysates from the cells used to measure activity of caspase-3 using fluorogenic peptide Ac-DEVD-AMC (50μM). B. Cells (1 × 10⁵cells/ml) were seeded for 24hr and treated with *Boyanghwanoh-tang* (50, 100, 200μg/ml) in serum-deprived PC12 cells for 24hr. Data were represented as a relative fluorescent to the control values. Results represented as the means ± S.D. of three experiments. **, *p*<0.01 *, *p*<0.05 compared to only serum and glucose-deprived group.

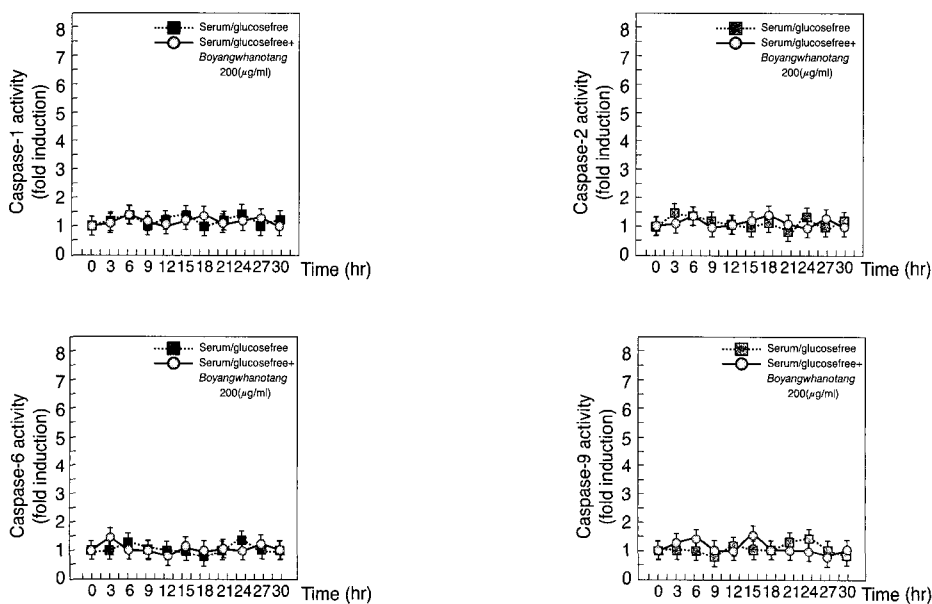


Fig. 10. Caspase 1, 2, 6, 9-like proteases did not activated by serum and glucose deprivation in PC12 cells. Cells were deprived serum in the absence or presence each periods indicated. Lysates from the cells used to measure activity of caspase-1, caspase-2, caspase-6, caspase-9 using fluorogenic peptide. Cells (1 × 10⁵cells/ml) were seeded for 24hr and treated with *Boyanghwanotang* (200μg/ml) in serum-deprived PC12 cells for 30hr. Data were represented as a relative fluorescent to the control values. Results represented as the means ± S.D. of three experiments.

다. 當歸는 補血活血, 調經止痛, 潤腸通便의 효능이 있으며, 자궁기능의 조절, 이뇨, 혈압강하, 항균작용

등이 있다. 赤芍藥은 清熱涼血, 活血祛瘀, 通順血脈, 散惡血의 효능이 있으며, 관상동맥확장, 중추신경억

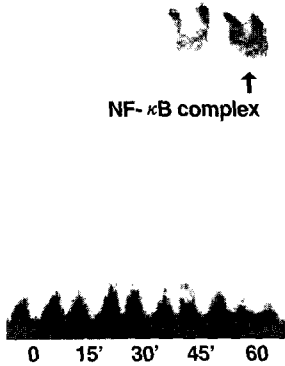


Fig. 11. Transcriptional activation of NF-κB by serum and glucose deprivation induced apoptosis in PC12 cells.

Cells (1×10^6 cells/ml) were seeded for 24hr and deprived serum and glucose for various periods (0, 15', 30', 45', 60'). Nuclear extracts were isolated and incubated with radio-labelled oligonucleotide probe of NF-κB. Transcriptional activation of NF-κB was assessed by using electrophoretic mobility shift assay.

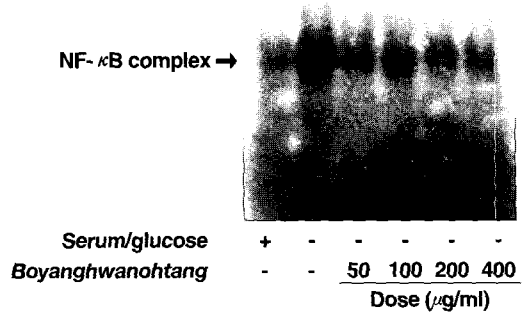


Fig. 12. Boyanghwanoh-tang inhibited the transcriptional activation of NF-κB by serum and glucose deprivation in PC12 cells.

Cells were washed with serum and glucose-free DMEM, treated with Boyanghwanoh-tang (50, 100, 200 μg/ml) for 1 hr. Nuclear extracts were isolated and incubated with radio-labelled oligonucleotide probe of NF-κB. Transcriptional activation of NF-κB was assessed by using electrophoretic mobility shift assay.

제, 위장평활근 억제작용 등이 있다. 川芎은 活血祛瘀, 祛風止痛, 行氣開鬱의 효능이 있으며, 말초혈관확장, 신경진통작용 등이 있다. 桃仁은 破血祛瘀, 潤燥滑腸의 효능이 있으며, 항혈액응고작용 등이 있다. 紅花는 破瘀活血, 通經, 消腫止痛의 효능이 있으며, 항혈액응고, 평활근수축작용 등이 있다. 地龍은 通絡止痛, 熄風止癇, 清熱平肝, 平喘, 利水の 효능이 있으며, 용혈, 진정작용 등이 있다¹²⁻¹⁵.

따라서 補陽還五湯은 活血祛瘀, 通經 함으로써 氣虛血瘀로 인한 질환에 활용되고 있으며², 최근에는 뇌경색, 뇌출혈, 일과성 뇌허혈, 고혈압성 뇌증, 혈관성 치매 등의 뇌혈관 질환뿐만 아니라¹⁶⁻¹⁸, 협심증, 심근경색 등의 심혈관 질환 등에도 응용되고 있다^{5,6}.

뇌혈관 질환시 나타나는 뇌세포 손상은 허혈상태에서 발생하는 활성산소에 의한 산화적 손상(oxidative stress)이 중요한 기전의 하나로 알려져 있으며, 활성산소에 의해 일어나는 세포고사는 개체 내에서 발생하는 생리적, 병리적 현상으로 유전적으로 조절되는 세포사 과정을 의미하며, 세포수준과 조직

수준에서 항상성 조절에 중요한 역할을 한다^{18,19}.

많은 신경계 질환의 증상 발현은 중추신경세포의 고사가 주원인으로 작용하고 있으며, 중추신경세포들은 아주 민감하여 짧은 시간 동안의 허혈(ischemia)에 의하여 방출된 아미노산 글루타메이트(glutamate)에 의해 흥분독성(excitotoxicity)이 이루어지는데 흥분독성 이외에 직접적인 산화성 손상(oxidative stress)도 중추신경세포 고사의 중요한 기전의 하나로 논의되고 있다^{18,19}. 세포 내 활성산소의 생성이 증가하면 lipid peroxidation에 의한 membrane 구조의 파괴, OH⁻에 의한 DNA 손상, 이중결합구조나 -SH를 포함하는 산화반응에 의한 단백질의 변성 등은 신경세포 고사의 원인이 될 수 있다. 신경계 질환에서 보이는 신경세포 고사에 산화적 손상이 관여한다는 증거로는 허혈 후 활성산소의 생성 증가 및 항산화제에 의한 허혈성 신경세포의 고사억제효과, Parkinson's disease의 substantia nigra에서 Fe²⁺의 증가,

glutathione의 감소, glutathione-peroxidase의 감소, catalase의 감소, dopamine의 산화작용에 의한 활성산소의 생성, Huntington's disease의 striatum에서 Fe²⁺의 증가, Alzheimer's disease에서 나타나는 β -amyloid에 의한 활성산소의 생성, ALS (amyotrophic lateral sclerosis)에서 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD-1) gene에서의 point mutation 등을 들 수 있다²⁰⁻²². 이러한 허혈로 인한 산화적 손상이 세포 내에서 어떠한 대사적 경로를 통하여 신경세포 고사를 일으키는지는 아직 명확히 알려져 있지는 않지만 아마도 활성산소 생성에 의한 산화성 손상이 관여한다고 보여지고²³, 이러한 세포손상 기전들이 단독 또는 복합적인 기전으로 작용함으로써 신경세포 고사를 초래하여 신경계 질환들이 유발된다고 보고되고 있다^{24,25}. 산화성 손상에 의한 신경세포 고사는 활성산소가 세포 내 Ca²⁺의 양을 증가시키고 insulin receptor kinase, src protein kinase, p72syk tyrosine kinase 등의 효소를 자극하여 tyrosine phosphorylation, PKC 및 PLA2의 활성 등을 유도하여 세포의 기능 및 생존에 필수적인 신호전달계에 영향을 주는 것으로 알려져 있다^{26,27}. 더욱이 활성산소는 c-fos와 c-jun과 같은 AP-1 transcription factor의 발현을 증가시키며, NF- κ B의 활성을 유도하기도 한다³⁰⁻³². 이러한 과정을 이해하는 것은 세포고사와 관련된 질병을 치료하는 근본적인 방법을 제시할 수 있다.

補陽還五湯에 대한 실험적 연구로는 김³³의 補陽還五湯이 혈압 및 국소뇌혈류량에 미치는 영향, 박³⁴의 補陽還五湯이 血栓生成關與因子에 미치는 影響 등이 보고되어 있으며, 한약제제를 이용하여 영양혈청 결핍상태에서 PC12 세포의 세포고사에 대한 연구로는 임³⁵의 還少丹이 영양혈청 결핍성 PC12 세포의 Apoptosis에 미치는 영향, 최³²의 PC12 세포의 Apoptosis에 대한 星香正氣散의 방어효과 및 작용기전 연구 등이 보고되었으나 補陽還五湯의 영양혈청 결핍에 의한 신경세포고사에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다.

이에 저자는 補陽還五湯이 신경세포 손상에 미치는 영향을 실험적으로 연구하기 위하여 PC12 세포에

서 serum과 glucose를 제거하여 허혈상태와 유사한 조건을 준 상태에서 PC12 세포의 생존율, Hoechst 핵염색, 세포 내 GSH 함유량, H₂O₂의 생성량, caspase계 cysteine protease의 활성도, NF- κ B의 활성도를 관찰하였다.

먼저 허혈상태와 유사한 조건을 만들기 위하여 정상 PC12 세포에서 정상조건인 세포배양액을 제거한 후 serum과 glucose가 제거된 세포배양액으로 2번 세척하여 남아있는 serum과 glucose를 제거하였다. 이후 6시간, 12시간, 18시간, 24시간이 지난 후 각각 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정 한 결과, 24시간이 경과하자 정상세포군에 비해 serum과 glucose를 제거한 상태하의 PC12 세포가 50% 이하의 세포생존율을 보였다(Fig. 1). 이에 반하여 補陽還五湯을 50, 100, 200, 400 μ g/ml씩 농도별로 동시 처리하고 24시간 후 관찰한 결과 200 μ g/ml까지 농도의존적으로 세포생존율이 증가하여 200 μ g/ml의 경우는 88 \pm 1%로 유의성있는 세포생존율이 관찰되었다(Fig. 2).

또한 serum과 glucose가 제거된 상태하의 PC12 세포에서 세포고사의 형태학적인 변화를 알아보기 위하여 Hoechst로 핵 염색을 시행한 결과, 세포고사의 형태학적인 특징의 하나인 염색사 응축현상과 핵분절 현상이 관찰되어, serum과 glucose의 결핍에 의한 PC12 세포는 전형적인 세포고사가 유도되는 것을 확인하였다. 그러나 200 μ g/ml의 補陽還五湯을 동시 처리한 세포군에서는 이러한 염색사 응축이나 핵분절 현상이 거의 나타나지 않았으며(Fig. 3), genomic DNA를 분리하여 agarose gel에 전기영동을 시행한 결과, serum과 glucose가 제거된 상태에서 24시간 배양 후의 PC12 세포는 DNA 분절현상이 관찰되었으나 補陽還五湯을 동시 처리한 경우에는 농도의존적으로 DNA 분절현상이 감소되어(Fig. 4) 補陽還五湯을 비롯한 여러 항산화제들이 PC12 세포의 고사를 유의성 있게 방어하고 있음도 확인되었다. 또한, 세포 내 중요한 항산화물질인 GSH 함유량의 변화를 살펴본 결과, serum과 glucose가 제거된 상태하의 PC12 세포의 고사에 따른 세포 내 GSH 함유량은 정상세포군과 비교하여 24시간까지 일정하게 20% 정도까

지 감소됨을 확인하였고(Fig. 5), 이러한 세포 내 GSH 함유량의 변화에 대한 補陽還五湯의 효과를 관찰하기 위하여 補陽還五湯을 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 씩 농도별로 동시 처리한 후 GSH 함유량을 측정 한 결과, 補陽還五湯의 농도에 의존적으로 serum과 glucose의 결핍으로 감소되었던 세포 내 GSH 함유량이 다시 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

산화성 손상과 관련한 이러한 세포 내 GSH 함유량의 감소가 활성산소의 생성에 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 serum과 glucose가 제거된 상태하에서 직접 H_2O_2 의 생성량을 측정하였다. 거의 시간의존적으로 24시간이 경과하자 H_2O_2 가 정상세포군에 비해 6배 이상이 생성되었으나(Fig. 7), 補陽還五湯을 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 씩 농도별로 동시 처리하고 24시간 후 H_2O_2 의 생성량을 측정 한 결과, 補陽還五湯의 농도에 의존적으로 감소되어 200 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 경우에는 정상세포와 비슷한 수준으로 1.2 ± 0.03 배를 나타내어 유의성있는 H_2O_2 의 감소가 관찰되었다(Fig. 8). 이 결과는 PC12 세포의 serum과 glucose의 결핍으로 인한 세포고사가 활성산소의 생성과 관련하고 있음을 시사한다.

Serum과 glucose를 제거한 상태하의 PC12 세포의 고사과정에 cysteine계의 단백질 분해효소로 단백질을 분해하여 세포를 세포고사로 유도하는 작용을 하는 caspase의 활성과 어떤 관련이 있는지를 알아보기 위하여 caspase의 활성을 측정하였다. 그 결과, caspase-1, caspase-2, caspase-6, caspase-9 protease는 높은 활성을 보이지 않았으나(Fig. 10), caspase-3 protease는 시간의존적으로 증가하여 24시간이 경과하자 정상세포군에 비해 7배 이상의 활성을 보였다(Fig. 9 A). 그리고 serum과 glucose를 제거한 상태하의 PC12 세포에 補陽還五湯을 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 씩 농도별로 동시 처리하고 24시간 후 caspase-3 protease의 활성을 관찰한 결과 caspase-3 protease의 활성이 현저하게 감소되었으며, 補陽還五湯 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 경우에는 정상세포군에 비해 2.3 ± 0.5 배로 나타나 유의성있는 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 9 B). 이 결과로 serum과 glucose의 결핍으로 인한 PC12 세포의 고사

가 caspase-3 protease의 활성과 관련함을 의미하며, 補陽還五湯이 이를 유의하게 보호하고 있음을 알 수 있다.

최근 들어 transcription factor인 NF- κ B의 활성이 신경세포의 고사과정에 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되어 흥미를 끌고 있다. 산화성 손상과 관련한 free radical, 성장단백질 등을 처리하면 세포질에 있는 I κ B의 인산화 및 분해가 일어나고 이어서 NF- κ B는 자유로운 상태로 되어 p65-p50 heterodimer의 상태로 핵으로 전이된다. 본 연구에서도 serum과 glucose의 결핍으로 인한 PC12 세포의 세포고사과정에 전사활성인자 NF- κ B와 어떤 관련이 있는지를 알아보기 위하여 시간별로 NF- κ B의 활성을 측정하였다. Serum과 glucose가 결핍된 후 서서히 NF- κ B의 활성이 일어나기 시작해서 60분에 이르러 가장 많은 활성을 보였다(Fig. 11). 그리고 전사활성인자 NF- κ B가 가장 많은 활성을 보였던 60분에 補陽還五湯이 어떤 효과가 있는지를 확인하기 위하여 補陽還五湯을 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 씩 농도별로 동시 처리한 세포군의 NF- κ B의 활성을 측정 한 결과, 농도의존적으로 NF- κ B의 활성이 감소되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 12). 이는 serum과 glucose의 결핍으로 인한 PC12 세포의 고사과정에 전사활성인자인 NF- κ B가 관여하고 있으며, 또한 補陽還五湯이 NF- κ B의 활성을 감소시켜 serum과 glucose의 결핍으로 인한 PC12 세포의 고사를 유의성 있게 방어하고 있음을 보여주고 있다.

이상의 결과를 종합하면 補陽還五湯이 serum과 glucose의 결핍으로 인한 H_2O_2 의 생성과 이로 인한 세포 내 중요한 항산화물질인 GSH 함유량의 감소를 유의성 있게 회복시켰고, 단백질을 분해하여 세포고사를 유도하는데 중요한 매개체로 작용하는 caspase-3의 활성과 전사활성인자인 NF- κ B의 활성을 억제함으로써 serum과 glucose의 결핍으로 인한 PC12 세포의 세포고사에 보호작용이 있는 것으로 나타났으므로 補陽還五湯은 허혈상태의 신경세포에서 활성산소에 의한 세포손상으로 야기되는 질환에 응용될 수 있으며, 자세한 작용기전에 대한 계속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

氣虛血瘀로 인한 中風에 활용되는 補陽還五湯이 虛血로 유도된 신경세포손상에 미치는 방어효과를 알아보기 위하여 신경세포의 특징을 나타내는 PC12 세포에 serum과 glucose의 공급을 중단한 상태에서 補陽還五湯을 처리한 후 PC12 세포 생존율, Hoechst 핵 염색, 세포 내 GSH 함유량, H₂O₂의 생성량, caspase계 cysteine protease의 활성도, NF-κB의 활성도를 측정 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 補陽還五湯은 영양혈청결핍에 의한 PC12 세포 생존율의 감소를 억제시켰다.
2. 補陽還五湯은 영양혈청결핍에 의한 PC12 세포의 핵 분절과 염색사 응축현상을 억제시켰다.
3. 補陽還五湯은 영양혈청결핍에 의한 PC12 세포의 GSH 함유량 감소를 농도의존적으로 억제시켰다.
4. 補陽還五湯은 영양혈청결핍에 의한 PC12 세포의 H₂O₂ 생성량 증가를 농도의존적으로 억제시켰다.
5. 補陽還五湯은 영양혈청결핍에 의한 PC12 세포의 caspase-3 protease의 활성 증가를 농도의존적으로 억제시켰다.
6. 補陽還五湯은 영양혈청결핍에 의한 PC12 세포의 전사활성인자 NF-κB 활성증가를 농도의존적으로 억제시켰다.

이상의 결과로 보아 補陽還五湯은 영양혈청결핍에 의한 PC12 세포의 활성산소 생성 및 세포내 GSH 함유량 감소를 억제시켰으며, caspase-3 protease와 NF-κB의 활성 증가 억제를 통하여 세포고사를 억제시켰으므로 허혈로 인한 신경세포 고사 보호제로 활용될 수 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 王清任. 醫林改錯. 서울: 醫聖堂.1994:84-86.
2. 鄭津牟. 中醫處方解說·臨床·應用. 서울: 癸丑文化社.1986:170-171.

3. 陳偉, 路一平. 方劑學. 서울: 醫聖堂.1993:336-337.
4. 東醫科學院. 東醫處方大全. 서울: 驪江出版社. 1993:2270.
5. 劉亦選. 活血化瘀辨治常見心臟病. 新中醫.1986;18(8): 53-54.
6. 卍長青, 蔡傳洋. 補陽還五湯加減治療血栓性深靜脈炎 63例. 浙江中醫雜誌.1996;31(8):366.
7. Kirino T., Tamura A., Sano K.. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia reversible and irreversible types of ischemic cell damage. Progress in Brain Res..1985; 63:39-58.
8. Dugan L.L., Sensi S.L., Canzoniero L.M.T., Choi D.W.. Mitochondria production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. J. Neurosci..1995;15:6377-6388.
9. Shigeno T., Yamasaki Y., Kato G., Kusaka K., Mima T., Takakura K., Graham D.I., Eurukawa S.. Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis. Neurosci. Lett..1990;120:117-119.
10. Goedert M., Sisodia S.S., Price D.L. : Neurofibrillary tangles and beta-amyloid deposits in Alzheimer' disease. Curr. Opin. in Neurobiol..1991;1:441-447.
11. 洪元植. 中國醫學史. 서울: 東洋醫學研究院.1987:335-336.
12. 辛民教. 臨床本草學. 서울: 永林社.1986:169-171, 221-223, 249-250, 300-301, 464-468, 662-663.
13. 申佶求. 申氏本草學(各論). 서울: 壽文社.1988:9-12, 80-84, 448-450, 521-522, 554-556, 562-564, 600-603.
14. 鄭普燮, 辛民教. 圖解 鄉藥(生藥)大事典. 서울: 永林社.1990:407-408, 418-419, 523-524, 632, 662-664, 1034-1035.
15. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균 역. 中藥大辭典. 서울: 정담.1998:592-599, 1159-1168, 1353-1358, 4839-4845, 5258-5265, 6357-6362, 6460-6471.
16. 全國 韓醫科大學 心系內科學教室 編. 東醫心系內科學. 서울: 書苑堂.1999:420-424.
17. 金永錫. 臨床中風學. 서울: 書苑堂.1997:303-348.
18. Aizenman Y, de Vellis J.. Brain neurons develop in a

- serum and glucose free environment: effects of transferrin, insulin, insulin-like growth factor- I and thyroid hormone on neuronal survival, growth and differentiation. *Brain Res.* 1987;406:32-42.
19. Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Bains I.C., Tekle E, Chock P.B. and Rhee S.G.. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:217-221.
20. Buttke, T.M. and Sandstrom, P.A.. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today.* 1994;15:7-10.
21. Coyle, J.T. and P. Puttfarcken. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science.* 1993;262:689-695.
22. Gotz, M.E., A. Freyberger and P. Riederer.. Oxidative stress: a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* 1990;29:241-249.
23. Savitz S.I., Rosenbaum D.M.. Apoptosis in neurological disease. *J. Neurosurgery.* 1998; 42:555-574.
24. Greene, L.A.. Induction of CPP32-like activity in PC12 cells by withdrawal of trophic support. Dissociation from apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1996;271:30663-30671.
25. Kato, S., K. Negishi, K. Mawatari and C.H. Kuo. A mechanism for glutamate toxicity in the C6 glioma cells involving inhibition of cystine uptake leading to glutathione depletion. *J. Neurosci.* 1992;48:903-914.
26. Murphy, T.H., M. Miyamoto, A. Sastre, R.L. Schnaar and J.T. Coyle. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cysteine transport leading to oxidative stress. *Neuron.* 1989;2:1547-1548.
27. Ozyurt E., Graham D.I., Woodruff G.N., McCulloch J.. Protective effect of the glutamate antagonist. MK-801 in focal cerebral ischemia in the cat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1988;8:138-143.
28. Peter Lipton.. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol. Review.* 1999;70:1499.
29. Shirlee Tan, Yutaka Sagara, Yuanbin Liu. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J. Cell Biol.* 1998;141:1413-1432.
30. Sundaresan M., Yu Z.Y., Ferrans V.J., Irani K. and Finkel T.. Requirement for Generation of H₂O₂ for Platelet Derived Growth Factor Signal Transduction. *Science.* 1995;270:296-299.
31. 임준식, 김명선, 소홍섭, 이지현, 한상혁, 허 윤, 박래길, 문병순. 還少丹이 영양혈청 결핍성 PC12 신경세포의 Apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000; 21(4):64-72.
32. 최철원, 이인, 이기상, 조남수, 문병순. PC12 세포의 Apoptosis에 대한 星香正氣散의 방어효과 및 작용기전 연구. 대한한의학회지. 2002;23(1):50-60.
33. 김남용, 이인, 장호연, 임준모, 김승모, 조한국, 차용석, 문병순. 補陽還五湯이 혈압 및 국소뇌혈류량에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001;15(5):682-686.
34. 박선영, 박종형, 한양희, 전찬용, 김동우, 박세기, 이청정혜, 고승희, 고재철, 최유경. 補陽還五湯이 血栓生成 關與因子에 미치는 影響. 대한한방내과학회지. 2000; 21(5):829-837.