

加味補陽還五湯의 SH-SY5Y 뇌신경세포에서 산화적 손상에 의한 세포사멸에 대한 보호효과

박용기^{#*}, 한형수¹

동국대학교 한의과대학 본초학교실, 1: 경북대학교 의과대학 생리학교실

Protective effects of added Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang on H₂O₂-induced
neurotoxicity in SH-SY5Y neuronal cells

Yong-Ki Park^{#*}, Hyung Soo Han¹

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju, 780-714 Korea
1: Department of Physiology, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, 700-422 Korea.

ABSTRACT

Objectives : To evaluate the neuroprotective effects of added Bo-Yang-Hwan-O-Tang (BHT), we investigated the neuronal death protection effects to oxidative damages in SH-SY5Y neuronal cells.

Methods : To study the cytotoxic effect of BHT on SH-SY5Y cells, the cell viability was determined by MTT assay. To investigate the neuronal death protection of BHT, SH-SY5Y cells were induced oxidative damages by H₂O₂ and then assayed the cell viability and DNA fragmentation. We also investigated DPPH free radical scavenging effect of BHT by tube test.

Results : In MTT assay, 1000 μg/ml of BHT was not showed the cytotoxic effect on SH-SY5Y cells. BHT protected SHSY5Y cells from H₂O₂-induced neuronal cell death in a dose-dependent manner. BHT also protected SH-SY5Y cells from H₂O₂-induced DNA fragmentation. BHT effectively scavenged DPPH free radicals in a dose-dependent manner.

Conclusion : These data suggest that BHT may have strong antioxidant effects through the free radical scavenging and neuroprotective effects in human neuronal cells.

Key words : antioxidation, apoptosis, Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang, H₂O₂-induced neuronal death, neuroprotecitve effect, SH-SY5Y cells.

[#]*제1저자, 교신저자: 박용기, 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel: 054-770-2661 · E-mail: yongki@dongguk.ac.kr,
· 접수 : 2006년 11월 1일 · 수정 : 2006년 11월 19일 · 채택 : 2006년 12월 20일

서 론

최근 생활수준의 향상과 식생활 환경의 변화로 사회가 노령화 되면서 노인인구의 급증과 함께 뇌졸중, 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병 등 퇴행성뇌질환의 치료와 예방에 관심이 고조되고 있다¹⁾. 퇴행성뇌질환은 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 여러 가지 증상을 유발하는 질병으로 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅تون병(Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) 등이 있다. 산화적 손상(oxidative stress)은 세포 내 자유기(free radical species)의 생산과 이를 조절하는 항산화 방어 기작(antioxidant defence mechanism)과의 불균형(imbalance)에 의해 유발되는데 세포손상(cellular damage) 및 세포사멸(cell death)을 유도하게 된다^{2,3)}.

산화적 손상은 특히 뇌와 같은 고도의 metabolic rate를 가지는 기관에서 세포사멸(cell apoptosis)을 유도하게 되므로 퇴행성뇌질환의 발생과 병태생리에 있어 매우 중요한 역할을 하게 된다^{4,9)}. 퇴행성뇌질환은 한번 손상을 받은 신경세포는 재생되지 않기 때문에 그 치료가 매우 어려운 실정이다. 따라서 최근에는 임상적으로 경험이 풍부한 한의학에 초점을 두고 한방치료제를 이용한 퇴행성 뇌질환 치료에 대한 연구들이 다양하게 시도되고 있다¹⁰⁻¹⁴⁾. 동의보감에 수록된 뇌질환 관련 치료제는 상용약 중 100여 가지 이상이며 이들은 대부분 중추신경억제효과, 항산화 효능 및 항염 효능 등이 있는 것으로 알려지고 있다³²⁾. 따라서 다양한 한방제제에 대한 임상자료 및 문헌을 근거한 한약을 토대로 퇴행성 뇌질환 한방치료제를 개발하는 것은 매우 중요하며 한약제제의 치료효능 및 작용기전을 체계적이고 과학적으로 검증함으로써 향후 양방 치료법과의 병용 및 상승효과가 우수한 치료제로 개발하는 것이 중요하다.

補陽還五湯은 清代 王清任의 醫林改錯에 처음 수록된 處方으로써 補氣하는 黃芪와 活血祛瘀作用이 있는 當歸尾, 赤芍藥, 川芎, 桃仁, 紅花와 通經活血하는 地龍으로 구성되어 있으며¹⁵⁻¹⁸⁾, 補氣, 活血化瘀, 通絡하는效能으로 氣虛로 인한 癪瘕證을 치료하는 處方 및 氣虛血瘀로 인한 中風 半身不遂의 治療에 활용되어 왔다¹⁹⁾. 近來에는 虛血性 腦血管 疾患, 腦動脈硬化 뿐만 아니라 冠狀動脈硬化, 心筋梗塞, 狹心症, 多發性神經炎, 血栓性靜脈炎 等의 疾患에도 應用되고 있다²⁰⁾. 또한 補陽還五湯이 腦血栓과 血中脂質改善作用이 있으며²¹⁾, 局所腦血流量의 增加效果^{22,23)}, 血壓降

下作用²⁴⁾, 血栓生成 抑制效果²⁵⁾ 및 高血壓이나 高脂血症에 대한 抑制 效果²⁶⁾가 있는 것으로 研究되었으며, 學習과 記憶의 減退 및 치매억제에 대한 效果²⁷⁾ 외에 可逆性 前腦虛血로 인한 腦細胞 損傷을 減少시키고²⁸⁾, 免疫調節作用, 抗炎症²⁹⁾, 神經膠細胞의 apoptosis를 抑制한다고 報告되었다³⁰⁾. 그런데 동국대학교 한방병원에서 주로 사용하는 加味補陽還五湯은 王清任의 補陽還五湯에 活血祛瘀하는 牛膝과 丹蔘, 血液循環을 촉진하는 桂枝 그리고 化瘀開竅하는 遠志와 石菖蒲를 기미한 것이다. 따라서 본 연구에서는 실제 임상에서 사용하는 加味補陽還五湯(modified Bi-Yang-Hwan-Oh-Tang; BHT)이 사람에서 뇌신경보호효과가 있는지 검증하고자 사람의 뇌신경세포주인 SH-SY5Y 세포를 이용하여 항신화 효과 및 뇌신경 보호효과를 검증하였다.

재료 및 방법

1. 加味補陽還五湯의 제조

본 실험에 사용한 加味補陽還五湯(added Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang; BHT)은 표 1의 처방대로 각 약제를 정량하여 세밀한 다음 중류수를 무게에 대해 부피비로 10배 첨가하여 가스 악기로 용출하였으며 이를 2겹 거더즈로 여과한 다음 회전식 증발기(rotary vaccum evaporator)로 감압농축한 후 동결건조하여 315.5g을 얻었고 -80°C에서 보관하였다. 실험직전 건조된 BHT 에기스를 0.1M NaCl이 첨가된 0.1M phosphate buffer로 50mg/ml 농도로 녹여 시료 검액으로 사용하였다(yields; 32.4 %).

Table 1. Prescription of added Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang

韓藥名	生藥名	重量(g)
黃芪	Astragalus Radix	375
當歸尾	Angelicae Lateralis Radix	75
赤芍藥	Paeoniae Radix	56.25
川芎	Uridii Rhizoma	37.5
桃仁	Lunbricus	37.5
紅花	Perciccae Semen	37.5
	Cartagami Flos	37.5
牛膝	Achyranthis Bidentatae Radix	56.25
丹蔘	Salviae Miltiorrhizae Radix	150
桂枝	Cinnamomi Ramulus	37.5
遠志	Polygalae Radix	37.5
石菖蒲	Acori Graminei Rhizoma	37.5
	Total amount	975(g)

2. 세포배양

본 실험에 사용된 사람의 신경세포주(neuroblastoma)인

SH-SY5Y 세포는 10% fetal bovine serum(FBS; Hyclone) 및 100U/ml penicillin과 streptomycin(GibcoBRL)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)을 배양액으로 하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

3. 세포독성(Cytotoxicity) 검정

SH-SY5Y 세포를 2×10⁴cells/well로 계수하여 96-well culture plate(NalgeNunc International, Hereford, UK)의 각 well에 100μl 배지와 함께 하룻밤 배양한 다음, 다양한 농도(50μg/ml, 100μg/ml, 200μg/ml, 500μg/ml, 1000μg/ml 및 2000μg/ml)의 BHT를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 또한 적정 세포 사멸을 유도하기 위해 H₂O₂를 농도별(100μM~500μM) 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 여기에 10μl의 MTT 용액을 넣어 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도한 다음, 상층액을 제거하고 100μl의 DMSO 용액을 첨가하여 formazan 결정을 완전히 용해하였다. 반응정도는 microplate reader (SpectraMax-340, Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다. BHT의 세포독성 및 H₂O₂ 처리에 의한 세포사멸정도는 세포만 배양한 무처리 대조군을 기준으로 상대적인 세포생존도(cell viability)를 퍼센트(%)로 계산하였다.

4. H₂O₂ 처리에 의한 신경세포의 산화적 손상 유도

SH-SY5Y 세포를 2×10⁴cells/well로 계수하여 96-well culture plate의 각 well에 100μl 배지와 함께 하룻밤 배양한 다음, 다양한 농도(50~1000μg/ml)의 BHT를 처리하여 90분간 배양하였다. 여기에 200μM의 H₂O₂를 처리하여 24시간 배양한 다음 10μl의 MTT 용액을 넣어 4시간 동안 배양하고 100μl의 DMSO 용액을 첨가하여 formazan 결정을 완전히 용해하였다. 반응정도는 microplate reader를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였으며 BHT의 신경보호 효과를 H₂O₂만 처리한 대조군을 기준으로 세포생존도를 퍼센트(%)로 계산하였다.

5. DNA fragmentation 분석

SH-SY5Y 세포를 1×10⁵cells/well로 계수하여 6-well culture plate의 각 well에 2ml DMEM 배지와 함께 하룻밤 배양한 다음, BHT를 처리하여 90분간

배양하였다. 여기에 200μM H₂O₂를 처리하여 24시간 배양함으로써 신경세포손상을 유도하였다. 수거된 세포에 lysis buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.2% Triton X-100)를 200μl 첨가하여 세포를 lysis시킨 다음, 30분간 얼음에 유지하고 proteinase K(200μg/ml)를 첨가하여 37°C에서 24시간 반응시켰다. 여기에 phenol: chloroform(1:1) 용액을 동량 넣고 잘 혼합한 후 15,000rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 상등액을 수거하여 100% ethanol로 침전 시킨 다음 DNA pellet을 실온에서 건조시키고 RNase 10μg/ml이 첨가된 TE buffer 30μl로 완전히 녹였다. 이를 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 세포 손상에 의한 DNA fragmentation 유무를 관찰하였다.

6. 자유기(free radical) 소거능 검정

BHT의 자유기 소거능을 측정하기 위해서 Yoshida 등³¹⁾에 의한 DPPH 방법을 수행하였다. 즉, 0.1M acetic acid(pH 5.5) 2ml에 다양한 농도(50~1000μg/ml)의 BHT 2ml 및 1.5×10⁻⁴M DPPH/MeOH 용액 1ml을 섞어 실온에 30분간 정치한 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정결과는 distilled water 대조군(control)을 기준으로 자유기 소거능(radical scavenging activity; %)으로 표시하였다.

7. 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균 ± 표준편차 (standard deviation; SD)로 나타내었으며 통계학적 분석은 ABI prism의 Student t-test로 검정하여 p값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과

1. 加味補陽還五湯의 세포독성

BHT의 세포독성을 조사하기 위해서 SH-SY5Y 세포에 50~2000μg/ml 농도의 BHT을 처리하여 MTT assay를 수행하였다. SH-SY5Y 세포에 BHT를 50μg/ml, 100μg/ml, 200μg/ml, 500μg/ml, 1000μg/ml 및 2000μg/ml 농도로 처리한 결과, 세포생존율(cell viability; %)은 세포만 배양한 대조군 세포생존율을 100%를 기준으로 각각 108.1±8.41%, 122.71±5.72%, 98.77±3.85%, 93.99±3.03%, 89.21±2.48%, 34.01±

5.77%로 측정되었다(Fig. 1). 따라서 BHT는 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지 세포독성이 없는 것으로 나타났으며, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 SH-SY5Y 세포의 증식(proliferation)이 오히려 유도되는 것을 관찰하였다.

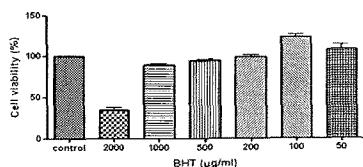


Fig. 1. Cell toxicity of BIIT in SH-SY5Y cells.

SH-SY5Y 세포는 처리된 H₂O₂ 농도에 따라 세포사멸(apoptosis) 정도를 조사하기 위해서 100~500 μM 의 H₂O₂를 처리하여 MTT assay를 수행하였다. SH-SY5Y 세포는 세포만 배양한 대조군(100%)에 비해 100 μM 의 H₂O₂를 처리하였을 때 세포생존율이 99.43± 2.84%였으며, 200 μM H₂O₂ 처리에서는 62.15± 0.43%, 300 μM H₂O₂ 처리에서는 26.02± 1.56%, 400 μM H₂O₂ 처리에서는 12.8± 0.28% 및 500 μM H₂O₂ 처리에서는 4.31± 0.29%로 측정되었다(Fig. 2). 따라서 산화적 손상의 해 유도된 세포사멸에 대한 BHT의 보호효과는 200 μM 의 H₂O₂를 처리한 후 조사하였다.

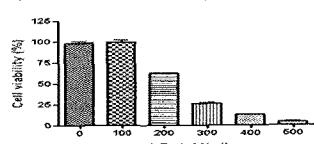


Fig. 2. H₂O₂-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were treated with increasing concentrations of H₂O₂(100~500 μM) and 24 hr post-insult viability was assessed by the MTT assay. Results are mean± SD of three independent experiments(n=3).

3. 加味補陽還五湯의 신경세포 보호효과

BHT의 H₂O₂ 처리에 의해 유도된 신경세포사멸에 대한 보호효과를 확인하기 위해 SH-SY5Y 세포에 50~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 BHT를 세포에 전처리한 후 200 μM 의 H₂O₂로 산화적 손상을 유도하여 MTT assay를 수행하였다. H₂O₂ 처리에 의해 세포사멸이

유도된 SH-SY5Y 세포(56.58± 1.65%)는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 BHT 처리 농도에서 세포생존율이 각각 62.12± 1.65%, 75.15± 0.985%, 91.88± 0.99%, 65.86± 2.69% 및 26.18± 4.11%로 측정되었다(Fig. 3). H₂O₂ 처리에 의해 유도된 SH-SY5Y 세포사멸에 대한 BHT의 보호효과는 농도에 의존적이지 않았으며, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 BHT 처리 시 오히려 높은 유의성으로 신경세포손상이 억제되는 것을 알 수 있었다.

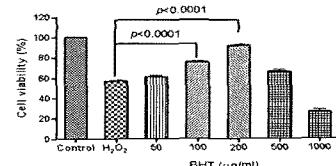


Fig. 3. Protective effects of BIIT in apoptotic SH-SY5Y cells.

SH-SY5Y 세포는 처리된 H₂O₂ 농도에 따라 세포사멸(apoptosis) 정도를 조사하기 위해서 200 μM H₂O₂로 처리된 세포와 대조군(untreated cells)을 사용하였다. 세포생존율은 MTT assay를 통해 24시간 후에 측정되었다. 200 μM H₂O₂ 처리된 세포는 대조군에 비해 56.58± 1.65%로 유도되었으며, BHT는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지의 농도에서 유의적인 보호효과를 보였다. 그 결과, Fig. 4에서처럼 세포만 배양한 정상군에서는 DNA ladder가 보이지 않았으며 H₂O₂만 처리하여 세포사가 유도된 대조군의 경우는 1Kbp 이하에서 불연속적인 ladder가 관찰되었다. 또한 BHT을 전처리할 경우 ladder가 관찰되지 않는 경향을 나타내었다.

4. 加味補陽還五湯이 신경세포의 DNA fragmentation에 미치는 영향

세포사멸이 일어나면 자가효소에 의해 세포내의 염색체가 잘라지게 되며 약 200~400bp 만큼 씩 불연속적인 절편(fragmentation)이 만들어지는데 이런 세포사의 일차 과정인 세포핵의 변화를 관찰하기 위해서 BHT를 농도 별로 전처리한 다음 200 μM 의 H₂O₂로 산화적 손상을 유도하여 배양한 세포의 세포사가 억제되는 정도를 DNA fragmentation을 조사하였다. 그 결과, Fig. 4에서처럼 세포만 배양한 정상군에서는 DNA ladder가 보이지 않았으며 H₂O₂만 처리하여 세포사가 유도된 대조군의 경우는 1Kbp 이하에서 불연속적인 ladder가 관찰되었다. 또한 BHT을 전처리할 경우 ladder가 관찰되지 않는 경향을 나타내었다.

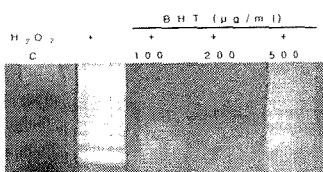


Fig. 4. Effect of BHT on DNA fragmentation in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were incubated with BHT for 24 h, DNA ed by lysis buffer. DNA fragments were analyzed by 2% agarose-gel electrophoresis. lane 1, non-treated control; lane 2, H_2O_2 alone; lane 3, 100 $\mu g/ml$ and BHT/ H_2O_2 , BHT-pretreatment.

5. 加味補陽還五湯의 DPPH free radical 소거효과

BHT의 free radical 소거능력을 알아보기 위해 DPPH radical 소거효과를 조사하였다. BHT를 농도별로 반응시켜본 결과, 50 $\mu g/ml$, 100 $\mu g/ml$, 200 $\mu g/ml$, 500 $\mu g/ml$, 1000 $\mu g/ml$ 농도에서 각각 13.27 \pm 7.28%, 13.51 \pm 0.35%, 16.68 \pm 0.73%, 25.61 \pm 1.18%, 및 26.51 \pm 1.26%의 소거능이 측정되었으며 BHT의 농도에 의존적으로 free radical 소거효과가 인정되었다.

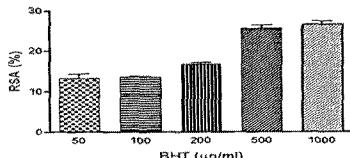


Fig. 5. Scavenging effect of BHT on DPPH radical. The effects of BHT on DPPH radical were determined by tube test. Each values present the mean \pm SD of three independent experiments. RSA, radical scavenging activity(%) - [control O.D. value - experimental O.D. value] / control O.D. value \times 100.

고 칠

현대사회의 특징인 고령인구의 증가는 퇴행성 뇌질환 환자의 수를 급격히 증가시키고 있으며 이는 사회적인 그리고 국가적인 부담이 되고 있다. 따라서 알츠하이머병, 파킨슨병, 현팅تون병과 같은 퇴행성 뇌질환 치료를 위한 치료제 개발에 연구는 시대적으로 절실하게 요구되고 있다. 퇴행성 뇌질환의 주요원인이 신경세포 사멸이며 산화적 손상이 신경세포사멸에 중요한 역할을 하게 된다³⁸⁾. 산화적 손상은 세포 내 free radicals의 과도한 생산과 이를 조절하는 항산화 방어기작과의 불균형에 의해 유발되어 세포손상 및

세포사멸을 유도하게 된다³⁻⁵⁾. 특히 산화적 손상은 뇌 신경세포의 세포사멸을 유도함으로 다양한 퇴행성 뇌 질환의 병태생리에 있어 기억하게 된다²⁻⁵⁾. 예를 들어 알츠하이머병의 경우 β -amyloid 단백질에 의한 신경 세포손상은 free radicals에 의해 매개되며⁹⁾, 근위축성 측색 경화증에서는 항산화효소인 superoxide dismutase(SOD)의 degradation과 연관되어 있고⁷⁾, 파킨슨병 환자 뇌에는 고농도의 iron으로부터 형성된 자유기가 존재하며 항산화 물질인 glutathione이 현저히 감소되어 있는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 또한 산화적 손상은 해면성뇌증(spongiform encephalopathies)에서 신경세포손상을 통해 척추(spinal cord) 상해 및 뇌허혈(ischemic damage) 등을 유발하는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 그러나 많은 퇴행성 뇌질환이 산화적 손상과 밀접하게 연관되어 있음에도 불구하고 현재까지 산화적 손상이 어떻게 퇴행성 뇌질환 유발과 연관되는지 정확한 기전이 알려져 있지 않다. 퇴행성 뇌질환은 한번 손상을 받은 신경세포가 재생되지 않기 때문에 그 치료가 매우 어려운 실정이다. 양방에서는 지난 10년 동안 세계 각국의 연구자들이 뇌신경손상의 확산을 제한하는데 필요한 신경보호제를 개발하는 연구를 진행해 왔으며 뇌졸중 동물모델을 이용한 전임상 실험을 통해 그 효과를 검증하였으나 아직 그 효과가 증명된 약은 아직 미비한 실정이다. 따라서 최근에는 한약재와 같은 천연물질을 이용하여 퇴행성 뇌질환을 치료하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 예를 들어, 단삼(*Salvia miltiorrhiza*)으로부터 분리한 15,16-dihydrotanshinone I 성분이 항염증 효과를 통해 퇴행성 뇌질환 치료에 이용할 수 있으며¹⁰⁾, 뱃톱(*Huperzia serrata*)으로부터 분리한 huperzine A 성분이 알츠하이머병에서 natural cholinesterase inhibitor로 작용하여 치료효과를 나타내며¹¹⁾, 백작약(*Paeoniae alba radix*)으로부터 분리한 Paeoniflorin은 뇌염증 세포의 활성화를 억제하여 뇌신경세포를 보호한다고 보고되었다¹²⁾. 또한 비타니아(*Withania somnifera*) 추출물은 항산화 활성을 통해 뇌졸중을 치료할 수 있으며¹³⁾, 와송(*Orostachys japonicus*)의 메탄올추출물은 산화적 손상으로부터 뇌 신경을 보호할 수 있다고 하였다¹⁴⁾. 임상에서 주로 사용되는 처방은 加味補陽還五湯으로, 王清任의 醫林改錯³³⁾에서 처음 수록된 补陽還五湯에 療血을 순환시키는 丹參, 牛膝, 桂枝와 뇌신경을 보호하는 것으로 알려진 遠志, 石菖蒲를 첨가하여 처방하고 있으며 근래에는 뇌혈관 질환 뿐 아니라 소화기 질환, 신경계 질환, 당뇨병 및 심혈관계 질환 등까지 응용범위가 확대되고 있다³⁴⁾. 加味補陽還五湯은 血栓症 및 高粘度血

症에 대한 개선작용^{[3], [33]}, 血液循環의 개선작용^[37], 局所血流量의 개선작용^[38] 및 PC12 신경세포의 사멸을 억제하는 작용기전^[39] 등이 알려져 있다. 본 연구에서는 加味補陽還五湯의 뇌신경보호효과를 사람의 신경세포주인 SH-SY5Y 세포를 이용하여 검증하였다.

세포사멸은 세포가 분해됨으로써 죽음으로 가게 되는 능동적인 기작으로서 특히 외부자극에 대한 세포내부에 이미 존재하는 일련의 프로그램에 의해 사멸하는 과정(programmed cell death)이다. 초기 신경세포손상은 신경조직의 산소와 포도당 고갈에 의한 에너지 대사 이상이 유발되고 신경연접부위로 방출된 glutamate의 재흡수가 방해를 받아 세포사이 공간에 과도하게 축적되게 됨으로써 세포막 투과성에 변화가 생기게 되어 Ca^{2+} 등 양이온의 세포내 다량 유입이 일어나게 된다. 이로서 세포부종, 산과다증(acidosis) 및 단백질 변성 등이 일어나 신경세포는 죽게 된다^[40]. 또한 후기 신경세포손상은 허혈 등의 발생 3~4일 후부터 해마 및 기저핵 등의 부위에서 생기는 홍분성 독성물질의 축적, 단백질 합성장애, 열충격단백질의 유전자 발현장애 등으로 신경세포사멸이 일어나게 된다^[41]. 따라서 신경세포 손상을 최소화하기 위해서는 손상초기 신경세포를 보호하거나 재생시킴으로서 세포사멸을 방지하는 것이 중요하다. 이에 본 연구에서는 加味補陽還五湯이 세포사멸로부터 신경세포를 보호할 수 있는지 조사하기 위해 SH-SY5Y 신경세포에 加味補陽還五湯을 전처리 한 후 H_2O_2 에 의해 산화적 손상을 유도하여 세포생존율 및 보호효과를 측정하였다. 그 결과, 加味補陽還五湯을 전처리한 경우 처리하지 않은 대조군에 비해 세포사멸이 현저히 줄어들고 세포생존율이 높아지는 것을 확인하였다(Fig. 3). 또한 加味補陽還五湯을 SH-SY5Y 신경세포에 처리하였을 때 세포독성 없이 세포증식을 유도되는 것을 관찰하였으며(Fig. 1), 이는 加味補陽還五湯이 신경세포를 재생시킬 수 있음을 시사하며, 신경세포증식 또는 재생을 통해 산화적 손상으로부터 신경세포를 보호하게 되는 것으로 사료된다.

한편, 세포사멸은 엄밀하게 괴사(necrosis)와 사멸(apoptosis)이라는 두 가지 중요한 기전에 의해 일어나는데, 전형적인 괴사는 유해한 상해나 사고에 의해 일어나는 반면, 세포사멸은 정상적인 세포발달에 있어서 세포분화와 수를 조절하기 위해 유발된다^{[41], [42]}. 즉, 괴사에 의한 세포 죽음은 세포의 붕괴과정인데 반해 세포사멸은 세포의 위축, 핵의 농축, 염색질의 응축, 원형질의 팽대 등 특징적인 형태적 변화를 동반한다. 따라서 DNA 사슬에서 oligonucleosomal

DNA fragments를 살펴보는 것은 세포사멸을 확인하기 위한 가장 잘 알려진 방법이며 세포사멸이 일어날 경우 자가효소에 의해 세포내 염색체가 잘려지게 되므로 불연속적인 작은 절편이 생겨나게 되는데 이는 세포사멸의 일차적 과정인 세포핵의 변화를 관찰할 수 있는 방법이다^[42]. 따라서 본 연구에서는 加味補陽還五湯의 세포사멸로부터의 신경세포 보호효과를 확인하기 위해 DNA fragmentation을 수행하였다. 그 결과, H_2O_2 에 의한 산화적 손상을 입은 SH-SY5Y 세포는 여러 개의 DNA ladder를 형성하였으며, 加味補陽還五湯의 전처리는 이를 소멸시키는 경향을 보였다(Fig. 4). 일반적으로 H_2O_2 와 같은 산화적 손상은 세포질 내 free radical을 다량 합성하여 protein kinase C(PKC)와 같은 이차전달자를 변성시킴으로써 단백질 및 DNA 합성의 억제를 촉진함으로써 신경세포사멸을 초래하는데^[42], 加味補陽還五湯이 세포 내 존재하는 산소유리기를 소거함으로써 세포사멸을 억제하는 것으로 보여지나 이에 대한 연구는 차후 좀 더 자세히 연구되어야 할 것이다. 한편, 본 연구에서 加味補陽還五湯은 농도의존적으로 DPPH free radical 소거효과가 있는 것으로 나타났으며(Fig. 5) 이는 加味補陽還五湯이 세포 내 과도하게 생성되어 조직손상을 유발하는 free radicals을 효과적으로 제거하고, H_2O_2 와 같은 외부스트레스로부터 세포사멸을 방지함으로서 신경조직을 보호할 수 있는 것을 의미한다.

이상의 결과로 볼 때, 加味補陽還五湯은 free radicals과 같은 독성물질을 제거하는 항산화 효과와 신경세포 증식 및 재생효과를 통해 신경세포를 보호함으로써 퇴행성뇌질환과 같은 신경손상 질환의 치료에 효과적일 것으로 사료된다.

결 론

加味補陽還五湯의 뇌신경보호효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 사람의 신경세포주인 SH-SY5Y 세포를 이용하여 加味補陽還五湯의 전처리가 산화적 손상으로부터 유발되는 신경세포사멸을 억제할 수 있는지 조사하였다. 加味補陽還五湯은 SH-SY5Y 세포의 증식을 유도하였으며, H_2O_2 에 의해 유발된 신경세포손상으로부터 세포사멸을 억제하여 세포생존도를 증가시켰으며 세포사멸로부터 형성되는 DNA fragmentation을 억제시켰다. 또한 加味補陽還五湯은 free radicals에 대한 강한 소거효과가 확인되었다.

따라서 加味補陽還五湯은 항산화 효능 및 신경

세포증식효과를 통해 신경세포손상으로부터 유발되는 다양한 퇴행성뇌질환의 치료에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 동국대학교 교내연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 서무규, 成人病 老人病學, 서울, 고려의학, 1992;37-49, 77-83, 107-122, 137-139, 142-149.
- Pappolla M, Omar R, Kim K, Robakis. Immunohistochemical evidence of oxidative stress in Alzheimer disease. Am J Pathol. 1992;140:621-628.
- Sendtner M, Thoenen H. Neurodegenerative disease. Oxidative stress and motoneuron disease. Curr Biol. 1994;4:1036-1039.
- Ferrante R, Browne S, Shinobu L, Bowling A, Baik M, MacGarvey U, Kowall N, Brown RJ, Beal M. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochemistry 1997;69:2064-2074.
- Anderson J. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? Nat Rev Neurosci. 2004;5:S18-S25.
- Behl. Amyloid beta-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. Cell Tissue Res. 1997;290:471-480.
- Cleveland D, Tothstein J. From Charcot to Lou Gehrig: Deciphering selective motor neuron death in ALS. Nat Rev Neurosci. 1997;2:806-819.
- Jenner P, Olanow C. Understanding cell death in Parkinson's disease. Ann Neurol. 1998;3:S72-S84.
- Milhavet O, McMahon H, Rachidi W, Nishida N, Katamine S, Mange A, Arlotto M, Casanova D, Riondel J, Favier A, Lehmann S. Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:937-942.
- Lee P, Hur J, Lee J, Kim J, Jeong J, Kang I, Kim SY, Kim H. 15,16-dihydroxyanthrone I suppresses the activation of BV-2 cell, a murine microglia cell line, by lipopolysaccharide. Neurochem Int. 2006;48:60-6.
- Wang R, Tang XC. Neuroprotective effects of huperzine A. A natural cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. Neurosignals. 2005;14:71-82.
- Liu HQ, Zhang WY, Luo XT, Ye Y, Zhu XZ. Paeoniflorin attenuates neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease by activation of adenosine A1 receptor. Br J Pharmacol. 2006;148:314-25.
- Chaudhary G, Sharma U, Jagannathan NR, Gupta YK. Evaluation of Withania somnifera in a middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2003;30:399-404.
- Yoon Y, Kim KS, Hong SG, Kang BJ, Lee MY, Cho DW. Protective effects of Orostachys japonicus A. Berger (Crassulaceae) on H2O2-induced apoptosis in GT1-1 mouse hypothalamic neuronal cell line. J Ethnopharmacol. 2000;69:73-8.
- 南京中醫學院, 中醫方劑大辭典, 北京, 人民衛生出版社, 1995;5:891.
- 신민교, 臨床本草學, 서울, 영림사, 1986;169-171, 221-223, 249-250, 300-301, 464-468, 662-663, 1986.
- 신길구, 申氏本草學, 서울, 수문사, 1988;9-12, 80-84, 448-450, 521-522, 554-556, 562-564, 600-603, 1988.
- 김창민 外, 中藥大辭典, 서울, 정담, 1998;592-599, 1159-1168, 1353-1358, 4839-4845, 5258-5265, 6357-6362, 6460-6471.
- 江克明, 簡明方劑辭典 上海, 上海科學技術出版社, 1990;571.
- 전영수, 補陽還五湯과 加味補陽還五湯이 endotoxin으로 유발된 白鼠의 血栓症에 미치는 影響, 동의병리학회지, 1993;8:157-176.
- 김남용, 補陽還五湯이 血壓 및 局所腦血流量에 미치는 影響, 원광대학교 대학원, 1985.
- 정하나, 韓藥材 경구투여에 의해 Th1/Th2 type 면역반응의 선택적인 조절에 관한 研究, 전북대학교 대학원, 2004.
- 문병형, 補陽還五湯煎湯液이 家兔의 血壓降低에 미치는 影響, 원광대학교, 1985.
- 탁의주, 補陽還五湯이 實驗的 血栓에 미치는 影響, 동국대학교 대학원, 1990.
- 김성훈, 復元活血湯 및 補陽還五湯이 endotoxin으로 유발된 血栓生成抑制에 미치는 影響, 동의대

- 학교 대학원, 1994.
26. 정우상, 高血壓 및 高脂血症에 대한 補陽還五湯의 實驗的 研究, 경희대학교대학원, 1998.
27. 설인숙, 加味補陽還五湯이 高脂血症, 血栓, 高粘度血症, 高血壓, 및 腦損傷에 미치는 影響, 대전대학교대학원, 1998.
28. 최은정, mongolian gerbil 의 reversible forebrain ischemia 모델에 미치는 補陽還五湯의 效果, 동국대학교 대학원, 1999.
29. 김영현, 抗瘀血 治療劑인 補陽還五湯의 免役調節作用, 전주대학교 대학원, 2002.
30. 정용준, 補陽還五湯이 LPS 와 PMA에 의해 損傷된 神經膠細胞에 미치는 影響, 원광대학교 대학원, 1999.
31. Yoshida T, Mori K, Hatano T, Okumura T, Uehara I, Morimae K, Fujita Y, Okuda T. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by Tannins and Flavonoids V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-Diphenyl-2-picylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull* 1989;37:1919-1921.
32. 고동균, 유자가 lipopolysaccharide의 뇌실주입으로 유발된 생쥐의 혈중 IL-6와 TNF- α 변화에 미치는 영향, 대한한의학 방제학회지 2004;12:195-208.
33. 王清任 : 醫林改錯, 서울 醫聖堂, pp.84-86, 1994.
34. 黃泰康, 施誠主. 中藥, 方劑, 現代 研究大典. 北京. 科學出版社. pp723-726.
35. 金珖德, 安孝. 血栓症 및 高粘度血症에 관한 補陽還五湯의 實驗的 研究. 대한동의병리학회지. 1988;3:30-46.
36. 文炳淨. 補陽還五湯抽出液이 血壓降下에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1985.
37. 下行洁. 補陽還五湯治療腦血栓形成的臨床及血液流變學觀察. 中醫雜紙. 1985;5:75.
38. 金株用. 補陽還五湯이 혈암 및 국소뇌혈류량에 미치는 영향, 동의생리병리학회지. 2001; 15:682-686.
39. 金鍾吉. 보양환오이 영양혈청결핍에 의한 PC12 세포의 고사에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 2000.
40. Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol.* 1996;6:667 -672.
41. Walter JJ, Nichael AM. Emerging treatments for stroke in humans. *TiPS* 1996;17: 227-233.
42. Yang Y, Wang J, Xu C, Pan H, Zhang Z. Maltol inhibits apoptosis of human neuroblastoma cells induced by hydrogen peroxide. *J of Biochemistry and Molecular Biology* 2006;39:145-149.
43. Kim ST, Ahn SH, Kim JD, Kim Y-K. Protective effect of MeOH of *Evodia officinalis* on cyanide-induced neurotoxicity in cultured neuroblastoma cells. *Kor J Pharmacology* 2003;34:282-287.