

紅花, 川芎, 黃芪 藥鍼液의 뇌교세포주 보호 효과

김형우^{#1}, 조수인¹, 김일환^{#2}

1: 부산대학교 한의학전문대학원, 2: 동신대학교 한의과대학

Received : 09. 05. 14

Accepted : 09. 05. 26

Key Words:Pharmacopuncture
Solution, Carthmi Flos,
Cnidii Rhizoma,
Astragali Radix

Protective effects of Pharmacopuncture Solutions made by Carthmi Flos, Cnidii Rhizoma and Astragali Radix on C6 glioma cells

Hyung Woo Kim^{#1}, Su In Cho¹, Il Hwan Kim^{#2}

1: School of Oriental medicine, Pusan National University, 2: College of Korean medicine, Dongshin University

ABSTRACT**Objective :** This study was carried out to investigate protective effects of Pharmacopuncture Solutions (PSs) made by Carthmi Flos (CF), Cnidii Rhizoma (CR) and Astragali Radix (AR) on C6 glioma cells**Methods :** We investigated the effects of PSs on proliferation rates and types of C6 cells, and also investigated the effects on LDH release. In addition, protective effects of PSs on oxidative stress induced by hydrogen peroxide and SOD-like activities were also investigated.**Results :** PSs made by CF, CR and AR did not show cytotoxicity in various concentrations. CF-PS and AR-PS elevated levels of proliferation rates significantly. Treatment with CF-PS lowered level of LDH release in C6 cells. In addition, CF-PS and CR-PS showed protective effects on cell death induced by hydrogen peroxide respectively. Finally, CF-PS group showed high level of SOD-like activity compared to that in CR-PS group.**Conclusion :** These results suggest that CF-PS can accelerate proliferation of neuroglial cells, and has protective action against oxidative stress, which was involved in anti-oxidative effects such as SOD-like activities. In addition, CR has protective effects against oxidative stress, and AR can accelerate proliferation of neuroglial cells.**I. 서론**

紅花 (Carthami Flos, CF)는 국화과 (Compositae)에 속한 1년생 초본인 잇꽃 (*Carthamus tinctorius* L.)의 꽃을 건조한 것으로, 7 ~ 8월에 꽃잎이 황색에서 홍색으로 변할 때 수집하여 陰乾한 것이다¹⁾. 性は 溫하고 味는 辛하다. 心, 肝의 血分으로 들어가 活血通經, 散瘀止痛 등의 효능으로 인해 經閉痛經, 惡露不行에 의한 腹痛 등의 병증에 적용하며, 내과, 부인과, 외과, 상과의 活血方 중에 사용하는 요약이 된다^{1,2)}. 이러한 이유로 인하여 紅花는 임상에서

뇌혈관 질환 등에 다용되고 있다³⁾.

川芎 (Cnidii Rhizoma, CR)은 미나리과 (Umbelliferae)에 속한 多年生 草本인 천궁 *Ligusticum chuanxiong* Hort의 根莖을 건조한 것으로, 가을에 채취하여 莖葉과 鬚根을 제거하고 세정한 다음 烘건한다²⁾. 性味가 辛溫하고 血中の 氣藥이 되어 活血行氣하고 祛風止痛의 效能이 있어 頭痛을 治療하는 要藥이 된다²⁾.

黃芪 (Astragali Radix, AR)는 콩과 (Leguminosae)

#First author : Hyung Woo Kim, Beomeo-ri, Mulgeum-eup, Yangsan City, Gyeongnam, Division of Pharmacology, School of Oriental medicine, Pusan National University 626-813. Tel : +82-51-510-8458 E-mail : kronos7@pusan.ac.kr

*Corresponding author : Il Hwan Kim, Department of Sasang-constitutional medicine, Oriental Hospital of Dongshin University, Sunchoen, Korea. Tel : +82-61-729-7122 E-mail : boinee@hanmail.net

* This research was supported by KPI(Korea Pharmacopuncture Institute) in 2008

에 속한 多年生 草本인 황기 *Astragalus membranaceus* Bunge의 周皮를 거의 벗긴 뿌리를 건조한 것으로, 봄과 가을에 채취하여 鬚根과 頭部를 제거하고 쏘건한다²⁾. 生用하면 補氣固表하는 효능이 있어 止汗하고 陽氣를 溫運케 하여 利水消腫하는 효능을 나타내며 灸用하면 補脾益氣하면서 陽氣를 升擧시키고 肌表에 작용하여 補氣升陽하므로 元氣가 下陷한 것을 升擧케 하고 補氣하므로써 生血한다²⁾.

紅花는 가장 대표적인 약침액의 재료로서 많은 연구자들이 홍화약침의 효능에 대하여 연구하고 있다. 대표적인 홍화약침 연구 결과로는 내독소로 유발된 혈전 발생을 억제해 줌이 알려져 있고⁴⁾, 실험동물을 이용한 관절염 모델에서 항진통 효과가 알려져 있으며⁵⁾, 퇴행성 슬관절염 및 요통 환자에게서 유의한 진통 효과가 있음이 알려져 있다^{6,7)}. 상기한 항진통 작용 이외에도 최근에는 홍화약침의 뇌혈관과 면역에 미치는 효과에 대한 연구가 진행되고 있다. 안 등⁸⁾과 김 등⁹⁾은 백서에서 홍화약침이 국소뇌혈류량을 유의한 수준으로 상승시킴을 보고 하였고, 오¹⁰⁾ 등은 홍화약침이 면역기능 활성화를 통한 항암 작용이 있음을 보고 하였다. 川芎 역시 최근들어 약침 제제로 각광 받고 있는 한약재로서 대표적으로 관절염 동물 모델에서 항진통 효과¹¹⁾, 간손상 보호효과¹²⁾등이 알려져 있으며, 黃芪 藥針에 대하여 관절염 동물 모델에서 항진통 효과¹³⁾, NO, DPPH 소거 및 IL-4 억제효과¹⁴⁾등이 있어 알려져 있다. 이렇듯 紅花, 川芎, 黃芪 약침 연구는 항진통, 뇌혈류 개선, 항암 작용 등으로 정리 할 수 있으나, 뇌신경 세포의 활성에 미치는 영향을 연구한 논문은 아직까지 접할 수가 없었다.

이에 본 저자들은 紅花, 川芎, 黃芪 약침액의 뇌교세포주에 대한 보호효과를 관찰하기 위하여 흰쥐의 뇌세포에서 유래한 세포주인 C6 glioma cell에 약침액을 희석배수 별로 투여하고, 세포 증식율과 증식 양상을 관찰하고, LDH 유출 정도, 과산화수소에 의하여 유발되는 산화적 스트레스로부터 보호효과를 관찰하였고, SOD 유사 활성을 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

본 실험에 사용된 뇌교세포주는 흰쥐에서 유래한 C6 glioma cell로 한국세포주은행 (서울, 한국)에서 냉동상

태로 구입하여 실험에 사용하였다. 분주 받은 세포주는 해동되어 배양액 속에 분주 된 후, 2주 이상 계대 배양하여 실험실 환경 및 기타 배양 환경에 충분히 적응 시킨 후 증식율(Doubling Time)이 구입처에서 제공한 자료와 거의 일치하게 되었을 때, 충분히 적응하였다고 생각하고 실험에 사용하였다.

2) 약재

본 실험에서 사용된 紅花 (Carthami Flos, CF)는 국화과에 속한 1년생 초본인 잇꽃 (*Carthamus tinctorius* L.)의 花瓣, 川芎 (Cnidii Rhizoma, CR)은 천궁 *Ligusticum chuanxiong* Hort의 根莖, 黃芪 (Astragali Radix, AR)는 황기 *Astragalus membranaceus* Bunge의 周皮를 거의 벗긴 뿌리로 동신대학교 순천 한방병원을 통하여 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포주 배양 환경

C6 glioma cell의 생육 배지로는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, U.S.A) 배지를 사용하였고, 배지에는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco U.S.A)와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 µg/µl)을 첨가하였다. 세포주의 계대 배양은 2일 간격으로 시행하였고, 부착세포의 탈착을 위해서 Trypsin-EDTA (Sigma, USA)를 사용하였다. C6 cell은 5% CO₂가 공여되는 배양기 속에서 37℃를 유지하며 배양되었다.

2) 약침액의 조제

구입된 CF, CR 및 AR 150g을 증류수 1,500 ml과 함께 전기 약탕기(대웅, 한국)로 2시간 동안 전탕한 후 거즈를 여러 장 겹쳐 간단히 거른 다음, 5000 rpm에서 15분간 원심분리하여 찌꺼기를 버리고 상청액을 취하였다. 얻어진 상청액은 감압 농축기 (EYELA, Japan)를 이용하여 농축시킨 다음, 증류수와 에탄올을 1 : 3으로 희석한 용액에 다시 녹이고 잘 흔들어준 다음 분획깔대기를 이용하여 찌꺼기와 상청액을 분리하였다. 분리된 상청액은 다시 농축되고 증류수와 에탄올을 1 : 6으로 희석한 용액에 다시 녹인 다음 상기한 분리를 반복하였으며, 이러한 과정을 100% 에탄올을 이용하여 재반복하였다. 최종으로 얻어

진 상청액을 감압 농축하여 saline 1000ml에 녹이고 pH=7로 적정한 다음 24시간 후에 0.45 μ m 크기의 필터 (syringe filter, 와트만)로 거른 다음 최종적으로 0.2 μ m 크기의 필터로 걸러 멸균을 대신하였다. 제작 과정을 아래에 제시하였다 (Fig. 1).

3) 세포 증식율 측정

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT)법을 변형하여 살아있는 세포를 정량하는 방법을 사용하였다¹⁵⁾. 먼저 96-well plate (Nunc, Netherlands)에 측정하고자 하는 대상 세포주를 웰당 5×10^3 개의 분량으로 분주하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 배양액 100 μ l를 제거하고, 원액, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16로 희석된 약침액 100 μ l를 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 24시간 동안 배양 하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 각 well 당 10ul의 CCK-8 (CCK-8 sol., Dojindo, Japan) 용액을 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 2시간 동안 방치하였다. 2시간 후, Micro-plate reader (Bio-rad, CA)를 이용하여 450nm파장에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군으로는 약물을 첨가하지 않은 well을 사용하였고, 결과는 정상 대조군에 대한 백분율로 환산하여 나타내었다.

4) 세포 증식 양상 관찰

100mm dish (Nunc, Netherlands)에 5×10^5 개의 세포를 분주하고 24시간 동안의 부착을 시행한 다음, 배양액 5ml를 제거하고, 원액과 1/4로 희석된 약침액 5ml를 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 24시간 동안 배양 하였다. 정상군은 동일한 용량의 인산완충액을 투여하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 세포 증식 양상은 광학 현미경 (Olympus, Japan)을 이용하여 육안적으로 관찰 되었다.

5) LDH 유출 농도 측정

Lactate dehydrogenase (LDH)의 유출 농도 측정을 위하여 24-well plate에 1×10^5 /well 농도로 세포를 분주하고 24시간 동안 배양하여 부착시킨 후, 농도별로 약물을 처리하고, 이어서 흥분독성물질 (excitotoxin) 인 N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)를 최종 농도 30 μ M로 투여하였다. 약물의 투여가 끝난 후, 24시간동안 방치

하고, 측정 전에 인산완충액에 0.3mg/ml 농도로 용해된 NADH를 각 웰당 100 μ l씩 분주하고 2.5mg/ml 농도의 pyruvate를 각 웰당 25 μ l씩 분주하고 Micro-plate reader (Bio-rad, CA)를 이용하여 340nm파장에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군으로는 약물을 첨가하지 않은 well을 사용하였고, 결과는 정상 대조군에 대한 백분율로 환산하여 나타내었다.

6) 과산화수소에 의한 세포 손상 보호 효과 측정

과산화수소에 의한 세포 손상 보호효과는 MTT법¹⁵⁾을 변형하여 측정하였다. 먼저 C6 세포주를 96-well plate에 well 당 5×10^4 개씩 분주한 후, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂가 공여되는 환경에 4시간동안 방치하여 부착을 시행하였다. 세포의 부착이 끝난 후, 약침액을 처리하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂가 공여되는 환경에 24시간 동안 방치하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 산화적 스트레스를 유발하여 세포 생존율을 감소시키는 것으로 알려져 있는 800 μ M의 과산화수소 (hydrogen peroxide, H₂O₂)를 처리하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂가 공여되는 환경에 3시간 동안 방치하였다. 3시간의 방치가 끝나고, 배양액을 제거한 후, 간단히 수세하고 다시 배양액을 첨가하여 24시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 각 well당 10ul의 CCK-8 (CCK-8 sol., Dojindo, Japan) 용액을 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 2시간 동안 방치하였다. 2시간 후, Micro-plate reader (Bio-rad, CA)를 이용하여 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군으로는 약물을 첨가하지 않은 well을 사용하였고, 결과는 정상 대조군에 대한 백분율로 환산하여 나타내었다.

7) SOD-like activity 측정

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 평가는 superoxide와 반응하여 갈변물질을 만드는 pyrogallol의 자동산화를 측정하는 방법인 Marklund와 Marklund 법¹⁶⁾을 변형하여 측정하였다. 간략히 정리하면, 일정농도의 시료 0.2ml에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer (50mM tris hydroxymethyl) amino-methane+10mM EDTA, pH 8.5) 2.6ml와 7.2mM pyrogallol 0.2ml을 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 시킨 후 1N HCl 0.1ml을 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액중 산화된 pyrogallol의 양은 420nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성을 계산한 공식은 다음과 같다.

$$1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 비첨가구의 흡광도}} \times 100$$

3. 통계 처리

SOD 유사 활성의 실험 결과를 제외한 모든 실험 결과에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 Sigma plot (Sigma plot for Windows, ver. 9.0, U.S.A.)를 이용하여 student t-test를 시행하였으며, SOD 유사 활성은 paired t-test를 시행하였다. 실험 성적은 평균±표준편차 (mean±SD)로 나타내었으며, p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결과

1. 세포 증식율에 미치는 영향

상기한 방법으로 제조된 CF, CR, AR 약침액이 C6세포의 증식율에 미치는 영향을 시험관내에서 알아본 결과 CF의 경우 1/2 희석배수 이하 농도에서는 특별한 증식율 변화는 나타나지 않았고, 원액을 처리한 군에서 유의한 증식율 증가를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2A). CR의 경우 모든 농도에서 특별한 증식율의 변화를 관찰할 수 없었고 (Fig. 2B), AR은 원액 농도에서 유의한 수준의 세포 증식율 증가 소견을 보였다 (Fig. 2C).

2. 세포 증식 양상에 미치는 영향

세 가지 약침액이 C6 세포주의 증식 양상에 미치는 영향을 육안적으로 관찰한 결과 CF의 경우 원액 농도에서 증식 밀도가 증가하는 경향을 보였고 (Fig. 3C), CR은 모든 농도에서 특별한 증식 밀도의 변화를 보이지 않았다 (Fig. 3D~F). AR은 원액 농도에서 증식밀도가 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 3I).

3. LDH 유출 농도에 미치는 영향

흥분독성물질인 NMDA에 의하여 세포가 파괴되어 유출되는 LDH의 양을 세 가지 약침액이 감소시켜 줄 수 있는지 살펴본 결과 CF의 경우, 원액 투여군에서 유의한 수준의 LDH 유출 감소 현상이 관찰되었다 (Fig. 4A). CR을 투여한 모든 군에서 특별한 LDH 유출 농도의 변화를

관찰할 수 없었다 (Fig. 4B). AR을 투여한 군에서도 특별한 LDH 유출 농도의 변화를 관찰할 수 없었다 (Fig. 4C).

4. 과산화수소에 의하여 발생하는 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸에 미치는 영향

세포에 산화적 스트레스를 유발하는 물질인 800uM의 과산화수소의 자극에 대하여 약침액이 보호효과를 발휘하는지 살펴보기 위하여 약침액을 전처리하고 과산화수소를 투여한 결과 CF를 전처치한 두 군 모두에서 과산화수소에 의한 세포 사멸을 유의한 수준으로 방지하는 것이 관찰되었다 (Fig. 5A). CR의 경우, 원액 농도의 약침액을 전처치한 군에서 유의한 수준으로 세포 사멸을 방지하였다 (Fig. 5B). AR은 두 가지 농도 모두에서 유의한 세포 생존율의 변화를 관찰할 수 없었다 (Fig. 5C).

5. SOD-like activity 에 미치는 영향

3종 약침액에 대하여 생체 내에서 산화적 스트레스 제거에 중요한 역할을 하는 SOD와 유사한 활성을 나타낼 수 있는지 관찰한 결과 CF에서 CR에 비하여 유의한 수준으로 높은 SOD 유사 활성을 보였으며, AR은 나머지 두 약침액과 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 6)

IV. 고찰

최근 평균 수명의 연장과 더불어 중요성이 증대 되고 있는 뇌혈관 질환에 사용될 수 있는 약침 개발을 위하여 기초적으로 紅花, 川芎, 黃芪 약침액의 뇌교세포 보호 효과를 살펴본 결과 紅花, 川芎, 黃芪 약침액 모두에서 특별한 세포독성은 관찰되지 않았고, 紅花, 黃芪 약침액은 원액 농도에서 유의한 수준으로 C6 세포의 증식율을 증가시켰으며, 紅花, 川芎 약침액 처리 군에서 유해한 자극으로부터 C6 세포의 손상을 보호하는 효과가 관찰되었으며, 紅花 약침액은 川芎 약침액에 비하여 유의하게 높은 수준의 항산화 활성을 보였다.

노인성 치매(Alzheimer's disease) 질환의 특징적 병변으로는 학습과 기억에 관여하는 중추신경계에 amyloid plaque가 발견되고 neurofibrillary tangles의 형성을 들 수 있다¹⁷⁾. Amyloid plaque의 구성 성분은 β -amyloid protein인데, β -amyloid protein이 과다 축적

되면 신경세포에서 apoptosis를 일으키게 되며¹⁸⁾, free radical의 생성과 유출을 유도하여 oxidative stress에 의하여 신경세포 손상을 가속화시키게 된다¹⁹⁾. 이러한 과정을 통하여 신경 세포 손상이 지속되고, 이는 결국 인지 기능과 기억력을 점진적으로 상실하게 함으로써 신경퇴행 (neuro-degeneration)을 일으키게 된다²⁰⁾.

Reactive oxygen species (ROS)는 세포의 대사과정에서 생산되는 대사산물로 주로 세포 내 소기관인 미토콘드리아에서 생산되며, 정상적인 세포 내 항산화과정을 통하여 대사되어 사라지게 된다²¹⁾. 그러나, 세포의 항산화능을 초과하는 ROS의 대량 생산 또는 항산화능의 감소등으로 인하여 세포가 충분히 ROS를 대사시키지 못하면, 산화적 스트레스에 의하여 세포가 파괴되는데, 이러한 결과로 노화를 비롯하여, 알츠하이머병, 정신분열증, 파킨슨병, 허혈, 동맥경화 등의 심혈관계 질환이 발생하게 된다²²⁾. 특히, β -amyloid protein에 의하여 유도되는 세포 독성에 ROS가 관여하고, 증상을 더욱 악화시킨다는 보고가 있어, 최근에는 이러한 ROS의 생성을 억제시키거나, 생성된 ROS를 효율적으로 제거할 수 있는 능력을 가진 물질을 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있다²³⁾.

본 연구에서는 이러한 추세를 반영하여 항산화 효과를 가지는 상용 한약재를 선정하여 뇌혈관 질환에 사용될 가능성을 타진하고자 하였다. 본 연구에 사용된 紅花는 주로 活血祛瘀의 효능을 가져 疼痛疾患에 다용되어 왔으나²⁾, 최근에는 뇌혈관질환^{8,9)} 및 항암과 면역활성¹⁰⁾에 대한 연구뿐만 아니라 항산화활성²⁴⁾이 있음이 밝혀졌다. 저자는 논문에서 紅花 추출물이 DPPH 소거활성 및 지질과산화 억제효과, ROS 생성 억제효과 등의 항산화 효과를 가짐을 보고 하였다²⁴⁾. 川芎과 黃芪 또한 항산화 활성이 알려져 있다²⁵⁻²⁷⁾. 송등은 보고서에서 川芎이 DPPH 소거활성이 뛰어난 것으로 보고하였으며²⁵⁾, 이등은 2년근 이상의 黃芪가 천연 항산화제로서 사용가능하다고 보고 하였다²⁶⁾.

이러한 연구들을 바탕으로 紅花, 川芎, 黃芪 약침액이 뇌교세포에 발생하는 산화적 스트레스를 효율적으로 막아줄 수 있을 것이라는 가설을 세우고 본 연구를 진행하였다. 본 연구의 결과에서 CF, CR 및 AR 모두 처리된 모든 농도에서 C6 glioma cell에 특별한 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 2). 특히, CF와 AR은 원액 농도에서 유의한 수준으로 증식율을 증가시켰다 (Fig. 2A,C). 이러한 내용을 세포 증식 형태의 육안적 관찰을 통하여 재차 확인 한 결과 상기한 실험 성적과 동일한 경향의 세

포 증식 밀도가 관찰되었다 (Fig. 3). 이러한 결과로부터 비록 제한적이라 할지라도, 세 가지 약침액이 생체 내에 유지될 수 있는 농도 범위 내에서는 정상 세포에 대하여 특별한 독성을 유발할 가능성은 매우 적을 것임을 유추할 수 있으며, CF와 AR은 손상된 뇌 조직의 재생에도 관여할 가능성이 있음을 유추할 수 있다.

흥분독성물질(excitotoxin)인 NMDA를 이용하여 세포를 손상시켜 유출되는 LDH의 양을 측정한 실험에서 CF 처리 군은 유의할 만한 수준으로 LDH 유출량을 감소시켰으며, CR과 AR 투여군에서는 특별한 변화를 보이지 않았다 (Fig. 4). 신경 세포가 손상될 때, 유출되는 LDH 함량의 감소는 결국 CF가 흥분독성물질에 의한 세포 손상으로부터 C6 세포를 보호한 것으로 해석할 수 있다.

과산화수소(hydrogen peroxide)는 산소를 이용한 세포 내 호흡과정에서 정상적으로 생성되는 물질로 다양한 세포 실험에서 산화적 스트레스를 생성하는 자극원으로 사용된다^{28,29)}. 본 연구의 결과에서 과산화수소의 처리는 C6 세포의 생존율을 유의한 수준으로 감소시켰다 (Fig. 5). 이러한 생존율 감소에 대하여 CF의 보호효과를 관찰한 결과 과산화수소에 의하여 유발되는 세포 사멸을 CF가 두 가지 농도 모두에서 효과적으로 방지하는 것으로 나타났다 (Fig. 5A). CR은 원액 농도에서 유의한 수준으로 세포 사멸을 방지하였으나 (Fig. 5B), AR은 모든 군에서 유의한 변화를 관찰할 수 없었다 (Fig. 5C). 이러한 결과로부터 뇌교세포에서 CF와 CR이 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸을 방지해 줄 수 있다는 사실을 짐작할 수 있다.

생체 내에 존재하는 가장 대표적인 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD)는 세포에 위해를 가할 수 있는 환원 산소 (superoxide)를 과산화수소 (hydrogen peroxide, H_2O_2)로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이다³⁰⁾. SOD는 30KDa 이상의 분자량을 가진 단백질 물질로 세포막을 통과하지 못한다. 따라서 SOD와 유사한 활성을 가지면서 SOD의 단점을 보완할 수 있는 SOD 유사활성 물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다³¹⁾. 본 연구의 결과에서 CF는 CR에 비하여 유의한 수준으로 높은 SOD 유사 활성을 나타냈다 (Fig. 6). 단일 성분 물질인 ascorbic acid (vitamin C)가 $50\mu g/ml$ 농도에서 25~30%의 SOD 유사활성을 보인다는 사실을 감안할 때 (data not shown), CF는 비교적 높은 수준의 SOD 유사 활성을 보인다고 판단할 수 있다.

상기한 결과들을 종합하여 보면, CF는 뇌교세포에 대하여 특별한 세포 독성이 나타나지 않으면서 원액 농도에서는 유의한 수준의 증식을 증가 소견을 보였으며, 흥분 독성물질이나, 산화적 스트레스 유발 물질에 의하여 발생하는 세포 사멸을 효과적으로 방지하였음이 관찰되었고, 비교적 높은 SOD 유사 활성을 보였다. 이와 비교하여, CR은 특별한 세포 독성을 나타내지는 않았으며, 과산화수소에 의한 세포 사멸을 유의한 수준으로 억제하였다. AR 역시 특별한 세포 독성을 유발하지 않았고, 원액 농도에서 유의한 수준의 증식을 증가 소견을 보였으며, 흥분 독성 물질이나 과산화수소에 의한 세포 독성을 방지하지는 못하였다. 본 연구의 결과로부터 CF는 뇌교세포의 재생 또는 회복 및 손상 방지의 기능을 동시에 수행할 가능성이 있으며, CR은 산화적 스트레스에 대한 보호효과가 있고, AR은 뇌교세포의 재생 또는 회복에 관여하고 손상 방지 효과는 없음을 유추할 수 있었다. 추후 이러한 가능성들에 대한 보다 폭넓은 후속연구가 수행되어야 한다고 생각하며, 이를 통하여 명확한 기전 또한 연구되어야 할 것으로 생각한다.

V. 결론

紅花, 川芎, 黃芪 약침액의 뇌교세포 보호 효과를 살펴보기 위하여 C6 glioma cell의 증식을, 세포 증식 양상, NMDA 및 과산화수소에 의하여 발생하는 세포 독성에 미치는 영향, SOD 유사 활성을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 紅花, 川芎, 黃芪 약침액 모두에서 특별한 세포독성은 관찰되지 않았고, 紅花, 黃芪 약침액은 원액 농도에서 유의한 수준으로 C6 세포의 증식을 증가시켰다.
2. 세포 증식 양상 관찰에서 紅花, 黃芪 약침액 원액 농도 처리군은 증식 밀도가 증가하는 양상을 보였다.
3. 紅花 약침액 처리 군에서 NMDA에 의하여 발생하는 LDH 유출을 유의한 수준으로 낮추었다.
4. 紅花, 川芎 약침액 처리군에서 과산화수소에 의하여 발생하는 산화적 손상에 기인한 세포 사멸을 유의한 수준으로 방지하였다.

5. 紅花 약침액은 川芎 약침액에 비하여 유의하게 높은 수준의 SOD 유사활성을 보였다.

VI. 감사의 글

이 논문은 2008년 대한약침학회의 재원으로 대한약침학회의 지원을 받아 수행된 연구이며, 이에 감사드립니다.

VII. 참고문헌

1. 辛民教 編著. 臨床本草學. 서울:南山堂. 1997;534-535.
2. 全國韓醫科大學 本草學 教授 共編著. 本草學. 서울:永林社. 1994;424-425, 450-451, 579-581.
3. 申佶求. 申氏本草學 各論. 서울:壽文社. 1988;554-556.
4. 김영태, 한상원. 수질 및 홍화약침이 Endotoxin으로 유발된 혈전증에 미치는 영향. 대한침구학회지, 1997;14(1):464-477
5. 이희태, 이학인. 홍화약침이 (紅花藥鍼) Adjuvant 관절염에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 동서의학, 1998;23(3):6-20.
6. 윤민영, 조남근, 허태영, 조은희, 이옥자, 김경식, 문성재. 요통환자의 홍화약침치료에 대한 임상적 연구. 대한침구학회지, 2002;19(3):216-229.
7. 윤민영, 조남근, 허태영, 조은희, 이옥자, 김경식. 홍화약침의 퇴행성 슬관절염에 대한 임상적 연구. 대한침구학회지. 2002;19(3):189-200.
8. 안영선, 위통순, 조명래, 채우석, 윤여충. 아문 (GV15) 의 홍화약침이 백서의 뇌 혈류역학 변동에 미치는 영향. 대한침구학회지, 2002;19(5):92-111
9. 김성욱, 정현우, 위통순, 조명래, 윤여충. 홍화약침이 국소뇌혈류량 및 평균혈압에 미치는 실험적 영향. 대한침구학회지, 2004;21(2):167-181
10. 오치석, 이현, 임윤경, 성락기. 중완에 시술한 홍화약침이 항암 및 면역기능에 미치는 영향. 대한침구학회지, 2004;21(5):205-218
11. 황영진, 임윤경, 이현. 족삼리(足三里) 천궁(川芎) 약침(藥鍼)이 Collagen-induced Arthritis에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2007;24(4):81-97.

12. 이문희, 조수열, 윤수홍. Benzo[a]pyrene에 의해 유도된 간기능 장애에 미치는 천궁 수침액의 영향. 한국위생과학회지. 2003;9(1):53-63.
13. 최봉균, 조명래, 김재홍, 류충열. 황기약침(黃耆藥鍼)이 Collagen으로 유발된 생쥐의 Arthritis에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2008;25(1):25-55.
14. 이경민, 서정철, 한상원. 황기약침액의 NO, DPPH 소거 및 IL-4 억제효과. 대한침구학회지. 2003;20(2):184-194.
15. Mari M, Seiji K, Kenji F, Airo T and Toshimasa N. Evaluation of the estrogenic activities of some pesticides and their combinations using MtT/Se cell proliferation assay. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2006;209(5):413-421.
16. Marklund G, Marklund S. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 1974;47:468-474.
17. Luigi P., Rugoph E. T., Dora M. K. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. Nat. Neurosci. 2003;6:345-351.
18. Goodman Y., Mattson M. P. Secreted forms of b-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid b-peptide-induced oxidative injury. Exp. Neurol. 1994;128:1-12.
19. Selkoe D. J. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. Ann N. Y. Acad. Sci. 2000;924:17-25.
20. Pederson W. A., Kloczewiak M. A., Bluszajin J. K. Amyloid beta-protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal fore brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996;93:8068-8071.
21. Miyamoto Y., Koh Y. H. Park Y. S., Fujiwara N., Sakiyama H., Misonou Y., Ookawara T., Suzuki K., Honke K., Taniguchi N. oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. Biol. Chem. 2003;384:567-574.
22. Metodiewa D., Koska C. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview. Neurotox Res. 2000;1:197-233.
23. Varadarajam S. Yatin S., Aksenava M., Butterfiels D. Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. J. Struct. Biol. 2000;130:184-208.
24. 유진숙. 紅花 추출물이 항산화에 미치는 영향. 경원대학교 대학원. 2007:22.
25. 송정춘, 박남규, 허한순, 방면호, 백남인. 국내산 약용식물의 항산화물질 탐색 및 분리. 한국약용작물학회지. 2008;8(2):94-101.
26. 이춘영, 이해익. 황기 추출물의 항산화 효과. 농업과 학연구. 2004;15(0):103-110.
27. 민진아, 이수천. 운동과 황기 추출물 투여가 혈중 에너지기질 및 항산화 방어기전에 미치는 영향. 한국체육학회지 2007;46(4):525-533.
28. J. Drabowicz et al., in The Syntheses of Sulphones, Sulphoxides and Cyclic Sulphides, p112-116, G. Capozzi et al., eds., John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1994.
29. Bi J, Jiang B, Liu JH, Lei C, Zhang XL, An LJ. Protective effects of catalpol against H₂O₂-induced oxidative stress in astrocytes primary cultures. Neurosci Lett. 2008 Sep 19;442(3):224-7.
30. Corpas FJ et al. (2006). "The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves.". Plant Cell Physio. 47 (7): 984-94.
31. Corpas FJ, Barroso JB, del Rio LA. (2001). "Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells.". Trends Plant Sci. 6 (4): 145-150.

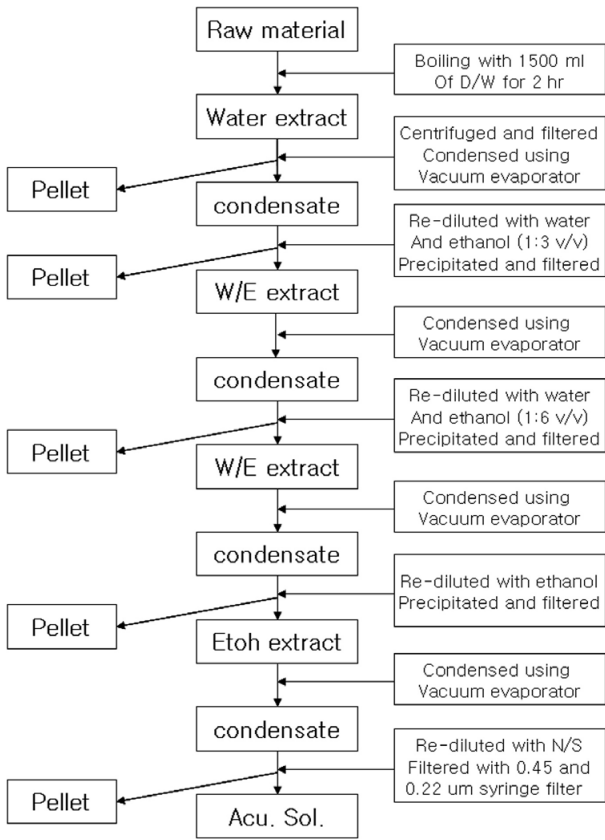


Fig. 1. Procedure for Filtering Herbal-acupuncture Solution

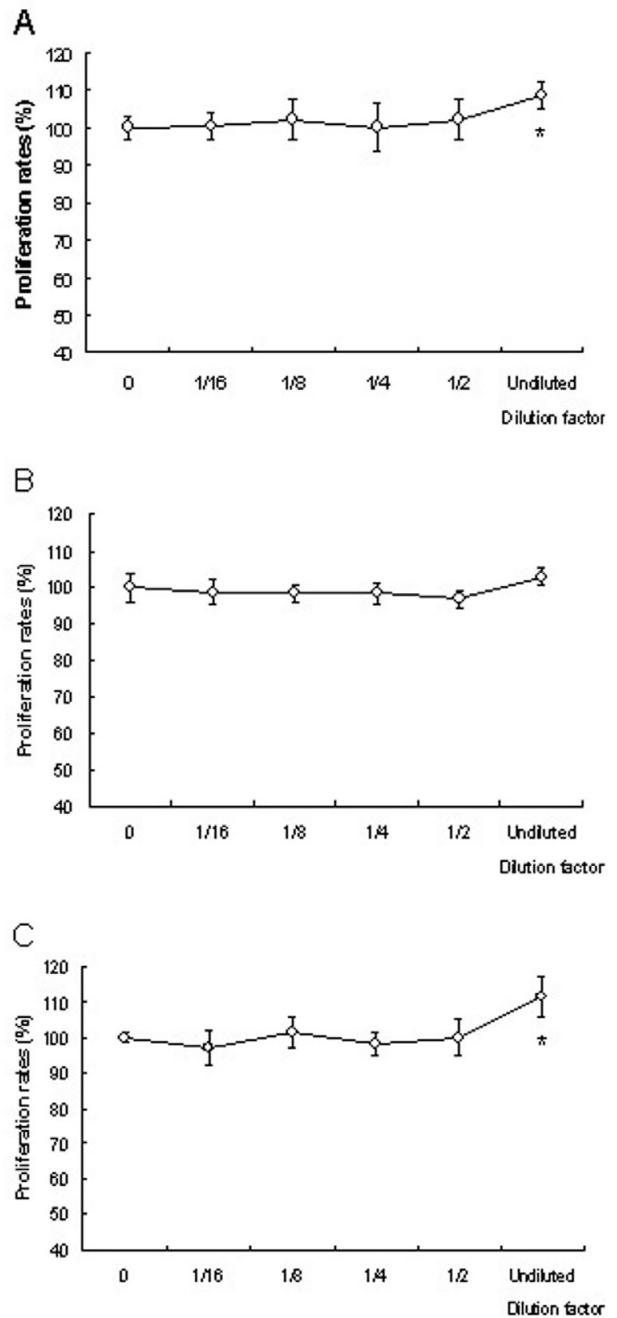


Fig. 2. Effects of Pharmacopuncture Solutions on proliferation rates of C6 glioma cell line in vitro. Cells were cultured in 96 well plate for 24 hr, then increasing dosage of Pharmacopuncture solution was treated for 24 hr. proliferation rates were measured using modified MTT methods. (A) Carthami Flos, (B) Cnidii Rhizoma, (C) Astragali Radix. Values were represented as mean \pm SD of 4 independent experiment. *P < 0.05 vs. non-treated control.

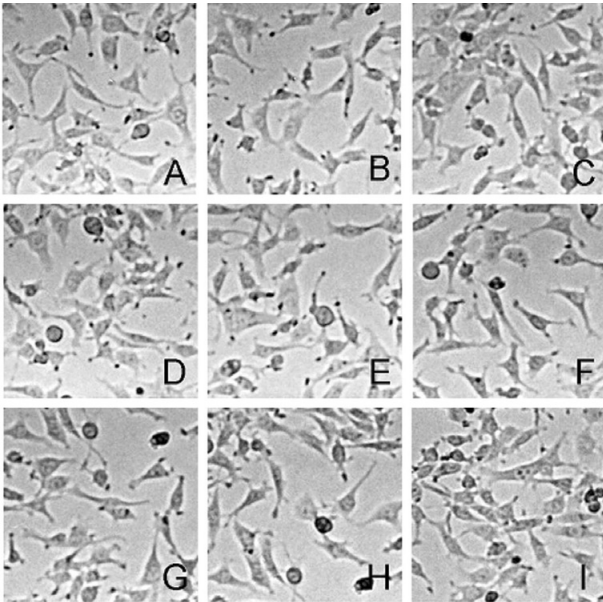


Fig. 3. Effects of Pharmacopuncture Solutions on optical observation of C6 glioma cell line in vitro. Cells were cultured in 100 mm dish for 24 hr, then undiluted and 1/4 diluted Pharmacopuncture solutions were treated for 24 hr. proliferation types of C6 cells were observed using microscope (x200). (A) Non-treated control, (B) 1/4 diluted CF-PS treated, (C) undiluted CF-PS treated (D) Non-treated control, (E) 1/4 diluted CR-PS treated, (F) undiluted CR-PS treated, (G) Non-treated control, (H) 1/4 diluted AR-PS treated, (I) undiluted AR-PS treated.

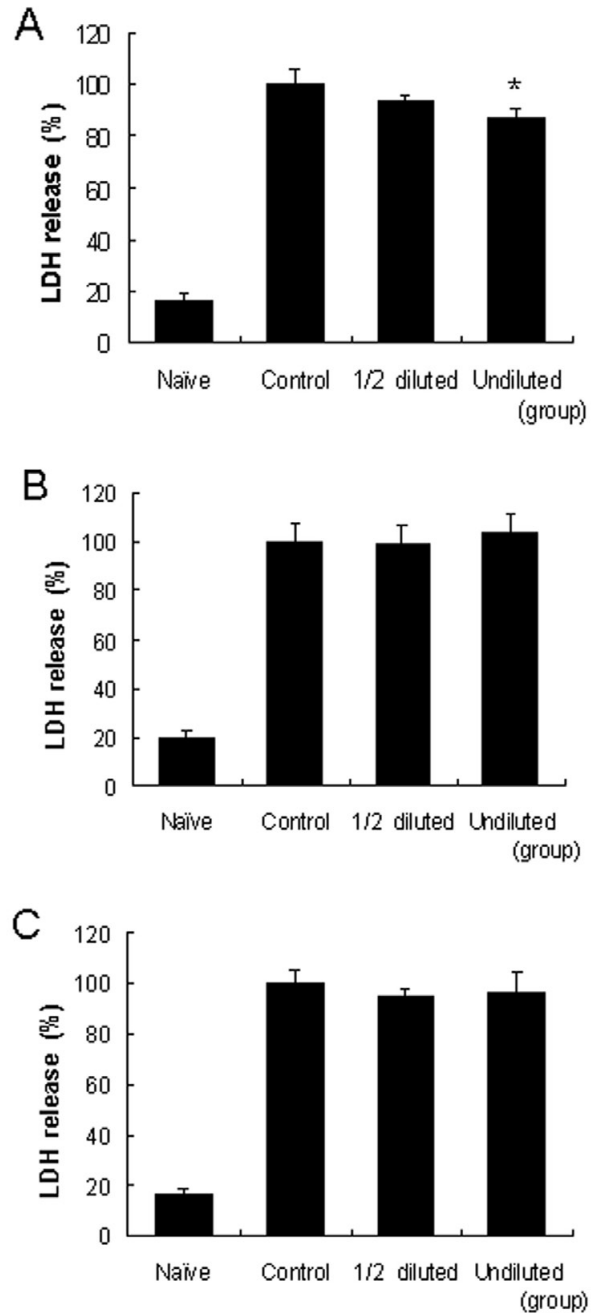


Fig. 4. Effects of Pharmacopuncture Solutions on LDH release in C6 glioma cell line. Cells were cultured in 24-well plate for 24 hr, then increasing dosage of Pharmacopuncture solution was treated for 24 hr. (A) Carthami Flos, (B) Cnidii Rhizoma, (C) Astragali Radix. Values were represented as mean \pm SD of 4 independent experiment. * $P < 0.05$ vs. control.

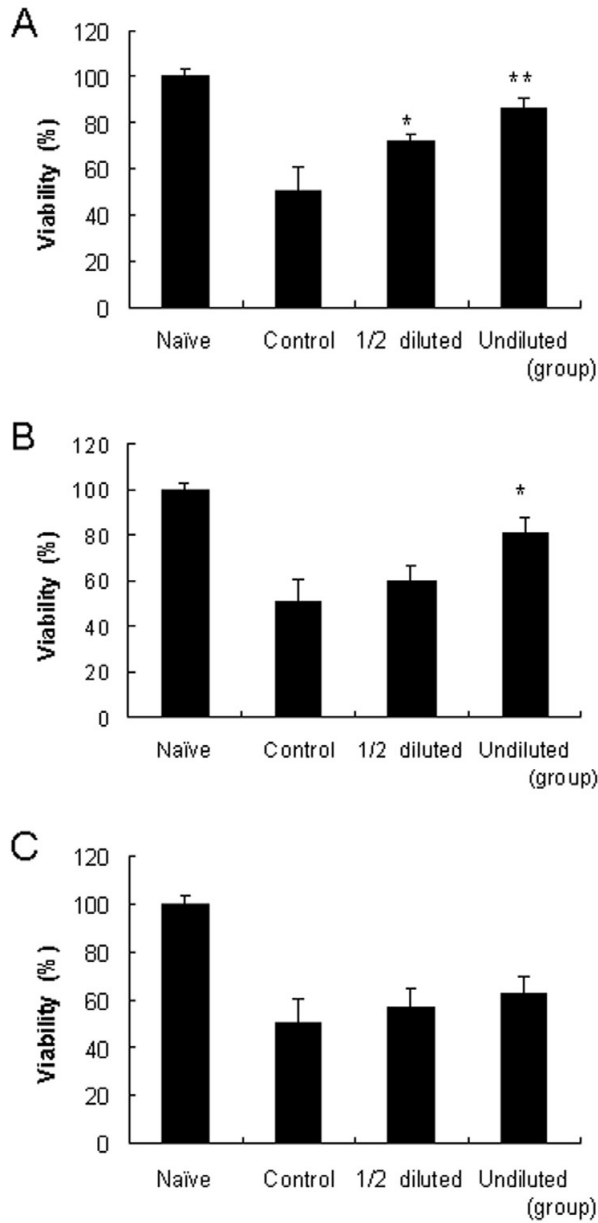


Fig. 5. Protective effects of Pharmacopuncture Solutions on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in C6 glioma cell line. Cells were cultured in 96 well plate for 24 hr, then indicated dosage of Pharmacopuncture solution was treated for 24 hr. After pre-treatment with PSs then 800 μ M of hydrogen peroxide were treated for 3 hr respectively. proliferation rates were measured using modified MTT methods. (A) Carthami Flos, (B) Cnidii Rhizoma, (C) Astragali Radix. Values were represented as mean \pm SD of 4 independent experiment. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control.

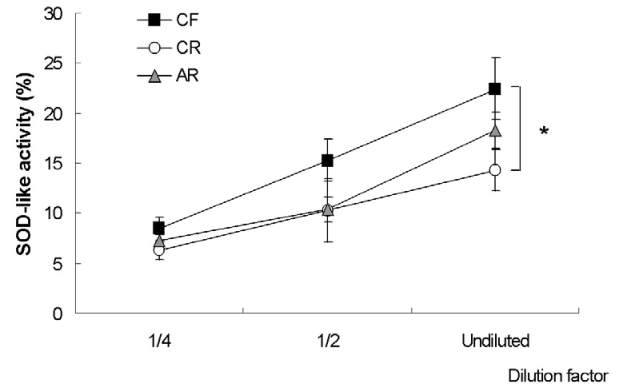


Fig. 6. Effects of Pharmacopuncture Solutions on SOD like activities in vitro. SOD-like activities were measured using Marklund and Marklund methods. CF : Carthami Flos, CR : Cnidii Rhizoma, AR : Astragali Radix. The present data were expressed mean \pm SD (n=6).