

원 저

攝生飲이 C6 glial 세포의 NO 생성에 미치는 영향

임창용, 김요한, 박세홍, 이소영, 이상관, 성강경
원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 원광대학교 부속광주한방병원 심계내과

Effects of *Sebsaeng-eum*(*Shesengyin*) on the NO Production of C6 Glial Cell

Chang-Yong Lim, Yo-Han Kim, Se-Hong Park, So-Young Lee, Sang-Kwan Lee, Kang-Kyung Sung

Department of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objectives : The water extract of *Sebsaeng-eum*(*SheShengYin*) has been used for treatment of ischemic brain damage in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of *Sebsaeng-eum*(*SheShengYin*) rescues brain cells from ischemic damages.

Methods : To elucidate the protective mechanism on ischemic induced cytotoxicity, We investigated the regulation of LPS and PMA induced iNOS expression in C6 glial cells.

Results : LPS and PMA treatment for 48 h in C6 glial cells markedly induced NO, but treatment of the cells with the water extract of *Sebsaeng-eum*(*SheShengYin*) decreased nitrite formation. In addition, LPS and PMA treatment for 48 h induced severe cell death in C6 glial cells. However treatment of the cells with the water extract of *Sebsaeng-eum*(*SheShengYin*) did not induce significant changes compared to the control. LPS and PMA induced iNOS activation in C6 glial cells caused chromosomal condensation and fragmentation of nuclei.

Conclusions : Taken together, We suggest that the protective effects of the water extract of *Sebsaeng-eum*(*SheShengYin*) against ischemic brain damages may be mediated by regulation of iNOS during ischemic condition. (*J Korean Oriental Med* 2000;21(4):84-92

Key Words: *Sebsaeng-eum*(SSE), Nitric oxide (NO), Ischemic brain damage

서론

攝生飲은 龔의《萬病回春》¹⁾에 “治一切卒中, 不論中風中寒中暑中濕, 及痰厥氣厥之類, 不省人事, 初發即用此, 無熱者宜此”라 하여 처음 기록된 이래 역대의가²⁾들에 의하여 중풍 응급시에 祛痰開竅의 효능으로

의식장애 및 중풍증상에 활용된 처방이다.

중풍은 卒然昏倒 昏不知人 或 痰涎壅盛 咽喉作聲 口眼喎斜 手足癱瘓 或 半身不遂 或 舌強不語 등의 증상을 주증으로 하며, 風, 火, 痰, 虛 등이 일정한 조건하에서 상호작용하여 발병되는데, 특히 줄중풍은 風陽, 痰熱, 腑實, 血瘀 등의 表實의 증후가 나타나므로 平肝熄風 化痰通腑 活血通絡 清熱滌痰 등의 처방이 주로 사용되고 있다^{12,13)}.

중풍은 서양의학에서 뇌졸중(Cerebrovascular accident: CVA)이라고 표현되며, 뇌혈관의 이상으로

· 접수 : 2000년 10월 18일 · 채택 : 12월 8일
· 교신저자 : 임창용, 광주시 남구 주월동 543-8 원광대 광주 한방병원 2내과
(Tel. 062-670-6413, Fax. 062-670-6529 E-mail : onlyyohan@hanmail.net)

발생하는 질환으로 국소 뇌세포의 대사이상을 일으켜 의식장애 및 운동마비 등의 신경학적 증상을 나타내며 뇌출혈, 뇌혈전증, 일과성 뇌허혈, 지주막하출혈 등 여러 질환이 포함된다¹⁴⁻¹⁶⁾.

중추신경계는 혈액공급에 매우 민감한 조직으로 졸중풍 등에 의하여 허혈현상이 발생되면 뇌의 병리생리적 반응에 의해 NO의 유도를 급격하게 증가시켜 미토콘드리아의 기능을 손상시키고, 에너지 고갈을 야기시키며, 지방과 단백질의 peroxidation 및 nitrosylation, DNA 손상을 일으키는 등 신경세포에 독성을 야기시켜 신경질환을 일으킨다고 보고되고 있으며, 허혈상태에서 세포독성에 매우 중요하게 작용한다는 NO에 대한 연구가 광범위하게 진행되고 있다²⁸⁻³⁴⁾.

최근 한약제의 뇌세포 보호작용에 대한 연구에서 定志丸이 老化白鼠 뇌조직의 생화학적 변화와 신경세포의 손상에 보호효과가 있다고 보고되었고¹⁹⁾, 清心蓮子湯이 Hydrogen peroxide(H₂O₂)에 노출되어 손상된 뇌신경세포에 대한 방어효과가 있다고 보고되었다²⁰⁾.

이에 저자는 중풍 초기에 응용되고 있는 攝生飲이 뇌허혈시 발생하는 세포손상에 대한 방어작용에 미치는 영향을 알아보기 위하여 C6 glial 세포주를 이용하여 Lipopolysaccharide(LPS)와 phobol-12-myristate-13-acetate(PMA)로 NO의 유발을 촉진시켜 증가된 NO 생성에 대한 攝生飲의 효과를 관찰하였던 바 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주 배양

C6 glial 세포 (ATCC)는 CO₂ 세포배양기에서 (37℃, 5% CO₂) 10% fetal bovine serum (Hyclones)이 포함된 DMEM (Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포를 사용하였다.

2) 약제

본 실험에 사용된 약제는 원광대학교 한의과대학 광주한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고, 처방은 東醫寶鑑²³⁾에 준하였으며, 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

Prescription of Sebsaeng-eum

Drug name	Scientific name	Weight (g)
南 星	<i>Arisaematis Rhizoma</i>	6.00
半 夏	<i>Pinelliae Tuber</i>	6.00
木 香	<i>Saussureae Radix</i>	4.00
蒼 朮	<i>Rhizoma Atractylodis</i>	4.00
細 辛	<i>Asiasari Radix</i>	4.00
石菖蒲	<i>Araceae gramineus</i>	4.00
甘草炙	<i>Glycyrrhizae Radix(boiled)</i>	4.00
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	8.00
Total amount		40.00

2. 방법

1) 시료조제

攝生飲 5첩분량 (200g)을 증류수 1.5 l 를 넣고 3시간 동안 끓인 다음 거즈로 여과하고 3,200 rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액은 -70℃에서 Freeze Dryer로 동결건조 시킨 후 42.8 g의 시료를 얻어 사용하였으며, 시료는 세포에 투여하기 전 0.22 μm pore 의 여과지로 여과 멸균하여 농도를 조정하여 다음 사용하였다.

2) MTT 정량

대조군과 실험군들을 각각 3개의 well을 한 군으로 하였으며, MTT [3 - (4,5 - dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma]정량은 Mosmann²⁹⁾의 방법에 따랐다. C6 glial 세포를 배양한 후 상층액을 버리고 사용당일 제조한 500 μg/ml MTT를 배양용기당 1ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3시간 동안 37℃, 5% CO₂로 유지된 정온기내에서 배양하였다. 배양 완료 후 세포내의 formazan을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck)를 배양용기당 1ml씩 넣고 15분간 실온에서 방치한 후 흡광광도계로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

3) Nitrite 농도 측정

C₆ glial 세포를 새로운 serum free 배양액으로 교환하여 3시간 동안 세포를 안정시킨 후 약제를 처리하고 배양액으로 유리되어 나온 NO의 양을 24, 48, 72 시간에 측정하여 대조군과 실험군의 NO 생성농도를 비교하였다. 뇌허혈시 신경세포와 신경아교세포의 iNOS가 활성화되어 NO가 증가되는 현상을 유도하기 위하여 LPS (Lipopolysaccharide, 1µg/ml)와 PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate, 100nM)를 처리하여 C₆ glial 세포에서 iNOS 활성을 증가시킨 후 攝生飲의 영향을 조사하였다.

먼저 알고 있는 농도의 sodium nitrite를 이용하여 표준곡선을 구하고, 대조군과 실험군의 배양액을 각각 150µl씩 얻어 4℃에서 1,500g의 속도로 15분간 원심분리를 한 후 세포성분들을 침전시키고 부유액만을 취하여 Griess reagent와 동량으로 혼합하여 실온에서 10분간 반응시키고 550nm의 파장으로 흡수도를 측정하였다.

4) 세포의 형태학적 관찰

세포의 형태학적 변화를 조사하기 위하여 배양중인 배양용기(well plate)를 도립위상차 현미경(Nikon)에서 관찰하였고, 필요시 부착된 사진기로 촬영하였다.

5) Hoechst staining

약제가 처리된 세포들을 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 씻어주고 Hoechst 33342 (Sigma Biosciences, St. Louis, Missouri, USA) 염색약을 PBS에 10µM이 되게 희석하여 10분간 염색한 후 다시 PBS에서 씻어서 형광현미경으로 관찰하였다.

6) 통계 처리

실험결과의 통계처리는 student's t-test에 준하여

처리하였고 p-value가 0.05 (P<0.05)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

실험성적

1. C₆ glial 세포에 대한 攝生飲의 효과농도

C₆ glial 세포에서 攝生飲 추출물의 효과농도를 결정하기 위해 MTT assay를 실시하여 세포생존율을 측정하였다. C₆ glial 세포에 攝生飲 추출물을 0.1, 0.5, 1, 2 mg/ml을 72시간 처리한 경우, 攝生飲은 전 농도에서 C₆ glial 세포에 대하여 독성효과를 나타내지 않았으며 攝生飲 1mg/ml군에서는 대조군에 비하여 세포생존율이 109.96±9%로 약간 증가하는 경향을 나타내었다(Table 1).

2. 攝生飲자체의 NO 생성유무

攝生飲이 자체적으로 C₆ glial 세포의 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 C₆ glial 세포를 攝生飲 추출물이 각각 0.1, 0.5, 1, 2 mg/ml 씩 포함된 배지에 배양하면서 24, 48, 72 시간후의 NO 생성유무를 관찰하였다.

攝生飲을 단독으로 처리한 경우 Nitric oxide는 攝生飲 추출물 전 농도 구간에서 거의 생성되지 않았고, 24, 48, 72시간까지 실험 전 시간대에서 거의 생성되지 않았다(Table 2).

3. NO 생성에 대한 攝生飲의 방어 효과

뇌허혈시 신경세포와 신경아교세포의 iNOS가 활성화되어 NO가 증가되는 현상을 유도하기 위하여 LPS(1µg/ml)와 PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate,

Table 1. Effect of the Water Extract of *Sebsaeng-eum*(SSE) on Viability of C₆ Glial Cells

Group	SSE(mg/ml)				
	0(control)	0.1	0.5	1	2
Viability (% of control)	100±4	102.47±4	106.79±5	109.96±9	107.31±6

The cells were treated with various concentrations of the extract up to SSE 10mg/ml for 72h. The cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Each value stands for mean±SSE. * P<0.05(n=3)

100nM)를 처리하여 C₆ glial 세포에서 iNOS 활성을 증가시킨 후 攝生飲의 영향을 조사하였다. C₆ glial 세포를 LPS만으로 자극하였을 때 72시간 후 13.80±0.4μM의 NO가 생성되었고, LPS와 PMA로 자극하였을 때는 21.02±1.5μM로 자극받지 않은 대조군의 3.47±0.2μM에 비하여 NO생성량이 많이 증가하였다. 그러나 攝生飲 0.5mg/ml를 LPS와 PMA에 함께 처리한 경우 LPS와 PMA에 의하여 증가된 NO의 양을 21.02±1.5μM에서 7.61±0.2μM로 유의성 있게 감소시켜 LPS와 PMA로 활성화된 C₆ glial 세포에서 NO의 생성을 효과적으로 억제하였다(Table 3).

4. NO의 세포독성에 대한 攝生飲의 방어효과

LPS와 PMA로 활성화된 C₆ glial 세포의 세포독성에 대한 攝生飲의 방어효과를 조사하였다. C₆ glial 세포에 LPS를 72시간 동안 처리한 경우 세포생존율이 대조군에 비하여 85±4%로 감소하였고, LPS와 PMA 처리군에서는 70±3%로 감소하였다. 그러나 LPS에 攝生飲 0.5mg/ml를 처리한 군에서 세포생존률

이 110.2±4%, LPS와 PMA군에 攝生飲 0.5mg/ml를 처리한 군에서는 120.25±7%로 현저히 증가하여 LPS나 LPS와 PMA에 의한 세포독성을 攝生飲이 막아주었다(Table 4).

5. C₆ glial 세포의 형태학적 관찰

배양세포의 형태적 변화를 도립위상차 현미경으로 관찰한 결과, LPS와 PMA를 72시간 처리하였을 경우 세포막이 응축되고 세포돌기도 현저히 감소하였으며 세포들이 응집되어 출현하였다(Fig. 1B). 그러나 LPS와 PMA를 攝生飲 추출물과 함께 처리하였을 경우 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1C).

또한 C₆ glial 세포에 LPS와 PMA를 72시간 처리하였을 때 apoptosis의 전형적인 양상인 염색사의 응축

Table 2. Nitrite Formation by *Sebsaeng-eum*(SSE) only in C₆ Glial Cells

SSE(mg/ml)	Nitrite production(μM)		
	24시간	48시간	72시간
0(Control)	2.60±0.5	3.15±0.1	3.15±0.2
0.1	2.5±0.3	3.04±0.2	2.39±0.2
0.5	3.04±0.2	3.80±0.2	3.15±0.2
1	2.39±0.3	3.47±0.2	2.60±0.2
2	3.15±0.2	3.80±0.3	3.36±0.3

The cells were treated with various concentrations of water extract of SSE only. Values stand for mean±SE of three independent experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * P<0.05

Table 4. Effect of the Water Extract of *Sebsaeng-eum*(SSE) on the Viability of C₆ Glial Cells damaged by LPS combined PMA

Group	SSE(mg/ml)				
	Control	L	L+P	L+SSE	L+P+SSE
Viability (% of control)	100±5	85±4	70±3*	110.2±4	120.25±7*

The cells were treated with LPS combined PMA, with LPS combined PMA and SSE for 72 h. Then, the cell viability were measured by MTT assay. Concentrations of different stimuli were:LPS, 1ug/ml; PMA, 100nM; SSE, 0.5mg/ml. Significant differences from the control are marked with asterisks.

* P<0.05

Control : no treated group

L : LPS alone treated group

L+P : LPS combined PMA treated group

L+SSE : LPS and SSE treated group

L+P+SSE : LPS combined PMA and SSE treated group

Table 3. Effect of the Water Extract of *Sebsaeng-eum* (SSE) on Suppression of Nitrite Formation by LPS combined PMA in C₆ Glial Cells

SSE(mg/ml)	Nitrite production(μM)		
	24시간	48시간	72시간
0(Control)	1.19±0.2	1.19±0.2	3.47±0.2
LPS	2.28±0.2	2.28±0.2	13.80±0.4*
LPS+PMA	3.80±0.2	3.80±0.2	21.02±1.5*
LPS+SSE	2.5±0.2	2.5±0.2	9.78±0.2*
LPS+PMA+SSE	3.15±0.2	3.15±0.2	7.61±0.2*

The cells were treated with water extract of SSE(0.5mg/ml) and LPS combined PMA. Concentrations of different stimuli were ; LPS, 1μg/ml; PMA, 100nM; SSE, 0.5mg/ml. Results were expressed the mean and standard deviation (SD) of three independent experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks.

* P<0.05

Control : no treated group

LPS : LPS alone treated group

LPS+PMA : LPS combined PMA treated group

LPS+SSE : LPS and SSE treated group

LPS+PMA+SSE : LPS combined PMA and SSE treated group

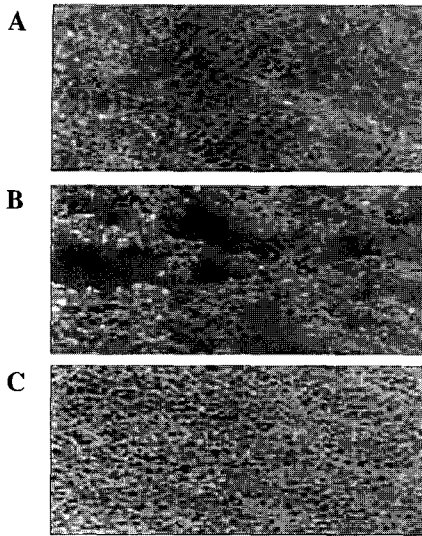


Fig. 1. Effect of the water extract of *Sebsaeng-eum* on the morphological changes of C₆ glial cells damaged by LPS and PMA. The cells were cultured with LPS combined PMA (B) and with LPS combined PMA and SSE(C) for 72 h. The morphological changes were observed in light microscope (200 X).

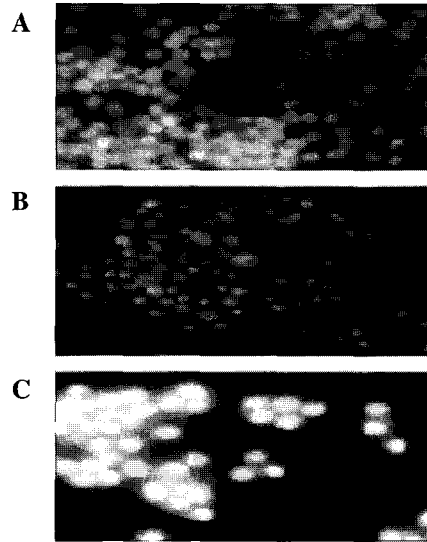


Fig. 2. Protective effect of the water extract of *Sebsaeng-eum* on chromosomal condensation of C₆ glial cells by LPS and PMA. chromosomal condensation was observed by Hoechst Staining (A:Control, B:LPS combined PMA, C:LPS combined PMA and SSE) (200 X).

과 DNA의 분절양상을 관찰하기 위하여 Hoechst staining을 하였던 결과, LPS와 PMA를 처리한 경우 염색사의 응축과 DNA의 분절양상을 관찰할 수 있었으나(Fig. 2B), LPS와 PMA와 함께 攝生飲 추출물을 같이 처리하였을 경우 염색사의 응축이나 DNA의 분절양상을 관찰할 수 없었다(Fig. 2C).

고찰

중풍은 대부분 憂思怒, 飲食不節, 恣酒縱欲 등의 원인으로 陰陽이 실조되고 장부의 氣가 편향되어 氣血이 錯難된 소치로 발병하며, 卒然昏倒 昏不知人 或痰涎壅盛 咽喉作聲 口眼喎斜 手足癱瘓 或半身不遂 或舌強不語 등의 증상을 나타내는 질병이다^{17,18)}.

攝生飲은 燥濕化痰, 祛風解痙의 효능이 있는 半夏, 南星, 行氣止痛, 健脾消食, 止痢의 효능이 있는 木香,

祛風濕, 燥濕健脾의 효능이 있는 蒼朮, 去風止痛, 發散風寒, 溫肺化痰의 효능이 있는 細辛, 開竅安神, 化痰濕, 和中辟濁의 효능이 있는 石菖蒲와 生薑, 甘草로 구성되어²⁰⁾ 濕痰으로 인한 졸중풍에 祛痰開竅하는 효능으로 熱證이 없는 人事不省에 사용되는 처방이다¹³⁾.

뇌졸중은 뇌에 혈액을 보내는 혈관이상으로 발생하며 혈류를 통한 지속적인 산소 및 포도당 공급이 필요한 국소 뇌조직의 대사 이상을 일으켜 그에 따른 국소 뇌세포가 손상되어 뇌조직의 기능장애가 임상 증상으로 나타나는 질환이다. 급성 뇌졸중 치료에 있어서 허혈성 뇌졸중이 일어난 경우 급성기에 그 경색이 생기는 부위를 줄이는 형태의 치료가 있는데, 이러한 치료법에는 허혈 부위에 혈류공급을 원활히 하는 방법과 허혈현상으로 발생하는 생화학적인 변화를 조절하는 방법으로 크게 나누어볼 수 있다. 여기에는 항응고제, 항혈소판제제, 혈전용해제, 혈액점

도 강하 및 기타 허혈진행의 차단제재 등을 들 수 있는데 최근 허혈성 생화학적 폭포현상(ischemic biochemical cascade)의 기전이 많이 밝혀짐에 따라 이를 중간에서 차단하려는 여러 가지 시도, 즉 Ca⁺⁺길항제의 사용, 활동성 산소 라디칼 제거제, 신경전달물질 조절에 관한 약물 등이 시도되고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾.

중추신경계는 혈액공급에 매우 민감한 조직으로 줄중풍 등에 의하여 허혈현상이 발생되면 중추신경계는 신경원세포와 신경교세포에서 신경세포막의 탈분극현상에 의하여 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 유리되고 이에 의하여 N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)에 선택적인 전압의존성 이온통로가 열리면서 칼슘이 세포내에 축적된다. 이 증가된 칼슘은 Nitric Oxide Synthase (NOS)를 과도하게 활성화시키고 Nitric Oxide (NO)의 유도를 급격하게 증가시키므로 증가된 과도한 NO는 미토콘드리아의 기능장애를 일으켜 에너지고갈을 야기하며, 지방과 단백질의 peroxidation 및 nitrosylation, DNA 손상을 일으키는 등 신경세포에 독성을 미쳐 퇴행성 신경질환에 관여한다²²⁻²⁷⁾고 보고되어 허혈상태에서 세포독성에 매우 중요하게 작용한다는 NO에 대한 연구가 광범위하게 진행되어지고 있다.

NO는 NOS에 의하여 L-arginine으로부터 L-citrulline으로 전환되면서 생성되는데. 뇌세포에는 3종류의 NOS가 있다^{28,30)}. 신경세포에서는 칼슘의존적으로 활성화되는 신경원세포의 NOS(nNOS, type1 NOS)가 항상 발현되고 있으며, 신경교세포(별아교세포, 희소돌기아교세포, 미세교세포)들은 lipopolysaccharide(LPS), interferon- γ , tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β 등 각종 cytokine등에 의해서 칼슘에 비의존적으로 합성되는 NOS(iNOS, type2 NOS), 그리고 마지막으로 혈관내피세포와 별아교세포 등에서 칼슘의존적으로 항상 합성되고 있는 혈관내피세포의 NOS(eNOS, type3 NOS)가 있다²⁸⁻³⁰⁾.

뇌허혈시 허혈초기에 신경원세포와 신경교세포에서 흥분성 아미노산에 의해서 칼슘에 의존적인 nNOS와 eNOS가 수시간내에 활성화되는데, 과발현된 nNOS에 의해 생성된 NO는 뇌세포손상을 초래한

다³⁵⁾. 또한 허혈 12시간후 부터 활성화되는 iNOS는 신경교세포인 astrocyte나 microglial 세포 등에서 생성되며 iNOS 발현에 의해 생성되는 NO는 미토콘드리아의 기능부전이나 에너지 고갈을 야기시켜 뇌세포손상을 주로 매개하는 반면³⁶⁾, 허혈성 질환의 초기에 혈관내피세포에서 생성되어지는 NO는 혈관을 확장시켜 혈류량을 증가시킴으로써 산소와 영양분의 공급을 원활하게 하여 허혈에 대한 세포손상을 줄여준다^{23,24,28,29,32)}. 따라서 허혈에 의한 뇌세포손상을 방어하기 위한 연구는 허혈초기의 nNOS를 억제하고 eNOS의 활성을 촉진시켜 혈액순환을 증가시켜야 하며 수시간 이후부터 유도되는 iNOS의 발현을 억제하는 데 초점이 맞추어져야 할 것으로 생각된다.

본 실험에서는 줄중풍기의 人事不省에 사용되어 온 攝生飲이 허혈성 뇌질환에 어떠한 세포독성 방어 작용이 있는지를 알아보기 위하여 성상으로 오직 척수와 뇌에서만 발견되며 각 neuron사이의 기계적이며 대사적인 지지를 하고 그것들이 작용할 수 있도록 환경을 조절해주는 별아교세포(astrocyte)의 특성을 지닌 C6 glial 세포주를 이용하여 Lipopolysaccharide와 PMA로 NO의 유발을 촉진시켜 세포생존율, NO 생성 측정, 세포의 형태적 변화, 염색체 분절 현상을 조사하였다.

허혈성 뇌질환시에 뇌세포에서 tumor necrosis factor- α (TNF- α)가 증가하며, 이 증가된 TNF- α 는 다른 cytokine과 더불어 astrocyte와 신경교세포에서 iNOS의 발현에 깊이 관여하고 있다. primary astrocyte와 microglial 세포에서 LPS는 단독 또는 다른 cytokine, phorbol ester(PMA)와 더불어 TNF- α 신호전달계를 활성화시킨다고 잘 알려져 있다³⁷⁾.

본 실험에서 우선 攝生飲이 C6 glial 세포에서 독성 효과를 나타내는지를 알아보기 위하여 MTT assay를 실시한 결과 0.1 mg/ml 의 농도에서 부터 2 mg/ml까지의 실험 전 농도에서 세포생존율에 큰 변화를 나타내지 않아 攝生飲 추출물은 세포 독성 효과가 없는 것으로 나타났다(Table 1). 또한 攝生飲이 자체적으로 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위한 실험에서 攝生飲 추출물을 단독으로 처리한 경

우 NO는 전 농도 구간에서 거의 생성되지 않았음을 알 수 있었다(Table 2).

뇌허혈시 신경세포와 신경아교세포의 iNOS가 활성화되어 NO가 증가되는 현상을 유도하기 위하여 LPS와 PMA 를 처리하여 C6 glial 세포에서 iNOS 활성을 증가시킨 후 攝生飲의 영향을 조사한 결과 攝生飲 0.5mg/ml를 LPS와 PMA에 함께 처리한 경우 LPS와 PMA에 의하여 증가된 NO의 양을 $21.02 \pm 1.5 \mu\text{M}$ 에서 $7.61 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 로 유의성 있게 감소시켜 LPS와 PMA로 활성화된 C6 glial 세포에서 NO의 생성을 효과적으로 억제시켰음을 알 수 있었으며 (Table 3), LPS와 PMA로 활성화된 C6 glial 세포의 세포독성에 대한 攝生飲의 방어효과를 조사한 결과 또한 LPS와 攝生飲 0.5mg/ml를 처리한 군에서 세포생존율이 $110.2 \pm 4\%$ 로 나타났고 LPS와 PMA와 함께 攝生飲 0.5mg/ml를 처리한 군에서는 $120.25 \pm 7\%$ 로 현저히 증가하여 LPS나 LPS와 PMA에 의한 세포독성을 攝生飲이 막아주어 (Table 4), LPS와 PMA에 의한 세포독성은 NO에 의한 것으로 나타났으며 攝生飲이 NO의 생성을 줄여줌으로써 세포독성을 막아주는 것으로 생각된다. 이는 허혈 모델의 배양 교세포와 중간대뇌동맥(middle cerebral artery, MCA)을 폐쇄시킨 쥐모델에서 칼슘에 비의존적으로 발현되는 iNOS의 활성이 증가하고³⁸⁾ 이러한 조건에서 선택적인 iNOS의 저해제인 aminoguanidine이 세포손상을 현저히 억제하였다는 보고와 일치하였다³⁹⁾.

그리고 NO의 경우 poly (ADP - ribose) synthetase 나 $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease를 활성화시켜 DNA의 분절을 유도하여 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있으므로⁴⁰⁾ 본 실험에서도 Hoechst 염색으로 염색체응축과 DNA 분절현상을 관찰한 결과 LPS와 PMA에 의해 염색체 응축이 다수 관찰되었으나, 攝生飲 추출물이 LPS와 PMA에 의한 염색체 응축현상을 현저히 억제하였다(Fig. 1, 2).

이상의 결과 攝生飲은 iNOS의 활성을 억제하여 NO의 생성을 줄이고, 핵의 염색체 분절을 막아줌으로써 뇌세포 손상으로부터 방어작용을 하는 것으로 생각되므로 허혈성 뇌질환에 유효하게 사용할 수 있

을 것으로 사료된다.

결론

豁痰開竅의 효능이 있는 攝生飲이 허혈상태에서 세포의 손상을 방어하는지를 알아보기 위하여 C6 glial 세포주를 이용하여 LPS와 PMA로 NO의 유발을 촉진시킨 다음 攝生飲을 투여하여 세포생존율, NO 생성 측정, 세포의 형태적 변화, 염색체 분절 현상을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 攝生飲은 2mg/ml 에서도 C6 glial 세포의 성장에 손상을 주지 않았다.
2. 攝生飲은 LPS와 PMA에 의해서 생성되어진 NO의 생성을 억제하였다.
3. 攝生飲은 LPS와 PMA에 의해서 유도되어지는 세포독성을 현저히 억제하였다.
4. 攝生飲은 LPS와 PMA에 의해서 유도되어지는 iNOS의 활성을 억제함으로써 염색체의 응축이나 DNA의 분절 등을 억제하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 攝生飲은 iNOS의 활성을 억제하여 NO의 생성을 줄이고, 핵의 염색체 분절을 막아줌으로써 신경세포독성으로부터 방어작용을 하는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 龔廷賢. 萬病回春. 서울:醫聖堂. 1993:47.
2. 江克明, 包明蕙. 校訂方劑大辭典. 서울:醫聖堂. 1991:1168.
3. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:大星文化社. 1992:362.
4. 陳夢雷. 醫部全錄. 중국:人民衛生出版社. 1976:110.
5. 印景 文淵閣 四庫全書 第七六六冊. 臺灣:臺灣商務印書館. 766-18.
6. 金定濟. 診療要鑑. 서울:東洋醫學研究院. 1974:322-323.
7. 東醫臨床處方集編纂學生委員會. 東醫臨床處方集. 서울:東洋醫藥大學. 1963:218.

8. 傅景華. 古代驗方大全. 북경:中醫古籍出版社. 1990:342.
9. 東醫科學院. 東醫處方大全. 서울:麗江出版社. 1993:338.
10. 과학백과사전종합출판사. 東醫學辭典. 서울:도서출판 까치 1990:527.
11. 陳復正. 幼幼集成. 북경:人民衛生出版社 1988:139.
12. 全國韓醫科大學 心系內科學教室. 心系內科學. 서울:書苑堂 1999:420.
13. 具本泓. 東醫內科學. 서울:書苑堂. 1985:193,229-247.
14. 대한신경외과학회. 신경외과학. 서울:중앙문화사. 1998:276-279,285.
15. 金東燦. 백서 대뇌 피질, 해마와 선조체 절편에서 허혈의 神經 전도 물질 유리효과. 원광대 학대학원. 익산 1993:27-28.
16. 서울대학교의과대학. 신경학원론. 서울:서울대학교출판부. 1997:521,522,526-543.
17. 方藥中 외. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社. 1986:420.
18. 許沛虎. 中醫腦病學. 북경:中醫醫藥科技出版社. 1998:344-347,352-354.
19. 최용준. 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 실험적 研究. 익산:圓光大學校. 1997.
20. 玉潤榮. 太陰人 清心蓮子湯이 Hydrogen Peroxide에 損傷된 白鼠의 大腦神經細胞에 미치는 影響. 익산:圓光大學校大學院. 1998:2.
21. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울:永林社. 1991:624-626,556-558,387-388,414-416,512-513,374-375,175-177,254-256.
22. Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Brecht, D.S., Snyder, S.H.. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991;88:6368-6371.
23. Dawson, V.L., Dawson, T.M., Bartley, D.A., Uhl, G.R., Snyder, S.H.: Mechanism of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. J. Neurosci. 1993;13:2651-2661.
24. Dawson, V.L., Dawson, T.M.. Nitric oxide neurotoxicity. J. Chem. Neuroanat. 1996;10:179-190.
25. Turski, L., Turski, L.. Towards an understanding of the role of glutamate in neurodegenerative disorders. energy metabolism and neuropathology, Experientia. 1993;49:1064-1072.
26. Ikonomidou, C., Turski, L.. Excitotoxicity and neurodegenerative diseases. Curr. Opin. Neurol. 1995;8:487-497.
27. Schulz, J.B., Matthews, R.T., Beal, M.F.. Role of nitric oxide in neurodegenerative diseases. Curr. Opin. Neurol. 1995;8:480-486.
28. Garthwaite, J., Chales, S.L., Chess-Williams, R.. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intercellular messenger in the brain. Nature. 1988;336, 385-387.
29. Vincent, S.R.. Nitric oxide : a radical neurotransmitter in the central nervous system. Progr. Neurobiol. 1994;42:129-160.
30. Brecht, D.S., Snyder, S.H.. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990;87:682-685.
31. Knowles, R.G., Moncada, S.. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem. J. 1994;298: 249-258.
32. Wagner, B.P., Stingle, R., Williams, M.A., Wilson, D.A., Traystman, R.J., Hanley, D.F.. NO contributes to neurohypophysial but not other regional cerebral fluorocarbon-induced hyperemia in cats. Am. J. Physiol. 1997;42:1994-2000.
33. Sato, S., Tominaga, T., Ohnishi, S.T.. EPR spin-trapping study of nitric-oxide formation during bilateral carotid occlusion in the rat. Biochim, Biophys. 1993;Acta 1181:195-197.
34. Tominaga, T., Sato, S., Ohnishi, S.T.. Potentiation of nitric oxide formation following bilateral carotid occlusion and focal cerebral-ischemia in the rat. In vivo detection of nitric oxide radical by electron-paramagnetic-resonance spin trapping. Brain Res. 1993;614:342-346.
35. paper. Juan P.B., Angeles A.. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. Biochimica Biophysica. 1998;Acta 1141:415-436.
36. Iadecola, C., Zhang, F.Y., Casey, R., Clark, H.B., Ross, M.E.. Inducible nitric oxide synthase gene-expression in vascular cells after transient focal cerebral-ischemia. Stroke. 1996;27:1373-1380.
37. Sacco S., Agnello D., Sottocorno M., Lozza G., Monopoli A., Villa P., Ghezzi P.. Nonsteroid -al anti-inflammatory drugs increase tumor necrosis factor

- production in the periphery but not in the central nervous system in mice and rats. *J Neurochem.* 1998;71(5):2063-2070.
38. Iadecola, C., Xu, X.H., Ahang, F.Y., Elfakahany, E.E., Ross, M.E.. Marked induction of Calcium-independent nitric-oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1995;15:52-59.
39. Iadecola, C., Zhang, F.Y., Xu, X.H.. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am. J. Physiol.* 1995;37:R286-R292.
40. Gilad E., Zingarelli B., Salzman AL., Szabo C.. Protection by inhibition of poly(ADP-ribose) synthetase against oxidant injury in cardiac myoblast In vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;Sep29(9):2585-2597.