

鎮肝熄風湯 전탕액이 GO에 의해 손상된 배양 척수감각신경세포의 LDH 활성도에 미치는 영향

박광수 · 권강범 · 성은경 · 송용선¹ · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 원광대학교 한의과대학 재활의학과

Effects of Jingsansikpung-tang Water Extract on LDH Activity of Cultured Spinal Sensory Neurons Damaged by GO

Kwang Su Park, Kang Beom Kwon, Eun Kyung Seong, Yong Sun Song¹, Do Gon Ryu*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

¹: Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

To evaluate the effect of Jingsansikpung-tang(JST) water extract on cultured mouse spinal sensory neuron which was inhibited by glucose oxidase(GO)-induced cytotoxicity, MTT and LDH activity assay were carried out after the cultured mouse spinal sensory neuron were pre-incubated with various concentrations of JST extract for 3 hours prior to exposure of GO. The results obtained were as follows: GO, a oxygen radical, decreased the survival rate of the cultured mouse spinal sensory neuron cells on MTT assay. JST water extract have efficacy of decreasing LDH activity increasing by GO in cultured mouse spinal sensory neuron. From above the results, it is concluded that JST water extract has marked efficacy as a treatment for the damages caused in the GO-mediated oxidative process.

Key words : Jingsansikpung-tang(鎮肝熄風湯), glucose oxidase(GO), MTT, LDH activity

서 론

鎮肝熄風湯은 清代末期 張錫純의 <醫學衷中參書錄>¹⁾에 최초로 수록된 처방으로 牛膝, 代赭石, 龍骨, 牡蠣, 龜板, 玄蔘, 天門冬, 白芍藥, 茵陳, 川棟子, 麥芽, 甘草로 구성되어져 있으며, 근래의 실험보고에서 본 처방의 강혈압작용과 항경련작용 및 심근억제작용이 보고되었다^{2,4)}. 산소자유기는 치매나 중풍, 뇌허혈뿐만 아니라 근위축성측삭경화증과 같은 신경병변의 병리학적 원인으로 밝혀지면서 이들 병변에 대한 치료적 측면에서 산소자유기에 의한 신경세포의 산화적 손상에 대한 작용규명과 병리적 현상을 밝히기 위하여 많은 연구가 이루어져 왔다⁵⁾.

최근에 이러한 산소자유기의 산화적 손상에 대하여 한약재가 효과적인 항산화작용을 나타낸다는 연구보고^{6,8)}들이 있었으며 또한 鎮肝熄風湯이 xanthine oxidase (XO)/hypoxanthine (HX)에 의해 손상된 배양 척수운동신경세포에 대한 방어효과가 있다는 보고⁹⁾가 있었다. 본 실험에서는 김의 보고⁹⁾를 기초로 glucose oxidase(GO)에 의한 배양 척수감각신경세포의 산화적 손상여부

를 MTT assay를 이용하여 조사하였으며 이러한 산화적 손상에 대하여 鎮肝熄風湯 전탕액의 방어효과를 LDH 활성도 측면에서 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 약재

본 실험에 사용한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강상태가 양호한 생쥐를 사용하였다. 본 실험에서 사용된 鎮肝熄風湯의 처방내용은 <醫學衷中參書錄>¹⁾에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 부속익산한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였고, 내용과 분량은 아래의 Table 1과 같다.

2. 실험방법

1) 鎮肝熄風湯 추출

鎮肝熄風湯 203.2g을 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 46.04g의 분말 시료를 얻었다.

2) 약제 제조

* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr Tel : 063-850-6846

· 접수: 2002/04/13 · 수정: 2002/05/03 · 채택 : 2002/06/03

본 실험에 사용한 약제로는 glucose oxidase(GO, Sigma)로 서 각각 100 U/ml, 10 U/ml, 1 U/ml의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of Jingansikpung-tang

韓藥名	生藥名	重量(g)
牛膝	Radix Achyranthis Bidentatae	32
代赭石	Haematitum	32
龍骨	Os Draconis	19.2
牡蠣	Concha Ostreae	19.2
龜板	Carapax et Plastrum Testudinis	19.2
白芍藥	Radix Paeoniae Alba	19.2
玄參	Radix Scrophulariae	19.2
天門冬	Radix Asparagi	19.2
川蘇子	Fructus Toosendan Seu Meliae Azedarach	6.4
麥芽	Fructus Hordei Germinatus	6.4
青蒿	Herba Artemisiae Apiaceae Seu Annuae	6.4
甘草	Radix Glycyrrhizae	4.8
총 량		203.2

3) 세포배양

척수감각신경세포의 분리는 Michikawa 등¹⁰⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생후 1~3일된 생쥐에서 적출한 척수조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36°C, 5% CO₂/95%air로 조절된 항온기 내에서 배양하였다. 배양완료후 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)으로 3회 세척 후 Pasteur 피펫으로 세포를 분리시켰다. 분리된 세포들은 Poly-L-lysine (Sigma)으로 전처리 한 96-multiwell에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양후 본 실험에 사용하였다.

4) Glucose oxidase(GO)의 처리

GO가 생쥐의 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 신경세포를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 GO를 척수감각신경세포에 처리한 후 분석하였다.

5) 세포독성 및 방어효과 검증

(1) MTT 정량

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma)> 정량은 Mosmann¹¹⁾의 방법에 의하였다. GO 나 한약재를 처리한 배양 신경세포를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk)를 처리한 다음 spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 측정후 대조군과 비교 조사하였다.

(2) LDH 정량

LDH 활성도의 측정은 최적화된 LDH/LD procedure (Sigma Diagnostics)를 이용하여 배양액의 일부를 사용하였다. 즉 phosphate buffer (pH 7.5)에 등몰농도의 NADH를 pyruvate

환원의 반응에 이용하여 spectrophotometer의 340nm에서의 흡광도의 감소율은 배양액의 LDH 활성도에 비례하게 됨을 이용하여 LDH 활성도를 측정하였다.

6) 통계 처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 산소자유기의 독성효과

1) 세포생존율 분석: MTT 정량

산소자유기가 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 glucose oxidase(GO)가 5 mU/ml 에서 40 mU/ml 까지의 농도로 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 후 GO의 독성효과를 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 처리한 농도에 비례하여 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 20 mU/ml 와 40 mU/ml GO를 처리한 경우 이의 생존율은 각각 50.9% (p<0.05)와 47.4% (p<0.01)로 대조군에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났다(Table 1).

Table 1. Absorbance(% of control) at 570nm wavelength for the MTT assay on glucose oxidase(GO) in cultured mouse spinal sensory neurons.

GO(mU/ml)	MTT absorbance(570nm)	Decrease rate of cell viability(%)
0(control)	0.57±0.07	-
5	0.46±0.05	19.3
10	0.36±0.03	36.8
20	0.29±0.06*	49.1
40	0.27±0.04**	52.6

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with various concentrations of GO for 6 hours. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

GO가 시간에 따라 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MCV(midcytotoxicity value)값인 20 mU/ml GO가 포함된 배양액에서 척수감각신경세포를 각각 2~8시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 조사하였다. 그 결과 GO를 처리한 시간에 따라 세포생존율이 낮게 나타났다. 특히 6시간(p<0.05), 8시간(p<0.01) 처리후에는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다(Table 2).

Table 2. Time-response relationship of glucose oxidase(GO) by MTT assay in cultured mouse spinal sensory neurons

GO (mU/ml)	MTT absorbance(570nm)				
	0 hr	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr
0	0.63±0.07	0.61±0.05	0.58±0.06	0.54±0.04	0.51±0.02
20	0.58±0.07	0.40±0.06	0.34±0.05	0.26±0.04*	0.15±0.01**

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with 20 mU/ml GO for various time intervals. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

2. 鎮肝熄風湯의 효과: LDH 정량

1) Glucose oxidase(GO)의 영향

GO 농도에 따른 LDH 활성도를 측정하기 위하여 GO가 1-100 mU/ml까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 척수감각신경세포를 6시간 동안 처리한 후 세포배양액내로 유출된 LDH의 활성도를 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 GO를 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 특히 50 mU/ml(p<0.05), 100 mU/ml(p<0.01) GO의 경우는 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈으며 MCV값(midcytotoxicity value)은 50 mU/ml GO의 처리에서 나타났다(Fig. 1).

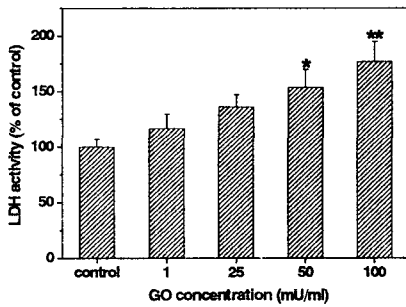


Fig. 1. Dose-dependency of glucose oxidase(GO) on LDH activity in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 1, 25, 50 and 100 mU/ml GO for 6 hours, respectively. Amount of LDH release was measured at wavelength of 340nm. The results indicate the mean±SE(n=6). Significant differences from the control group are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

2) 鎮肝熄風湯 전탕액의 효과

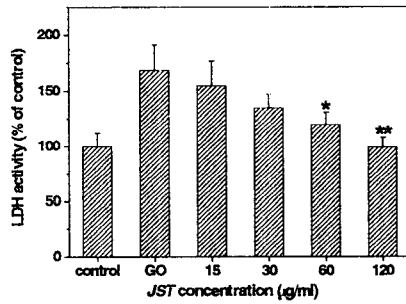


Fig. 2. Dose-dependency of Jingansikpong-tang water extract for its neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in LDH release. Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with JST water extract. Cultures were preincubated with 15, 30, 60 and 120 µg/ml JST water extract for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 50 mU/ml GO for 6 hours. LDH release was measured at wavelength of 340nm. The values are the mean±SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences from the JST non-treated group. *p<0.05; **p<0.01

배양 척수감각신경세포에 대한 glucose oxidase(GO)의 산화적 손상에 있어서 鎮肝熄風湯의 효과를 LDH 활성도 측면에서 조사하기 위하여 GO의 MCV값인 50 mU/ml GO 농도에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15-120 µg/ml 鎮肝熄風湯 전탕액이 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 LDH 활성도의 변화에 있어서 鎮肝熄風湯 전탕액만을 처리한 경우 유의한 변화는 나타나지 않았다. 40 mU/ml GO만을 처리한 경우 대조군100%에 비하여 168.6%로 유의한 증가를 나타내 독성을 나타냈다. 그러나 鎮肝熄風湯 전탕액을 3시간 동안 전처리한 경우 농도의존적으로 GO에 의하여 증가한

LDH 활성도가 유의하게 감소하여 GO의 독성에 대한 방어효과를 보였다. 특히 60 µg/ml, 120 µg/ml 鎮肝熄風湯 煎湯液 처리군은 대조군168.6%에 비하여 각각 119.4%(p<0.05), 99.2%(p<0.01)로 유의한 방어효과를 나타냈다(Fig. 2).

고찰

鎮肝熄風湯은 清代末期 張錫純의 <醫學衷中參西錄>에 최초로 수록된 처방으로 牛膝, 代赭石, 龍骨, 牡蠣, 龜板, 玄蔘, 天門冬, 白芍藥, 茵陳, 川棟子, 麥芽, 甘草로 구성되어져 있다. 각 구성 약물의 효능을 보면 引血下行하는 牛膝을 중용하여 肝陽上亢을 막고, 代赭石의 味苦質重한 성질을 이용하여 平肝潛陽하고 龍骨, 牡蠣 역시 平肝潛陽하는 효력이 강력하다¹²⁾. 따라서 위 4가지 약물을 응용하여 表를 치료하고 龜板, 玄蔘, 天門冬, 白芍藥을 사용하여 간의 역기를 가라앉히게 하였다¹²⁾. 근래의 실험보고에서 본 처방의 강혈압작용과 항경련작용 및 심근억제작용이 보고된 바 있다²⁻⁴⁾. 산소자유기는 중추신경계를 비롯하여 말초신경계에 영향을 미쳐 파킨슨씨병이나 근위축성측삭경화증과 같은 신경질환을 유발하는 병인으로 밝혀지고 있다¹³⁻¹⁵⁾. 이러한 산소자유기의 독성현상에 대한 기전규명과 산소자유기에 의하여 유발되는 질환에 대한 치료적 접근을 위하여 국내외 많은 학자들이 동물을 대상으로 꾸준한 연구를 진행하여 오고 있다^{16,17)}. 이러한 산소자유기의 산화적 손상에 대하여 한약재가 방어효과가 있다는 보고⁶⁻⁸⁾가 있었으며 김⁹⁾은 鎮肝熄風湯 전탕액이 XO/HX에 의해 손상된 배양 척수운동신경세포에 방어효과가 있다고 보고하였다. 본 실험은 김의 보고⁹⁾를 기초로 배양 척수감각신경세포에 鎮肝熄風湯 전탕액의 방어효과를 조사하였다. 먼저 glucose oxidase (GO)의 감각신경세포에 대한 독성효과를 MTT assay를 통하여 조사하였다. 그 결과 처리한 GO의 농도와 시간에 비례하여 세포의 생존율이 감소하였다(Table 1-2). 이는 GO가 산소자유기를 유발하여 독성을 나타낸 것으로 사료된다. 이러한 GO의 산화적 손상에 대하여 鎮肝熄風湯 煎湯液의 방어효과를 LDH 활성도의 측정을 통하여 조사하였다. 먼저 lipid peroxidation과 LDH 활성도에 있어서 처리한 GO의 농도에 비례하여 세포에 독성을 나타냈으며(Fig. 1) MCV(midcytotoxicity value)값이 50 mU/ml GO의 처리에서 나타났다. 鎮肝熄風湯 전탕액을 전처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하였으며 특히 60 µg/ml, 120 µg/ml의 농도에서 GO만을 처리한 군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 2). 이러한 결과는 鎮肝熄風湯 전탕액이 GO에 의하여 손상된 배양 척수감각신경세포에 대하여 방어효과가 있으며 김⁹⁾이 보고한 운동신경세포에서의 방어효과와 유사한 결과이며 앞으로 이를 토대로 鎮肝熄風湯의 임상에서의 응용범위를 넓힐 수 있리라 사료된다.

결론

Glucose oxidase(GO)의 산화적 손상에 의한 독성효과를 구명하기 위하여 신생생쥐에서 분리 배양한 척수감각신경세포에 여러 농도의 GO가 포함된 배양액에서 3시간 동안 처리한 다음

GO가 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 GO의 독성효과에 대한 한약추출물인 鎮肝熄風湯 전탕액의 영향을 조사한 결과는 다음과 같다. Glucose oxidase(GO)는 MTT assay에 의한 세포생존율을 감소시켰다. 鎮肝熄風湯 전탕액은 glucose oxidase(GO)의 산화적 손상에 의한 신경독성에 대하여 LDH 활성도의 감소에 유의한 효과를 보였다.

이상의 결과로 보아 GO는 생쥐에서 분리한 척수감각신경세포에 산화적 손상에 의한 신경독성을 나타냈으며 鎮肝熄風湯이 GO의 산화적 손상에 대한 방어에 효과적인 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2001-1-20500-018-1) 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- 張錫純: 醫學衷中參西錄(상), 石家莊, 河北科學技術出版社, pp.307-327, 1985.
- 張壽頤 著, 元秦喜 譯: 國譯中風講註, 서울, 大星文化社, pp.282-290, 328-346, 1994.
- 陳傳外: 方劑學, 上海, 上海中醫學院出版社, pp.447, 449-451, 1990.
- 金希俊 外: 鎮肝熄風湯이 家兔의 血壓 및 血清 Total Cholesterol 에 미치는 영향, 大韓韓醫學會誌, 11(1):109-119, 1990.
- Kikuchi S., Kim S. U. : Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in cultures. J. Neurosci. Res., 36:558-569, 1993.
- 金鍾寬 : 太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院, 1998.
- 육윤영 : 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. 益山, 圓光大學校 大學院, 1998.
- 이영보, 송용선 : 加味十全大補湯 煎湯液이 Xanthine Oxidase/Xanthine에 의해 損傷된 培養 脊髓運動神經細胞에 미치는 影響. 韓方再活醫學科學會誌 Vol.9, No.1, 1999.
- 김성환 : 鎮肝熄風湯이 손상된 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향, 원광대학교 한의과 대학원 박사학위논문, 1998.
- Michikawa M., Lim K. T., McLarnon J. G., Kim S. U. : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J. Neurosci. Res. 37:62~70, 1994.
- Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods 65:55~63, 1983.
- 圓光大18期卒準委: 譯釋中醫方劑問答, 益山, 圓光大學校出版局, pp.286-289, 408, 545-546, 1995.
- Conradi, S., Ronnevi, L., Norris, F. : Amyotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP(ed) : Human Motor Neuron Diseases. New York Raven Press. pp. 35-56, 1982.
- Difazio, M. C., Hollingsworth, Z., Young, A. B., Penny, J.B : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. Neurology. 42:402 1992.
- Rosen, D., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J. O., Regan, J., Deng, H., Rahamni, Z., Krizus, A. : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature(London). 362,59 1993.
- Floyd, R. A : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J. 4:2587-2597, 1990.
- Park S.T., Lim K.T., Chung Y.T., Kim S.U.: Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. Neurotoxicol. 17:37-46, 1996.
- Buege J.A., Aust S.D. : Microsomal lipid peroxidation. In "Methods in enzymology". Academic Press, Vol 52, New York. p.306, 1978.