

# 加味補中益氣湯이 GLUCOSE OXIDASE에 의해 손상된 배양 척수감각신경세포의 총단백질 합성량에 미치는 영향

이창호 · 권강범 · 장승호 · 송용선<sup>1</sup> · 류도곤\*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 원광대학교 한의과대학 재활의학과

## Effects of Gamibojungikki-tang on Total Protein Synthesis of Cultured Spinal Sensory Neurons Damaged by GLUCOSE OXIDASE

Lee Chang Ho, Kwon Kang Beom, Jang Seung Ho, Song Yong Sun<sup>1</sup>, Ryu Do Gon\*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine,

1: Department of Oriental Rehabilitation Medicine, Collage of Oriental Medicine, WonKwang University

In order to clarify the neuroprotective effect of Gamibojungikki-tang (GBJIKT) water extract on cultured mouse spinal sensory neuron damaged by glucose Oxidase (GO), MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay and SRB (Sulforhodamine B) assay were carried out after the cultured mouse spinal sensory neuron were preincubated with various concentrations of GBJIKT water extract for 3 hours prior to exposure of GO. Cell viability of cultured mouse spinal sensory neurons exposed to various concentrations of GO for 8 hours was decreased in a dose-dependent manner. MTT50 values were 45 mU/ml GO. Cultured mouse spinal sensory neurons in the medium containing various concentration of GO for 8 hours showed decreasing of total protein synthesis. GO was toxic on cultured spinal sensory neurons. Pretreatment of GBJIKT water extract for 3 hours following GO prevented the GO-induced neurotoxicity such as decreasing of total protein synthesis. These results suggest that GO shows toxic effect on cultured spinal sensory neurons and GBJIKT water extract is highly effective in proecting the neurotoxicity induced by GO.

Key word : Gamibojungikki-tang(加味補中益氣湯), Mouse Spinal Sensory Neuron, Glucose Oxidase, Neurotoxicity.

### 서 론

補中益氣湯은 益氣升陽, 調補脾胃하는 기본적인 처방으로서 李東垣이 《脾胃論》에서 立方한 이후 광범위하게 임상적으로 응용되는 방제이며<sup>1,2)</sup>, 그 적응증은 脾胃氣虛로 인한 食少, 疲勞, 畏寒, 自汗, 發熱, 脈虛大無力, 中氣下陷, 內臟下垂 및 不能攝血 崩漏 등이다<sup>1,2)</sup>. 산소자유기는 치매를 비롯한 뇌허혈 및 뇌졸중 과 같은 병변의 병인의 하나로 알려지고 있다<sup>3,4)</sup>. 이같은 산소자유기는 정상적으로 인체의 대사중에 소량으로 만들어지며 이는 곧 catalase나 superoxide dismutase (SOD)와 같은 항산화효소에 의하여 분해되어 세포에 아무런 손상을 주지 않는다<sup>5)</sup>. 그러나 뇌허혈이나 근위축성측삭경화증과 같은 병변에서는 산소자유기가 과량으로 만들어져 뇌속에 축적되어 과량 축적된 산소자유기는 항산화효소의 활성감소를 초래하여 결국 세포를 사멸하게 된

다<sup>6,7)</sup>. Glucose oxidase (GO) 는 in vitro에서 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 유발하여 DNA에 손상을 주어 세포에 독성을 나타낸다<sup>8)</sup>. 보중익기탕에 관한 실험적연구로 자궁 및 주위조직의 선택적 흥분작용, 장유동운동의 평형적조절, hydrocortosone으로 유발한 陽虛證에 미치는 영향 등이 있다<sup>9-11)</sup>. 최근 산소자유기에 의해 손상된 세포에 대하여 한약재가 방어효과를 나타낸다는 연구보고를 접하였다<sup>12-15)</sup>. 그러나 산소자유기로 손상된 척수감각신경세포에 대한 補中益氣湯의 방어효과를 관찰한 보고는 접할 수 없었다.

이에 저자는 산소자유기를 유발하기 위하여 GO를 배양한 척수감각신경세포에 처리한 후 세포독성을 MTT assay를 이용하여 조사하였다. 補中益氣湯에 전신이 마비되는 氣虛에 加味되는 木瓜, 瓜薑仁, 香附子, 靑皮, 防風, 川芎, 桂枝를 加味한 加味補中益氣湯이 산소자유기의 손상에 대하여 끼치는 방어효과를 관찰하기 위하여 加味補中益氣湯 煎湯液을 배양 척수감각신경세포에 전처리 한 후 GO에 노출시켜 SRB assay를 이용하여 총단백질 합성량을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

\* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344, 원광대학교 한의과대학

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

접수: 2001/12/12 · 수정: 2002/01/19 · 채택 : 2002/02/07

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강상태가 양호한 생쥐를 사용하였다.

### 2. 약재 제조 및 처리

#### 1) 전탕액의 제조 및 처리

본 실험에서 사용된 加味補中益氣湯은 원광대학교 부속익산 한방병원에서 구입한 후 염산하여 사용하였고, 내용과 분량은 Table 1과 같고, 加味補中益氣湯 201.6g을 각각 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 42.74g의 분말 시료를 얻은 후 실험당일 적당한 양을 배양액에 첨가하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of Gamibojungikki-tang

韓藥名	生藥名	총重量(g)
黃芪(蜜炙)	Radix Astragali	16.8
人參	Radix Ginseng	11.2
白朮	Rhizoma Atractylodis Macrocephalae	11.2
甘草	Radix Glycyrrhizae	11.2
當歸身	Radix Angelicae Sinens	5.6
陳皮	Pericarpium Citri Reticulatae	5.6
升麻	Rhizoma Cimicifugae	33.6
柴胡	Radix Bupleuri	33.6
木瓜	Fructus Chaenomelis	11.2
烏藥	Radix Linderae	11.2
香附子	Rhizoma Cyperi	11.2
靑皮	Pericarpium Citri Reticulatae Viride	11.2
防風	Radix Saposhnikoviae	11.2
川芎	Rhizoma Chuanxiong	11.2
桂枝	Ramulus Cinnamomi	5.6
총 계		201.6

#### 2) Glucose Oxidase (GO)의 제조 및 처리

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

### 3. 세포배양

척수감각신경세포의 분리는 Michikawa 등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생후 1~3일된 생쥐에서 적출한 척수조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36℃, 5% CO<sub>2</sub>/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 전처리된 96-multiwell에 3×10<sup>6</sup> cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양후 본 실험에 사용하였다.

### 4. 세포독성 및 방어효과 검정

#### 1) MTT 정량

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma)> 정량은 Mosmann<sup>17)</sup>의 방법에 의하였다. GO를 처리한 배양 신경세포를 PBS로 3회 세척한 후 전달 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37℃, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료후 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk)를 처리한 다음 ELISA Leader(Molecular Device, USA)로 570nm에서 흡광도를 측정후 대조군과 비교 조사하였다.

#### 2) SRB 정량

GO나 加味調中益氣湯 煎湯液을 일정시간 동안 처리한 배양 신경세포에 0.4% sulforhodamine B (SRB)를 200 μl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 반응시킨 후 1.0% acetic acid로 3회 세척하였다. 세척 후 10 mM Tris base를 이용하여 SRB-bound protein을 녹인후 ELISA Leader(Molecular Device, USA)로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

### 5. 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

배양중인 척수 감각신경세포를 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>이 없는 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)로 3회 세척한 후 GO가 15 mU/ml에서 60 mU/ml까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 8시간 배양한 후 이의 영향을 조사한 결과 처리한 GO의 농도에 비례하여 세포생존율이 감소하였다. 특히 45 mU/ml, 60 mU/ml GO의 처리에서는 대조군에 비하여 각각 46.4%(p<0.05), 32.1% (p<0.01)로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 1).

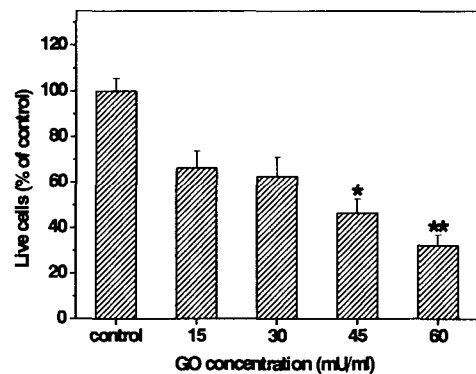


Fig. 1. Dose-dependency of glucose oxidase (GO). GO-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in mouse spinal sensory neurons. Cultured cells were treated with various concentrations of GO for 8 hours. The values are the mean±SE(n=6). Significant differences from the control are marked with asterisks (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

GO의 배양시간에 따라 신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 45 mU/ml GO 농도에서 1-12시간 동안 배양한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포의 생존율이 감소하였으며 특히 8시간, 12시간에서는 대조군에 비하여 각각 51.4%( $p<0.05$ ), 44.1%( $p<0.01$ )로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 2).

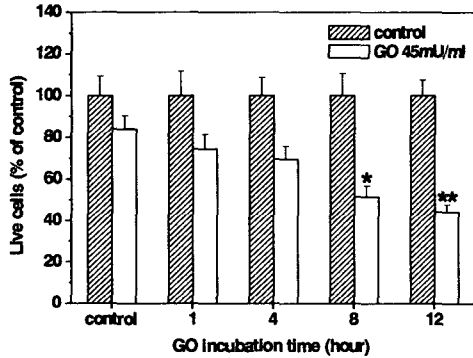


Fig. 2. Time-dependency of glucose oxidase (GO). GO-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in mouse spinal sensory neurons. Cultured cells were treated with 45 mU/ml GO for 1, 4, 8 and 12 hours, respectively. The values are the mean±SE(n=6). Significant differences from the control are marked with asterisks (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ).

2. GO의 독성에 대한 加味補中益氣湯의 효과 - SRB 정량

1) GO의 영향

GO가 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 총단백질 합성량의 측면에서 조사하기 위하여 1 mU/ml에서 50 mU/ml까지의 GO가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 8시간 동안 배양한 후 XO에 의한 총단백질 합성량의 변화에 대해 조사한 결과 처리한 GO의 농도에 의존적으로 총단백질 합성량이 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 특히 30 mU/ml와 50 mU/ml GO를 처리한 경우 총단백질 합성량은 대조군100%에 비하여 각각 53.7%( $p<0.05$ )와 43.2%( $p<0.01$ )로 나타나 유의하게 감소하였으며, MCV(midcytotoxicity value)값은 30 mU/ml GO에서 나타났다(Fig. 3).

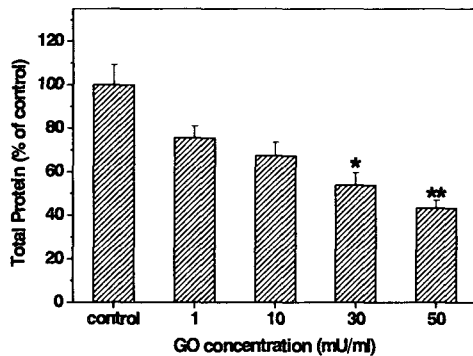


Fig. 3. Dose-dependency of glucose oxidase (GO) in total protein synthesis. Cultures mouse spinal sensory neurons were exposed to 1, 10, 30 and 50 mU/ml GO for 8 hours, respectively. Amount of total protein was measured by SRB assay(540nm), and shown as % of control. The results indicate the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ).

2) 총단백질 합성량에 대한 加味補中益氣湯의 영향

배양 척수감각신경세포에 대한 GO의 총단백질 합성량의 감소에 대한 加味補中益氣湯의 방어효과를 조사하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 30 mU/ml GO 농도에서 8시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15-140 ug/ml 加味補中益氣湯煎湯液이 각각 포함된 배양액에서 처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 GO만을 처리한 경우 총단백질 합성량의 변화는 GO를 처리하지 않은 대조군(100%)에 비하여 46.3%로 감소하여 세포독성으로 인한 총단백질 합성량의 감소를 나타냈다. 그러나 GO 처리에 앞서 가미보중익기탕 전탕액을 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 총단백질의 합성량이 증가하여 방어효과를 나타냈다. 특히 70 ug/ml, 140 ug/ml 加味補中益氣湯煎湯液을 전처리한 경우 대조군에 비하여 80.2%( $p<0.05$ ), 87.5%( $p<0.05$ )로 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 4).

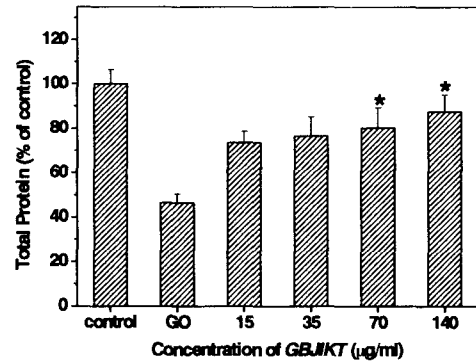


Fig. 4. Dose-dependency of Gamibojungikki-tang (GBJIKT) for its neuroprotective effect on glucose oxidase (GO) in total protein synthesis. Cultured cells were preincubated with 15, 35, 70 and 140 ug/ml GBJIKT for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 30 mU/ml for 8 hours. Amount of total protein was measured at wavelength of 540nm. The results indicate the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control group are marked with asterisks (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ).

고찰

신경조직에 손상이 발생되면 신경학적 증상이 나타나는데<sup>18-21</sup>, 이의 병태생리를 살펴보면 신경조직 손상에 따른 국소 뇌혈류의 감소로 인한 일련의 대사물질에 의해 산소자유기, 글루탐산 등의 독성물질이 생성되거나 침착되는데 이들의 상호작용에 의해 신경세포는 사망하게 되어 운동마비를 포함한 신경학적 증후를 나타내게 된다<sup>18-20</sup>. 특히 산소자유기는 중추신경계를 비롯하여 말초신경계에 영향을 미쳐 근위축성측삭경화증이나 파킨슨씨병과 같은 신경질환을 유발하는 병인으로 밝혀지고 있다<sup>21-23</sup>. 이러한 산소자유기에 대하여 한약재가 방어효과를 나타낸다고 보고되었다<sup>11-15</sup>. 補中益氣湯의 적응증은 脾胃氣虛로 인한 食少, 疲勞, 畏寒, 自汗, 發熱, 脈虛大無力, 中氣下陷, 內臟下垂 및 不能攝血崩漏 등으로<sup>1,2</sup>子宮 및 주위조직의 선택적 흥분작용, 장운동운동의 평형적조절, hydrocortosone으로 유발한 陽虛症에 미치는 영향 등에 대한 실험적 보고가 있다<sup>9,10</sup>. 이러한 補中益氣湯에 전신이 마비되는 氣虛證에 加味되는 木瓜, 烏藥, 香附子, 陳皮, 防風, 川芎, 桂枝를 加味한 加味補中

益氣湯을 검액으로 行氣通絡시키는 효능을 증가시켜 본 실험에 사용하였다.

본 실험은 Mihalis 등의 보고<sup>8)</sup>에 근거하여 GO를 처리하여 유발된 산소자유기가 세포에 독성을 나타내는지 MTT assay를 이용하여 관찰하였으며 加味補中益氣湯의 방어효과를 관찰하기 위하여 加味補中益氣湯 煎湯液을 배양 척수감각신경세포에 3시간 동안 전처리한 다음 GO에 8시간 동안 노출시킨 후 총단백질 합성량의 측면에서 관찰하였다. 또한, GO의 세포독성의 유발여부를 관찰하기 위하여 여러농도의 GO가 포함된 배양액에서 척수감각신경세포를 1-12시간 동안 배양한 후 MTT 분석법에 의하여 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 GO의 처리농도에 비례하여 유의하게 세포의 생존율이 감소하였다(Fig. 1-2). 특히 MTT 분석법에서 45 mU/ml GO에서 8시간 동안 처리에서 MCV값(midcytotoxicity value)이 나왔다. 그리고 GO의 산화적 손상에 대한 가미보중익기탕 전탕액의 효과를 조사하기 위하여 생쥐에서 순수분리하여 배양한 척수감각신경세포에 GO를 처리한 후 가미보중익기탕 전탕액의 효과를 총단백질 합성량의 측면에서 조사하기 위하여 SRB 분석을 한 결과 GO의 처리농도에 비례하여 감소하였으며 MCV는 30 mU/ml GO 처리에서 나타났다(Fig. 3). 한편 30 mU/ml GO를 8시간 동안 신경세포에 처리하기 전 15-140 µg/ml의 加味補中益氣湯 煎湯液이 각각 포함된 배양액에서 3시간 동안 처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 총 단백질양의 증가를 보였다. 특히 특히 70 ug/ml, 140 ug/ml 加味補中益氣湯 煎湯液의 처리에서는 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 4).

이같은 실험 결과를 종합해보면, 加味補中益氣湯 煎湯液이 GO와 같은 산소자유기의 산화적 손상에 의한 척수감각신경세포 독성에 대하여 효과적으로 방어하여 총단백질 합성량의 증가를 보여 주었다. 앞으로 이를 바탕으로 산소자유기의 산화적 손상에 대한 한약재의 방어효과를 기전적으로 연구한다면 catalase, glutathione과 같은 역할을 할 수 있는 항산화제의 개발도 가능하리라 사료된다.

## 결 론

加味補中益氣湯이 산소자유기에 의한 신경독성을 방어하는 효과를 구명하기 위하여 신생 흰쥐에서 분리 배양한 척수감각신경세포를 여러농도의 Glucose oxidase(GO)가 포함된 배양액에 加味補中益氣湯 煎湯液을 3시간 동안 전처리한 다음 加味補中益氣湯이 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 관찰하였다. GO는 척수 감각신경세포에 처리한 농도에 비례하여 세포의 생존율을 현저히 감소시켰으며 총단백질 합성량의 감소를 통하여 세포에 독성을 나타냈다. 加味補中益氣湯 煎湯液을 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 GO에 의하여 유발된 총단백질 합성량의 감소를 유의하게 방어하였다.

이상의 결과로서 GO는 신생백서로부터 분리한 배양 척수감각신경세포에 신경독성을 보였으며 加味補中益氣湯은 이러한 신경독성에 대하여 방어효과를 나타냄으로서 항산화제로서의 기능으로 연구될 수 있는 가능성을 보여주었다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2001-1-20500-018-1) 지원과 2001년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었음.

## 참고문헌

1. 鄭光油 : 東垣學說論文集, 北京, 人民衛生出版社, pp.13-24, 178-182, 1983.
2. 李東垣 : 東垣十種醫書, 서울, 大星文化社, p.467, 1983.
3. Williams PL, Burson JL : Industrial Toxicology. Van Nostrand Reinhold(eds.). pp.197-210, 1985.
4. Rosen D, Sidique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362:59-62, 1993.
5. Hussain T, Shukla GS, Chandra SV : Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats in vivo and in vitro studies. Pharm Toxicol 60:355-359, 1987.
6. Saez JC, Kessler JA, Bennett MVL, Spray DC : Superoxide dismutase protects cultured neurons against death by starvation. Proc Natl Acad Sci USA 84:3056-3059, 1987.
7. Warner BB, Wispe JR : Free radical-mediated diseases in pediatrics. Perinatol Seminar 16:47-57, 1992.
8. Mihalis P, Orestes T, Dimitrios G : Glucose oxidase-produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces Ca<sup>2+</sup>-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. Free Radical Biology & Medicine 26:548-556, 1999.
9. 金吉藍 : 운동부하후 피로회복에 미치는 補中益氣湯 및 六味地黃湯의 효과, 慶熙大學論文集 7:121, 1984.
10. 이태호 : 양허증유발에 의한 보중익기탕 및 육미지황탕의 효과, 동의병리학회지 2:12, 1987.
11. 김영수, 권강범, 민영기, 조현익, 박준배, 이호섭, 류도곤 : 장원환이 XO/HX에 의해 손상된 대뇌피질 신경세포에 미치는 영향. 대한한의학회지 20(4):3-10, 2000.
12. 양경석, 신선호 : 소풍활혈탕 전탕액이 XO/HX에 의해 손상된 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향. 대한한의학회지 21(1):29-39, 2000.
13. 최환석, 권강범, 이호섭, 류도곤 : XO/HX에 의해 손상된 배양 척수감각신경세포에 미치는 가미십전대보탕의 효과. 동의생리병리학회지 15(1):67-72, 2001.
14. 권영달, 정상필, 송용선, 류도곤 : 부자번하탕 전탕액이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 손상된 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 15(1):143-149, 2001.
15. 손창식, 권강범, 김상범, 이호승, 이호섭, 서은아, 류도곤 : 단삼음 전탕액이 심근세포 박동수에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 15(2):241-245, 2001.

16. Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 37:62~70, 1994.
17. Mosmann T., : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods*, 65:55-63, 1983.
18. 의학교육연구원 : 물리요법, 서울, 서울대학교출판부, pp.399-403, 1996.
19. 대한신경외과학회 : 신경외과학, 서울, 중앙문화사, pp.276-279, 284~285,299, 1997.
20. 이광우 외 : 임상신경학, 서울, 고려의학, 394-399,900-906, 1997.
21. 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.
22. 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.
23. 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.