

PC12 세포의 虛血모델에 있어 廣豆根 분획물의 항산화효과연구

조진환 · 김연섭*

경원대학교 한의과대학 해부경혈학

Protective Effect of Sophorae Subprostratae Radix and Each Fractions on PC12 cell Damage Induced by Hypoxia/Reperfusion

Jin Hwan Jo, Youn Sub Kim*

Department of Anatomy-Pointlogy College of Oriental Medicine, Kyungwon University

This research was performed to investigate protective effect of Sophorae subprostratae Radix and each fractions against ischemic damage using PC12 cells. To observe the protective effect of Sophorae subprostratae Radix on ischemia damage, viability and changes in activities of Superoxide dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx), Catalase and Production of Malondialdehyde (MDA) were observed after treating PC12 cells with Sophorae subprostratae Radix during ischemic insult. Groups were divided into five groups: no treated (Normal), hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h at normoxic chamber (H/R), Sophorae subprostratae Radix total phase treated group with H/R (Total), Sophorae subprostratae Radix water phase treated group with H/R (Water), Sophorae subprostratae Radix BuOH phase treated group with H/R (BuOH), Sophorae subprostratae Radix alkaloid phase treated group with H/R (Alkaloid). The results showed that (1) in hypoxia/reperfusion model using PC12 cell, the Sophorae subprostratae Radix has the protective effect against ischemia in the dose of 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (2) Sophorae subprostratae Radix increased the activities of glutathione peroxidase and catalase. (3) the activity of Superoxide Diamutase(SOD) increased by ischemic damage, which might represent the self protection. This study suggests that Sophorae subprostratae Radix has neuroprotective effect against neuronal damage following hypoxia/reperfusion cell culture model using PC12 cell and dose dependency effects. In conclusion, Sophorae subprostratae Radix has protective effects against ischemic oxidative damage at the early stage of ischemia.

Key words : Sophorae subprostratae Radix, SOD, catalase, GPx, MDA

서 론

허혈에 의한 뇌손상은 중추신경계와 관련된 사망원인 중 빈도가 가장 높다. 중추 신경계내 혈관의 손상 혹은 폐색에 의한 뇌허혈은 허혈의 정도 및 손상부위에 따라 치명적인 뇌손상을 일으키거나, 국소적인 뇌손상에 따른 장기적인 후유증을 남기게 된다¹⁾. 뇌허혈 상태에서 신경세포가 생존할 수 있는 시간이 극히 제한되어 있다는 사실 때문에 뇌허혈 급성기에 재관류를 위한 혈전용해제와 신경세포의 손상을 최소화시킬 수 있는 적절한 신경보호제의 개발이 뇌졸중 치료의 주된 관건으로서, 이를 위한 연구가 진

행되고 있다. 중추신경계의 허혈 상태는 뇌의 에너지대사를 감소시키고²⁾, 능동수송을 방해하며³⁾, 신경전달물질들의 비정상적인 방출을 일으킨다^{4,5)}. 또한 신경세포막에서 inositol phosphate의 대사 항진을 일으키며^{6,7)}, 신경세포 내 calcium 농도의 증가 및 유리지방산의 증가를 유발하고⁸⁻¹⁰⁾, free radicals의 생성을 촉진하며¹¹⁾, 뇌부종을 일으킨다¹²⁾. 중추신경세포 손상의 기전은 아미노산 글루타메이트의 과다한 방출 또는 글루타메이트 수용체의 과다한 흥분에 의한 흥분독성, 이온통로를 통한 칼슘의 세포 내 유입이 중요하다고 알려져 있다^{13,14)}. 최근에는 이러한 기전 외에 세포피사가 허혈성 뇌질환, 간질, 알츠하이머병 등 신경계질환의 신경 세포사에 관여되어 있다는 보고¹⁵⁾들이 증가하고 있다. 허혈성 뇌졸중은 한의학에서 中風의 범주에 포함되며, 痰證, 麻木의 범주에 속하여 이는 風·寒·濕 三氣가 인체의 허한 틈을 타고 肌表經絡을 침입하여 기혈운행이 순조롭지 못하고 막혀서 통하지 못

* 교신저자 : 김연섭, 경기 성남시 수정구 복정동 산65, 경원대학교 한의과대학

· E-mail : ysk@kyungwon.ac.kr · Tel : 031-750-5420

· 접수 : 2003/09/03 · 수정 : 2003/10/30 · 채택 : 2003/11/10

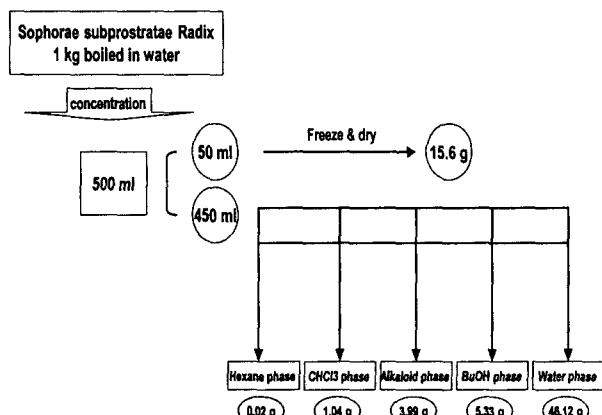
하는 상태를 말한다^{15,16)}. 중풍의 증상은 갑작스런 의식장애(暴仆, 不知人, 不省人事, 昏到, 昏不知人, 精神夢寐), 운동장애(偏枯, 四肢不遂, 半身不遂) 및 언어장애(舌強不語, 言語蹇澁) 등을 主症으로 하는 痘證이며, 이러한 중풍의 치료는 順氣, 利大小便, 割疾, 開竅, 祛風 등의 치법이 복합적으로 활용되어 왔다¹⁾.

광두근(Sophorae subprostratae Radix)은 콩과에 속한 낙엽지는 작은 관목인 광두근 (Sophora subprostrata Chun et T. Chen)의 뿌리와 뿌리줄기를 건조한 것으로 중국에서는 越南塊 (*S. tonkinensis* GAPNEP.)를 기원으로 한다. 한의학에서 清熱解毒, 消腫利咽의 효능으로 頭瘡熱毒, 喉中發癰, 肺癌 등의 증상에 사용되어온 약물이며 최근 초기의 咽頭癌과 肺癌에 일정한 치료 효과가 보고되어 왔다¹⁸⁾. 광두근의 성분 중 matrine은 안정적인 눈 염증치료제로 사용되어지며¹⁹⁾, 진통제로도 효과가 있고²⁰⁾ 심 혈관계에 작용하여 저혈압, 서맥증²¹⁾ 및 부정맥에¹⁹⁾ 효과가 있는 것으로 알려져 있고 protein kinase C(PKC)를 억제하여 뇌허혈 시 발생하는 부종을 감소시킨다²²⁾. 뇌부종은 뇌손상과 밀접한 관계가 있기 때문에^{24,25)} 광두근이 뇌허혈로 인한 뇌손상에 보호효과가 있을 것으로 생각되며, 이러한 광두근의 뇌손상을 보호하는 효과에 대한 실험으로는 중대뇌동맥 폐쇄 후 광두근을 경구투여한 실험에서 광두근이 대뇌피질에서 신경세포 수의 감소를 유의하게 억제하고, 신경세포의 위축을 유의하게 억제하는 효과를 나타낸다고 보고²⁵⁾된 바 있다. 이러한 보고를 바탕으로 중풍 치료제 개발을 위한 신경손상 보호효과를 지닌 활성성분을 찾아내고자 광두근을 광두근 분획전 추출출, 광두근 알카로이드층, 광두근 부탄올층 및 광두근 물층으로 나누어 신경세포의 특징을 나타내는 PC12 세포에 허혈 상태와 유사한 조건인 serum의 공급을 중단하고 광두근 추출물 주입에 따른 생존율, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase 및 malondialdehyde(MDA) 활성을 측정하여 신경세포보호효과를 항산화효과에 맞추어 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 약물의 조제 및 투여

실험에 사용된 광두근(Sophorae subprostratae Radix)은 경희대학교 부속한방병원 약재과에서 구입하였으며, 광두근 분획물의 추출은 광두근 1,000 g를 냉각기가 부착된 전탕기에서 2시간 동안 가열한 후 여과포로 여과한 여액을 갑암농축하여 농축액 500 ml를 얻었다. 농축액 중 50 ml는 동결건조하여 15.6 g의 분획전 추출물을 얻었다. 나머지 450 ml의 농축액의 분획 추출과정을 순서대로 서술하면, 맨 처음 헥산층(hexane phase), 이후 단계적으로 클로로포름층(CHCl₃ phase), 알칼로이드층(alkaloid phase), 부탄올층(BuOH phase) 및 물층(water phase)으로 분리하여 각각 0.02g, 1.04g, 3.99g, 5.33g, 46.12g를 얻었다. 광두근의 PC12 세포에 대한 실험은 광두근 분획전 추출출, 광두근 알카로이드층, 광두근 부탄올층 및 광두근 물층을 사용하였으며, 투여농도는 0.2 μg/ml, 2 μg/ml 및 20 μg/ml의 세가지로 나누어 시행하였다.



Schematic diagram of the extraction procedure of *Sophorae subprostratae Radix*.

2. Hypoxia/reperfusion에 의한 세포사멸에 미치는 영향

광두근의 신경보호효과에 대한 *in vitro* model로서 PC12 세포(American Type Culture Collection, U.S.A.)를 이용한 hypoxia/reperfusion model을 사용하였다. 배양액으로는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL, U.S.A.), 5% Fetal Bovine Serum (Gibco BRL, U.S.A.), 10% horse serum (Gibco BRL, U.S.A.), 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, U.S.A.)으로 구성된 것을 사용하였다.

저산소 환경은 세포를 hypoxic chamber내에 무산소 상태로 48시간 배양하여 유발하였고 직후 정상적인 배양기로 옮겨 6시간 동안 배양하여 재관류를 유발시켜, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) assay로 세포의 생존에 미치는 효과를 관찰하였다. PC12 cell을 96 well plate에 8×10⁴개 씩 seeding하고 24 시간 동안 37°C incubator (5% CO₂ humid atmosphere, Forma, U.S.A)에서 배양하였다. 배양 후 실험 약재를 phosphate buffered saline (PBS)에 녹여서 최종 농도가 0.2 μg/ml, 2 μg/ml와 20 μg/ml가 되도록 2시간 전에 전처리하였다. 2시간 후 세포를 hypoxic chamber (CO₂ 5%, H₂ 10%, N₂ 85%, Forma, U.S.A)에 넣어 무산소 상태로 48시간 배양하여 저산소 상태를 유발한 후 정상적인 CO₂ incubator로 옮겨 6시간 동안 배양하여 재관류를 유발하였다. 대조군으로 광두근 대신 PBS를 동량 넣어 주었고, hypoxic damage를 측정하기 위해서 같은 시간 동안 CO₂ incubator에 넣어 normoxia 상태를 유지시켜 주었다. Cell viability는 conventional MTT dye reduction assay를 사용하여 측정하였다. 재관류가 유발 된 후 각 well마다 MTT solution (final concentration, 1mg/ml)을 넣은 후 1시간 동안 37°C incubator에서 반응시켰다. 1시간 후 죽은 cell과 반응하여 생성된 formazan을 DMSO 150 μl 넣은 후 60°C incubator에서 10분간 녹인 후 ELISA reader로 570, 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 흡광도 값을 PBS를 투여한 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

3. 세포처리 및 단백질 정량

광두근의 신경보호효과에 대한 PC12 세포를 이용한 생화학

적 측정에 있어 hypoxia/reperfusion model의 조건은 위의 MTT assay와 동일하게 적용하였다. 배지는 산소와 serum 을 제거한 배지로, 뇌허혈과 비슷한 상태에서 세포를 배양하였다. 단백질 정량은 Bradford 방법²⁶⁾에 따라 측정하였다. Diluted dye 980 μl 에 sample 20 μl 를 반응시켜서 spectrophotometer 로 595 nm에서 OD 를 측정하였다.

4. SOD 활성 측정

SOD의 활성도 측정은 McCord 와 Fridovich의 cytochrome c 방법²⁷⁾을 이용하였다. 이 방법의 원리는 cytochrome c 가 superoxide radical에 의해 환원되는 반응이 SOD 활성에 비례하여 억제됨을 이용한 것이다. 이것은 ferricytochrome c 가 파장 550 nm 에서 최대의 흡광도를 나타내는 ferricytochrome c 로의 전환이 억제되어 생기는 흡광도의 차이를 이용한 방법이다. SOD 측정을 위한 반응액에는 50 mM 의 potassium phosphate buffer (0.1 mM EDTA를 포함, PH 7.8) 와 0.05 mM 의 xanthine, ferricytochrome c를 가하여 25 °C에서 10분간 항온 시킨 후, 조제된 효소액을 가하여 xanthine oxidase(XOD)의 첨가로 반응이 개시되었다. SOD 효소액을 넣기 전에 혼합액과의 반응에서 흡광도의 변화가 적어도 분당 0.025가 되도록 XOD 의 양을 조절하는 과정을 먼저 수행하였다. 흡광도의 변화는 550 nm에서 UV/Vis spectrophotometer (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Sweden)로 측정하였다. SOD 의 1unit은 550 nm 에서 흡광도를 측정하였을 때 cytochrome c 의 환원속도를 50% 억제하는 양으로 정하였다.

5. Catalase 활성 측정

Catalase의 활성도는 Hugo Abei 의 방법²⁸⁾에 따라 이 효소에 의해 H₂O₂가 H₂O와 O₂로 분해되는 원리를 이용하여 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer 에 19 mM H₂O₂인 반응액에 효소액을 가하여 20°C 240nm 에서 흡광도의 변화를 3분 간 10초 간격으로 측정하였다. Catalase 의 활성도는 1 분 동안에 1 mmol 의 H₂O₂를 분해 시키는 효소의 양을 1 unit 으로 하였다.

6. GPx 활성 측정

Glutathione peroxidase의 활성은 t-butyl hydroperoxide를 기질로 사용하여 NADPH의 산화정도를 측정한 Del Maestro와 McDonald의 방법²⁹⁾을 이용하였다. 각각의 sample에는 Assay buffer (900 μl + NADPH 50 μl + sample 50 μl + t-Bu-OOH 10 μl)을 넣고, blank에는 assay buffer (950 μl + NADPH 50 μl + t-Bu-OOH 10 μl)을 넣고, 340 nm 에서 2분 동안 10초 간격으로 측정하였다. Glutathione peroxidase의 활성도는 1분 동안 NADPH 1 μmol 이 산화되는 양을 1 unit 으로 정하였다.

7. MDA 활성 측정

과산화지질함량은 Ohkawa 등³⁰⁾의 방법을 이용하여 TBARS 법으로 측정하였으며, thiobarbituric acid (TBA)와 과산화지질이 반응하여 생성되는 malondialdehyde를 흡광도로 측정하는 방법

이다. Sample 200 μl 에 cold 10% TCA 를 400 μl 넣고 4°C 에서 10분 동안 원심분리 시킨 후, 상층액 500 μl 를 0.67% TCA 500 μl 와 섞어, 10분 동안 boiling 하고 532 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

8. 통계처리

실험결과의 분석은 PC12 세포실험의 경우 농도별 약물투여 군을 허혈 후 재관류 대조군과 각각 비교하는 Student's t-test를 사용하였다.

실험 성적

1. Hypoxia/reperfusion 에 의한 세포사멸에 미치는 영향

광두근 분획전 및 각각의 분획층들의 배양액내 양은 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 세가지 농도로 나누어 허혈후 재관류에 따른 세포생존에 미치는 효과를 관찰하였다. 실험결과 광두근 분획전 투여군의 경우 0.2, 2, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 108.21±5.98%, 158.40±21.62%, 172.61±25.21%를, .40±21.62%를, 광두근 알카로이드층 투여군의 경우 각각 127.55±23.01%, 124.50±20.77%, 143.61±12.06%를, 광두근 부탄올층 투여군의 경우 각각 101.52±8.89%, 108.53±10.12%, 94.74±6.36%를, 광두근 물층 투여군의 경우 각각 148.94±18.94%, 138.98±17.59%, 103.99±16.45%를 보였다(Fig. 1).

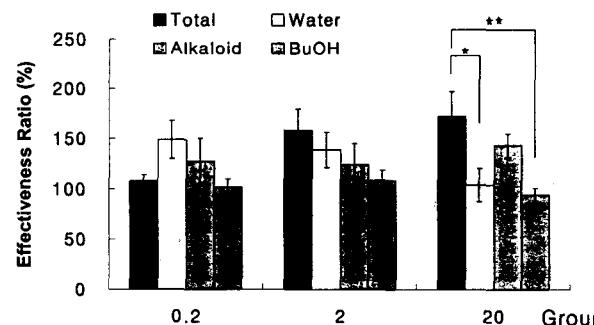


Fig. 1. Concentration dependent effect of *Sophorae subprostratae* Radix extract on ischemia induced by hypoxia/reperfusion model with PC12 cell. Total, *Sophorae subprostratae* Radix total phase treated group with H/R; Water, *Sophorae subprostratae* Radix water phase treated group with H/R; BuOH, *Sophorae subprostratae* Radix BuOH phase treated group with H/R; Alkaloid, *Sophorae subprostratae* Radix alkaloid phase treated group with H/R; H/R, hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h at normoxic chamber

2. SOD 활성에 미치는 영향

PC12세포에 대한 광두근 추출액 첨가의 경우 세포배양액 50 μl 에 대해 광두근 추출액 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 가한 후 SOD의 활성도에 미치는 효과를 관찰하였다.

SOD 활성도를 단백질 mg 당으로 나타내었을 때 H/R 대조군은 142.5±3.2 nitrite unit (NU)이었으며, 광두근 분획전 투여군의 경우 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 102.5±3.7 NU(P<0.01), 116.5±3.9 NU(P<0.01), 126.7±2.3 NU(P<0.05)를, 광두근 알카로이드층 투여군의 경우 149.5±1.9 NU, 134.7±2.1 NU, 109.4±2.5 NU(P<0.01)를, 광두근 부탄올층 투여군의 경우

135.2 ± 2.4 NU, 118.5 ± 1.9 NU($P < 0.01$), 133.8 ± 2.8 NU를, 광두근 물총 투여군의 경우 104.5 ± 2.3 NU($P < 0.01$), 108.7 ± 2.1 NU($P < 0.01$), 134.5 ± 1.9 NU를 나타내었다(Fig. 2).

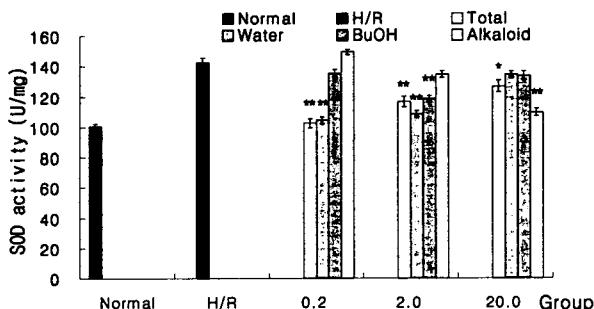


Fig. 2. Catalytic activities of superoxide dismutase (SOD). Enzyme activities are measured after treated with *Sophorae subprostratae Radix* at $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, $2 \mu\text{g}/\text{ml}$, and $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations. Normal, no treated; H/R, hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h at normoxic chamber; Total, *Sophorae subprostratae Radix* total phase treated group with H/R; Alkaloid, *Sophorae subprostratae Radix* alkaloid phase treated group with H/R; BuOH, *Sophorae subprostratae Radix* BuOH phase treated group with H/R; Water, *Sophorae subprostratae Radix* water phase treated group with H/R.

3. Catalase 활성에 미치는 영향

단백질 mg 당 catalase 활성도는 H/R 대조군이 68.4 ± 1.1 NU이었으며, 광두근 분획전 투여군의 경우 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 투여농도에서 각각 84.7 ± 2.7 NU($P < 0.01$), 91.3 ± 3.5 NU($P < 0.01$), 97.6 ± 1.7 NU($P < 0.01$)를, 광두근 알카로이드총 투여군의 경우 73.9 ± 3.7 NU, 74.3 ± 1.2 NU($P < 0.05$), 96.4 ± 2.3 NU($P < 0.01$)를, 광두근 부탄올총 투여군의 경우 75.6 ± 1.6 NU($P < 0.05$), 86.5 ± 1.4 NU($P < 0.01$), 65.2 ± 3.2 NU를, 광두근 물총 투여군의 경우 95.6 ± 2.3 NU($P < 0.01$), 88.8 ± 3.3 NU($P < 0.01$), 62.7 ± 3.8 NU를 나타내었다(Fig. 3).

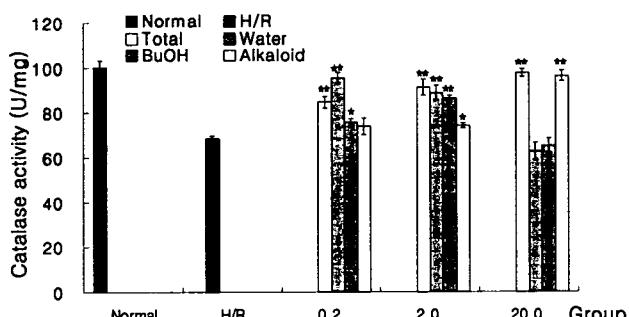


Fig. 3. Catalytic activities of catalase. Enzyme activities are measured after treated with *Sophorae subprostratae Radix* at $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, $2 \mu\text{g}/\text{ml}$, and $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations. Normal, no treated; H/R, hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h at normoxic chamber; Total, *Sophorae subprostratae Radix* total phase treated group with H/R; Alkaloid, *Sophorae subprostratae Radix* alkaloid phase treated group with H/R; BuOH, *Sophorae subprostratae Radix* BuOH phase treated group with H/R; Water, *Sophorae subprostratae Radix* water phase treated group with H/R.

4. GPx 활성에 미치는 영향

단백질 mg 당 GPx 활성도는 H/R 대조군이 32.6 ± 2.4 NU이었으며, 광두근 분획전 투여군의 경우 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 투여농도에서 각각 74.3 ± 2.1 NU($P < 0.01$), 79.8 ± 2.3 NU($P < 0.01$), 89.4 ± 3.0 NU($P < 0.01$)를, 광두근 물총 투여군의 경우 87.5 ± 2.7 NU($P < 0.01$), 72.4 ± 2.0 NU($P < 0.01$), 35.6 ± 2.5 NU를,

광두근 부탄올총 투여군의 경우 58.3 ± 3.5 NU($P < 0.01$), 69.3 ± 2.6 NU($P < 0.01$), 41.9 ± 1.7 NU($P < 0.05$)를 광두근 알카로이드총 투여군의 경우 54.2 ± 2.8 NU($P < 0.01$), 59.8 ± 2.1 NU($P < 0.01$), 84.5 ± 2.6 NU($P < 0.01$)를 나타내었다(Fig. 4).

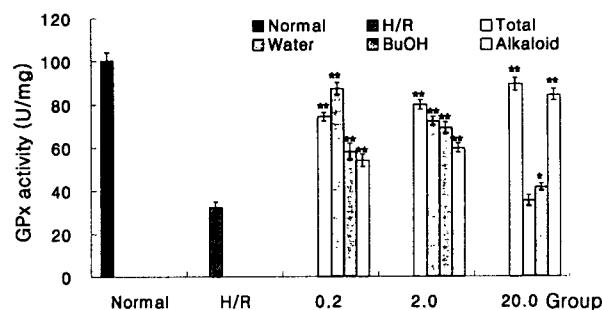


Fig. 4. Catalytic activities of glutathione peroxidase (GPx). Enzyme activities are measured after treated with *Sophorae subprostratae Radix* at $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, $2 \mu\text{g}/\text{ml}$, and $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations. Normal, no treated; H/R, hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h at normoxic chamber; Total, *Sophorae subprostratae Radix* total phase treated group with H/R; Alkaloid, *Sophorae subprostratae Radix* alkaloid phase treated group with H/R; BuOH, *Sophorae subprostratae Radix* BuOH phase treated group with H/R; Water, *Sophorae subprostratae Radix* water phase treated group with H/R.

5. MDA 활성에 미치는 영향

단백질 mg 당 MDA 활성도는 H/R 대조군이 125.4 ± 1.1 nmol 이었으며, 광두근 분획전 투여군의 경우 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 투여농도에서 각각 114.5 ± 2.5 nmol($P < 0.05$), 103.8 ± 1.6 nmol($P < 0.01$), 105.4 ± 1.2 nmol($P < 0.01$)을, 광두근 알카로이드총 투여군의 경우 114.5 ± 2.0 nmol($P < 0.01$), 123.5 ± 2.2 nmol, 105.7 ± 1.8 nmol($P < 0.01$)을, 광두근 부탄올총 투여군의 경우 114.3 ± 2.2 nmol($P < 0.01$), 109.5 ± 1.7 nmol($P < 0.01$), 128.9 ± 2.9 nmol을, 광두근 물총 투여군의 경우 103.2 ± 2.4 nmol($P < 0.01$), 116.5 ± 1.9 nmol($P < 0.05$), 123.8 ± 1.5 nmol을 나타내었다(Fig. 5).

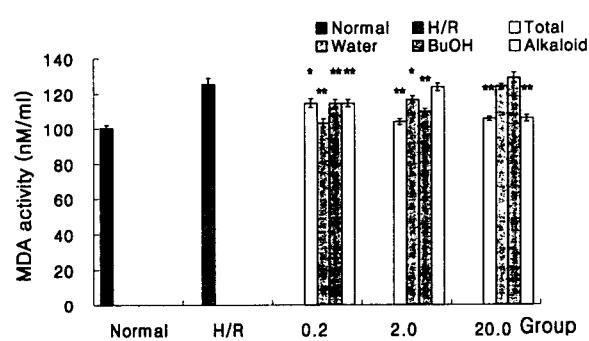


Fig. 5. Catalytic activities of malondialdehyde (MDA). Enzyme activities are measured after treated with *Sophorae subprostratae Radix* at $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, $2 \mu\text{g}/\text{ml}$, and $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations. Normal, no treated; H/R, hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h at normoxic chamber; Total, *Sophorae subprostratae Radix* total phase treated group with H/R; Alkaloid, *Sophorae subprostratae Radix* alkaloid phase treated group with H/R; BuOH, *Sophorae subprostratae Radix* BuOH phase treated group with H/R; Water, *Sophorae subprostratae Radix* water phase treated group with H/R.

고 칠

뇌동맥의 폐색으로 인한 혈관성 세포사의 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았으나 현재 계속 연구가 진행 중이며, 최근에는

허혈치료제의 개발과 관련하여 遲延性 細胞死에 관심이 모아지고 있다. 자연성 세포사란 허혈발생 후 즉각적으로 세포손상이 일어나는 것이 아니라 약 5-7일 정도의 세포사 지연이 일어나며 세포손상의 양상이 apoptosis와 비슷한 것을 말한다^{31,32)}. 허혈로 인한 뇌손상 발생 후 遲延性 細胞死의 시기에 신경방어효과를 가진 약물로 치료하면 신경세포의 퇴화를 막을 수 있으며³³⁾, 이는 허혈 발생 후 빠를수록 더욱 높은 효과²⁵⁾를 가지고 있다. 또한, 이미 중풍의 과거력이 있거나 고혈압, 당뇨병, 심장병 등의 위험인자를 가지고 있는 환자의 경우에는 이러한 약물로 예방효과를 도모할 수 있을 것이다. 뇌혈관 장애시 나타나는 뇌세포 손상은 허혈 상태에서 발생하는 활성산소에 의한 산화적 손상(oxidative stress)이 중요한 기전의 하나로 알려져 있으며, 신경계 질환에서 나타나는 세포고사의 경로에 활성산소가 중요한 매개체로 작용한다는 근거¹⁵⁾가 제시되고 있다.

활성산소에 의해 일어나는 세포고사는 개체 내에서 발생되는 생리적, 병리적 현상으로 유전적으로 조절되는 세포사 과정을 의미하며, 세포수준과 조직수준에서 항상성 조절에 중요한 역할³⁴⁾을 한다. 많은 신경계 질환의 증상 발현과 관련하여 중추신경세포의 고사가 주원인으로 작용하고 있으며, 중추신경세포들은 아주 민감하여 짧은 시간 동안의 허혈(ischemia)에 의하여 방출된 glutamate에 의해 흥분독성(excitotoxicity)이 이루어지는데¹³⁾ 흥분독성 이외에 직접적인 산화성 손상(oxidative stress)도 중추신경세포 고사의 중요한 기전의 하나로 논의되고 있다. 세포 내 활성산소의 생성이 증가하면 lipid peroxidation에 의한 membrane구조의 파괴, OH⁻에 의한 DNA손상, 이중결합구조를 포함하는 산화반응에 의한 단백질의 변성 등은 신경세포 고사의 원인이 될 수 있다^{15,34)}. 신경계 질환에서 보이는 신경세포 고사에 산화적 손상이 관여한다는 증거로는 허혈 후 활성산소의 생성 증가 및 항 산화제에 의한 허혈성 신경세포의 고사억제 효과, Parkinson's disease의 substantia nigra에서 Fe²⁺의 증가¹⁵⁾, glutathione의 감소^{35,36)}, catalase의 감소³⁷⁾, dopamine의 산화작용에 의한 활성산소의 생성¹⁵⁾ 등을 들 수 있다.

뇌허혈에 효능이 있다고 판정된 광두근 각각의 투여군의 세포생존에 미치는 효과를 비교해 본 결과, 광두근 분획전, 알카로이드총, 부탄올총 및 물총의 0.2 µg/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml의 투여농도에 따라 상이한 효과를 보인 것으로 나타났다. 세포사멸에 대한 가장 높은 효과를 보인 군은 광두근 분획전 투여군이었으며, 광두근 물총 투여군, 광두근 알카로이드총 투여군 및 광두근 부탄올총 투여군의 순으로 효과를 보였다. 특히 광두근 분획전 투여군과 광두근 물총 투여군은 20 µg/ml 농도에서 유의한 효과(각각 P<0.01, P<0.05)를 보여주었으며, 광두근 부탄올총 투여군의 경우는 모든 농도에서 효과가 없는 것으로 나타났다. 또한 광두근 부탄올총의 경우에는 20 µg/ml 농도에서 오히려 다시 세포사멸이 증가하여 PC12세포 보호효과가 일정 농도 이상에서는 독성으로 작용할 수 있음을 시사한다고 할 수 있다. 신경세포에서 꼭 필요로 하는 산소는 생존에 가장 필수적인 물질로 전자전달계의 최종 전자수용체가 되며, 여러 대사과정에 관여한다. 그러나 산소의 대사과정에서 생체에 독성을 나타낼 수 있는 중간

대사 산물들이 나타날 수 있다. 이러한 물질로는 superoxide radical (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (OH), singlet oxygen (O₂)등이 있으며, 이 중 superoxide radical은 산소분자에 전자 하나가 더 부가된 음이온 형태로서 oxygen radical독성의 중추적인 역할을 한다고 알려져 있다³⁸⁾. 이러한 oxygen free radical에 관한 연구는 1969년 McCord와 Fridovich²⁷⁾에 의해 superoxide dismutase(SOD)가 발견됨에 따라 활발하게 진행되었고, 그 후 다양한 질병과의 관계에 대해 수많은 연구가 진행되고 있으며, Halliwell과 Gutteridge³⁹⁾는 free radical이 모든 질병과 모든 독물의 작용과 깊은 관계를 가진다고 주장하였다.

최근에는 뇌경색, 뇌 외상 등과 같은 손상후의 뇌 기능 장애에 미치는 free radical의 역할이 주목을 받고 있다. Free radical은 허혈후 조직에 lipid peroxidation의 대사가 늘어나면서 증가하게 되어 specific membrane associated protein에 손상을 주고, 이렇게 손상 받은 membrane은 정상에서는 투과시키지 않던 물질들에 대한 투과성이 증가되어 궁극적으로 세포손상이 야기된다고 하였으며 뇌 손상 후 free radical이 내피세포와 혈뇌관문에 손상을 주고 직접 뇌 세포에 작용하여 뇌부종 및 뉴런, 신경교세포의 구조적인 변화를 초래한다고 주장하였다^{39,40)}. 특히 중추신경계는 세포막에 불포화지방산이 풍부하여 oxygen free radical에 의해 손상 받기가 쉬우며 free radical을 제거하는 SOD, Catalase, GPx등의 효소가 적고, 또한 free radical을 형성하는 iron이 풍부하여 free radical에 의한 신경세포 손상의 가능성성이 높은 것으로 보고되고 있다^{38,41)}.

Oxidative stress는 여러 가지 임상증상을 일으키는 뇌세포 손상에 중요한 원인으로 생각되어지고 있으며 최근 연구에 따르면 apoptosis를 통해 세포사를 유발하는 것으로 밝혀졌다^{34,40)}. 이에 두 번째 생화학적실험에서는 뇌세포를 손상시키는 free radical을 제거하는 SOD, Catalase, GPx등의 효소를 이용해 효소 활성도를 측정해보았다.

본 실험결과 SOD의 활성도는 H/R 대조군이 높아 허혈후 재관류에 의한 산소라디칼(O₂⁻)의 생성이 증가하여 산화적 스트레스 상태가 되었음을 나타낸다. 산소라디칼은 mitochondria에서 일어나는 산소대사과정 중 전자전달계로 전자가 이동되는 과정에서 산소분자가 효소를 통하지 않고 직접 전자 1개를 받음으로써 만들어지며 이차적으로 다른 산소라디칼도 생기게 된다⁴¹⁾. 이러한 산소라디칼이 증가하면 세포막에 손상을 입힐 수 있는데, mitochondria에서 생성된 산소라디칼의 대부분은 mitochondria 기질에 있는 SOD에 의해 제거되고 mitochondria에서 유리되어 나온 일부 산소라디칼은 cytosol에 있는 SOD에 의해 제거된다⁴¹⁾. 그러나 대사과정이 이루어지면서 산소라디칼은 계속적으로 생성되며 일부 제거되지 않은 산소라디칼이 지속적으로 세포에 손상을 가하게 되는데, 만약 허혈이 산화적 스트레스에 의해 발생하는 것이라면 허혈이 진행됨에 따라서 세내 자유라디칼의 생성이 증가하고 이에 대한 방어작용으로 항산화효소인 SOD의 활성도는 증가한다³⁸⁾. 허혈/재관류 상태에서는 인체의 뇌세포 손상에 치명적인 장애를 일으키는 superoxide radical이 증가하게 되며,

superoxide radical을 제거 시켜 생체를 보호하는 효소인 SOD, Catalase, GPx, MDA의 효소활성도가 감소하게 된다.

SOD의 경우는 허혈이나 재관류시에 normal에 비해 활성도가 높게 나왔는데 이는 허혈에서 생성된 superoxide radical의 제거를 위한 방어기전이라 생각하며, superoxide radical의 제거가 지속됨으로 활성도가 높은 상태를 유지하는 것으로 생각된다. 허혈/재관류 상태에서 광두근을 각각 여러 농도별로 처리했을 경우 투여농도에 따른 관찰결과 H/R 대조군에 비해 0.2 µg/ml 농도에서는 광두근 분획전 투여군이, 2 µg/ml 농도에서는 물총 투여군이, 20 µg/ml 농도에서는 알카로이드층 투여군이 가장 유의한(모두 P<0.01) 결과를 나타내었다. 특히 광두근 분획전층과 알카로이드층의 0.2 µg/ml 농도에서는 normal 군에 근접한 SOD 활성의 감소(모두 P<0.01)를 보였으며, 이후 투여농도의 증가에 따라 효과는 감소하는 것으로 나타났고, 알카로이드층과 부탄올층의 경우는 대조군에 비하여 효과가 유의하지 않았다. 따라서 광두근의 SOD 활성도에 미치는 효과는 광두근 물총투여군(평균 115.23 U/NU)이 광두근 분획전층 중 가장 유효한 성분으로 작용하는 것으로 사료된다.

Catalase의 활성도는 허혈/재관류시 normal에 비해 유의하게 낮았는데 이는 허혈 시 생성된 superoxide radical에 의해 catalase의 활성도가 억제된 것으로 생각된다⁴²⁾. 또한 허혈/재관류시 보다 광두근을 처리하였을 때 catalase의 활성도가 높았는데 이로써 광두근 추출액은 허혈/재관류로 인한 세포독성으로부터 세포를 보호하는 역할을 하며, catalase 효소 활성의 감소를 막는 것으로 밝혀졌다. 투여농도에 따른 관찰결과 0.2 µg/ml 농도에서는 광두근 물총 투여군이, 2 µg/ml 및 20 µg/ml 농도에서는 분획전 투여군이 가장 유의한 효과(모두 P<0.01)를 나타내었다. 분획전 투여군은 투여농도가 증가할수록 catalase 활성이 증가하고 물총의 경우에는 감소하였으며, 알카로이드층 투여군의 경우에는 20 µg/ml에서 높은 증가가 관찰되어 GPx 활성에서 보여준 결과와 비슷한 양상을 나타내었다.

GPx의 경우 H/R 대조군이 32.6 NU이었으며, 투여농도에 따른 관찰결과 0.2 µg/ml 농도에서는 광두근 물총 투여군이, 2 µg/ml 및 20 µg/ml 농도에서는 분획전 투여군이 가장 유의한 효과(모두 P<0.01)를 나타내었다. 분획전 투여군은 투여농도가 증가할수록 활성이 감소하는 물총 투여군과 대조되는 양상을 보였으며, 알카로이드층 투여군의 경우에는 투여농도의 증가에 따라 GPx 활성이 증가하였는데 특히 20 µg/ml에서 높은 증가가 관찰되었다. 광두근 추출물의 효과가 GPx 활성의 경우 SOD 활성에 비해 다른 점은 광두근 분획전층과 물총의 농도별 활성이 대조되는 것으로 물총의 경우에는 0.2 µg/ml 농도에서 가장 높은 효과(P<0.01)를 보인 반면 분획전층의 경우에는 20 µg/ml에서 효과가(P<0.01) 높은 것으로 나타났으며, 이는 알카로이드층의 20 µg/ml에서의 효과(P<0.01)로 인한 것으로 사료된다.

MDA의 경우 허혈/재관류시 normal에 비해 활성도가 높게 나타났다. 단백질 mg 당 MDA 활성도는 H/R 대조군이 125.4 nmol 이었으며, 투여농도에 따른 관찰결과 0.2 µg/ml 농도에서

는 광두근 물총 투여군이, 2 µg/ml 및 20 µg/ml 농도에서는 분획전 투여군이 가장 유의한 효과(모두 P<0.01)를 나타내어 normal 군에 근접한 효과를 보였다. 분획전 투여군은 투여농도가 증가할수록 MDA 활성이 감소하여 물총의 증가양상과 대조를 보였다. 분획에 따른 결과를 보면 부탄올층 투여군의 경우 2 µg/ml 농도에서 가장 유의한 효과(P<0.01)를, 알카로이드층 투여군의 경우에는 20 µg/ml에서 가장 유의한 효과(P<0.01)를 나타내었다. 따라서 MDA 활성에 미치는 광두근 분획전층의 효과는 0.2 µg/ml 농도에서는 물총이, 2 µg/ml 농도에서는 부탄올층이, 20 µg/ml 농도에서는 알카로이드층이 영향을 미치는 것으로 SOD, Catalase 및 GPx 활성에 미치는 영향에 비해 각 층들이 농도별로 다르게 기여하는 것으로 생각된다.

따라서 SOD, Catalase, GPx, MDA등의 효소는 각종 Superoxide radical에 의해 일어날 수 있는 산소독성 효과를 없애고 허혈을 회복하려는 역할을 하는 것으로 생각되며, 이러한 결과들은 광두근이 허혈로 유발된 뇌손상에 방어 효과가 있음을 보여주고 있으며, 광두근 각각의 추출물 중 물총 투여군이 가장 높은 효과를 갖는 것으로 보이며 앞으로 물총에 있어 활성성분으로서의 지표물질 탐색의 연구기반이 될 것으로 사료된다.

결 론

광두근 및 광두근 분획물들이 뇌허혈 초기에 신경세포손상에 미치는 방어효과를 확인하기 위하여 PC 12세포의 허혈모델을 이용 광두근 분획전, 알카로이드층, 부탄올층 및 물총 투여에 따른 농도별 생존율, SOD assay, catalase, GPx 및 MDA 활성을 비교 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

허혈후 재관류에 따른 PC12 세포의 사멸에 미치는 효과를 관찰한 결과 광두근 분획전 투여군이 20 µg/ml 농도에서 유의한 효과(P<0.01)를 나타내었다. SOD 활성에 있어 0.2 µg/ml 농도에서는 광두근 분획전 투여군이, 2 µg/ml 농도에서는 물총 투여군이, 20 µg/ml 농도에서는 알카로이드층 투여군이 가장 유의한 효과(모두 P<0.01)를 나타내었으며, 분획전 투여군과 물총 투여군의 경우는 투여 농도가 증가할수록 SOD 활성이 감소하는 효과를 나타내었다. Catalase 활성도를 관찰한 결과 0.2 µg/ml 농도에서는 광두근 물총 투여군이, 2 µg/ml 및 20 µg/ml 농도에서는 분획전 투여군이 가장 유의한 효과(모두 P<0.01)를 나타내었으며 농도증가에 따른 양상이 GPx 활성 결과와 유사한 효과를 나타내었다. GPx 활성의 경우 0.2 µg/ml 농도에서는 광두근 물총 투여군이, 2 µg/ml 및 20 µg/ml 농도에서는 분획전 투여군이 가장 유의한 효과(모두 P<0.01)를 나타내었다. 분획전 투여군 알카로이드층 투여군은 투여농도가 증가할수록 GPx 활성이 증가하여 농도가 증가할수록 활성이 감소하는 물총 투여군과 대조되는 양상을 보였다. MDA 활성에 있어서는 0.2 µg/ml 농도에서는 광두근 물총 투여군이, 2 µg/ml 및 20 µg/ml 농도에서는 분획전 투여군이 가장 유의한 효과(모두 P<0.01)를 나타내었다. 분획전 투여군은 투여농도가 증가할수록 MDA 활성이 감소하여 물총의 증가 양상과 대조를 보였으며, 부탄올층 투여군의 경우 2 µg/ml 농도

에서, 알카로이드층 투여군의 경우에는 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 가장 유의한 효과($P<0.01$)를 나타내었다.

이러한 결과 광두근 분획전 및 분획물이 허혈후 재관류에 따른 PC12 세포에서의 세포사멸보호효과 및 산화작용에(stress)에 의한 세포독성을 억제하는 효과가 있는 것으로 인정된다.

참고문헌

1. 김영석. 임상증증학. 서울 : 서원당. p.303-329, 1997.
2. Kauppinen RA, Nicholls DG. Failure to maintain glycolysis in anoxic nerve terminals. *J Neurochem*, 47:1864-1869, 1986.
3. Blaustein MP. The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 70:33-82, 1974.
4. Benveniste H, Drejer J, Scyhousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem*, 43:1369-1374, 1987.
5. Ogura K, Shibuya M, Kanamori M. Changes of monoamine neurotransmitter metabolism in brain ischemia measured by in vivo voltammetry. *Brain Nerve*. 40:87-93, 1988.
6. Abe K, Kogure K, Yamamoto H. Mechanism of arachidonic acid liberation during ischemia and gerbil cerebral cortex. *J Neurochem*. 48:503-509, 1987.
7. Strosznajder J, Wikiel H, Sun GY. Effects of cerebral ischemia on [³H]inositol lipids and [³H]inositol phosphates of gerbil brain and subcellular fractions. *J Neurochem*. 40:943-948, 1987.
8. Ikeda M, Yoshida S, Bustos R. Polyphosphoinositides as a probable source of brain free fatty acids accumulated at the onset of ischemia. *J Neurochem*. 47:123-132, 1986.
9. Noremberg K, Strosznajder J. Modification of GABA and calcium uptake by lipids in synaptosomes from normoxic and ischemic brain. *Neuropharmacology*. 8:59-66, 1986.
10. Yanagihara T, McCall JT. Ionic shift in cerebral ischemia. *Life Sci*. 30:1921-1925, 1982.
11. Kiyota Y, Pahlmark K, Memezawa H, Smith M, Siesjo BK. Free radicals and brain damage due to transient middle cerebral artery occlusion: the effect of dimethylthiourea. *Exp Brain Res*. 95:388-396, 1993.
12. Uenohara H, Imaizumi S, Yoshimoto T, Suzuki J. Correlation with lipid peroxidation, brain energy metabolism and edema. *Brain Nerve*. 39:205-212, 1987.
13. Drejer J, Benveiste H, Diemer NH, Schousboe A. Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *J Neurochem*. 45:145-151, 1985.
14. Szatkowski M, Attwell D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurol Sci*. 17:359-365, 1994.
15. Foy CJ, Passmore AP, Vahidassar MD, Young IS, Lawson JT. Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease, *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*. 92:39-45, 1999.
16. 김상수, 고성규, 조기호, 김영석, 배형섭, 이경섭. 비증에 관한 동서의학적 고찰. *한방내과학회지*. 15(1):116-127, 1994.
17. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:남산당. 359-361, 1994.
18. Kojima R, Fukushima S, Ueno A, Saiki Y. Antitumor activity of Leguminosae plants constituents. I. Antitumor activity of constituents of *Sophora Subprostrata*. *Chem Pharm Bull*. 18(12):2555-2563, 1970.
19. Chuang CY, Xao JG, Chiou GC. Ocular anti-inflammatory action of matrine. *J Ocul Pharmacol*. 3:129-134, 1987.
20. Kamei J, Xiao P, Ohsawa M, Kubo H, Higashiyama K, Takahashi H, Li J, Nagase H, Ohmiya S. Antinociceptive effects of (+)-matrine in mice. *Eur J Pharmacol*. 337(2-3):223-226, 1997.
21. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1:623-634, 1988.
22. Hu ZL, Tan YX, Zhang JP, Qian DH. Effects of inhibitor of protein kinase C on brain edema formation evoked by experimental cerebral ischemia in gerbils and rats. *Yao Xue Xue Bao*. 31(12):886-890, 1996.
23. Betz AL, Keep RF, Beer ME, Ren XD. Blood-brain barrier permeability and brain concentration of sodium, potassium, and chloride during focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 14:29-37, 1994.
24. Karibe H, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR. Mild intraischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 14(4):620-627, 1994.
25. 이현삼, 정혁상, 강철훈, 손낙원. 廣豆根이 白鼠 中大腦動脈閉鎖에 의한 局所腦虛血損傷에 미치는 保護效果. *대한한의학회지*. 20:68-78, 2000.
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-254, 1976.
27. McCord JM, Fridovich LJ. *Biol. Chem*. 244:6049-55, 1969.
28. Hugo A. Catalase in vitro. *Methods in enzymatic analysis*. 673-84, 1984.
29. Maestro RD, McDonald W. Oxidative enzymes in tissue

- homogenate. CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. 291-6, 1985.
30. Ohkawa H, Ohishi K, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 95:351-8, 1979.
 31. Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J cerebr Blood Flow Metab*. 16:195-201, 1996.
 32. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*. 239:57-69, 1982.
 33. 吳延煥. 清肺瀉肝湯이 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류에 미치는 영향. 東國大學校大學院 韓醫學科(박사학위논문). 2000.
 34. Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol*. 34:609-616, 1993.
 35. Harding JJ, Blakytny R, Ganea E. Glutathione in disease. *Biochemical Society Transactions*. 24:881-884, 1996.
 36. Griffith OW. Glutathione and glutathione disulphide. *Methods in Enzymatic Analysis*. 8:521-529, 1985.
 37. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiological Reviews*. 50:319-375, 1970.
 38. Xiao XQ, Wang R, Han YF, Tang XC. Protective effects of huperzine A on beta-amyloid(25-35) induced oxidative injury in rat pheochromocytoma cells. *Neurosci Lett*. 286(3):155-158, 2000.
 39. Halliwell B, Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molecular Aspects of Medicine*. 8:89-193, 1985.
 40. Islekel H, Islekel S, Guner G, Ozdamar N. Evaluation of lipid peroxidation, cathepsin L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia reperfusion. *Brain Res*. 843:18-24, 1999.
 41. Hussain S, W slikker, Ali SF. Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int J Devl Neurosci*. 13:811-817, 1995.
 42. Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem*. 257:5751-5754, 1982.