

# 加味地黃丸이 低酸素性 神經細胞 손상에 미치는 영향

백은경 · 주성민 · 김근중 · 김대근 · 강정호 · 이영찬 · 이 준 · 김영목 · 전병훈\*

원광대학교 한의과대학 병리학교실

## Influence of Kamijihwang-hwan on the Hypoxic Damage of Cultured Cerebral Neurons from mouse and SK-N-MC cells

Baek Yeun Kyung, Sung Min Ju, Kun Jun Kim, Dae Keun Kim, Jeong Ho Kang, Young Chan Lee, Jun Lee, Young Mok Kim, Byung Hun Jeon\*

*Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University*

To elucidate the neuroprotective effect of Kamijihwang-hwan(KSH) on nerve cells damaged by hypoxia, the cytotoxic effects of exposure to hypoxia were determined by XTT, NR, MTT and SRB assay. The activity of catalase and SOD was measured by spectrophometry, and TNF- $\alpha$  and PKC activity was measured after exposure to hypoxia and treatment of Kamijihwang-hwan(KSH) water extract(KJHWE). Also the neuroprotective effect of KJHWE was researched for the elucidation of neuroprotective mechanism. The results were as follows ; Hypoxia decreased cell viability measured by XTT, NR assay when cultured cerebral neurons were exposed to 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> for 2~26 minutes in these cultures and KJHWE inhibited the decrease of cell viability. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment decreased cell viability measured by MTT, and SRB assay when cultured cerebral neurons were exposed to 1-80  $\mu$ M for 6 hours, but KJHWE inhibited the decrease of cell viability. Hypoxia decreased catalase and SOD activity, and also TNF- $\alpha$  and PKC activity in these cultured cerebral neurons, but KJHWE inhibited the decrease of the catalase and SOD activity in these cultures. Hypoxia triggered the apoptosis via caspase activation and internucleosomal DNA fragmentation. Also hypoxia stimulate the release of cytochrome c from mitochondria. KJHWE inhibited the apoptosis via caspase activation induced by hypoxia. From these results, it can be suggested that brain ischemia model induced hypoxia showed neurotoxicity on cultured mouse cerebral neurons, and the KJHWE has the neuroprotective effect in blocking the neurotoxicity induced by hypoxia in cultured mouse cerebral neurons.

**Key words :** Kamijihwang-hwan(加味地黃丸), hypoxia, cerebral neuron, SK-N-MC

### 서 론

우리 나라의 정신지체 인구는 전체인구의 1%가 넘고, 이 중 재가(在家) 정신지체인의 출현율은 인구 천명당 2.67건이며 이중 73.6%가 언어능력에 장애를 가지고 있다<sup>33)</sup>. 이들 정신지체아동의 상당수는 신체발육이 지연됨과 동시에 사회적응의 미숙 및 고등 사고의 발달부전 양상을 보인다<sup>38)</sup>. 이 질환에 대한 서양의학적 치료는 특수교육을 조기에 받도록 권하거나, 정신지체아동의 가족 이 겪을 위기를 돕는 상담자로서의 역할이 대부분이며 뚜렷한

약물치료가 없는 실정이다<sup>38)</sup>. 한의학에서는 발달이 지연되는 五 運의 원인을 신기부족(腎氣不足) 혹은 부모로부터 받은 기혈(氣 血)의 허약으로 간주하며, 加味地黃丸으로 영혈(榮血)을 자양(滋 養)하고 보중익기탕(補中益氣湯)으로 조보익기(助補益氣)하는 치 법과 처방을 선용한다<sup>39)</sup>. 加味地黃丸에 대한 최근의 연구에 따 르면 in vivo에서 뇌신경세포가 유의하게 증가되며, 알코올로 손상 된 신경세포에 대해서도 유의성 있는 생성효과가 있었다<sup>35,36)</sup>.

정신지체를 야기하는 주산기 요인에는 조산아로 태어나거나 저체중일 경우 및 분만중에 두개골내의 출혈이 있거나 뇌허혈이 있는 경우가 대표적이며, 특히 출혈이나 허혈의 정도는 인지적인 기능의 저하정도와 밀접한 관련이 있다<sup>41)</sup>. 최근에 뇌허혈을 비롯 한 중풍 및 치매와 같은 뇌의 퇴행성 질환에 산소유리기가 관여

\* 교신저자 : 전병훈, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학  
· E-mail : omdjbh@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-8506843  
· 접수 : 2003/04/29 · 수정 : 2003/06/20 · 채택 : 2003/07/28

한다는 것이 밝혀지면서 뇌허혈을 비롯한 여러 가지 신경의 퇴행성 병변의 기전을 산소유리의 산화적 손상측면에서 규명하려는 연구가 많이 진행되고 있다<sup>1-3,5,11,12,21</sup>.

이에 저자는 가미지황환의 신경세포보호효과를 알아보고자 한다. 연구에 사용된 신경세포는 흰쥐의 대뇌신경세포를 배양한 것으로 일정시간 저산소증에 노출시켜 *in vitro* 허혈 상태를 유도하여 신경세포독성을 발생시켰다. 또한 산소유리의 일종인 Hydrogen peroxide로 유발되는 독성효과와 이들에 대한 가미지황환의 세포보호효과를 분석하였다. 가미지황환의 신경세포보호 효과에 대하여 XTT, NR, MTT, SBR assay 와LDH 측정, catalase 및 SOD 등의 항산화효소의 측정, 그리고 TNF- $\alpha$ 와 PKC 활성을 측정하였으며, 세포고사에 관련된 효과 및 기전 연구를 통하여 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 약재

본 실험에 사용한 동물은 ICR 계통의 건강상태가 양호한 생후 3 일 된 생쥐를 사용하였다. 加味地黃丸의 처방은 東醫寶鑑에 근거하였으며, 1 첩의 분량을 기준으로 하였다.

Table 1. Prescription of Kamijihwang-hwan

藥物名	生藥名	學名	用量(g)
熟地黃	Rehmanniae Radix	Rehmannia glutinosa var. purpurea Makino.	15.00 g
山藥	Dioscoreae Radix	Dioscorea batatas Decne.	7.50 g
山茱萸	Corni Fructus	Cornus officinalis Sieb. et Zucc.	7.50 g
澤瀉	Alismatis Rhizoma	Alisma orientale (Sam.) Juz.	5.60 g
牡丹皮	Moutan Cortex	Paeonia suffruticosa Andr.	5.60 g
白茯苓	Poria	Poria cocos Wolf	5.60 g
五味子	Fructus Schisandrae	Schisandra Chinensis	7.50 g
鹿茸	Cornus Cervi Parvum	Cervus nippon Temminck	3.75 g
Total amount			58.05 g

### 2. 검액의 조제

검액의 조제를 위하여 加味地黃丸의 구성 성분 100 g을 증류수 1,000 L와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2 시간 동안 전열기로 전탕한 후 전탕액을 3,000 rpm에서 20 분 간 원심분리하고 여과지로 여과하고, 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 24 시간 동결건조하여 분말 시료를 얻었다. 수율은 약 12% 였다.

### 3. 약제 제조

본 실험에 사용한 약제로는 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk), XTT (Sigma), NR (Sigma), trypsin(Sigma) 등은 각각 증류수에 녹여 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다. 加味地黃丸 추출물의 투여는 분말을 증류수에 녹여 0.22  $\mu$ m의 micropore filter를 이용하여 멸균하여 사용하였다.

### 4. 세포배양

대뇌신경세포의 분리는 Kim 등의<sup>18,19</sup> 방법에 따라 시행하였다. 즉, 생후 3 일 된 생쥐에서 적출한 뇌조직을 trypsin을 이용한 해리술에 의하여 분리한 다음 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하였다. 세척완료 후 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)으로 3 회 세척 후 분리된 세포들은 poly-L-lysine (Sigma)으로 코팅된 96-multiwell에  $3 \times 10^6$  cells /well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 36 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air로 조절된 정온기 내에서 배양하였으며 3 일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7 일 동안 배양 후 본 실험에 사용하였다. 또한 SK-N-MC 세포는 37 $^{\circ}$ C, 습도 CO<sub>2</sub> 5%, 95% air, FCS 10%의 DMEM에서 유지시켰다.

### 5. 虛血 誘導

허혈유도를 위하여 세포를 glucose-free Hanks' balanced salt solution (HBS, Gibco)으로 교환후 95% nitrogen/5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기 내에서 일정시간 동안 노출시킨 후 허혈을 유도하였다. 대뇌신경세포나 SK-N-MC 세포가 80 % 차게될 때 세포는 자유산소를 제거하기 위해 혐기성 glove cabinet이 봉해져 있는 습도가 있는 37 $^{\circ}$ C incubator에 5% CO<sub>2</sub>와 N<sub>2</sub> 균형상태에서 배양했다. 산소농도는 blood gas analyzer로 측정하였으며, chamber 내의 산소 농도는 배양 기간 동안 10 ppm 이내로 유지했으며, 반면 medium 의 산소분압은 hypoxic chamber 로 옮긴 후 15 분, 30 분, 1 시간, 6 시간, 48 시간에서 4.3, 3.0, 2.2, 2.0 그리고 2.0 $\pm$ 0.2% 까지 각각 떨어지는 상태를 유지했다.

### 6. 산소유리기 처리

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 생쥐의 척수운동신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정 시간 배양한 척수운동신경세포를 0.6% D-glucose가 함유된 MEM으로 3 회 세척한 다음 10~80  $\mu$ M을 여러 농도로 조합하여 혼합한 다음 이들 각각의 배양액에서 1-12 시간 동안 처리한 후 분석하였다.

### 7. 허혈의 세포독성 측정 및 加味地黃丸추출물의 방어효과 분석

#### 1) XTT, NR, MTT, SRB, LDH 측정

XTT의 정량을 위하여 뇌허혈이나 한약추출물을 처리한 배양 대뇌신경세포를 PBS로 3 회 세척한 후 전날 제조한 3 mg/ml 의 XTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양이 완료된 후 이를 DMSO로 처리한 다음 spectrophotometer로 530 nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교 조사하였다. NR의 정량은 Mosmann<sup>7</sup>의 방법에 따랐다. 즉 허혈이나 한약추출물을 처리한 배양 대뇌신경세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3 회 세척 후 전날 제조한 5 mg/ml의 NR을 well 당 최종 농도로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 PBS로 3 회 세척후 1% formalin으로 처리한 다음 spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 정량은 Mosmann<sup>7)</sup>의 방법에 의하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>나 약재추출물을 처리한 배양 신경세포를 PBS로 3 회 세척한 후 전날 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well 당 최종농도로 희석하여 넣어 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk)를 처리한 다음 spectrophotometer 로 590 nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교 조사하였다. 산소유리거나 한약재 추출물로 일정시간 동안 처리한 척수운동신경세포에 0.4% sulforhodamine B를 200 µl씩 첨가하여 1 시간 동안 실온에 방치한 다음 1.0% acetic acid로 3 회 세척하였다. 세척 완료후 10 mM Tris base를 이용하여 SRB-bound protein을 녹인 후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다. LDH 활성은 200 mM Tris-HCl buffer, 1.5 mM NAD, 0.32 mM HCl과 시료를 혼합한 후 37°C에서 5 분 동안 처리한 다음 0.1 N HCl을 넣어 잘 혼합한다. 혼합 후 반응이 완료된 다음 500 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

#### 2) catalase 및 SOD 활성 측정

catalase 활성의 분석은 130 mM phosphate buffer(pH 7.0)와 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 구성된 반응액에 효소액을 40 µl를 가하여 잘 혼합하였다. 혼합 완료 후 반응을 정지시킨 후 catalase의 양적변화를 흡광광도계로 240 nm에서 측정을 하였으며 효소의 활성은 백분율로 환산하였다. 허혈이나 한약추출물에 대한 SOD 활성의 측정은 1.5 ml Tris-buffer에 0.1 ml 효소용액과 효소 반응액을 넣고 25°C에서 10 분 동안 반응시켰다. 반응완료 후 0.05 ml 1N-HCl을 가하여 잘 혼합한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

#### 3) TNF-α 및 PKC 활성 측정

저산소나 한약추출물을 일정 시간 동안 처리한 대뇌신경세포에서 TNF-α 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대뇌신경세포를 일정 시간 동안 처리한 후 anti-rabbit TNF-α와 phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG 및 2,2'-azinobis를 처리한 다음 450 nm에서 정량 분석하였다. 또한 저산소나 한약추출물을 일정 시간 동안 처리한 대뇌신경세포를 변형된 Hu 등<sup>26)</sup>의 방법에 따라 분석하였다. 세포를 냉각한 PBS로 세척하고 0.5 ml 의 냉각한 hypotonic lysis medium (1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 100 µM phenylmethyl sulfonyl fluoride)에 2 분 동안 현탁하고 다시 2 분 동안 vortexing하여 용해시킨다. 이러한 반응은 4°C 하에서 실시한다. 핵과 용해되지 않은 세포는 600 × g에서 5 동안 침전시킨다. membrane과 cytosol 분획은 100,000 × g에서 10 분 동안 초원심분리(Beckman TL-100 ultracentrifuge)한다. 막의 PKC 활성은 MARCKS protein에 특이적인 PKC-인산화에 해당하는 peptide substrate인 Ac-FKKSFKL-NH<sub>2</sub>을 이용하여 측정하였다. 이 기질 peptide는 모든 주요한 PKC isoforms 에 의해 동등하게 인산화되는 것으로 밝혀졌다. assay를 위한 반응액에는 assay buffer[50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM CaCl<sub>2</sub>, 100 µM sodium vanadate, 100 µM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium fluoride, and

100 µM phenylmethylsulfonyl fluoride]에 3-8 µg의 단백질을 포함하는 20-50 µl의 membrane suspension 용액과 10 µl의 750 µM PKC 기질 peptide (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)를 가하고 총 용량을 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 90 µl가 되게 최종적으로 조정하였다. 반응은 10 µl의 500 µM [32P]ATP (220 cpm/pmol in Tris buffer; 0.5 mCi/tube)로 시작하여, 25 °C에서 10 분 동안 반응하고, 10 µl의 5% acetic acid로 반응을 정지시켰다. 반응액을 16,000 × g에서 5 분 동안 원심분리하였다. 90 µl의 상층액을 P81 Whatman paper에 옮기고 건조하였다. 그것을 5% acetic acid로 10 분 동안 가볍게 stirring 하여 세척하였다. P81 종이에 부착한 radioactivity는 섬광계수기에 의하여 측정하였다. 기질 peptide에 환합된 radioactivity를 계산하기 위하여 비특이적 결합은 peptide가 없는 상태의 결과로서 결정하였다.

#### 4) DNA 분절현상

세포들은 PBS로 세척하고, lysis buffer(10mM Tris-HCl; pH7.4, 5mM EDTA, 0.5% Triton X-100)를 이용하여 4°C에서 20 분 간 용해시킨 후 4°C에서 15 분 간 27000×g 에서 원심분리 하였다. 상층액의 DNA는 페놀, 페놀/클로로포름(1:1,v/v), 그리고 클로로포름의 세 단계로 추출되었다. 그리고 DNA는 0.1 vol. 3M sodium acetate (pH 5.2)와 2 vol. ethanol로 침전되었다. DNA는 TE buffer( 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA)로 용해하였고 37°C에서 1 시간 동안 40 µg/ml RNase A를 처리했다. DNA 농도는 260 nm 에서 흡광도로 확인하고, 20 mg DNA를 TAE buffer(40mM Tris-Hcl; pH 8.5, 2mM EDTA)로 1.5% gel 상에서 전기 영동 하였다. 전기영동 후 15 분 간 0.5 mg/ml ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator를 통하여 확인하였다.

#### 5) 형태학적 변화

DNA의 염색은 5 × 10<sup>5</sup> 개의 세포를 2 µg/ml DAPI (Sigma)로 30 분 동안 37°C에서 시행하고, 형광현미경으로 관찰하였다. DAPI 염색은 원형질막을 투과하여 염색체를 푸르게 염색한다. 살아있는 세포는 정상적인 핵 크기와 푸른 형광을 보이고, 반면에 세포고사가 일어난 세포는 응축된 염색체와 분절된 핵을 관찰할 수 있다.

#### 6) caspase 활성 측정

SK-N-MC 세포는 60 mm plates 에서 지정된 시간 동안 저산소증 상태의 챔버에서 배양되었다. 저산소증 처치 후 배양액을 제거하고 세포를 PBS로 씻은 후 50 µl lysis buffer( 50mM Tris-HCl; pH7.4, 1mM EDTA, 10 mM digitonin)을 첨가했다. 그 세포들을 37°C에서 10 분 간 배양했다. 배양 후, 부유물을 10 분 간 15,000 rpm에서 원심분리했다. 다음으로 분리한 lysate (50 µg protein)를 30 분 간 50 uM Ac-DEVD-MCA나 60 분 간 Ac-YVAD-MCA 와 함께 배양했다. 분비된 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) 의 양은 380 nm 에서 excitation 하고 460 nm에서는 emission 하는 spectrofluorometer 를 이용하여 측정했다. 한 단위는 37°C에서 분당 AMC 1 pmol 분비하는 것을 효소 요구량으로 정의되었다.

#### 7) Western Blot 측정법

5×10<sup>5</sup> 세포를 냉각된 PBS로 두 번 씻고, buffer A 500 μl (50 mM Tris; pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM sucrose, 2 mg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, and 1 mg/ml pepstatin)를 첨가 했다. 세포들은 Dounce homogenizer를 이용하여 분쇄하였으며, 분쇄물은 초원심분리에 의해 cytosol과 membrane 조각으로 분리되었다. 분해물과 membrane은 SDS sample buffer와 함께 5 분 간 끓였다. 동량의 각각의 샘플들은 (20 μg) 4℃에서 1 시간 동안 100 V로 12% SDS-PAGE를 했고, nitrocellulose filter에 transfer 했다. filter는 상온에서 1 시간 동안 5% non-fat milk가 들어있는 TBST(10mM Tris-HCl; pH 7.5, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 처리하였다. Human anti-Ich-1 (caspase-2, Santa Cruz), anti-caspase-3(PharMingen), anti- PARP(Clontech)를 1 차 항체로 사용하였고, horseradish peroxidase-labeled goat 또는 mouse Ig를 2 차 항체로 사용하였다. 항체반응 밴드는 chemiluminescence(ECL Western detection kit)로 보여졌다. Cytochrome c 단백질은 mouse 단일클론성 anti-cytochrome c 항체를 이용하여 Western blot 분석을 하였다.

8) 統計 處理

實驗 結果에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Student-t test에 의하였으며 p 값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

실험성적

1. 저산소증에 의한 대뇌신경세포의 손상과 加味地黃丸의 보호작용  
저산소증에 따른 in vitro ischemia에 노출된 시간 및 加味地黃丸의 처리가 배양된 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 저산소 상태로 조절된 정온기에서 세포를 각각 2 분에서 16 분 동안 노출시켰다. 그 후 세포의 생존율을 XTT 법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 2 분 간 노출군에서는 정상군에 비하여 세포생존율이 10.9% 감소하였으며, 또한 4 분, 8 분, 16 분 간 노출군에서는 각각 30.9, 47.3(p<0.05), 76.4%(p<0.01)로 감소하였다.

Table 1. Analysis of hypoxic injury after in vitro ischemia in cultured mouse cerebral neurons and the neuroprotective effect of KJHWE

A) Time-dependent relationship of cell viability after exposure to in vitro ischemia

Experimental Group	Time of exposure to in vitro ischemia (hour)				
	0	2	4	8	16
XTT absorbance	0.57±0.05	0.50±0.04	0.40±0.05	0.31±0.03*	0.14±0.02**
NR absorbance	0.58±0.07	0.49±0.05	0.38±0.04	0.31±0.03*	0.15±0.02**

B) KJHWE dose-dependent relationship of cell viability after exposure to in vitro ischemia

Experimental Group	Concentration of KJHWE(μg/ml)				
	0	25	50	100	200
XTT absorbance	0.61±0.06	0.54±0.06	0.47±0.06	0.45±0.05*	0.40±0.03**
NR absorbance	0.64±0.05	0.56±0.06	0.44±0.07	0.46±0.04*	0.38±0.04**

Cultured cerebral neurons were treated with hypoxia with various time intervals and various concentration. KJHWE: Kamijhwang-hwan water extract. Data of (A) and (B) were measured by XTT and NR assay. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

특히 8분간 노출군에서 XTT50 값을 나타냈다. 또한 NR 정량으로 측정된 결과도 이와 유사한 결과를 보였다(Table 1A). 加味地黃丸(KJHWE)을 투여한 실험에서는 이러한 세포 생존율의

감소가 농도 의존적으로 억제되는 경향을 보였다(Table 1B). 이러한 결과는 저산소증의 세포독성효과를 보여주는 것이며 KJHWE가 저산소증 세포독성을 완화하는 효과를 나타낸 것이다.

2. 산소유리기 처리로 인한 대뇌신경세포의 손상과 加味地黃丸의 보호작용

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 로 유도된 산소유리기 배양 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 10 uM에서 80 uM 까지의 농도로 조절된 배양액에서 대뇌신경세포를 6 시간 동안 배양한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 독성효과를 MTT assay 법에 의하여 조사한 결과 10, 20 uM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군에서는 세포의 생존율이 정상군(100%)에 비하여 각각 72.4, 63.5%로 나타났다. 40, 80 uM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군에서는 세포의 생존율이 46.7(p<0.05), 34.8%(p<0.01)로 정상군과 비교하여 유의성있는 감소 결과를 보였으며, SRB 법으로 결과도 이것과 유사한 경향을 보였다(Table 2A). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리시간에 따른 영향도 역시 8 시간 이상 처리한 실험군에서는 유의성있는 세포 생존율의 감소를 확인할 수 있었다(Table 2B). MTT50 값에 준하는 40 uM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 8 시간을 처리하고 KJHWE를 투여한 실험군에서는 100 μg/ml를 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 유의성있는 세포생존율의 감소가 억제되는 결과를 보였다(Table 3C).

Table 2. Analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity in cultured mouse cerebral neurons and the neuroprotective effect of KJHWE

A) Concentration-dependent relationship of cell viability by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity

Assay Method	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Concentration(μM)				
	0	10	20	40	80
MTT absorbance (% of control)	100	85.4±8.5	65.1±5.7*	45.4±4.1**	39.5±3.7**
SRB assay (% of control)	100	79.6±9.2	63.7±6.3*	49.7±5.9**	38.4±3.9**

B) Time-dependent relationship of cell viability by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity

Assay Method	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Incubation Time (hour)				
	0	2	4	8	16
MTT absorbance (% of control)	100	82.3±7.1	67.7±7.8	45.9±4.8**	27.8±2.6**
SRB assay (% of control)	100	77.6±8.3	63.4±5.6*	44.6±4.3**	27.8±3.3**

C) KJHWE dose-dependent relationship of cell viability by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity

Assay Method	Concentration of KJHWE(μg/ml)				
	0	CONT	50	100	200
MTT absorbance (% of control)	100	45.7±4.6	53.5±5.9	64.6±4.7*	62.6±5.1*
SRB assay (% of control)	100	45.7±4.3	59.6±5.1	68.6±5.3*	65.6±6.1*

Cultured cerebral neurons were treated with hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and KJHWE with various time intervals and various concentration. KJHWE: Kamijhwang-hwan water extract. Data of (A), (B), and (C) were measured by MTT and SRB assay. (A) Cultured cells were exposed to 10, 20, 40, 80 μM for 6 hours, respectively. (B) Cultured cells were exposed to 40 μM for 1, 3, 6, 12 hours, respectively. (C) The cultured cells were preincubated with various concentration of KJHWE, 25, 50, 100, and 200 μg/ml, respectively, for 2 hours before exposure to 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 8 hours. All values represented the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value. \* p<0.05; \*\* p<0.01.

3. 항산화효소(catalase, SOD)의 활성 측정

저산소증이 catalase와 SOD 등의 항산화효소에 미치는 영향을 관찰하였다. 저산소증 처리 시간이 30 분 이상 경과하면 catalase는 정상군에 비하여 53.7(p<0.01), 46.7(p<0.01), 27.6

( $p < 0.01$ )%로 활성이 유의성있게 감소하는 경향을 보였으며, SOD는 57.8( $p < 0.05$ ), 43.2( $p < 0.01$ ), 32.6( $p < 0.01$ )%로 활성이 유의성있게 감소하는 경향을 보였다(Table 3A). 세포생존율50에 준하는 값인 저산소증의 30 분 처리와 KJHWE를 2 시간 동안 전처리 한 실험군에서 100  $\mu\text{g/ml}$  이상 투여한 실험군에서 catalase와 SOD의 유의성 있는 감소의 억제를 관찰할 수 있었다(Table 3A).

**Table 3. Analysis of antioxidant enzyme activation in cultured mouse cerebral neurons exposed to in vitro ischemia and the neuroprotective effect of KJHWE**

A) Time-dependent change of catalase and SOD activation in hypoxia-induced neurotoxicity

Enzyme Activation	Exposure time to hypoxia(min)				
	0	10	30	60	120
Catalase activation (% of control)	100	84.5±7.3	59.4±6.1**	49.8±5.7**	31.9±3.5**
SOD activation (% of control)	100	81.7±6.7	61.6±5.9**	51.5±4.5**	33.5±4.1**

B) KJHWE dose-dependent change of catalase and SOD activation in hypoxia-induced neurotoxicity

Assay Method	Concentration of KJHWE( $\mu\text{g/ml}$ )				
	0	CONT	50	100	200
Catalase activation (% of control)	100	54.2±5.5	64.6±5.9	81.6±7.1**	75.7±6.8*
SOD activation (% of control)	100	52.3±5.1	65.7±7.1	83.6±7.2**	78.9±7.5*

Cultured cerebral neurons were exposed to hypoxia and KJHWE with various time intervals and various concentration. KJHWE: Kamjhwang-hwan water extract. The activation of catalase and SOD was measured by spectrophotometry. (A) Cultured cells were exposed to hypoxia for 5 to 40 minutes. (B) Cultured cells were exposed to hypoxia for 20 minutes and preincubated for 2 hours with various concentration of KJHWE before it was exposed to hypoxia for 30 minutes. All values represented the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

**Table 4. Analysis of TNF- $\alpha$  and PKC activity in cultured mouse cerebral neurons exposed to in vitro ischemia and the neuroprotective effect of KJHWE**

A) Time-dependent change of TNF- $\alpha$  and PKC activity in hypoxia-induced neurotoxicity

Enzyme Activation	Exposure time to hypoxia(min)				
	0	10	30	60	120
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	321.4±24.5	342.4±32.5	391.4±33.3	454.3±42.6*	554.3±35.9**
PKC activity ( $1 \times 10^3$ cpm/ $\mu\text{g}$ protein)	5.1±0.6	4.6±0.4	6.1±0.7	5.6±0.6	5.3±0.6

B) KJHWE dose-dependent change of TNF- $\alpha$  and PKC activity in hypoxia-induced neurotoxicity

Enzyme Activation	Concentration of KJHWE( $\mu\text{g/ml}$ )				
	0	CONT	50	100	200
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	311.4±23.5	521.8±29.3	452.4±33.4	367.9±28.7*	424.8±37.7
PKC activity ( $1 \times 10^3$ cpm/ $\mu\text{g}$ protein)	3.7±0.4	5.3±0.5	5.1±0.5	4.6±0.05	4.4±0.6

Cultured cerebral neurons were exposed to hypoxia and KJHWE with various time intervals and various concentration. KJHWE: Kamjhwang-hwan water extract. The activation of PKC and TNF- $\alpha$  was measured by radioactivity using liquid scintillation counter immunosorbent assay. (A) Cultured cells were exposed to hypoxia for 10 to 120 minutes. (B) Cultured cells were exposed to hypoxia for 60 minutes and preincubated for 3 hours with various concentration of KJHWE before it was exposed to hypoxia for 60 minutes. All values represented the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

**4. TNF- $\alpha$ 와 PKC 활성 측정**

저산소증 처리 및 KJHWE가 배양 대뇌신경세포에 미치는 영향을 TNF- $\alpha$  및 PKC의 활성의 측면에서 조사하기 위하여 신경

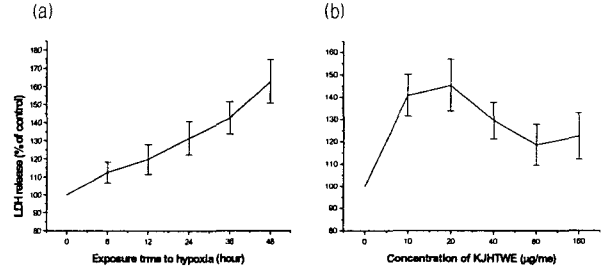
세포를 저산소증 상태에 각각 10에서 120 분까지 노출시킨 후 저산소증의 처리시간에 따른 TNF- $\alpha$ 와 PKC의 양적 변화를 정상군과 비교하였으며, 각각의 값은 pg/ml(TNF- $\alpha$ )와 다.  $1 \times 10^3$  cpm/ $\mu\text{g}$  protein(PKC)으로 표시하였다.

저산소를 처리한 실험군에서는 TNF- $\alpha$  값이 정상군에 비하여 60 분 이상을 저산소에 노출한 실험군에서 49.0%의 유의성 있는 증가가 관찰되었으며, PKC의 값은 저산소증 처리가 30 분 이상되는 실험군에서 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었다(Table 4A). KJHWE가 TNF- $\alpha$ 와 PKC 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 3 시간동안 KJHWE를 전처리하고 60 분 동안 저산소증에 노출한 결과 저산소 처리로 각각 73.7%와 51.4%로 증가한 TNF- $\alpha$ 와 PKC 활성이 KJHWE 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 실험군에서 TNF- $\alpha$ 와 PKC 활성 증가가 억제되는 경향을 보였으며, 특히 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 KJHWE를 투여한 실험군에서는 TNF- $\alpha$ 의 값이 대조군에 비하여 30.7%로 유의성 있는 감소의 결과를 보였다(Table 4B).

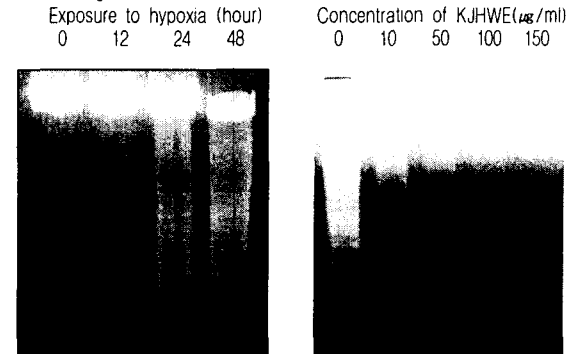
**5. 저산소증으로 유도되는 신경세포고사와 加味地黃丸의 항세포고사 작용**

저산소 처리가 SK-N-MC 세포의 세포사멸을 유도하는지를 확인하기 위하여 저산소 처리 후 SK-N-MC 세포에서 LDH 유리를 세포배양액에서 측정하여 세포손상을 확인하였다.

(A) LDH release



(B) DNA Fragmentation



**Fig. 1. Apoptosis induced by exposure to hypoxia in SK-N-MC cells and antiapoptotic properties of KJHWE.**

A: Time-dependent change of LDH leakage during hypoxia and KJHWE treatment. The cells were exposed to hypoxia for the indicated periods, 6, 12, 24, 36 and 48 hours and treated with various concentration of KJHWE, 10, 20, 40, 80, and 160  $\mu\text{g/ml}$  for 24 hours of exposure to hypoxia. The LDH leakage was measured by spectrophotometry at 570 nm wavelength. B: Time course of DNA fragmentation in response to hypoxia and effect of KJHWE on hypoxia-induced DNA fragmentation. (a): SK-N-MC cells were exposed to hypoxia for various periods (0, 12, 24, and 48 hours). (b): The cells were exposed to hypoxia for 24 hours and treated with various concentration of KJHWE, 10, 50, 100, and 150  $\mu\text{g/ml}$  for 24 hours of exposure to hypoxia.

6 시간 동안 저산소 처리를 하면 LDH 유리가 10% 증가하였으며 24 시간 이상 처리하면 저산소처리를 하지 않은 정상군에 비하여 LDH 유리가 유의성있는 증가를 보여 시간 의존적으로 저산소 처리에 의한 LDH의 증가를 나타냈다(Fig. 1Aa). 24 시간 동안 저산소 처리하는 동안 KJHWE를 10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$  씩 처리하고 배양액 내로의 LDH의 유리를 측정 한 결과 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 KJHWE를 처리한 실험군에서 LDH의 유리가 감소하는 경향을 나타냈으며, 특히 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 KJHWE를 투여한 실험군에서 저산소만을 처리한 대조군에 비하여 유의성있는 LDH의 감소가 관찰되었다(Fig. 1Ab). 이러한 세포사멸이 세포괴사(apoptosis)에 의한 것인지 세포괴사(necrosis)에 의한 것인지 구별하기 위하여 추가 실험을 시행하였다. 즉 internucleosomal DNA 단편화 실험과 chromatin dye를 이용하여 핵의 형태 관찰을 시행했다. 저산소 처리한 세포에서 DNA는 아가로스 젤 전기영동을 이용해 oligonucleosomal fragmentation을 확인한 결과 저산소 처리한 SK-N-MC 세포에서 추출한 낮은 분자량(180 base)의 DNA는 LDH 유리의 증가와 유사하게 나타났다. 즉 ethidium bromide로 염색된 아가로스 젤 상에서 시간의존적으로 oligosomal DNA ladder 가 생성됐다(Fig. 1Ba).

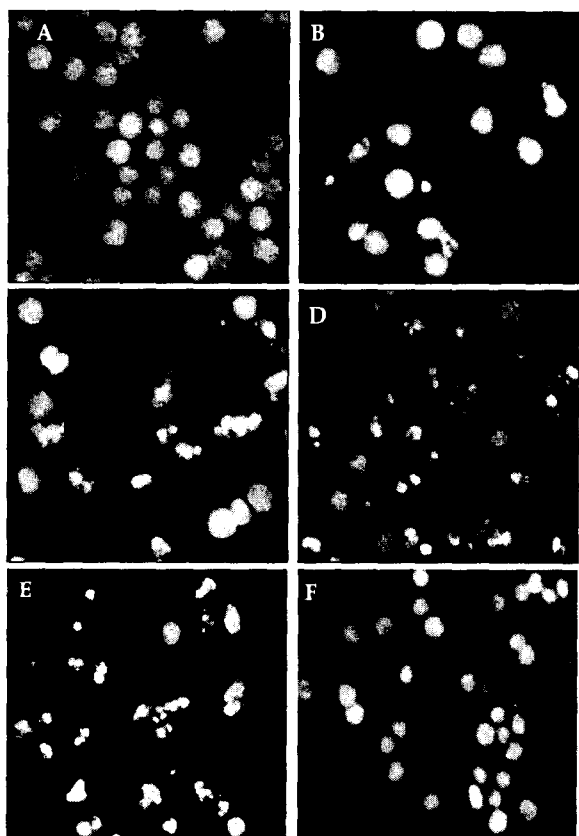


Fig. 2. Morphologic changes of apoptotic nucleus of SK-N-MC cells exposed to hypoxia and antiapoptotic effect of KJHWE. Hypoxia induced nuclear DNA condensation and fragmentation. Fluorescence micrographs were taken of cells stained with DAPI. Cultured cells incubated with normoxia (A), hypoxia (B) 6 hours, (C) 24 hours, (D) 48 hours, and KJHWE (E) 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and (F) 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 24 hypoxia. DNA condensation and fragmentation were observed in (C) and (D), and DNA condensation and fragmentation was rarely observed in (E) and (F).

KJHWE가 DNA 단편화에 미치는 실험을 한 결과 24 시간 저산소 처리를 하면서 KJHWE를 50, 100, 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 실험군에서는 DNA의 단편화 현상이 나타나지 않은 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1Ab). 또한 DAPI 염색을 통하여 핵의 형태학적 변화를 관찰한 결과 저산소를 처리하지 않은 정상군에서는 핵응축이 관찰되지 않았으며, 저산소 처리 시간 의존적으로 핵의 응축과 염색체의 단편화 양상 및 apoptotic body를 관찰할 수 있었으며, 24 시간 저산소 처리를 하면서 KJHWE를 투여한 실험군에서는 핵의 응축과 염색체의 절편이 보이는 하지만 핵의 응축 및 염색체의 단편화가 억제되는 핵의 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

이러한 저산소 처리로 인한 SK-N-MC 세포의 세포괴사 현상에 관여하는 기전을 알아보기 위하여 핵의 단편화의 최종 경로인 caspase-3의 활성화 양상을 형광분석법과 Western blotting을 통하여 확인하였고, caspase의 기질인 PARP 단백질의 분절화로 인한 현상을 관찰하였다. 즉 저산소 처리를 시행한 결과 시간의존적으로 caspase-3의 활성화를 관찰할 수 있었으며, 24 시간 저산소 처리 후 유의성있는 증가를 나타냈으며(Fig. 3Aa),

(A) Effect of hypoxia and KJHWE on caspase activation

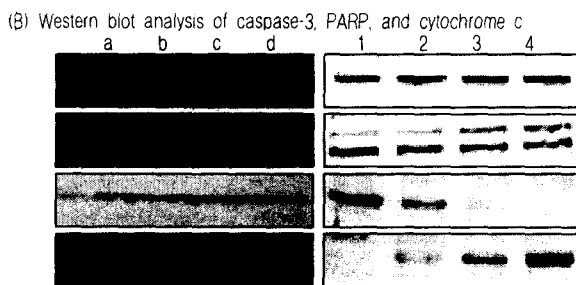
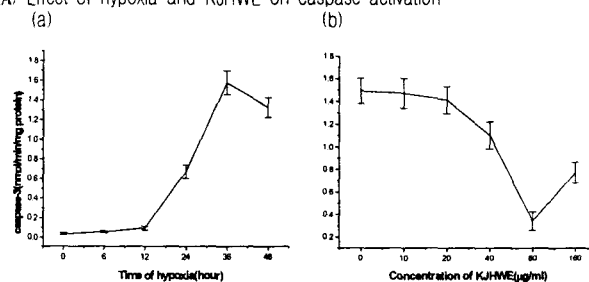


Fig. 3. The change of caspase-3 activation and decrease in proforms of caspase-3, PARP, and cytochrome c release induced by hypoxia and treatment of KJHWE in SK-N-MC cells. A: The activation of caspase-3 in SK-N-MC cells were observed after exposure to hypoxia for the periods indicated and treatment of KJHWE for 36 hours. The caspase-3 activity was measured as described in Materials and Methods. Data represented the mean $\pm$ SE of triplicate reactions. B: Representative Western blot analysis demonstrating the response to hypoxia and KJHWE treatment. Expressions of caspase-3, PARP, and release of cytochrome c. Lane a: normoxia, b: exposure to hypoxia for 12 hours, c: 24 hours, d: 48 hours. Lane 1: hypoxia for 36 hours, 2: treatment of KJHWE 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  during exposure to hypoxia, 3: treatment of KJHWE 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  during exposure to hypoxia, 4: treatment of KJHWE 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$  during exposure to hypoxia

24 시간 저산소 처리와 함께 KJHWE를 투여한 결과 caspase-3의 활성이 억제되는 경향을 보였고, 특히 KJHWE 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 처리군에서는 현저한 감소 현상을 보였다(Fig. 3Ab). 그리고 caspase-3의 기질 중의 하나인 PARP가 caspase의 활성화와 함

계 가수분해되는 양상을 보였으며, KJHWE를 투여한 실험군에서는 이러한 가수분해 양상이 억제되는 것을 보였다(Fig. 3B). 그리고 cytochrome c의 유리를 관찰하기 위하여 세포질과 membrane에서 cytochrome c의 양을 Western blot 분석에 의해 측정 되었다. 저산소 처리 후 세포질에서의 cytochrome c의 양은 증가되는 경향을 보여 막손상으로 인하여 유리되는 결과를 보였으며, 이것 또한 KJHWE의 처리로 이러한 양상이 감소되는 결과를 보였다(Fig. 3B). membrane 조각에서의 cytochrome c의 양은 시간 의존적 방식에 상응한 감소를 보였으며, 이러한 경향은 KJHWE의 투여로 억제되는 경향을 나타냈다(Fig. 3B).

## 고 찰

행지(行遲) 발지(髮遲) 치지(齒遲) 입지(立遲) 어지(語遲)를 포괄하는 오지(五遲)는 발달이 지연되는 정신지체아동에게서 매우 흔한 증상들이다. 서양의학에서는 정신지체에 대하여 지능을 호전시켜 주는 치료약물이 없으며<sup>40)</sup>, 대개는 적응기술훈련과 사회성증진훈련의 포괄적인 특수교육 프로그램에 의존하고 있는 실정이다<sup>41)</sup>. 한의학에서는 정상발육에 비해 늦어지고 있는 오지(五遲)에 대해 부모로부터의 氣血不足 肝腎不足 腎氣虛弱을 원인으로 보며 腎氣不足에 의한 어지(語遲)에 대해서 加味地黃丸을 활용해왔다<sup>39)</sup>. 처방구성 중 숙지황(熟地黃)은 자음보혈(滋陰補血) 익정진수(益精眞水)의 효능이 있으며 산약(山藥)은 고신익정(固腎益精)하고 산수유는 보익간신(補益肝腎) 정고탈(精固脫)의 효능의 있다. 백복령(白茯苓)은 건비양심(健脾養心)하며 목단피(牡丹皮)는 청열양혈(淸熱涼血)하며 택사(澤瀉)는 설열(泄熱)의 효과가 있다<sup>31)</sup>. 오미자(五味子)는 중추신경계를 자극하여 척수반사를 증강시키고 반사역치를 낮춘다. 적정량에서는 정신적기능을 개선시키며 작업능률을 향상시킨다<sup>27)</sup>. 녹용(鹿茸)은 신체의 활동기능을 높이고 수면과 식욕을 개선하는 강장작용외에 적혈구수와 혈액소량을 증가시키며 부교감신경을 흥분시킨다<sup>37)</sup>. 백<sup>35)</sup> 등의 연구에 따르면 신경심리검사와 지능검사 및 언어검사에서 加味地黃丸을 6주간 투약한 일반 아동군이 투약하지 않은 아동군에 비해 동작성지능(PIQ)의 유의한 상승이 있었으며 전체지능(FIQ)에서도 더 나은 수행을 보였다. KPI-C(Korean Personality Inventory for Children)에 있어서는 불안장애에 대한 감소효과도 인정되었는데 이 결과는 류<sup>32)</sup> 등의 연구결과 신기환(腎氣丸)이 항불안효과가 있다고 보고한 바와 유사한 결과이다. 加味地黃丸은 정상상태의 해마에서 신경세포를 유의하게 생성시키는 효과가 있음<sup>34)</sup>은 물론 급성알코올중독에 의한 뇌손상으로부터 감소된 신경세포의 생성도 의미 있게 증가시키는 것<sup>36)</sup>으로 보아 뇌의 정상기능에 상당한 도움을 주는 것으로 사료된다. 정신지체의 원인 중 분만시 두개골내의 출혈이나 뇌허혈이 있는 경우는 인지적인 기능의 저하와 밀접한 관계가 있다. 최근 뇌허혈이나 저산소증에 산화적 손상이 관여한다는 보고가 많이 되고 있다<sup>9,24)</sup>. 따라서 뇌질환에 대하여 많은 연구자들은 이들의 병인적 현상에 대한 기전규명과 효과적인 치료방법에 대하여 꾸준히 연구를 진행하여 왔다<sup>2,6,11,18,25)</sup>. 세포에 충분한 산소공급이 이루어지지 않

면 신경계의 가장 급성적인 세포손상을 받게 된다<sup>2,5,21)</sup>. 특히, 뇌 세포는 산소공급이 부족하게 되면 크게 손상을 받는 저산소증에 가장 민감하게 반응하는 세포이다. 따라서 저산소증은 뇌질환의 중요한 병인의 하나로 인식된다<sup>8,20,23)</sup>. 만성적인 저산소증은 뇌세포의 손상으로 인하여 언어장애를 비롯하여 학습장애, 기억력 상실 등을 가져오며 심하면 간질이나 치매와 같은 증후를 야기하기도 한다<sup>14,22)</sup>. 특히, 저산소증 노출의 초기에는 세포 내의 다양한 생화학적 변화를 초래하게 되는데 그 중 하나가 활성산소의 생성이다<sup>1,16,18)</sup>. 즉, 저산소증이나 이로 허혈은 세포 내 산화적 인산화반응의 차단으로 인하여 ATP의 생산 저하가 유발되며 이로 인한 ATP의 대사과정에서 xanthine oxidase에 의해 활성산소가 생성된다<sup>1,12,16)</sup>. 산소유리기는 정상적인 대사과정에서도 소량이 생성되나 인체내의 항산화효소인 catalase나 superoxide dismutase(SOD)에 의하여 물로 변환되어 인체에는 별다른 영향을 주지 못한다. 그러나 근위축성측삭경화증이나 파킨슨씨병과 같은 질환에서는 제거되지 못한 산소유리기가 뇌에 축적되어 뇌 신경세포를 손상하거나 사멸시켜 병변을 가속화시킨다고 알려져 있다. 따라서 산소유리기의 산화적 손상으로 매개된 뇌질환의 치료방법의 하나로 glutathione이나 vitamin E와 같은 항산화제들을 투여함으로써 많은 치료적 효과를 얻고 있다. 따라서 항산화제들은 과다한 산소유리기를 제거해줌으로써 병변을 회복시켜 주는데 중요한 역할을 한다는 보고에 근거하여<sup>15)</sup> 산소유리기의 독성효과와 이에 대한 방어 및 회복작용에 대한 기전을 밝히려는 연구가 꾸준히 진행되어 왔다<sup>27)</sup>. 또한 산소유리기와 glutamate 수용체에 대한 연구에서 산소유리기는 흥분성아미노산(excitatory amino acids, EAAs)의 분비를 촉진시킨다는 보고에 따라 신경세포의 손상에 산소유리기와 EAA는 여러 신경성질환의 주된 병리적 요인으로 제시되었다<sup>41)</sup>. 최근 소수의 연구에서 산소유리기는 glutamate 수용체의 하나인 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 통하여 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 농도를 증가 시킴으로써 신경세포의 손상이나 퇴화를 초래한다고 보고된 바 있다<sup>2,12)</sup>. 특히, 인체의 뇌에 존재하고 있는 NMDA 수용체는 α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid(AMPA) 및 kainate receptor와 같은 수용체와 함께 이온 전하질의 항상성을 조절하는 중요한 역할을 하고 있다<sup>5,13)</sup>. 그 중에서 Ca<sup>2+</sup>의 ion-channel과 밀접한 관계가 있는 NMDA receptor는 흥분성아미노산의 과자극에 의하여 활성화 됨으로써 그 결과 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도를 증가시키거나<sup>1)</sup> 또는 세포 내 각종 효소나 protein kinase C(PKC)와 같은 신호전달체계에 영향을 미쳐 세포를 손상하며<sup>4)</sup> 신경병변을 가속화시킨다. 최근에 한약재나 동식물 등에서 유래한 천연물이 산소유리기의 산화적 손상이나 독성물질에 의해 야기되는 각종 신경병변의 치료에 매우 효과적이라는 임상보고가 많이 이루어지고 있다<sup>1-3)</sup>. 특히, 한약재는 합성 화학약물에 비하여 적은 독성과 이로 인한 부작용이 적기 때문에 천연물의 연구가 많이 이루어지고 있다<sup>2,6)</sup>. 이러한 연구를 위하여 경제적이고 효율적인 병태모델이 개발되었으며, 특히 배양세포를 이용한 병태모델이 동물의 실험모델을 대신하여 많이 이루어지고 있다<sup>4,5,7,8)</sup>.

본 연구는 저산소에 의한 허혈상태에서 산소유리기의 신경

독성에 대한 효과와 加味地黃丸의 신경세포 보호기전을 연구하고자 한 것이다. 따라서 저산소증으로 유도한 *in vitro* 허혈이 대뇌신경세포와 신경세포 종양세포인 SK-N-MC 세포에 미치는 영향을 조사하였다. 저산소증에 따른 *in vitro* 허혈에 노출된 시간 및 加味地黃丸의 처리가 배양된 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 저산소 상태로 조절된 정온기에서 세포를 각각 2 분에서 16 분 동안 노출시켰다. 그 후 세포의 생존율을 XTT과 NR 법에 의하여 정상군과 加味地黃丸을 처리한 실험군에서 노출 시간의존적으로 세포 생존율이 감소하는 것을 관찰하였다 (Table 1A). 또한 加味地黃丸을 투여한 실험에서는 이러한 세포 생존율의 감소가 농도 의존적으로 억제되는 경향을 나타내었으며 (Table 1B), 이러한 결과는 저산소증의 세포독성과 KJHWE가 저산소증 세포독성완화 효과를 보여준 것이다. 이 같은 실험결과는 Borgers 등(1990)<sup>9)</sup>이 보고한 허혈이 심근세포와 뇌세포에 손상을 초래하였다는 연구결과와 일치하는 것이며, 그 원인이 허혈시 형성된 산소유리기가 세포를 손상시킨 결과일 것으로 생각된다<sup>2,24,25)</sup>. 즉 허혈시 생성된 산소유리기에 의한 세포막의 지질과산화반응에 의한 손상 및 단백질합성 저해 등 복합적인 세포손상의 요인의 결과라고 생각할 수 있을 것이며<sup>1,21,24)</sup>, 加味地黃丸이 이러한 신경세포 손상의 억제효과를 나타내는 것을 확인하였다. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산소유리기 생성으로 발생한 세포 손상에 加味地黃丸이 미치는 영향을 관찰한 결과 산소유리기처리는 농도와 시간의존적으로 세포손상을 유발하였으며, 加味地黃丸 처리시 산소유리기로 유발된 세포손상을 억제하는 효과를 관찰하였다 (Table 2). 또한 저산소 처리에 의한 허혈상태가 유발하는 신경세포 손상이 산화적 손상 기전과 관계가 있는가를 알아보기 위하여 저산소증으로 허혈을 유도하고 catalase와 SOD의 항산화효소의 활성을 조사하였다. 저산소 시간에 비례하여 catalase와 SOD의 활성이 감소되었으며 (Table 3A), 이러한 결과로서 허혈이 산화적 손상과 밀접한 관련이 있는 것으로 확인하였고, 허혈시 생성된 산소유리기가 세포막을 투과하여 세포내 항산화효소의 활성을 억제함으로써 세포손상을 초래한 것으로 생각된다<sup>5,13,24)</sup>. 한편, 加味地黃丸 추출물을 투여한 결과 저산소 처리로 감소한 catalase와 SOD의 활성이 증가하는 결과를 보였다 (Table 3B). 이러한 결과는 加味地黃丸 추출물의 구성성분중 산소유리기의 산화적 손상에 대하여 신경세포의 보호작용은 항산화효소 활성을 통하여 이루어지는 것으로 생각된다<sup>15,18,21)</sup>. 이러한 결과는 최근 한약재의 산화적 손상으로 인해 영향을 받은 신경세포를 방어 내지는 보호하였다는 연구결과와 일치함을 알 수 있었다<sup>15,16)</sup>.

한편, 허혈이 신경세포 손상과 관련된 기전의 하나로 TNF- $\alpha$  및 PKC의 활성에 미치는 영향을 조사하였으며, 加味地黃丸 추출물을 처리하고 그 결과를 확인하였다. 저산소 처리시 TNF- $\alpha$  및 PKC의 활성이 증가하는 것을 보였고 (Table 4A), 加味地黃丸 처리시 활성의 증가가 억제되는 양상을 보였다 (Table 4B). Kham 등 (1995)<sup>3)</sup>이 산소유리기가 혈관내피세포에서 cytokine과 intracellular adhesion molecule(ICAM)과 같은 물질들을 생성함으로써 동맥질환을 유발한다는 연구결과를 보고하였으며, 이러한 결과는 허혈 시 생성된 산소유리기가 TNF- $\alpha$ 의 활성을 촉진시

켰을 가능성이 클 것으로 생각된다<sup>3,22)</sup>. 따라서 본 실험 결과는 허혈에 의해 생성된 산소유리기에 의한 지질막의 과산화반응과 cytokine의 분비증가를 KJHWE 추출물이 항산화 효과를 나타냄으로서 산화적 손상으로부터 신경세포를 보호한 것으로 생각된다<sup>15,18,19,25)</sup>. 또한 저산소 처리시 생성된 활성산소가 흥분성아미노산의 분비를 촉진시켜 NMDA receptor를 과자극함으로써 세포내 칼슘증가를 초래하고 동시에 세포 내 칼슘증가는 Ca<sup>2+</sup>-dependent PKC의 활성을 증가시켰을 가능성이 높을 것으로 생각한다<sup>14,17)</sup>.

이러한 저산소증의 신경세포 손상의 기전으로 세포고사가 관여하는 지를 확인하고 加味地黃丸이 세포고사기전에 미치는 효과를 관찰하여 신경세포 손상에 미치는 加味地黃丸의 효과를 세포고사의 측면에서 관찰하고자 했다. 저산소 처리가 SK-N-MC 세포의 세포사멸을 유도하는 지를 확인하기 위하여 저산소 처리 후 SK-N-MC 세포에서 LDH 유리를 세포배양액에서 측정하여 세포손상을 확인한 결과 시간 의존적으로 저산소 처리에 의한 LDH의 증가를 나타냈으며 (Fig. 1Aa), 24 시간 동안 저산소 처리하는 동안 加味地黃丸을 10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{g/ml}$  씩 처리하고 배양액 내로의 LDH의 유리를 측정한 결과 80  $\mu\text{g/ml}$ 의 加味地黃丸을 투여한 실험군에서 저산소 만을 처리한 대조군에 비하여 유의성있는 LDH의 감소가 관찰되었다 (Fig. 1Ab). 이러한 결과는 앞의 배양된 대뇌신경세포를 이용한 실험과 같은 것이다. 이러한 세포사멸이 세포고사 (apoptosis)에 의한 것인지 세포괴사 (necrosis)에 의한 것인지 구별하기 위하여 internucleosomal DNA 단편화 실험과 chromatin dye를 이용하여 핵의 형태 관찰을 시행했다. DNA 단편화를 확인한 결과 저산소 처리한 SK-N-MC 세포에서 DNA 단편화는 LDH 유리의 증가와 유사하게 나타났다 (Fig. 1Ba). 또한 加味地黃丸을 처리한 실험군에서는 DNA의 단편화 현상이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1Ab). 또한 저산소증 처리로 인한 핵응축과 염색체의 단편화 양상 및 apoptotic body를 관찰할 수 있었으며, 加味地黃丸을 투여한 실험군에서는 핵의 응축과 염색체의 절편이 보이기는 하지만 핵의 응축 및 염색체의 단편화가 억제되는 핵의 변화를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

이러한 저산소 처리로 인한 SK-N-MC 세포의 세포고사 현상에 관여하는 기전을 알아보기 위하여 핵의 단편화의 최종 경로인 caspase-3의 활성화 양상을 분석한 결과 저산소 처리 시간 의존적으로 caspase-3의 활성화의 증가를 관찰할 수 있었으며, (Fig. 3Aa), 加味地黃丸의 투여로 caspase-3의 활성이 억제되는 경향을 보였다 (Fig. 3Ab). 그리고 caspase-3의 기질 중의 하나인 PARP가 caspase의 활성화와 함께 가수분해되는 양상을 보였으며, 加味地黃丸을 투여한 실험군에서는 이러한 가수분해 양상이 억제되는 것을 보였다 (Fig. 3B). 또한 저산소 처리 후 세포질에서의 cytochrome c의 양은 증가되는 경향을 보여 막손상으로 인하여 유리되는 결과를 보였으며, 이것 또한 加味地黃丸의 처리로 이러한 양상이 감소되는 결과를 보였다 (Fig. 3B). 그리고 membrane 분획에서의 cytochrome c의 양은 시간 의존적 방식에 상응한 감소를 보였으며, 이러한 경향은 加味地黃丸의 투여로 억제되는



경향을 나타냈다(Fig. 3B). 이러한 결과는 저산소 처리가 SK-N-MC 신경아세포종양 세포에서 caspase 활성화를 통하여 세포고사를 유도하고 DNA 단편화 결과를 초래하였으며, 또한 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 유리를 자극하였다. 즉 저산소처리로 유도되는 세포고사는 cytochrome c의 유리를 동반하는 caspase의 활성을 통하여 발생한다는 것을 다시 확인하였고, 加味地黃丸의 신경세포고사의 억제에는 caspase의 활성 억제 기전을 통하여 이루어지는 것으로 생각된다.

## 결론

加味地黃丸의 신경세포보호효과를 관찰하기 위하여 허혈에 의하여 유발되는 신경세포손상에 대한 독성기전과 신경아세포종양세포인 SK-N-MC 세포를 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 저산소 처리로 in vitro 허혈을 유도하여 2~16 분 동안 노출시킨 결과 허혈을 처리한 시간에 비례하여 세포생존율이 감소하였고, 加味地黃丸 실험군에서는 이러한 세포생존율의 감소가 억제되는 결과를 보였으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용하여 산소유리기를 처리한 후 신경세포의 생존율은 감소하였고, 加味地黃丸은 신경세포 생존율의 감소를 억제하는 효과가 있었다. 저산소 처리 시 catalase와 SOD의 활성은 감소하였고, 加味地黃丸의 투여는 이러한 활성의 감소를 억제하는 효과를 보였다. TNF- $\alpha$ 와 PKC의 활성이 증가하였으나 加味地黃丸을 투여한 결과 억제되었고, 저산소처리로 유도되는 세포고사는 cytochrome c의 유리를 동반하는 caspase의 활성을 통하여 발하였고, 加味地黃丸은 caspase의 활성 억제 기전을 통하여 신경세포고사를 억제하였다.

## 감사의 글

본 연구는 2001년 원광대학교 교내연구비 지원에 의하여 이루어졌습니다.

## 참고문헌

- Dario G, Antonio C, Giuseppe P: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267, 1996.
- Floyd RA : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* 4:2587-2597, 1997.
- Kham BV, Pathasarathy SS, Alexander RW, Medford RM: Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 95:1262-1270, 1995.
- Mattson MP, Cheng B, Smith-Swintosky VL : Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium and free radical mediated excitotoxic injury: Implications for treating neurodegenerative disorders. *J Exp Neurol* 124:89-95, 1993.
- Mayer ML, Westbrook GL : Permeation and block of N-methyl -D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. *J. Physiol.*, 394:501-527, 1987.
- Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU : 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.
- Alexander RW: Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: A new perspective. *Hypertension* 25:155-161, 1995.
- Borgers M, Vandeplassche G, van Reempts J : Cytochemical markers of ischemia in the heart and brain. *Histochem J* 22:125-133, 1990.
- Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J : NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature(London)* 336:68-70, 1988.
- Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623, 1992.
- Jackson GR, Apfell L, Werrbach-Perex K, Perex-Polo JR : Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balanced and neuronal injury. 1. Stimulation of hydrogen peroxide resistance. *J NeurosciRes* 25 : 360-368, 1990.
- Borenfreund E, Puerner J. A., : A Simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J. Tiss. Cult. Meth.*, 9:7-9, 1984
- Takahashi K., Fujita T., Mayum T., Kish T., : Effect of Adriamycin on Cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem. Pharm.*, 35(1): 326-334, 1987.
- 林泰榮 : 獨活類의 效能에 關한 實驗的 研究, *大韓韓醫學會誌*, 8(2):97-98, 1987.
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla V, Moroni F : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J. Neurochem.*, 51:1960-1963, 1988.
- Zeman S, Lloyd C, Meldrum B, Leigh PN : Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. *Neuropathol. Appl Neurobiol.*, 20:219-231, 1994.
- Kim YS, Kim SU : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci Res* 29:100-106, 1991.
- Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU : Methylmercury

- induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists, *Neurotoxicology* 17:37~46, 1996.
20. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A et al. : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature(London)* 362:59-62, 1993.
  21. Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T : A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alphatocopherol administration. *Stroke* 14:977-982, 1983.
  22. Nowak TS, Jr, Ikeda J, Nakajima T : 70-kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. *Stroke Suppl III* 21:107-111, 1990.
  23. Nishizuka Y : Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614, 1992.
  24. Vannucci RC : Experimentalbiology of cerebral hypoxia-ischemia : relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 27:317-326, 1990.
  25. Silverstein FS, Buckanan K, Hudson C, Johnsten MV : Flunarizine limits hypoxia-ischemia induced morphologic injury in immature rat brain. *Stroke* 17:477-482, 1986.
  26. Hu K-Q, Backer JM, Sahagian G, Feener EP, King GL : Modulation of the insulin factor II/mannose 6-phosphate receptor in microvascular endothelial cells by phobol ester via protein kinase C. *J Biol Chem* 265:13864-13872, 1990.
  27. Tang W., Eisenbrand G., *Chinese Drugs of Plant Origin Chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine*, Springer- Verlag, 903-917 1992.
  28. 王清任 : 醫林改錯, 臺灣, 東方書店, p.49, 1960.
  29. 車相賢 : 中風治療의 문헌적 고찰과 침구치료에 대한 소견, 서울, 大韓韓方內科學會誌, 15(2):59-63, 1995.
  30. 趙英哲, 孫洛源 : 小續命湯이 中腦動脈 閉鎖에 의한 虛血性 腦損傷에 미치는 影響, 경희한의대논문집21(1), pp.41-54, 1998.
  31. 김수철, 함암본초, 서울: 도서출판 바람과물결, p.251, 354, 365, 415, 474, 1988.
  32. 류종훈외, 응용약물학회지 제9권, pp.125-130, 2001.
  33. 변용찬외, 2000년도장애인실태조사, 서울: 보건복지부 한국보건의사회연구원, pp.279-285, 2000.
  34. 백은경외, Shenqi-wan Increases Cell Proliferation of Cultured Hippocampal Cell Line HiB5 and Dentate Gyrus of Young Sprague- Dawley Rats, 대한경락경혈학회지 제 19(1), 2002.
  35. 백은경외, EFFECT OF LIUWEIDIHUANG-TANG-JIA-WEI FOR INTELLIGENCE IN HEALTHY CHILDREN, Enhancing the Evidence- base for TCM Practice- Methodology and Grantsmanship, p.30, Workshop 30-31 October 2002 Hong Kong, China
  36. 백은경외, Effect of liuweidihuang-tang on Alcohol-induced Decrease in New Cell Formation in Rat Dentate Gyrus, 동의생리병리학회지 16(5), pp.1055-1059, 2002.
  37. 생약학교재편찬위원회, 생약학, 서울: 동명사, p.169, 2001.
  38. 이정균, 정신의학, 서울: 일조각, pp.494-496, 501-503, 1989.
  39. 정규만, 동의소아과학, 서울: 향림출판, p.476,477,276,278, 1992.
  40. 조수철, 소아정신약물학, 서울: 서울대학교출판부, pp.76, 2000.
  41. 조수철, 소아정신질환의 개념, 서울 : 서울대학교출판부, p.28,29,37, 2000.