

## 저산소/재관류로부터 청폐사간탕의 PC12 세포 보호 효과

소 윤 조\*

전북대학교 치과대학 약리학교실

### Protective Effect of Metabolized Chungpesagan-tang on Hypoxia/Reperfusion Induced-PC12 Cell Damage

Yunjo Soh\*

Department of Pharmacology, School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

**Abstract** – This research was performed to investigate the protective effect of Chungpesagan-tang (CST) from hypoxia /reperfusion induced-PC12 cell damage. To elucidate the mechanism of the protective effect of CST, cell viability, changes in activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, caspase 3 and the production of malondialdehyde were observed after treating PC12 cells with CST which was metabolized by rat liver homogenate. Pretreatment of CST with liver homogenate appeared to increase its protective effect against hypoxia/reperfusion insult. The result showed that CST exhibited the highest protective effect against hypoxia/reperfusion at the dose of 1 µg/ml in PC12 cells, probably by recovering the redox enzyme activities and MDA to control level.

**Key words** – Chungpesagan-tang, Hypoxia/reperfusion, anti-oxidant enzymes

뇌졸중은 전 세계적으로 3대 사인의 하나이며 국내에서는 특히 60세 이상의 노인인구에서 1위를 차지하고 있다. 뇌졸중은 뇌혈관 장애로 인하여 갑자기 의식이 상실되고 편마비 증세를 비롯하여 인지, 언어장애를 야기시키는 급격한 대뇌혈관 장애로 뇌졸중 환자는 신체기능은 물론 인지, 정서적인 기능까지 상실되므로 의료적 치료뿐만 아니라 심리 사회적 적응문제까지 직면하게 된다.<sup>1-3)</sup> 뇌졸중은 뇌혈전증 (cerebral thrombosis), 뇌색전증 (cerebral embolism), 뇌경색증 (cerebral infarction), 뇌출혈 (cerebral hemorrhage)로 구분할 수 있으며, 뇌졸중 환자에게서 나타나는 임상적 증상은 복합적으로 나타나며 의식장애, 감각장애, 운동장애, 언어장애, 인지장애 등의 기능장애로 인해 일상생활 동작의 독립적 수행에 장애를 준다.<sup>4)</sup> 뇌졸중의 종류별 발생양상을 보면 전에는 출혈성 뇌졸중의 빈도가 다소 높았으나 10년 전부터 허혈성 뇌졸중의 빈도가 점차 증가하여 출혈성 뇌졸중과 거의 동등한 비율 내지는 다소 높은 편이라고 보고되기 시작하였다.<sup>2,5)</sup>

청폐사간탕(淸肺瀉肝湯)은 우리나라에서 급성기 중풍에 가장 많이 사용되고 있는 한약재 처방중의 하나이다.<sup>6)</sup> 이

처방은 중풍의 진행을 막아주고 운동기능을 회복시켜 주는데 효력이 있는 것으로 알려져 있다. 지금까지 혈전형성 억제 효과, 혈압 강하 및 국소 뇌혈류량 증가 효과, 항알레르기 작용, 항암 효과, 항산화 효과 및 뇌신경 세포손상 감소, 항염증 효과 등을 밝힌 실험 연구들이 진행되어 왔다.<sup>7-9)</sup> 이 실험은 뇌허혈에 좋은 효과가 기대되는 한약재인 청폐사간탕의 치료기전을 밝히고자 하는 목적으로 계획되었다.

허혈성 뇌손상의 기전에 관련된 많은 인자들이 규명되고 있고 그 결과로 허혈성 뇌손상을 억제하기 위한 다양한 방법들이 제시되고 있다. 뇌허혈 상태에서 신경세포가 생존할 수 있는 시간이 극히 제한되어 있기 때문에 뇌허혈 급성기에 재관류 (reperfusion)를 위한 혈전용해제와 신경세포의 손상을 막을 수 있는 적절한 신경보호제의 개발이 뇌졸중 치료의 주된 관건으로서, 이를 위한 연구가 진행되고 있다.<sup>10)</sup> 이러한 질환의 신경세포 손상 발생 기전으로는 free radical, glutamate, calcium overload, nitric oxide (NO) 및 여러 cytokines등 많은 요인들이 관여하며 세포의 생존을 및 산화환원에 중요하게 관여하는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase 등의 항산화 효소가 세포의 보호에 관련된 것으로 알려져 있다.<sup>11-13)</sup>

동물실험에 의한 한약물의 허혈 치료 효과의 측정은 뇌

\*교신저자(E-mail) : ysoh@chonbuk.ac.kr  
(FAX) : 063-270-4037

손상의 기전을 규명 하는데 한계가 있어 *in vitro* 세포 배양에 의한 한약물의 기전 연구가 요구된다. 한약물은 수많은 화합물이 존재하여 이들의 흡수, 대사, 배설의 경로를 추적하는 것이 불가능하다. 본 실험에서는 한약물을 rat liver homogenate와 반응시킨 후 그 대사산물을 이용하여 간 조직에서 나타나는 약물의 일차-통과 효과 (first-pass effect)를 세포배양 실험에서 나타나도록 함으로써 동물실험에서 나타나는 약물의 대사 영향을 세포배양실험에서도 나타나도록 고안하였다.

이 실험은 PC12 세포에서 저산소/재관류 (hypoxia/reperfusion)에 대한 청폐사간탕의 세포 보호 효과를 분석하기 위해 청폐사간탕을 흰쥐의 간 homogenate의 상등액과 반응시켜 신경세포에 처리한 후 세포의 생존율 및 산화환원에 중요하게 관여하는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase와 세포사멸과 관련된 caspase 3 등의 효소 활성 및 Malondialdehyde (MDA)의 수준을 측정하였다.

## 재료 및 방법

**시약** - Bradford Reagent, NADPH, t-butyl hydroperoxide, Potassium phosphate, Trichloroacetic acid, Glutathione Peroxidase assay kit 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. 그 외의 시약은 특급 또는 일급을 사용하였다.

**재료** - 실험에 사용된 청폐사간탕은 경희대학교 한방병원에서 공급 받았으며 조성은 Table I과 같다. 청폐사간탕을 3000 ml round flask에 넣고 2000 ml의 정제수를 가하여 냉각기가 부착된 진탕기에서 1시간 30분 동안 가열한 후 여과지로 여과한 여액을 동결 건조하였다. 그 후 멸균수에 녹여 실험에 사용하였다.

**세포배양** - 실험에 사용한 PC12 세포는 신경세포의 특

**Table I.** The Amount and Composition of Chungpesagan-tang (CST) Extracts

한약명(韓藥名)	생약명(生藥名)	용량(g)
갈근(葛根)	Puerariae Radix	15.0 g
황금(黃芩)	Scutellariae Radix	7.5 g
고본(藜蘆)	Angelicae tenuissimae Radix	7.5 g
나복자(蘿蔔子)	Raphani Semen	3.75 g
길경(桔梗)	Platycodi Radix	3.75 g
승마(升麻)	Cimicifugae Rhizoma	3.75 g
백지(白芷)	Angelicae Radix	3.75 g
대황(大黃)	Rhei Rhizoma	3.75 g
Total Amount		48.75 g

성을 나타내는 세포로 미국 세포주 은행 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)에서 분양 받아 5% heat-inactivated fetal bovine serum과 10% horse serum, 100 units/ml penicillin G, 100 mg/ml streptomycin의 항생제를 넣은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium에 넣고, 5% CO<sub>2</sub>와 95% 대기로 채워진 가슴 배양기에서 배양하였다. 저산소/재관류 실험을 위해서는 세포를 serum-free, low glucose배지로 옮긴 후 85% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>가 들어 있는 anaerobic chamber (Thermo Forma, Co. Marietta, OH, USA)에서 배양하였으며, 재관류 유발은 5% CO<sub>2</sub>, air 95%가 들어있는 배양기에서 이루어지도록 하였다.

**간 효소에 의한 청폐사간탕의 전처리** - 흰쥐의 간을 10 배 부피의 homogenization buffer (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM Potassium phosphate, pH 7.4, 1 mM DTT)에 넣어 균질화 후 9,000 × g에서 4°C에서 20분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 세포질과 microsome 분획이 포함된 상등액을 취하여 약물대사 효소로 사용하였다 (상등액을 S9 분획이라 칭함).<sup>14)</sup> S9 분획 (100 µg/ml)과 청폐사간탕 (1 µg/ml)을 시간별로 반응시킨 후 1 ml씩 취하여 0.22 mm Syringe Filter를 이용하여 멸균여과 한 후 세포에 처리하였다.

**세포 생존율 측정** - 세포 생존율을 측정하기 위해 MTT [3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] assay를 사용하였다. MTT reagent (stock 농도 5 mg/ml) 10%를 96-well plate에 10 µl씩 넣고 37°C 배양기에서 2시간 동안 반응시킨 후 media를 제거하였다. DMSO 150 µl를 넣은 후 70°C에서 10분간 녹여 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm와 650 nm에서의 흡광도 차이를 측정하였다.

**효소활성 측정** - Superoxide dismutase (SOD) 활성을 측정하기 위하여 SOD Assay Kit (Oxis Research, Portland, OR, USA)를 사용하였다. Boric acid와 DTPA가 들어있는 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol (pH 8.8)액 900 µl과 0.1-0.5 mg 정도의 단백질이 들어있는 sample 40 µl, 1-methyl-2-vinylpyridium trifluoromethanesulfonate액 30 µl를 1 ml cuvette에 넣고 섞은 다음 1분간 37°C에 두었다가 DTPA와 ethanol이 들어있는 5,6,6a,11b-tetrahydro-3,9,10-trihydroxybenzo [c]fluorine 액 30 µl를 첨가한 후 525 nm에서 흡광도의 변화를 5분간 측정하였다. Catalase의 활성도는 Abei의 방법<sup>15)</sup>에 따라 이 효소에 의해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 H<sub>2</sub>O와 O<sub>2</sub>로 분해되는 원리를 이용하여 측정하였다. Sample에 19 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 µl를 첨가한 후 0.1 M potassium phosphate buffer 800 µl (pH 7.0)를 더하고 온도를 25°C로 유지시켜주면서 240 nm에서 흡광도의 변화를 4분간 10초 간격으로 측정하였다. Glutathione peroxidase (GPx) 활성도는 Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit를 사용하였다. 50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA (pH 7.4), 1.6 mM glutathione (GSH),

0.32 mM NADPH, 0.8 units의 GSH reductase로 구성된 용액 700  $\mu$ l와 0.1 - 0.5 mg 정도의 단백질이 들어있는 sample 70  $\mu$ l, 0.0007% (v/v) t-BOOH 350  $\mu$ l를 1 ml cuvette에 넣고 섞은 후 340 nm에서 흡광도의 변화를 5초 간격으로 4분간 측정하였다. Caspase 3의 측정은 ApoAlert Caspase Colorimetric Assay Kits (Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. Cell lysate (단백질 50  $\mu$ g)를 96-well plate에 넣은 후 1 mM caspase 3 substrate (DEVD-pNA)를 5  $\mu$ l씩 첨가한 다음 37°C 수조에서 1시간 동안 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

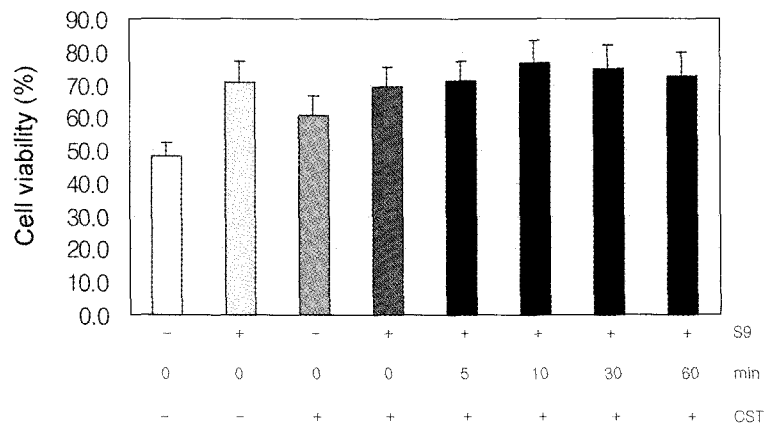
**Malondialdehyde (MDA) 측정** - 과산화지질 함량은 Thiobarbituric acid (TBA)와 과산화지질이 반응하여 생성되는 malondialdehyde를 흡광도로 측정하는 TBARS 법을 사용하였다. Cell lysate 200  $\mu$ l에 cold 10% trichloroacetic acid (TCA) 400  $\mu$ l를 넣고 8,000  $\times$  g, 4°C에서 10분 동안 원심 분리한 후 상등액 500  $\mu$ l와 0.67% TBA 500  $\mu$ l을 섞어

1시간 동안 끓인 후 냉각시켰다. 3,000  $\times$  g, 4°C에서 15분 동안 원심 분리한 후 상등액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

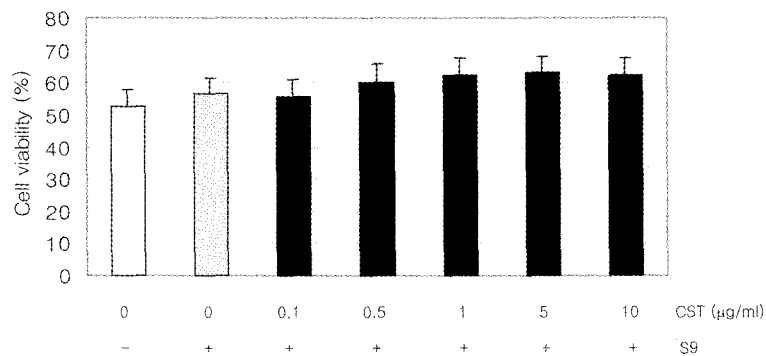
**Data 분석** - 실험은 3회 이상 실시하여 그 평균값을 mean  $\pm$  S.D.로 표시하였으며, Student's t-test를 시행하여 p<0.05인 경우 유의성 있는 것으로 판단하였다.

## 결 과

PC12 세포를 저산소/재관류로부터 보호하는 최적의 청폐사간탕 대사산물을 얻기 위해 100  $\mu$ g/ml의 S9 분획과 1  $\mu$ g/ml의 청폐사간탕을 시간별로 반응시킨 후 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다 (Fig. 1). 또한 청폐사간탕의 농도에 따른 세포보호 작용을 알아보기 위하여 청폐사간탕의 농도를 0.1, 0.5, 1, 5, 10  $\mu$ g/ml로 나누어서 세포에 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다 (Fig. 2). MTT



**Fig. 1.** The protective effect of metabolized Chungpesagan-tang (CST) on hypoxia/reperfusion induced PC12 cell damage at various time points. Cells were treated with 1  $\mu$ g/ml of CST which was pretreated with 100  $\mu$ g/ml of S9 fraction of rat liver homogenate for 0, 5, 10, 30 and 60 min, and incubated at anaerobic chamber for 48 hr followed by incubation at CO<sub>2</sub> incubator for 6 hr. Cell viability was measured by MTT assay and described as the percentage of control.



**Fig. 2.** The dose-dependent protective effect of Chungpesagan-tang (CST) on hypoxia/reperfusion induced PC12 cell damage. Cells were treated with 0.1, 0.5, 1, 5 and 10  $\mu$ g/ml of Chungpesagan-tang which was pretreated with 100  $\mu$ g/ml of S9 fraction of rat liver homogenate for 10 min and incubated at anaerobic chamber for 48 hr followed by incubation at normal CO<sub>2</sub> incubator for 6 hr. Cell viability was measured by MTT assay and described as the percentage of control.

assay 실험 결과 세포의 반응 시간에서는 청폐사간탕과 S9 분획을 10분간 반응시켰을 때 세포의 생존율이 가장 높게 나타났고, 농도별 반응에서는 청폐사간탕의 농도를 1 µg/ml로 처리하였을 때 세포의 생존율이 가장 높게 나타났다. 청폐사간탕을 처리할 때 S9 분획으로 처리한 것이 그렇지 않았을 때 보다 세포의 생존율이 더 좋게 나타났다. 이는 S9 분획이 청폐사간탕을 체내에서 유효한 약물로 변화시켰거나 toxicity를 감소시킨 것으로 생각된다. 그러나 10분이 지나서는 오히려 세포의 생존율이 감소하는 것을 볼 수 있다. S9 분획만을 세포에 처리한 경우도 세포 생존율이 증가한 것은 S9 분획 성분 중에 여러 가지 성장인자를 포함한 영양인자가 포함되어 있기 때문으로 생각된다.

청폐사간탕에 의한 세포 생존율의 증가와 SOD나 GPx, catalase 등의 항산화 효소의 활성이 관련되어 있는지를 확인하기 위해 PC12 세포를 48시간동안 저산소에 둔 후 6시간 동안 재관류 시켜 SOD, catalase, GPx의 활성을 측정하였다 (Table II). 저산소/재관류를 일으킨 PC12 세포에서는 SOD 활성이 104.2%로 약간 올라갔으며, 1 µg/ml의 청폐사간탕을 같이 처리한 경우 SOD 활성이 75.2%로 감소하나 S9 분획으로 전처리한 청폐사간탕을 같이 처리한 경우는 SOD 활성이 다소 증가하는 경향을 보였다. 또한 저산소/재관류를 일으킨 PC12 세포에서는 catalase 활성이 66.5%로 감소하였으나, 1 µg/ml의 청폐사간탕을 같이 처리한 경우는 83.3%로 증가하였으며, S9 분획으로 전처리한 청폐사간탕을 같이 처리한 경우는 비슷하거나 다소 증가하는 경향을 보였다. 한편, 저산소/재관류를 일으킨 PC12 세포에서 GPx 활성이 76.6%로 감소하였으나, 1 µg/ml의 청폐사간탕을 처리한 경우 GPx 활성이 91.4%로 증가하였고 S9 분획으로 전처리한 청폐사간탕을 같이 처리한 경우는 92.6%로 control과 비슷한 경향을 보였다. SOD는 mitochondria 내의 Mn-

SOD와 세포질의 Cu/Zn-SOD 형태로 존재하는데 2개의 superoxide radical ( $O_2^-$ )을  $H_2O_2$ 와  $O_2$ 로 바꾸어 주는 역할을 한다.  $H_2O_2$ 는 잠재적인 hydroxyl radical ( $OH^\cdot$ )의 source가 되므로 여기에 catalase가 작용하여 peroxisome과 mitochondria 내에서  $H_2O_2$ 를  $H_2O$ 와  $O_2$ 로 변환 시켜준다. 또한 GPx는 2개의  $H_2O_2$ 를 써서 환원된 GSH를 GSSG로 산화시켜 세포 내에서 궁극적인 항산화 작용을 한다.<sup>16)</sup> 이 실험의 결과에 의하면 PC12 세포에서 청폐사간탕이 catalase와 GPx의 활성을 정상세포 수준으로 회복하게 함으로써 저산소/재관류에 의한 세포의 손상을 어느 정도 회복시킨다고 생각되나 SOD의 활성과 세포 생존율의 상관관계는 크지 않은 것으로

**Table III.** The level of malondialdehyde (MDA) in PC12 cells treated with metabolized CST after Hypoxia/Reperfusion (H/R) insult.

	MDA	
	Control normoxia	100
H/R		124.6 ± 9.6*
H/R + CST (1 µg/ml)		117.5 ± 10.3
H/R + mCST (0.1 µg/ml)		121.0 ± 11.7
H/R + mCST (0.5 µg/ml)		115.8 ± 9.8
H/R + mCST (1 µg/ml)		114.0 ± 6.8
H/R + mCST (5 µg/ml)		101.7 ± 8.5 <sup>#</sup>

The level of malondialdehyde (MDA) was determined after treated with various concentrations of metabolized Chungpesagan-tang (mCST) or 1 µg/ml of CST as indicated in Materials and Methods. Data are expressed as means (% of untreated normoxia control) ± S.D. (n=5).

\*Significantly different from the corresponding values from the control (p<0.05).

<sup>#</sup>Significantly different from the corresponding values from the H/R (p<0.05).

**Table II.** The anti-oxidant enzyme activities in PC12 cells treated with mCST after Hypoxia/Reperfusion (H/R) insult.

	SOD	Catalase	GPx
	100 ± 8.3 (2.1 ± 0.2) (U/mg)	100 ± 10.5 (13.8 ± 1.5) (U/mg)	100 ± 7.4 (8.1 ± 1.3) (U/mg)
H/R	104.2 ± 9.8	66.5 ± 9.3*	76.6 ± 8.7*
H/R + CST (1 µg/ml)	75.2 ± 5.6	83.3 ± 8.7	91.4 ± 8.7
H/R + mCST (0.1 µg/ml)	86.4 ± 7.7	75.8 ± 7.1	81.7 ± 6.6
H/R + mCST (0.5 µg/ml)	87.7 ± 8.9	83.7 ± 5.5	91.0 ± 8.4
H/R + mCST (1 µg/ml)	97.2 ± 8.2	98.6 ± 11.2 <sup>#</sup>	92.6 ± 9.4 <sup>#</sup>
H/R + mCST (5 µg/ml)	77.1 ± 5.9	92.1 ± 8.9 <sup>#</sup>	76.3 ± 7.5

The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) were determined after treated with various concentrations of metabolized Chungpesagan-tang (mCST) or 1 µg/ml of CST as indicated in Materials and Methods. Enzyme activity was described as the percentage of control. Data are expressed as means (% of untreated normoxia control) ± S.D. (n=5).

\*Significantly different from the corresponding values from the control (p<0.05).

<sup>#</sup>Significantly different from the corresponding values from the H/R (p<0.05).

로 생각된다.

저산소/재관류에 의한 PC12 세포의 산화적 손상을 측정하고 청폐사간탕의 보호효과를 확인하기 위해 산화적 스트레스의 지표이며, 지질과산화 산물인 Malondialdehyde (MDA)의 수준을 측정하였다 (Table III). MDA는 과잉 산소가 존재할 때 세포막에서 다중 불포화지방산과 새로운 지질 자유기가 반응하여 생성된 산소 radical 화합물이 lipid peroxidation의 연쇄반응을 거쳐 나오는 지질 과산화물이다.<sup>17)</sup> 48시간 동안 저산소에 둔 후 6시간의 재관류를 일으킨 PC12 세포에서는 MDA 수준이 증가하였으나 (124.6%), 여기에 1 µg/ml의 청폐사간탕을 처리한 경우는 117.5%로 약간 감소하였으며, S9 분획으로 전처리한 청폐사간탕을 같이 처리한 경우는 비슷하거나 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보여 청폐사간탕이 PC12 세포에서 지질 과산화를 억제함으로써 세포 보호효과를 가진다고 생각된다.

저산소/재관류로부터 청폐사간탕의 PC12 세포 보호효과를 확인하기 위해 세포사멸과 관련되어 있는 단백질 분해 효소인 caspase 3의 활성을 측정하였다 (Fig. 3). 저산소에 노출된 PC12 세포에서 처음에는 caspase 3의 활성이 감소하였으나 48시간 이후 증가하였다. S9 분획으로 전처리한 청폐사간탕을 같이 처리한 경우 caspase 3의 활성이 지연되어 증가하였다. 이는 청폐사간탕이 저산소/재관류에 의한 세포사멸에 의한 세포의 죽음을 지연시키는 것으로 생각되나 의미 있게 caspase 3의 활성에 변화를 주지 않았다. 따라서 청폐사간탕의 세포 보호 작용은 caspase 3의 직접적인 작용을 통해서 일어나지는 않은 것으로 생각된다.

## 고 찰

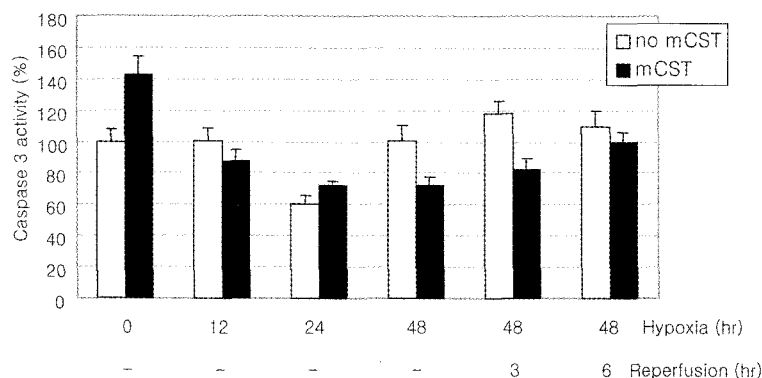
허혈 (ischemia)에 의한 뇌세포의 죽음은 허혈과 재관류에 의해 시작된 여러 가지의 세포 내의 변화에 기인하는데, 뇌세포에 허혈 손상이 가해진 뒤에는 산화적 손상을 쉽게

받게 된다.<sup>18,19)</sup> 이는 재관류에 의해 세포 내에서 증가된 ROS (Reactive Oxygen Species)나 RNS(Reactive Nitrogen Species)가 생성되어 세포의 생존을 크게 억제하기 때문이다. 이들의 예로는 superoxide radical ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical (OH $\cdot$ ), peroxy radical ( $RO_2^-$ ) 등과 생체에 유독한 물질인 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hypochlorous acid (HOCl), peroxynitrite (ONOO $^-$ ), singlet oxygen 등이 있다.

한의학에서의 중풍(뇌졸중)은 갑작스런 의식장애, 운동장애, 및 언어장애 등의 증상이 나타나며 병증은 열증(熱證)의 형태로, 대부분 한약(寒藥)을 응용함에 우선적인 근거를 삼는다. 청폐사간탕은 이열병(裏熱病)에서 간조열(肝燥熱)의 내울(內鬱)을 풀어주며 청양상승(淸陽上升)을 도와줌으로써 태음인의 졸중풍을 치료하는 복합제제로 하기(下氣)를 도와 중풍의 한의학적 치료원칙으로서의 대변을 폐통(快通)시킨다.<sup>6,9,20)</sup> 청폐사간탕은 항산화 효과이외에 항염증작용, 항알레르기 작용이 있는 것으로 보고되었는데 이러한 작용들이 저산소/재관류에 의한 신경세포 손상으로부터 세포를 보호하는 것으로 사료된다.

허혈 치료 효과에 대한 한약물의 연구는 주로 동물실험을 통해 이루어지고 있으나 많은 종류의 약물을 탐색하거나 양이 적은 시료에 대한 연구를 하는 데 있어서 동물실험은 어려운 점이 있다. 이 실험에서는 간 조직에서 나타나는 약물의 일차-통과 효과 (first-pass effect)를 세포배양 실험에서 나타내기 위해 청폐사간탕을 간 효소와 반응시킨 후 신경세포에 처리하여 동물실험에서 나타나는 약물의 대사 영향을 세포배양 실험에서도 나타나도록 한 것에 그 의의가 있다.

청폐사간탕의 전처리에 사용한 간 조직의 S9 분획에는 간세포 내의 microsome과 세포질을 포함하도록 분리한 것으로, CYP3A4, CYP2C9, CYP1A2, CYP2E1, CYP2C19, CYP2D6과 같은 cytochrome P450 효소 등 약물 대사와 관련된 효소가 들어있다.<sup>21)</sup> 대부분의 약물들은 지용성이거나 약산성 혹은 약염기성의 유기 물질이므로 체내에서 여러 변



**Fig. 3.** The change of caspase 3 activity in hypoxia/reperfusion (H/R) induced PC12 cell damage after treatment with metabolized Chungpesagan-tang (mCST). The activity of caspase 3 was measured in PC12 cells after treatment with 1 µg/ml of mCST for various times as indicated in the Materials and Methods. The activity of caspase 3 was described as the percentage of control.

화를 거쳐 좀더 지용성을 낮추거나 수용성이 큰 형태로 전화됨으로써 체내에 분포되는 용적을 감소시키는 과정을 거치게 된다. 이를 통해 체내에서 활성화 되어 각각 유효한 약물로 변화되기도 하며 약물의 작용을 소실, 때로는 체내에서 변화를 받은 후 독성 물질로 변화되기도 한다.<sup>22)</sup> 예를 들어 소염제의 일종인 Prednisone은 inactive한 약물이나 대사된 후 활성이 있는 Prednisolone으로 변하며, 흡입마취제인 Halothane은 대사된 후 독성이 있는 Trifluoroacetic acid로 변한다. 이런 대사반응은 간을 비롯한 다른 기관이나 신체 조직 즉 위장관, 폐, 신장, 피부조직, 심장, 근육조직에서도 일어나지만<sup>23)</sup> 대부분은 간 내에서 일어난다. 한편 ginsenoside-Rb1, -Rb2 같은 인삼 saponin은 전신으로 분포되기 이전 장내 세균에 의해 대사된다.<sup>24,25)</sup>

청폐사간탕은 임상에서 중풍이라 불리는 뇌허혈 질환에 가장 빈번히 사용되는 처방중의 하나이며, 병의 진행을 막아주고 운동기능을 회복시켜 주는데 효력이 있는 것으로 알려져 있으나 분자수준에서의 치료기전은 아직 밝혀진 바가 부족하다. 이 실험을 통해 청폐사간탕이 PC12 세포에서 저산소/재관류에 의한 손상으로부터 세포를 보호하는데 이는 SOD나 GPx, catalase 등의 항산화 효소의 활성을 정상 수준으로 회복하게 하며, 지질과산화 물질인 MDA의 수준을 낮추어 주는 효과가 있음을 확인하였다. 본 실험의 결과는 청폐사간탕이 허혈로 유발된 뇌손상에 보호 효과가 있음을 세포배양 실험을 통해 보여 주었으며 이는 청폐사간탕이 뇌허혈 손상의 방어에 유용한 치료 약물로 쓰일 수 있는 연구기반을 마련할 것으로 보인다. 또한 보다 정확한 치료기전을 밝히기 위해서는 청폐사간탕의 성분을 더 분석하여 세포 보호 작용을 연구할 필요가 있다고 생각된다.

## 사 사

이 연구는 BK21 프로젝트와 보건복지부 한방치료기술연구개발사업 (HMP 01-PJ9-PG1-01CO03-0003)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다. 또 실험에 많은 도움을 준 이은호님과 최화정님에게 감사드립니다.

## 인용문헌

- Murray C. J. L. and Lopez A. D. (1997) Mortality by cause for eight regions of the world Global Burden of disease Study. *Lancet* **349**: 1269-1276.
- 정철, 김옥년, 김민정, 최석문, 어경운, 박미영, 하정상, 변영주 (1993) 허혈성 뇌졸중의 재발과 연관된 위험인자. *영남의대학술지* **10**: 423-431.
- 김현철, 김세주, 최낙경, 김영신, 이병철, 이병철, 이만홍 (2002) 뇌졸중 후 삶의 질에 관한 추적연구. *신경정신의학* **41**: 681-692.
- 안중국, 김병성 (1992) 뇌졸중 환자의 기능평가에 대한 연구. *인제의학* **13**: 83-96.
- 명호진, 이상복, 노재규, 윤병우, 이원용, 김명호, 김주한, 위봉애, 정진상, 권오상 (1989) 최근 국내 뇌졸중의 역학적 동향에 관한 연구. *대한신경과학회지* **7**: 179-187.
- 권도익, 조기호, 고창남, 문상관, 김영석, 배형섭, 이경섭 (1999) 태음인 청폐사간탕의 응용 예를 통한 증후분석. *대한한방내과학회지* **20**: 237-242.
- 윤진구, 조기호, 김영석, 이경섭 (1989) 뇌졸중에 관한 임상통계적 연구. *대한한방내과학회지* **10**: 25-38.
- 홍성길, 강봉주, 김윤진, 강상모, 조동욱 (1999) 허혈/재관류 세포 손상에서 청폐사간탕의 보호 효과. *한국한의학회원 논문집* **5**: 111-117.
- 홍성길, 강봉주, 조동욱 (2000) 허혈/재관류 환경하에서 청폐사간탕의 염증 관련 반응 억제 효과. *한국한의학회원 논문집* **6**: 81-87.
- Chan P. H. (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* **27**: 1124-1129.
- Choi K. S., Park K. A., Lee H. J., Park M. S., Lee J. H., Jeon S. E., Choe M. A. and Park K. C. (2004) Temporal changes in cerebral antioxidant enzyme activities after ischemia and reperfusion in a rat focal brain ischemia model: effect of dietary fish oil. *Brain Res Dev Brain Res.* **152**: 11-18.
- Wilson J. X. and Gelb A. W. (2002) Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. *J Neurosurg Anesthesiol.* **14**: 66-79.
- Francis J. W., Ren J., Warren L., Brown R. H. Jr. and Finklestein S. P. (1997) Postischemic infusion of Cu/Zn superoxide dismutase or SOD:Tet451 reduces cerebral infarction following focal ischemia /reperfusion in rats. *Exp Neurol.* **146**: 435-443.
- Brandon, E. F., Raap, C.D., Meijerman, I., Beijnen, J. H., and Schellens, J. H. (2003) An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research. *Toxicol Appl Pharmacol.* **189**: 233-246.
- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**: 121-126.
- Nita D. A., Nita V., Spulber S., Moldovan M., Popa D. P., Zagrean A. M. and Zagrean L. (2001) Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat. *J Cell Mol Med.* **5**: 163-170.
- Takeuchi N., Matsumiya K., Takahashi Y., Higashino K. and Tanaka F. (1977) Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and lipid metabolism in alpha-tocopherol deficient rats. *Exp Gerontol.* **12**: 63-68.
- White B. C., Sullivan J. M., DeGracia D. J., O'Neil B. J., Neumar R. W., Grossman L. I., Rafols J. A. and Krause G. S. (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci.* **179**: 1-33.
- Graham S. H. and Chen J. (2001) Programmed cell death in cerebral ischemia. *J. Cereb Blood Flow Metab.* **21**: 99-109.

20. 김달래, 고병희, 송일병. (1991) 태음인 청심연자탕과 청폐사간탕의 면역반응과 항 알레르기 효과에 관한 실험적 연구. *경희한의대논문집*. **14**: 131-160.
21. Gunaratna C. and Kissinger P. T. (1997) Application of microdialysis to study the in vitro metabolism of drugs in liver microsomes. *J. Pharm. Biomed Anal.* **16**: 239-248.
22. Pirmohamed M., Madden S. and Park B. K. (1996) Idiosyncratic drug reactions. Metabolic bioactivation as a pathogenic mechanism. *Clin Pharmacokinet.* **31**: 215-230.
23. Krishna D. R. and Klotz U. (1994) Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet.* **26**: 144-160.
24. Bae E. A., Han M. J., Choo M. K., Park S. Y., and Kim D. H. (2002) Metabolism of 20(S)- and 20(R)-ginsenoside Rg3 by human intestinal bacteria and its relation to *in vitro* biological activities. *Biol Pharm Bull.* **25**(1): 58-63.
25. Karikura M., Miyase T., Tanizawa H., Takino Y., Taniyama T., and Hayashi T. (1990) Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. V. The decomposition products of ginsenoside Rb2 in the large intestine of rats. *Chem Pharm Bull.* **38**(10): 2859-2861.

(2005년 5월 17일 접수)