

원 저

Sodium Cyanide로 유도된 신경아세포종 세포주에서 오수유의 신경상해 보호효과

장우석, 이소연, 윤현덕, 신오철, 박창국, 박치상
대구한의대학교 한의학과 내과학전공

Anti-neuronal Injury Effect of *Evodiae Fructus* Water Extract in Sodium Cyanide-induced SK-N-SH Cell Lines

Woo-Seok Jang, So-Yeon Lee, Hyeon-Deok Yoon, Oh-chul Shin, Chang-Gook Park, Chi-Sang Park
Department of Oriental Medicine Graduate school of Daegu Haany University Gyeongbuk, Korea

Objectives : This study investigated effects of *Evodiae fructus* water extract (EVOR) on apoptotic cell death induced by NaCN in SK-N-SH neuroblastoma cell lines. NaCN stimulates glutamate release which can activate glutamate receptors to initiate excitotoxic processes. This study examines the role of EVOR in mediating NaCN-induced cytotoxicity.

Methods & Results : Cytotoxicity was assessed by measuring lactate dehydrogenase (LDH) in the culture media. NaCN (0.1mM) produced cytotoxicity following 12hrs of incubation. NaCN-induced cytotoxicity was partially blocked by EVOR. The treatment of EVOR in simultaneous exposure of cultures to NaCN provided complete protection against cytotoxicity. NaCN-induced cytotoxicity was found to inhibit DNA fragmentation, repaired by cell cycle and simultaneous exposure to NaCN, regenerated with neurite outgrowth by EVOR. These results indicate that damage by NaCN in neuronal cell cultures was repaired by EVOR, whereas NaCN-induced cytotoxicity is blocked primarily by activation of anti-apoptosis.

Conclusions : These results suggest that EVOR may be beneficial for the treatment of dementia and other degenerative problems of the central nervous system.

Key Words: Sodium cyanide, *Evodiae fructus*, anti-neuronal injury

緒 論

신경세포는 바이러스감염, 질병, 노화, 스트레스, 면역저하, 외상 등과 같은 요인들에 의해 손상을 받

게 되는데, 신경섬유의 손상은 회복이 가능하지만 신경세포체가 손상 받게 되면 재생이 되지 않아 기능의 상실을 초래하게 된다^{1,3)}.

신경세포체를 손상시켜 중추신경계의 병변을 일으키는 원인으로는 *buthionine sulfoximine*, *sodium nitroprusside*, *ZnCl₂*, *FeCl₂*에 의한 酸素自由基로 인한 신경상해⁴⁾와 *excitotoxic amino acids(EAAs)*⁵⁾ 및 신경성장인자(*neurotrophic factor, NTF*)의 결핍⁶⁾과 *sodium cyanide(NaCN)*⁷⁾ 등이 포함된 환경폐수와 농업용수로 인한 오염된 채소류와 과일류의 섭취로 인한 축

· 접수 : 2005년 6월 7일 · 논문심사 : 2005년 7월 14일
· 채택 : 2005년 8월 11일
· 교신저자 : 박치상, 대구광역시 수성구 상동 대구한의대학교
심계내과학교실
(Tel: 053-770-2179)

적 등이 있다. 특히 NaCN에 의한 酸素自由基의 독성효과에 대해서는 아직까지 자세한 기전규명이 되어 있지 않았을 뿐만 아니라 酸素自由基의 산화적 손상으로 인하여 유발되는 각종 신경병변에 대한 효과적인 치료방법이 매우 미흡한 실정이다.

이러한 신경세포의 산화적 손상은 중추신경계의 여러 이상을 유발하게 되는데, 치매도 그 중 하나가 될 수 있다.

치매란 일단 정상적으로 성숙한 뇌가 후천적인 외상이 아닌 질병 등 요인에 의해서 기질적으로 손상 내지는 파괴되어 전반적으로 지능, 학습, 언어 등의 인지기능과 고도 정신기능이 감퇴하는 복합적인 임상후군을 일괄하여 지칭하는 것으로⁸⁾ 終日愁愁, 忽不言不語, 不食不飲, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 與之所饑則不受, 與之糞則大喜, 與之衣不服, 與之草木之葉則大喜 등의 증상을 보이며, 飲食 혹은 攝生이適切하지 못하여 濕痰이 沮礙하거나 情緒의 抑鬱 혹은 精神의 쇼크, 打撲損傷 등으로 인해 氣滯血瘀가 발생하거나 大病 혹은 久病 후와 高齡으로 인한 衰弱 등으로 인해 肝腎陰虛하여 발생하거나 先天不足 혹은 遺傳的인 결함으로 인해 발생하게 된다⁹⁾.

吳茱萸(*Evodia rutaecarpa*(Juss.)Benth.)는芸香科(Rutaceae)식물인 吳茱萸의 미성숙 果實로 性은 有小毒熱하고 味는 辛, 苦하며, 肝, 胃經으로 歸經하고, 散寒止痛, 疏肝下氣, 降逆止嘔, 疏肝止痛 등의 효능이 있다^{10,11)}.

吳茱萸의 약리작용은 子宮收縮, 利尿, 抗菌, 殺蟲, 中樞興奮, 鎮痛, 降壓, 強心, 胃液分泌抑制, 小腸活動抑制, 血栓形成時間延長 등이 있으나¹²⁾ 神經障礙에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

이에 著者는 中樞神經系 질환에 효과가 있을 것으로 思料되는 吳茱萸의 神經상해에 대한 보호효과를 규명하기 위하여 Sodium Cyanide(NaCN)로 유도된 신경세포의 상해에 吳茱萸의 물추출액을 반응시켜 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材料

1) 試料의 調製

실험에 사용한 吳茱萸는 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 600g을 엄선하여 세말한 다음 적당량의 3차 증류수를 첨가하여 85℃에서 12시간 가열 한 후 식혀서 이를 gauze로 1차 여과한 후 동결건조 하였다. 동결건조 중량 35g을 회수하여 사용 전 -80℃에 보관하여 3차 증류수로 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

2) 試藥 및 機器

실험에 사용된 시약 중 RPMI 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, trypsin은 Gibco BRL에서, Ethanol은 Merck에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 기기 중에서 light microscope, immunofluorescence microscope는 Olympus에서, FACSscan은 Becton Dickinson에서 구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) SK-N-SH 신경세포주의 배양

실험에 사용된 세포주인 SK-N-SH는 서울대학교 암연구소 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아 계대 배양시켜 5% FBS가 함유된 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 cell culture용 dish에 배양하면서 103세포를 6-well plate에 분주하고 37℃에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀하게 배양한 다음 본 실험에 사용하였다.

2) NaCN 처리에 의한 신경세포사 관찰

정상군(NOR), NaCN을 처리한 대조군(NaCN) 그리고 대조군에 吳茱萸를 처리한 吳茱萸 처리군(EVOR)으로 구분하여 10³세포수로 6-well plate에 분주하고 하룻밤 배양하였다. 吳茱萸 처리군은 세포 독성억제 능력이 각각 5 μ g/ml와 25 μ g/ml에 나타났다. 이 두 농도로 처리하여 5% FBS가 함유된 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 37℃에서 12시간 배양하여 반응을 관찰하였다. 세포들은 현

미경하에서 세포사 유무를 관찰하였으며, NaCN에 의한 신경세포의 세포사에 대한 영향과 吳茱萸의 세포사에 대한 억제효과를 조사하기 위해 위상차 현미경의 200배율에서 세포사가 유도된 200개 정도의 세포수를 촬영하여 조사하였다. 세포사의 억제 농도를 조사하기 위해 96-well plate에 103세포수로 분주하고 하룻밤 배양한 다음 ELISA(enzyme-linker immunosorbent assay) reader를 이용하여 세포사의 유도양상과 세포사가 억제되는 농도를 조사하였다.

3) LDH assay에 의한 신경세포의 손상 측정

정상군(NOR), 대조군(NaCN) 그리고 吳茱萸 처리군(EVOR)으로 나누었으며 吳茱萸 처리군의 경우 각각 5 μ g/ml, 25 μ g/ml 농도로 처리하였다. 각각 위와 같이 처리한 세포를 5% FBS를 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 배양하고 그 상층액 20 μ l를 96-well plate에 옮기고 pyruvate substrate(NADH 1mg/ml)를 20 μ l씩 가한 다음 상온에서 2분간 혼합 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 더 흔들었다. 발색시약(color reagent, Sigma 505-2)을 20 μ l씩 가한 후 상온에서 20분간 혼합한 다음 0.4N NaOH를 100 μ l씩 가하고 상온에서 15분간 더 혼합 후 ELISA reader로 흡광도(A570/A630)를 측정하였다.

4) DNA fragmentation 분석

NaCN을 처리한 신경아세포종 세포주를 103세포수로 6-well plate에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 吳茱萸를 5, 25 μ g/ml 농도로 처리하여 DNA fragmentation을 유도하는 정도를 파악하기 위해 세포 용해액인 lysis buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 200 μ l를 첨가한 후 30분간 얼음에 유지한 다음 proteinase K(100 μ g/ml)를 첨가하였다. 50 $^{\circ}$ C에서 5시간동안 항온조에서 유지하고 phenol/chloroform의 동량을 넣고 혼합 후 상기와 같이 15,000rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상층액을 취해 100% EtOH로 침전시켜 침전물을 건조하여 이를 RNase(50 μ g/ml)가 함유한 dH₂O 35 μ l를 첨가하여 녹인 후 이 용액으로 2% agarose gel을 제조하여 전기영동을 실시한 다음 DNA fragmentation의 유무를 조사하였다.

5) Flow cytometry 분석

NaCN을 처리한 신경아세포종 세포주를 10³세포수로 6-well plate에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 吳茱萸를 5, 25 μ g/ml로 5시간 처리한 후 PSB(phosphate-buffered saline)로 세척하고 trypsin을 처리하였다. 세포를 모아서 1.5ml eppendorf tube에 넣은 다음 1,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 모아 100% EtOH로 침전 후 침전물을 건조시켜 이를 propidium iodide 5 μ g/ml와 RNase를 혼합해서 준비하고 고정된 세포를 원심분리 하여 상층액을 취한 다음 PBS로 한번 세척한다. 동시에 고정된 DNA에 염색시약을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 항온조에서 가온시킨 후, propidium iodide로 염색한 후 호일에 밀봉하여 4 $^{\circ}$ C에 보관하고 유세포 검색분석(flow cytometry analysis)을 실시하였다.

6) Neurite outgrowth 분석

NaCN으로 유도된 신경아세포종 세포주를 laminin coated 6-well plate에 well 당 10³세포수로 분주하고 하룻밤 배양한 다음 NGF(Nerve Growth Factor)를 50ng/ml의 농도로 첨가한 후 5시간동안 자극을 가한 다음 정상군(NOR), 대조군(NaCN) 그리고 吳茱萸 처리군(EVOR)으로 나누고, 吳茱萸 처리군의 경우는 25 μ g/ml 농도로 처리하여 100개의 세포에서 신경돌기 신장유무를 위상차 현미경으로 관찰하였다. 신경돌기를 측정하기 위해 吳茱萸를 5, 25 μ g/ml의 농도로 처리하여 100개의 신경세포의 신경돌기 신장 길이를 위상차 현미경으로 관찰하고 neurite outgrowth로 환산하여 측정하였다.

7) 통계처리

모든 실험은 최소한 3회 수행하였고 실험결과는 대조군에 대한 백분율로 표시하였으며 통계학적 유의성은 student's t-test에 의한 $p < 0.05$ 와 $p < 0.001$ 의 유의성으로 나타내었다.

結果

1. NaCN의 유도에 따른 세포의 형태학적 관찰
NaCN에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위

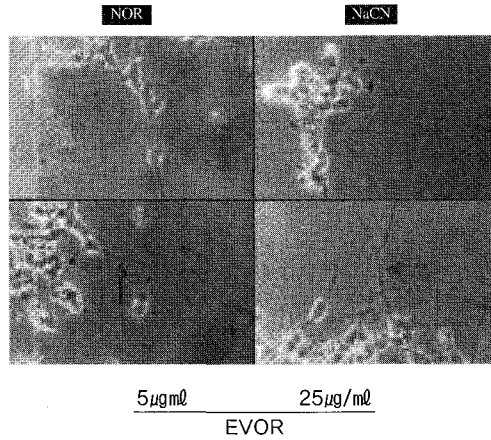


Fig. 1. Morphological pattern in NaCN-induced SK-N-SH cell lines by EVOR water extract. Survival cell of NaCN-induced SK-N-SH cells were observed by morphological characteristic of survival cells and inhibited by EVOR water extract. Similar results were found in at least three separate experiments. Survival cell was determined by phase-microscopy.

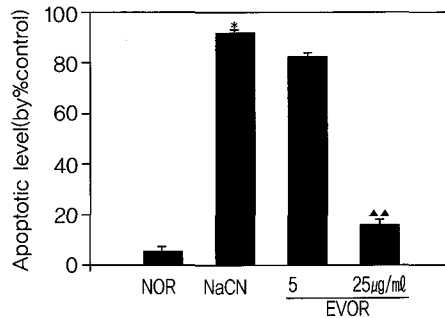


Fig. 2. Inhibitory effect of apoptotic level in NaCN-induced SK-N-SH cell lines by EVOR water extract. Apoptotic ratio of NaCN-induced SK-N-SH cells were observed by ELISA reader and phase-microscopy in medium, induced by CT105 expression. All results are the Means \pm S.D. of about 200 determination cells obtained from three independent experiments. $\star p < 0.05$ versus normal by Student's *t* test; $\blacktriangle\blacktriangle p < 0.001$ versus control by Student's *t* test.

해 위상차 현미경으로 관찰한 결과 정상군에 비해 대조군은 형태학적으로 큰 변화를 나타내었는데, 세포사에 관련된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였다. 吳茱萸를 처리군은 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 신경세포의 생존과 신경돌기의 출현이 미약하게 관찰되었고, 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 신경세포의 생존율이 높게 나타남과 동시에 신경돌기의 신장이 유도된 것으로 나타났다(Fig. 1).

2. NaCN이 신경세포의 세포사에 미치는 영향

신경세포의 세포사가 吳茱萸에 의해 얼마나 억제되는지 세포사의 비율을 조사한 결과 NaCN에 의한 신경세포의 세포사는 정상군의 경우 $4.0 \pm 3.5\%$ 인 것에 비해 대조군은 $92.0 \pm 2.0\%$ 이고 吳茱萸 처리군은 5, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 각각 $82.0 \pm 2.5\%$, $17.0 \pm 0.5\%$ 로 나타났다(Fig. 2).

3. LDH assay에 의한 신경세포 손상측정

NaCN에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 LDH활성도를 분석해본 결과, 정상군에서는 8.5

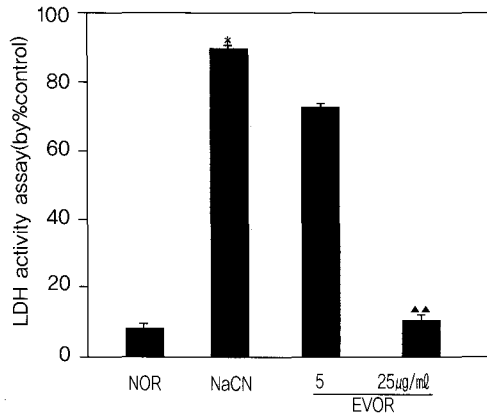


Fig. 3. Effects of EVOR water extract on LDH activity in NaCN-induced SK-N-SH cell lines. Survival cell ratio of NaCN-induced SK-N-SH cells were observed by morphological characteristic of survival cells and inhibited by EVOR water extract. Similar results were found in at least three separate experiments. Survival cell was determined by LDH detection kit from ELISA reader. All results are the Means \pm S.D. of about 200 determination cells obtained from three independent experiments. ★, $p < 0.05$ versus normal by Student's t test; ▲▲, $p < 0.001$ versus control by Student's t test.

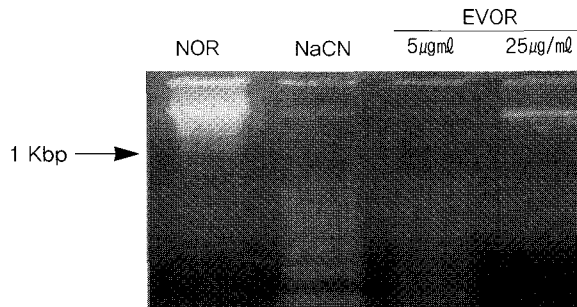


Fig. 4. Effects of EVOR water extract on DNA fragmentation in SK-N-SH cell lines. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from cells. M, DNA-HindIII digest was used as molecular weight markers. Cells were treated with 5 and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of EVOR water extract for 12hrs. Cells were incubated for 12hrs necessary to initiate DNA fragmentation. The results of a typical experiment of three replicates is shown. DNA fragments were analyzed by 2.0% agarose gel electrophoresis.

$\pm 1.5\%$ 에 비해 대조군은 $91.0 \pm 0.5\%$ 로 나타났고, 吳茱萸 처리군은 5, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 각각 $73.0 \pm 2.5\%$, $11.2 \pm 0.5\%$ 로 나타났다(Fig. 3).

4. DNA fragmentation 분석

N대조군의 경우에는 1Kbp이하에서 불연속적인 band가 존재하지만 吳茱萸 처리군에서는 농도가 높아질수록 각 lane에 나타나는 불연속적인 band가 감소하고 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 처리한 것에서는 ladder가

감소하여 거의 소멸되는 것으로 나타났다(Fig. 4).

5. Flow cytometry 분석

N정상군에서는 G0/G1, S, G2/M 단계에서는 각각 59.2%, 10%, 25.5%로 나타났고 대조군의 경우 G0/G1, S, G2/G1 단계에서 각각 71.4%, 5%, 21.5%로 나타났다. 吳茱萸 처리군은 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 G0/G1, S, G2/M 단계가 각각 59%, 8%, 25%로 나타났다(Fig. 5).

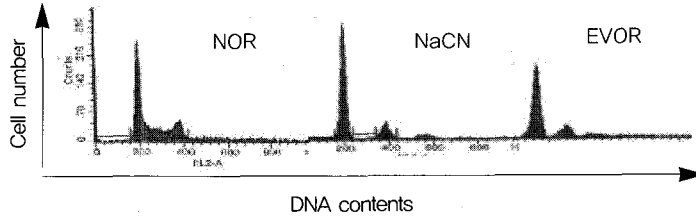


Fig. 5. Effect of EVOR water extract on the cell cycle distribution in NaCN-induced SK-N-SH cell lines. Representative examples of the cell cycle effects of EVOR. The cells were treated with EVOR as indicated, stained with propidium iodide, and The DNA content was analyzed by fluorescence flow cytometry. Arrest of position of the G0/G1 peak, progressed by apoptotic cells, is indicated by arrows. The experiment was repeated four times and representative histograms are presented. Cellular DNA content was determined by flow cytometry of propidium iodide-stained cells as described under 'Experimental Procedures.' The left peak in each profile reflects cells with 2N DNA content, the right peak, cells with 4N DNA content. Cells suspended in PBS, pH 7.4, and analyzed by flow cytometry for a total of 20,000 events.

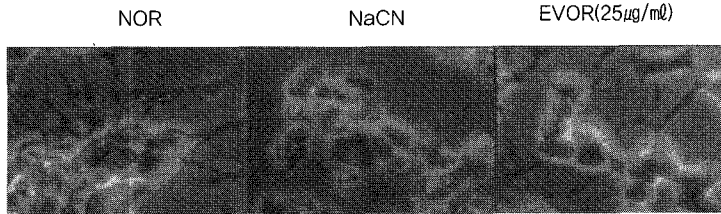


Fig. 6. Induction of neurite outgrowth in NaCN-induced SK-N-SH cell lines by EVOR water extract. NaCN-induced SK-N-SH cell lines were cultured for 5hrs in the presence of the NGF(50ng) and EVOR water extract. neurite outgrowth was visualized by phase-contrast microscope.

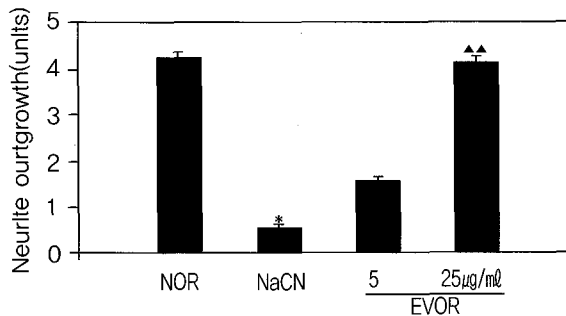


Fig. 7. Effect of EVOR water extract on neurite outgrowth length in NaCN-induced SK-N-SH cell lines. NaCN-induced SK-N-SH cell lines were cultured for 5 hours in the presence of the NGF(50ng) and EVOR water extract. neurite outgrowth was visualized by phase-contrast microscope. All results are the Means±S.D. of about 200 determination cells obtained from three independent experiments.★, $p < 0.05$ versus normal by Student's *t* test; ▲▲, $p < 0.001$ versus control by Student's *t* test.

6. Neurite outgrowth 분석

정상군에서의 신경돌기는 잘 발달되어 분지되어 있으나 NaCN에 의해 신경돌기가 손상을 입은 경우

는 신경이 억제되는 상태로 나타났고, 吳茱萸를 25 µg/ml 농도로 처리한 군에서는 신경돌기가 잘 발달 되어 자라게 되는 양상을 보여주고 있다(Fig. 6).

Neurite outgrowth length로 환산하여 조사한 결과 대조군이 0.55 ± 0.2 일 때 정상군은 4.25 ± 2.50 이고, 吳茱萸 처리군에서는 5, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도일 때 각각 1.55 ± 0.35 , 4.15 ± 3.50 으로 나타났다(Fig. 7).

考 察

신경세포는 여러 가지 요인에 의해 손상을 입게 되는데, 그 중 산업폐수나 오염된 농업용수 등으로 인한 경우가 있으며, 도금 등의 세정용수에 포함된 중금속 및 유독성 시안화물의 축적으로 인한 문제점이 부각되고 있다⁷⁾. 따라서 NaCN에 의한 위해성과 그로 인한 신경계 질환에 대한 연구가 중요성을 가지게 된다.

현재까지 밝혀진 NaCN이 신경세포를 저해하는 기전을 살펴보면 酸素自由基의 생성과 excitotoxic amino acids(EAAs)의 흡수경로에서의 수용체 및 신경성장인자(neurotrophic factor, NTF)의 결핍 등이 있다¹⁴⁾. 특히 酸素自由基는 세포막에서 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 질소자유기의 하나인 nitric oxide(NO)와 상호 작용함으로써 독성이 강한 물질인 peroxynitrite을 생성하여 병변을 더욱 가속화시킨다¹⁵⁾. 이중 reactive oxygen species(ROS)나 reactive nitrogen species(RNS)와 같은 自由基는 생체 내에서 여러 생리적인 반응에 관여하고 있으나 이들이 필요 이상 형성되는 경우는 세포막의 불포화 지방산을 과산화시켜 그 결과 지질과산화반응을 가속화시킬 뿐만 아니라 세포질내의 protein kinase C(PKC)와 같은 이차전달자를 변성시키고 단백질 및 DNA 합성 억제를 가속화시킨다¹⁶⁾. 특히 酸素自由基는 항산화계에 영향을 주어 superoxide dismutase(SOD)나 catalase와 같은 항산화효소의 기능을 저하시킴으로써 인체내에 불필요한 酸素自由基의 축적을 초래케 하여 각종 세포나 조직에 산화적 손상을 유발 한다¹⁷⁻¹⁸⁾. 최근의 研究에서 酸素自由基는 배양 해마신경세포에서 흥분성아미노산(excitatory amino acid, EAA)의 분비를 촉진시킨다고 보고됨으로써 酸素自由基와 흥분성아미노산과의

상호작용에 대한 현상이 밝혀지게 되었고 더욱이 이같이 분비된 酸素自由基는 세포내 자유 Ca^{2+} 의 농도를 증가시켜 결국 세포의 사멸을 초래함은 물론이고 NO와 작용함으로써 맹독성 물질인 peroxynitrite을 형성하여 세포의 손상을 가중시켜 중추신경계를 구성하고 있는 신경세포손상의 병인으로 증명되었다¹⁹⁻²¹⁾.

위와 같은 여러 가지 연구들이 있어 왔으나 NaCN에 의한 酸素自由基의 독성효과에 대하여 아직까지 자세한 기전규명이 되어 있지 않았을 뿐만 아니라 酸素自由基의 산화적 손상으로 인하여 유발되는 각종 신경병변에 대한 효과적인 치료방법이 없는 실정이다²²⁻²⁵⁾.

산화적 손상으로 인한 신경세포의 상해는 여러 가지 중추신경계의 이상을 초래할 수 있다. 특히 NaCN에 의해 유도되는 신경세포의 산화적 손상은 칼슘의 생성을 유도하여 glutamate 분비에 관여하는 NMDAR(N-methyl-D-aspartate receptor)의 기능이상과 NO생성에 관여하여 nitric oxide synthase를 저해하는 L-NAME의 작용으로 인한 apoptosis와 유사하며, 이러한 과정은 무산소화를 유도하고 과산화수소를 생성하며 DNA의 분질을 초래하여 미토콘드리아의 막전위를 감소시키고 Bcl-2, Bcl-x(L)의 기능을 저하시켜 apoptosis와 같은 신경의 퇴행성 변화를 가져온다²⁶⁻³⁴⁾.

이러한 신경세포의 손상은 전반적인 인지기능의 장애를 주된 증상으로 하고 만성적으로 진행하여 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 고도의 대뇌기능의 장애를 유발하는 치매 등의 뇌의 퇴행성 변화로 인한 여러 중추신경계의 질환을 일으킬 수 있다³⁵⁻³⁷⁾.

한의학적으로 치매는 明代 張介賓³⁸⁾의 《景岳全書·雜證謨》癲狂篇에서 상세하게 언급되어 鬱結·不遂·思慮·疑貳·驚狂 등과 같은 구체적인 病因·病機와 治法·豫後에 대해서 설명하였고 이후에 呆病, 癲狂, 健忘, 虛勞 등의 범주에서 다루어졌으며, 陳³⁹⁾은 《辨證錄》에서 肝氣鬱結이 胃氣之衰를 유발하여 木克土로 인해 痰이 胸中에 쌓이게 되

면 神明이 不清하게 되어 치매가 일어난다고 하여 呆病의 病因病機에 관하여 비교적 자세한 설명을 하였다.

치매의 주요 病因病機로는 痰飲, 七情傷, 稟賦不足, 肝腎不足, 瘀血內阻, 心肝火盛 등으로 크게 나눌 수 있고 각각의 원인에 따라 豁痰開竅, 理氣和血, 滋補肝腎, 填精補髓, 活血去瘀, 清熱瀉火 등의 치법이 사용된다.^{9,39-40).}

吳茱萸는 芸香科(Rutaceae)에 속한 落葉灌木 或은 小喬木인 吳茱萸(*Evodia rutaecarpa(Juss)Benth.*), 石虎 或은 毛脈吳茱萸의 未成熟果實을 微火로 炕乾한 것이다^{20).} 性은 溫有毒하고 味는 辛苦하고 肝, 胃經으로 歸經하며 散寒止痛, 疏肝理氣, 溫脾燥濕하는 효능이 있어 脘腹冷痛, 虛寒泄瀉, 寒濕頭痛, 脘腹脹痛, 嘔逆吞酸, 風寒濕痺, 寒濕脚氣, 寒濕水腫 등을 治한다^{10-11).} 吳茱萸의 약리작용은 子宮收縮, 利尿, 抗菌, 殺蟲, 中樞興奮, 鎮痛, 降壓, 強心, 胃液分泌抑制, 小腸活動抑制, 血栓形成時間延長 작용 등이 알려져 있으나¹²⁻¹³⁾ 신경상해에 대한 신경보호효과에 대한 실험적 보고는 아직 없다.

이에 著者는 吳茱萸의 신경보호효과를 규명하기 위해 NaCN의해 유도에 따른 신경아세포종 세포주의 형태학적변화, 신경세포사에 미치는 영향 및 DNA fragmentation 분석, LDH assay에 의한 신경세포 손상측정, flow cytometry 분석, neurite outgrowth 분석 등을 통해 연구하였다.

신경세포의 최종적인 현상으로 NaCN에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 광학현미경하에서 관찰한 결과 정상군에 비해 NaCN으로 유도된 신경세포는 형태학적으로 큰 변화를 보였는데, 세포사에 관련된 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였다. 그러나 吳茱萸 처리군에서는 5 μ g/ml에서 신경세포의 생존과 신경돌기의 출현이 미약하게 관찰되었고, 25 μ g/ml에서는 신경세포의 생존율이 높게 나타남과 동시에 신경돌기의 신장이 유도된 것으로 나타났다(Fig. 1).

신경세포의 세포사가 吳茱萸에 의해 어느 정도 억제되는지 세포사의 비율을 조사한 결과 吳茱萸 처

리군에서는 세포사가 유의하게 억제되었다(Fig. 2).

NaCN에 의한 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 LDH의 활성도를 측정하여 관찰한 결과 吳茱萸 처리군의 경우 세포사의 비율이 유의하게 감소되었다(Fig. 3).

이상의 결과를 종합해 볼 때 吳茱萸는 세포사가 유도될 때의 nuclease효소에 의한 염색체의 DNA 절단으로 유전자에서 mRNA를 통한 단백질 생산중단의 억제 과정에 관여하고 신경돌기의 재생에 관여하는 단백질인 BDNF, NGF 등의 생성을 촉진시켜 신경세포의 세포사 억제와 신경세포의 재생시키는 것이 가능할 것으로 생각되며, NaCN에 의한 신경세포의 세포사에서 吳茱萸가 신경상해의 과정을 억제 또는 지연시키는 효과를 보이는 것으로 생각된다.

세포사가 일어날 경우 자가효소에 의해 세포내의 염색체가 절단되면 약 200~400bp 씩 불연속적인 절편이 존재하게 되는데 세포사의 일차적인 과정인 세포핵의 변화를 관찰한 결과 대조군의 경우에는 1Kbp 이하에서 불연속적인 대(ladder)가 존재하지만 吳茱萸 처리군에서는 농도가 높아질수록 각 lane에서 나타나는 불연속적인 대가 감소하고 25 μ g/ml 이상의 농도로 처리한 것부터는 불연속대가 감소하여 거의 소멸되는 양상을 보였다(Fig. 4). 이는 吳茱萸가 NaCN에 의한 신경세포의 세포사로부터 신경상해를 억제하는 것으로 생각된다.

신경세포의 세포사가 유도될 경우 세포주기에서 일차적으로 변화를 보이는데, 세포사에서는 G0/G1 내지 G2/M의 arrest가 유도되는 경우가 일반적인 현상으로 나타난다. 세포주기의 특정단계를 flow cytometry로 조사한 결과 吳茱萸를 25 μ g/ml 농도로 처리시에 NaCN에 의한 신경세포의 신경상해를 G0/G1 단계에서 정지시켰다(Fig. 5). 이는 세포주기의 진행을 촉진시키므로 세포증식을 촉진하기 때문이라 보이며, 吳茱萸에는 신경세포의 파괴를 억제하고 재생작용을 유도하는 성분이 있는 것으로 생각된다.

신경세포의 신경돌기 상해는 세포사에 영향을 주기 때문에 정상군에서의 신경돌기는 잘 발달하여

분지 되어 있으나 NaCN에 의해 신경돌기가 손상을 입은 경우에는 신장이 억제된다. 이러한 상태에서 吳茱萸를 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하면 신경돌기가 잘 발달되어 자라는 것을 보여주고 있다(Fig. 6). Neurite outgrowth length로 환산하여 조사한 결과 吳茱萸의 농도가 증가할수록 neurite outgrowth length가 증가한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 7). 따라서 吳茱萸에는 신경돌기의 신장을 억제시키는 현상을 저해시키거나 신장을 촉진하는 유효 성분이 함유된 것으로 생각된다.

이상과 같이 吳茱萸는 NaCN에 의해 유도된 신경아세포종 세포주에서의 신경세포의 산화적 손상으로 인한 신경상해에 현저한 억제효과를 보이고 있어 신경상해로 인한 치매 및 기타 중추신경계 질환의 치료 및 예방에 효과가 있을 것으로 추정되며, 吳茱萸를 이용하여 신경상해를 일으키는 인자와 연결하여 지속적인 분자생물학적 연구와 함께 임상실험 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

結 論

吳茱萸의 신경상해 보호효과를 규명하기 위해 Sodium Cyanide로 유도된 신경아세포종 세포주에서 신경세포의 상해를 유도하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 吳茱萸는 유의하게 세포사의 비율을 감소시키고 신경돌기의 생성을 유도하며 신경세포의 세포사를 억제하였다.

2. 吳茱萸는 신경세포의 세포사로 인한 LDH의 활성도를 유의하게 감소시켰다.

3. 吳茱萸는 DNA fragmentation을 억제하여 세포 생존을 촉진하였다.

4. 吳茱萸는 세포주기의 G0/G1단계의 정지를 해제시켜 S단계를 촉진하여 세포증식을 유도하였다.

5. 吳茱萸는 신경세포의 Neurite outgrowth를 유의하게 촉진하였다.

이상과 같은 결론으로 吳茱萸가 Sodium Cyanide로 유도된 신경아세포종 세포주에서 세포사를 효과

적으로 억제하고 신경세포의 손상을 방어한다는 것이 입증되었다.

參考文獻

1. Garden GA. Microglia in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *Glia*. 2002;40(2):240-51.
2. Gold BG, Griffin JW, Price DL. Somatofugal axonal atrophy precedes development of axonal degeneration in acrylamide neuropathy. *Arch Toxicol*. 1992;66(1):57-66.
3. Kiernan JA, Macpherson CM, Price A, Sun T. A histochemical examination of the staining of kainate-induced neuronal degeneration by anionic dyes. *Biotech Histochem*. 1998;73(5):244-54.
4. Ha HJ, Kwon YS, Park SM, Shin T, Park JH, Kim HC, Kwon MS, Wie MB. Quercetin attenuates oxygen-glucose deprivation- and excitotoxicity-induced neurotoxicity in primary cortical cell cultures. *Biol Pharm Bull*. 2003;26(4):544-6.
5. Luo X, Weber GA, Zheng J, Gendelman HE, Ikezu T. C1q-calreticulin induced oxidative neurotoxicity: relevance for the neuropathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*. 2003;135(1-2):62-71.
6. Scott HL, Pow DV, Tannenberg AE, Dodd PR. Aberrant expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002;22(3):206.
7. Gao XD, Ye WC, Yu AC, Zhang Y, Tan RX, Li M, Hsiao WL. Pulsatilloside A and anemoside A3 protect PC12 cells from apoptosis induced by sodium cyanide and glucose deprivation. *Planta Med*. 2003;69(2):171-4.
8. 민성길. 최신정신의학. 서울:—潮閣. 2000:189.
9. 이봉교. 症狀鑑別治療. 서울:정보사. 1991:122-6.
10. 서부일, 김상찬 監修. 本草集成. 서울:목과도.

- 2000:390.
11. 강병수 외. 本草學. 서울:영림사. 1994:337.
 12. 이상인, 안덕균, 신민교. 韓藥臨床應用. 서울:성보사. 1982:234.
 13. 王本上. 現代中藥藥理學. 天真:天真科學技術出版社. 1997:608.
 14. Cho SO, Seong YH. Protective effect of fangchinoline on cyanide-induced neurotoxicity in cultured rat cerebellar granule cells. *Arch Pharm Res.* 2002;25(3):349-56.
 15. Porasuphatana S, Tsai P, Pou S, Rosen GM. Perferyyl complex of nitric oxide synthase : role in secondary free radical formation. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1569(1-3):111-6.
 16. Wang HT, Yang XL, Zhang ZH, Lu JL, Xu HB. Reactive oxygen species from mitochondria mediate SW480 cells apoptosis induced by Na₂SeO₃. *Biol Trace Elem Res.* 2002;85(3):241-54.
 17. Voelkel NF, Czartolomna J. Vanadate potentiates hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;259(2):666-72.
 18. Guarnieri C, Ventura C, Georgountzos A, Muscari C, Budini R. Involvement of superoxide radicals on adrenochrome formation stimulated by arachidonic acid in bovine heart sarcolemmal vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1985;838(3):355-60.
 19. Shinomiya K, Dawson J, Spengler DM, Konrad P, Blumenkopf B. An analysis of the posterior epidural ligament role on the cervical spinal cord. *Spine.* 1996;21(18):2081-8.
 20. Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Piroli GG, Lima AE, De Nicola AF. The 21-aminosteroid U-74389F increases the number of glial fibrillary acidic protein-expressing astrocytes in the spinal cord of control and Wobbler mice. *Cell Mol Neurobiol.* 1996;16(1):61-72.
 21. Rudnik-Schoneborn S, Forkert R, Hahnen E, Wirth B, Zerres K. Clinical spectrum and diagnostic criteria of infantile spinal muscular atrophy : further delineation on the basis of SMN gene deletion findings. *Neuropediatrics.* 1996;27(1):8-15.
 22. Macianskiene R, Matejovic P, Sipido K, Flameng W, Mubagwa K. Modulation of the extracellular divalent cation-inhibited non-selective conductance in cardiac cells by metabolic inhibition and by oxidants. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(7):1371-85.
 23. Saransaari P, Oja SS. Mechanisms of D-aspartate release under ischemic conditions in mouse hippocampal slices. *Neurochem Res.* 1999;24(8):1009-16.
 24. Downing JE. Transient block of respiratory chain by cyanide triggers NADPH-diaphorase activity(a marker for nitric oxide synthase) in Dunning rat prostatic epithelium. *Cancer Lett.* 1997;121(1):91-7.
 25. Saransaari P, Oja SS. Enhanced GABA release in cell-damaging conditions in the adult and developing mouse hippocampus. *Int J Dev Neurosci.* 1997;15(2):163-74.
 26. Cho SO, Seong YH. Protective effect of fangchinoline on cyanide-induced neurotoxicity in cultured rat cerebellar granule cells. *Arch Pharm Res.* 2002;25(3):349-56.
 27. Jensen MS, Ahlemeyer B, Ravati A, Thakur P, Mennel HD, Kriegelstein J. fangchinoline, a bis-benzylisoquinoline alkaloid, Ca²⁺ channel blocker, on cyanide-induced neurotoxicity rat cerebellar granule neurons. *Neurochem Int.* 2002;40(4):285-93.
 28. Jensen MS, Nyborg NC, Thomsen ES. Various nitric oxide donors protect chick embryonic neurons from cyanide-induced apoptosis. *Toxicol Sci.* 2000;58(1):127-34.
 29. Shou Y, Li N, Li L, Borowitz JL, Isom GE. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-X(S) and Bax contributes to cytochrome c release in

- cyanide-induced apoptosis. *J Neurochem.* 2002;81(4):842-52.
30. Hutter-Paier B, Grygar E, Loibner M, Skofitsch G, Windisch M. Effects of NaCN and ionomycin on neuronal viability and on the abundance of microtubule-associated proteins MAP1, MAP2, and tau in isolated chick cortical neurons. *Cell Tissue Res.* 2000;302(1):39-47.
31. Myers KM, Fiskum G, Liu Y, Simmens SJ, Bredezen DE, Murphy AN. Bcl-2 protects neural cells from cyanide/aglycemia-induced lipid oxidation, mitochondrial injury, and loss of viability. *J Neurochem.* 1995;65(6):2432-40.
32. Ray P, Monroe FL, Berman JD, Fiedler J. Cyanide sensitive and insensitive bioenergetics in a clonal neuroblastoma x glioma hybrid cell line. *Neurochem Res.* 1991;16(10):1121-4.
33. Jones DC, Prabhakaran K, Li L, Gunasekar PG, Shou Y, Borowitz JL, Isom GE. Cyanide enhancement of dopamine-induced apoptosis in mesencephalic cells involves mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Neurotoxicology.* 2003;24(3):333-42.
34. Cebers G, Cebere A, Liljequist S. Metabolic inhibition potentiates AMPA-induced Ca^{2+} fluxes and neurotoxicity in rat cerebellar granule cells. *Brain Res.* 1998;779(1-2):194-204.
35. 李符永 譯. ICD-10 정신 및 행동장애 분류. 서울:一潮閣. 1994:63-6.
36. 郭隆璿. 圖解腦神經外科學. 서울:第一醫學社. 1992:27-31.
37. 이가옥. 노인생활실태 분석 및 정책 과제. 한국보건사회연구원. 1994:114-132.
38. 張景岳. 景岳全書. 上海:上海科學技術出版社. 1985:573-8.
39. 陳士鐸. 辨證錄. 北京:人民衛生出版社. 1996:241-3.
40. 全國韓醫科大學心系內科學教室 編. 心系內科學. 서울:서원당. 1999:285-6, 436-50.