

간효소에 의해 대사된 涼膈散火湯의 저산소/재관류로부터 PC12 세포 보호효과

소 윤 조[#]

경희대학교 동서의학대학원 신경과학교실
(Received January 28, 2005; Revised February 7, 2005)

Protective Effect of Yangguksanwha-tang Metabolized by Liver Homogenate on Hypoxia-reperfusion Induced PC12 Cell Damage

Yunjo Soh[#]

Department of Neuroscience, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea

Abstract — The protective effect of Yangguksanwha-tang (YST) against hypoxia-reperfusion insult was investigated in PC12 cells. To elucidate the mechanism of the protective effect of YST, cell viability, the changes in activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, caspase 3 and the production of malondialdehyde were observed after treating PC12 cells with YST which was metabolized by rat liver homogenate. Pretreatment of YST with liver homogenate appeared to increase its protective effect against hypoxia-reperfusion insult. The result showed that YST had the highest protective effect against hypoxia/reperfusion at the dose of 2 µg/ml in PC12 cells, probably by recovering the redox enzyme activities and MDA to control level.

Keywords □ Yangguksanwha-tang, antioxidant activity, hypoxia/reperfusion

뇌졸중(腦卒中)은 뇌신경조직의 특성상 발병후의 원상회복에 한계성을 가지고 있으므로 환자가 비록 사망하지 않는다 해도 심각한 신체적 정신적 장애를 후유증으로 남기어 환자는 물론 그 가족들에게도 많은 정신적, 경제적 어려움을 준다. 중추신경계내 혈관의 손상 혹은 폐색에 의한 뇌허혈은 허혈의 정도 및 손상부위에 따라 치명적인 뇌손상을 일으키거나, 국소적인 뇌손상에 따른 장기적인 후유증을 남기게 된다.¹⁻³⁾ 뇌졸중은 크게 두가지로 나누는데 허혈성 뇌졸중과 출혈성 뇌졸중으로 구분할 수 있다. 허혈성 뇌졸중은 뇌의 일부에 혈류가 차단되거나 부족하게 되어 뇌조직으로의 산소와 영양공급이 충분치 못할 때 발생되고 출혈성 뇌졸중은 뇌의 혈관이 파열되어 뇌속에서 출혈돼 생긴다. 허혈성 뇌졸중의 경우에는 뇌혈관의 동맥경화증으로 인한 뇌동맥의 혈전 및 색전과 심장질환 등에 의한 심인성색전이 주된 원인이며 뇌출혈의 경우는 고혈압에 의한 원발성 뇌출혈과 동정맥 기형이나 동맥류에 의한 지주막하 출혈이 중요한 원인이라고 할

수 있다.

허혈성 뇌손상의 예방 및 억제에 위한 많은 노력이 다각적으로 이어져 왔으며, 뇌손상의 기전의 규명과 이를 차단하여 허혈성 뇌손상의 억제수단을 개발하기 위한 연구가 오랫동안 이루어져 왔으며, 이에 따라 허혈성 뇌손상 기전에 관련된 많은 인자들이 규명되고 있고 그 결과로 허혈성 뇌손상을 억제하기 위한 다양한 방법 혹은 약물들이 제시되고 있다.⁴⁾ 뇌허혈 상태에서 신경세포가 생존할 수 있는 시간이 극히 제한되어 있다는 사실 때문에 뇌허혈 급성기에 재관류(reperfusion)를 위한 혈전용해제와 신경세포의 손상을 최소화 시킬 수 있는 적절한 신경보호제의 개발이 뇌졸중 치료의 주된 관건으로서, 이를 위한 연구가 진행되고 있다.⁵⁾ 이러한 뇌졸중의 예방과 치료제는 국내외를 막론하고 오래 전부터 연구되어왔으나 아직 확실한 치료방법이 개발되지 못하였다. 전통적으로 많은 자료를 가지고 있는 한약재의 약물 치료는 오랜 임상경험으로 많은 효과가 있어왔지만 명확한 치료 기전이 알려지지 않았다.

허혈 치료 효과에 대한 한약물의 연구는 주로 동물실험을 통해 이루어 지고 있으나 많은 종류의 약물을 탐색하거나 양이 적은 시료에 대한 연구를 하는 데 있어서 동물실험은 어려운 점이

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
현주소: 전북대학교 치과대학 약리학교실
(전화) 063-270-4038 (팩스) 063-270-4037
(E-mail) ysoh@chonbuk.ac.kr

있다. 따라서 세포배양에 의한 한약물 연구의 필요성이 증가하고 있으나 동물실험에서 나타나는 약물의 흡수, 대사등의 효과를 볼 수 없는 단점이 있다. 본 실험에서는 간 조직에서 나타나는 약물의 일차-통과 효과 (first-pass effect)를 세포배양 실험에서 나타내기 위해 한약물을 간 효소와 반응시킨 후 신경세포에 처리하였다. 그리하여 동물실험에서 나타나는 약물의 대사 효과를 세포배양실험에서도 나타나게 한 후 약물의 기전을 연구하였다.

본 실험에 쓰인 양격산화당은 임상에서 가장 빈번히 사용되는 처방중의 하나이며⁶⁻⁸⁾ 혈압상승 및 국소 뇌혈류 증가⁹⁾ 그리고 지주막하출혈이후의 제반 병리적 변화를 회복¹⁰⁾시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 분자수준에서 양격산화당의 치료기전은 아직 연구가 되어 있지 않다. 이에 저자는 양격산화당의 작용기전을 밝히기 위하여 간 효소로 양격산화당을 반응시킨 후 이 한약물이 저산소/재관류에 의한 신경세포의 손상을 보호하는 것과 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 효소들인 SOD, GPx, CAT에 대한 활성을 분석하였다.

실험 방법

실험재료

시약은 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.

세포 배양

PC12 세포는 신경세포의 특성을 나타내는 세포로 미국 세포주 은행(America Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.)에서 분양 받아 사용하였다. 세포는 5% fetal bovine serum(FBS)과 10% horse serum이 포함된 DMEM 세포배양액에 5% CO₂, 95% 대기공기 및 37°C 세포배양기에서 배양하였다.

양격산화당의 조제

본 실험에 사용된 양격산화당은 경희대학교 한방병원에서 공급 받았다. 처방내용은 Table I과 같으며 1첩(48.0 g)을 3000 ml round flask에 넣고 2000 ml의 정제수를 가하여 냉각기가 부착된 전탕기에서 1시간 30분을 가열한 후 여과지로 여과한 여액을 동결 건조하였다.

간 효소에 의한 양격산화당의 전처리

양격산화당을 배지에 처리하기 16시간 전, 배지를 DMEM에서 MEM으로 교체하여 안정화시켰다. 흰쥐의 간을 Homogenization Buffer(0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM Potassium

Table I – The amount and composition of yangguksanwha-tang

한약명(韓藥名)	생약명	용량(g)
생지황(生地黃)	Rehmanniae Radix Preparat	8.0 g
인동등(忍冬藤)	Lonicerae Caulis	8.0 g
연교(蓮翹)	Forsythiae Fructus	8.0 g
산치자(山梔子)	Gardeniae Fructus	4.0 g
박하(薄荷)	Menthae Herba	4.0 g
지모(知母)	Anemarrhenae Rhizoma	4.0 g
석고(石膏)	Gypsum Fibrosum	4.0 g
방풍(防風)	Ledebouriellae Radix	4.0 g
형개(荊芥)	Schizonepetae Herba	4.0 g
총량		48.0 g

phosphate, pH 7.4, 1 mM DTT)에 넣어 homogenization 후 9000×g에서 4°C에서 20분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 취하여 약물대사 효소로 사용하였다(상등액을 S9 분획이라 칭함).¹¹⁾ 대부분의 약물대사 효소가 존재하는 S9 분획(100 µg/ml)과 양격산화당(20 µg/ml)을 시간별로 반응시킨 후 1 ml씩 취하여 0.22 µm Syringe Filter를 이용하여 멸균여과 하였다. 이처럼 전 처리된 양격산화당을 plate당 10⁴ cells/well인 96 well plate에 처리하였다. 저산소 배양은 N₂ 85%, H₂ 5%, CO₂ 10%가 들어있는 저산소배양기(ThermoForma, Co. Marietta, OH, U.S.A.)에서 48시간 이루어지고, 재관류(reperfusion) 유발은 CO₂ 5%, air 95%가 들어있는 정상적인 배양기에서 6시간 동안 이루어졌다.

MTT Assay

세포 생존율을 측정하기 위해 MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay를 사용하였다. MTT reagent(5 mg/ml stock) 96 well에 10 µl씩 넣은 후 37°C incubator에서 2시간 동안 반응시킨다. 배지를 제거한 후 DMSO 150 µl를 넣은 후 70°C incubator에서 10분간 녹인 다음 ELISA reader를 이용하여 570 nm와 650 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 측정하였다.

항산화 효소 활성 측정

SOD(Superoxide dismutase)의 활성도 측정은 Oyanagui의 방법을 사용하였다.¹²⁾ 요약하면, sample을 용량별(10 µl, 25 µl, 50 µl)로 100 µl의 Reagent A(0.5 mM hypoxanthine, 10 mM hydroxylamine HCl, pH 7.0)에 가한 후, H₂O 250 µl를 섞고 10 분간 실온에서 배양하였다. 이 후 Reagent B(5 mU/ml xanthine oxidase/EDTA-phosphate buffer) 100 µl를 각 tube에 넣고 37°C incubator에서 30분간 반응시켰다. 반응 종결을 위해 Reagent C(300 µg/ml sulfanilic acid, 5 µg/ml N-1-naphthylethylenediamine and 16.7% acetic acid) 1 ml을 넣고 20분 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 1 unit은 550 nm에서 흡광도를 측정하였

을 때 hypoxanthine-xanthine oxidase로부터 나오는 superoxide anion의 생성을 50% 억제하는 SOD의 양으로 정의하였다. Catalase 활성도는 Abei의 방법¹³에 따라 이 효소에 의해 H₂O₂가 H₂O와 O₂로 분해되는 원리를 이용하여 측정하였다. H₂O₂를 기질로 하여 240 nm에서 흡광도의 변화를 4분간 10초 간격으로 측정하였다. Catalase의 활성도는 1분 동안에 1 μmole의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였다. Glutathione peroxidase(GPx)의 활성은 GPx assay kit(Sigma Chemical Co.)를 이용하여 측정하였다. 50 mM Tris/HCl buffer(pH 7.4), 5 mM EDTA, 2.1 mM reduced GSH, 0.25 mM NADPH과 glutathione reductase(0.8 unit)가 들어있는 용액 920 μl와 효소액 70 μl (0.3~1.0 mg 단백질을 잘 섞은 후 10 μl의 30 mM t-butyl hydroperoxide를 첨가하여 반응을 시작하였다. GPx의 활성은 340 nm에서 4분 동안 5초 간격으로 측정하였다. GPx의 활성도는 1분 동안 1 μmole의 NADPH를 산화시키는 양을 1 unit으로 정의하였다. Caspase 3의 측정은 ApoAlert Caspase Colorimetric Assay Kits(Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 세포를 48시간 저산소/6시간 재관류 배양 후 배지를 제거한 다음 세포를 수집하여 병냉하에 12초 동안 10회 sonication하여 12,000×g, 4°C에서 10분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 상등액을 96 well plate에 50 μg 넣고 Caspase 3의 기질인 1 mM DEVD-pNA 5 μl를 넣은 후, 37°C 수조에서 1시간 동안 배양시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Malondialdehyde 측정

과산화지질함량은 TBARS 법으로 측정하였으며, thiobarbituric acid(TBA)와 과산화지질이 반응하여 생성되는 malondialdehyde(MDA)를 흡광도로 측정하였다. Sample 200 μl에 400 μl의 cold 10% TCA를 넣고 12,000×g에서 10분 동안 4°C에서 원심 분리하였다. 상등액 500 μl를 취한 후 0.67% TBA 500 μl와 섞고 1시간 동안 Boiling을 한 다음 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Data 분석

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

실험 결과 및 고찰

동물실험에서 나타나는 약물의 간 효소에 의한 대사영향을 PC12 세포 배양 실험에 주기 위해 양격산화당을 S9 분획으로 반응을 시킨 후 세포에 처리하였다. PC12 세포를 저산소/재관류로부터 보호하는 최적의 양격산화당 대사산물을 얻기 위해 S9 분획(100 μg/ml)과 양격산화당(20 μg/ml)을 시간별로 5분, 10분, 15

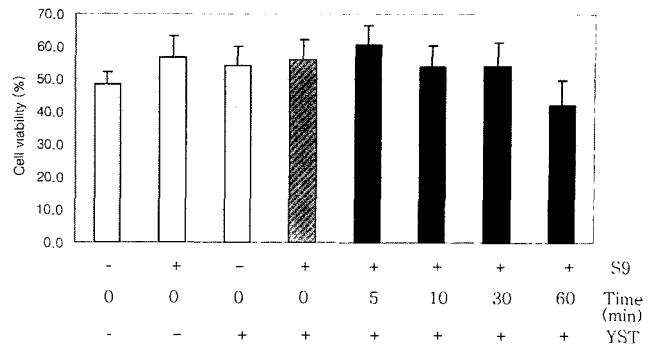


Fig. 1 – The protective effect of metabolized Yangguksanwha-tang (YST) on hypoxia/reperfusion (H/R) induced PC12 cell damage at various time points. Cells were treated with 2 μg/ml of YST which was pretreated with 100 μg/ml of S9 fraction of rat liver homogenate for 0, 5, 10, 30 and 60 min while incubated at anaerobic chamber for 48 hr followed by incubation at CO₂ incubator for 6 hr. Cell viability was measured by MTT assay and described as the percentage of control.

분, 30분간 반응시킨 후 MTT assay를 이용하여 PC12 세포 생존율을 측정하였다(Fig. 1). 양격산화당의 농도와 세포보호 작용과의 관계를 알아보기 위하여 양격산화당의 농도를 0.5 μg/ml, 1 μg/ml, 2 μg/ml, 10 μg/ml로 나누어서 세포에 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다(Fig. 2). MTT assay 실험 결과 세포의 반응 시간별에서는 양격산화당과 S9 분획을 5분간 반응시켰을 때 세포의 생존율이 가장 높게 나타났고 농도별 반응에서는 양격산화당의 농도를 2 μg/ml로 처리하였을 때 세포의 생존율이 가장 높게 나타났다. 양격산화당을 처리할 때 S9 분획으로 처리한 것이 그렇지 않았을 때 보다 세포의 생존율이 더 좋게 나타났다. 이 결과는 양격산화당의 구성성분 중 S9 분획에 의한 대사산물이 보다 효과적으로 세포를 보호함을 의미한다. 그러나 5분이 지

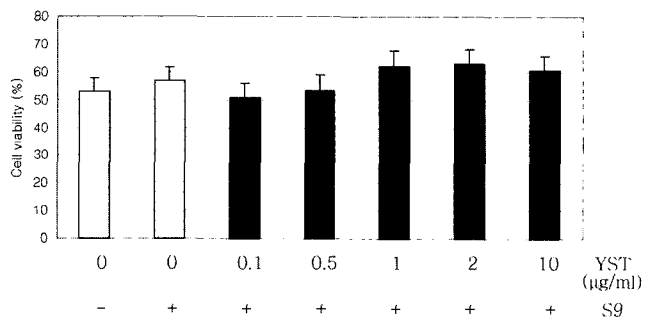


Fig. 2 – The dose-dependent protective effect of Yangguksanwha-tang (YST) on hypoxia/reperfusion (H/R) induced PC12 cell damage. Cells were treated with 0.1, 0.5, 1, 2 and 10 μg/ml of YST which was pretreated with 100 μg/ml of S9 fraction of rat liver homogenate for 10 min and incubated at anaerobic chamber for 48 hr followed by incubation at CO₂ incubator for 6 hr. Cell viability was measured by MTT assay and described as the percentage of control.

Table II – The anti-oxidant enzyme activities in PC12 cells after Hypoxia/Reperfusion (H/R) insult

	SOD	Catalase	GPx
Control normoxia	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+mYST (0.5 µg/ml)	98.2±10.3	72.9±8.7*	82.3±6.6
H/R+mYST (1 µg/ml)	96.9±8.9	75.1±8.1*	100.8±8.4
H/R+mYST (2 µg/ml)	101.3±9.2	96.5±9.2	100.1±9.4
H/R+mYST (10 µg/ml)	103.8±1.7	75.7±7.2*	123.6±7.5*

The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) were determined after treated with various concentrations of metabolized Yangguksanwha-tang (mYST) 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=6). *Significantly different from the corresponding values from the control (p<0.05).

나서는 오히려 세포의 생존율이 감소하는 것을 볼 수 있다. 따라서 여러 농도(0.5 µg/ml~10 µg/ml)의 양격산화탕과 S9 분획을 5분 반응시킨 후 산화 환원에 관여하는 효소활성과 Malondialdehyde (MDA) 그리고 세포사멸에 관여하는 caspase 3의 활성을 측정하였다.

뇌졸중은 뇌혈관의 폐쇄로 인한 세포막기능의 상실을 초래하며 세포사를 일으키는데, 세포사의 가장 큰 원인은 산화적 스트레스를 초래하는 free radical과 peroxynitrite의 생성이다.^{14,15)} 따라서 S9분획에 의해 대사된 양격산화탕의 저산소/재관류에 대한 스트레스 억제 효과를 관찰하기 위해 세포 내 항산화 효소인 SOD, GPx, Catalase의 활성을 측정하였으며 그 결과를 Table II에 나타내었다. SOD의 경우 저산소/재관류에 의한 스트레스에서 활성이 증가하였으나 양격산화탕을 처리한 세포에서는 대조군과 비슷하였다. SOD의 활성이 증가한 것은 재관류시에 산소의 유입이 증가하므로 이를 방어하기 위해 것으로 사료된다. GPx의 활성도는 대조군보다 유의하게 낮았으나 양격산화탕을 처리하였을 때 효소활성이 증가하였으며 2 µg/ml의 농도에서 가장 대조군과 비슷한 값을 나타내었다. 저산소/재관류에 의한 스트레스에서 Catalase의 활성도는 대조군에 비해 유의하게 낮음을 볼 수 있다. 그러나 양격산화탕을 처리하였을 때 Catalase 효소 활성이 증가하였고 2 µg/ml의 농도에서 가장 효과적이었다.

산화적 스트레스의 indicator로 알려진 MDA에 대한 양격산화탕의 영향을 분석하였다(Table III). 저산소/재관류에 의한 스트레스로 인해 MDA가 대조군에 비해 1.5배 정도 증가하였으나 대사된 양격산화탕을 처리하였을 때 MDA는 감소하여 대조군의 값에 접근하였다. 이는 산화적 스트레스가 완화되었음을 암시하였다. 한편 S9 분획에 의해 대사 되지 않은 양격산화탕을 처리한 세포에서는 MDA가 대조군보다 여전히 높았다. 이것은 간효소에 의해 대사된 양격산화탕이 그 자체보다 더 효과적으로 저산소/재관류로부터 세포를 보호한다는 것을 암시한다.

Table III – The level of malondialdehyde (MDA) in PC12 cells after Hypoxia/Reperfusion (H/R) insult

	MDA
Normoxia control	100+11.3
H/R	150.1+13.2*
H/R+mYST (2 µg/ml)	143.8+11.5*
H/R+mYST (0.5 µg/ml)	125+9.7
H/R+mYST (1 µg/ml)	131.3+11.3
H/R+mYST (2 µg/ml)	112.5+10.4
H/R+mYST (10 µg/ml)	131.3+8.9

The level of malondialdehyde (MDA) was determined after treated with various concentrations of metabolized Yangguksanwha-tang (mYST) or 2 µg/ml of YST 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).

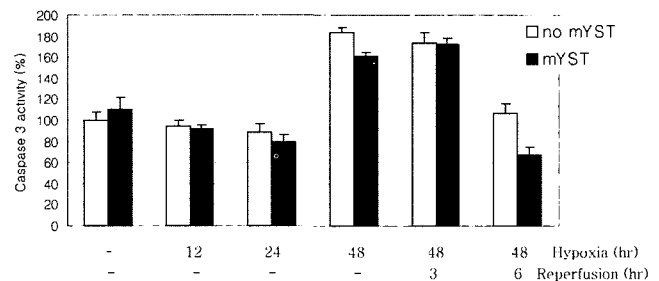


Fig. 3 – The change of caspase 3 activity in hypoxia/reperfusion (H/R) induced PC12 cells by metabolized Yangguksanwha-tang (mYST). The activity of caspase 3 was measured in PC12 cells after treatment with 2 µg/ml of mYST for different times as indicated in the Materials and Methods. The activity of caspase 3 was described as the percentage of control.

세포사멸의 final executor로 알려진 caspase 3는 저산소/재관류가 진행됨에 따라 활성이 증가하였다(Fig. 3). 시간별로 caspase 3의 활성을 분석한 결과 저산소 배양 48시간에 활성이 최대였으며 그 후 감소하였다. 그러나 양격산화탕을 처리한 군에서 caspase 3의 활성도 변화는 처리하지 않은 군과 비슷한 양상을 보여줌에 양격산화탕의 세포보호 작용은 caspase 3의 작용을 통해서 일어나지 않는 것으로 생각된다.

허혈(ischemia)에 의한 뇌세포의 죽음은 허혈과 재관류에 의해 시작된 여러 가지의 세포 내의 변화에 기인하는데, 세포 내의 변화에는 electron transport의 억제, ATP의 감소, pH의 감소, 세포 내의 Ca²⁺ 증가, glutamate의 방출, arachidonic acid의 증가, cytokine의 합성, free radicals의 생산과 관련된 효소의 합성, 백혈구의 축적 등이 있으며 이를 통해 free radicals와 peroxynitrite에 의한 손상, Ca²⁺ 의존 protease인 calpain의 활동, 인지질의 활성, poly ADP ribose polymerase(PARP)의 활성, 세포사멸 과정의 활성화와 같은 기작이 일어난다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 이러한 중추신경세포 손상의 기전은 글루타메이트의 과다한 방출 또는 글루타메이트

수용체의 과다한 흥분에 의한 흥분성독성, 이온통로를 통한 칼슘의 세포내 유입이 중요하다고 알려져 있다.^{19,20)} 많은 신경계 질환의 증상 발현과 관련하여 중추신경세포의 고사가 주원인으로 작용하고 있으며, 중추신경세포들은 아주 민감하여 짧은 시간 동안의 허혈에 의하여 방출된 아미노산 글루타메이트에 의한 흥분성독성이 이루어지는데 중추신경세포 고사의 중요한 기전의 하나로 논의되고 있다.

최근에는 이러한 기전 외에 세포괴사가 허혈성 뇌졸중, 간질, 알츠하이머병 등 신경계질환의 신경 세포사에 관여되어 있다는 연구들이 증가되고 있는 추세이다. 뇌혈관 장애 시 나타나는 뇌 세포 손상은 허혈 및 재관류 상태에서 발생하는 활성산소에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress)가 중요한 기전의 하나로 알려져 있으며, 신경계 질환에서 나타나는 세포고사의 경로에 활성산소가 중요한 매개체로 작용한다는 근거들이 제시되고 있다.^{21,22)} 신경계 질환에서 보이는 신경세포 고사에 산화적 스트레스가 관여한다는 증거로는 허혈 후 활성산소의 생성 증가 및 항산화제에 의한 허혈성 신경세포의 고사억제 효과, Parkinson's disease의 substantia nigra에서 Fe^{2+} 의 증가,²³⁾ Glutathione의 감소,²⁴⁾ dopamine²⁵⁾의 산화작용에 의한 활성산소의 생성, Huntington's disease의 striatum에서 Fe^{2+} 의 증가²⁶⁾ 등을 들 수 있다.

세포 내 활성산소의 생성이 증가하면 lipid peroxidation에 의한 membrane 구조의 파괴, OH에 의한 DNA의 손상, 이중결합 구조나 SH를 포함하는 산화반응에 의한 단백질의 변성 등은 신경세포 고사의 원인이 될 수 있다.^{27,28)} 뇌경색, 뇌외상 등과 같은 손상후의 뇌기능 장애에 미치는 free radical의 역할이 점차 주목을 받고 있다.¹⁸⁾ free radical은 허혈 후 조직에 lipid peroxidation의 대사가 늘어나면서 증가하게 되어 membrane associated protein에 손상을 주고, 이렇게 손상 받은 세포막은 정상에서는 투과 시키지 않던 물질들에 대한 투과성이 증가되어 궁극적으로 세포손상이 초래되며 뇌손상 후 free radical이 내피 세포와 혈뇌관문에 손상을 주고 직접 뇌세포에 작용하여 뇌부종 및 뉴런, 신경교 세포의 구조적인 변화를 초래한다.²⁹⁾ 특히 중추 신경계는 세포막에 불포화지방산이 풍부하여 oxygen free radical에 의해 손상 받기가 쉬우며 free radical을 제거하는 SOD, Catalase, GPx 등의 효소가 적고, 또한 free radical을 형성하는 iron이 풍부하여 free radical의 손상에 의한 가능성이 높다.²³⁾ 따라서 신경세포사의 기전과 앞의 실험 결과들과 연계하여 볼 때 양격산화당이 저산소/재관류에 의해 발생하는 산화환원효소의 활성도저하를 정상 수준으로 회복하게 함으로써 세포를 보호하는 것으로 여겨진다.

대부분의 약물들은 지용성이거나 약산성 혹은 약염기성의 유기 물질이므로 체내에서 여러 변화를 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 활성화된 물질로 변화되기도 한다.³⁰⁾ 예를 들면, cortisone이나 enalapril처럼 대사 효소에 의해 inactive form에서 active drug으로 변하는 약물도 존재한다.³¹⁾ 본 실험의 결과에서 양격산화당은 S9 분획과 반응을 한 후 세포 보호 효과가 증가하였는데 이는 대사된 양격산화당이 보다 효과적으로 세포를 보호하였으며, 이 약물의 투여는 산화환원효소의 활성도가 정상세포 수준으로 회복하게 되는데 기여하는 것으로 사료된다.

결 론

임상에서 가장 빈번히 사용되는 한방처방중의 하나인 양격산화당의 치료기전을 분자수준에서 연구하였다. 세포배양실험에서는 간 조직에서 나타나는 약물의 일차-통과 효과(first-pass effect)를 세포배양 실험에서 나타내기 위해 양격산화당을 간 효소와 반응시킨 후 신경세포에 처리하였다. 그리하여 동물실험에서 나타나는 약물의 대사 효과를 세포배양실험에서도 나타나게 한 후 약물의 기전을 연구하였다. 본 실험의 결과는 양격산화당이 허혈로 유발된 뇌손상에 방어적인 효과가 있음을 보여주고 있으며 양격산화당이 뇌허혈 손상의 방어에 유용한 치료약물로 쓰일 수 있는 가능성을 제시하는 연구의 기반을 마련할 것으로 기대된다.

감사의 말씀

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

문 헌

- 1) Murray, C. J. L. and Lopez, A. D. : Mortality by cause for eight regions of the world global burden of disease study. *Lancet* **349**, 1269 (1997).
- 2) 정철, 김옥년, 김민정, 최석문, 어경윤, 박미영, 하정상, 변영주 : 허혈성 뇌졸중의 재발과 연관된 위험인자. *영남의대학술지* **10**, 423 (1993).
- 3) 김현철, 김세주, 최낙경, 김영신, 이병철, 이병철, 이만홍 : 뇌졸중 후 삶의 질에 관한 추적연구. *신경정신의학* **41**, 681 (2002).
- 4) Fisher, M. and Brott, T. G. : Emerging therapies for acute ischemic stroke: new therapies on trial. *Stroke* **34**(2), 359 (2003).
- 5) Chan, P. H. : Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* **27**, 1124 (1996).
- 6) 윤진구, 조기호, 김영석, 이경섭 : 뇌졸중에 관한 임상통계적 연

- 구. 대한한방내과학회지 **10(1)**, 25 (1989).
- 7) 김진성, 송일병 : 양격산화탄의 효능에 관한 실험적 연구. 경희한의대 논문집 **7**, 273 (1984).
 - 8) 배철환, 조기호, 이원철, 김영석, 배형섭, 이경섭, 구분홍 : 폐쇄성 뇌졸중에 대한 임상적 연구. 경희한의대논문집 **10**, 665 (1987).
 - 9) 이기주, 김경요 : 십이미관중탕, 양격산화탕, 형방사백산이 백서의 혈압 및 국소 뇌혈류량에 미치는 영향. 한국전통의학지 **9(2)**, 259 (1999).
 - 10) 이동원, 이원철 : 지주막하출혈 후 뇌기저동맥벽에 존재하는 면역 양성 신경섬유의 변화에 미치는 양격산화탕의 효과. 한의학연구소논문집 **8(1)**, 117 (1999).
 - 11) Brandon, E. F., Raap, C. D., Meijerman, I., Beijnen, J. H. and Schellens, J. H. : An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **189(3)**, 233 (2003).
 - 12) Oyanagui, Y. : Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* **142(2)**, 290 (1984).
 - 13) Aebi, H. : Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* **105**, 121 (1984).
 - 14) Lipton, P. : Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* **79(4)**, 1431 (1999).
 - 15) 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. : Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* **179(S1-S2)**, 1 (2000).
 - 16) Jenkins, L. W., Povlishock, J. T., Lewelt, W., Miller, J. D. and Becker, D. P. : The role of postischemic recirculation in the development of ischemic neuronal injury following complete cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.* **55(3)**, 205 (1981).
 - 17) Sato, M., Hashimoto, H. and Kosaka, F. : Histological changes of neuronal damage in vegetative dogs induced by 18 minutes of complete global brain ischemia: two-phase damage of Purkinje cells and hippocampal CA1 pyramidal cells. *Acta Neuropathol.* **80(5)**, 527 (1990).
 - 18) Krause, G. S., White, B. C., Aust, S. D., Nayini, N. R. and Kumar, K. : Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence. *Crit. Care Med.* **16(7)**, 714 (1988).
 - 19) Siesjo, B. K. : Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J. Neurosurg.* **77(2)**, 169 (1992).
 - 20) Schoepp, D. D. and Conn, P. J. : Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* **14(1)**, 13 (1993).
 - 21) 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. : Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* **179**, 1 (2000).
 - 22) Graham, S. H. and Chen, J. : Programmed cell death in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 99 (2001).
 - 23) Thomas, M. and Jankovic, J. : Neurodegenerative disease and iron storage in the brain. *Curr. Opin. Neurol.* **17(4)**, 437 (2004).
 - 24) Bharath, S., Hsu, M., Kaur, D., Rajagopalan, S. and Andersen, J. K. : Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* **64(5-6)**, 1037 (2002).
 - 25) Jenner, P. : Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **53 Suppl 3**, S26 (2003).
 - 26) Moos, T. and Morgan, E. H. : The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1012**, 14 (2004).
 - 27) Takeuchi, N., Matsumiya, K., Takahashi, Y., Higashino, K. and Tanaka, F. : Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and lipid metabolism in alpha-tocopherol deficient rats. *Exp. Gerontol.* **12**, 63 (1977).
 - 28) Kim, Y. D., Sohn, N. W., Kang, C. and Soh, Y. : DNA array reveals altered gene expression in response to focal cerebral ischemia. *Brain Res. Bull.* **58**, 491 (2002).
 - 29) Gilgun-Sherki, Y., Rosenbaum, Z., Melamed, E. and Offen, D. : Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol. Rev.* **54(2)**, 271 (2002).
 - 30) Pirmohamed, M., Madden, S. and Park, B. K. : Idiosyncratic drug reactions. Metabolic bioactivation as a pathogenic mechanism. *Clin. Pharmacokinet.* **31**, 215 (1996).
 - 31) Park, B. K., Kitteringham, N. R., Pirmohamed, M. and Tucker, G. T. : Relevance of induction of human drug-metabolizing enzymes: pharmacological and toxicological implications. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **41(6)**, 477 (1996).