

十全大補湯 및 加味十全大補湯의 항산화 효과 및 신경교세포주 보호 효과

이상영 · 김형우¹ · 김계엽² · 최찬헌 · 윤여충 · 정현우*

동신대학교 한의과대학, 1: 부산대학교 한의학전문대학원, 2: 동신대학교 보건복지대학

Protective Effects and Anti-oxidative Effects of Sipjeon-Daebo-Tang and Gami-Sipjeon-Daebo-Tang in C6 Glioma Cell

Sang Yeong Lee, Hyung Woo Kim¹, Gye Yep Kim², Chan Hun Choi, Yeo Chung Yun, Hyun Woo Jeong*

College of Oriental Medicine, Dongshin University, 1: School of Korean Medicine, Pusan National University, 2: College of Health and Welfare, Dongshin University

Sipjeon-Daebo-Tang (SDT) is indicated for deficiency syndrome of both gi and blood, marked by pale or sallow complexion, dizziness, lassitude, shortness of breath, dislike for talking, poor appetite, pale tongue with thin whitish fur, thready and weak pulse. Gami-Sipjeon-Daebo-Tang(GSDT) is composed of 10 herbs within SDT and *Cervi Pantotrichum Cornu* (CPC). CPC can nourish kidney-yang, promote the production of the essence and blood, strengthen tendons and bones. Recently SDT is known as anti-cancer drug. Especially CPC is reported to have anti-oxidative action. For these reasons, we investigated the protective effects on cell death induced by chemicals such as paraquat, hydrogen peroxide and anti-oxidative effects in C6 glioma cells. In our results, GSDT accelerated proliferation rates of C6 cells in vitro. In addition, protective effects on cell death induced by hydrogen peroxide and rotenone. In addition, SOD activities were increased by treatment with both SDT and GSDT. In conclusion, these results suggest the possibility of GSDT to protect brain cell or neuronal cell from damage induced by oxidative stress. And also suggest that related mechanisms are involved in SOD activities.

Key words : Sipjeon-Daebo-Tang(SDT), herbal medicine, neuroglial cell, oxidative stress

서 론

생물체는 대사를 통하여 에너지를 얻는 과정에서 산소 호흡을 필요로 하고, 이때 소모되는 산소의 2~3%는 필연적으로 활성 산소 (reactive oxygen species, ROS)로 전환된다^{1,2}. 생체 대사 과정에서 발생하는 대표적인 활성 산소로 Superoxide, Singlet oxygen, hydroxyl radical와 과산화수소 (hydrogen peroxide) 등이 있으며, 이들은 화학적으로 매우 불안정하여 쉽게 다른 조직과 결합으로써 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 유발한다³. 생체 내에서 oxidative stress는 세포나 조직을 손상시키기 때문에 제거되어야 하며, 이를 위해 산소를 이용하는 생체는 효율적인 항산화 체계를 가지고 있다⁴. 생체가 가진 항산화 체계의 한

계를 넘어서는 정도의 산화적 스트레스가 발생하면 세포 단위에서 apoptosis 등과 같은 방법을 통하여 사멸하게 되며, 이러한 기전은 노화와 관련 있을 뿐만 아니라, 생체 내에서 발생하는 거의 모든 질병의 전변에 관여한다^{5,6}.

十全大補湯 (Sipjeon-Daebo-Tang, SDT)은 宋대에 편찬된 太平惠民和劑局方에 처음으로 소개된 처방으로 四物湯과 四君子湯, 黃芪健中湯의 合方으로 구성되었으며^{7,8}, 氣血虛弱의 대표적인 처방으로 인식되고 있다⁷. 본 연구에 사용된 加味十全大補湯 (Gami-Sipjeon-Daebo-Tang, GSDT)은 기존의 SDT에 鹿茸 (*Cervi Pantotrichum Cornu*, CPC)을 첨가하여 새롭게 구성된 처방이다. CPC는 韓醫學에서 가장 대표적인 補陽劑⁹로 補氣·補血의 대표방인 SDT에 補陽의 효능을 가미한 처방이라고 할 수 있다.

SDT에 대한 최근의 연구는 주로 면역기능 증진, 항암 효과 등의 분야에서 활발하게 이루어지고 있으며¹⁰⁻¹⁴, CPC의 경우 성장 및 지능 발달^{15,16}, 조혈작용 증진^{17,18} 뿐만 아니라 항산화 효과

* 교신저자 : 정현우, 전남 나주시 대호동 건제로 252 동신대학교 한의과대학
· E-mail : hwdolsan@dsu.ac.kr, · Tel : 061-330-3524
· 접수 : 2009/11/11 · 수정 : 2009/11/25 · 채택 : 2009/12/05

에 따른 항노화 기능¹⁹⁾과 항염증 작용^{20,21)}을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나, CPC 혼합 음료의 섭취가 당뇨환자의 혈액 상에 항산화 효과를 발휘하지 못한다는 보고²²⁾도 있어 다양한 관점에서의 접근이 필요하다고 생각된다.

이에 본 저자들은 신경교세포주인 C6 glioma cell에 각종 산화적인 스트레스를 유발하고, SDT 및 GSDT의 항산화 효과 및 주어진 스트레스에 의하여 유발되는 신경교세포주의 사멸을 효과적으로 보호할 수 있는지를 관찰한 결과 유의성을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 十全大補湯 (Sipjeon-Daebo-Tang, SDT)의 구성은 太平惠民和劑局方에 준하였고, SDT에 CPC 8 g을 첨가하여 加味十全大補湯 (Gami-Sipjeon-Daebo-Tang, GSDT)을 구성하였다. 실험에 사용된 약재는 시중 (전남생약조합, 한국)에서 구입하였으며, 처방 내용은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of Gami-Sipjeon-Daebo-Tang (GSDT)

| 韓藥名 | 生藥名 | 用量(g) |
|-----|----------------------------------|-------|
| 鹿茸 | <i>Cervi Pantotrichum Cornu</i> | 8 g |
| 人參 | <i>Panax ginseng Radix</i> | 8 g |
| 白朮 | <i>Atractylodis Rhizoma Alba</i> | 8 g |
| 茯苓 | <i>Hoelen</i> | 8 g |
| 熟地黃 | <i>Rehmanniae Radix Preparat</i> | 8 g |
| 當歸 | <i>Angelicae Gigantis Radix</i> | 8 g |
| 川芎 | <i>Cnidii Rhizoma</i> | 8 g |
| 白芍藥 | <i>Paeoniae Radix</i> | 8 g |
| 黃芪 | <i>Astragali Radix</i> | 8 g |
| 肉桂 | <i>Cinnamomi Cortex</i> | 8 g |
| 甘草 | <i>Glycyrrhizae Radix</i> | 8 g |
| 生薑 | <i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i> | 4 g |
| 大棗 | <i>Jujubae Fructus</i> | 4 g |
| 總計 | | 96 g |

2) 세포주

원래의 뇌세포에서 유래한 신경교세포주인 C6 glioma cell은 한국세포주은행 (서울, 한국)에서 동결 상태로 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

SDT 84 g과 GSDT 96 g 1첩 분량을 증류수 1,200 ml과 함께 전기약탕기(대웅, 한국)으로 3시간 동안 전탕하여 얻어진 추출액을 거즈로 거른 다음, 원심분리기(eppendorf, Germany)를 이용하여 5,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 찌꺼기를 버리고 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액은 감압 농축기 (EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축된 다음, 동결건조하여 최종적으로 SDT는 15.8 g, GSDT는 20.1 g의 시료를 얻었다.

2) 세포 배양

신경교세포주인 C6 glioma cell은 RPMI 배지에 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)과 항생제(Antibiotic antimycotic)를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하였다. 세포는 T-75 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 세포의 탈착을 위하여 인산완충액 (Phosphate buffered saline, PBS)으로 가볍게 세척한 다음, Trypsin-EDTA (Sigma, USA)을 처리한 후, 37°C에서 5분간 방치하였다가 세포를 채집하였다. 계대 배양은 2~3일에 1회씩 시행하였다.

3) 세포 증식율에 미치는 영향 측정

SDT 및 GSDT가 세포 증식율에 미치는 영향 측정은 MTT assay²³⁾를 통해 확인하였다. C6 glioma cell을 96 well plate에 5×10³ cell/well의 농도로 분주하여 배양기에서 37°C, % CO₂를 유지하며 24시간동안 pre-incubation시킨 후 0~1000 µg/ml의 농도로 약물을 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)를 처리하여 4시간을 배양하였다. 배양이 끝난 후, 각 well에 생성된 formazan결정을 DMSO를 첨가하여 녹이고, Microplate Reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 세포 생존율에 미치는 영향 측정

SDT 및 GSDT가 세포 생존율에 미치는 영향 측정은 trypan blue exclusion assay를 시행하여 관찰하였다. 간단히 정리하면, 100mm dish에 각각 1×10⁶ 개의 세포를 분주하고 37°C, % CO₂를 유지하며 24시간 동안 pre-incubation시킨 후, 0, 250, 500, 1000 µg/ml 농도의 약물을 처리하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 24시간의 배양이 끝나고, 세포를 부유 시킨 다음 trypan blue (Sigma, USA)를 1:1 비율로 첨가하고 세포계수기 (Hemocytometer) 위에서 광학현미경으로 관찰하였다. 살아있는 세포의 개수는 총 세포 개수에서 trypan blue에 염색된 세포의 개수를 차감하여 계산하였다.

5) 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 보호 효과 측정

산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 보호효과는 MTT법²³⁾을 변형하여 측정하였다. 먼저 C6 세포주를 96-well plate에 well 당 1×10⁴개씩 분주한 후, 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에 4시간동안 방치하여 부착을 시행하였다. 세포의 부착이 끝난 후, SDT 및 GSDT를 처리하고 동일한 환경에서 24시간 동안 방치하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 15 mM의 paraquat, 0.8 mM의 rotenone, 0.8 mM의 sodium nitroprusside (SNP) 그리고, 0.5 mM의 과산화수소 (hydrogen peroxide, H₂O₂)를 각각 처리하고 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에 4시간 동안 방치하였다. 4시간동안의 배양이 끝난 후, 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan결정을 DMSO를 첨가하여 녹인 후 Microplate Reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 540 nm에서 광도를 측정하였다.

6) SOD 활성 측정

SOD 활성은 SOD assay kit (Dojindo, Japan)을 이용하여 측정하였다. 100mm dish에 각각 1×10⁶ 개의 세포를 분주하고 37°C, 5% CO₂를 유지하며 24시간 동안 pre-incubation시킨 후, 500 µg/ml 농도의 약물을 처리하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 24시

간의 배양이 끝나고, 세포를 수집한 다음 -20℃에서 20분간 냉동 후, 항온 수조를 이용하여 37℃에서 10분간 방치하기를 2회 반복하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄가 끝난 후, 3,000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 기질로 사용하였으며, 측정 과정은 제조자가 제시한 지침에 따라 진행되었다. 측정된 Optical density (OD) 값으로부터 SOD 활성도를 계산하였으며, 계산 공식은 아래와 같다.

$$\text{SOD activity (inhibition rate \%)} = \frac{(S1-S3)-(SS-S2)}{S1-S3} \times 100$$

S1 : slope of enzyme blank S2 : slope of sample blank
S3 : slope of blank SS: slope of Samples

7) Total glutathione 함량 측정

Total glutathione 함량 측정은 Total glutathione Quantification Kit (Dojindo, Japan)을 이용하여 측정하였다. SOD 활성 측정과 동일한 방법으로 효소액을 제조한 다음, Pseudo-end point method를 이용하여 glutathione 함량을 측정하였으며, 측정 과정은 제조자가 제시한 지침에 따라 진행되었다.

3. 통계 처리

제시된 모든 결과에 대한 통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하여 실시하였으며, Student-Newman-Keuls multiple range test를 이용하여 P값이 0.05 미만 일 때 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 세포 증식율에 미치는 영향

SDT 및 GSDT가 신경교세포주의 증식율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 C6 glioma cell에 농도별로 SDT 및 GSDT를 투여하고 24시간 후, 세포 증식율을 측정한 결과 SDT에서는 유의한 세포 증식율의 변화를 관찰할 수 없었으나, GSDT군에서는 250 µg/ml 이상에서 유의한 수준의 세포 증식율 증가가 관찰되었으며, 그 양상은 농도 의존적이었다(Fig. 1).

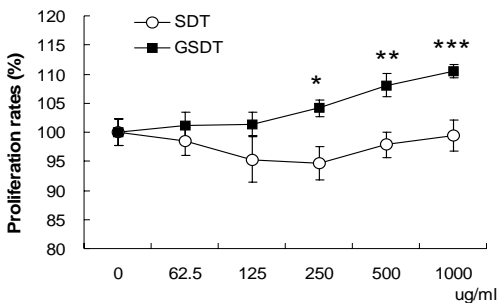


Fig. 1. Effects of SDT and GSDT on proliferation rates of C6 glioma cells in vitro. C6 Cells were attached 96-well plate, and added SDT and GSDT as indicated concentrations respectively. After 24 hr incubation, proliferation rates were measured using MTT methods. Result are presented as mean±SD of three independent experiments. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. Normal (non-treated).

2. 세포 생존율에 미치는 영향

세포 증식율 측정에 이어, 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰한 결과 SDT 및 GSDT 두 군 모두에서 유의할 만한 세포 생존율의 감소는 관찰되지 않았다(Fig. 2).

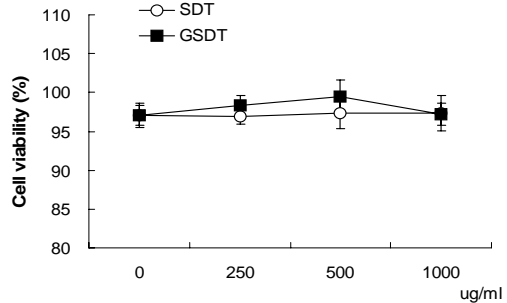


Fig. 2. Effects of SDT and GSDT on cell viability of C6 glioma cells in vitro. C6 Cells were attached 100 mm plate, and added SDT and GSDT as indicated concentrations respectively. After 24 hr incubation, cell viabilities were measured using trypan blue exclusion methods. Result are presented as mean±SD of three independent experiments.

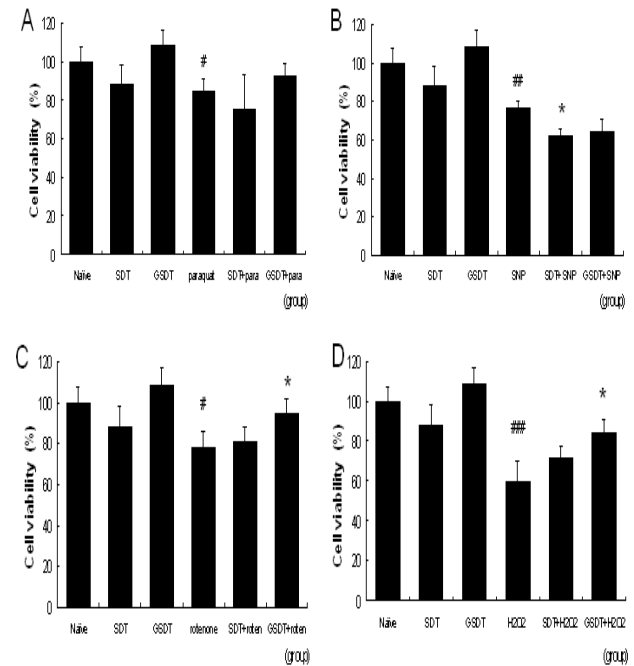


Fig. 3. Protective effects of SDT and GSDT on Oxidative stress induced by various chemicals in C6 glioma cells. C6 Cells were attached 96-well plate, and added 500 µg/ml of SDT and GSDT for 24 hr. After 24 hr incubation, indicated concentration of paraquat, SNP, hydrogen peroxide and rotenone were treated for 4 hr. Naive : non-treated, SDT or GSDT : only SDT or GSDT treated, Chemicals : only chemicals (paraquat, SNP, hydrogen peroxide and rotenone) treated, SDT or GSDT+chemicals : SDT or GSDT pre-treated then chemicals treated. (A) Paraquat, (B) SNP, (C) Rotenone, (D) H₂O₂. Result are presented as mean±SD of three independent experiments. #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 vs. Naive, *P < 0.05 vs. chemical treated control.

3. 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 방지효과

C6세포에 500 µg/ml의 SDT 및 GSDT를 전처리하고, paraquat, SNP, hydrogen peroxide, rotenone으로 산화적 스트

레스를 유발한 다음 SDT 및 GSDT의 세포 사멸 방지 효과를 측정하였다. paraquat, SNP, rotenone 및 hydrogen peroxide 단독 처리 군에서는 아무것도 처리하지 않은 Naive 군에 비하여 유의한 세포 생존율 감소가 관찰되었고, SDT 및 GSDT를 전처리 한 후, paraquat를 처리한 군과 SNP를 처리한 군의 세포 생존율은 약물의 전처리 없이 chemical 만을 처리한 수준으로 나타났다 (Fig. 3A, B). GSDT 전처리 후, rotenone 및 hydrogen peroxide를 처리한 군에서 rotenone 및 hydrogen peroxide를 단독으로 처리한 군에 비하여 유의하게 높은 수준의 세포 생존율이 관찰되었으며, SDT 전처리 군에서는 chemical 단독 처리군과 유의한 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 3C, D).

4. SOD 활성에 미치는 영향

C6세포에 500 µg/ml의 SDT 및 GSDT를 처리한 후, SOD 활성도 (inhibition rates)를 측정된 결과 두 약물군 모두에서 유의한 수준의 SOD 활성도 증가가 관찰되었다(Fig. 4).

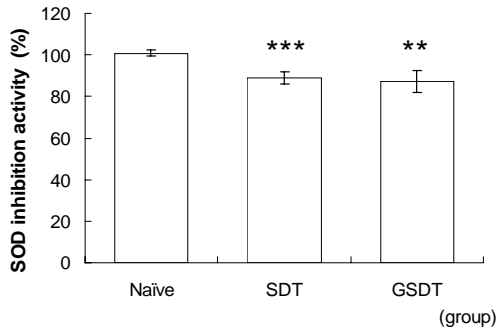


Fig. 4. Effects of SDT and GSDT on SOD activities in C6 glioma cells. C6 Cells were attached 100 mm plate, and added 500 µg/ml of SDT and GSDT for 24 hr. Result are represented as mean±SD of three independent experiments. **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. non-treated control (naive).

5. Total glutathione 함량에 미치는 영향

재료 및 방법에서 논술한 바와 같이, C6세포에 500 µg/ml의 SDT 및 GSDT를 처리한 후, Total glutathione 함량을 측정된 결과 모든 군에서 유의할 만한 변화는 발견할 수 없었다(Fig. 5).

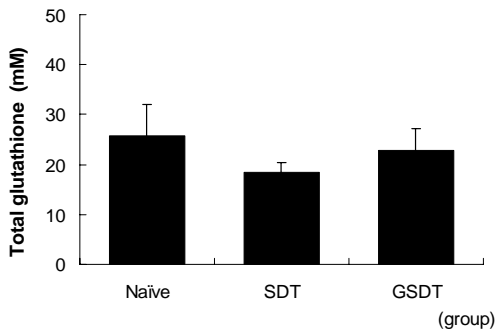


Fig. 5. Effects of SDT and GSDT on production levels of total glutathione in C6 glioma cells. C6 Cells were attached 100 mm plate, and added 500 µg/ml of SDT and GSDT for 24 hr. Result are represented as mean±SD of three independent experiments.

고찰

SDT는 四君子湯, 四物湯 등과 함께 氣血을 補하는 가장 대표적인 처방으로 宋代 陳師文의 太平惠民和劑局方에 최초로 등장한다⁷⁸⁾. SDT는 八珍湯에 黃芪와 肉桂를 더하여 諸虛不足과 五勞七傷으로 발생하는 食慾不振, 久病虛損으로 인한 時發潮熱, 夜夢遺精 등의 증상을 치료한다²⁴⁾. 본 연구에서 사용한 GSDT는 SDT에 補腎陽, 益精血, 強筋骨, 調衝任의 효능을 가진 鹿茸⁹⁾을 첨가하여 鹿茸, 黃芪, 人蔘, 白朮, 茯苓, 熟地黃, 當歸, 白芍藥, 川芎, 肉桂, 甘草와 生薑, 大棗로 구성되었다.

SDT에 대한 최근의 연구는 주로 면역기능 증진, 항암 효과 등의 분야에서 활발하게 이루어지고 있으나¹⁰⁻¹⁴⁾, 항산화 효과 또는 신경세포 보호와 관련된 연구는 거의 찾아보기 힘든 실정이다.

비록 SDT가 항산화 효과에 관련된 연구는 찾아보기 힘들었지만, SDT를 구성하는 약물들에 대한 연구에서는 항산화 효과에 대한 연구를 흔히 찾아 볼 수 있다. 대표적으로 년근별 黃芪의 항산화 및 항당뇨 작용²⁵⁾, 人蔘의 항산화 작용²⁶⁾, 茯苓 군사체의 항산화성과 아질산염 소거작용²⁷⁾, 熟地黃에 대하여 노령 흰쥐에서 보이는 항산화 효과²⁸⁾, 신장 조직 손상에서 보이는 항산화 효과²⁹⁾, 남성 생식 세포에서 보이는 항산화 효과³⁰⁾, 등이 있고, 當歸와 白芍藥에 대하여서는 藥針液의 항산화 효과^{31,32)}가 보고되어 있다.

CPC의 補血, 補陽 효능은 SDT의 補氣血 효과와 좋은 조화를 이루어 임상에서 병용하는 경우가 많을 뿐 아니라, 최신 연구를 통해서도 성장, 지능발달, 조혈작용¹⁵⁻¹⁸⁾, 등이 있음이 밝혀져 SDT와 좋은 조합을 이룬다고 생각하였다. 또한, CPC는 항산화 효과에 기인한 항노화 기능¹⁹⁾과 항염증 작용^{20,21)}을 가지고 있어 GSDT는 항산화 효과를 통하여 신경세포를 보호해 줄 수 있을 것이라는 가설을 세우고 실험을 진행하였다.

본 연구의 결과에서 GSDT는 C6 세포주에 대하여 250 µg/ml 이상에서 유의한 수준의 증식을 증가를 나타냈다(Fig. 1). 또한, SDT 및 GSDT 모두 특별한 세포 독성은 나타나지 않았다 (Fig. 2). 이러한 결과로부터 GSDT가 신경 손상 환자의 뇌 또는 신경 조직을 재생 시킬 수 있다는 가능성을 발견하였다. 이에 부가하여, GSDT 및 SDT의 최소 유효 농도는 250 µg/ml 이상으로 결정되었으며, 이후 실험에서는 500 µg/ml 농도를 사용하였다.

신경교세포주에 대하여 증식을 증가 소견을 보인 GSDT에 대하여 산화적 스트레스를 유발한다고 알려져 있는 4가지 chemical의 처치에 의해 발생하는 세포 사멸에 미치는 영향을 살펴보았다. 4가지 chemical 중 첫 번째로 paraquat는 그라목손 (Gramoxone)으로 알려져 있는 강력한 제초제로 실험실에서는 주로 각종 중독 작용, 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 일으키는 자극원으로 사용된다^{33,34)}. 두 번째로, 생체 내에서 nitric oxide (NO)를 발생시켜 산화적 스트레스를 유발하는 sodium nitro-prusside (SNP)³⁵⁾, 과산화수소 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 그리고 농약, 살충제 용도로 사용되며, 생체 내의 각종 세포에 산화적 손상을 통하여 apoptosis를 유발하는 rotenone^{36,37)}을 사용하였다.

본 연구의 결과에서 상기한 4가지 chemical은 모두 C6 세포의 생존율을 유의한 수준으로 감소시켰다. 이러한 생존율 감소에 대하여 SDT는 특별한 보호효과를 발휘하지 못하였으며, SNP 자극에 의하여 오히려 세포 생존율이 더 낮아지는 경향을 보였다 (Fig. 3). 그러나, GSDT의 경우 paraquat와 SNP를 사용한 경우 세포 생존율에 특별한 영향을 미치지 않았지만, rotenone과 hydrogen peroxide에 의한 산화적 스트레스로부터 C6 세포의 사멸을 효율적으로 방지하였다(Fig. 3). 기존의 SDT는 주로 면역 기능 증진과 면역 기능 증진에 의한 항암 작용을 보이는데, 일반적으로 면역 기능 증진과 항암 작용의 기전에는 산화적 스트레스를 이용할 가능성이 높다는 것을 감안할 때^{38,39)}, 본 연구의 결과는 기존의 연구 결과와 유사하며, GSDT에서 보인 효과는 CPC에 기인하는 것으로 생각된다. CPC에 대한 이전 연구에서 鹿茸藥針液은 인간에서 유래한 골아세포에서 thioredoxin 관련 유전자의 발현을 증가시키며 알려져 있다⁴⁰⁾. Thioredoxin은 생체 내에서 자유 radical를 제거함으로써 항산화 작용을 수행하는 단백질⁴¹⁾로 CPC에 대한 항산화 효과와 항노화 효과, 항염증 작용 등을 설명할 수 있는 중요한 단서이며, 본 연구의 결과도 상기한 결과들과 동일한 맥락에서 이해될 수 있다.

생체 내에서 가장 대표적 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD)는 세포에 해로운 superoxide를 hydrogen peroxide로 전환시키는 반응에 관여하는 효소이며⁴²⁾, 30 KDa 이상의 분자량을 가진 단백질 물질로 세포막을 통과하지 못한다⁴³⁾. 본 연구의 결과에서 SDT와 GSDT군 모두에서 유의한 수준의 SOD 활성 증가가 관찰되었다(Fig. 4). GSDT에서의 SOD 활성 증가는 산화적 스트레스에 대한 보호 효과를 보인 Fig. 3의 결과를 보충 설명할 수 있는 자료라 생각된다. 일반적으로 항산화 효과가 알려지지 않은 SDT에서도 SOD 활성 증가 소견이 관찰된 것은 새로운 사실이라 할 수 있으며, 추후 SDT의 항산화 관련 연구를 통하여 재확인함과 동시에 명확한 기전을 밝혀야 할 것으로 생각된다.

Glutathione (GSH)은 대표적인 항산화제로 free radical과 peroxide와 같은 reactive oxygen species (ROS)로부터 세포를 보호해 주는 역할을 한다⁴⁴⁾. GSH는 대부분은 환원형으로 존재하며, ROS에 의하여 산화되면서 항산화 활성을 발휘하게 된다⁴⁴⁾. 산화된 GSH는 glutathione reductase에 의하여 다시 환원형으로 돌아간다⁴⁵⁾. 본 연구에서 SDT 및 GSDT는 total glutathione 함량에 특별한 영향을 미치지 않았다(Fig. 5). 이전 연구 결과에서 CPC에 의하여 활성이 증가하는 것으로 알려진 thioredoxin이 glutathione의 농도와 반비례 관계⁴⁶⁾에 있다는 것과 비교하면, 본 연구의 결과로부터 GSDT의 항산화 효과에는 glutathione 관련 기전 이외의 다른 기전이 관여한다는 것을 알 수 있다.

결 론

十全大補湯 (SDT) 및 加味十全大補湯 (GSDT)이 뇌교세포주에서 항산화 효과를 발휘하는지 살펴보기 위하여 C6 glioma cell에 SDT 및 GSDT 추출물을 투여하고 세포 증식율 및 생존율에

미치는 영향과 산화적 스트레스를 유발하는 paraquat, SNP, hydrogen peroxide 그리고 rotenone에 의하여 유발되는 세포 사멸에 미치는 영향을 관찰하였고, SOD 활성과 total glutathione 함량에 미치는 영향을 관찰하였다.

그 결과 GSDT 추출물은 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 이상에서 유의한 수준으로 세포 증식율을 증가시켰고, SDT 및 GSDT 두군 모두에서 특별한 세포 독성을 관찰할 수 없었다. 또한, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 GSDT 추출물은 hydrogen peroxide와 rotenone의 자극에 의한 세포 사멸을 유의한 수준으로 방지함을 알 수 있었다. 또한, SDT와 GSDT군 모두에서 유의한 수준으로 SOD 활성을 증가시키는 효과를 확인하였다.

이러한 결과로부터 본 저자는 加味十全大補湯이 항산화 효과를 통하여 뇌 및 신경 세포의 손상을 방지해 줄 수 있는 가능성이 있으며, 그 기전으로는 SOD 활성의 증가가 관여한다고 생각된다.

참고문헌

1. Lee, S.O., Kim, M.J., Kim, D.K. and Choi, H.J. Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*. Korean J. Food Sci. Nutr. 34: 139-147, 2005.
2. 조숙현, 최용조, 노치웅, 최철웅, 김덕송, 조성환. 대나무수액의 활성산소 소거활성과 세포독성. 한국식품저장유통학회지 15(1):105-110, 2008.
3. PaPa, S. and Skulachev, V.P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. Mol. Cell. Biochem. 174: 305-319, 1997.
4. Slavić, M., Appiah, I., Nikolić-Kokić, A., Radojčić, R., Jones, D.R., Spasić, M.B., Milovanović, S., Blagojević, D. The anti-oxidative defence system in the isolated rat uterus during spontaneous rhythmic activity. Acta Physiol Hung. 93(4):335-339, 2006.
5. Szuster-Ciesielska, A., Daniluk, J. and Kandefr-Szerszen, M. Alcohol-related cirrosis with pancreatitis. The role of oxidative stress in the progression of the disease. Arch. Immunol. Ther. Exp. 49: 19-22, 2001.
6. Sranely Mainzen Princem, P. and Menon, V.P. Antioxidant action of *Tinospora cordifolia* root extract in alloxan diabetic rats. Phytother. Res. 15: 213-217, 2001.
7. 정규만, 구본홍. 십전대보탕에 관한 문헌적 고찰. 동서의학, 5(2):16-20, 1980.
8. 陳師文, 裴宗元. 太平惠民和劑局方. 서울, 경희대학교 한의학 과, p 152, 1974.
9. 전국 한의과대학 본초학교수 공저. 본초학. 서울, 영림사, pp 588-589, 2007.
10. 황규동, 류봉하, 박동원, 류기원. 십전대보탕 와송 및 십전대보탕과와송의 항암효과와 면역반응에 관한 연구. 대한한방

- 종양학회지 2(1):1-23, 1996.
11. 고영권, 류봉하, 박동원, 류기원. 십전대보탕이 CD4+ 및 CD8+ T세포수에 미치는 영향. 대한한방중양학회지 4(1):111-129, 1998.
 12. 윤재호, 최승훈, 안규석. 십전대보탕이 암전이 억제에 미치는 영향. 대한한방중양학회지 4(1):131-146, 1998.
 13. 임동주, 김동희. 십전대보탕가미방의 면역조절효과에 관한 실험적 연구. 한의학논문집, 10(1):55-65, 2001.
 14. 최승훈, 오민석, 송태원, 남기열. 십전대보탕의 면역증강 및 항암 효과. 한의학논문집, 11(1):257-283, 2002.
 15. 이세나, 손재봉, 손중희, 김완기, 이상준, 이평재, 임강현. 한약혼합제(韓藥混合製劑)와 녹용발효추출물(鹿茸醱酵抽出物)의 성장기(成長期) 흰쥐 장골(長骨) 길이 성장(成長)에 대한 효과. 대한본초학회지 24(1):121-131, 2009.
 16. 한상원, 김영태, 손양선, 진수희, 심인섭, 임사비나, 이학인. 녹용 및 녹용약침이 동물의 성장과 지능발달에 미치는 영향. 대한침구학회지 18(5):122-134, 2001.
 17. 이민형, 서영배. 녹용의 조혈작용에 대한 실험적 연구. 대한본초학회지 16(1):91-109, 2001.
 18. 김성훈, 이효정, 박정란, 김하나, 안규석, 조덕연, 최돈웅. 녹용의 품질에 따른 조혈작용 비교연구. 생약학회지 35(1):6-15, 2004.
 19. 이수영, 안택원. 녹용대보탕의 노화 억제 효과에 대한 실험적 연구. 한의학논문집, 16(2):327-348, 2007.
 20. 이현진, 조현석, 황민섭, 정찬영, 이동진, 김은정, 김갑성, 김경호. 녹용약침이 백서의 제2형 Collagen 유발 관절염에서 iNOS발현과 NO 생성 억제에 미치는 영향. 대한침구학회지 25(5):105-116, 2008.
 21. 황종순, 황지혜, 이현진, 이동진, 강민주, 백성욱, 조현석, 김경호, 김갑성. 녹용약침(鹿茸藥鍼)이 CIA 모델 생쥐의 염증인자 생성억제에 미치는 영향. 대한침구학회지 24(6):1-14, 2007.
 22. 김혜영, 박유경, 강명희. 녹용혼합음료의 섭취가 당뇨환자의 지질양상 및 항산화 영양상태에 미치는 영향. 한국식품영양학회지 33(7):1147-1153, 2004.
 23. Mari, M., Seiji, K., Kenji, F., Airo, T. and Toshimasa, N. Evaluation of the estrogenic activities of some pesticides and their combinations using MtT/Se cell proliferation assay. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 209(5):413-421, 2006.
 24. 한의과대학 방제학교실 교수 공저. 방제학. 서울, 영림사, p 294, 1999.
 25. 윤유, 허성일, 정미정, 왕명현. 연근별 황기의 항산화 및 항당뇨 활성 평가 고찰. 생약학회지 40(1):1-5, 2009.
 26. 김은혜, 이동권. 인삼의 항산화 작용. 고려인삼학회지 33(1):1-7, 2009.
 27. 김대곤, 손동화, 최응규, 조영석, 김수민. 복령 균사체의 항산화성 및 아질산염 소거작용. 한국식품영양학회지 31(6):1097-1101, 2002.
 28. 안상원, 이철완. 숙지황(熟地黃)과 육미지황탕(六味地黃湯)이 노화과정 흰쥐에서의 항산화 기전에 미치는 영향. 한의학논문집, 8(1):593-623, 1999.
 29. 조수인. 흰쥐 신장 조직 손상에 대한 숙지황의 항산화 효과. 대한본초학회지 18(4):119-126, 2003.
 30. 장문석, 양용모, 유태원, 김도립, 박은화, 고은빛, 최문정, 김휴영, 오지훈, 심경준, 윤지원, 박 성. 숙지황(熟地黃)이 남성 생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향. 대한본초학회지 22(4):81-86, 2007.
 31. 안준철, 문진영, 임종국. 당귀(當歸) 약침액의 항산화 효능에 관한 연구. 대한침구학회지 13(2):254-262, 1996.
 32. 임창수, 김갑성. 작약 약침액의 항산화 효능에 관한 연구. 대한침구학회지 14(2):191-198, 1997.
 33. Wills, B.K., Aks, S., Maloney, G.E., Rhee, J., Brand, R., Sekosan, M. The effect of amifostine, a cytoprotective agent, on paraquat toxicity in mice. J Med Toxicol. 3(1):1-6, 2007.
 34. Krasowska, A., Sigler, K. Cell-protective and antioxidant activity of two groups of synthetic amphiphilic compounds-phenolics and amine N-oxides. Folia Microbiol (Praha). 52(6):585-592, 2007.
 35. Mullens, W., Abrahams, Z., Francis, G.S., Skouri, H.N., Starling, R.C., Young, J.B., Taylor, D.O., Tang, W.H. Sodium nitroprusside for advanced low-output heart failure. J Am Coll Cardiol. 52(3):200-207, 2008.
 36. Molina-Jiménez, M.F., Sánchez-Reus, M.I., Andres, D., Cascales, M., Benedi, J. Neuroprotective effect of fraxetin and myricetin against rotenone-induced apoptosis in neuroblastoma cells. Brain Res. 1009(1-2):9-16, 2004.
 37. Zhang, J.G., Nicholls-Grzemeski, F.A., Tirmenstein, M.A., Fariss, M.W. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. Chem Biol Interact. 138(3):267-284, 2001.
 38. Goodwin, J.S., Garry, P.J. Relationship between megadose vitamin supplementation and immunological function in a healthy elderly population. Clin Exp Immunol. 51(3):647-653, 1983.
 39. Chen, Q., Espey, M.G., Krishna, M.C., Mitchell, J.B., Corpe, C.P., Buettner, G.R., Shacter, E., Levine, M. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. Proc Natl Acad Sci USA. 102(38):13604-13609, 2005.
 40. 한상원, 서정철, 이윤호, 최제용. 녹용약침액의 DNA chip을 이용한 유전자 발현 분석. 대한침구학회지 20(3):34-44, 2003.
 41. Wollman, E.E., d'Auriol, L., Rimsky, L., Shaw, A., Jacquot, J.P., Wingfield, P., Graber, P., Dessarps, F., Robin, P.,

- Galibert, F. Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 263(30):15506-15512, 1988.
42. Corpas, F.J. "The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves.". *Plant Cell Physio.* 47(7):984-994, 2006.
43. Corpas, F.J., Barroso, J.B., del Río, L.A. "Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells.". *Trends Plant Sci.* 6(4):145-150, 2001.
44. Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 66(8):1499-1503, 2003.
45. Pastore, A., Piemonte, F., Locatelli, M., Lo Russo, A., Gaeta, L.M., Tozzi, G., Federici, G. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clin. Chem.* 47(8):1467-1469, 2003.
46. Arnér, E., Holmgren, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* 267(20):6102-6109, 2000.