

石菖蒲 煎湯液이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響

Effects of *Acori Rhizoma* water extract on the Cerebral Cortex Neuron injured by Glucose Oxidase

최공한* · 박승택** · 류도곤*** · 최만호*** · 허진영*** · 강성도*** · 고정수*** · 양상철*** · 성은
경*** · 조남수*** · 이춘우*** · 서의석*** · 류영수*

1. 緒論

최근들어 平均壽命의 延長과 老人 人口의 增加로 老化에 併發하는 慢性 退行性 疾病들이 急増하고 있고 사회적 문제로 대두되고 있다¹⁾.

韓醫學에서 腦에 관한 記錄은 《素問·五臟別論篇》²⁾에 “或而腦髓爲臟 或而爲腑……故藏而不瀉, 名曰奇恒之府”라고 하여 奇恒之府 중의 하나로 보았으며, 또한 《素問·陰陽應象大論篇》²⁾에서는 “腎生骨髓”, 《靈樞·海論篇》³⁾에서는 “腦爲髓之海”라 하여 腦를 腎과 관련된 단순한 生理器管의 하나로 認識하였다⁴⁻⁵⁾. 以後 後世에 이르러 “腦爲元神之府”, “人之記性 皆屬腦中”이라 하여 腦의 精神 및 記憶作用을 언급하여 오늘날 西洋醫學의 人 腦와 類似한 概念으로 認識하였다⁶⁻⁷⁾.

西洋醫學에서 腦의 病理變化로는 甚한 彌滿性 腦萎縮과 腦神經細胞의 消失 등 器質的 變성과 腦의 各種 神經傳達物質의 減少 등 生化學的 變

化를 招來함으로써 記憶力과 知能低下 등 高等精神活動에 障礙를 일으키는데 이는 人間의 老化로 인한 腦의 退行性 疾患과 不可分의 關係를 가지고 있다⁸⁾.

일반적으로 老化란 한 개체에서 시간의 진행에 비례하여 일어나는 漸進的이고 不可逆의인 退行性 變化로서, 構造的·機能的 變化가 초래되어 外部環境에 대해 反應하는 能力이 떨어지는 現象이다⁹⁻¹⁰⁾.

老化의 原因은 아직 明確하게 밝혀지지 않아 다양한 假說들이 발표되어 왔는데, 最近에는 연령의 增加에 따라 自由基가 生체에 축적되어 각 세포 성분 機能을 低下시키고 老化를 가져온다는 自由基說(free radical theory)에 관련된 研究가 多樣하게 進行되고 있다¹⁰⁾.

最近 腦에 關한 實驗的 研究로는, 黃¹¹⁾은 遠志가 腦神經膠細胞로부터 分泌된 炎症性 腦細胞活性物質에 대한 抑制效果가 있음을, 崔¹²⁾는 定志丸이 老化된 腦機能을 改善시키고 神經細胞毒性에 防禦效果가 있음을 보고하였다. 그러나 石菖蒲가 酸素自由基에 의해 손상된 大腦의 變化에 관한 研究는 아직 보고된 바가 없었다.

* : 원광대학교 한의과대학 정신과교실
** : 원광대학교 의과대학 해부학교실
*** : 원광대학교 한의과대학 생리학교실

따라서 酸素自由基의 神經毒性에 대한 石菖蒲의 影響을 究明하기 위하여 新生 생쥐에서 순수 분리한 大脳神經細胞를 培養하여 glucose oxidase(GO)에 노출시킨 후 이의 毒性效果를 測定하였으며, 또한 石菖蒲 煎湯液을 投與한 後 GO에 의하여 誘發된 毒性에 대한 防禦 效果를 neurofilament, SRB측면에서 比較 調査하여 유의성 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

本 實驗에 使用한 동물은 ICR 계통의 生後 3 일된 健康상태가 양호한 生쥐를 使用하였다.

2) 藥材

本 實驗에 使用한 石菖蒲는 圓光大學校 附屬益山韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 檢液의 調劑

石菖蒲 200g을 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 2시간동안 電熱器로 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 凍結乾燥器에서 24시간 凍結乾燥하여 각각 20.7g의 분말 시료를 얻었다.

2) 藥劑 製造

本 實驗에 使用한 藥劑로는 glucose oxidase(GO, Sigma)로서 각각 100mU/ml, 10mU/ml, 1mU/ml의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 實驗 당일 適當한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 培養液에 첨가하여 사용하였다.

3) 細胞培養

大脳神經細胞의 분리는 Michikawa 등¹³⁾의 方法에 따라 施行하였다. 즉 生後 1-3일된 生쥐에서 적출한 뇌조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 處理한 후 36℃, 5% CO₂/95%air로 조절된 恆온기 내에서 培養하였다. 培養完了後 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)으로 3회 세척 후 Pasteur 피펫으로 세포를 분리시켰다. 분리된 세포들은 Poly-L-lysine (Sigma)으로 전처리된 96-multiwell에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 培養液으로 교환하여 주었으며 7일동안 培養後 本 實驗에 使用하였다.

4) 酸素自由基 處理

酸素自由基가 生쥐의 大脳神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 일정시간 培養한 神經細胞를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 1-30mU/ml glucose oxidase(GO)가 포함된 培養液에서 2-12시간 동안 處理 後 分析하였다.

5) 細胞毒性 및 防禦效果 檢定

(1) 細胞生存率 分析

① NR定量

Neutral red(NR, Sigma)의 定量은 Borenfreund와 Puerner(1984)¹⁴⁾의 方法에 따랐다. 즉 여러 濃度の GO를 處理한 培養 神經細胞를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5mg/ml의 NR을 well당 최종濃도로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37℃, 5% CO₂로 조절된 恆온기에서 培養하였다. 培養 완료후 PBS로 3회 세척후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 處理한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다.

② MTT 定量

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma) 定量은 Mosmann¹⁵⁾의 方法에 의하였다. 酸素自由基나 항산화제를 處理한 培養 神經細胞를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50mg/ml의 MTT를 well 당 最終濃度로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 完了後 dimethylsulfoxide(DMSO, Merk)를 處理한 다음 spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 測定後 對照群과 比較 調査하였다.

③ Neurofilament enzymeimmuno assay(EIA)

培養중인 神經細胞를 PBS로 3회 세척하여 알콜로 고정시킨 다음 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료후 NE14(1:100, Sigma)로 1시간 동안 반응시킨후 0.04% O-phenylenediamine(OPD), Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide로 處理한 다음 Dynatech Microelisa reader로 490nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다.

④ SRB 定量

酸素自由基나 石菖蒲으로 일정시간 동안 處理한 大腦神經細胞에 0.4% sulforhodamine B를 200μl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음 1.0% acetic acid로 3회 세척하였다. 세척 완료후 10mM Tris base를 이용하여 SRB-bound protein을 녹인후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다.

6) 統計 處理

實驗 結果에 대한 유의성의 검정은 ANOVA 후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

III. 實驗成績

1. 酸素自由基의 毒性效果

1) 細胞 生存率 分析

(1) MTT 定量

酸素自由基가 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 glucose oxidase(GO)가 1mU/ml에서 30mU/ml 까지의 각각의 濃度로 포함된 培養液에서 6시간 동안 培養한 후 GO의 毒性效果를 MTT assay법에 의하여 調査한 結果 1mU/ml GO 處理에서는 세포의 생존율이 對照群(100%)에 비하여 86.3%로 나타났다. 그러나 10mU/ml의 處理에서는 74.4%로 이보다 다소 낮게 나타났다. 또한 25mU/ml와 30mU/ml GO를 處理한 경우 이의 생존율은 각각 52.9%(p<0.05)와 36.9(p<0.01)%로 對照群에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났다(Fig. I). GO가 시간에 따라 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 25mU/ml GO가 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 각각 2~12시간 동안 培養한 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 對照群과 比較 調査한 結果 2시간 培養에서는 對照群(100%)에 비하여 76.8%의 細胞生存率을 보였다. 또한 4시간 培養에 있어서는 59.5%로 對照群에 비하여 다소 낮은 생존율을 나타냈으며 6시간 培養에서는 對照群에 비하여 51.1%(p<0.05)의 생존율을, 12시간 培養에 있어서는 37.6%(p<0.01)의 생존율을 각각 나타냈다(Fig II).

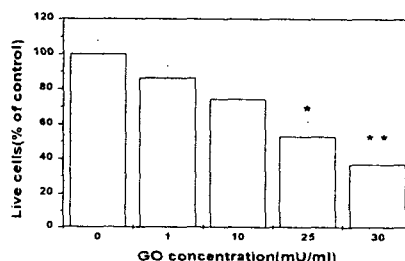


Fig. 1. Dose-dependency of glucose oxidase(GO). GO-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in

cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to 1, 10, 25 and 30 mU/ml GO for 6 hours, respectively. The results indicate the mean±SE(n=6). **p(0.01

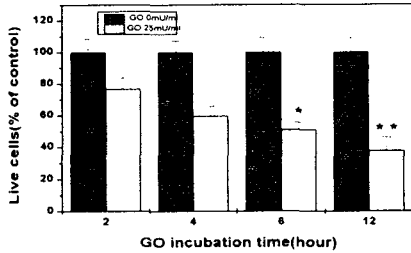


Fig. II. Time-dependency of glucose oxidase(GO) in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to 25 mU/ml GO for 2, 4, 6 and 12 hours, respectively. Cell viability was measured by MTT assay. The results represent the mean±SE(n=6). *p(0.05): **p(0.01

(2) NR 定量

培養中인 大腦神經細胞를 Ca^{2+} , Mg^{2+} free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 GO가 1mU/ml에서 20mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 6시간 培養한 다음 이의 影響을 調査한 結果 1mU/ml의 處理에서 細胞의 生存率은 對照群(100%)에 비하여 73.5%로 나타났으며 5mU/ml와 10mU/ml에서는 각각 64.0%와 47.1%(p<0.05)로 나타났다. 또한 20mU/ml GO에서는 21.3%(p<0.01)로 나타났다(Fig III). GO가 培養時間에 따라 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 MCV(midpoint cytotoxicity value)값인 10mU/ml GO濃度에서 2~12시간 동안 培養한 후 각 시간 별로 세포의 생존율을 調査한 結果 2시간 培養에서는 對照群(100%)에 비하여 68.3%로 나타났으며 4시간과 6시간 및 12시간에서는 각각 56.3%(p<0.05), 50.0%(p<0.05), 및 25.9%(p<0.01)로 나타났다(Fig IV).

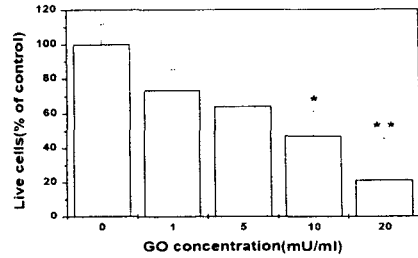


Fig. III. Dose-response relationship of glucose oxidase(GO) in cultured mouse cerebral neurons. Cytotoxicity was measured by NR assay. Cultures were exposed to 1, 5, 10 and 20 mU/ml GO for 6 hours, respectively. The results indicate the mean±SE(n=6). *p(0.05): **p(0.01

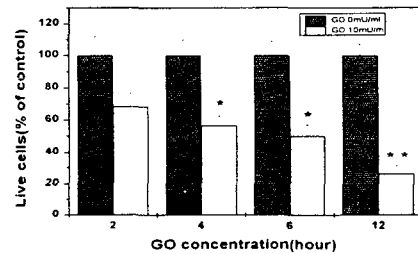


Fig. IV. Time-dependency of glucose oxidase(GO) in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to 10mU/ml GO for 2, 4, 6 and 12 hours, respectively. Cell viability was measured by NR assay. The results represent the mean±SE(n=6). p(0.05): **p(0.01

2. 韓藥抽出物の 效果

1) neurofilament 定量

(1) GO의 影響

GO濃度에 따른 neurofilament의 量的 測定을 위한 neurofilament EIA에 있어서 GO가 10-30mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 6시간 동안 處理한 후 細胞의 生存率을 對照群과 比較 調査하였다. 그 結果 10mU/ml GO 處理에서는 세포의 생존율은 對照群(100%)에 비하여 71.3%로 나타났으며, 15mU/ml 處理에서는 63.1%로 나타났다. 또한

20mU/ml의 경우는 48.4%($p<0.05$)의 생존율을 보여 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈으며, 25mU/ml와 30mU/ml GO의 處理에서는 각각 34.4%($p<0.01$)와 21.7%($p<0.01$)의 생존율을 나타냈다(Table I).

Table I. Dose-response relationship of glucose oxidase(GO) by neurofilament enzymeimmuno assay(EIA) in cultured mouse cerebral neurons.

GO(mU/ml)	EIA absorbance(490nm)	Decrease of neurofilament(%)
0	1.57 ± 0.18	-
10	1.12 ± 0.15	28.7
15	0.99 ± 0.13	36.9
20	0.76 ± 0.16*	51.6
25	0.54 ± 0.09**	65.6
30	0.34 ± 0.06**	78.3

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to various concentrations of glucose oxidase(GO) for 6 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values are the mean ± SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p(0.05)$; ** $p(0.01)$

(2) 石菖蒲(*Acori Rhizoma*, AR)의 效果 培養 大腦神經細胞에 대한 GO의 산화적 손상 에 있어서 石菖蒲抽出物의 效果를 neurofilament 의 量的變化側面에서 調査하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 20mU/ml GO 濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각의 抽出物인 石菖蒲(*Acori Rhizoma*, AR)가 25-150 μ g/ml이 각각 포함된 培養液에서 전처리 한 후 이의 防禦效果를 neurofilament EIA법으로 調査하였다. 20mU/ml GO만을 處理하였을 때 neurofilament의 양적변화는 對照群 1.37 에 비하여 0.73 으로 나타났다. 그러나 石菖蒲(AR) 25 μ g/ml 處理에서는 對照群 1.35에 비하여 0.83으로 나타났다. 또한 50 μ g/ml의 AR 處理에서는 對照群 1.39에 비하여 1.11($p<0.05$)로 다소 높게 나타났다. 그러나 100 μ g/ml 및 150 μ g/ml AR處理의 경우에 있어서 각각 對照群 1.41에 대하여 1.22($p<0.01$)로, 對照群 1.42에 대하여 1.28($p<0.01$)로 GO만의 處理에 비하여 매우 높게 나타났다(Table II).

Table II. Dose-response relationship of *Acori Rhizoma*(AR) extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in neurofilament

concentration of AR extract (μ g/ml)	EIA absorbance	
	GO 0mU/ml	GO 20mU/ml
control	1.37 ± 0.13	0.73 ± 0.01
25	1.35 ± 0.11	0.83 ± 0.05
50	1.39 ± 0.15	1.11 ± 0.12*
100	1.41 ± 0.16	1.22 ± 0.14**
150	1.42 ± 0.19	1.28 ± 0.18**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with 25, 50, 100 and 150 μ g/ml *Acori Rhizoma*(AR) for 3 hours respectively. After then cultures were exposed to 20mU/ml glucose oxidase(GO) for 6 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values are the mean ± SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. * $p(0.05)$; ** $p(0.01)$

2) SRB 定量

(1) GO의 影響

酸素自由基가 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 총단백질量的 측면에서 調査하기 위하여 glucose oxidase(GO)가 5mU/ml에서 60mU/ml 까지의 각각의 濃度로 포함된 培養液에서 6시간 동안 培養한 후 GO에 의한 단백질 합성의 변화에 대해 調査한 結果 1mU/ml GO 處理에서는 단백질의 합성이 對照群(100%)에 비하여 76.4%로 나타났다. 또한 15mU/ml의 處理에서는 對照群에 비하여 56.3%($p<0.05$)로 다소 낮게 나타났다. 또한 30mU/ml와 60mU/ml GO를 處理한 경우 단백질 합성은 각각 48.2%($p<0.01$)와 21.5%($p<0.01$)로 나타나 對照群에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났으며, MCV값은 30mU/ml 에서 나타났다(Table III).

Table III. Dose-response relationship of glucose oxidase(GO) on total protein synthesis in cultured mouse cerebral neurons.

GO concentration(mU/ml)	Total protein(% of control)
0	100 ± 3.6
5	76.4 ± 5.1
15	56.3 ± 4.8*
30	48.2 ± 3.9**
60	21.5 ± 3.2**

Cultures mouse cerebral neurons were exposed to 5, 15, 30 and 60mU/ml glucose oxidase(GO) for 6 hours, respectively. Amount of total protein was measured by SRB assay(540nm), and shown as % of control. The results indicate the mean ± SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p(0.05)$; ** $p(0.01)$

(2) 石菖蒲(*Acori Rhizoma*, AR)의 效果

培養 大脳神經細胞에 대한 GO의 산화적 손상 에 있어서 石菖蒲抽出物의 效果를 Total protein 의 量的變化 측면에서 調查하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 30mU/ml GO 濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 抽出物인 石菖蒲(*Acori Rhizoma*, AR)가 20-160 μ g/ml가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이 의 防禦效果를 調查하였다. 石菖蒲(AR)가 30mU/ml GO만을 處理하였을 때 총단백질의 양 적변화는 對照群(100%)에 비하여 58.3%로 나타 났다. 그러나 20 μ g/ml AR處理에서는 對照群에 비하여 67.2%로 나타났다. 또한 40 μ g/ml와 80 μ g/ml의 處理에서는 對照群에 비하여 각각 70.6%(p<0.05)와 72.5%(p<0.05)로 GO만의 處理 에 비하여 다소 높게 나타났다. 그러나 160 μ g/ml AR處理의 경우에 있어서 79.8%(p<0.01)로 GO만의 處理에 비하여 매우 높게 나타났다 (Table IV).

Table IV. Dose-response relationship of *Acori Rhizoma*(AR) extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in total protein

concentration of AR extract (μ g/ml)	Total protein(% of control)	
	GO 0mU/ml	GO 30mU/ml
control	100 \pm 3.6	58.3 \pm 4.3
20	100 \pm 5.3	62.7 \pm 6.2
40	100 \pm 4.2	70.6 \pm 5.7*
80	100 \pm 5.5	72.5 \pm 5.1**
160	100 \pm 4.1	79.8 \pm 6.7**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with 20, 40, 80 and 160 μ g/ml *Acori Rhizoma*(AR) for 3 hours respectively. After then, cultures were exposed to 30mU/ml glucose oxidase(GO) for 6 hours. Amount of total protein was measured by SRB assay at wavelength of 540nm. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. *p(0.05); **p(0.01)

IV. 考察

韓醫學에서는 人間の 壽命을 대략 100에서 120 歲로 보고 있으며, 內經 《靈樞·天年篇》³⁾을 보 면 “…… 六十歲 心氣始衰故憂悲 血氣懈惰 故好 臥 七十歲 脾氣虛 皮膚枯 …… 八十歲 肺氣虛 魄 離 故言善誤 九十歲 腎氣焦 四臟經脈空虛 百歲 五臟皆虛 神氣皆去 形骸獨居而終矣”라고 老化의

過程을 記述하고 있는데, 六十歲의 心氣始衰하여 憂悲하고 八十歲에 魄離하여 言善誤라 하여 老化 에 따른 精神의인 變化를 說明하였고, 또한 《素 問·上古天真論》²⁾에 “女子 七歲, 腎氣盛 …… 六 七三陽脈衰于上, 面皆焦, 髮始白, 七七任脈衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形壞而無子也, 丈夫 八歲, 腎 氣實 …… 六八陽氣衰于上, 面焦, 髮鬢頽去, 七八 肝氣衰, 筋不能動, 天癸竭, 精少, 腎臟衰, 形體皆 極, 八八則髮去”라고 하여 男·女의 年齡에 따른 腎氣의 盛衰與否가 人體의 生殖·生長發育·老衰 에 密接하게 關係하고 있음을 말하였으며, 虞²¹⁾는 “腎元盛即壽延, 腎元衰即壽夭”라고 하여 長壽하는 것이 腎氣에 의하여 決定된다고 하였다.

西洋醫學의으로 老化의 정의는 學說에 따라 다 소 다르게 설명되나 정리해 보면 다음과 같이 2 가지로 구분된다. 즉 하나는 老化가 受精에서 죽 음까지의 生體의 變化를 말한다는 것이고, 다른 하나는 成熟期 이후의 生體의 變化를 말한다는 것이다. 전자는 加齡現象(aging)이라고 불리워지 고 있으며, 후자는 협의의 老衰(senescence)라고 불리운다¹⁰⁾. 즉 老化란 한 개체에서 時間의 進行 에 비례하여 일어나는 漸進의이고 不可逆的인 退 行性 變化로서, 構造的·機能的 變化가 초래되어 外部環境에 대해 反應하는 能力이 떨어지는 自然 現象이다⁹⁻¹⁰⁾. 老化의 原因은 다양한 가설들이 존 재하는데 이는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았 기 때문이다. 현재까지 알려진 老化에 對한 가설 (theory)로는 크게 消耗說(waste and tear theory)과 遺傳子說로 대별된다. 消耗說은 다시 직접적인 원인으로 생각되는 有毒代謝產物 蓄積 과 free radical 理論, DNA 유전정보의 error로 발생되는 error 破滅說(error-catastrophe theory) 과 생리과정 중 발생하는 post-translation modifications 등으로 나누며 유전자설은 豫定說, DNA복제상에 나타나는 체세포 돌연변이설 (somatic mutation theory)과 프로그램설 (programmed aging theory) 등이 있다¹⁶⁾.

이중 가장 알려진 學說은 自由基說 (free-radical theory)로 최근 이를 뒷받침하는 證

據들이 많이 나오고 있어 이에 대한 研究가 활발히 進行되고 있는 實情이다¹⁷⁻¹⁸.

自由基說(free radical theory)은 세포내의 酸化 酵素가 촉매로 작용하는 O₂의 환원반응에서 自由基로 hydroxyl radical(OH⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂⁻) 등이 생기며 이것이 세포성분과 임의로 반응하여 산화체 혹은 과산화체를 만들게 되면 단백질, 효소, DNA 등 각 세포성분 본래의 기능을 상실하게 되는데, 연령의 增加에 따라 이 自由基가 蓄積되면 생체에 유해하게 작용하여 老化的 原因이 된다는 가설이다⁹⁻¹⁰.

韓醫學에서 腦에 關한 研究로는, 黃¹¹과 姜¹⁷은 遠志 및 天門冬이 腦神經膠細胞로부터 分泌된 炎症性 腦細胞活性物質에 대한 抑制效果가 있음을, 李¹⁸은 麝香이 損傷된 생쥐 腦組織에 對한 保護作用을, 崔¹²는 定志丸이 老化된 腦機能을 改善시키고 神經細胞毒性에 防禦效果를, 金¹⁹과 鄭²⁰은 洗心湯 및 溫膽湯이 腦組織의 抗氧化作用이 있음을 報告하였고, 이외에도 다수의 研究報告²¹가 發表되었으나, 酸素自由基를 통한 구체적인 大腦皮質의 變化에 關한 實驗은 아직 報告된 바가 없다.

酸素自由基와 中樞神經損傷과의 關係에 대한 最近의 研究報告는 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)에 酸素自由基의 제거 효소 유전자인 superoxide dismutase(SOD)-1에 돌연변이가 일어남으로써 患者의 腦속에 酸素自由基가 과다히 축적되어 결국 神經細胞에 酸化的 損傷을 주는 것으로 밝혀지면서²² 酸素自由基가 많은 神經病變에 關여하고 있음이 증명되어 酸素自由基의 毒性現象에 대한 機轉糾明과 酸素自由基에 의하여 誘發되는 疾患에 대한 治療的 접근을 위하여 國內外 많은 學者들이 動物을 대상으로 꾸준히 研究를 進行하여 왔다²³. 특히 酸素自由基는 세포막의 지질과산화 반응을 촉진시킬 뿐만 아니라²⁴, 질소자유기의 하나인 nitric oxide(NO)와 상호 작용함으로써 毒性이 강한 物質인 peroxyntirite를 생성하여 병변을 더욱 가속화시킨다고 한다²⁵. 또한 酸素自由基는

protein kinase C(PKC)나 cyclic AMP와 같은 이차 전달자에 影響을 미침으로서 세포독성을 초래한다고 한다. 최근에 酸素自由基의 酸化的 損傷에 대하여 한약재의 抽出物이나 동식물에서 정제한 天然抽出物들이 강력한 항산화작용을 나타낸다는 實驗結果들이 報告되어 지고 있다²⁶.

本 實驗에서 GO를 생쥐의 培養 大腦神經細胞에 노출시킨 후 NR assay와 MTT assay법으로 分析한 結果, GO는 處理 濃도와 時間에 비례하여 細胞의 生存率을 현저하게 減少시켰다. 이같은 結果는 酸素自由基가 培養 생쥐의 척수신경절 세포에, 소의 배양 회소돌기아교세포에 각각 毒性을 나타냈다는 實驗 結果와 일치하였다¹³. 이러한 현상은 酸素自由基가 中樞나 末梢神經細胞에 모두 細胞毒性을 가지고 있음을 證明해 주고 있다. 本 實驗에 있어서 酸素自由基가 생쥐의 培養 大腦神經細胞에 毒性을 나타낸 것은 GO가 항산화계에 손상을 줌으로서 항산화효소의 活性減少를 초래했거나 또는 酸素自由基중 superoxide와 같은 환원제가 세포내 Fe⁺⁺⁺와 상호작용하여 毒性을 나타냈을 가능성도 배제할 수는 없지만²⁷, 本 實驗의 NR assay와 MTT assay를 비롯하여 neurofilament EIA, SRB 分析의 結果를 볼 때 GO는 neurofilament의 손상, 단백질합성의 억제에 의한 것으로 생각된다²⁴.

GO의 酸化的 損傷에 대한 神經毒性을 調査하기 위하여 1-30mU/ml의 GO가 각각 여러 濃도로 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 시간별로 培養한 후 MTT assay에 의한 細胞生存率을 測定하였다. 그 結果 GO의 處理濃도에 비례하여 유의하게 細胞의 生存率이 減少하였으며 25mU/ml GO處理에서 MCV값(midcytotoxicity value)이 나왔다(Fig. I). 또한 GO의 處理 時間에 의한 影響을 調査하기 위하여 GO의 MCV인 25mU/ml에서 2-12시간 동안 각각 培養 大腦神經細胞를 培養한 結果 GO의 處理 時間에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 減少시켰으며 6시간 培養에서 MCV를 나타냈다(Fig. II). GO의 독성에 대한 影響을 調査하기 위하여

1-20mU/ml의 GO가 각각 여러 濃度로 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 시간별로 培養한 후 NR assay에 의한 細胞生存率을 測定하였다. 그 結果 GO의 處理濃度에 비례하여 有意하게 細胞의 生存率이 減少하였으며 10mU/ml GO處理에서 MCV값(midcytotoxicity value)이 나왔다(Fig. III). 또한 GO의 處理 시간에 의한 影響을 調査하기 위하여 GO의 MCV인 10mU/ml에서 2-12시간 동안 각각 培養 大腦神經細胞를 培養한 結果 GO의 處理 時間에 비례하여 細胞의 生存率을 有意하게 減少시켰으며 6시간 培養에서 MCV를 나타냈다(Fig. IV).

石菖蒲에 대한 neurofilament의 測定을 위한 neurofilament enzymeimmuno assay (EIA)에 있어서 GO는 培養 大腦神經細胞에 處理한 濃度에 비례하여 neurofilament의 양적 減少를 보였으며 20mU/ml GO處理에서 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다(Table I). 그러나 20mU/ml GO를 6시간 동안 神經細胞에 處理하기 전 25-150 μg/ml의 石菖蒲가 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리한 경우 處理한 濃度에 비례하여 neurofilament의 有意한 量的 增加를 보였으며 특히 150 μg/ml의 處理에서는 對照群(1.42±0.19)에 비해 1.28±0.18로 나타나 이는 GO만의 處理(0.73±0.01)에 비하여 매우 有意한 增加를 보였다(Table II). 총단백질 調査를 위한 SRB 分析에 있어서 GO가 5-60mU/ml의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 培養 大腦神經細胞를 6시간 동안 培養한 다음 총단백질量은 處理 濃度에 비례하여 減少하였으며 MCV는 30mU/ml GO處理에서 나타났다(Table III). 그러나 30mU/ml GO를 6時間 동안 神經細胞에 處理하기 전 20-160 μg/ml의 石菖蒲가 160 μg/ml의 處理에서는 對照群(100%)에 비해 79.8%로 나타나 이는 GO만의 處理(58.3%)에 비하여 다소 높은 增加를 보였다(Table IV).

이와같은 實驗 結果를 綜合해보면, GO와 같은 酸素自由基는 酸化的 損傷에 의해 細胞 生存率을 減少시키고 神經細胞에 대하여 毒性을 나타내며,

이에 대한 石菖蒲의 投與가 neurofilament의 量的 增加, 총단백질量의 增加를 보여 老化豫防에 一定的한 藥理的 效果가 있는 것으로 나타났다.

V. 結論

本 研究에서는 glucose oxidase(GO)의 酸化的 損傷에 의한 毒性 效果를 糾明하고 이 毒性 效果에 대한 石菖蒲의 效果를 確認하기 위해 新生 生쥐에서 분리 培養한 大腦 神經細胞를 對象으로 實驗한 結果는 다음과 같다.

1. 酸素自由基인 GO는 NR assay와 MTT assay에서 細胞生存率을 減少시켰다.

2. 酸素自由基인 GO는 神經細絲와 총단백질양을 감소시켜 생쥐의 培養 大腦神經細胞에 毒性을 나타내었다.

3. 石菖蒲(AR)는 GO에 의하여 감소된 神經細絲를 有意하게 증가시켰다.

4. 石菖蒲(AR)는 GO에 의하여 감소된 총단백질양을 有意하게 증가시켰다.

이상의 實驗結果에 따르면 石菖蒲은 GO와 같은 酸素自由基의 酸化的 損傷에 대한 防禦作用이 있어 腦細胞의 老化 豫防에 대해 效果的으로 活用할 수 있으며, 尙後 이에 대한 臨床的인 研究가 보완되어져야 할 것으로 思料된다.

= Abstract =

Effects of *Acori Rhizoma* water extract on the Cerebral Cortex Neuron injured by Glucose Oxidase

Choi, Kong-Han* · Park, Seung-Taeck** · Ryu, Do-Gon*** · Choi, Min-ho · Hea, Jin-young* · Kang, Sung-do* · Go, Jeong-soo* · Yang, Snag-cheal* · Sung, Yeun-Kyung* · Cho, Nam-su* · Lee, Chun-Woo* · Eui-ruk Sou* · Ryu, Young-su*

*Dept. of Psychology, ***Dept. of Physiology, College of Oriental medicine, **Dept. of Anatomy, College of medicine, Wonkwang. Univercity, Iksan, Korea

The purpose of this study is to examine the toxic effects caused by Glucose Oxidase(GO) and the effects of herbal extracts such as *Acori Rhizoma*(AR) on the treatment of the toxic effects. For this purpose, experiments with the cultured cell from the cerebrums of new born mice were done.

The results of these experiments were as follows.

1. GO, a oxygen radical, decreased the survival rate of the cultured cells on NR assay and MTT assay
2. GO, a oxygen radical, decreased the amount of neurofilaments and total protein
3. AR have efficacy of increasing the amount of neurofilament.
4. AR have efficacy of increasing the amount of total protein.

From the above results, It is concluded that AR has marked efficacy as a treatment for the damages caused in the GO-mediated oxidative process. And AR is thought to have certain pharmacological effects on controlling over aging. Further clinical study of this pharmacological effects of AR should be complemented.

Key Word : glucose oxidase(GO), *Acori Rhizoma*(AR), oxygen radicals(OR).

參考文獻

1. 의학교육연수원 편저 : 노인의학, 서울, 서울대학교출판부, p.3, 7, 9, 10, 14, 22, 27, 595, pp.29-31, 1997.
2. 楊維傑編 : 黃帝內經譯解(素問), 서울, 成輔社, pp.1-12, 42-61, 100-103, 131-145, 206-211, 455-468, 701-704, 1980.
3. 楊維傑編 : 黃帝內經譯解(靈樞), 서울, 成輔社,

pp.84-89, 104-145, 280-283, 1980.

4. 金完熙外編著: 東醫生理學, 서울, 慶熙大學校 出版局, p.384, 1993.
5. 成彊慶 : 腦의 機能에 對한 臟象論的 考察, 서울, 大韓韓醫學會誌, 16 (1):468-474, 1995.
6. 李時珍 : 本草綱目, 서울, 高文社, pp.603-604, 1973.
7. 程如海 : 略論張錫純心腦共主神明說, 北京, 北京中醫藥大學學報, 19(6): 12, 1996
8. 지계근 : 치매(Dementia)의 병리, 大韓神經科學會誌, 3(1):5-9, 1985.
9. 이철완 : 이철완교수의 노인병 연구, 서울, 일중사, pp.130-150.1997.
10. 조유향 : 노인보건, 서울, 현문사, pp.43-49, 1995.
11. 黃始榮 : 遠志에 의한 腦 星狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制 效果에 關한 研究, 圓光大學校 大學院 博士論文, 1997.
12. 崔龍垓 : 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗的 研究, 圓光大學校 大學院 博士論文, 1996.
13. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU : Oxygen radical -induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J Neurosci Res., 37:62-70, 1994.
14. Borenfreund E, Puerner JA ; A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). J. Tiss cult Mett 9:1-9, 1984.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol Methods., 65:55-63, 1983.
16. 徐舜圭 : 成人病 老人病學, 서울, 高麗醫學, pp.10-13, 225-228, 1992.
17. 강형원 : 天門冬에 의한 腦神經膠細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制效果, 圓光大學校 大學院 碩士論文, 1997.
18. 李保英·姜錫峯 : 麝香이 생쥐이 腦損傷에 미치는 影響, 서울, 大韓韓醫學會誌, 16(2):299-311,

- 1995.
19. 金聖賢·李相龍 : 洗心湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2): 39-50, 1997.
 20. 鄭仁哲·李相龍 : 溫膽湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2): 51-62, 1997.
 21. 鄭智天 : 左歸飲과 右歸飲에 의한 活性 酸素類의 消去作用과 抗酸化 酵素系의 活性 增加 效果에 대한 研究, 大韓韓醫學會誌, 17(1)21-36, 1996.
 22. Tsai S Y, Tchen P H, Chen J D : The relation between motor evoked potentia and clinical motor status in stroke patients. *Electromyogr. Clin. Neurophysiol.*, 32:615-620, 1992
 23. Floyd RA : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.*, 4:2587-2597, 1990.
 24. 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 alpatocopherol administrtion. *Stroke.*, 14:977-982, 1983.
 25. Zhang Y, Tatsuno T, Carney JM, Mattson MP : Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against iron- induced degeneration. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 13:378-388, 1993.
 26. 백봉숙 외 : 녹차로 부터 분리된 Epicatechin 3-O-Gallate의 抗酸化作用 機轉에 관한 研究, 釜山大學校藥學研究誌, 29(2):49-56, 1995.
 27. Halliwell B : Oxidants and human disease : Some new concepts. *FASEB J.*, 1:358-364, 1987.