

# 炙甘草湯이 LPS와 PMA에 의해 손상된 C6 glial 세포에 미치는 영향

나영훈, 조남수\*, 유준기\*, 이 인\*, 신선호\*, 문병순

원광대학교 한의학전문대학원, 원광대학교 한의과대학 심계내과학교실\*

## Effects of *Jagamcho-tang* on the C6 Glial Cell Injured by LPS Combined PMA

Young-Hoon Na, Nam-Su Cho\*, Jun-Ki Rhyu\*, In Lee\*, Sun-Ho Shin\*, Byung-Soon Moon

Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University  
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University\*

The water extracts of *Jagamcho-tang* has been used for treatment of arrhythmia and palpitation in oriental traditional medicine. Brain is provided with blood flow by heart. *Jagamcho-tang* has been studied on ischemia and infarction in heart. However, little is known about the mechanism by which the water extracts of *Jagamcho-tang* rescues brain cells from ischemic damages. To elucidate the protective mechanism on ischemia induced cytotoxicity, the effects of *Jagamcho-tang* on ischemia induced cytotoxicity and generation of nitric oxide(NO) are investigated in C6 glioma cells. *Jagamcho-tang* induce NO in a dose dependent manner up to 2.5mg/ml in C6 glioma cells. The pretreatment of *Jagamcho-tang* protect sodium nitroprusside(SNP) (2mM) induced cytotoxicity. This effect of *Jagamcho-tang* is mimicked by treatment by pretreatment of SNP(100μM), an exogenous NO donor. NG-monomethyl-L-arginine(N<sup>o</sup>MMA), a specific inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), significantly blocks the protective effects of *Jagamcho-tang* on cell toxicity by ischemia. In addition, lipopolysaccharide(LPS) and phorhol 12-myristate 13-acetate(PMA) treatment for 72h in C6 glial cells markedly induce NO, but treatment of the cells with the water extracts of *Jagamcho-tang* decrease nitrite formation in a dose dependent manner. In addition, LPS and PMA treatment for 72h induce severe cell death and LDH release into medium in C6 glial cells. However treatment of the cells with the water extracts of *Jagamcho-tang* dose not induce significant changes compare to control cells. Furthermore, the protective effects of the water extracts of *Jagamcho-tang* is mimicked by treatment of N<sup>o</sup>MMA. Taken together, I suggest that the protective effects of the water extracts of *Jagamcho-tang* against ischemic brain damages may be mediated by regulation of iNOS during ischemic condition.

**Key Word :** *Jagamcho-tang*(zhigancaotang), Nitric Oxide, NO, C6 Glial Cell

## I. 緒 論

炙甘草湯은 張<sup>1)</sup>의 《傷寒論》에 “傷寒脈結代, 心動悸 炙甘草湯主之”라고 처음 수록된 처방으로서 이후 여러 의서에 인용되어 왔으며, 王<sup>2)</sup>은 肺痿를, 汪<sup>3)</sup>은 呃逆을, 張<sup>4)</sup>은 誤治로 汗下하여 眞陰이 손상되어 오는 癭病을 치료하는데 사용하는 등 매우 광범위하게 활용되고 있다. 또한, 최근에는 心氣虛, 心陰不足으로 인한 각종 心臟疾患, 甲狀腺機能亢

進症, 神經衰弱症, 貧血, 交感神經緊張症, 高血壓, 動脈硬化 등에 응용하고 있다<sup>5-7)</sup>.

《素問·六節藏象論篇》<sup>8)</sup>에서는 “心者生之本 神之變也”, 《靈樞·本神篇》<sup>9)</sup>에서는 “心藏脈 脈舍神”이라고 한 바와 같이 心의 주요 생리기능은 인간의 사유, 의식, 정신활동을 주재하는 主神志機能이며, 이러한 주요 생리기능이 저하되면, 心神不安으로 인한 驚悸不安, 失眠健忘, 喜悲欲哭, 多憂善忘, 精神恍惚

등 정신활동장애를 나타낸다.<sup>3,10-11)</sup> 이러한 心의 기능은 현대의학적인 腦의 기능인 학습, 기억, 각성, 기쁨, 공포, 분노 등과 관련된 기능과 유사하다<sup>12)</sup>.

한의학에서 腦에 대한 기록을 살펴보면 《素問·奇病論篇》<sup>13)</sup>에서 “腦是髓液 聚集之處 稱爲髓海”라 하였고, 《靈樞·海論篇》<sup>14)</sup>에서는 “髓海有餘 則輕勁多力 自過其度 髓海不足 則腦轉耳鳴 脛痠眩冒 目無所見 懈怠安臥.....”라 하였으며, 柳 등<sup>7,13-14)</sup>은 腦髓의 機能이 失調되거나 減退되면 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘, 知能低下, 痴呆 등의 임상증상이 나타난

다 하였다.

뇌조직은 체중의 2%에 불과하지만 뇌로 가는 혈액량은 안정시 심박출량의 15%를 차지하고 흡입하는 전체 산소량의 약 20%를 필요로 한다<sup>12,15</sup>. 또한, 心臟肥大, 心不全, 不整脈, 虛血性 心疾患, 류마티스성 心臟疾患, 僧帽瓣脫出 및 心粘液腫 등의 심장질환은 뇌졸중의 발생 빈도를 증가시키는 위험요소로서 작용하고 있으며<sup>16-17</sup>, 이와같이 전자(embolus)에 의해 발생하는 뇌의 색전증은 전체 뇌혈관 질환중 32%를 차지하고 있다<sup>15</sup>.

炙甘草湯에 대한 실험적 연구로 文<sup>18</sup>은 심박동수, 좌심실압, 수축기의 심근능력, 심근효소의 변화 등에서 유의성이 있는 효과를 나타내었다고 하였고, 李<sup>19</sup>는 허혈시 NO의 생성과 매우 밀접한 관계가 있으며, 허혈후 재관류시 미토콘드리아의 독성, 막독성을 억제시켰고 심근세포 돌기의 수축이나 세포의 수적감소를 억제시킨다고 하였고, 韓<sup>20</sup>은 혈청중 T3, T4, 및 FT4 함량의 하강작용이 있다고 보고 하고 있으나, 뇌허혈시의 nitric oxide(NO) 생성에 의해 손상된 신경세포에 대한 연구는 아직 찾아 볼 수 없었다.

이에 저자는 益心氣, 補心血, 養心陰, 通心陽의 효능이 있는<sup>9</sup> 炙甘草湯이 허혈상태에서 nitric oxide(NO)가 야기하는 세포손상에 어떠한 효과를 나타내는 지 구명하고자 lipopolysaccharide(LPS)와 phorhol 12-myristate 13-acetate(PMA)에 의해 손상된 C6 glial 세포에서 炙甘草湯의 NO 생성에 대한 방어효과 및 MTT assay, LDH 활성도 측정, 광학현미경적 관찰에 의한 방법으로 세포손상 방어기전에 대하여 실험적으로 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 재료

(1) 세포주  
본 실험에 사용한 C6 glial 세포주는 America Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 사용하였으며, CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>) 10% fetal bovine serum(Hyclones)이 포함된 DMEM(dulbecco's modified eagle's medium)(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 DMEM 배양액을 교체해 주며 log phase에 있는 세포를 사용하였다.

### (2) 약제

본 실험에 사용한 炙甘草湯의 처방은 張<sup>1)</sup>의 《傷寒論》에 의거하였으며, 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

### 2. 방법

#### (1) 점액의 조제

炙甘草湯 5첩 분량인 440g을 증류수 2,000ml와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로

전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 上淸液을 취한 다음, 여과지로 여과한 용액을 감압 회전증발기를 이용하여 감압 농축한 후 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 건조엑기스를 얻었다. 건조한 엑기스는 분말로 만들어 증류수로 희석하여 원심분리한 후 취한 上淸液을 여과하여 檢液으로 사용하였다.

#### (2) Nitrite 농도 측정

C6 glial 세포를 새로운 배양액으로 교환한 후 90분간 배양하면서 배양액으로 유리되어 나온 nitrite의 양을 15분마다 6회에 걸쳐 측정함으로써 대조군과 실험군의 iNOS(type2 nitric oxide synthase)의 활성도를 비교하였다. 먼저 알고 있는 농도의 sodium nitrite를 이용하여 표준곡선을 구하고, 대조군과 실험군의 배양액을 각각 150μl씩 얻어 4℃에서 1,500rpm으로 15분간 원심분리한 후, 세포성분들을 침전시키고 부유액만을 취하여 Griess reagent와 동량으로 혼합하여 실온에서 10분간 반응시키고 550nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다.

#### (3) 광학현미경적 관찰

세포의 형태학적 변화를 조사하기 위하여 배양중인 배양용기(well plate)를

### Prescription of Jagamcho-tang

한약명	생약명	중량(g)
甘草炙	Glycyrrhizae Radix(boiled root)	8.00
生薑	zingiberis Rhizoma(raw root)	6.00
桂枝	Cinnamomi Ramulus(twig)	6.00
大棗	Zizyphi Fructus(fruit)	10.00
生地黃	Rehmanniae Radix(raw root)	32.00
麥門冬	Liriodis Tuber(root)	10.00
麻子仁	Cannabis Fructus(fruit)	8.00
人蔘	Ginseng Radix(root)	4.00
阿膠	Gelantium(treated skin of cattle)	4.00
Total amount		88.00

도립위상차 현미경(Nikon)에서 관찰하였고, 필요시 부착된 사진기로 촬영하였다.

(4) MTT 정량

대조군과 실험군들을 각각 8개의 well을 한 군으로 하였으며, MTT [3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma) 定量은 Mosmann<sup>21)</sup>의 방법에 따랐다. 즉 C6 glial 세포를 배양한 후 상층액을 버리고 사용 당일 제조한 500 µg/ml MTT를 배양용기당 1ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub>로 유지된 정온기 내에서 배양하였다. 배양 완료 후 세포내의 formazan을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 dimethyl sulfoxide(DMSO, Merck)를 배양용기당 1ml씩 넣고 15분간 실온에서 방치한 후 흡광도계로 540nm에서 吸光度를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

(5) Lactate dehydrogenase(LDH) 활성도 측정

대조군과 실험군들을 각각 8개의 well을 한 군으로 하여 각 well의 상층액을 tube에 담아 1,000rpm으로 7분간 원심 분리시킨 후, tube의 부유액을 검체량 50µl와 효소기질액 kit인 LD-D 1.0ml를 섞어 30℃, 340nm에서 Gilford-Impact 400E로 setting하여 측정하였다.

(6) 통계처리

실험결과와 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였고, p-value가 0.05(p < 0.05)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

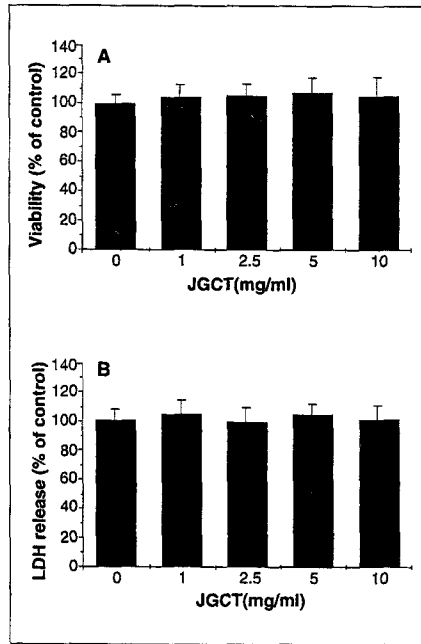


Fig. 1. Effects of water extracts of Jagamcho-tang(JGCT) on cell viability and LDH release in C6 glial cells. The cells were treated with various concentrations of the extract up to 10mg/ml for 72h. The cell viability was measured by MTT assay(A) and LDH release from cell into media(B) as described in materials and methods. Results were expressed the mean and standard error(SE).

III. 實驗成績

1. C6 glial 세포에 대한 炙甘草湯의 독성

먼저 炙甘草湯 물추출물 자체의 세포 독성을 알아보기 위하여 炙甘草湯 물추출물만을 72시간동안 10mg/ml까지 C6 glial 세포에 처리하였다.

MTT assay에 의한 방법으로 대조군에 대한 세포활성도를 측정된 결과, 炙甘草湯을 1mg/ml, 2.5mg/ml, 5mg/ml, 10 mg/ml 투여했을 때 각각의 군에서는 유의한 변화가 없었다(Fig. 1. A). 또한, 세포의 비가역적인 손상의 지표로서 C6 glial 세포에서 배양액내로 유출된

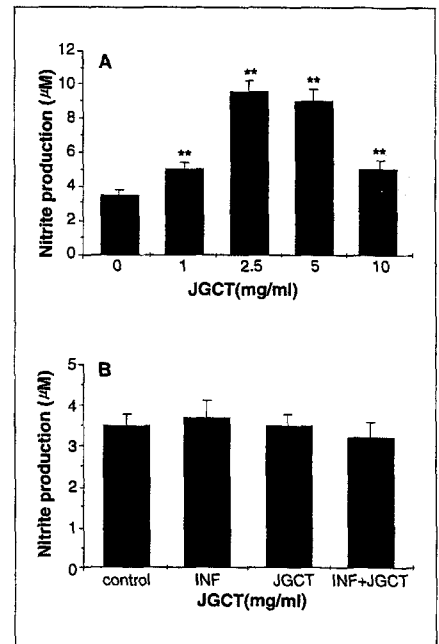


Fig. 2. Effects of water extracts of Jagamcho-tang(JGCT) on the generation of nitric oxide(NO) from C6 glial cells. C6 glial cells were stimulated with water extracts of Jagamcho-tang for 72h with various concentrations (A). And Raw 264.7 cell were treated with Jagamcho-tang or/and interferon-γ(INF-γ) for 24h and then the generation of NO was measured (B). \*\*p<0.01 (n=7)

LDH의 양을 측정된 결과 MTT assay에 의해 측정된 결과와 마찬가지로 각각의 군에서는 유의한 변화가 없었다(Fig. 1. B).

炙甘草湯의 물추출물은 10mg/ml에서도 미토콘드리아나 세포막에 어떠한 손상도 입히지 않았고, 또한 炙甘草湯의 물추출물이 처리된 C6 glial 세포는 어떠한 형태적 변화도 없었다.

2. C6 glial 세포에서 NO 생성에 대한 炙甘草湯의 효과

C6 glial 세포에서 炙甘草湯을 단독으로 처리하였을 경우 NO생성에 미치는 영향과, 이 영향이 炙甘草湯 이외의

물질에 의해 나타나는 효과인지 여부를 알아보기 위해 interferon- $\gamma$ (INF- $\gamma$ )와 함께 처리하여 NO 생성에 미치는 영향에 대하여 실험하였다.

먼저 炙甘草湯을 투여하고 72시간이 경과한 다음 NO 생성을 측정된 결과, 대조군에서는  $3.52 \pm 0.31 \mu\text{M}$ 의 NO를 생성하고, 炙甘草湯  $1\text{mg/ml}$ 을 처리한 군에서는  $5.65 \pm 0.41 \mu\text{M}$ ,  $2.5\text{mg/ml}$ 을 처리한 군은  $9.52 \pm 0.74 \mu\text{M}$ ,  $5\text{mg/ml}$ 을 처리한 군은  $9.01 \pm 0.72 \mu\text{M}$ 을 생성하였으며,  $10\text{mg/ml}$ 을 처리한 군은  $5.33 \pm 0.54 \mu\text{M}$ 을 생성하여, NO는 炙甘草湯 자체에 의하여 유의하게 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 2.A).

다음은 炙甘草湯이 INF- $\gamma$ 와 함께 처리되었을 경우 Raw cell에서 24시간 후에 NO 생성에 미치는 영향에 대하여 실험하였다. 먼저 대조군에서는  $3.54 \pm 0.33 \mu\text{M}$ 의 NO를 생성하고, INF- $\gamma$ 군은  $3.75 \pm 0.41 \mu\text{M}$ 을 생성하였으며, 炙甘草湯을  $2.5\text{mg/ml}$ 을 처리한 군은  $3.52 \pm 0.40 \mu\text{M}$ 을 생성하였고, 炙甘草湯과 INF- $\gamma$ 를 함께 처리한 군은  $3.25 \pm 0.48 \mu\text{M}$ 을 생성하여 NO는 炙甘草湯 전당액에 의하여 생성되지 않음을 알 수 있었다(Fig. 2.B).

위와 같은 결과를 종합하여 보면 C6 glial 세포에서 炙甘草湯 이외의 물질이 아닌 炙甘草湯 단독으로 NO의 생성을 유도하는 것을 알 수 있었다.

### 3. SNP에 의한 세포손상 유도시 炙甘草湯에 의한 방어효과

다음은 NO doner로서 세포손상을 야기하는 sodium nitroprusside(SNP)를 이용하여 炙甘草湯이 세포활성도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay 방법으로 측정하였다. 대조군을 100으로 하였을 경우, SNP 2mM를 투

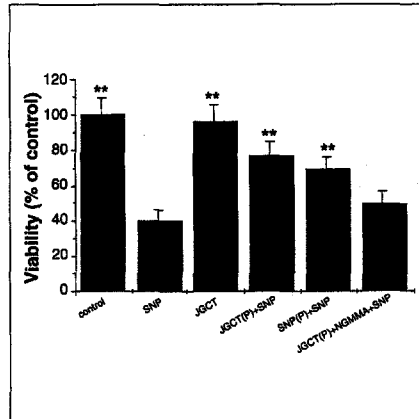


Fig. 3. Effects of Jagamcho-tang(JGCT) or SNP preconditioning against SNP induced cytotoxicity in C6 glial cells. Before SNP treatment. The cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Results were expressed the mean and standard error(SE). \*\*p<0.01 (n=7)

여한 군에서는 세포활성도가  $40.35 \pm 5.63\%$ 이었고, 炙甘草湯 단독처리군으로는  $96.78 \pm 9.76\%$ 로 측정되었다. 이를 炙甘草湯을 미리 15분 전처리하여 SNP 2mM을 처리한 군에서는  $76.59 \pm 8.80\%$ 로 측정되었고, SNP 100 $\mu\text{M}$ 을 15분 전처리하고 SNP 2mM을 처리한 군에서는  $68.42 \pm 7.81\%$ 로 측정되어 자감초탕을 전처리한 경우와 비슷하게 나타났다. 炙甘草湯을 15분 전처리하고 NOS의 저해제인 NG-monomethyl-L-arginine(NGMMA)와 SNP를 처리한 군에서는  $48.40 \pm 7.81\%$ 으로 측정되어 NGMMA의 효과는 炙甘草湯의 효과를 감소시키는 것으로 나타났다. 이상의 결과는 전처리된 炙甘草湯은 NO 생성을 유발하여 NO에 의한 세포독성을 억제함을 알 수 있었다(Fig. 3).

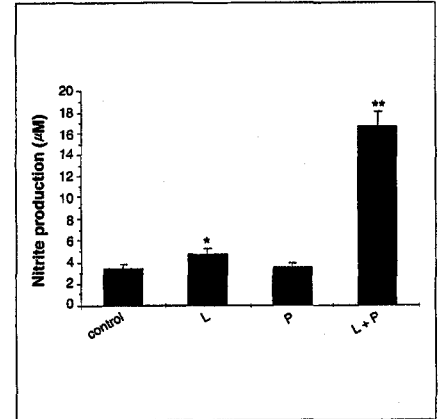


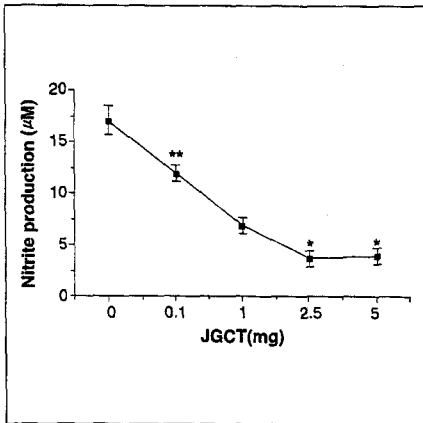
Fig. 4. Nitrite formation by LPS(L) and PMA(P) in C6 glial cells. The cells were treated with LPS alone ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), PMA alone ( $100 \mu\text{M}$ ) and LPS combined PMA. The cells treated with LPS combined PMA significantly product nitrite compare to cells treated LPS alone or PMA alone. Results were expressed the mean and standard deviation(SD). L : LPS alone treated group P : PMA alone treated group L+P: LPS combined PMA treated group \*p<0.05, \*\*p<0.01 (n=7)

### 4. LPS와 PMA에 의해 유발된 C6 glial 세포에서 NO 생성에 대한 炙甘草湯의 효과

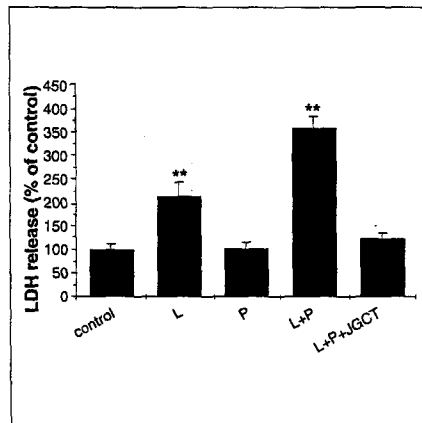
다음은 C6 glial 세포에서 LPS와 PMA에 의한 NO 유발 효과에 대해 실험하고, 이렇게 유발된 NO 생성에 대하여 炙甘草湯이 미치는 영향을 알아보았다.

먼저 LPS와 PMA에 의한 NO 유발 효과에 대한 실험에서 대조군은  $3.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 의 NO가 유도되었고, PMA 100  $\mu\text{M}$ 군에서는 72시간동안 배양으로  $3.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 이 유도되어 대조군과 유의한 차이가 없었다. LPS  $1 \mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서는  $4.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$ 이 유도되었고, LPS  $1 \mu\text{g/ml}$ 와 PMA 100 $\mu\text{M}$ 을 처리한 군에서는  $17 \pm 1.2 \mu\text{M}$ 이 유도되었다(Fig. 4).

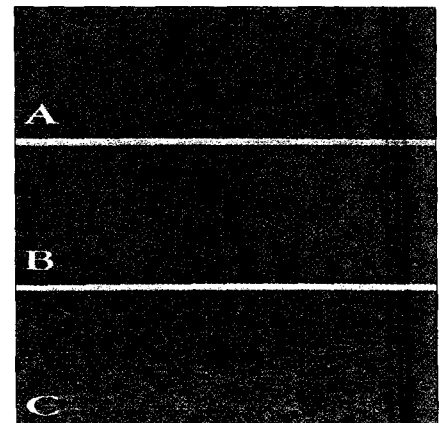
다음은 LPS  $1 \mu\text{g/ml}$ 와 PMA 100 $\mu\text{M}$



**Fig. 5.** Effects of the water extracts of *Jagamcho-tang*(JGCT) on suppresion of nitrite formation by LPS combined PMA in C6 glial cells. The cells treated with LPS combined PMA and water extracts of JGCT. Released NO was enzymatically measured by using Griess reagents. Results were expressed the mean and standard error(SE). \*p<0.05, \*\*p<0.01 (n=7)



**Fig. 6.** Effects of *Jagamcho-tang*(JGCT) on LDH release of C6 glial cells damaged by LPS(L) combined PMA(P). The cell viability was measured by LDH release from cell into media as described in Materials and Methods. \*\*p<0.01 (n=7)



**Fig. 7.** Effects of *Jagamcho-tang*(JGCT) with LPS combined PMA on morphology. Data from C6 glial cell for 48h in CO<sub>2</sub> incubator. And fixed invert phase contrast microscope(Nikon) ×100. LPS was 1µg/ml, PMA was 100µM and JGCT was 2mg/ml (A: control, B: LPS combined PMA, C: LPS combined PMA and JGCT) (200 ×)

을 C6 glial 세포에 혼합 처리하여 발생되는 NO에 炙甘草湯이 미치는 영향에 대한 실험에서 대조군인 炙甘草湯 0mg/ml에서는 17.24±1.55µM의 NO가 검출되었고, 炙甘草湯 0.1mg/ml에서는 12.42±0.95µM의 NO가 검출되었다. 炙甘草湯 1mg/ml에서는 7.46±0.97µM, 2.5mg/ml에서는 3.96±0.52µM이 검출되어 NO 생성이 감소되었으며, 5mg/ml에서는 4.26±0.62µM의 NO가 검출되어 약간 증가되는 경향이 보였으나 유의성은 없었다. 따라서, C6 glial 세포에서 LPS와 PMA에 의해 유발된 NO 생성에 대해 炙甘草湯이 2.5mg/ml까지 농도 의존적으로 NO생성을 억제하였다(Fig. 5).

### 5. LPS, PMA와 炙甘草湯이 미치는 세포활성도 관찰

LPS, PMA와 炙甘草湯이 미치는 세포활성도를 관찰하기 위하여 LDH분비를 측정하였다. 먼저 대조군을 100이라

가정하였을 경우, LPS 1µg/ml군인 경우, 215.32±28.10%이었고, PMA 100µM군인 경우, 102.96±15.40%로 관찰되었다. 이에 반해 NO가 유도되는 LPS와 PMA를 함께 처리한 군인 경우, 358.02±30.88%로 나타나 대조군에 비하여 3배가 넘는 세포가 죽게 됨을 알 수 있었다. 그러나 LPS와 PMA를 함께 처리하고 炙甘草湯을 같이 투여한 군인 경우, 119.11±15.15%로 세포의 사멸이 거의 대조군과 비슷함을 알 수 있었다(Fig. 6).

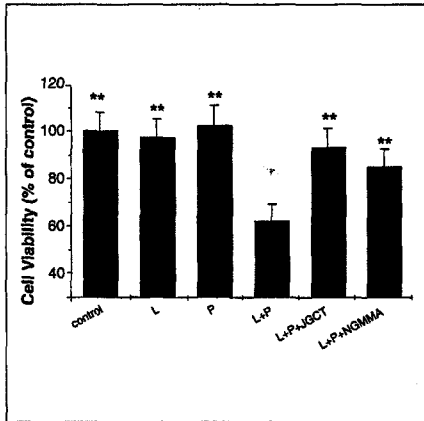
### 6. LPS, PMA와 炙甘草湯이 미치는 세포손상에 대한 광학현미경적 관찰

다음은 LPS와 PMA를 함께 처리한 경우 세포손상에 대한 炙甘草湯의 방어효과를 광학현미경상에서 관찰한 결과이다. 먼저 대조군의 세포와 LPS와 PMA를 함께 처리한 군의 세포를 비교하면 세포수가 현저하게 떨어져 있고,

또한 세포가 많이 죽어가는 모습이 관찰되었다. 그러나 炙甘草湯을 함께 투여한 실험군에서는 세포수가 대조군과 비슷한 양상을 보이며, 사멸과정 또한 뚜렷하게 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

### 7. LPS와 PMA에 의한 C6 glial 세포독성에 대한 炙甘草湯의 방어기전

미토콘드리아의 succinic dehydrogenase의 활성을 나타내는 MTT assay에서 LPS와 PMA만을 처리한 군은 LPS와 PMA를 炙甘草湯과 함께 처리한 군에 비하여 활성도가 현저히 감소하였다. 이러한 炙甘草湯의 효과는 NGMMA를 처리하였을 때도 유사하게 나타났다(Fig. 8). 따라서 炙甘草湯의 효과는 NO가 매개하는 것을 알 수 있었다.



**Fig. 8.** The protective mechanism of *Jagamcho-tang*(JGCT) against LPS(L) and PMA(P) induced cytotoxicity in C6 glial cells. LPS and PMA induced severe cytotoxicity in C6 glial cells. Pretreatment of JGCT significantly protects C6 glial cells against LPS and PMA induced severe cytotoxicity. This protective effect of JGCT against LPS and PMA induced cytotoxicity was mimicked by N°MMA. The viability of cell was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Results were expressed the mean and standard error(SE). \*\*p<0.01 (n=7)

#### IV. 考 察

뇌졸중은 노인 연령에 흔한 질환으로 중양, 심장질환과 더불어 우리나라의 3대 사망원인중 하나를 차지하며 위험인 자로는 고혈압, 허혈성 심장질환, 당뇨, 흡연, 음주 등이 알려져 있다<sup>16-17)</sup>.

뇌는 계속되는 혈액공급을 통하여 영양분과 산소를 공급받고 있는데 혈액공급이 차단되면 ATP를 1분 이상 유지하기가 힘들 정도로 혈액공급에 매우 민감한 조직이다<sup>22-23)</sup>. 따라서 뇌의 허혈상태에서의 병리생리학적 기전이 최근 광범위하게 연구되고 있는데 nitric oxide(NO)가 허혈상태에서 세포독성에 매우 중요하게 작용한다는 보고가 있다<sup>24-25)</sup>.

NO는 NO synthase(NOS)에 의하여

L-arginine으로부터 L-citrulline으로 전환되면서 생성되는데, 뇌세포에서는 3종류의 NOS가 있다<sup>26)</sup>. 첫째로 신경원 세포에서는 칼슘의존적으로 활성화되는 신경원세포의 NOS(nNOS, type1 NOS)가 항상 발현되고 있고, 둘째로 교세포(별아교세포, 희소돌기아교세포, 미세교세포)들은 lipopolysaccharide(LPS), interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , 그리고 interleukin 1- $\beta$  등 각종 cytokine 등에 의해 칼슘에 비의존적으로 합성되는 NOS(iNOS, type2 NOS), 그리고 마지막으로 혈관내피세포와 별아교세포 등에서 칼슘의존적으로 항상 합성되고 있는 혈관내피세포의 NOS(eNOS, type3 NOS)가 있다<sup>26)</sup>.

세포에 손상을 입히는 병리적 외부 자극이 전달되면, 신경원세포와 교세포들에서는 신경세포막이 탈분극되어 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 유리되는데, 이에 의하여 N-methyl-D-aspartic acid(NMDA)에 선택적인 전압의존성 이온통로가 열리며 칼슘이 세포내에 축적된다. 이 증가된 칼슘은 NOS를 과도하게 활성화시키고 NO의 유도를 급격하게 증가시킨다. 이에 따라 과도하게 증가된 NO는 미토콘드리아의 기능장애를 일으켜 이로 인한 에너지고갈을 야기시키며, 지방과 단백질의 peroxidation 및 nitrosylation, DNA 손상 등 신경독성을 야기시키고 퇴행성 신경질환에 관여한다는 보고가 있다<sup>27)</sup>. 그러나, 최근 NO가 신경을 보호한다는 실험결과가 발표되어<sup>28)</sup> NO 역할의 이중성에 대한 논란이 계속되어 왔다.

NO는 1990년 초에 동물세포에서 세포간의 messenger로서 생성된다는 것을 발견하였다. NO 자체는 화학적으로 불완전한 gas체로 반감기가 지나면 nitrite(NO<sub>2</sub>), nitrate(NO<sub>3</sub>) 등의 안정한

화합물로 존재하게 되며, 혈압, platelet adhesion, neutrophil의 집성 뿐만 아니라 뇌에서 synaptic plasticity의 역할과 관련이 있을 것으로 보고되고 있다<sup>29)</sup>. 또한 NO는 EDRF (endothelium-derived relaxing factor)로<sup>30)</sup> NMDA receptor 및 Ca<sup>2+</sup>와 관계된다는 보고가 있다<sup>31)</sup>. 이러한 작용외에 NO는 peroxynitriteanion (ONOO<sup>-</sup>), superoxide(O<sup>2-</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등을 형성하여 세포내 독소작용을 야기시키기도 한다고 보고되어 세포내에서 다양한 기능을 매개한다고 알려져 왔다.

본 실험에서 사용되어진 LPS는 bacterial products로 중추신경계에서 TNF- $\alpha$  신호전달체계를 활성화시키는 염증유발제로 잘 알려져 있다<sup>32)</sup>. TNF- $\alpha$ 는 허혈성 뇌질환에서 증가하는데, 이 증가된 TNF- $\alpha$ 는 IL-1, INF- $\gamma$ , IL-8 등의 다른 cytokine과 더불어 별아교세포와 신경교세포에서 nuclear factor kappa B(NFkB)에 의한 iNOS의 발현에 깊이 관여하고 있다<sup>33)</sup>.

허혈상태의 뇌에서 병리생리학적 반응에 이러한 NO의 생성이 중요하게 관여한다는 연구가 최근 활발히 진행되고 있다<sup>25)</sup>.

한의학에서 腦에 대한 기록을 살펴보면 《靈樞.海論篇》<sup>9)</sup>에 “腦輸上在于其盖下在風府”라 하여 腦는 風府穴과 頭蓋의 사이에 있는 것이라 하였고, 《靈樞.海論篇》<sup>9)</sup>에 “腦爲髓之海”, 《素問.奇病篇》<sup>8)</sup>에 “腦是髓液聚集之處 稱爲髓海”라 하여 腦를 인체의 髓液이 모이는 곳이라고 설명하였으며, 《素問.五臟別論篇》<sup>8)</sup>에 “或以腦髓爲臟.....或而爲腑.....故藏而不瀉, 名曰奇恒之府”라고 하여 腦를 奇恒之府 중의 하나로 보았다.

《素問.脈要精微論篇》<sup>8)</sup>에서는 “頭者

精明之府”라 하였고, 《本草綱目》<sup>34)</sup>에서 “腦爲元神之府”라 하였으며, 王<sup>35)</sup>은 “人之記性 皆屬腦中”, “腦爲元神之府”라 하여 精神, 思惟活動이 腦에서 이루어지는 것으로 認識하였다.

또한, 《靈樞·海論篇》<sup>9)</sup>에 “髓海有餘則輕勁多力 自過其度 髓海不足則腦轉耳鳴 眩冒 目無所見 懈怠安臥.....”라고 하여 腦髓의 충족여부에 따라 정신 및 신체 활동의 상태도 관계됨을 말하였으며<sup>13,36-37)</sup>, 腦髓의 기능이 실조되거나 감퇴되면 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘, 知能低下, 痴呆 등의 임상증상이 나타난다<sup>7,14)</sup>.

心은 人間の 思惟, 意識, 精神活動을 主宰하는 主神志機能을 가진 臟腑이며, 이 기능이 저하되면, 心神不安으로 인한 驚悸不安, 失眠健忘, 喜悲欲哭, 多憂善忘, 精神恍惚 등 精神活動障礙를 나타낸다<sup>3,10-11)</sup>.

이상에서 살펴본 바와 같이 현대의학적 腦는 해부학적으로 한의학의 腦와 유사하며 그 기능은 腦와 心의 機能과 유사하다<sup>12,38)</sup>.

炙甘草湯은 張<sup>1)</sup>의 《傷寒論》에 “脈結代 心動悸”를 치료하는 대표적인 처방으로 기재된 이후 여러 의서에 인용되어온 방제인데, 唐의 孫<sup>39)</sup>은 虛勞를 主治한다 하였고, 王<sup>2)</sup>은 汗吐下後 津液이 亡失되어 나타나는 肺痿를, 汪<sup>3)</sup>은 眞陰損傷으로 인한 呃逆을, 張<sup>4)</sup>은 誤治로 汗下하여 眞陰이 손상되어 오는 癆病을, 吳<sup>40)</sup>는 津液枯槁한 사람의 二便秘澀을 치료하는데 사용하는 등 매우 광범위하게 활용되고 있다.

炙甘草湯의 구성약물에 관한 효능을 살펴보면, 炙甘草는 補中益氣하여 肺의 本源을 돕고 緩急定痛 止心悸強心 通利血脈하며, 生薑은 溫中 解毒 健胃 溫行陽氣하며, 桂枝는 溫經通脈 調和營衛 鎮

靜 鎮痛 健胃 入心助陽하며, 大棗는 補脾益胃 生津止瀉 助營衛 緩陰血 鎮痙鎮靜作用이 있으며, 生地黃은 清熱涼血 補陰 消瘀通經 補五臟 除痺 強心利尿하며, 麥門冬은 清心除煩 清熱滋陰 養胃生津 潤肺止咳 消炎 強心強壯滋養하며, 麻子仁은 潤肺滑腸 滋養肝腎緩脾 滋陰生津하며, 人蔘은 大補元氣 補肺益脾 安神益智 止驚悸 通血脈 利血氣 堅筋骨 強心固脫 益氣生津하며, 阿膠는 補血止血 滋陰潤肺 增血作用이 있다<sup>41-42)</sup>. 따라서 炙甘草湯은 益心氣, 補心血, 養心陰, 通心陽의 효능이 있으므로 心氣虛, 心陰不足으로 인한 각종 심장질환, 감상선기능항진증, 신경쇠약증, 빈혈, 교감신경긴장증, 고혈압, 동맥경화 등에 응용하고 있다<sup>5,7)</sup>.

이에 저자는 “脈結代 心動悸”를 치료하며, 益心氣, 補心血, 養心陰, 通心陽의 효능을 가진 炙甘草湯이 허혈성 뇌질환에 어떠한 세포독성 억제작용이 있는지를 구명하고자, 炙甘草湯의 물추출물이 C6 glial 세포에서 LPS와 PMA에 의해 유발된 NO의 생성을 억제시킴으로써 NO에 의한 세포손상에 대한 방어효과를 관찰하였다.

본 실험에서 炙甘草湯의 세포독성을 알아보기 위하여 炙甘草湯 물추출물만을 72시간동안 10mg/ml까지 C6 glial 세포에 처리하여 세포활성도와 세포에서 배양액내로 유출된 LDH의 양을 측정된 결과 유의한 변화가 없었다(Fig. 1. A,B). 그러나, 炙甘草湯 단독으로 처리하고 72시간이 경과한 다음 NO 생성을 측정된 결과 2.5mg/ml까지 농도의존적으로 NO가 생성되었으며, 炙甘草湯이 INF-gamma와 함께 처리되었을 경우 Raw cell에서 24시간 후의 NO 생성에 유의성 있는 변화가 관찰되지 않은 것으로 보아 NO는 炙甘草湯 단독에

의하여 유의하게 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 2.A,B). 여기서 炙甘草湯의 세포손상 방어효과를 알아보기 위하여 炙甘草湯을 15분 전처리하고 NO doner로서 세포손상을 야기시키는 SNP 2mM을 처리한 경우 세포독성을 억제하였고, 이 경우 NGMMA와 함께 처리하면 炙甘草湯의 효과를 감소시키는 것으로 나타나, 炙甘草湯은 NO 생성을 유발시켜 NO에 의한 세포독성을 억제함을 알 수 있었고, 이러한 효과는 100μM의 SNP를 전처리한 효과와 비슷하였다(Fig. 3).

炙甘草湯은 C6 glial 세포에서 농도의존적으로 LPS 1μg/ml와 PMA 100μM에 의해 유발된 NO의 생성을 감소시킴으로써 세포막이나 미토콘드리아의 손상을 현저히 억제하였다(Fig. 5, 6, 7, 8). 미토콘드리아의 손상억제 효과는 N<sup>o</sup>MMA를 처리하였을 때도 유사하게 나타났다(Fig. 8).

이상의 결과를 종합하여 보면, 炙甘草湯의 전처리는 소량의 NO의 생성을 경유하여 과량의 NO에 의한 세포손상을 억제하는 것으로 사료되며 이러한 결과는 문 등<sup>43)</sup>의 결과와 일치하였다. 뿐만 아니라 炙甘草湯은 LPS와 PMA에 의해 유발된 NO에 의한 세포독성을 감소시켜 세포의 손상을 억제하는 것으로 사료된다.

따라서 炙甘草湯은 뇌허혈증과 같이 NO에 의하여 세포손상이 유발되는 질환의 예방 및 치료에 炙甘草湯이 응용될 수 있음을 제시하고 있으며, 앞으로 이러한 炙甘草湯의 효과가 어떠한 기전을 통하여 NO의 생성을 조절하는지에 대한 실험이 계속적으로 진행되어야 할 것이다.

## V. 結論

허혈상태에서 nitric oxide에 의해 야기되는 세포손상에 대한炙甘草湯의 효과를 구명하고자 LPS와 PMA에 의해 손상된 C6 glial 세포에서炙甘草湯의 NO 생성에 대한 방어효과 및 MTT assay, LDH 활성도 측정, 광학현미경적 관찰에 의한 방법으로 세포손상 방어기전에 대하여 실험적으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1)炙甘草湯은 10mg/ml까지 농도를 증가시켜도 정상적인 C6 glial 세포에 세포독성을 유발시키지 않았다.

2)炙甘草湯은 단독으로 2.5mg/ml까지 C6 glial 세포에 대하여 농도의존적으로 NO 생성을 유발시켰다.

3)炙甘草湯은 SNP에 의해 유발된 세포독성을 유의성 있게 억제시켰다.

4)炙甘草湯은 2.5mg/ml까지 LPS와 PMA에 의해 유발된 Nitrite 생성을 농도의존적으로 억제시켰다.

5)炙甘草湯은 LPS와 PMA에 의해 유발된 세포막독성, 미토콘드리아독성을 억제시켰다. 이러한炙甘草湯의 방어효과는 NOS의 저해제인 NGMMA를 처리하였을 때도 유사하게 나타났다.

이상의 결과로 보아, LPS와 PMA 및 SNP에 의한 C6 glial 세포독성에 대하여炙甘草湯의 전처리 및 동시처리는 NO에 의한 세포손상을 억제하였다. 따라서炙甘草湯은 NO에 의한 신경세포 손상질환의 예방 및 치료에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## VI. 參考文獻

- 張仲景. 傷寒論. 上海: 上海科技出版社; 1983, 50-1쪽 .
- 王燕. 外臺秘要. 臺北: 文光圖書有限公司; 1979, 279쪽
- 汪 庵. 醫方集解. 서울: 成輔社; 1983, 257-8, 366쪽
- 張璐 張氏醫通. 臺北: 金藏書局; 1977, 156, 234, 256-7, 684, 973쪽
- 尹吉榮. 東醫臨床方劑學. 서울: 明寶出版社; 1985, 140쪽
- 上海中醫學院 編. 中醫內科學. 香港: 商務印書館; 1981, 494-503쪽
- 全國韓醫科大學 心系內科學教室. 東醫心系內科學(上). 서울: 書苑堂; 1995, 181, 230-1, 243, 267, 499-502, 542-6쪽
- 楊維傑 編. 黃帝內經解釋(素問). 서울: 成輔社; 1980, 89, 100, 133, 356-61쪽
- 楊維傑 編. 黃帝內經解釋(靈樞). 서울: 成輔社; 1980, 89, 280-3, 356-61, 397쪽
- 鄭遇悅. 韓方病理學. 서울: 三進社; 1988, 127-8쪽
- 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂; 1987, 98-9쪽
- 성호경 외. 생리학. 서울: 도서출판 의학문화사; 1997, 193, 639-57쪽
- 柳道坤. 東醫生理學講義. 益山: 圓光大學校出版局; 1996, 267-70, 365-77, 413-5, 506-7쪽
- 王乃石. 益氣聰明湯治療腦血管神經性病變的體會. 湖北中醫雜誌 1996 ;18 (124):41
- 대한신경외과학회. 신경외과학. 서울: 중앙문화사; 1997, 275-6쪽
- 이광우, 정희원 역. 임상신경학. 서울: 도서출판 고려의학; 1997, 393, 400, 418쪽
- 해리슨 번역 편찬위원회 역. HARRISON S 내과학 (I, II 권). 서울: 도서출판 정담; 1997, 2409-10쪽
- 文亨權. 炙甘草湯이 흰쥐의 摘出心臟에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院. 1997
- 李來春. 炙甘草湯이 培養心筋細胞에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院. 1998
- 韓承東. 炙甘草湯이 sodium levothyroxine으로 誘發된 白鼠의 甲狀腺機能 亢進症에 미치는 影響. 慶山大學校 大學院. 1994
- Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide neurotoxicity. *J. Chem. Neuroanat.* 1996;10:179-90
- Hawkins R. Cerebral energy metabolism. In: D.W. McCandless (Ed.). *Cerebral Energy Metabolism and Metabolic Encephalopathy*. New York: Plenum Press; 1985, p.3-17
- Lust WD, Yasumoto Y, Wittingham TS, Djuricic B, Mrsulja BB, Passonneau J. Ischemic encephalopathy. In: D.W. McCandless (Ed.). *Cerebral Energy Metabolism and Metabolic Encephalopathy*. New York: Plenum Press; 1985, p.79-112
- Garthwaite J, Chales SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988;336, 385-7
- Vincent SR. Nitric oxide : a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Progr. Neurobiol.* 1994;42:129-60
- Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990;87:682-5
- Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH. Mechanism of nitric oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J. Neurosci.* 1993;13:2651-61
- Lei SZ, Pan ZH, Aggarwal SK, Chen HSV, Hartman J, Sucher NJ, Lipton SA. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron* 1992;8:1087-99
- Gally JA, Montague PR, Reeke GN, Jr. and Edelman GM. The NO hypothesis; Possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990;87:3547-51
- Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. In: Vanhoutte PM ed. *Mechanism of Vasodilatation*. Raven. New York: 1988, p.427-35
- Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RMJ, Mondaca S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 1989;172: 413-6
- Matsukawa A, Ohkawara S, Maeda T,



- Takagi K, Yoshinaga M. Production of IL-1 $\beta$  and IL-1 $\beta$  receptor antagonist and pathological significance in lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits. *Clin. Exp. Immunol.* 1993;93: -11
33. Sacco S, Agnello D, Sottocorno M, Lozza G, Monopoli A, Villa P, Ghezzi P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs increase tumor necrosis factor production in the periphery but not in the central nervous system in mice and rats. *J. Neurochem.* 1998;71(5):2063-70
34. 李時珍. 本草綱目. 北京: 人民衛生出版社; 1982, 219-20쪽
35. 王清任. 醫林改錯. 臺聯: 國風出版社; 1975, 22-5쪽
36. 成彊慶. 腦의 機能에 대한 臟象論的 考察. *大韓韓醫學會誌* 1995;16(1):468-74
37. 許美晶 外. 內經의 腦學說에 對한 文獻的 考察. *惠和醫學* 1997;6(1):175-200
38. 권홍식. 인체해부학. 서울: 壽文社; 1990, (I) 48-61쪽, (II) 191쪽
39. 孫思邈. 千金翼方. 서울: 杏林出版社; 1976, 231-2쪽
40. 吳謙. 醫宗金鑑. 서울: 大星文化社; 1983, (上冊) 92-4쪽, (中冊) 122-3, 299-300쪽
41. 辛民敎. 原色臨床本草學. 서울: 南山堂; 1986, 166-7, 174, 177, 197-8, 224-5, 232-3, 254-5, 518-9, 561-2쪽
42. 申佶求. 申氏本草學. 서울: 壽文社; 1973, 1-8, 16-20, 55-8, 88-91, 112-4, 144-7, 215-8, 242-5, 401-3
43. 문준식, 정희선, 김동구, 김경환, 이병철. 뇌허혈 재관류로 인한 뇌조직 아민 변동과 nitric oxide 및 산소유리기와의 관련성. *대한신경과학회지* 1995;6(1):773-87