

Nitric Oxide에 의해 유발된 C6 glial 細胞毒性에 대한 四物湯의 防禦效果

김도환, 김승모, 조한국, 차용석, 허 윤, 문병순, 조광호

원광대학교 한의학전문대학원

Effects of *Samul-tang* on Nitric Oxide Induced-cytotoxicity in C6 Glial Cell

Do-Hwan Kim, Seung-Mo Kim, Han-Gook Cho, Yong-Seok Cha, Yun Heo, Byung-Soon Moon, Kwang-Ho Cho

Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

The water extracts of *Samul-tang*(SMT) has been used for treatment of ischemic brain damage in Oriental traditional medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extracts of SMT rescues brain cells from ischemic damages. To elucidate the protective mechanism on ischemic induced cytotoxicity, I investigate the regulation of LPS and PMA induced iNOS expression in C6 glial cells. LPS and PMA treatment for 72 h in C6 glial cells markedly induce nitric oxide(NO), but treatment of the cells with the water extracts of SMT decrease dose dependently nitrite formation. In addition, LPS and PMA treatment for 72 h induce severe cell death and LDH release in C6 glial cells. However treatment of the cells with the water extracts of SMT dose not induce significant changes compare to control cells. Furthermore, the protective effects of the water extracts of SMT is mimicked by treatment of N^GMMA, a specific inhibitor of NOS. LPS and PMA induced iNOS activation in C6 glial cells cause chromosomal condensation and fragmentation of nuclei by caspase activation. The treatment of the cells with the water extracts of SMT may suppress apoptosis via caspase inhibition by regulation of iNOS expression. Taken together, I suggest that the protective effects of the water extracts of SMT against ischemic brain damages may be mediated by regulation of iNOS during ischemic condition.

Key Word : NO, iNOS, C6 glial cell, Samultang

1. 緒 論

四物湯은宋代陳¹의《太平惠民和劑局方》에“四物湯 調益榮衛 治衝任虛損 月水不調...”라고 처음 수록된 이래 補血과 調經 및 活血의 기본방제로 사용되어 왔으며^{2,4}, 최근에는 뇌혈관계질환, 심혈관계질환, 부인과질환 등에 광범위하게 응용되고 있다^{5,7}.

뇌혈관질환이란 뇌혈관의 이상으로 인하여 혈류로 통한 뇌조직에 지속적인 산소 및 포도당의 공급이 부족하게 되어 국소 뇌조직의 이상을 초래함으로써

신경학적 기능장애를 유발하는 것으로, 크게 허혈성 뇌졸중과 출혈성 뇌졸중으로 나누어지며⁸, 최근의 보고에 의하면 우리나라에서는 허혈성 뇌졸중의 빈도가 출혈성 뇌졸중보다 높아지는 추세에 있다⁹.

허혈성 뇌졸중은 혈류의 지연과 울체, 혈액구성 성분의 변화 및 미세혈관의 활성산소에 의한 내피세포 손상 등 혈류공급의 차단에 따른 뇌세포의 손상에 이르는 병태생리학적 기전을 가지고 있는데⁸, 최근일산화질소(nitric oxide, NO)가 허혈상태에서 세포독성에 매우

중요하게 작용한다는 많은 보고가 있다^{22,23}.

허혈상태에서 nNOS와 iNOS는 중추신경세포에 심각한 손상을 일으키는데 비하여 허혈성 질환의 초기에 혈관 내피세포에서 생성되는 eNOS는 혈관을 확장시켜 혈류량을 증가시킴으로써 산소와 영양분의 공급을 원활하게 하여 허혈로 인한 세포손상을 감소시키는 것으로 알려져 있다²⁴.

최근 한약재의 신경세포보호작용에 관한 연구로는 金鍾寬¹¹의 太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響, 金永洙¹²의 酸素自由基에 의해 損傷된 大腦皮質

교신저자 : 문병순 (전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 익산한방병원, 전화 : 063)850-2102, FAX : 063)841-0033)

*이 논문은 2000년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의해 연구됨.

神經細胞에 미치는 壯元丸의 影響 등 많은 연구가 보고되어 있으나 四物湯이 뇌세포의 허혈상태에서 야기되는 NO의 독성에 대한 연구는 아직 찾아볼 수 없었다.

이에 저자는 본 연구에서 뇌허혈 초기의 신경세포 손상에 대한 四物湯의 방어효과를 알아보고자 lipopoly saccha ride(LPS)와 phorhol 12-myristate 13-acetate(PMA)에 의해 손상된 C6 glial 세포에 四物湯을 처리하여 MTT assay, EMSA, 광학현미경적 조사, Hoechst staining에 의한 방법으로 세포생존율, LDH 활성도, 염색사의 응축과 DNA 분절, caspase 활성도 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 細胞柱

본 실험에 사용한 C6 glial 세포주는 America Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 사용하였으며 C6 glial 세포 (ATCC)를 CO₂ 세포배양기에서 (37°C, 5% CO₂) 10% fetal bovine serum (Hyclones)이 포함된 DMEM (Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포를 사용하였다.

2) 藥材

본 실험에 사용한 四物湯의 處方은 陳¹⁾의 《太平惠民和劑局方》에 의거하였고, 藥材는 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 1貼의 내용과 분량은 다음과 같다.

Prescription of Samul-tang

韓藥名	生藥名	用量(g)
熟地黃	Radix Rehmanniae	12 g
當歸	Radix Angelicae Gigantis	12 g
白芍藥	Radix Paeoniae	8 g
川芎	Rhizoma Cnidii	6 g
Total amount		38 g

2. 方法

1) 檢液의 調製

四物湯 10貼 분량인 380g을 증류수 2,000ml와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로煎湯한 후, 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 上清液을 취한 다음, 여과지로 여과한 용액을 감압회전증발기를 이용하여 감압농축한 후 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 건조엑기스를 얻었다. 건조한 엑기스는 분말로 만들어 증류수로 희석하여 원심분리한 후 취한 上清液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 iNOS의 활성도를 비교하였다. 먼저 알고 있는 농도의 sodium nitrite를 이용하여 표준곡선을 구하고, 대조군과 실험군의 배양액을 각각 150 µl씩 얻어 4°C에서 1,500rpm의 속도로 15분간 원심분리를 한 후 세포성분들을 침전시키고 부유액만을 취하여 Griess reagent와 동량으로 혼합하여 실온에서 10분간 반응시키고 550nm의 파장으로 흡수도를 측정하였다.

3) 광학현미경적 관찰

세포의 형태학적 변화를 조사하기 위

하여 배양중인 배양용기(well plate)를 도립위상차 현미경(Nikon)으로 관찰하였고, 필요시 부착된 사진기로 촬영하였다.

4) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

NFκB의 활성측정은 NFκB의 consensus binding site을 가진 oligo nucleotide probe는 5'-ccg gCC GGT TAA CAG AGG GGG CTT TCC GAG; 5'-ccg gCT CGG AAA GCC CCC TCT GTT AAC CGG를 합성하여 10 mM Tris-HCl 용액(pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 MgCl₂, 1 mM DTT 함유)에 희석한 후 85°C에서 5분 annealing한 후 100 ng을 Rediprime kit (Amersham, England)을 이용하여 32P를 부착하였다. 방사선 동위원소가 부착된 probe는 5~10 µg의 핵단백질과 실온에서 30분 반응시킨 후 냉온실에서 4% polyacrylamide gel에 걸어 0.5× TBE buffer로 전기영동하였다. 이 gel은 건조 후 autoradiography 방법으로 X-ray 필름에 현상하여 NFκB 활성을 측정하였다.

5) MTT 정량

대조군과 실험군들은 각각 8개의 well을 한 군으로 하였으며, MTT [3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide,

Sigma]정량은 Mosmann의 방법³⁷⁾에 따랐다. 즉 C6 glial 세포를 배양한 후 상층액을 버리고 사용 당일 제조한 500 $\mu\text{g/ml}$ MTT를 배양용기당 1ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3시간 동안 37°C, 5% CO₂로 유지된 정온기내에서 배양하였다. 배양 완료 후 세포내의 formazan을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 dimethyl sulfoxide(DMSO, Merck)를 배양용기당 1ml씩 넣고 15분간 실온에서 방치한 후 흡광광도계로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

6) lactate dehydrogenase(LDH) 활성도 측정

대조군과 실험군들은 각각 8개의 well을 한 군으로 하여 각 well의 상층액을 tube에 담아 1,000rpm으로 7분간 원심분리시킨 후, tube의 부유액을 검체량 50 μl 와 효소기질액 kit인 LD-D 1.0ml를 섞어 30°C, 340nm에서 Gilford-Impact 400E로 setting하여 측정하였다.

7) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

C6 glial 세포를 (2×10^6 cells) 4°C에서 15분 동안 lysing buffer (1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ apro tinin, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 2 mM dithio threitol(DTT), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 용해하고 14,000rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상층액은 BCA (Bicinchoninic acid, Sigma Co, St. Louis, MO)법으로 정량하여 assay buffer (100 mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ apro tinin, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 2 mM DTT)

에 희석되어 형광표지된 기질과 37°C에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer (Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA)로 측정하였다. 이 때의 파장은 excitation wavelength (380nm) 와 emission wavelength (460nm)를 사용하였다.

8) Hoechst staining

약제가 처리된 세포들을 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 세척하고 Hoechst 33342(Sigma Biosciences, St. Louis, Missouri, USA) 염색약을 PBS에 10 μM 이 되게 희석하여 10분간 염색한 후 다시 PBS에서 세척하여 형광현미경으로 관찰하였다.

9) 統計處理

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

III. 實驗成績

1. C6 glial 세포에 대한 四物湯의 毒性

먼저 四物湯 물추출액이 C6 glial 세포에 영향을 주는 독성을 알아보기 위하여 四物湯 물추출액만을 72시간동안 0, 1mg/ml, 2.5mg/ml, 5mg/ml, 10 mg/ml까지 C6 glial 세포에 처리하였으나, 세포 생존율과 LDH 유출에 유의성있는 변화가 없으므로 미토콘드리아나 세포의 막에 어떠한 손상도 주지 않았음을 알 수 있고(Fig. 1 A, B), 또한 어떠한 형태적 변화도 없었다(data not shown).

2. LPS와 PMA에 의해 손상된 C6 glial 세포에서 NO 생성에 대한 四物湯의 效果

C6 glial 세포에 LPS를 단독으로 72시간 처리하였을 때 생성되는 NO의 양은 $5 \pm 0.5 \mu\text{M}$ 로 대조군 $3.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 에 비하여 다소 증가하였고, PMA단독 처리군은 $3.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$ 로 대조군과 별다른 차이가 없었다. 그러나 LPS와 PMA를 동시에 처리하였을 때는 $17 \pm 1.2 \mu\text{M}$ 로 대조군 $3.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 에 비하여 NO의 생

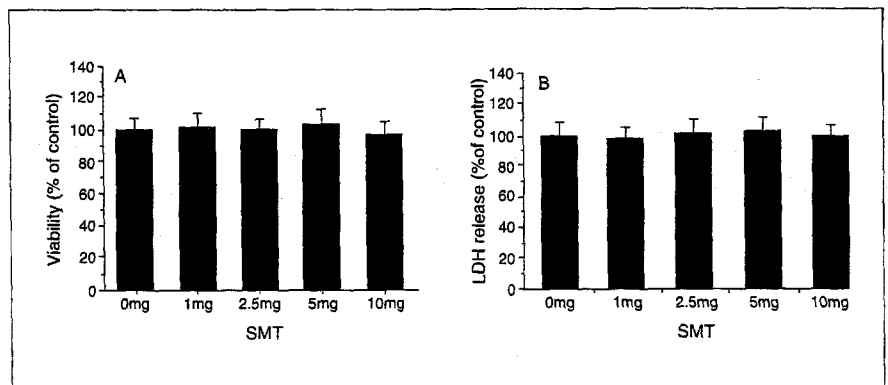


Fig. 1. Effect of the Water Extract of SMT on Viability of C6 Glial Cells
The cells were treated with various concentrations of the extract up to 10mg/ml for 72 h. The cell viability was measured by MTT assay(A) and LDH release from cell into media(B) as described in Materials and Methods. Results were expressed the mean and standard deviation(SD) of three independent experiments.

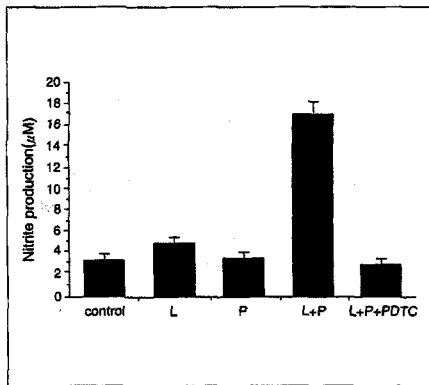


Fig. 2. Nitrite Formation by LPS and PMA in C6 Glial Cells.

The cells were treated with LPS alone ($1\mu\text{g/ml}$), PMA alone ($100\mu\text{M}$) and LPS in combination with PMA. The cells treated with LPS in combination with PMA produced significantly more nitrite compared to cells treated with LPS or PMA alone. Results were expressed the mean and standard deviation(SD) of three independent experiments.

CONT : no treated group
 L : LPS alone treated group
 P : PMA alone treated group
 L+P : LPS in combination with PMA treated group
 L+P+PDTC : LPS in combination with PMA and PDTC treated group

성이 현저히 증가되었다. 또한, 이때 NFkB의 억제제인 PDTC를 처리하였을 때는 $3.2\pm 0.3\mu\text{M}$ 로 NO의 생성을 현저히 억제하였다 (Fig 2).

LPS와 PMA에 의해 증가된 NO는 四物湯을 처리하였을 때, $10\mu\text{g/ml}$, $25\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$ 에서 $14\pm 0.8\mu\text{M}$, $8\pm 0.6\mu\text{M}$, $3.5\pm 0.3\mu\text{M}$ 로 농도 의존적으로 감소되었으며, $100\mu\text{g/ml}$, $250\mu\text{g/ml}$, $500\mu\text{g/ml}$ 에서도 $3.6\pm 0.3\mu\text{M}$, $3.5\pm 0.4\mu\text{M}$, $3.3\pm 0.2\mu\text{M}$ 로 지속하였다(Fig. 3A).

NFkB의 활성은 LPS와 PMA를 동시에 처리한 3시간 이후까지 지속되었다. 그러나 LPS와 PMA를 처리하고 동시에 四物湯을 처리하면 NFkB의 활성은 1시간 이후부터 감소하여 3시간이

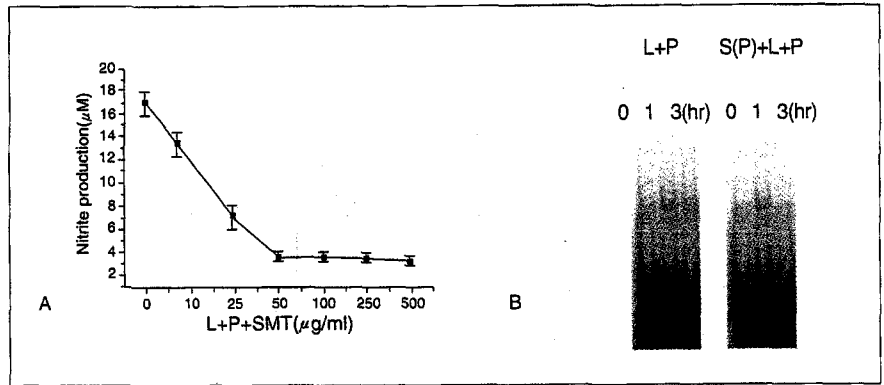


Fig. 3. Effect of the Water Extract of SMT on Suppression of Nitrite Formation by LPS in Combination with PMA in C6 Glial Cells.

The cells were treated with LPS in combination with PMA and water extract of SMT. Released NO was enzymatically measured by using Griess reagents. Results were expressed the mean and standard deviation (SD) of three independent experiments(A). C6 glial cells were treated with LPS in combination with PMA, LPS in combination with PMA and SMT. Nuclear extracts were isolated and incubated with oligonucleotide probe of NFkB. Transcriptional activity of NFkB was assessed by using electrophoretic mobility shift assay(EMSA) and visualized by PhosphorImage analyzer (Fuji Co, Japan) (B).

경과하였을 때는 대조군의 수준으로 감소되었다(Fig. 3B).

3. LPS와 PMA에 의해 유발된 C6 glial 細胞毒性에 대한 四物湯의 防禦效果

C6 glial 세포에 LPS와 PMA를 동시에 72시간 처리하였을 때 세포막은 응축되고 세포돌기도 현저히 감소되었다. 그러나 LPS와 PMA를 四物湯과 같이 처리하였을 때는 형태학적으로 대조군과 큰 차이가 없었다(Fig. 4). 또한 미토콘드리아의 succinic dehydrogenase의 활성을 나타내는 MTT assay에서 LPS와 PMA만을 처리한 군의 세포생존율은 $58\pm 5\%$ 이고, LPS와 PMA를 四物湯과 동시에 처리한 군은 $95\pm 8\%$ 로 유의성있게 감소되었다(Fig. 5 A). 세포의 비가역적인 손상의 지표로서 C6 glial 세포에서 배양액 내로 유출된 LDH의 양을 측정된 결과, 미토콘드리아의 succinic dehydrogenase의 활성을 측정된 결과와 마찬가지로, LPS와

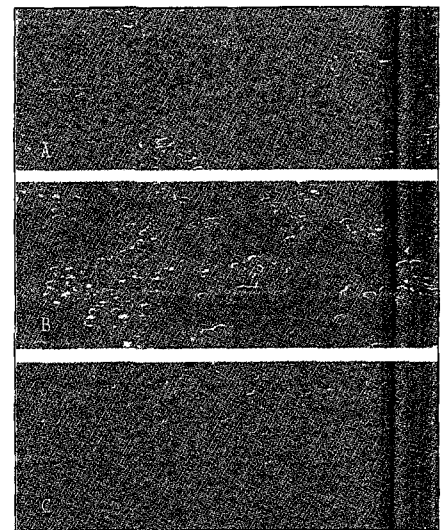


Fig. 4. Effect of the Water Extract of SMT on the Morphological Changes of C6 Glial Cells Damaged by LPS and PMA. The cells were cultured without anything (A), with LPS in combination with PMA (B) and with LPS in combination with PMA and SMT (C) for 72 h. The morphological changes were observed in light microscope (200 ×)

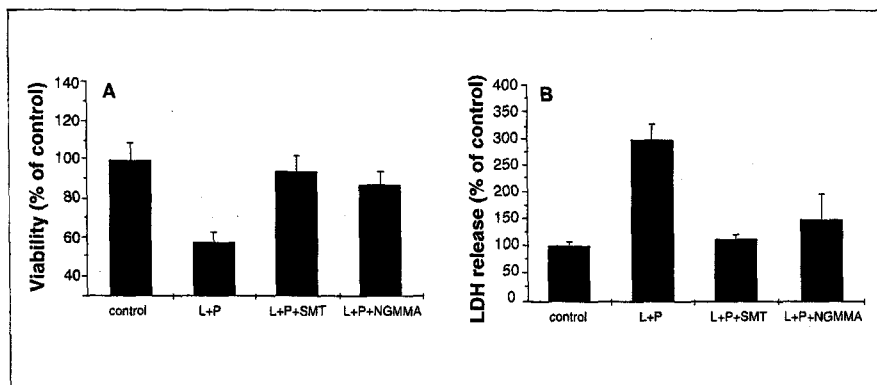


Fig. 5. Effect of NO on the Viability of C6 Glial Cells damaged by LPS in Combination with PMA. The cells were treated with LPS combined PMA , with LPS in combination with PMA and SMT for 72 h. In addition, the cells were treated with LPS in combination with PMA and NGMMA (10· μ M). Then, The cell viability were measured by MTT assay (A) and LDH release into media (B). Results were expressed the mean and standard deviation (SD) of three independent experiments.

CONT : no treated group
 L+P : LPS combined PMA treated group
 L+P+SMT : LPS combined PMA and SMT treated group
 L+P+N^oMMA : LPS combined PMA and NGMMA treated group

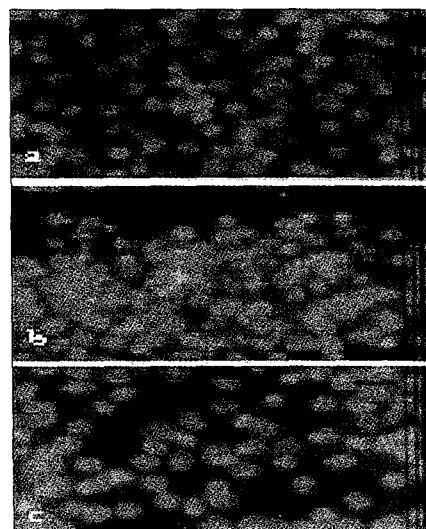


Fig. 6. D

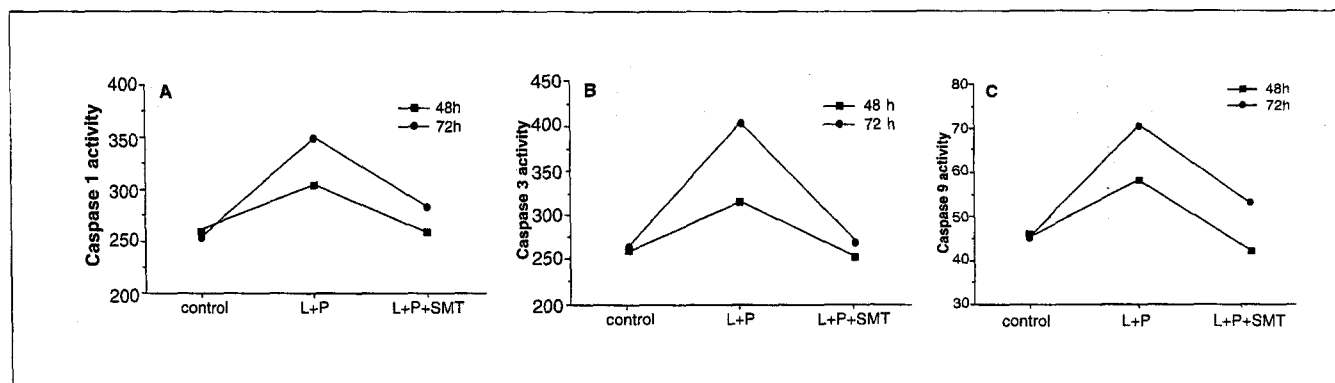


Fig. 6. Protective Effect of the Water Extract of SMT on Apoptosis of C6 Glial Cells by LPS and PMA.

The cells were treated with LPS in combination with PMA , with LPS in combination with PMA and SMT for 72 h. The caspases(1(A) 3(B), 9(C)) activity were measured. DNA fragmentation was observed by hoechst staining(D).(a:control, b:LPS in combination with PMA c:LPS in combination with PMA and SMT) (200 ×)

PMA만을 처리한 군이 300±30%인데 비하여 LPS와 PMA를 四物湯과 동시에 처리한 군은 112±10%로 배양액 내로 유출된 LDH 양이 현저히 감소되었다(Fig. 5B). 이것은 四物湯의 효과가 NO 생성 저해제인 N^oMMA를 처리한 88±7%, 150±50%와 유사하다고 볼 수 있다.

4. LPS와 PMA에 의해 손상된 C6 glial 세포에서 DNA 분절과 caspase 활성화에 대한 四物湯의 효과

세포 죽음의 한 기전인 apoptosis와 가장 밀접하게 관련되어 있는 caspase 라는 효소는 C6 glial 세포에 LPS와 PMA를 72시간 처리하였을 때 caspase 1, caspase 3, caspase 9가 대조군에 비하여 증가된 양상을 관찰할

수 있었으나 LPS와 PMA를 四物湯과 동시에 처리하였을 때는 LPS와 PMA에 의한 caspase 활성화의 증가를 관찰할 수 없었다(Fig. 6 A, B, C). 그리고 C6 glial 세포에 LPS와 PMA를 72시간 처리하였을 때 apoptosis의 전형적인 양상인 염색사의 응축과 DNA의 분절양상을 관찰할 수 있었으나, LPS와 PMA를 四物湯과 동시에 처리하였을 때는 염색사의 응축이나 DNA의 분절양상을

전혀 관찰할 수 없었다.(Fig. 6 D)

IV. 考 察

뇌는 계속되는 혈액공급을 통하여 영양분과 산소를 공급받고 있는데 혈액공급이 차단되면 ATP를 1분 이상 유지하기가 힘들 정도로 혈액공급에 매우 민감한 조직이다^{20,21}. 허혈 상태의 뇌에서 일어나는 병리생리학적 반응에서 NO의 생성이 중요하게 관여하고 있다는 연구가 최근 활발히 진행되고 있다^{22,23}.

뇌허혈시 신경원세포와 교세포에서는 신경세포막이 탈분극되어 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 유리되는데 이에 의하여 N-methyl-D-aspartic acid(NMDA)에 선택적인 전압의존성 이온통로가 열리며 칼슘이 세포 내에 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 신경질환에도 관여한다^{25,26}.

허혈성 뇌질환에 의한 세포 손상은, 흥분성 아미노산에 의해서 허혈 초기에 칼슘에 의존적인 nNOS와 eNOS가 수 시간 내에 활성화되면서 이루어진다²⁷. 이 때 nNOS의 활성을 선택적으로 억제하거나 eNOS의 활성을 촉진시키면 허혈에 의한 뇌세포 손상을 막을 수 있다^{28,29}. 또한 허혈이 시작된 12시간 후에 활성화되는 iNOS는 미토콘드리아의 기능부전이나 에너지고갈을 야기시켜 뇌세포 손상을 매개한다³⁰. 따라서 허혈에 의한 뇌세포 손상은 허혈 초기의 nNOS를 억제하고 eNOS의 활성을 촉

진시켜야 하고 수시간 이후부터 유도되기 시작하는 iNOS의 발현을 억제하는데 치료의 초점을 맞추어야 할 것으로 생각한다.

四物湯은, 補血滋陰의 效能으로 腎水를 滋養하여 血虛 및 腎陰不足으로 인한 諸般症狀에 활용하는 熟地黃, 養血補血·和血調經·活血止痛의 效能으로 造血과 血液循環을 촉진하며 자궁에 대한 수축 및 억제작용, 중독성 간염에 대하여 간장보호, 간장 glycogen의 저하 방지 작용, 비타민 E결핍 방지 작용, 혈관평활근 수축시켜 혈압상승 작용 및 호흡 억제작용이 있고, *in vitro*에서 이질균, 용혈성 연쇄구균 등에 대한 항균 작용 등이 있는 當歸, 活血行氣·祛風止痛하는 效能으로 혈관신경에 작용하여 순환촉진과 혈액의 신진대사를 촉진시키고 동물의 중추신경계에 대한 진정 작용, 혈압 하강 작용, 자궁평활근 수축 작용 등의 약리작용이 있는 川芎, 柔肝止痛·養血斂陰·平抑肝陽하는 效能으로 腹痛, 陰虛發熱, 月經不順, 崩漏, 帶下 등에 사용하는 芍藥³¹으로 구성되어 補血·活血의 效能으로 혈액의 병리적인 상태로 기인한 혈액질환, 심혈관질환, 부인과질환, 뇌질환 등에 다양하게 사용되고 있는 처방이다.

血은 精·氣·神과 더불어 인체의 생명현상을 구성하는 기본요소로서, 血液의 不足이나 血의 機能減退로 인한 血虛, 血의 運行失調로 인한 血瘀와, 血分으로 熱邪가 침범한 血熱 등으로 病機가 귀속되며 특히 血虛와 血瘀는 歷代 醫家들에 의해 中風의 중요한 病機로 제시되어 왔다¹⁰.

四物湯에 관한 실험적 연구에서, 四物湯은 貧血 家兔의 RBC, hemoglobin, hematocrit 치를 상승시켜 조혈효과가 있었고¹³, 家兔의 혈압강하에 유의한 효

과가 있었으며¹⁴, hydrocortisone acetate로 유발된 고점도혈증을 개선시켰고¹⁵, endotoxin으로 유발된 혈전증을 개선시켰으며¹⁶, hydrogen peroxide로 손상된 혈관내피세포를 회복하는 효과가 있는 것¹⁷으로 보고되고 있으나 허혈 상태를 유발시켜 발생하는 NO의 세포독성에 대한 四物湯의 방어효과에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없었다.

따라서 본 연구에서는 補血·活血의 효능으로 血虛, 血瘀證에 활용하는 四物湯이 허혈성 뇌질환시 신경세포독성 억제작용에 미치는 영향을 알아보기 위하여 lipopoly saccharide(LPS)와 phorhol 12-myristate 13-acetate (PMA)에 의해 손상된 C6 glial 세포에 四物湯을 처리하여 세포생존율, LDH 활성도, NO 생성, 염색사의 응축과 DNA 분절, caspase 활성도에 미치는 효과를 관찰하였다.

LPS는 중추신경계에서 tumor necrosis factor-alpha(TNF- α) 신호전달계를 활성화시킨다고 잘 알려져 있다. TNF- α 는 허혈성 뇌질환에서 증가하는데, 이 증가된 TNF- α 는 다른 cytokine과 더불어 별아교세포와 신경교세포에서 nuclear factor kappa B(NFkB)에 의한 iNOS의 발현에 깊이 관여하고 있다³¹.

본 실험에서 LPS와 PMA에 의해 활성화된 NFkB를 四物湯이 억제하여 NO의 생성을 농도의존적으로 감소시킴으로써 LPS와 PMA에 의해서 유발된 세포막손상이나 미토콘드리아의 손상을 현저히 억제하였다(Fig 2, 3). 이는 허혈모델의 배양 교세포와 중대뇌동맥(middle cerebral artery, MCA)을 폐쇄시킨 쥐모델에서 칼슘에 비의존적으로 발현되는 iNOS의 활성이 증가하였고^{32,33}, 이러한 조건에서 선택적인 iNOS

의 저해제인 aminoguanidine이 세포 손상을 현저히 억제하였다는 보고와 일치하였다³⁴. 그러므로 허혈시 四物湯의 세포독성을 막는 기전 중의 하나는 허혈시 발생하는 iNOS의 생성을 억제함으로써 이루어진다고 볼 수 있다.

아포토시스(apoptosis)란 세포의 분해를 위해 세포내의 효소들이 활발하게 관여하는 능동적인 죽음의 기작이다. 이 과정은 형태적으로 세포의 비중감소, 염색체의 응축, DNA의 분절 등과 더불어 세포내부의 물질들이 사멸체(apoptotic body)라는 포낭을 형성하는데, caspase (cystein aspartase) 효소와 매우 밀접한 관계가 있다³⁵. 본 실험에서도 LPS와 PMA에 의해 apoptosis의 전형적인 양상인 caspase 활성의 증가, 염색사의 응축, DNA의 분절이 나타났는데, LPS와 PMA를 四物湯과 동시에 처리하였을 때는 caspase 활성의 증가, 염색사의 응축, DNA의 분절 등이 현저하게 억제되었다(Fig 6 D). 이는 四物湯이 뇌세포에서 iNOS의 발현을 억제함으로써 뇌세포의 caspase 1, 3, 9의 활성을 억제하여 apoptosis를 억제하는 것으로 생각한다. 이러한 결과는, C6 glial 세포에 대하여 LPS와 interferon gamma를 처리하여 iNOS의 발현이 증가되었을 때, caspase 3의 활성을 증가시키지만 이때 caspase 3의 활성저해제인 Ac-DEVD-MCA를 처리하면 뇌세포의 apoptosis를 억제한다는 결과³⁶와 깊은 연관성이 있는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면 四物湯은 뇌허혈 초기 신경세포 손상에 대하여 iNOS의 활성을 저해함으로써 세포의 막독성이나 미토콘드리아의 독성을 억제하고, 또한 caspase의 활성을 억제함으로써 염색사의 응축이나 DNA의 분절 등의 apoptosis를 억제하므로 허혈

성 뇌졸중 초기에 신경세포 손상을 방지하는데 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

뇌허혈로 인한 신경세포 손상에 대한 四物湯의 방어효과를 究明하고자 lipopoly saccharide(LPS)와 phorhol 12-myristate 13-acetate (PMA)에 의해 손상된 C6 glial 세포에 四物湯을 처리하여 MTT assay, EMSA, 광학현미경적 조사, Hoechst staining에 의한 방법으로 세포생존율, LDH 활성, NO 생성, 염색사 응축과 DNA 분절, caspase 활성에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 四物湯은 10mg/ml까지 농도를 증가시켜도 정상적인 C6 glial 세포에 손상을 주지 않았다.
2. 四物湯은 2.5mg/ml까지 NFkB의 활성을 억제하여 LPS와 PMA에 의해 유발된 Nitrite 생성을 농도의존적으로 억제하였다.
3. 四物湯은 LPS와 PMA에 의해 유발된 세포막독성과 미토콘드리아독성을 현저히 억제하였다.
4. 四物湯은 LPS와 PMA에 의해 유발된 iNOS의 활성을 억제함으로써 염색사의 응축이나 DNA의 분절 등을 억제하였고, caspase 1, 3, 9의 활성을 억제하였다.

이상의 결과로 보아 四物湯은 뇌허혈에 의한 신경세포 독성에 대하여 NFkB의 활성을 억제하여 NO의 생성을 감소시킴으로써 세포막독성 및 미토콘드리아의 독성을 억제할 뿐만 아니라 염색사 응축, DNA 분절, caspase 활성을 억제하여 apoptosis를 억제하는 것

으로 사료된다.

VI. 參 考 文 獻

1. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北: 旋風出版社; 1975, p.242
2. 朱震亨. 新編丹溪心法附餘. 서울: 大成文化社; 1993, pp.702-3
3. 李 杲. 東醫十種醫書. 서울: 大成文化社; 1983, pp.667-8
4. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂; 1986, p.113
5. 康舜洙. 바른方劑學. 서울: 大成文化社; 1996, pp.122-3
6. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울: 醫聖堂; 1998, pp.163-70
7. 辛民教. 最新韓方臨床診療. 서울: 永林社; 1996, pp.389-90
8. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 中藥大辭典. 서울: 정담; 1998, p.3349, 5260, 5263, 2183
9. 辛民教. 臨床本草學. 서울: 永林社; 1988, pp.219-23, 249-50
10. 金完熙, 崔達永. 臟腑辨證論治. 서울: 成輔社; 1993, pp.57-8
11. 金鍾寬. 太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院. 1998
12. 金永洙. 酸素自由基에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 壯元丸의 影響. 圓光大學校 大學院. 1999
13. 金世吉. 四物湯이 貧血 家兔의 造血效果에 미치는 影響. 圓光대학교 한의과대학 학위논문집; 1982, 2:143-52
14. 姜昌洙. 四物湯 煎湯液이 家兔의 혈압강하에 미치는 影響. 圓光대학교 대학원. 1984
15. 權在龍. 四物湯 및 계절별 活用方이 혈액에 미치는 影響. 대구한의과대학 대학원. 1991
16. 河智容. 四物湯 및 四君子湯이 endotoxin으로 유발된 혈전증에 미치는 影響. 경희대학교 대학원. 1998.
17. 南昌圭. 四物湯이 血管內皮細胞에 미치는 影響. 圓光대학교 대학원. 1997
18. 김명호, 김주한. 뇌졸중의 개요. 대한의학회지 1992; 35(8):976-83
19. 서정규. 뇌혈관질환의 진단과 치료방침. 대한의학회지 1990; 33(8):850-8
20. Hawkins R. Cerebral energy metabolism. In: McCandless DW editor.

- Cerebral Energy Metabolism and Metabolic Encephalopathy. New York. Plenum Press; 1985, 3-17
21. Lust WD, Yasumoto Y, Wittingham TS, Djuricic B, Mrsulja BB, Passoneau J. Ischemic encephalopathy. In: McCandless DW editor. Cerebral Energy Metabolism and Metabolic Encephalopathy, New York, Plenum Press; 1985, 79-112
 22. 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
 23. Vincent SR. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Progr. Neurobiol* 1994; 42: 129-60
 24. Wagner BP, Stingle R, Williams MA, Wilson DA, Traystman RJ, Hanley DF. NO contributes to neurohypophysial but not other regional cerebral fluorocarbon-induced hyperemia in cats. *Am. J. Physiol* 1997; 42: H1994-H2000
 25. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *J. Biochem* 1994; 298:249-58
 26. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88:6368-71
 27. Almeida A, Heales SJR, Bolaos JP, Medina JM. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res* 1998; 790:209-16
 28. Juan PB, Angeles A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochemica. Biophysica. Acta* 1998; 1141:415-36
 29. Zhang ZY, Iadecola C. Reduction of focal cerebral ischemia damage by delayed treatment with nitric oxide donors. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1994; 14:574-80
 30. Pluta RM, Oldfield EH, Boock RJ. Reversal and prevention of cerebral vasospasm by intracarotid infusions of nitric oxide donors in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg* 1997; 87:746-51
 31. Iadecola C, Zhang FY, Casey R, Clark HB, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene-expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 1996; 27:1373-80
 32. 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
 33. Iadecola C, Xu XH, Zhang FY, Elfakahany EE, Ross ME. Marked induction of Calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1995; 15:52-9
 34. Peng ZC, Pietra C, Sbarbati A, Ziviani L, Yan XB, Osculati F, Bentivoglio M. Induction of NADPH-diaphorase activity in the rat forebrain after middle cerebral artery occlusion. *Exp. Neurol* 1996; 138:105-20
 35. Zhang FY, Casey RM, Ross ME, Iadecola C. Amino-guanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1996; 27:317-23
 36. Alnemri ES, Livingston DJ, Nocholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell* 1996; 87:171-6
 37. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide neurotoxicity. *J. Chem Neuroanat.*, 1996; 10:179-90
 38. 해리슨 번역편찬위원회 역. Harrison's 내과학. 서울: 정담; 1997, 2409-11