

원저

右歸飲이 Zinc에 의한 신경교세포의 고사(Apoptosis)에 미치는 영향

이영구, 문병순¹⁾

우석대학교 한의과대학 심계내과학교실, 원광대학교 한의과대학 심계내과학교실¹⁾

Protective Effects of *Ukyium*(右歸飲, *Yougui-yin*) in Zinc-induced Apoptosis of C6 Glial Cells

Young-Goo Lee, Byung-Soon Moon¹⁾

Department of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Woosuk University,
Department of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University¹⁾

Objectives : The objective of the current study is to determine the protective effect of *Ukyium*(右歸飲, *Yougui-yin*) on the apoptosis induced by zinc.

Methods : Zinc is known to generate reactive oxygen species (ROS), including superoxide anion (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂), which eventually contribute to cytotoxicity in a variety of cell types. We investigated the viability of cells, H₂O₂ generation, chromatin condensation and nuclear fragmentation in Hoechst dye staining and IκB-α degradation in C6 glial cells of ZnCl₂ between pretreatment- and not pretreatment-group with *Ukyium*. The former methods were researched by Time- and Dose-dependent manners.

Results : We demonstrated that pretreatment with *Ukyium* prevented zinc-induced cell death of C6 glial cells and apoptotic characteristics including chromatin condensation and nuclear fragmentation. *Ukyium* also prevented H₂O₂-induced cell death. We further confirmed that *Ukyium* decreased zinc-induced generation of H₂O₂ and inhibited degradation of IκB-α by zinc in C6 glial cells.

Conclusions : These data indicated that *Ukyium* (右歸飲, *Yougui-yin*) prevents zinc-induced apoptotic death of C6 glial cells via inhibition of ROS generation, such as H₂O₂ as well as inhibition of IκB-α degradation. (*J Korean Oriental Med* 2001;22(3):63-73)

Key Words: *Ukyium*(右歸飲, *Yougui-yin*), C6 glial cell, Apoptosis

서론

생활수준의 향상과 의학의 발달 등으로 인하여 수명이 연장되고 노년인구의 증가로 치매 등 뇌의 퇴행성 질환이 점차 증가 추세에 있다¹⁾.

뇌의 노화에 대하여 한의학에서는 나이가 많아지면 氣血不足과 腎精의 虧虛로 髓海不足을 야기하여

· 접수 : 2001년 5월 19일 · 채택 : 7월 1일
· 교신저자 : 이영구, 우석대학교 부속한방병원 한방2내과, 전북 전주시 완산구 중화산동 2가 5번지 (Tel. 063-220-8608, Fax. 063-227-6234, E-mail: LP209@hitel.net)
· 본 연구의 일부는 우석대학교 교내학술연구비지원에 의하여 이루어졌음.

腦髓가 점차로 공허해진다^{2,3)}고 설명하고 있으며, 서양의학에서는 뇌의 미만성 위축과 뇌신경세포의 소실로 인한 뇌의 기질적 변성과 뇌의 각종 신경전달물질의 감소 등 뇌의 퇴행성 변화에 기인하는 것으로 인식하고 있다^{4,5)}.

많은 신경계질환의 증상 발현은 신경세포(neuron)와 신경교세포(glial cell)의 고사(apoptosis)가 주요한 원인이며⁶⁾, 이런 세포고사 과정에는 아미노산 글루타메이트(glutamate)에 의한 흥분독성(excitotoxicity)과 산화성 손상(free radical injury)이 중요한 기전으로 연구되고 있으며^{6,7)}, 또한 미량원소인 zinc은 체내 효소의 구성 성분이 되고 핵산의 합성과 면역 작용에 관여하고⁸⁻¹⁰⁾, 세포고사 조절의 중요한 인자로서 작용하는데¹¹⁾ 특히, 중추신경계에 상당량 존재하여 신경세포 고사에 관여한다고 보고되고 있다¹²⁾.

한편, 右歸飲은 溫補腎陽 填精補髓하는 효능을 가진 처방으로 腎陽不足으로 인한 虛勞, 畏寒肢冷, 陽萎, 滑精, 腰膝酸軟, 氣怯神疲, 腹痛 等症에 사용되어 왔으며^{13,14)}, 최근에는 髓海不足으로 인한 치태 등 퇴행성 뇌질환에도 응용되고 있다^{2,3)}.

右歸飲에 관한 실험적 연구로는 주로 신장기능과 부신피질에 관한 연구가 대부분을 차지하고 있으며¹⁵⁾, 뇌에 연관된 연구로는 尹¹⁷⁾이 뇌에서 활성 산소류의 생성을 阻害하여 과산화지질의 생성을 억제시킨다는 보고를 하였다.

따라서, 腎精虧虛로 인한 퇴행성 뇌질환에 활용되

고 있는 右歸飲이 뇌신경세포의 손상에 대해 일정한 효과가 있을 것으로 사료되어 본 연구를 시행하였다.

이에 저자는 퇴행성 뇌질환에 활용되고 있는 右歸飲이 zinc에 의한 신경교세포의 고사에 미치는 영향을 究明하고자 C6 교세포에 ZnCl₂의 단독처리와 右歸飲과의 병행처리에 따른 세포생존율, 염색사 응축과 핵 분절, H₂O₂ 생성양, IκB-α의 활성도를 관찰하였던 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 細胞株

C6 교세포는 쥐의 신경교세포로서 한국 세포주은행에서 구입하여 CO₂ 세포배양기(37℃, 5% CO₂)에서 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 배양하였다.

2) 약재

실험에 사용한 右歸飲의 처방 내용은 《景岳全書》¹³⁾에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

3) 시약 및 기기

DMEM, FBS, 항생제 및 trypsin 등의 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL Co.(Grand Island, NY, U.S.A.)로부터 구입하였으며, 배양용기(24 well plate 와 10 cm dish)는 Falcon(Becton Dickinson, San Jose,

Table 1. Prescription of Ukyijum

| Species | Part used | Latin name | Amount(g) |
|-------------------------------------|-----------|---|-----------|
| <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch. | Root | <i>Rehmanniae Radix</i> (熟地黄*) | 15.00 |
| <i>Dioscorea batatas</i> Decne. | Root | <i>Dioscoreae Radix</i> (山藥炒 [†]) | 7.50 |
| <i>Lycium chinense</i> Mill. | Fruit | <i>Lycii Fructus</i> (枸杞子) | 7.50 |
| <i>Eucommia ulmoides</i> Oliv. | Cortex | <i>Eucommiae Cortex</i> (杜仲薑製 [‡]) | 7.50 |
| <i>Cornus officinalis</i> Sieb. | Fruit | <i>Corni Fructus</i> (山茱萸) | 3.75 |
| <i>Aconitum carmichaeli</i> Debx. | Root | <i>Aconiti Tuber</i> (附子晷) | 3.75 |
| <i>Cinnamomum cassia</i> Bl. | Cortex | <i>Cinnamomi Cortex Spissus</i> (肉桂) | 3.75 |
| <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch. | Root | <i>Glycyrrhizae Radix</i> (甘草炙 [§]) | 3.75 |
| Total amount | | | 48.75 |

These herbs were treated by following method.

* heating with steam 9 times ; † parthed ; ‡ soaked in Zingiberis Rhizoma

§ roasted, enveloped with wet papers ; || fried with honey

CA, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 세포 및 핵 염색과 관찰에 이용한 slide chamber는 Nunc Co. (Germany)로부터 구입하여 사용하였다.

MTT, Hoechst 33258, BCA, SDS, DMSO는 Sigma(St. Louis, Missouri, U.S.A.)로부터 구입하였고, caspase 종류의 형광기질은 Calbiochem Co.(San Diego, CA, U.S.A.)로부터 구입하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

右歸飲 4칩 분량(195g)을 3,000 ml 환저 플라스크에 증류수 1,500 ml와 함께 넣은 다음, 120분간 가열하여 얻은 전탕액을 여과지로 여과한 뒤 5,000 rpm으로 30분간 원심분리하고 rotary vacuum evaporator에 넣어 감압 농축한 후 동결건조기로 완전히 건조하여 수득을 35%로 68.25g을 얻어, eppendorf tube에 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 DMSO로 녹여서 냉장보관하면서 사용 시에는 DMEM에 희석해서 사용하였다.

2) C6 교세포의 배양 및 관찰

C6 교세포의 배양은 CO₂ 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 배양하였다. 약 48시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포에 右歸飲을 처리한 뒤 실험을 시행하였다.

3) 세포생존율 측정

C6 교세포를 세포배양판(24well plate)에 10% FBS/DMEM으로 1×10⁶/ml의 세포를 6시간 동안 정치시켜 부착시킨 후 右歸飲과 ZnCl₂, H₂O₂를 처리하여 생존율(viability)을 측정하였다. 세포생존율은 MTT assay²⁰⁾을 이용하였다. 약재 처리 후 최종시간 2시간 전에 최종농도 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 MTT용액을 넣어 37°C 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하고 최종시간에 배양액을 제거한다. 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 불용성의 formazan을 확인한 후 DMSO에 의해 녹여낸 다음, ELISA reader(Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, U.S.A.)로 540 nm의 波長下에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 얻은 값은 평균을 내어 대조군에 비교한 %로 나타내었다.

4) H₂O₂ 생성양 측정

C6 교세포를 6 cm 세포배양판에 2×10⁶ cells/ml씩 분주한 다음 右歸飲과 ZnCl₂를 처리한 후 부착시켜서 상층액만을 모은다. 상층액을 96 wells 세포배양판에 각각 100 l씩 분주한 다음 1U HRP, 1-2 M scopoletin을 처리한 다음 10분 동안 반응시켰다. 생성된 H₂O₂에 의해 감소된 scopoletin의 형광을 대조군과 비교하여 fluorometer(Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA)로 380/450 nm의 파장에서 측정하여 백분율(%)로 표시하였다.

5) 핵 염색

약재가 처리된 세포들을 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 세척하고 Hoechst 33258 염색약을 PBS에 10 μM 이 되도록 희석하여 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경으로 관찰하였다. 실험에 따른 사진은 역상 광학현미경 (Nikon Eclipse TE300, Japan)을 이용하였고, 10×10의 배율로 사진을 찍었다 (Nikon, Japan).

6) Western blotting

배양된 C6 교세포에 右歸飲과 ZnCl₂을 다양한 시간동안 처리 후 세포를 捕集하여 차가운 HBSS로 2회 세척하였다. 얻은 세포는 RIPA 용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 2 mM Na₃VO₄, 100 μM phenylarsine oxide)으로 얼음 위에서 용해하였다. 용해세포 浮游液에 2배의 sample buffer(5mM EDTA, 4% SDS, 20% glycerol, 200mM Tris, pH 6.8, 0.06% bromophenol blue)와 섞어 100°C에서 3분간 끓인 후, 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4°C, 30 V에서 16시간 동안 transfer한 후 blocking buffer (5% skim milk)로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. IkB- α 에 대한 항체(Santacruz Co., San Diego, CA, U.S.A.)를 TBS에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated HRP (TBS로 1:1,000으로 희석, Amersham Co., Buckinghamshire, England)와 상온에서 1시간 동안 반응시킨

후 ECL kit (Amersham, England)를 사용하여 필름에 노출시켜 얻었다.

7) 통계 처리⁹⁾

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의 평균(Mean)과 표준편차(S.D.)를 산출하여 Mean±S.D.로 나타내고, student's t-test를 사용하여 검정하였다.

실험성적

1. ZnCl₂에 의한 C6 교세포에 미치는 세포독성과 右歸飲의 보호효과

먼저 zinc가 C6 교세포에 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 C6 교세포를 세포배양용 24Well 판에 6 시간동안 정치시켜 부착시킨 후 일정한 250μM ZnCl₂ 농도로 시간대별로 처리하여 세포생존율을 관찰한 결과, 4시간 경과 후에는 세포생존율이 처리전의 대조군과 비교하여 1.8% 감소하였고, 6, 8, 10, 12 시간 경과 후에는 각각 14.5, 49.8, 80.9, 89.5% 유의성 있게 감소하였으며(Table 2), ZnCl₂ 100μM에서 250μM의 ZnCl₂를 8시간 처리하여 세포생존율을 관찰한 결과, ZnCl₂ 100, 150μM에서의 세포생존율은 처리전의 대조군과 비교해서 각각 4.5, 7.2% 감소하였으며, ZnCl₂ 200, 250μM에서의 각각 12.6, 51.9% 유의성 있게 감소하였다(Table 3).

그리고, ZnCl₂에 의한 C6 교세포의 세포독성에서 右歸飲의 병행처리시 세포생존율을 알아보기 위하여

C6 교세포를 右歸飲 100, 200, 400, 600, 800 μg/ml의 농도로 각각 30분 동안 처리한 후 전처리한 세포에 250μM ZnCl₂을 각각 8시간 동안 처리하여 세포생존율을 관찰한 결과, 250μM ZnCl₂를 단독처리시 세포생존율은 42.2%이었으며, 右歸飲 100, 200, 400, 600, 800 μg/ml과의 병행처리시 세포생존율은 각각 55.3, 59.6, 62.3, 71.4, 81.7%로 右歸飲 농도 의존적으로 세포생존율이 증가하였는데(Fig. 1), 처리전의 대조군과 비교하면 각각 右歸飲 병행처리시 농도별로 세포생존율이 각각 44.7, 40.4, 37.7, 28.6, 18.3% 감소하였지만, ZnCl₂ 단독처리시와 비교하면 세포생존율은 각각 13.1, 17.4, 20.1, 29.2, 38.5% 증가하였다(Table 2, 3, Fig. 1).

2. 右歸飲에 의한 ZnCl₂ 유도성 핵분질의 방지효과

ZnCl₂에 의해 유도된 C6 교세포의 세포독성이 세포고사에 의한 현상인지 여부와 右歸飲의 영향을 알아보기 위하여 C6 교세포에 250μM ZnCl₂를 단독처리한 세포와 250μM ZnCl₂와 800μg/ml 右歸飲을 병행처리한 세포를 각각 4시간 동안 처리하여 4% formaldehyde에 의해 고정시킨 후 핵 안에 끼어 들어갈 수 있는 Hoechst로 염색하여 형광 현미경으로 관찰한 결과, 처리전의 대조군 세포에서의 핵은 뚜렷하게 둥글거나 타원형을 보였으며(Fig. 2-A), ZnCl₂만 단독처리한 세포에서는 대조군 세포와 비교해서 염색사가 응축되고 핵의 분절을 뚜렷이 관찰할 수 있었고(Fig. 2-B), ZnCl₂ 250μM와 800μg/ml 右歸飲을 병행처리한 세포에서는 ZnCl₂만 단독처리한 세포와 비

Table 2. Time-dependent Cytotoxic Effects of ZnCl₂ in C6 Glial Cells

| Time (hr) | Viability (%) |
|-----------|---------------|
| 0 | 100 ± 2.0 |
| 4 | 98.2 ± 4.0 |
| 6 | 85.5 ± 3.0 * |
| 8 | 50.2 ± 2.0 * |
| 10 | 19.1 ± 3.0 ** |
| 12 | 10.5 ± 5.0 ** |

Cells were seeded for 6 hours and treated with 250μM ZnCl₂ for each period. The viability of cells was measured by MTT assay. Results represented the mean (%) ± S. D. of three different experiments.

* P < 0.5, ** P < 0.1 by student's t-test, compared to control group

Table 3. Dose-dependent Cytotoxic Effects of ZnCl₂ in C6 Glial Cells

| Dose (μM) | Viability (%) |
|-----------|---------------|
| 0 | 100 ± 1.0 |
| 100 | 95.5 ± 3.0 |
| 150 | 92.8 ± 1.5 |
| 200 | 87.4 ± 2.0 * |
| 250 | 48.1 ± 3.0 ** |

Cells were seeded for 6 hours and treated with various concentrations of ZnCl₂ for 8 hours. The viability of cells was measured by MTT assay. Results represented the mean (%) ± S.D. of three different experiments.

* P < 0.5, ** P < 0.1 by student's t-test, compared to control group

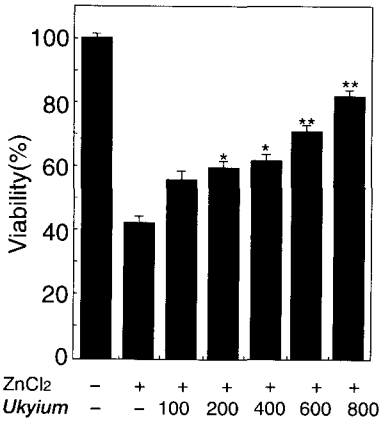


Fig. 1. Protective effects of *Ukyium* and zinc-induced cell death of C6 glial cells. Cells were pretreated with various concentrations of *Ukyium* for 30 minutes and further incubated with 250 μ M ZnCl₂ for 8 hours. Then, the viability of cells was measured by MTT assay. Results represented the mean(%) \pm S.D. of three different experiments.

* P < 0.5, ** P < 0.1 by student's t-test, compared to only ZnCl₂-treated group

교해서 염색사의 응축 정도가 적었으며, 핵의 분절 또한 뚜렷하지 않았고, 처리전의 대조군과 큰 차이가 없었다(Fig. 2-C).

3. 右歸飲에 의한 H₂O₂ 생성 억제효과

ZnCl₂ 처리에 의한 C6 교세포에서의 세포독성이 자유라디칼에 의해 매개되어질 가능성을 확인하기 위하여 ZnCl₂ 처리에 의한 H₂O₂ 생성량을 관찰하였다. 먼저 C6 교세포에 250 μ M ZnCl₂를 단독처리 후 2시간 간격으로 10시간 동안의 세포내 H₂O₂ 생성량을 각각 시간대별로 관찰한 결과 2, 4시간 후에는 H₂O₂의 생성량이 처리전의 대조군에 비하여 각각 112, 119% 증가하였으며, 6, 8, 10시간 후에는 각각 124, 185, 278%로 유의성있게 증가하였다(Table 4).

또한, ZnCl₂에 의한 C6 교세포에서의 右歸飲의 효과를 알아보기 위하여 800 μ g/ml 右歸飲을 각각의 C6 교세포에 30분 동안 전처리하고 시간별로 동량의 250 μ M ZnCl₂을 후처리하여 2시간 간격으로 10시간

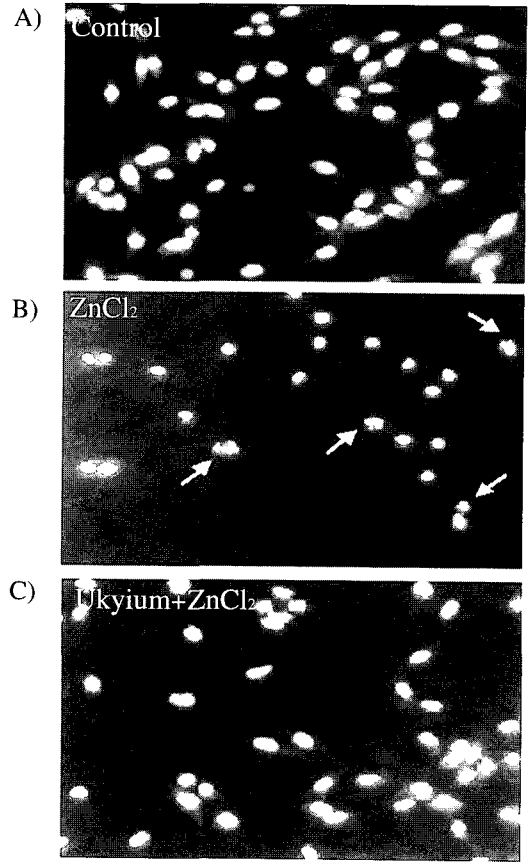


Fig. 2. Inhibitory effect of *Ukyium* on zinc-induced H₂O₂ generation in C6 glial cells. Cells were treated with 250 μ M ZnCl₂ with or without 800 μ g/ml *Ukyium* for each period. The generation of H₂O₂ was measured by scopoletin- HRP assay. Results represented the mean(%) \pm S.D. of three different experiments.

Table 4. The Generation of Hydrogen Peroxide(H₂O₂) in Zinc-induced C6 Glial Cells

| Time(hr) | Relative fluorescence(%) |
|----------|--------------------------|
| 0 | 100 \pm 2.0 |
| 2 | 112 \pm 3.0 |
| 4 | 119 \pm 5.0 |
| 6 | 124 \pm 7.0 * |
| 8 | 185 \pm 15.0 ** |
| 10 | 278 \pm 13.0 * |

Cells were seeded for 6 hours and treated with 250 μ M ZnCl₂ for each time. The generation of H₂O₂ was measured by scopoletin HRP assay from cultured supernatants described in materials and methods. Results represented the mean(%) \pm S.D. of three different experiments.

* P < 0.5, ** P < 0.1 by student's t-test, compared to control group

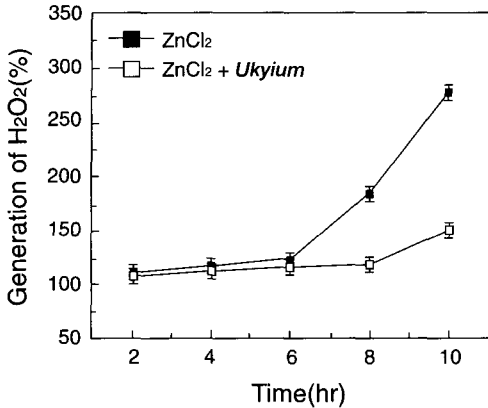


Fig. 3. Protective effect of *Ukyium* on ZnCl₂-induced nuclear fragmentation of C6 glial cells. Cells were treated with ZnCl₂(250 μ M) in the absence or presence of *Ukyium* (800 μ g/ml). The cells were fixed with 4% formaldehyde, stained with Hoechst 33258 to observe nuclear morphology under the fluorescent microscope(100 \times). Arrows indicated nuclear fragmented cells.

동안 H₂O₂의 생성량을 시간대별로 관찰한 결과 250 μ M ZnCl₂을 단독처리시 2, 4, 6, 8, 10시간 후 H₂O₂ 생성량은 처리전의 대조군에 비교하여 각각 112, 119, 124, 185, 278%의 증가를 보였고, 右歸飲을 병행처리시에는 처리전의 대조군에 비교하여 각각 108, 113, 116, 118, 149%의 증가를 보였으므로 H₂O₂ 생성량을 각각 시간대별로 비교하면 右歸飲 병행처리시에 ZnCl₂을 단독처리시보다 현저히 적게 나타났다(Fig. 3).

4. H₂O₂에 의한 C6 교세포에 미치는 세포독성과 右歸飲의 보호효과

앞의 [Table 4]과 [Fig. 3]에서 보인 결과에서 ZnCl₂에 의한 H₂O₂ 생성이 직접 C6 교세포의 독성 유발을 매개할 가능성을 증명하기 위하여 외부에서 H₂O₂를 직접 C6 교세포에 단독처리하여 세포독성을 관찰하였다. H₂O₂를 처리하지 않은 대조군 세포와 H₂O₂ 100 μ M에서 300 μ M농도로 24시간 단독처리시 세포 생존율을 비교한 결과, H₂O₂ 100, 150, 200, 300 μ M에서의 세포생존율이 각각 92, 78, 64, 40%를 보여 처리전의 대조군 세포와 비교해서 각각 8, 22, 36, 60% 감

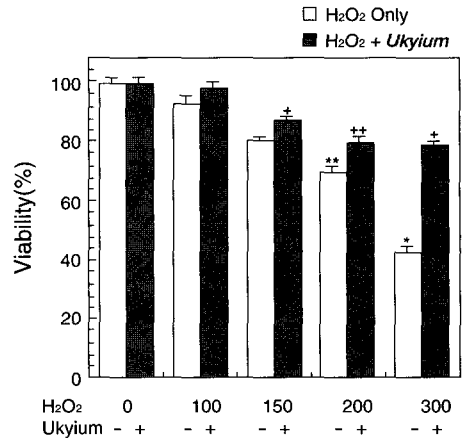


Fig. 4. Protective effect of *Ukyium* on H₂O₂-induced death of C6 glial cells. Cells were treated with H₂O₂ in absence or presence of *Ukyium* (800 μ g/ml) for 24 hours. The viability of cells was measured by MTT assay. Results represented μ g the mean(%) \pm S.D. of three different experiments.

* P < 0.5, ** P < 0.1 by student's t-test, compared to control group.
+ P < 0.5 by student's t-test, compared to 200 μ M H₂O₂-treated group.
++ P < 0.5 by student's t-test, compared to 300 μ M H₂O₂-treated group.

소하였다(Fig. 4). 또한, H₂O₂에 의한 C6 교세포의 세포독성에서 右歸飲의 병행처리시 세포생존율을 알아보기 위하여 각각의 C6 교세포에 800 μ g/ml 농도의 右歸飲을 30분 전처리한 후 H₂O₂ 100, 150, 200, 300 μ M에서의 세포생존율을 비교한 결과, 右歸飲과 H₂O₂ 병행처리시에는 세포생존율이 각각 98, 86, 80, 79%를 보여 처리 전의 대조군과 비교해서 세포생존율이 각각 2, 14, 20, 21% 감소하였지만, H₂O₂ 단독처리시와 비교하면 세포생존율은 각각 6, 8, 16, 39% 증가하였다(Fig. 4).

5. ZnCl₂의 단독처리와 右歸飲의 병행처리시의 I κ B- α 의 변화

유전자의 전사적 활성을 조절하는 NF- κ B의 핵내 이동을 세포질에서 억제하는 단백질인 I κ B- α 의 분해 정도를 확인하기 위하여 먼저 C6 교세포를 250 μ M ZnCl₂로 2시간 30분 동안 단독처리하여 각 시간별로 I κ B- α 의 변화를 관찰하여 처리전의 대조군 세포와

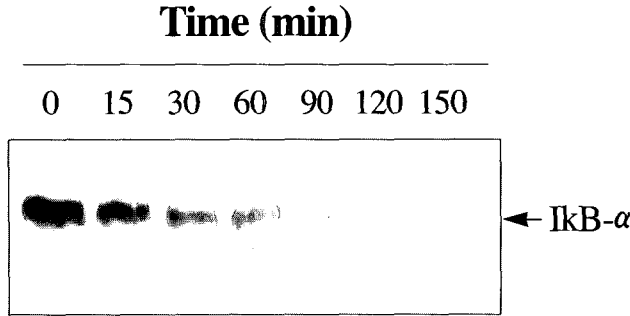


Fig. 5. Time-dependent degradation of IκB-α protein in zinc-induced C6 glial cells. Cells were treated with 250μM ZnCl₂ for indicated periods. Whole cell lysates were separated by 12.5% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with Anti-IκB-α antibody.

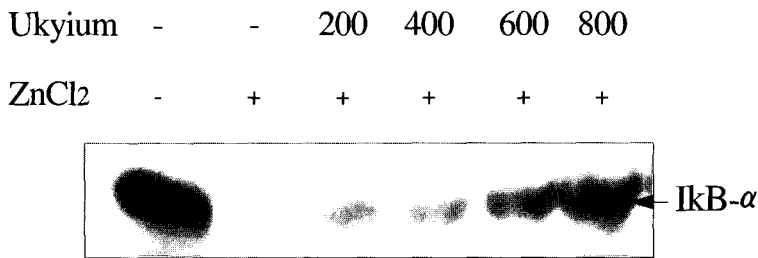


Fig. 6. Inhibition of zinc-induced IκB-α degradation by Ukyium in C6 glial cells. Cells were pretreated with various concentrations(200, 400, 600, 800μg/ml) of Ukyium and further incubated with 250μM ZnCl₂ for 2 hours. Whole cell lysates were separated by 12.5% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with Anti-IκB-α antibody.

비교한 결과, 처리시간이 경과함에 따라 IκB-α의 분해가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

또한, C6 교세포에 200, 400, 600, 800μg/ml 농도의 右歸飲을 각각 30분 동안 전처리한 후 250μM ZnCl₂를 2시간동안 처리하여 IκB-α의 변화를 관찰한 결과, 右歸飲의 처리 농도에 비례하여 IκB-α분해가 억제되었다(Fig. 6).

고 찰

노화는 형태적·기능적 퇴축, 예비력과 적응력의 저하로 사망에 귀착되는 보편적인 생리적 현상으로서 생체의 성숙 후에 일어나는 쇠퇴과정이다¹⁾. 특히, 뇌의 노화는 신경세포의 감수 및 위축을 비롯하여 신경원섬유의 엉킴(neurofibrillary tangle), 노인성 신경반(senile plaque), 과립공포변성(granulovacuolar

degeneration), Lewy소체 등이 출현하는 조직병리학적 변화 이외에도 cholinergic계, noradrenergic계, dopamine 등의 신경전달물질(neurotransmitters)의 감소와 aluminium 등의 금속이온 축적 등과 같은 생화학적 변화를 유발시키는 것으로 알려져 있다^{1,4)}.

한편, 한의학에서는 뇌에 대하여 《靈樞·海論篇》¹⁸⁾에 “腦爲髓之海”, 楊¹⁹⁾은 “腦是髓液聚集之處 稱爲髓海”라 하여 뇌를 髓液이 모이는 곳이라고 하였으며, 《靈樞·經脈篇》¹⁸⁾에서는 “人始生, 先成精, 精成而腦髓生”, 《素問·陰陽應象大論》¹⁹⁾ “腎生骨髓”, 《靈樞·本神篇》¹⁸⁾ “腎藏精 精舍神”, 張²⁰⁾은 “先天水火의 精氣에서 먼저 兩腎이 생하고 腎精이 上注하여 腦髓가 생한다”라고하여 腎精이 腦髓를 생성하는 근본물질이 되어 정신사고활동을 주관한다하였으며, 《靈樞·海論篇》¹⁸⁾에서 “髓海不足 則腦轉耳鳴, 脛痠眩冒, 目无所見, 懈怠安臥”, 《醫林改錯·腦髓論》²¹⁾에서 “小兒無記

性者 腦髓未滿 高年無記性者 腦髓漸空”이라하여 先天稟賦不足이나 年老體虛로 髓海가 부족해지면 신체의 운동장애와²²⁾, 기억력 손상 등의 정신사고장애를 동반한다 하였다²³⁾.

右歸飲은 明代 張²³⁾의 《景岳全書》에 “此益火之劑也 命門之陽衰陰勝者 宜此方加減主之”라고 처음 기재된 처방으로 補血滋陰하는 熟地黃과 補脾胃·益肺腎하는 山藥, 滋補肝腎·益精明目하는 枸杞子, 補肝腎·壯筋骨하는 杜庶, 補益肝腎·滋精斂汗하는 山茱萸, 回陽救逆·補火助陽·溫中止痛하는 附子, 溫中補陽·散寒止痛하는 肉桂, 補脾益氣·調和諸藥하는 甘草로 구성되어 있으며²⁴⁾, 주로 腎陽不足으로 命門火가 衰弱한 虛勞, 畏寒肢冷, 陽萎, 滑精, 腰膝酸軟 등의 증상에 활용되고 있을 뿐만 아니라^{13,14)} 溫補腎陽 填精補髓의 효능이 있으므로 腎精虧虛로 인한 건망, 치태 등 퇴행성 뇌질환에도 응용하고 있다^{23,25)}.

신경세포 손상기전 중 산소 유리기에 의한 손상은 정상적이거나 또는 비정상적인 뇌내의 변화에서 일련의 반응으로 생성되어지는 자유라디칼(free radical)에 의해 매개되어지고, 손상에 따른 질병이 자유라디칼 식세포(scavenger)에 의해 억제되어짐이 보고되고 있으며²⁴⁾, 활성산소에는 superoxide anion(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂), hydroxyl radical(OH⁻), lipid peroxide, nitric oxide(NO), peroxynitrite(ONOO⁻), thiol peroxy radical(RSOO⁻) 등이 속하고, 특히 H₂O₂는 상대적으로 안정되어 있으며 쉽게 세포막을 통과할 수 있어 신호전달물질로 적합하고, 여러 생체 조직에 손상을 일으킬 수 있는 독성물질로 이미 알려져 있어서 가장 주목을 받고 있다²⁵⁾.

한편, zinc은 체내에 필수적인 미량 원소로써 세포고사 조절의 중요한 인자로 작용하는데⁸⁾, zinc의 유입으로 인한 체내 독성 및 반응은 일차적으로 발생하는 면역계에서의 독성반응과 함께 zinc이 뇌신경세포에서 어떤 작용의 興否와 신경계 질환과의 관련이 관심의 초점이 되고 있으며, 뇌에서 zinc가 축적되고 뉴런과 다른 세포에 독성을 유발한다는 많은 보고들이 있다²⁶⁻²⁸⁾.

또한, 중추신경계에 존재하는 zinc이 허혈성 신경

세포 고사에 관여한다는 증거들이 보고되고 있는데¹²⁾, 즉 중추신경세포 말단에는 상당량의 zinc이 시냅스 소포체 안에서 존재하고 신경세포 활동과 함께 세포 밖으로 방출되는데, 방출된 zinc의 일부는 칼슘통과이온 통로를 통하여 시냅스 이후 신경세포로 이동하게 되고 이때 과다한 양의 zinc이 세포 내로 유입되면 세포고사의 원인이 된다^{10,29-31)}.

따라서, 본 研究에서는 신경교세포에서의 zinc에 의한 세포고사 유도를 확인하고 右歸飲의 세포고사에 미치는 영향을 알아보기 위해 C6 교세포에 ZnCl₂의 단독처리와 右歸飲과의 병행처리에 따른 세포생존율, 염색사 응축과 핵 분절, H₂O₂ 생성양, 고사를 매개하는 것으로 여겨지는 NF-κB 활성화 동반되는 IκB-α의 degradation을 관찰하였다.

먼저 ZnCl₂가 신경교세포에 미치는 세포독성과 右歸飲의 보호효과를 알아보기 위하여 ZnCl₂를 C6 교세포에 단독처리한 결과 처리시간과 농도에 비례하여 세포생존율이 감소하는 강한 세포독성을 보였으며, 右歸飲의 병행처리시에는 ZnCl₂ 단독처리시보다 세포생존율의 증가를 보여 ZnCl₂에 의한 세포독성으로부터 右歸飲이 세포를 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

위에서의 세포독성이 세포고사에 의한 현상인가를 확인하고, 이 과정에서의 右歸飲의 역할을 관찰하기 위해 ZnCl₂의 세포독성이 유도된 C6 교세포를 Hoechst 염색한 결과 ZnCl₂로 단독처리한 군에서는 세포고사의 전형적인 현상인 염색사 응축, 핵의 분절이 선명하게 보였고, 右歸飲을 병행처리한 군에서는 정상대조군과 별 차이없는 상태로 완전히 방어하고 있음을 알 수 있었다. 따라서, Marini³²⁾가 zinc는 뇌의 신경세포와 다른 세포에서 독성을 유발하여 DNA 분절현상을 보인다고 밝힌 것처럼 뇌에서 신경세포의 항상성을 유지시켜 주는 역할을 하는 신경교세포에서도 zinc는 염색사 응축과 핵의 분절 현상을 수반하는 세포고사를 유발시키고, ZnCl₂에 의한 C6 교세포의 세포독성은 세포고사에 의해 유도된 현상임을 확인할 수 있었으며, 또한 이 과정에서 右歸飲의 C6 교세포에 대한 보호 효과는 세포고사의 전형적인 형태

인 염색사의 응축과 핵 분절 현상을 방어하여 이루어짐을 알 수 있었다.

위에서의 zinc에 의한 세포고사 작용기전에 대하여 알아보기 위하여 C6 교세포의 ZnCl₂ 처리에 의한 H₂O₂ 생성 정도와 右歸飲의 효과를 관찰한 결과 ZnCl₂로 단독처리한 群에서는 대조군과 비교하여 278%의 H₂O₂를 생성하였고, C6 교세포에 대해 ZnCl₂는 처리시간과 농도에 비례하여 강한 세포독성을 보였으며, 실제 외부에서 H₂O₂를 C6 교세포에 직접 단독처리한 결과 처리농도에 비례하여 세포생존율이 감소하였는데, 이 결과들을 종합하면 세포독성이 H₂O₂ 같은 활성산소종에 의해 매개되고 있음을 나타내며, 또한 zinc가 세포내에서 활성산소종을 생성하여 세포에 산화성 손상을 초래한다³³⁾는 사실과 일치하는 것이다.

또한, 예비 실험 결과에서 GSH, NAC, PDTC 및 H₂O₂ 대사효소인 catalase와 같은 항산화제를 전처리시 ZnCl₂ 처리에 의한 세포생존율을 정상수준으로 회복시켰는데(결과는 보이지 않음) 본 연구에서도 右歸飲의 병행처리시 ZnCl₂에 의한 세포독성을 감소시켜 세포생존율의 증가를 보였으며, H₂O₂ 생성량은 ZnCl₂ 단독처리시와 비교하여 右歸飲의 병행처리시 대조군 수준으로 억제하였고, 세포생존율이 H₂O₂ 단독처리에 비해 右歸飲의 병행처리시 증가되었으므로 이것으로 유추하면 右歸飲이 H₂O₂ 같은 활성산소종에 의한 세포독성으로부터 세포를 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

위에서의 결과로 zinc에 의한 C6 교세포의 세포독성은 세포내 H₂O₂ 생성 증가로 인한 산화성 손상에 의하여 유도됨을 알 수 있으며, 이러한 세포손상 기전들의 작용들이 신경교세포 고사를 초래하여 신경계 질환들을 유발시키고, 右歸飲은 C6 교세포를 산화성 손상에 의한 세포고사로부터 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

유전자의 전사적 활성을 조절하여 세포고사를 신경세포나 신경교세포에서 직접적으로 유도하는 단백질인 NF-κB^{34,36)}의 활성화 여부를 확인하기 위하여 NF-κB 활성을 억제하는 단백질인 IκB-α의 분해정도를

를 ZnCl₂로 처리한 C6 교세포에서 관찰한 결과 시간이 경과함에 따라 IκB-α의 분해가 증가하였는데, 이 결과는 IκB-α의 분해가 증가하면 NF-κB가 핵내로 이동하여 nuclear factor를 활성화시키므로 zinc가 세포고사에 연관됨을 알 수 있었다. 또한, 위와 같은 ZnCl₂ 단독처리에 의한 IκB-α의 분해 정도는 右歸飲의 병행처리에 의해서 농도 의존적으로 억제되었는데, 이 결과로부터 右歸飲은 IκB-α의 분해를 감소시켜 NF-κB의 핵내 이동을 간접적으로 저지하여 ZnCl₂에 의한 C6 교세포의 고사로부터 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면 右歸飲은 C6 교세포의 ZnCl₂에 의한 세포고사에 수반되는 기전인 염색사 응축, 핵의 분절 현상, 산화성 손상, nuclear factor의 활성화 등에 관여하여 신경교세포를 보호하는 효과가 있음을 알 수 있으며 이외의 작용기전에 대하여는 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

右歸飲이 zinc에 의한 신경교세포의 고사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 C6 교세포에 ZnCl₂의 단독처리와 右歸飲과의 병행처리에 따른 세포생존율, H₂O₂의 활성, 염색사 응축과 핵분절, IκB-α 활성도를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 右歸飲은 농도 의존적으로 ZnCl₂에 의한 세포독성을 억제시켰다
2. 右歸飲은 ZnCl₂의 세포독성으로 인한 염색사 응축과 핵 분절 현상을 억제시켰다.
3. 右歸飲은 외부에서 가한 H₂O₂에 의한 세포독성을 억제시켰다.
4. 右歸飲은 농도 의존적으로 ZnCl₂에 의한 H₂O₂ 생성을 억제시켰다.
5. 右歸飲은 IκB-α의 degradation을 억제시켰다.

이상의 결과로 보아 右歸飲은 H₂O₂의 활성을 억제하고 IκB-α의 degradation을 억제시켜 신경교세포에

대한 보호 효과가 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 徐舜圭. 成人病·老人病學. 서울:고려의학. 1992:10-15,28-30,225-229.
2. 許沛虎. 中醫腦病學. 北京:中國醫藥科技出版社. 1996:10-23,139,461-463.
3. 趙鴻斌, 王雨亭. 心腦血管病中醫證治學. 北京:學術書刊出版社. 1990:370-372.
4. 김진수. Alzheimer's disease의 신경화학적 변화에 관한 고찰. 大韓神經科學會誌. 1985;3(1):10-15.
5. Behl C, Davis JB, Killer FG, Schubert D. Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res.* 1994;645:253-264.
6. McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV. MK-801 protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic neuronal damage. *Eur. J. Pharmacol.* 1987;140:359-361.
7. Ozyurt E, Graham DI, Woodruff GN, McCulloch J. Protective effect of the glutamate antagonist, MK-801 in focal cerebral ischemia in the cat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1988;8:138-143.
8. Gotz ME, A Freyberger, P Riederer. Oxidative stress:a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 1990;29:241-249.
9. Sunderman FW. The influence of zinc on apoptosis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1995;25:134-142.
10. Treves S, Trentini PL, Ascanelli M, Bucci G, Di Virgilio F. Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 1994;211:339-343.
11. Barbieri D, Troiano L, Grassilli E, Agnesini C, Cristofalo E, Monit D, Capri M, Cossarizza A, Franceschi C. Inhibition of apoptosis by zinc:A reappraisal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992;187:1256-1261.
12. Choi DW, Koh JY. Zinc and brain injury. *Annu. Rev. Neurosci.* 1998;21:347-375.
13. 張介賓. 景岳全書(下). 서울:大成文化社. 1988:416-417.
14. 王新華. 中醫歷代醫論選. 江蘇省:江蘇科學技術出版社. 1983:134-152.
15. 강인수, 이언정, 유지운. 右歸飲과 八味地黃湯煎蕩液 投與가 家腎臟機能 및 血漿 Aldosterone 濃도에 미치는 影響. 益山. 圓光大學校韓醫學研究所. 1992;2(1):65-85.
16. 金榮陸. 右歸飲이 Hydrocortisone 投與로 誘發된 家副腎皮質機能低下에 미치는 影響. 益山. 圓光大學校大學院. 1988.
17. 윤철호, 정지천. 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 腦과산화지질생성 및 활성산소 생성계 효소활성에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1995;16(2):65-85.
18. 楊維傑. 黃帝內經靈樞譯解. 서울:成輔社. 1980:87-88,104-105,196-197,271-272,280-283,397-398,415.
19. 楊維傑. 黃帝內經素問譯解. 서울:成輔社. 1980:2-3,6-8,36,52,90,269-270.
20. 張隱庵, 馬元臺. 黃帝內經靈樞. 臺北:臺聯國風出版社. 1986:73-74.
21. 王清任. 醫林改錯. 臺北:臺聯國風出版社. 1975:22-25.
22. 金完熙, 崔達英. 臟腑辨證論治. 서울:成輔社. 1985:286,319.
23. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울:南山堂. 1986:171-172,175-177,198-199,219,243-245,261-265.
24. Chan PH. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol.* 1994;4:59-64.
25. Sundaresan M, Yu ZY, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet derived growth Factor signal transduction. *Science.* 1995;270:296-299.
26. Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 1987;7:357-368.
27. Choi DW, Koh JY. Zinc and brain injury. *Annu. Rev. Neurosci.* 1998;21:347-375.
28. Yukiyo Fukamachi, Yuji Karasaki, Tsutomu Sugiura. Zinc suppress apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of the Bcl-2/Bax ratio. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;246:364-369.
29. Koh JY, Choi DW. Zinc toxicity on cultured cortical neurons:involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurosci.* 1994;60:1049-1057.
30. Koh J, Suh S, Gwag B, He Y, Hsu C, Choi D. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science.* 1996;272:1013-1016.
31. Weiss JH, Hartley DM, Koh JY, Choi DW. AMPA

- receptor activation potentiates zinc neurotoxicity. *Neuron*. 1993;10:43-49.
32. Dipasquale B, Marini AM, Youle RJ. Apoptosis and DNA degeneration induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;181:1442-1448.
33. Aruoma OL, Halliwell B, Hoey J, Butler L. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 1989;6:593-597.
34. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 1994;12:141-179.
35. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Ann. Rev. Immunol.* 1994;12:405-455.
36. Kasibhatla S, Genestier L, Green DR. Regulation of FasLigand expression during activation-induced cell death in T-lymphocytes via nuclear factor - κ B. *J. Biol. Chem.* 1999;274:987-992.