

加味補中益氣湯이 배양 척수감각신경세포의 LDH 활성도에 미치는 영향

이창호 · 권강범 · 박준수 · 송용선¹ · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 원광대학교 한의과대학 재활의학과

Effects of Gamibojungikki-tang on LDH activity of Cultured Spinal Sensory Neurons

Chang Ho Lee, Kang Beom Kwon, Jun Su Park, Yong Sun Song¹, Do Gon, Ryu*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,

1: Department of Oriental Rehabilitation Medicine, Collage of Oriental Medicine, Wonkwang University

In order to clarify the neuroprotective effect of Gamibojungikki-tang(GBJIKT) water extract on cultured mouse spinal sensory neuron damaged by glucose Oxidase (GO), NR (Neutral Red) assay and LDH (Lactate Dehydrogenase) activity assay were carried out after the cultured mouse spinal sensory neuron were preincubated with various concentrations of GBJIKT water extract for 3 hours prior to exposure of GO. Cell viability of cultured mouse spinal sensory neurons exposed to various concentrations of GO for 8 hours was decreased in a dose-dependent manner. NR₅₀ values were 50 mU/ml GO. Cultured mouse spinal sensory neurons in the medium containing various concentration of GO for 8 hours showed increasing of LDH activity. We knew that GO was toxic on cultured spinal sensory neurons. Pretreatment of GBJIKT water extract for 3 hours following GO prevented the GO-induced neurotoxicity such as increasing of LDH activity. These results suggest that GO shows toxic effect on cultured spinal sensory neurons and GBJIKT water extract is highly effective in proecting the neurotoxicity induced by GO.

Key words : Gamibojungikki-tang(加味補中益氣湯), Mouse Spinal Sensory Neuron, Glucose Oxidase, Neurotoxicity, Lactate dehydrogenase activity.

서 론

산소자유기는 치매를 비롯한 뇌허혈 및 뇌졸중과 같은 병변의 병인의 하나로 알려지고 있다^{1,2)}. 이같은 산소자유기는 정상적으로 인체의 대사중에 소량으로 만들어지며 이는 곧 catalase나 superoxide dismutase (SOD)와 같은 항산화효소에 의하여 분해되어 세포에 아무런 손상을 주지 않는다³⁾. 그러나 뇌허혈이나 근위축성측삭경화증과 같은 병변에서는 산소자유기가 과량으로 만들어져 뇌속에 축적되어 과량 축적된 산소자유기는 항산화효소의 활성감소를 초래하여 결국 세포를 사멸하게 된다^{4,5)}. 補中益氣湯은 그 적응증이 脾胃氣虛로 인한 食少, 疲勞, 畏寒, 自汗, 發熱, 脈虛大無力, 中氣下陷, 內臟下垂 및 不能攝血崩漏 등이다^{6,7)}. 補中益氣湯에 관한 실험적연구로 자궁 및 주위조직의 선택적 흥분

작용, 장운동운동의 평형적조절, hydrocortosone으로 유발한 陽虛證에 미치는 영향 등이 있으나⁸⁻¹⁰⁾ 산소자유기로 손상된 척수 감각신경세포에 대한 補中益氣湯의 방어효과를 관찰한 보고는 접할 수 없었다. 이에 저자는 산소자유기를 유발하기 위하여 GO를 배양한 척수감각신경세포에 처리한 후 세포독성을 NR assay를 이용하여 조사하였다. 補中益氣湯에 전신이 마비되는 氣虛에 加味되는 木瓜, 瓜蒌仁, 香附子, 靑皮, 防風, 川芎, 桂枝를 加味한 加味補中益氣湯이 산소자유기의 손상에 대하여 끼치는 방어효과를 관찰하기 위하여 加味補中益氣湯 전탕액을 배양 척수감각신경세포에 전처리 한 후 GO에 노출시켜 LDH activity를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강상태가 양호한 생쥐를 사용하였다.

* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

E-mail : tkryu@wonwang.ac.kr, Tel : 063-850-6846

· 접수: 2002/02/11 · 수정: 2002/03/11 · 채택 : 2002/04/02

2. 약재 제조 및 처리

1) 전탕액의 제조 및 처리

본 실험에서 사용된 加味補中益氣湯은 원광대학교 부속익산 한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였고, 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Gambojungikki-tang(GBJIKT)

韓藥名	生藥名	총重量(g)
黃芪(蜜炙)	Radix Astragali	16.8
人參	Radix Ginseng	11.2
白朮	Rhizoma Atractylodis Macrocephalae	11.2
甘草	Radix Glycyrrhizae	11.2
當歸身	Radix Angelicae Sinens	5.6
陳皮	Pericarpium Citri Reticulatae	5.6
升麻	Rhizoma Cimicifugae	33.6
柴胡	Radix Bupleuri	33.6
木瓜	Fructus Chaenomelis	11.2
烏藥	Radix Linderae	11.2
香附子	Rhizoma Cyperi	11.2
青皮	Pericarpium Citri Reticulatae Viride	11.2
防風	Radix Saphoshnikoviae	11.2
川芎	Rhizoma Chuanxiang	11.2
桂枝	Ramulus Cinnamomi	5.6
총 계		201.6

加味補中益氣湯 201.6g을 각각 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 42.74g의 분말 시료를 얻은 후 실험당일 적당한 양을 배양액에 첨가하여 사용하였다.

2) Glucose Oxidase (GO)의 제조 및 처리

본 실험에 사용한 glucose oxidase (GO, Sigma)는 100 mU/ml, 10 mU/ml, 1 mU/ml의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3. 세포배양

척수감각신경세포의 분리는 Michikawa 등¹¹⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생후 1~3일된 생쥐에서 적출한 척수조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 37℃, 5% CO₂/95%air로 조절된 항온기 내에서 배양하였다. 배양완료후 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 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양 후 본 실험에 사용하였다.

4. 세포독성 및 방어효과 검정

1) NR 정량

Neutral red(NR, Sinma)의 정량은 Borenfreud와 Puerner¹²⁾의 방법에 따랐다. 즉 여러 농도의 GO를 처리한 배양 신경세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5 mg/ml의 NR을 well당 최종 농도로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37℃, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 PBS로 3회 세척 후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 ELISA Leader(Molecular Device, USA) 로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

2) Lactate Dehydrogenase(LDH) 활성도 조사

LDH 활성도의 측정은 최적화된 LDH/LD procedure (Sigma Diagnostics)를 이용하여 하였으며 배양액의 일부를 사용하였다. 즉 phosphate buffer (pH 7.5)에 등몰농도의 NADH를 pyruvate로 환원시키는 반응을 이용한 것이다. 340nm의 흡광도의 감소율은 배양액의 LDH 활성도에 비례하게 됨을 이용하여 LDH 활성도를 측정한 방법이다.

5. 통계 처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 산소자유기의 독성효과 - 세포생존율 분석

배양중인 척수 감각신경세포를 Ca²⁺, Mg²⁺ free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 GO가 10 mU/ml에서 100 mU/ml까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 8시간 배양한 다음 이의 영향을 조사한 결과 10 mU/ml GO의 처리에서 세포의 생존율은 대조군100%에 비하여 78.7%로 나타났으며 25 mU/ml XO에서는 60.7%로 나타나 감소의 경향을 나타냈으나 유의성은 보이지 않았다. 그러나 50 mU/ml, 100 mU/ml GO에서는 대조군100%에 비하여 각각 49.2%(p<0.05), 36.1%(p<0.01)로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 1).

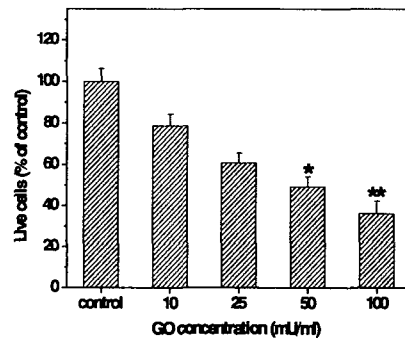


Fig. 1. Dose-dependency of glucose oxidase (GO). GO-induced neurotoxicity was measured by NR assay in mouse spinal sensory neurons. Cultured cells were treated with various concentrations of GO for 8 hours. The values are the mean±SE(n=6). Significant differences from the control are marked with asterisks (*p<0.05, **p<0.01).

GO가 배양시간에 따라 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 50 mU/ml GO 농도에서 1-12 시간 동안 배양 한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 조사한 결과 처리한 직후에는 대조군100%에 비하여 1시간 배양에서는 대조군100%에 비하여 84.3%로 나타났으며 4시간 배양에서는 77.1%로 나타나 세포 생존율이 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 그러나 8 시간 및 12 시간 배양에서는 대조군 100%에 비하여 각각 51.9% ($p<0.05$), 41.5%($p<0.01$)로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 2).

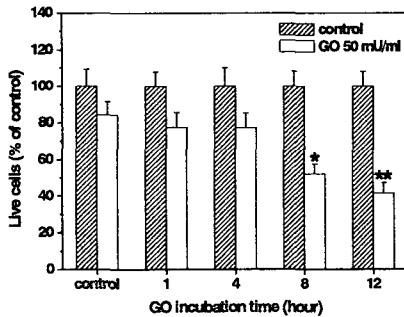


Fig. 2. Time-dependency of glucose oxidase (GO). GO-induced neurotoxicity was measured by NR assay in mouse spinal sensory neurons. Cultured cells were treated with 50 mU/ml GO for 1, 4, 8 and 12 hours, respectively. The values are the mean±SE(n=6). Significant differences from the control are marked with asterisks (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

2. GO의 독성에 대한 加味補中益氣湯의 효과 - LDH 정량

1) GO의 영향

GO의 농도에 따른 LDH 활성도를 측정하기 위하여 10~100 mU/ml의 GO가 각각 포함된 배양액에서 배양 척수감각신경세포를 8시간 동안 처리한 후 세포배양액내로 유출된 LDH양을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 10 mU/ml GO 처리에서는 대조군 100%(19.3±1.6 mmol/mg protein)에 비하여 112.6%로 나타났다. 또한 25 mU/ml GO 처리에서는 129.7%로 증가하는 경향을 나타냈으며 50 mU/ml GO, 100 mU/ml GO를 처리한 경우 각각 대조군에 비하여 155.0%($p<0.05$), 186.3%($p<0.01$)로 유의한 증가를 나타냈다. LDH활성도의 MCV(midcytotoxicity value)값은 50 mU/ml GO의 처리에서 나타났다(Fig. 3).

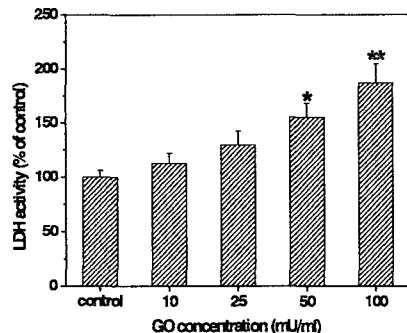


Fig. 3. Dose-dependency of glucose oxidase (GO). GO-induced neurotoxicity was measured by LDH assay in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with various concentrations of GO for 8 hours. LDH activity was measured at wavelength of 340nm. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks(* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

2) LDH 활성도에 대한 加味補中益氣湯의 영향

배양 척수감각신경세포에 대한 GO의 산화적 손상에 있어서 加味補中益氣湯의 방어효과를 LDH 활성도측면에서 조사하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 50 mU/ml GO 농도에서 8시간 동안 노출시키기 3 시간 전에 15-140 ug/ml 加味補中益氣湯 전탕액이 각각 포함된 배양액에서 처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 GO를 처리하지 않고 加味補中益氣湯 전탕액만을 농도별로 처리한 경우 대조군에 비하여 LDH 활성이 약간 감소하였으며 세포독성은 나타나지 않았다. 50 mU/ml GO만을 처리한 경우 GO를 처리하지 않은 대조군 100% (17.3±1.4 mmol/mg protein)에 비하여 256.1%로 LDH 활성도가 증가하여 세포독성을 나타냈다. 그러나 加味補中益氣湯 전탕액을 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 방어효과를 나타냈다. 특히 70 ug/ml, 140 ug/ml의 加味補中益氣湯 전탕액의 전처리에서는 대조군에 비하여 162.4% ($p<0.05$), 145.8%($p<0.01$)로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 4).

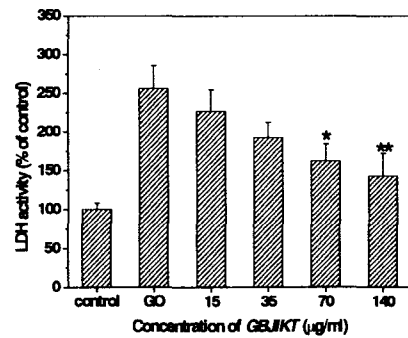


Fig 4. Dose-dependency of Gamibojungikki-tang(GBJIKT) in LDH activity. Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with 15, 35, 70 and 140 ug/ml GBJIKT. Cultured cells were preincubated with GBJIKT for 3 hours, after then cultures were exposed to 50 mU/ml GO for 8 hours. LDH activity was measured at wavelength of 340nm. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control group are marked with asterisks (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

고찰

補中益氣湯은 益氣升陽, 調補脾胃하는 기본적인 처방으로서 李東垣이 《脾胃論》에서 立方한 이후 광범위하게 임상적으로 응용되는 방제이며^{6,7)}, 그 적응증은 脾胃氣虛로 인한 食少, 疲勞, 畏寒, 自汗, 發熱, 脈虛大無力, 中氣下陷, 內臟下垂 및 不能攝血崩漏 등이다^{6,7)}. 산소자유기는 중추신경계를 비롯하여 말초신경계에 영향을 미쳐 근위축성척삭경화증이나 파킨스씨병과 같은 신경질환을 유발하는 병인으로 밝혀지고 있다¹³⁻¹⁵⁾. 이러한 산소자유기에 대하여 한약재가 방어효과가 있다는 보고가 되고 있다¹⁶⁻¹⁹⁾. 補中益氣湯의 적응증은 비위기허로 인한 食少, 疲勞, 畏寒, 自汗, 發熱, 脈虛大無力, 中氣下陷, 內臟下垂 및 不能攝血崩漏 등으로^{6,7)} 子宮 및 주위조직의 선택적 흥분작용, 장운동운동의 평형적조절, hydrocortisone으로 유발한 陽虛症에 미치는 영향 등에 대한 실험적 보고가 있다⁸⁻¹⁰⁾. 이러한 補中益氣湯에 전신이 마비되는 氣虛證에 加味되는 木瓜, 烏藥, 香附子, 陳皮, 防風, 川芎, 桂枝를 加味한 加味補中益氣湯을 검액으로 行氣通絡시키는 효능을

증가시켜 본 실험에 사용하였다.

본 실험은 Panayiotidis 등의 보고²⁰⁾에 근거하여 GO를 처리하여 유발된 산소자유기가 세포에 독성을 나타내는지 NR assay를 이용하여 관찰하였으며 加味補中益氣湯의 방어효과를 관찰하기 위하여 加味補中益氣湯 전탕액을 배양 척수감각신경세포에 3시간 동안 전처리한 다음 GO에 8시간 동안 노출시킨 후 LDH 활성도 측면에서 관찰하였다. 또한, GO의 세포독성의 유발여부를 관찰하기 위하여 여러농도의 GO가 포함된 배양액에서 척수감각신경세포를 1-12시간 동안 배양한 후 NR 분석법에 의하여 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 GO의 처리농도에 비례하여 유의하게 세포의 생존율이 감소하였다(Fig. 1-2). 특히 NR 분석법에서 50 mU/ml GO에서 8시간 동안 처리에서 MCV값(midcytotoxicity value)이 나타났다. 그리고 GO의 산화적 손상에 대한 加味補中益氣湯 전탕액의 효과를 조사하기 위하여 생쥐에서 순수분리하여 배양한 척수감각신경세포에 GO를 처리한 후 加味補中益氣湯 전탕액의 효과를 LDH 활성도 측면에서 조사한 결과 GO는 배양 척수감각신경세포에 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 증가하여 세포에 독성을 나타냈으며 30 mU/ml MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다(Fig. 3). 그리고 30 mU/ml GO를 8시간 동안 감각신경세포에 처리하기 전 15-140 ug/ml의 加味補中益氣湯 전탕액이 각각 포함된 배양액에서 3시간 동안 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 GO에 의해 증가한 LDH 활성도가 감소하여 방어효과를 나타냈다. 특히 70 ug/ml, 140 ug/ml 加味補中益氣湯 전탕액의 처리에서는 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 4).

이 같은 실험 결과를 종합해보면, 加味補中益氣湯 전탕액이 GO와 같은 산소자유기의 산화적 손상에 의한 척수감각신경세포 독성에 대하여 효과적으로 방어하여 LDH 활성도의 감소를 보여 주었다. 이러한 결과는 加味補中益氣湯이 산화적 손상에 의한 LDH 활성도의 증가를 유의하게 방어하는 효과가 있음을 시사한다. 앞으로 이에 대한 기전적인 연구가 필요하리라 사료된다.

결 론

加味補中益氣湯이 산소자유기에 의한 신경독성을 방어하는 효과를 구명하기 위하여 생생 흰쥐에서 분리 배양한 척수감각신경세포를 여러농도의 Glucose oxidase(GO)가 포함된 배양액에 加味補中益氣湯 전탕액을 3시간 동안 전처리한 다음 加味補中益氣湯이 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 관찰하였다.

GO는 척수 감각신경세포에 처리한 농도에 비례하여 세포의 생존율을 현저히 감소시켰으며 LDH 활성도의 증가를 통하여 세포에 독성을 나타냈다. 加味補中益氣湯 전탕액을 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 GO에 의하여 유발된 LDH 활성도의 증가를 유의하게 방어하였다.

이상의 결과로서 GO는 생생백서로부터 분리한 배양 척수감각신경세포에 신경독성을 보였으며 加味補中益氣湯은 이러한 신경독성에 대하여 방어효과를 나타냄으로서 항산화제로서의 기능으로 연구될수 있는 가능성을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2001-1-20500-018-1) 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- Williams P. L., Burson J. L. : Industrial Toxicology. Van Nostrand Reinhold (eds). pp.197-210, 1985.
- Rosen D, Sidique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362:59-62, 1993.
- Hussain T, Shukla GS, Chandra SV : Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats in vivo and in vitro studies. Pharm Toxicol 60:355-359, 1987.
- Saez JC, Kessler JA, Bennett MVL, Spray DC : Superoxide dismutase protects cultured neurons against death by starvation. Proc Natl Acad Sci USA 84:3056-3059, 1987.
- Warner BB, Wispe JR : Free radical-mediated diseases in pediatrics. Perinatol Seminar 16:47-57, 1992.
- 鄭光油 : 東垣學說論文集, 北京, 人民衛生出版社, pp.13-24, 178-182, 1983.
- 李東垣 : 東垣十種醫書, 서울, 大星文化社, p.467, 1983.
- 金吉藍 : 운동부하후 피로회복에 미치는 補中益氣湯 및 六味地黃湯의 效果, 慶熙大學論文集 7:121, 1984.
- 이태호 : 양허증유발에 의한 보중익기탕 및 육미지황탕의 효과, 동의병리학회지 2:12, 1987.
- 김영수, 권강범, 민영기, 조현익, 박준배, 이호섭, 류도곤 : 장원환이 XO/HX에 의해 손상된 대뇌피질 신경세포에 미치는 영향. 대한한의학회지 20(4):3-10, 2000.
- Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J Neurosci Res 37:62~70, 1994.
- Borenfreund E., Puerner J. A., : A Simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). J. Tiss. Cult. Meth., 9:7-9, 1984
- Conradi, S., Ronnevi, L., Norris, F. : Amyotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP(ed) : Human Motor Neuron Diseases. New York Raven Press. pp. 35-56, 1982.
- Difazio, M. C., Hollingsworth, Z., Young, A. B., Penny, J.B : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. Neurology. 42:402 1992.
- Rosen, D., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J. O., Regan, J., Deng, H., Rahmani, Z., Krizus, A. : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial

- amyotrophic lateral sclerosis. *Nature (London)*. p. 362, 1993.
16. 양경석, 신선호 : 소풍활혈탕 전탕액이 XO/HX에 의해 손상된 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향. *대한한의학회지* 21(1):29-39, 2000.
 17. 최환석, 권강범, 이호섭, 류도곤 : XO/HX에 의해 손상된 배양 척수감각신경세포에 미치는 가미십전대보탕의 효과. *동의생리학회지* 15(1):67-72, 2001.
 18. 권영달, 정상필, 송용선, 류도곤 : 부자반하탕 전탕액이 H₂O₂에 의해 손상된 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향. *동의생리학회지* 15(1):143-149, 2001.
 19. 손창식, 권강범, 김상범, 이호승, 이호섭, 서은아, 류도곤 : 단삼음 전탕액이 심근세포 박동수에 미치는 영향. *동의생리학회지* 15(2):241-245, 2001.
 20. Mihalis P, Orestes T, Dimitrios G : Glucose oxidase-produced H₂O₂ induces Ca²⁺-dependent DNA damage in human peropheral blood lymphocytes. *Free Radical Biology & Medicine* 26:548-556, 1999.