

# 鎮肝熄風湯 및 加味鎮肝熄風湯 추출물이 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향

서영석\* · 윤상학 · 염승룡 · 이수경 · 신병철 · 권영달 · 송용선

원광대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

## Effects of Jingansikpung-tang and Gamijingsikpung-tang Water Extract on the Cultured Spinal Sensory Neurons

Young Suk Seo\*, Sang Hak Yun, Seung Ryong Yeom, Su kyung Lee, Byung Cheul Shin, Young Dal Kwon, Yung Sun Song

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

To evaluate the mechanism of oxidative damage by Xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX)-induced oxygen radicals, XTT assay was carried out. Neurofilament EIA and PKC activity were measured to evaluate the protective effect of Jingansikpung-tang(JST) and Gamijingsikpung-tang(GJST) water extract on cultured spinal sensory neurons damaged by XO/HX, after the cultured mouse spinal sensory neurons were preincubated with various concentrations of JST and GJST water extract for 3 hours prior to exposure of XO/HX. The results were XO/HX decreased significantly, in proportion to concentration and exposed time, the survival rate of the cultured mouse sensory neurons on XTT assay. And in proportion to concentration and exposed time on cultured spinal sensory neurons, XO/HX showed the quantitative decrease of neurofilament by EIA, increase of PKC activity, but JST and GJST showed the neuroprotective effects against decrease of neurofilament and increase of PKC activity by XO/HX. From the above results, it is concluded that XO/HX have a neurotoxic effect on cultured spinal sensory neurons and the herbs water extract, such as JST and GJST prevent the toxicity of XO/HX effectively.

Key words : Jingansikpung-tang(鎮肝熄風湯), Gamijingsikpung-tang(加味鎮肝熄風湯), XTT, Neurofilament, XanthineOxidase(XO), Hypoxanthine(HX), PKC activity

### 서 론

척수는 뇌와 함께 중추신경계를 구성하고 있으며, 말초에서 중추까지의 지각전달은 상행성 전도로를 통하여 이루어지고, 중추에서 말초로의 운동전달은 하행성 전도로를 통하여 전해진다. 척수의 손상은 운동, 감각, 자율신경 흥분의 전달에 장애를 야기시키는데, 특히 지각 전도로의 장애는 감각의 소실과 함께 사지의 통증 및 운동의 부조화를 일으키게 된다<sup>1-2)</sup>. 신경계의 손상은 산소자유기(oxygen free radical), 글루타민산 등의 각종 독성물질에 의하는데<sup>3-5)</sup>, 특히 산소자유기는 중추신경세포나 말초신경세포에 산화적 손상을 일으켜 파킨슨병과 같은 신경병변을 유발하는 병리적 요인으로 밝혀졌다<sup>6-8)</sup>. 최근에 이러한 산소자유기의 산화적 손상에 대하여 각종 한약재가 항산화작용을 나타낸다는

연구 보고들이 있다<sup>9-13)</sup>. 신경조직의 손상으로 나타나는 이러한 통증이나 마비감은 한의학적으로 痺證이나 痲木의 범주에 속한다고 할 수 있다<sup>14)</sup>. 痺證은 風, 寒, 濕의 邪氣가 인체 표면과 經絡에 침범하여 氣血運行에 장애가 생겨 肢體, 筋肉, 關節 등에 疼痛, 酸澀, 痲木, 重着, 腫脹, 屈伸不利와 관절종창 등의 증상이 나타나는 것을 말하며<sup>15)</sup>, 痲木은 肌部 知覺이 소실되어 痛痒을 알지 못하는 것이다<sup>16)</sup>. 鎮肝熄風湯은 清代末期 張錫純의 《醫學衷中參書錄》에 최초로 수록된 이후 주로 肝風內動, 肝陽上亢으로 인한 中風, 痺證, 痲木 등에 활용해 오고 있다<sup>17-20)</sup>.

이에 저자는 鎮肝熄風湯 및 鎮肝熄風湯에 木瓜, 海桐皮, 蒺藜를 첨가한 加味鎮肝熄風湯이 척수감각신경세포 손상에 미치는 영향을 구명하기 위하여 XO/HX에 의한 배양 척수감각신경세포의 산화적 손상정도를 XTT assay로 조사하였으며, 鎮肝熄風湯과 加味鎮肝熄風湯 추출물의 방어효과 구명을 위하여 PKC(protein kinase C) 활성도, 신경세사 등을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

\* 교신저자 : 서영석, 서울시 광진구 구의 3동 200-2, 다남한의원  
· E-mail : naturalm@kornet.net, Tel : 02-455-7217  
· 접수 : 2003/01/27 · 수정 : 2003/03/06 · 채택 : 2003/03/25

## 실 험

### 1. 재료

#### 1) 동물

본 실험에 사용한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강해 보이는 생쥐를 사용하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용한 鎮肝熄風湯의 처방내용은 《醫學衷中參書錄》<sup>17)</sup>에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였고, 鎮肝熄風湯, 加味鎮肝熄風湯 각각의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1, 2).

Table 1. Prescription of Jingansikpung-tang (JST)

herbal name	pharmacognostic name	weight(g)
牛 膝	<i>Radix Achyranthis</i>	10
代 磁 石	<i>Haematitum</i>	10
龍 骨	<i>Fossilia Osis Mastodi</i>	6
牡 蠣	<i>Concha Ostreae</i>	6
龜 板	<i>Carapax Testudinis</i>	6
白 芍 藥	<i>Radix Paeoniae Lactiflorae</i>	6
玄 麥	<i>Radix Scrophulariae</i>	6
天 門 冬	<i>Radix Asparagi</i>	6
川 棘 子	<i>Fructus Meliae Tooserdan</i>	2
麥 芽	<i>Fructus Hordei Germinatus</i>	2
茵 陳	<i>Herba Artemisiae Capillaris</i>	2
甘 草	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	1.5
total amount		63.5

Table 2. Prescription of Gamijingsikpung-tang (GJST)

herbal name	pharmacognostic name	weight(g)
牛 膝	<i>Radix achyranthis</i>	10
代 磁 石	<i>Haematitum</i>	10
龍 骨	<i>Fossilia Osis Mastodi</i>	6
牡 蠣	<i>Concha Ostreae</i>	6
龜 板	<i>Carapax Testudinis</i>	6
白 芍 藥	<i>Radix Paeoniae Lactiflorae</i>	6
玄 麥	<i>Radix Scrophulariae</i>	6
天 門 冬	<i>Radix Asparagi</i>	6
川 棘 子	<i>Fructus Meliae Toosendan</i>	2
麥 芽	<i>Fructus Hordei Germinatus</i>	2
茵 陳	<i>Herba Artemisiae Capillaris</i>	2
甘 草	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	1.5
木 瓜	<i>Fructus Chaenomelis</i>	6
海 桐 皮	<i>Cortex Erythrinae</i>	6
蓼 蘆	<i>Herba Siegesbeckiae</i>	6
total amount		81.5

### 2. 방법

#### 1) 검액의 조제

鎮肝熄風湯 203.2g, 加味鎮肝熄風湯 203.75g을 각각 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압 농축

한 후 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 각각 46.04g, 40.62g의 분말 시료를 얻었다.

#### 2) 시약 제조

본 실험에 사용한 약제로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypoxanthine(HX, Sigma)로서 XO는 100mU/ml, 10mU/ml, 1mU/ml의 저장액을, HX의 경우 1M, 100mM, 10mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

#### 3) 세포 배양

척수감각신경세포의 분리는 Michikawa 등의 방법<sup>21)</sup>에 따라 시행하였다. 즉 생후 3일된 생쥐에서 적출한 척수조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36℃, 5% CO<sub>2</sub>/95%air로 조절된 항온기 내에서 배양하였다. 배양 완료 후 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 3×10<sup>6</sup>cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양후 본 실험에 사용하였다.

#### 4) 산소자유기 처리

산소자유기가 생쥐의 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 척수감각신경세포를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 1~200mU/ml xanthine oxidase(XO)에 0.1~50mM hypoxanthine(HX)을 여러 농도로 조합하여 혼합한 다음 이들 각각의 배양액에서 1~24시간 동안 처리한 후 분석하였다.

#### 5) 세포독성 및 방어효과 검정

##### (1) 세포생존율 분석 - XTT 정량

XTT(Sigma)의 定量은 약제를 처리한 배양 신경세포를 Triton-X로 3회 세척 후, 전날 제조한 50μg/ml의 XTT를 well당 0.1ml씩 넣은 다음에 cooking foil로 싸서 빛을 차단한 후 5시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 배양한다. 배양 완료 후 spectrophotometer로 530nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사한다. XTT assay는 530nm에서 빛의 흡수량에 비례하여 세포의 생존율을 측정하는 분석법이다.

##### (2) 한약추출물의 방어효과 검정

###### ① TNF-β 측정

TNF-β에 대한 산소자유기와 한약추출물의 영향을 조사하기 위하여 여러 농도의 TNF-β를 산소자유기나 한약추출물과 병합 처리한 후 척수후근신경절 세포에 미치는 TNF-β의 활성을 세포 생존율 측면에서 조사하였다.

###### ② PKC 활성 측정

PKC의 정량 측정은 XO/HX나 한약재를 일정시간 동안 처리한 신경세포를 Hu 등의 방법<sup>22)</sup>에 따라 시행하였다. 즉 Tris-HCl 완충액(50mM)과 합성 peptide를 포함한 반응액에 효소를 가하여 25℃에서 15분간 반응시킨 다음 50 ul를 취하여 P81 종이에 옮겨 건조시켰다. 건조가 완료된 후 75mM 인산염액으로 세척한 다음 섬광계수기에 의하여 측정하였다.

③ Neurofilament 효소면역 정량

배양중인 신경세포를 PBS로 3회 세척하여 알코올로 고정시킨 다음 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료후 NE14(1:100, Sigma)로 1시간 동안 반응시킨 후 0.04% O-phenylenediamine(OPD, Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide로 처리한 다음 Dynatech Microelisa reader로 490nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

6) 통계 처리

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

성 적

1. 산소자유기의 독성효과

1) 세포 생존율 분석 - XTT 정량

XO가 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 XO가 10mU/ml에서 70mU/ml까지의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 5시간 동안 배양한 후 XO의 독성효과를 XTT assay법에 의하여 조사한 결과 10mU/ml XO 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 72.3%로 나타났으며 30mU/ml의 처리에서는 61.7%로 나타났다. 그러나 50, 70mU/ml XO를 처리한 경우 세포 생존율은 각각 48.9%(p<0.05)와 31.9%(p<0.01)로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났다(Fig. 1).

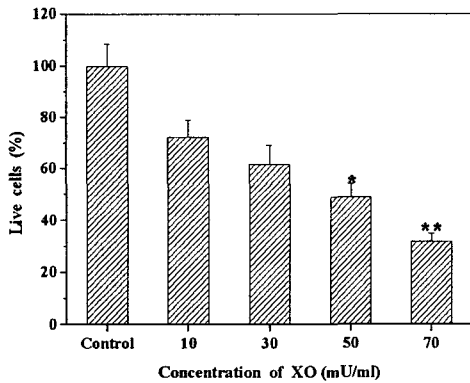


Fig. 1. Dose-response relationship of XO in cultured mouse spinal sensory neurons.

XO/HX가 시간에 따라 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 50 mU/ml XO/0.1 mM HX가 포함된 배양액에서 척수감각신경세포를 각각 1~4시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 XTT assay법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 1시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 76.2%의 세포생존율을 보였다. 또한 2시간 배양에 있어서는 70.7%로 대조군보다 다소 낮게 나타났으며 3시간 배양에서는 대조군에 비하여 52.8%(p<0.05), 4시간 배양에서는 42.9%(p<0.01)로 각각 나타났다(Fig. 2).

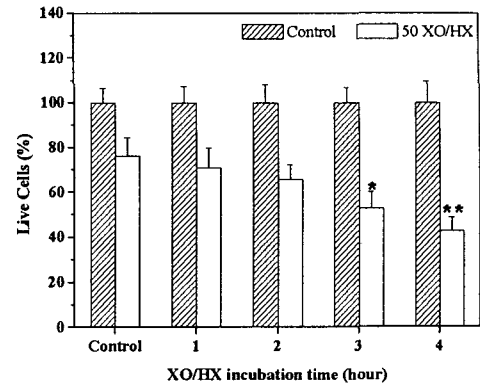


Fig. 2. Time-dependency of XO and HX in cultured mouse spinal sensory neurons.

2. 한약추출물의 효과

1) XO/HX/TNF-β의 독성에 대한 방어효과

XO/HX/TNF-β에 의하여 손상된 배양 척수감각신경세포에 대한 효과를 세포생존율의 측면에서 조사하기 위하여 10mU/ml XO/HX/TNF-β 1.5ng/ml의 농도에서 배양 척수감각신경세포를 3시간 동안 노출시키기 3시간 전에 5~100μg/ml 鎮肝熄風湯과 加味鎮肝熄風湯 추출물이 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후의 방어효과를 XTT assay법으로 조사하였다.

鎮肝熄風湯의 경우 5μg/ml의 농도로 처리한 경우 대조군(100%)에 비하여 74.2%로 XO/HX/TNF-β를 처리한 군(63.6%)에 비하여 세포의 생존율을 증가시켰으며 특히, 25μg/ml, 50μg/ml, 100μg/ml을 처리한 경우 세포의 생존율은 각각 82.8%(p<0.05), 89.3%(p<0.05), 90.0%(p<0.01)로 XO/HX/TNF-β를 처리한 군(63.6%)에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다(Fig. 3). 加味鎮肝熄風湯의 경우 5μg/ml을 처리한 경우 대조군(100%)에 비하여 75.8%로 XO/HX/TNF-β를 처리한 군(54.8%)에 비하여 세포의 생존율을 증가시켰으며 특히, 25μg/ml, 50μg/ml, 100μg/ml을 처리한 경우 세포의 생존율은 각각 80.0%(p<0.05), 90.6% p<0.01), 93.5%(p<0.01)로 XO/HX/TNF-β를 처리한 군(54.3%)에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다(Fig. 3).

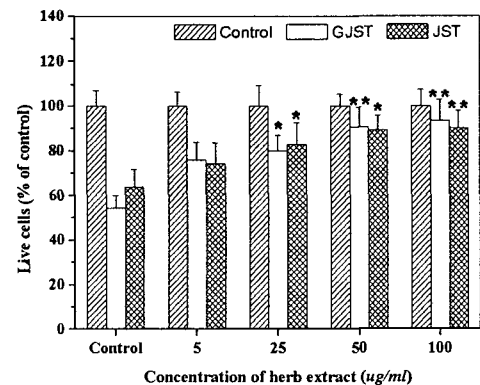


Fig. 3. Dose-response relationships of JST and GJST for their neuroprotective effects on XO/HX/TNF-β induced cell viabilities in the spinal sensory neurons.

2) PKC 활성도에 대한 방어효과

鎮肝熄風湯의 경우 80 $\mu$ g/ml을 처리한 경우 대조군(100%)에 비하여 131.8%(p<0.01)로 XO/HX를 처리한 군(172.0%)에 비하여 PKC 활성도가 유의하게 감소하였으며, 加味鎮肝熄風湯의 경우 80 $\mu$ g/ml을 처리한 경우 대조군(100%)에 비하여 125.0%(p<0.01)로 XO/HX를 처리한 군(172.0%)에 비하여 PKC 활성도가 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

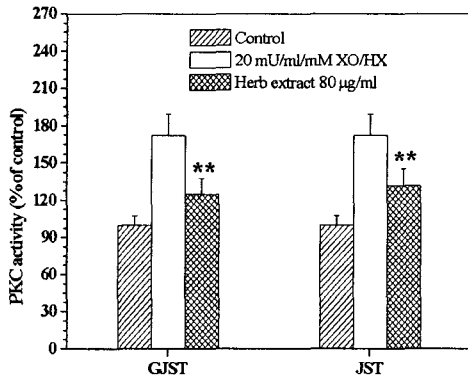


Fig. 4. Effects of JST and GJST for their neuroprotective effect on XO/HX in PKC activity on cultured spinal sensory neurons.

3) 신경세사(Neurofilament)의 양적변화에 대한 방어효과

鎮肝熄風湯의 경우 30 $\mu$ g/ml을 처리한 경우 대조군(100%)에 비하여 76.4%로 XO/HX를 처리한 군(55.0%)에 비하여 신경세사의 양을 증가시켰으며 특히, 40 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 60 $\mu$ g/ml 鎮肝熄風湯을 처리한 경우 신경세사의 양은 각각 84.4%(p<0.05), 86.7%(p<0.05), 91.3%(p<0.01)로 XO/HX를 처리한 군(55.0%)에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 5). 加味鎮肝熄風湯의 경우 30 $\mu$ g/ml을 처리한 경우 대조군(100%)에 비하여 83.1%(p<0.05)로 XO/HX를 처리한 군(65.6%)에 비하여 신경세사의 양을 유의하게 증가시켰으며 특히, 40 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 60 $\mu$ g/ml 加味鎮肝熄風湯을 처리한 경우 신경세사의 양은 각각 90.1%(p<0.01), 92.7%(p<0.01), 93.9%(p<0.01)로 XO/HX를 처리한 군(65.6%)에 비하여 유의한 신경세사의 양의 증가를 나타냈다(Fig. 5).

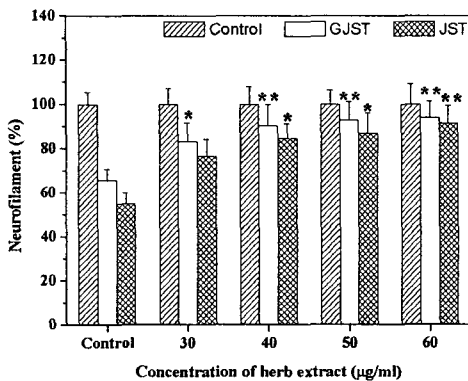


Fig. 5. Dose-response relationship of JST and GJST for their Neuroprotective Effects on XO and HX in Neurofilament.

고찰

척수는 뇌와 함께 중추신경을 구성하며 인체의 모든 운동과 지각을 담당하는 신경조직의 일종이다. 척수가 손상되면 감각소실과 함께 동통, 운동장애 등이 발생된다<sup>1,2)</sup>. 이러한 척수신경계에 병변을 일으키는 질환으로는 척수염, 척수압박증, 척수변성질환, 척수손상, 다발성경화증 등이 있으며, 대부분 肢體疼痛, 감각장애 및 운동기능의 악화를 초래하는데<sup>23,24)</sup>, 이는 한의학에서 痺證이나 痲木에 해당한다고 볼 수 있다<sup>14)</sup>. 痺證은 風寒濕의 邪氣가 인체의 虛함을 타고 침입하여 氣血運行이 順暢하지 못하여 經絡이 阻滯되어 일어나는 질환으로서, 지체, 筋肉, 關節 등에 疼痛, 酸澀, 痲木, 重着, 腫脹, 屈伸不利, 關節腫脹 등의 증상이 나타나는 것을 말한다. 西洋醫學의으로는 류마티스 관절염, 통풍, 골질증식성질병, 폐색성 혈전혈관염, 경피증 등의 질병이 痺證과 밀접한 관계가 있다. 또한 痺證은 氣血不通하여 발생하므로 宣通시켜 氣血과 榮衛가 順行하도록 하여 치료한다<sup>15)</sup>. 痲木은 肌部 知覺이 소실되어 痛痒을 알지 못하는 것<sup>16)</sup>으로 七情, 濕邪 등으로 인한 營衛氣의 不行이 그 원인이 된다고 하였고 痲는 氣虛로 木은 濕痰死血에 의한 것으로 구분하였다<sup>25,26)</sup>. 痺證과 痲木은 모두 肢體의 感覺低下의 증상을 나타낼 수 있어 脊髓神經細胞 損傷과 유사하다.

鎮肝熄風湯은 清末 張錫純의 《醫學衷中參書錄》에 최초로 수록된 처방으로 頭目時常眩暈, 或肢體漸覺不利, 或口眼漸形歪斜, 或面色如醉, 甚或眩暈, 至于癱仆, 昏不知人, 移時始醒, 或醒後不能復原, 精神短少, 或肢體痿廢, 或成偏枯 등의 中風, 痺證, 痲木을 치료할 목적으로 사용하고 있다<sup>17)</sup>. 鎮肝熄風湯은 牛膝, 代赭石, 龍骨, 牡蠣, 龜板, 玄蔘, 天門冬, 白芍藥, 茵陳, 川棟子, 麥芽, 甘草로 구성되어 있는데, 이들 구성 약물들을 살펴보면, 牛膝은 引血下行하여 肝陽上亢을 막고, 代赭石, 龍骨, 牡蠣은 平肝潛陽하며, 龜板, 玄蔘, 天門冬, 白芍藥을 사용하여 滋陰養液하고, 茵陳, 川棟子, 麥芽를 사용하여 肝의 逆氣를 가라앉히게 하였다<sup>27,28)</sup>. 加味鎮肝熄風湯은 鎮肝熄風湯에 木瓜, 海桐皮, 蒺藜를 첨가한 처방으로 木瓜는 舒筋活絡하는 효능으로 濕痺, 腳氣病 등을 치료한다. 海桐皮는 祛風濕, 通經絡하여 風濕痺痛 등을 치료하는데 사용되며, 蒺藜는 祛風濕, 利關節, 降血壓하는 효능으로 四肢痲痺, 關節痛, 筋肉痛, 高血壓 등을 치료하는데 항염작용과 강혈압작용이 보고되고 있다<sup>29)</sup>. 즉 加味鎮肝熄風湯은 鎮肝熄風湯에 祛風濕하는 효과를 가진 木瓜, 海桐皮, 蒺藜를 가미하여 肢體疼痛, 感覺障礙 등을 나타내는 痺證에 더 강한 효과를 나타낼 수 있도록 한 처방이라고 할 수 있다. 최근 한약추출물을 비롯한 천연추출물들이 산화적 손상에 의하여 유발되는 신경 질환에 효과적이라는 결과가 많이 보고되어지고 있다<sup>9-13)</sup>. 鎮肝熄風湯은 GO에 의해 손상된 배양척수감각신경세포에 대한 방어효과에 관한 보고<sup>12)</sup>가 있었고, 加味鎮肝熄風湯은 XO/HX에 의해 손상된 배양척수운동신경세포에 미치는 영향은 보고되었으나<sup>13)</sup>, 加味鎮肝熄風湯이 배양척수감각신경세포의 손상에 미치는 영향은 아직 보고되지 않았다. 이에 저자는 鎮肝熄風湯에 木瓜, 海桐皮, 蒺藜를 첨가한 加味鎮肝熄風湯의 산소자유기의 산화적 손상에 의하여 유발되는 감각신경장애에 대한 영향을 조사하기 위하여 생쥐의

배양척수감각신경세포에 XO/HX를 처리한 후 XTT assay를 비롯하여 신경세사 합성량과 PKC 활성화 등을 측정하여 그 방어 효과를 관찰하였다.

한편 산소자유기는 중추신경계와 말초신경계에 영향을 미쳐 각종 신경질환을 유발하는 것으로 밝혀지고 있다<sup>6,9)</sup>. 이러한 산소자유기의 신경독성효과를 조사하기 위하여 생쥐의 척수조직으로부터 순수 분리하여 배양한 척수감각신경세포를 여러 농도의 XO나 XO/HX에 노출시킨 후 XTT 정량분석을 시행한 결과 산소자유기의 처리농도와 노출시간에 비례하여 세포의 생존율은 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다. XTT assay법에서 50mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 3시간 동안 처리에서 MCV(midcytotoxicity value)값을 나타내었다(Fig. 1~2). 이러한 결과는 산소자유기가 척수감각신경세포에 세포독성을 가지고 있다는 것을 증명하는 것이다. XO/HX/TNF- $\beta$ 에 대한 한약추출물의 영향에 대한 조사를 위하여 XO/HX/TNF- $\beta$  10mU/ml/mM XO/HX와 1.5ng/ml TNF- $\beta$ 에서 신경세포를 3시간 동안 처리하기 3시간 전에 5~100 $\mu$ g/ml 眞肝熄風湯, 加味眞肝熄風湯이 각각 포함된 배양액에서 배양후 세포생존율을 조사하였다. 眞肝熄風湯의 경우 25, 50, 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 유의한 방어효과를 나타냈으며 加味眞肝熄風湯의 경우에서도 25, 50, 100 $\mu$ g/ml에서 유의한 방어효과를 나타냈다(Fig. 3). 이는 眞肝熄風湯과 加味眞肝熄風湯이 XO/HX/TNF- $\beta$ 에 의한 독성효과를 방어함을 나타낸다고 할 수 있다. 腦虛血이나 저산소 시 산소자유기에 의한 세포고사의 기전으로, 산소자유기는 phosphoinositide-specific phospholipase C PI-PLC를 활성화시키고 이러한 결과로 생성된 diacylglycerol (DAG)이 calcium-phospholipid dependent PKC를 활성화시키는데, 더욱이 PKC의 활성화는 세포내 c-fos gene의 발현을 유도케하여 세포의 枯死를 촉진시키며, 그 외에도 투과성의 증가를 비롯하여<sup>30,31)</sup> 세포증식의 변화 및 성장인자와 호르몬조절 등에 影響을 미친다고 보고되고 있다<sup>32)</sup>. 그리고 PKA나 PKG는 cAMP와 cGMP를 활성화시키는데, 한편 PKC도 cAMP를 활성화시킨다는 주장이 대두되면서 이에 대한 관심이 높아가고 있다<sup>33,34)</sup>. XO/HX가 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향과 이에 대한 眞肝熄風湯, 加味眞肝熄風湯의 방어효과를 PKC 활성도를 이용하여 조사한 결과 XO/HX는 PKC 활성도를 증가시켰으며 眞肝熄風湯과 加味眞肝熄風湯 전처리군에서 XO/HX에 의한 PKC 활성도의 증가를 방어하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 한약재와 XO/HX의 처리에 따른 neurofilament의 측정을 위한 neurofilament EIA에 있어서 XO/HX는 배양된 척수감각신경세포에 처리한 농도에 비례하여 neurofilament의 양을 감소시켰으며 한약재의 방어효과를 조사하기 위하여 30mU/ml XO/0.1mM HX를 척수감각신경세포에 처리하기 전 30~60 $\mu$ g/ml의 한약재가 포함된 배양액에서 3시간 동안 전처리한 경우 농도에 비례하여 neurofilament의 양이 증가하는 경향을 나타냈으며, 특히 加味眞肝熄風湯의 경우 처리한 모든 군에서 유의한 방어효과를 나타냈다(Fig. 5). 이를 통해 眞肝熄風湯과 加味眞肝熄風湯이 모두 신경독성에 대한 방어작용이 있으나 眞肝熄風湯 보다 加味眞肝熄風湯의 효과가 더 뛰어남을 추측할 수 있다.

이상의 실험 결과를 종합해 볼 때 XO/HX에 의한 산화적 손상에 의해 척수감각신경세포의 생존율을 감소시켰으며, 이에 대하여 眞肝熄風湯과 加味眞肝熄風湯 추출물의 투여는 신경세사의 양을 증가시켰으며, PKC 활성화는 저하시켜서 세포생존율을 증가시켰다. 이러한 결과는 眞肝熄風湯과 加味眞肝熄風湯이 신경독성의 방어에 보다 효과적이며 특히 加味眞肝熄風湯은 세포독성 방어작용을 나타내어 한의화적인 측면에서 痺證, 癱木으로 분류되는 감각 및 운동기능의 저하에 사용될 수 있을 것으로 보이며, 또한 산소자유기에 의한 노화의 촉진을 예방하는 측면에서의 다양한 활용도 가능하다고 하겠다. 앞으로 보다 광범위한 연구를 통하여 산소자유기에 의한 세포독성의 기전 및 한약추출물의 신경독성 방어의 기전 등에 관하여 명확한 규명이 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

Xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)의 산화적 손상에 의한 독성효과와 이에 대한 한약 추출물인 眞肝熄風湯 및 加味眞肝熄風湯의 방어효과를 조사한 결과는 다음과 같다. XO/HX로 처리한 생쥐의 배양 척수감각신경세포는 처리한 농도와 시간에 비례하여 유의한 세포생존율의 감소를 보였으며, XO/HX는 생쥐의 배양 척수감각신경세포에 신경세사의 양적 감소와 PKC 활성도의 증가를 나타냈다.

XO/HX의 신경독성에 대하여 眞肝熄風湯, 加味眞肝熄風湯은 XO/HX에 의하여 유도된 세포독성을 방어하였으며 특히 加味眞肝熄風湯이 효과가 뛰어난 것으로 나타났다. 이상의 결과로 眞肝熄風湯 및 加味眞肝熄風湯 추출물은 XO/HX의 산화적 손상을 효과적으로 방어한 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 논문은 2002년도 원광대학교 교비지원에 의해서 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 김명호. 기초임상신경학, pp 221,222, 최신의학사, 서울, 1997.
2. 김창환, 김용석. 마비질환클리닉, p.98,104-106, 정담, 서울, 1996.
3. 대한신경외과학회. 신경외과학, pp 276-279,284,285,299, 중앙문화사, 서울, 1997.
4. 이광우, 정희원. 임상신경학, pp 394-399,900-906, 고려의학, 서울, 1997.
5. 피터두스. 신경국소진단학, p.29,30, 과학서적센타, 서울, 1992.
6. Levi-Montalcin. The nerve growth factor Thirty-five years later. JEMBO(Eur Mol Biol Organ) 6, 1145-1154, 1987.
7. Lesniak, M.A., Hill, J.M., Kiess, W., Rojeski, M., Pert, C.B., Roth, J. Receptors for insulin-like growth factors I and II. Autoradiographic localization in rat brain and comparison

- to receptors for insulin. *Endocrinology* 123:2089-2099, 1988.
8. Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan J. P., Deng H.X., Rahmani Z., and Krizus A. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature(London)* 362(6415), 59-62, 1993.
  9. 김종관. 太陰調胃湯이 Glucose oxidase에 의해 손상된 대뇌 피질신경세포에 미치는 영향, 원광대학교대학원, 1998.
  10. 옥윤영. 太陰人 清心蓮子湯이 Hydrogen Peroxidase에 손상된 白鼠의 대뇌신경세포에 미치는 영향, 원광대학교대학원, 1998.
  11. 이영보, 송용선. 加味十全大補湯 煎湯液이 Xanthine oxidase/Xanthine에 의해 손상된 培養脊髓運動神經細胞에 미치는 영향, 한방재활의학과학회지 9(1), 255-269, 1999.
  12. 박광수. 鎮肝熄風湯 煎湯液이 GO에 의해 손상된 培養脊髓感覺神經細胞에 미치는 영향, 원광대학교대학원, 2000.
  13. 김성환. 加味鎮肝熄風湯이 손상된 培養脊髓運動神經細胞에 미치는 영향, 원광대학교대학원, 1999.
  14. 송봉근. 痺證의 形證과 病域에 관한 문헌적 고찰, 원광대학교대학원, 1985.
  15. 전국한의과대학재활의학과학교실 편. 동의재활의학과학, pp 95-149, 서원당, 서울, 1995.
  16. 한국한의학회연구원. 한의진단명과 진단요건의 표준화연구(III), pp 327-336, 한국한의학회연구원, 서울, 1997.
  17. 張錫純. 醫學衷中參書錄, pp 312-318, 河北科學技術出版社, 河北, 1985.
  18. 최호석. 한방임상입문, pp 207-208, 성보사, 서울, 1985.
  19. 김완희, 최달영. 臟腑辨證論治, p.160-161, 성보사, 서울, 1985.
  20. 陣貴廷, 楊思澍. 實用中西醫結合治療, p 418, 中國醫藥科學技術出版社, 北京, 1991.
  21. Michikawa, M., Lim, K.T., McLamon, J.G., and Kim, S.U. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 37, 62-70, 1994.
  22. Hu, K.-Q., Backer, J.M., Sahagian, G., Feener, E.P., King, G.L. Modulation of the insulin factor II/mannose 6-phosphate receptor in microvascular endothelial cells by phobol ester via protein kinase C. *J Biol Chem* 265, 13864-13872, 1990.
  23. 이원택, 박경아. 의학신경해부학, pp 329-342, 고려의학, 서울, 1996.
  24. 아담스신경과학편찬위원회 편. 신경과학, pp 153-159, 정담, 서울, 1998.
  25. 조한숙, 송태원, 김신석. 동의보감에 나타난 麻木不仁에 대한 小考. 한방재활의학과학회지 8(1), 352-366, 1998.
  26. 정석희, 이종수, 김성수, 신현대. 麻木에 관한 문헌적 고찰. 대한한의학회지 9(1), 137-144, 1998.
  27. 김상찬 외. 方劑學. pp 454-456, 영림사, 서울, 1990.
  28. 이상인, 박선동. 韓方臨床處方學, pp 262-263, 영림사, 서울, 1998.
  29. 강소신의학원편. 중약대사전, pp. 1688-1694, 6039-6041, 6660-6666, 정담, 서울, 1998.
  30. 이소라. 허혈 유도에 의해 손상된 신생쥐의 배양 대뇌신경세포에 대한 vitamin E와 Desferrioxamine의 보호효과, 원광대학교대학원, 1998.
  31. Lynch, J. J., Ferro, T. J., Blumenstock, F. A., Brockenauer, A. M., and Malik, A. M. Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation. *J Clin Invest* 85, 1991-1998, 1990.
  32. Nowak, T.S., Ikeda, J., Nakajima, T. 70-kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. *Stroke Suppl* III 21, 107-111, 1990.
  33. Pellegrini-Giampietro, D.E., Cherici, G., Alesiani, M., Carrla, V., Moroni, F. Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free radical formation. *J Neurochem* 51, 1960-1963, 1988.
  34. Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614, 1992.