

萬金湯 및 加味萬金湯이 배양 척수후근신경절 세포에 미치는 영향

최규선* · 윤상학 · 염승룡 · 이수경 · 신병철 · 권영달 · 송용선

원광대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Effects of Mangeum-tang and Gamimangeum-tang on the Cultured Spinal Dorsal Root Ganglion Cells

Gyu Seon Choi*, Sang Hak Yun, Seung Ryong Yeom, Su kyung Lee, Byung Cheul Shin, Young Dal Kwon, Yung Sun Song

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

The purpose of this study is to examine the toxic effects caused by xanthine oxidase/hypoxanthine (XO/HX) and the effects of herbal extracts such as Mangeum-tang (萬金湯: MGT) and Gamimangeum-tang (加味萬金湯: GMGT) on the treatment of the toxic effects. The results of these experiments were XO/HX, an oxygen radical-generating system, decreased the survival rates of the cultured cells on XTT assay, the amount of DNA syntheses, and the amount of neurofilaments, and increased c-fos positive cells. MGT and GMGT have the efficacy of increasing the survival rates of the cultured cells by increasing the amount of neurofilaments and DNA synthesis and decreasing the c-fos positive cells damaged by XO/HX. From the above results, it is suggested that MGT and GMGT have marked efficacy as a treatment for the damages caused by the XO/HX-mediated oxidative stress. And MGT and GMGT are thought to have certain pharmacological effects.

Key words : Mangeum-tang(萬金湯), Gamimangeum-tang(加味萬金湯), Xanthine Oxidase (XO), Hypoxanthine (HX), XTT, Neurofilament, DNA synthesis, c-fos

서 론

척수는 신체의 운동, 감각, 자율신경활성도를 조절 및 관리하는 곳으로, 이곳에 병변이 생기면 병발 수준과 상행로에 손상을 주게 되어 고위신경중추로 보내거나 받는 운동, 감각, 자율신경 흥분의 단절을 초래하게 된다¹⁾. 이러한 신경조직의 손상은 국소 혈류의 감소에 따른 일련의 대사물질에 의해 발생되는데, 산소자유기, 글루타민산 등의 독성물질의 생성과 침착 및 이들의 상호 작용에 의해 발생하게 된다²⁾. 신경조직의 손상에 의해 나타나는 통증이나 마비감의 증상은 한의학적으로 痺證이나 麻木不仁의 범주에 속할 것으로 사료되며, 痺證은 外邪의 感觸이나 正氣의 손상, 거처와 음식 등에 의해 氣血의 운행이 순조롭지 못하여 筋骨, 肌肉, 關節 등에 疼痛, 麻木, 重着, 關節腫大灼熱, 屈伸不利 등의 증상을 일으키게 되는 질환으로, 서양의학에서의 후근신경절 세포의 손상에 가깝다고 볼 수 있다^{3,4)}.

萬金湯은 宋代 危⁵⁾의 <世醫得效方>에 “治風, 補虛, 順管衛, 通血脈, 并腰脚膝沈重, 緩弱無力 及 治手足風, 累驗”이라고 최초로 수록된 이래, 虛證 위주의 중풍 및 수족무력 등에 응용되었고^{6,7)}, 氣血凝滯, 氣血虛弱, 肝腎衰弱 등으로 인한 각종 痺證을 치료하는 데에도 응용할 수 있다⁸⁾. 加味萬金湯은 萬金湯에 天麻, 鈞鉤藤, 白僵蠶를 加味하여, 鎮肝熄風, 通絡止痛의 효과⁹⁾를 높인 處方으로, 현재 腰脊損傷後期, 慢性關節炎, 坐骨神經痛, 中風癱瘓, 風濕性 神經痛, 혹은 麻痺 등에 활용되고 있다. 萬金湯에 대한 실험적 연구로는 서¹⁰⁾의 萬金湯 및 加味萬金湯이 고지혈증에 미치는 영향, 조¹¹⁾의 萬金湯이 백서의 국소뇌혈류량 및 혈압에 미치는 영향 등은 보고 되었으나, 척수후근신경절 세포에 대한 연구는 아직 찾아볼 수 없었다.

이에 저자는 萬金湯이 각종 痺證에 응용될 수 있다는 문헌^{3,8,12,13)}에 근거하여 萬金湯과 加味萬金湯이 산소자유기에 의해 손상된 척수후근신경절 세포에 미치는 영향을 알아보고자 생쥐에서 순수 분리 배양한 척수후근신경절 세포에 Xanthine oxidase (XO)와 Hypoxanthine (HX)에 의해 培養된 생쥐의 척수후근신경절 세포에 대한 산소자유기의 독성효과를 XTT 정량을

* 교신저자 : 최규선, 경기도 안양시 동안구 호계1동 1003-9 최규선한의원
· E-mail : choi9887@hanmail.net, Tel : 031-455-9887
· 접수 : 2003/02/12 · 수정 : 2003/03/15 · 채택 : 2003/04/09

통해 관찰한 후, 한약추출물인 萬金湯 및 加味萬金湯의 산소자유기에 의한 산화적 손상에 대한 방어효과를 Neurofilament EIA, DNA 합성능, c-fos 단백질 발현을 측정하여 본 바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 동물

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

2) 약제

본 실험에 사용한 萬金湯의 處方內容은 危⁹⁾의 <世醫得效方>에 의거하였으며 약제는 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였고, 萬金湯, 加味萬金湯 각각의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1, 2).

Table 1. Composition of Maugeum-tang

Herbal Name	Pharmacognostic Name	Amount (g)
續 斷	<i>Radix Dipsaci</i>	16.8
杜 冲	<i>Eucommia</i>	16.8
防 風	<i>Radix Saposhnikoviae</i>	16.8
白茯苓	<i>Poria</i>	16.8
牛 膝	<i>Radix Achyranthis Bidentatae</i>	16.8
人 蔘	<i>Radix Ginseng</i>	16.8
細 辛	<i>Herba Asari</i>	16.8
桂 皮	<i>Cortex Cinnamomi</i>	16.8
當 歸	<i>Radix Angelicae Sinens</i>	16.8
甘 草	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	16.8
川 芎	<i>Rhizoma Chuanxiong</i>	8.4
獨 活	<i>Radix Aralia Cordatae</i>	8.4
秦 艽	<i>Radix Gentianae Macrophyllae</i>	8.4
熟地黄	<i>Radix Rehmanniae Preparata</i>	8.4
Total Amount		201.6

Table 2. Composition of Gamimangeum-tang

Herbal Name	Pharmacognostic Name	Amount (g)
續 斷	<i>Radix Dipsaci</i>	13.2
杜 冲	<i>Eucommia</i>	13.2
防 風	<i>Radix Saposhnikoviae</i>	13.2
白茯苓	<i>Poria</i>	13.2
牛 膝	<i>Radix Achyranthis Bidentatae</i>	13.2
人 蔘	<i>Radix Ginseng</i>	13.2
細 辛	<i>Herba Asari</i>	13.2
桂 皮	<i>Cortex Cinnamomi</i>	13.2
當 歸	<i>Radix Angelicae Sinens</i>	13.2
甘 草	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	13.2
川 芎	<i>Rhizoma Chuanxiong</i>	6.6
獨 活	<i>Radix Aralia Cordatae</i>	6.6
秦 艽	<i>Radix Gentianae Macrophyllae</i>	6.6
熟地黄	<i>Radix Rehmanniae Preparata</i>	6.6
天 麻	<i>Rhizoma Gastrodiae</i>	13.2
釣 鈎 藤	<i>Ramulus Uncariae Cum Uncis</i>	13.2
白僵蚕	<i>Batryticatus Bombycis</i>	13.2
Total Amount		198

2. 방법

1) 검액의 조제

萬金湯 201.6g, 加味萬金湯 198g을 각각 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 각각 45.44g, 39.7g의 분말 시료를 얻었다.

2) 약제 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 사용하여나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3) 세포 배양

척수후근신경절 세포의 분리는 Michikawa 등¹⁴⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생후 3일된 생쥐에서 적출한 척수조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline (PBS)으로 처리한 후 36℃, 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/well 의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양 후 본 실험에 사용하였다.

4) 산소자유기 처리

산소자유기가 생쥐의 척수후근신경절 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 척수후근신경절 세포를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 5~40 mU/ml XO에 0.1 mM HX을 여러 농도로 조합하여 혼합한 다음 이들 각각의 배양액에서 1~9시간 동안 처리한 후 분석하였다.

5) 세포독성 및 방어효과 검증

(1) 세포생존율 분석 - XTT 정량

XTT(Sigma)의 정량은 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% CO₂로 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 검증

① 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 비교 조사하였다.

② DNA synthesis 정량

일정 시간동안 약제를 처리한 실험군과 약제처리를 하지 않은 대조군을 [3H]thymidine이 10uCi/ml 포함된 배양액으로 교환하여 1시간 동안 표식하였다. 100µg/ml의 sodium azide로 DNA합성을 억제시켜 Ca²⁺, Mg²⁺가 없는 PBS로 3회 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 부유시켰다. 세포를 Whatman GF/C glass filter paper로 수확한 후, 여과지를 건조시켜 scintillation cocktail(PPO 4g, POPOP 0.1g/Toluene 1L)을 넣고 반응시킨 다음 액체섬광계수기로 방사능을 측정하여 이를 대조군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

③ c-fos 단백질의 정량

일정 시간동안 약제를 처리한 실험군과 약제처리를 하지 않은 대조군을 c-fos 단백질 발현을 측정하기 위하여 sample을 4% paraformaldehyde + 0.1M PBS에서 3시간 동안 실온에서 고정한 후 30% sucrose에서 2일 방치한다. 그 후 pH 7.4의 PBS 용액으로 3회 이상 세척하고 0.3% triton-X 100으로 30분간 진탕한 후 PBS로 3회 이상 세척한다. 그 후 Blocking agent(Normal goat serum)를 실온에서 30분간 처리한 다음 일차항체(c-fos, oncogene sci, 1:150)를 영상 4도에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 2시간동안 실온에서 진탕시키고 PBS로 세척한다. 그 후 이차항체인 biotinylated anti-rabbit & anti-mouse immunoglobulin(Dako, Denmark)을 실온에서 40분간 처리하여 PBS로 세척하고, streptavidin peroxidase(Vector ABC kit)를 20분간 처리하여 PBS로 세척한 뒤 chromogen인 0.05% diaminobenzidine으로 발색하였다. 증류수로 1시간동안 세척한 후 광학 현미경하에서 진갈색으로 보이는 c-fos 양성세포를 관찰하였으며, 화상자동분석 시스템(Image Pro Plus 4.0, USA)으로 분석하였다.

6) 통계 처리

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

성 적

1. 산소자유기의 독성효과

1) 세포 생존율 분석

(1) XTT 정량

XO가 배양 척수후근신경절 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 XO가 5mU/ml에서 40mU/ml까지의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 후 XO의 독성을 XTT assay법에 의하여 조사한 결과 5mU/ml XO 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 74.2%로 나타났으며 10mU/ml의 처리에서는 57.6%로 나타났다. 그러나 20, 40mU/ml XO를 처리한 경우 세포 생존율은 각각 51.5%(p<0.05)와 36.4%(p<0.01)로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났다(Fig. 1).

XO/HX가 시간에 따라 배양 척수후근신경절 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 20mU/ml XO/0.1mM HX가 포함된 배양액에서 척수후근신경절 세포를 각각 1~9시간 동안 배양한 후

세포의 생존율을 XTT assay법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 특히 6시간, 9시간의 처리에서는 세포생존율이 48.4%(p<0.05)와 41.0%(p<0.01)로 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 2).

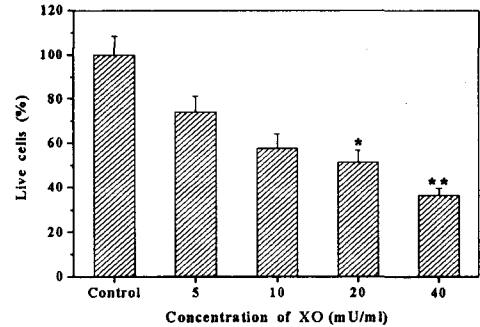


Fig. 1. Dose-response relationship of XO on cell viability in cultured mouse spinal dorsal root ganglion cells.

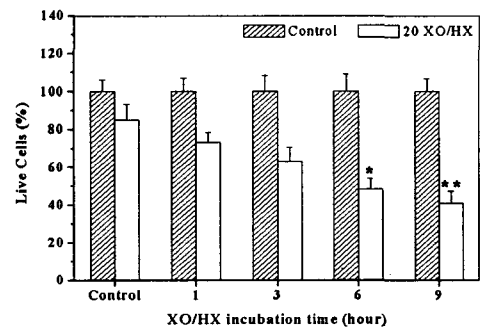


Fig. 2. Time-dependency of XO and HX on cell viability in cultured mouse spinal dorsal root ganglion cells.

2. 한약추출물의 효과

1) Neurofilament 효소면역 정량

(1) 萬金湯의 효과

XO/HX에 의하여 손상된 배양 척수후근신경절 세포에 대한 萬金湯의 효과를 neurofilament의 양적변화측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV(midcytotoxicity value)값인 30mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 배양 척수후근신경절 세포를 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 50~80µg/ml 萬金湯이 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 neurofilament EIA법으로 조사하였다. 50µg/ml, 60µg/ml 萬金湯을 처리한 경우 세포의 neurofilament의 양적 변화는 萬金湯을 처리하지 않은 대조군(56.3%)에 비하여 각각 68.7%, 76.5%로 나타나 증가하는 경향을 나타냈으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 70µg/ml와 80µg/ml 萬金湯처리에서는 각각 86.3%(p<0.05)와 92.4%(p<0.01)로 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 3).

(2) 加味萬金湯의 효과

XO/HX에 의하여 손상된 배양 척수후근신경절 세포에 대한 가미만금탕의 효과를 neurofilament의 양적변화측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값인 30mU/ml XO/0.1mM HX농도

에서 배양 척수후근신경절 세포를 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 50~80 μg/ml 加味萬金湯이 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 neurofilament EIA법으로 조사하였다. 50 μg/ml 加味萬金湯을 처리한 경우 세포의 neurofilament의 양적 변화는 XO/HX만을 처리한 대조군(63.4%)에 비하여 75.8%로 나타나 증가하는 경향을 나타냈으나 유의성은 보이지 않았다. 그러나 60 μg/ml, 70 μg/ml, 80 μg/ml 加味萬金湯처리에서는 각각 82.4%(p<0.05), 91.6%(p<0.01), 94.6% (p<0.01)로 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 3).

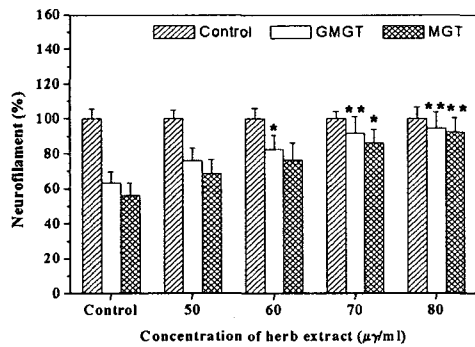


Fig. 3. Dose-dependency of MGT and GMGT for its protective effect on XO and HX in cultured mouse spinal dorsal root ganglion cells.

2) DNA synthesis 정량

(1) 萬金湯의 효과

XO/HX에 의하여 손상된 배양 척수후근신경절 세포에 대한 萬金湯의 효과를 DNA 합성량의 측면에서 조사하기 위하여 35mU/ml XO/HX의 농도에서 배양 척수후근신경절 세포를 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15~100 μg/ml 萬金湯이 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 DNA 합성량의 측면에서 조사하였다. 15 μg/ml 萬金湯 투여군에서는 XO/HX만 처리한 대조군 56.7%에 비하여 72.5%로 증가하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml 萬金湯을 처리한 경우 DNA 합성량은 萬金湯을 처리하지 않은 대조군(56.7%)에 비하여 각각 86.3%(p<0.05), 90.8%(p<0.01), 92.7%(p<0.01)로 나타나 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 4).

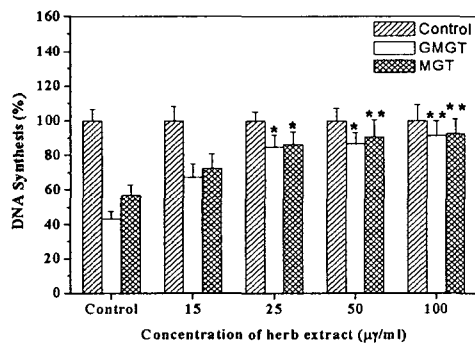


Fig. 4. Dose-response relationships of MGT and GMGT for their neuroprotective effects on DNA synthesis in the spinal dorsal root ganglion cells. The significant differences between groups are marked with the asterisks. *p<0.05; **p<0.01

(2) 加味萬金湯의 효과

XO/HX에 의하여 손상된 배양 척수후근신경절 세포에 대한 加味萬金湯의 효과를 DNA 합성량의 측면에서 조사하기 위하여 35mU/ml XO/HX의 농도에서 배양 척수후근신경절 세포를 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15~100 μg/ml 加味萬金湯이 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 DNA 합성량의 측면에서 조사하였다. 15 μg/ml 加味萬金湯 투여군에서는 XO/HX만 처리한 대조군 43.2%에 비하여 67.4%로 증가하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml 萬金湯을 처리한 경우 DNA 합성량은 萬金湯을 처리하지 않은 대조군(43.2%)에 비하여 각각 80.8%(p<0.05), 86.6%(p<0.05), 91.9%(p<0.01)로 나타나 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 4).

3) c-fos 단백질의 정량

(1) 萬金湯의 효과

XO/HX에 의하여 손상된 배양 척수후근신경절 세포에 대한 萬金湯의 효과를 c-fos 양성세포의 측면에서 조사하기 위하여 25mU/ml XO/HX의 농도에서 배양 척수후근신경절 세포를 노출시킨 결과, 2시간의 노출에서 MCV값을 나타내었다(Fig. 5).

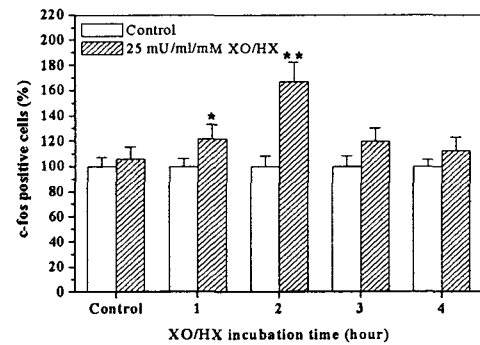


Fig. 5. Effects of XO/HX on c-fos positive cells in spinal dorsal root ganglion cells. *significantly different from the value of control group. *p<0.05; **p<0.01

배양 척수후근신경절 세포를 2시간 동안 노출시키기 3시간 전에 130 μg/ml 萬金湯이 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 c-fos 양성세포의 측면에서 조사하였다. 25mU/ml의 XO/HX만 처리한 군에서 c-fos 양성세포의 수는 대조군(100%)에 비하여 144.6%로 증가하였으나 130 μg/ml 萬金湯 투여군에서는 116.5%(p<0.05)로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 6).

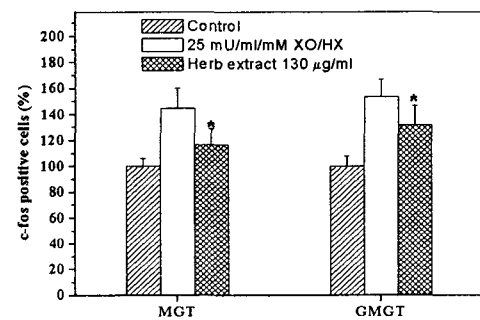


Fig. 6. Effects of MGT and GMGT for its neuroprotective effects on c-fos positive cells in spinal dorsal root ganglion cells.

(2) 加味萬金湯의 효과

XO/HX에 의하여 손상된 배양 척수후근신경절 세포에 대한 加味萬金湯의 효과를 c-fos 양성세포의 측면에서 조사하기 위하여 25mU/ml XO/HX의 농도에서 배양 척수후근신경절 세포를 2시간 동안 노출시키기 3시간 전에 130 µg/ml 加味萬金湯이 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 c-fos 양성세포의 측면에서 조사하였다. 25mU/ml의 XO/HX만 처리한 군에서 c-fos 양성세포의 수는 대조군(100%)에 비하여 153.3%로 증가하였으나 130 µg/ml 萬金湯 투여군에서는 131.7%(p<0.05)로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 6).

고 찰

척수는 환추골의 두개 경계부 수준에서 연수와 연결되며 제 1요추의 아래 경계부까지 연속되어 있다. 척수의 평균길이는 성인남자에서 45cm, 성인여자는 42~43cm이며¹⁵⁾, 척수신경이 손상되면 병변 아래에서 올라오는 모든 상행로와 아래로 내려가는 모든 하행로가 차단되어서, 손상부위 이하의 운동과 감각기능 및 자율신경의 장애가 나타난다^{15,16)}. 척수를 침범하는 것으로 알려진 질환은 약 30여 가지이며, 이들 중 반 수 정도만이 비교적 자주 보인다. 이들 질환은 횡단성 척수증후군, 반척수증후군(Brown-Sequard), 중심척수증후군, 마미총증후군, 경부-대후두공증후군 등의 일련의 증후군 집단으로 표현되며, 대상포진, 척수 변성질환, 척수공동증, 다발성경화증, 척수손상, 척수로(Tabs Dorsalis) 등의 원인에 의해 발생한다¹⁷⁾. 척수의 감각신경의 손상을 일으키는 질환은 대부분 지체에 동통을 유발하거나 감각장애, 또는 운동기능의 약화를 초래하는데, 이는 한의학에서 痺證, 痿證, 麻木不仁의 범주에 해당된다고 볼 수 있다^{12,13,18-21)}. 痺證은 막혀서 통하지 않는 것으로, 風寒濕의 邪氣가 體表와 經絡에 침입하여, 疼痛, 重着, 腫脹, 屈伸不利, 關節腫痛 등의 증상이 나타나는 것으로 주요한 임상증상은 痛症이다³⁾. 痿證은 四肢筋脈이 弛緩하고, 手足이 軟無力하며, 隨意運動을 하지 못하는 질환을 말하고, 麻木이란 肌膚知覺이 消失되어 痛痒을 알지 못하는 것으로⁴⁾, 척수 감각신경세포의 손상질환은 痿證보다는 痺證이나 麻木에 더 가까운 증상으로 여겨진다.

萬金湯은 宋代 危⁵⁾의 <世醫得效方>에 최초로 收錄된 處方으로 처방내용은 續斷, 杜冲, 防風, 白茯苓, 牛膝, 人蔘, 細辛, 桂皮, 當歸, 甘草, 川芎, 獨活, 秦艽, 熟地黃으로, 補氣血, 通血脈의 效能이 있어 中風의 腰脚膝沈重, 緩弱無力, 手足無力에 사용하는 處方이다. 처방의 構成을 살펴보면 補肝腎, 壯筋骨하고 活血祛瘀, 通血脈하는 效能이 있어 風濕性 關節痺痛, 高血壓 등의 治療에 사용되는 續斷, 杜冲, 牛膝을 君藥으로 하고 氣血兩虛를 治療하는 人蔘, 白茯苓, 甘草, 熟地黃, 川芎, 當歸에, 疏經升陽, 祛風寒濕의 效能이 있으며, 風寒濕痺, 筋脈拘攣 등을 治療하는 防風, 秦艽와 通血脈, 祛風하는 細辛, 獨活, 그리고 溫中補陽, 散寒止痛, 通血脈의 效能을 가진 肉桂로 구성되어 있으며, 전체적인 方義가 補氣血, 壯筋骨하고, 祛風散寒 通血脈하는 效能을 가진다⁹⁾. 本方은 肝腎虛弱, 風濕, 痛痒 등의 諸般 痺證에 頻用하는 獨活寄生湯,

三痺湯, 十全大補湯 등의 3가지 方劑의 變方으로 해석할 수 있는데, 獨活寄生湯의 變方으로 보면, 白芍藥, 桑寄生 대신 續斷을 加味한 것으로 볼 수 있고, 三痺湯의 變方으로 보면, 黃芪, 白芍藥을 去하고, 生地黃을 熟地黃으로 대신한 것으로 볼 수 있다. 또한 十全大補湯의 變方으로 보면 白朮, 白芍藥, 黃芪를 去하고, 杜冲, 牛膝, 續斷, 細辛, 獨活, 秦艽를 가미한 것으로 볼 수 있다⁸⁾.

獨活寄生湯은 孫²²⁾의 <千金要方>에 처음으로 기록된 처방으로 痺와 脚氣, 四肢癱, 腰脚疼痛, 膝腫痛 등에 사용되었으며⁶⁾, 三痺湯은 宋代 陳²³⁾의 <婦人良方大全>에 처음으로 收錄된 處方으로, 益肝腎, 補氣血, 祛風濕, 止痛痒하는 效能이 있어, 風寒濕痺證과 氣血虛로 인한 痺證에 널리 사용되어 왔다⁶⁾. 十全大補湯은 陳²⁴⁾의 <太平惠民和劑局方>에 최초로 收載된 處方으로 氣血을 雙補하며 男子婦人, 諸虛不足, 五勞七傷, 不進飲食 久病虛損 等證에 활용되어 왔으며, 최근까지 補氣血劑의 대표적인 處方으로 임상에서 常用하는 方劑의 하나이다²⁵⁾. 따라서, 萬金湯은 獨活寄生湯, 三痺湯, 十全大補湯의 變方으로서 氣血凝滯, 氣血虛弱, 肝腎衰弱 등으로 인한 手足筋骨의 각종 痺證을 치료 할 수 있는 중요한 方劑가 될 수 있다⁸⁾.

加味萬金湯은 萬金湯에 天麻, 鈞鉤藤, 白僵蠶를 加味한 處方으로, 天麻는 鎮痙熄風, 通絡止痛, 止頭暈痛의 效능으로, 風痰으로 인한 頭痛, 眩暈 및 風寒濕痺, 肢體麻木의 證에 응용하고⁹⁾, 鈞鉤藤은 清熱平肝, 熄風鎮痙, 鎮靜의 效능이 있어 高血壓, 眩暈, 驚癇 등을 치료하는 약물로 鎮痙, 抗痙攣 및 鎮靜에 활용될 수 있다^{9,26,27)}. 白僵蠶는 熄風鎮痙, 疏散風熱, 化痰散結, 行經絡의 效능이 있어 諸風麻木不仁, 驚癇抽搐, 頭痛, 目赤, 中風失音의 증상에 활용되고 있는 한약재로 신경계 병변의 치료에 응용되고 있다^{9,28,29)}. 加味萬金湯은 萬金湯에 祛風濕風痺藥類와 平肝息風藥類에 모두 속하는 天麻, 鈞鉤藤, 白僵蠶이 결합되어 통증과 마비의 치료 효과를 배가시킨 처방이라 할 수 있다. 자유기는 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자로서, 대단히 반응성이 크며, 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시키는 등, 생체 내에서 여러 가지 병태 생리적인 반응에 관여하고 있다^{30,31)}. 특히 산소자유기는 흥분성아미노산(excitatory amino acid, EAA)의 분비를 촉진시키고^{30,31)}, 세포내 Ca²⁺의 농도를 증가시켜 세포의 사멸을 초래하며^{32,33)}, 중추나 말초신경계를 구성하고 있는 신경세포에 산화적 손상을 유발함으로써 노인성 치매나 파킨슨씨병을 비롯하여, 腦虛血 및 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)과 같은 각종 신경질환의 病因으로 밝혀지고 있다^{34,35)}. 그러나, 산소자유기의 독성효과에 대하여 아직까지 이에 대한 자세한 기전이 밝혀져 있지 않았고, 이로 인하여 유발되는 많은 신경질환에 대한 효과적인 치료방법 역시 미흡한 실정이다³³⁾. 최근에는 한약추출물을 비롯한 천연추출물들이 항산화 효과나 세포성장인자 등의 약리적 활성을 가지고 있어 뇌나 척수의 중추신경계나 또는 말초신경계를 구성하고 있는 신경세포가 손상을 입었을 경우 이를 방어하는 효과가 있음이 규명되면서 이러한 물질들을 병변의 치료에 적용하려는 연구가 활발히 진행중이다³⁶⁾.

이에 저자는 補氣血, 強筋骨, 祛風의 약재로 구성되어 있어 痺證治療에 효과가 기대되는 萬金湯 및 加味萬金湯의 산화적 손상에 대한 방어효과를 구명하기 위하여, 신생생쥐에서 분리 배양한 척수후근신경절 세포에 여러농도의 XO/HX에서 전처리한 후, XO/HX가 배양 척수후근신경절 세포에 미치는 영향을 조사하였으며, 또한 XO/HX의 독성효과에 대하여 한약추출물인 萬金湯 및 加味萬金湯의 방어효과를 관찰하였다. 산소자유기의 신경독성을 조사하기 위하여 본 실험에서는 순수분리 배양한 생쥐의 척수후근신경절 세포에 여러 농도의 XO/HX에 노출시킨 후 XTT assay를 시행한 결과 XO/HX를 배양 신경세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 대조군에 비하여 세포생존율의 유의한 감소를 보였다. XTT assay에 있어서 20, 40mU/ml XO를 처리한 경우에서 세포 생존율은 각각 51.5%($p < 0.05$)와 36.4%($p < 0.01$)로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났고(Fig. 1), 20mU/ml XO/0.1mM HX의 세포생존율 분석에서는 대조군과 비교하여 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며, 특히 6시간, 9시간에서는 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 2). XO/HX가 배양 척수후근신경절 세포에 미치는 영향을 neurofilament의 양적변화를 neurofilament enzymeimmuno assay를 이용하여 분석한 결과, 세포의 신경세사의 양이 감소하였으며 XO/HX에 의하여 손상된 배양 척수후근신경절 세포에 대한 萬金湯과 加味萬金湯의 방어효과는 전처리한 농도에 비례하여 신경세사의 양이 증가하여 방어효과를 나타냈다. 특히 萬金湯의 경우 70 μ g/ml, 80 μ g/ml의 농도에서 통계적으로 유의한 증가를 나타냈으며 加味萬金湯의 경우 60 μ g/ml, 70 μ g/ml, 80 μ g/ml의 농도에서 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 3). DNA합성은 세포의 증식이나 분화를 비롯하여 DNA복제나 DNA손상에 대한 회복기전을 조사하는 지표로서 많이 활용하고 있다³⁷⁾. 본 실험에서는 한약추출물인 萬金湯과 加味萬金湯이 DNA합성에 미치는 영향을 조사하였는데, 그 결과 XO/HX는 신경세포에 DNA합성을 감소시키는 결과를 보였다. 이는 아마도 XO/HX의 산화적 손상이 DNA의 염기에 손상을 주었거나 또는 세포의 분화능을 저해한 결과일 것으로 생각된다³⁸⁾. 한편, XO/HX에 의한 DNA 합성억제에 대한 한약추출물의 영향에 있어서 萬金湯과 加味萬金湯을 XO/HX에 노출시키기 3시간 전에 신경세포에 처리한 결과 DNA합성은 XO/HX만의 처리에 비하여 유의하게 증가하였다. 특히, 萬金湯과 加味萬金湯 모두 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도에서 DNA의 합성율은 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 4). 본 실험의 이같은 결과는 아마도 한약추출물인 萬金湯과 加味萬金湯이 XO/HX에 의한 DNA손상이나 또는 세포분화능의 저해로부터 방어하는 작용이 있는 것으로 생각된다³⁹⁾. c-fos는 세포내 여러 단백을 조절하는 조절자의 기능을 하며 그 밖에 비특이적인 자극에 반응하는 유전자로 알려져 있다. 따라서 c-fos는 활성산소의 자극에 의해 반응하지만 다른 신호전달자와도 함께 작용함으로써 활성산소의 산화적 손상에 의해 유발되는 세포현상을 조절하는 조절자로서의 역할을 한다. XO/HX에 의하여 손상된 배양 척수후근신경절 세포에 대한 萬金湯의 효과를 c-fos 양성세포의 측면에서 조사

하기 위하여 25mU/ml XO/HX의 농도에서 배양 척수후근신경절 세포를 노출시킨 결과, 2시간의 노출에서 MCV값을 나타내었다(Fig. 5). XO/HX가 배양 척수후근신경절 세포에 미치는 영향을 c-fos 양성세포의 숫적변화를 immunohistochemistry를 이용하여 분석한 결과, c-fos 양성세포가 증가하였으며 XO/HX에 의하여 손상된 배양 척수후근신경절 세포에 대한 萬金湯과 加味萬金湯의 방어효과는 c-fos 양성세포가 감소한 것을 통하여 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

이상의 실험 결과를 종합해 보면, XO/HX와 같은 산소자유기는 산화적 손상에 의해 신경독성을 나타내어 세포생존율을 감소시켰으며, 이에 대한 萬金湯 및 加味萬金湯의 투여는 neurofilament의 양적 증가, DNA 합성율의 증가, c-fos양성세포의 감소시켜 세포생존율을 증가시켰다. 이와 같은 결과는 萬金湯 및 加味萬金湯이 산소자유기의 형성을 저해함으로써 신경세포의 생존율을 증가시킨 것으로 사료되며, 韓醫學으로 痺證, 麻木으로 분류되는 감각신경의 손상질환에 일정한 약리적 효과가 있음을 알 수 있다. 앞으로, 이에 대한 정확한 기전구명을 위해서는 면역학, 생리학 및 약리학적 측면에서 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론

Xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)의 산화적 손상에 대한 기전을 규명하기 위하여 신생 생쥐의 척수조직에서 순수 분리 배양한 감각신경세포에 여러 농도의 XO/HX가 포함된 배양액에서 6시간 동안 처리한 다음 XO/HX가 배양 척수후근신경절 세포에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 XO/HX의 독성효과에 대한 한약추출물인 萬金湯과 加味萬金湯의 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

XO/HX는 XTT 분석법에 의하여 생쥐의 배양 척수후근신경절 세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 유의한 세포생존율의 감소를 보였으며, 배양 척수후근신경절 세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 neurofilament 효소면역 정량에 의한 신경세사의 양적 감소를 비롯하여, DNA 합성능의 감소, c-fos 양성세포의 증가를 나타냈다. XO/HX의 신경독성에 대하여 萬金湯과 加味萬金湯은 XO/HX만의 처리에 비하여 neurofilament의 양적 증가, DNA 합성능의 증가, c-fos 양성세포의 유의한 감소 효과를 나타냈다.

이상의 결과로부터 XO/HX는 생쥐에서 분리한 배양 척수후근신경절 세포에 신경독성을 나타냈으며, 동시에 萬金湯과 加味萬金湯은 XO/HX의 산화적 손상을 효과적으로 방어한 것으로 생각되며 척수후근신경절 세포의 손상으로 인한 痺證治療에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2002년도 원광대학교 교비지원에 의해서 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김명호. 기초 임상신경학, p.221-222, 최신의학사, 서울, 1997.
2. 피터두스. 신경국소진단학, p.29-30, 과학서적센터, 서울, 1992.
3. 全國韓醫科大學再活醫學科學教室 編. 東醫再活醫學科學, pp 95-149, 書苑堂, 서울, 1995.
4. 한국한의학연구원. 한의진단명과 진단요건의 표준화연구(III), pp 327-336, 한국한의학연구원, 서울, 1997.
5. 危亦林. 世醫得效方, p 448, 南山堂, 서울, 1990.
6. 許浚. 校正東醫寶鑑, p.448,450,571,575,578, 한미의학, 서울, 2001.
7. 申載用. 方藥合編解說, p 22, 成輔社, 서울, 1991.
8. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說, p.637-638, 醫聖堂, 서울, 1998.
9. 辛民教. 臨床本草學, pp 656-657,658-659,663-664, 永林社, 서울, 1992.
10. 徐雲教. 萬金湯 및 加味萬金湯이 高脂血症에 미치는 影響. 東國大學校 韓醫學研究所 韓醫學 論文集 3, 299-315, 1994.
11. 曹永敏. 萬金湯이 白鼠의 局所腦血流量 및 血壓에 미치는 影響, 東義大學校 大學院, 1999.
12. 宋峰根. 痺證의 形證과 病域에 관한 文獻의 考察, 圓光大學校 大學院, 1985.
13. 金湘洙, 高成奎, 曹基湖, 金永錫, 裒亨燮, 李京燮. 痺證에 對한 東西醫學的 考察(原因, 症狀를 爲主로). 大韓韓方內科學會誌 15(1), 116-127, 1994.
14. 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.
15. 김승민, 선우일남, 이광수, 최경규, 최일생. 임상신경 국소진단학, p 101, 정담, 서울, 1999.
16. 최영태, 김유철, 조은수, 최선미, 김연희. 척추손상환자의 사회적응실태조사. 대한재활의학회지 16(4), 473-481, 1992.
17. Gregory, D. Cramer, Susan, A. Darby. Basic and clinical anatomy of the Spine, Spinal cord and ANS, pp 296-299, Mosby, St. Louis, 1995.
18. 張斗浩. 素問·痺論에 대한 研究, 圓光大學校 大學院, 1995.
19. 조한숙, 송태원, 김신석. 東醫寶鑑에 나타난 麻木不仁에 對한 小考. 한방재활의학회지 8(1), 352-366, 1998.
20. 鄭錫熙, 李鍾秀, 金性洙, 申鉉大. 麻木에 關한 文獻의 考察. 대한한의학회지 9(1), 137-144, 1988.
21. 嚴祥燮. 素問·痺論에 對한 研究, 圓光大學校 大學院, 1996.
22. 孫思邈. 千金要方, pp 166-167, 自由出版社, 臺北, 1976.
23. 陳自明. 婦人良方大全, p 33, 정담, 서울, 1993.
24. 陳師文. 太平惠民和劑局方, p 121, 中國中醫藥出版社, 河北, 1996.
25. 황충연. : 十全大補湯加 鹿茸이 마우스의 免疫反應에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 1989.
26. 황충연. 鈞鈞藤 煎湯液이 XO/HX에 의해 損傷된 培養 脊髓 感覺神經細胞에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 2000.
27. 신명섭. 鈞鈞藤 水鍼이 鎮痛, 抗痙攣 및 鎮靜作用에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 1995.
28. 황경택. 白蠟蠶이 血壓 및 局所腦血流量에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 1998.
29. 이민주. 白蠟蠶 煎湯液이 Hydrogen Peroxide에 의해 損傷된 培養 脊髓運動神經細胞에 미치는 效果, 圓光大學校 大學院, 2001.
30. 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.
31. Pellegrini-Giampietro, D.E., Cherici, G., Alesiani, M., Carrla, V., Moroni F. Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. J Neurosci 10, 1035-1041, 1990.
32. Mayer, M.L., Westbrook, G.L. Permeation and block of N-methyl- D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. J Physiol 394, 501-527, 1987.
33. Zeman, S., Lloyd, C., Meldrum, B., Leigh, P.N. Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neurons disease. Neuropathol Appl Neurobiol 20, 219-231, 1994.
34. Rosen, D., Siddique, T., Patterson, D., Figlewix, D., Sapp, P., Hentati, A., Deng, H., Rahmani, Z., Krizus, A. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature(London) 362, 59-62, 1993.
35. Yamamoto, M., Scima, T., Uozumi, T., Yamada, K., and Kawasaki, T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpa-tocopherol administration. Stroke 14, 977-982, 1983.
36. Park, B.R., Kim, M.S., Kim, S.G., Kim, H.K., Kim, S.S. Effect of intermittent electrical stimulation of muscle atrophy in hindlimb suspended rats, Proceeding of the 1st International FES Symposium, pp 223-229, Japan, 1992.
37. Friedberg, E.C. DNA damage : In DNA repair, pp 1-78, Freeman, New york, 1985.
38. Waalkes, M.P., Poirier, L.A. In vitro cadmium-DNA interactions : Cooperativity of binding and competitive antagonism by calcium, magnesium and zinc. Toxicol Appl Pharmacol 75,539-546, 1984.
39. Koizumi, T., Waalkes, M.P. Interaction of cadmium with rat testicular interstitial cell nuclei : Alterations induced by zinc pretreatment and cadmium binding proteins. Toxicol In Vitro 3,215-220, 1989.