

# 十全大補湯이 신경교세포의 산화적 손상에 미치는 영향

류지용<sup>1</sup> · 윤종민<sup>1,2</sup> · 조광호<sup>2</sup> · 문병순<sup>1,2\*</sup>

1: 원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 2: 원광대학교 한의학전문대학원 제3외과학교

## Effects of *Sibjeondaebotang* on Oxidative Stress of C6 Glial Cells

Ji Yong Ryu<sup>1</sup>, Jong Min Yun<sup>1,2</sup>, Kwang Ho Cho<sup>2</sup>, Byung Soon Moon<sup>1,2\*</sup>

1: Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

2: Department of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

Zinc ion has both essential and toxic effects on mammalian cells. The results demonstrated that the ability of zinc to act as an inducer of apoptosis in C6 glial cells. Incubation with 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> caused cell death that was characterized as apoptosis by internucleosomal DNA fragmentation, formation of apoptotic bodies, nuclear fragmentation and breakdown of the mitochondrial membrane potential. ZnCl<sub>2</sub>-induced apoptosis of C6 glial cells was prevented by the addition of *Sibjeondaebotang* and antioxidants including reduced glutathione, N-acetyl-L-cysteine. We further confirmed that ZnCl<sub>2</sub> decreased the intracellular levels of GSH as well as generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in C6 glial cells. In 2D-electrophoresis, computer-assisted comparative analysis of the respective silver stained spot patterns revealed 3 groups with strongly decreased intensity by ZnCl<sub>2</sub>. Whereas, 3 groups with increasing intensity were recovered by *Sibjeondaebotang*. These results suggest that *Sibjeondaebotang* may function as an antioxidant against free radicals and be applicable to the treatment of brain cells against oxidative stress.

**Key words :** *Sibjeondaebotang*(十全大補湯), Oxidative Stress, C6 Glial Cells

### 서론

노화란 인체의 생성과 성장 및 성숙 과정 후 시간의 흐름에 따라 진행되는 일련의 퇴행성 변화로서, 形態的, 機械的으로 쇠퇴하여 사망에 귀착되는 현상을 의미한다<sup>1)</sup>. 서양의학에서 노화에 대한 학설은 노화예정론, DNA설, 면역학적 학설, 자유유리기 학설 등 여러 가지가 있지만<sup>2,3)</sup>, 최근에는 자유유리기에 의한 세포 내의 산화적 손상(free radical injury)이 노화의 중요한 원인이 된다는 견해가 많아져서 자유유리기에 대한 많은 연구가 진행되고 있다<sup>4-7)</sup>. 특히 나이가 증가함에 따라 뇌의 중추신경세포는 대사성 손상을 비롯한 여러 종류의 화학적, 물리적 손상에 아주 민감하여 허혈에 따른 흥분독성이나 자유유리기에 의한 산화적 손상으로 사멸되어 알츠하이머병, 파킨슨병 및 허혈성 뇌졸중 등의 발생 확률이 높아질 수 있다는 것이 밝혀지고 있다.

한의학에서 노화는 腎精不足, 氣血不足, 陰陽失調, 營衛不和, 臟

腑虛弱 등과 관계가 있으며, 특히 腦는 稟受不足하거나 나이가 많아지면서 腎精의 虧虛로 인한 腦海不足과 氣血不足으로 인한 臟腑機能의 失調 등에 의하여 노화가 발생하는 것으로 인식하고 있다.

十全大補湯은 『太平惠民和劑局方』<sup>5)</sup>에 “治男子婦人, 諸虛不足, 五勞七傷, 不進飲食, 久病虛損”이라고 처음 기록된 이후, 氣血虛를 치료하는 대표적인 방제로 임상에 널리 응용되어 왔으며, 현재까지 成長發育 · 生肌 · 세포재생 · 면역항진 · 항암 효과 등이 실험적으로 밝혀지고 있다<sup>6-8)</sup>. 따라서, 氣血을 補하는 작용이 있는 十全大補湯이 뇌의 노화와 관련된 중추신경세포의 산화적 손상에 일정한 효과가 있을 것으로 思料되어 본 연구를 시행하였다. 十全大補湯의 항산화에 대한 실험적 연구는 許<sup>11)</sup>가 十全大補湯이 노화백서의 장기에서 과산화지질 함량, glutathione (GSH) 함량과 catalase, superoxide dismutase(SOD) 활성도에 미치는 영향을 보고하였으나 미토콘드리아 막전위차의 변화 및 단백질 발현변화에 미치는 영향 등 산화적 손상에 대한 방어작용 기전은 아직 연구되지 않았다.

이에 저자는 十全大補湯이 ZnCl<sub>2</sub>에 의해 유도된 신경교세포 내의 산화적 손상에 미치는 영향을 구명하고자 ZnCl<sub>2</sub>의 단독처리와 十全大補湯과의 병행처리에 따른 세포생존율, 염색사 응축과

\* 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 익산한방병원

· E-mail : mbs@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-2264

· 접수 : 2004/05/17 · 수정 : 2004/06/21 · 채택 : 2004/07/15

핵 분절의 발현, caspase-3, -8, 및 -9 protease의 활성화, ROS 생성, 세포내 GSH 함유량, 미토콘드리아 막전위치의 변화 및 단백질 발현변화 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 연구에 사용한 十全大補湯의 처방내용은 東醫寶鑑에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 의산 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 1첩의 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription contents of Sibjeondaabo-Tang Per Pack

本草名	生藥名	學名	分量(g)
人蔘	Ginseng Radix	<i>Panax schinseng</i> Nees	3.75g
白朮	<i>Atractylodes Rhizoma aiba</i>	<i>Atractylodes macrocephala</i> Kordzumi	3.75g
白茯苓	Hoel'on alba	<i>Poria cocos</i> Wolff	3.75g
甘草	Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	3.75g
熟地黄	Rehmanniae Radix	<i>Rehmanniae glutinosa</i> Liboschitz	3.75g
當歸	Angelicae gigantis Radix	<i>Angelica gigas</i> Nakai	3.75g
芍藥	Cnidii Rhizoma	<i>Cnidium officinale</i> Makino	3.75g
白芍藥	Paeoniae Radix	<i>Paeonia japonica</i> Nakai	3.75g
黃芪	Radix Astragal	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	3.75g
肉桂	Cortex Cinnamomi	<i>Cinamomum cassia</i> Presl	3.75g
生薑	Rhizom Zingiberis	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	3.00g
大棗	Radix Glycyrrhizae	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	2.00g
Total amount			42.50g

#### 2) 시약

ZnCl<sub>2</sub>는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)에 용해한 다음 0.2µm filter (Millipore, Bedford, MA, USA)를 이용하여 여과한 후에 사용하였다. 세포배양에 사용한 세포배양판은 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, GSH, NAC, PDTC, catalase, Hoechst 33258, Scopolin, Horseradish peroxidase (HRP), JC-1 및 Rhodamine 123 등은 Sigma사(USA)의 제품을 사용하였고, 세포배양액 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), 우태아혈청(fetal bovine serum) 및 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 검액의 조제

十全大補湯 5첩 분량인 212.5g을 증류수 1ℓ와 함께 3ℓ 환저 플라스크에서 2시간 동안 가열 추출하고 깨끗한 여과지로 여과한 다음, 3,200rpm으로 20분간 원심분리하였다. 이 중 상층액을 농축기(rotary evaporater)로 농축하고 동결건조기로 건조하여 63.75g(수득율: 30%)의 시료를 얻었으며, 시료는 eppendorf tube에 넣어 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 2) 세포배양

신경교세포 C6는 한국 세포주은행(KNCC)에서 분양받아

10cm 세포배양판에 부착한 후 10% 우태아혈청이 포함된 세포배양액 DMEM으로 5% CO<sub>2</sub>, 95% 대기공기 및 37°C가 유지된 세포배양기에서 배양하였다. Trypsin-EDTA를 사용하여 24시간 간격으로 계대배양하였으며, 세포배양액을 교체한 후 안정화 상태에 있는 세포에서 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 세포사멸 현상 및 손상을 회복시키는 十全大補湯과 관련한 생화학적 실험을 수행하였다.

#### 3) 세포생존율 측정

신경교세포 C6를 24 well 세포배양판에 1×10<sup>5</sup> cells/ml씩 분주하여 24 시간 세포배양판에 부착시키고, 안정화된 C6 세포에 ZnCl<sub>2</sub>를 일정시간 처리하여 MTT(0.5mg/ml)와 3시간 반응시켰다. 생존 세포에 의해 MTT로부터 생성된 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 540nm 파장에서 ELISA reader(THERMO max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 대조군 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

#### 4) 핵 염색(Hoechst staining)

세포 핵 형태의 관찰은 4% formaldehyde 용액으로 세포를 고정시킨 다음, PBS로 2번 세척하였다. 핵 염색 시약 Hoechst 33258을 10µM로 희석하여 10분 염색하고, 다시 PBS로 세척한 후 형광현미경(Nikon Eclipse TE 300, Japan)을 이용하여 핵 형태를 관찰하면서 10×10의 배율로 사진을 촬영하였다.

#### 5) DNA 분절현상

DNA 분절현상을 알아보기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard genomic DNA purification kit (Promega Co, Madison, USA)을 이용하였다. 포집된 세포에 nuclei lysis buffer를 첨가하여 세포를 파쇄하고 RNase를 37°C에서 5분간 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하였다. Isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA는 70% 에탄올로 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액 (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)을 가하여 DNA를 용해한 후 260nm와 280nm의 spectrophotometer (Beckman Co, Du-7 Model, Palo Alto, CA, USA)하에서 흡광도를 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5µg을 1.8% agarose gel에서 전기영동(50 voltage, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 등을 이용하여 DNA 분절현상을 관찰하였다.

#### 6) Caspase family cysteine protease 활성도 측정

C6 세포를 4°C에서 30분간 세포파쇄용액(1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol (DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)과 반응 후 14,000rpm으로 15분간 원심분리하여 이 때 얻어진 상층액의 단백질량을 bicinchoninic acid(BCA) 용액을 이용하여 정량하였다. 세포파쇄액(100µg)은 caspase assay buffer(100mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 2mM DTT, pH 7.5)로 희석된 형광 기질(caspase-3: Ac-DEVD-AMC, caspase-8: Z-IETD-AFC, caspase-9: Ac-LEHD-AFC)과 37°C에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer로 caspase 활성을 측정하였다. 이때의 파장은

excitation wavelength(380nm)와 emission wavelength(460nm)를 사용하였다.

7) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성 측정

C6 세포의 상층액을 96 wells 세포배양판에 각각 100 $\mu$ l씩 분주하고 0.2-0.4 $\mu$ M HRP와 1-2 $\mu$ M scopoletin을 실온에서 10분간 반응시켰다. 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 감소된 scopoletin의 형광을 대조군과 비교하여 fluorometer(Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA)로 450nm의 파장에서 측정하여 대조군에 의한 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

8) GSH 함유량 측정

세포배양액을 조심스럽게 제거하고 냉 10% trichloroacetic acid(TCA)를 400 $\mu$ l씩 분주한 후 세포배양판을 10분간 조심스럽게 흔들어 주었다. TCA에 의해 용출된 분획을 모아 원심 분리한 다음, 상층액을 3M NaOH를 사용하여 중성 pH로 조정하였다. 상층액 50 $\mu$ l에 250 $\mu$ l의 5,5'-dithionitrobenzoic acid (0.96mg/ml in 0.1M phosphate buffer pH 7.4, 5mM EDTA)와 250 $\mu$ l의 NADPH (0.59mg/ml)와 450 $\mu$ l의 glutathione reductase (5U/ml)를 첨가하고 실온에서 15분간 반응시킨 다음, ELISA reader를 이용하여 412nm에서 GSH contents를 측정하였다.

9) 미토콘드리아 염색(JC-1, Rhodamine 123 staining)

미토콘드리아만을 특이적으로 염색하는 시약인 JC-1과 Rhodamine 123이 포함된 세포배양액으로 교체해 준 다음, 세포 배양기에서 30분간 반응시킨 후에 세포배양액을 제거하고 세포 표면을 PBS로 3번 세척하였다. PBS를 완전히 제거한 후 C6 세포의 생존한 상태를 유지하기 위하여 슬라이드 글라스로 세포표면을 조심스럽게 덮은 다음, 형광현미경(Nikon Eclipse TE 300, Japan)을 이용하여 10 $\times$ 10의 배율로 사진을 촬영하였다.

10) 2-dimensional gel electrophoresis

(1) 등전위 전기영동(isoelectric focussing)

C6 세포를 포집하여 PBS로 세척한 다음, lysis buffer(8M urea, 4% CHAPS, 50mM DTT, 20mM Tris base, 0.2% ampholyte)를 상온에서 가한 후 5초간 간격으로 30초간 초음파 분해를 한 다음, 13,000rpm(18 $^{\circ}$ C)에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 BCA법으로 정량하였다. 이 상층액과 rehydration buffer(8M urea, 2% CHAPS, 0.2% IPG buffer, bromophenol blue, 18mM DTT)를 rehydration tray에 분주하고, 상용화된 IPG strip(Bio-rad)을 gel면이 sample solution에 닿도록 sliding하였다. mineral oil을 덮어 마르거나 urea가 적출되지 않도록 하고 15시간 방치한 후 strip을 IEF tray에 옮겨 다시 mineral oil을 덮고 IEF를 manual (Bio-rad Co.)에 의거하여 수행하였다.

(2) 2-dimentional electrophoresis(2-D)

IPG strip을 SDS buffer system으로 평형화(equilibration) 후 strip에 SDS equili- bration buffer I (50mM Tris-Cl(pH 8.8), 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromo phenol blue, 2% DTT, 2.5% idoacetamide, 1% DTT)을 충분히 잠기도록 넣고 20분간 반응시킨 후 SDS equilibration buffer II(buffer I + 2.5% Idoacetamide)를 넣고 20분간 반응하여 SDS gel 상단에 었는다. strip을 고정하기 위하여 agarose를 넣어 굳히고 전기영동을 실

시하였다. Polyacryamide gel의 silver staining 은 Pharmacia사에서 제공하는 kit을 사용하였으며, fixation 30분, sensitization 20분, silver impregnation 20분, 마지막으로 development 5분을 수행하였다. Gel의 분석은 imaging system을 이용하여 gel spot을 digital form으로 얻은 후 이를 analysis software PDQUEST(Bio-rad)를 이용하였다.

11) 통계 처리

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하였고, 통계적 유의성 검증은 standard t-test를 이용하였으며, p-value가 최대치 0.01(p<0.01)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

실험성적

1. 十全大補湯이 ZnCl<sub>2</sub>로 인한 세포독성에 미치는 영향

신경교세포 C6에 ZnCl<sub>2</sub>를 농도별, 시간별로 처리하고 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. ZnCl<sub>2</sub> 0.05, 0.1, 0.2, 0.4mM 농도로 8시간 동안 처리한 결과 C6의 세포생존율은 농도의 의존적으로 감소하였다(Fig. 1A). ZnCl<sub>2</sub>에 의한 세포독성의 시간 의존적인 변화를 알아보고자 C6 세포에 ZnCl<sub>2</sub> 0.2mM을 처리한 후 2, 4, 5, 8시간별로 MTT assay를 이용하여 생존율을 관찰하였다. C6에 ZnCl<sub>2</sub> 0.2mM을 처리하고 4시간이 경과하면서부터 세포생존율이 서서히 감소하였으며, 6시간 경과한 후에는 대조군에 비교하여 25%가 감소하였고, 8시간 경과한 후에는 50% 이상 감소하였다(Fig. 1B).

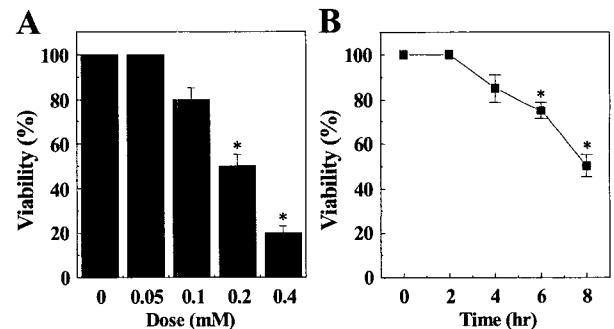


Fig. 1. ZnCl<sub>2</sub> decreased the viability of C6 glial cells in a dose- and time-dependent manner. (A), cells were treated with various concentrations of ZnCl<sub>2</sub> for 8 hr. (B), cells were treated with 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> for the indicated periods. Cell viability was measured by MTT assay. Results represent as the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments. \*, P<0.01.

ZnCl<sub>2</sub>에 의한 C6 세포독성에 대한 十全大補湯의 방어효과를 확인하고자 C6 세포에 ZnCl<sub>2</sub> 0.2mM과 十全大補湯 400, 600, 800 $\mu$ g/ml 농도를 8시간 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 十全大補湯은 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 C6 세포독성을 농도 의존적으로 방어하였으며, 十全大補湯 800 $\mu$ g/ml을 처리하였을 때는 ZnCl<sub>2</sub>을 단독으로 처리한 세포군과 비교하여 세포 생존율이 30% 이상 회복됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한, 다양한 항산화제는 ZnCl<sub>2</sub> 0.2mM 단독처리에 의한 세포독성을 예방하여 정상이었다(Fig. 3).

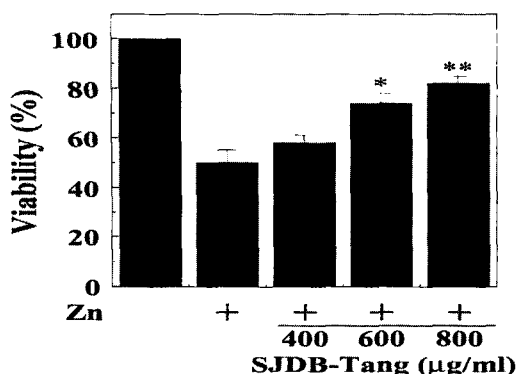


Fig. 2. Sibjeondaabo-Tang protected C6 glial cells from ZnCl<sub>2</sub> cytotoxicity in a dose-dependent fashion. Cells were treated with various concentrations of Sibjeondaabo-Tang and followed by the addition of 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> for 8 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results represent as the mean±S.D. of three experiments. \*, P<0.01, \*\*, P<0.001.

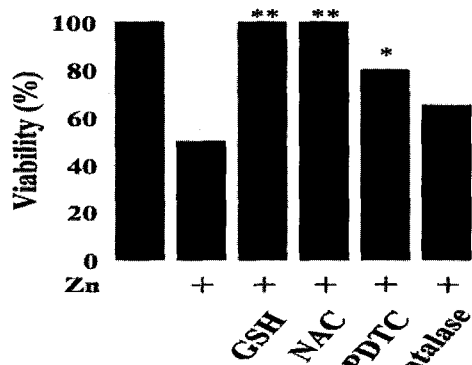


Fig. 3. Antioxidants protected C6 glial cells from ZnCl<sub>2</sub> cytotoxicity. Cells were treated with antioxidants (GSH 10 mM, NAC 10 mM, PDTC 50 mM, catalase 100 U/ml) and followed by the addition of 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> for 8 hr. The viability was measured by MTT assay. Results represent as the mean±S.D. of three experiments. \*, P<0.01, \*\*, P<0.001.

2. 十全大補湯이 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 세포고사에 미치는 영향

ZnCl<sub>2</sub> 세포독성에 의한 형태학적인 변화를 알아보기 위하여 C6 세포에 ZnCl<sub>2</sub> 0.2mM을 8시간 처리한 후 4% paraformaldehyde로 세포를 고정하고, Hoechst 33258로 핵 염색을 시행하였다. 대조군에서는 타원형의 균질한 핵형태의 핵이 관찰되었으나, ZnCl<sub>2</sub> 0.2mM을 처리한 실험군의 핵은 세포고사의 형태학적 특징 중 하나인 염색사 응축(chromatin condensation)과 분절(fragmentation)이 관찰되었다. 그러나 ZnCl<sub>2</sub>과 함께 800μg/ml의 十全大補湯을 8시간 처리한 실험군에서는 전체적으로 염색사의 응축과 핵분절이 현저히 감소하여 대조군과 유사한 핵 형태가 관찰되었다(Fig. 4).

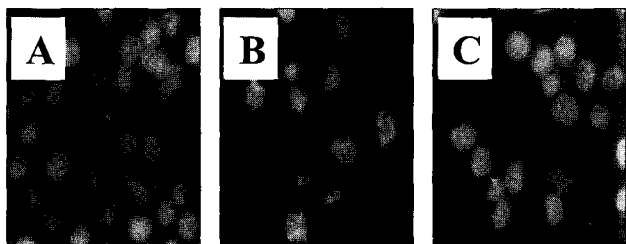


Fig. 4. SJB-Tang protected the nuclear fragmentation of C6 glial cells from ZnCl<sub>2</sub> toxicity. Nuclear fragmentation of C6 glial cells treated with ZnCl<sub>2</sub>, revealed by Hoechst 33258 staining. (A), control cells. (B), cells treated with 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> for 8 hr. (C), cells treated with SJB-Tang (800 μg/ml) and followed by the addition of 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> for 8 hr.

또한 DNA 분절현상을 agarose gel 전기영동 방법으로 확인하기 위하여 genomic DNA를 분리하고 전기영동을 시행한 결과, ZnCl<sub>2</sub> 0.2mM을 처리한 C6 세포에서 사다리 모양의 DNA 분절현상을 관찰할 수 있었으나, 十全大補湯 400, 600, 800 μg/ml과 ZnCl<sub>2</sub> 0.2mM을 함께 처리한 C6 세포에서는 농도 의존적으로 DNA 분절현상이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

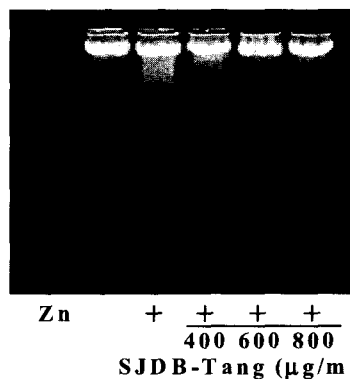


Fig. 5. SJB-Tang inhibited the DNA fragmentation by ZnCl<sub>2</sub> in C6 glial cells. Ladder pattern of DNA fragmentation on ZnCl<sub>2</sub>-induced apoptosis: lane 1), standard DNA size marker, 2), control cells, 3), ZnCl<sub>2</sub>-treated cells, 4-6), treatment of SJB-Tang (400, 600, 800 μg/ml) in ZnCl<sub>2</sub>-treated cells. Genomic DNA was isolated and separated on 1.5% agarose gels. DNA was stained with ethidium bromide and visualized under U.V. light.

3. 十全大補湯이 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 caspase proteases 활성에 미치는 영향

ZnCl<sub>2</sub>에 의한 신경교세포 C6 세포고사 과정에 caspase proteases가 관여하는지를 확인하고자 caspase계 cysteine proteases 중에서 caspase -3, -8, 및 -9 protease의 활성을 조사하였다. Caspase-3를 포함한 -8 및 -9 protease는 유의한 활성을 보이지 않았다(Fig. 6). 이 결과는 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 신경교세포 C6 세포고사 과정에 caspase proteases가 관여하지 않음을 시사하였다.

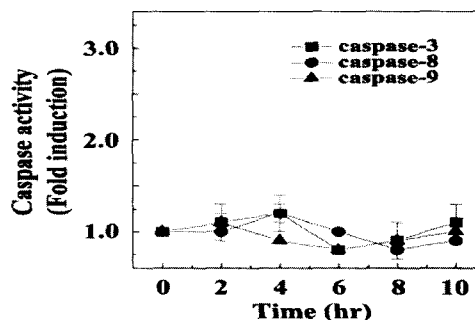


Fig. 6. ZnCl<sub>2</sub> did not affect catalytic activity of caspase-3, -8, and -9 proteases in C6 glial cells. Cells were seeded for 12 hr and followed by the addition of 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> for various periods. Lysate from cells was used to measure activity of caspase-3, -8, and -9 proteases using fluorogenic peptide as a substrate (caspase-3: Ac-DEVD-AMC, caspase-8: Z-IETD-AFC, caspase-9: Ac-LEHD-AFC). Data were represented as a relative fluorescence compared with the control value. Results represent as the mean±S.D. of three independent experiments.

4. 十全大補湯이 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 ROS 생성에 미치는 영향

ZnCl<sub>2</sub>에 의한 신경교세포 C6의 세포고사 과정에 활성산소 종이 관여하는지를 알아보기 위하여 다양한 항산화제와 함께 ZnCl<sub>2</sub>를 처리한 후 생존율을 관찰하였다. 그 결과 Fig. 3에서 항산화제 GSH와 NAC는 0.2mM ZnCl<sub>2</sub> 단독 처리시 감소한 세포생존율을 정상세포와 동일한 수준으로 회복시켰으며, PDTC와 catalase도

十全大補湯이 회복시킨 세포생존율과 비슷한 결과를 보였다. 이 결과는 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 C6의 세포고사 과정에 활성산소종의 작용을 시사하였기 때문에 ZnCl<sub>2</sub> 처리에 의한 C6 세포에서 ROS 생성을 직접 측정하였다. C6 세포에 0.2mM의 ZnCl<sub>2</sub>를 시간별로 처리하고 scopoletin assay를 이용하여 ROS 생성변화를 관찰하였다. 정상세포와 비교하여 0.2mM ZnCl<sub>2</sub> 단독 처리시 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성량은 2시간부터 서서히 증가하기 시작하여 6시간에 1.5배, 8시간에는 1.8배 가량 증가하였다(Fig. 7A). 또한 0.2mM ZnCl<sub>2</sub>와十全大補湯을 400, 600, 800µg/ml 농도별로 처리한 실험군에서는 증가한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성량이 정상세포 수준이었다(Fig. 7B).

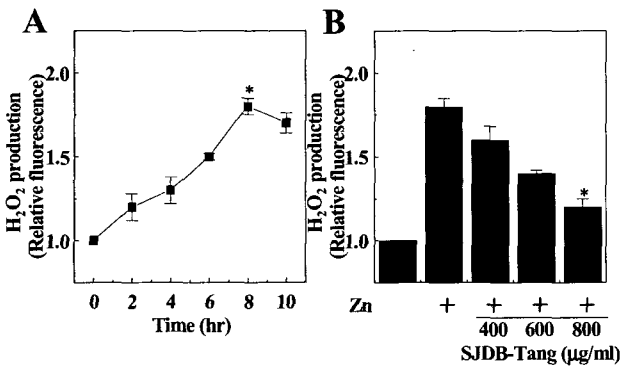


Fig. 7. SJDB-Tang decreased the intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level by ZnCl<sub>2</sub> in C6 glial cells. Cells were treated with 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> for various periods (A). Cells were treated with various concentrations of SJDB-Tang and followed by the addition of 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> for 8 hr (B). Cells were analyzed the intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level by scopoletin assay. \*, P<0.01.

5.十全大補湯이 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 C6 세포내 GSH에 미치는 영향

ZnCl<sub>2</sub>에 의한 세포고사 기전이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성과 같은 산화적 손상과 연관됨을 확인하였으므로 ZnCl<sub>2</sub>가 세포내 GSH 농도에 미치는 효과를 측정하였다. ZnCl<sub>2</sub>(0.2mM)를 C6 세포에 시간별로 처리하여 세포내 GSH의 양을 측정하였다.

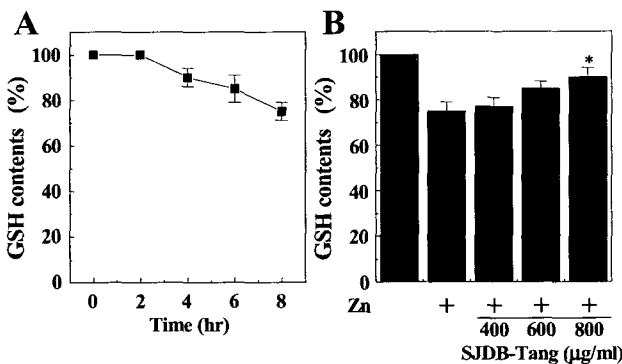


Fig. 8. SJDB-Tang recovered the intracellular GSH content in ZnCl<sub>2</sub>-treated C6 glial cells. Cells were treated with 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> for various periods (A). Cells were treated with various concentrations of SJDB-Tang and followed by the addition of 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> for 8 hr (B). \*, P<0.01.

ZnCl<sub>2</sub>는 C6 세포내 GSH 양을 시간 의존적으로 감소시켜, 4 시간 후에는 정상세포와 비교하여 10% 이상 감소하였으며, 8 시간 후에는 20% 이상 감소하였다(Fig. 8A). 이 결과는 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 C6 세포독성에서 ZnCl<sub>2</sub>가 세포내 GSH의 level을 감소시킴을

의미하였다. 또한 0.2mM ZnCl<sub>2</sub>와十全大補湯을 400, 600, 800µg/ml 농도별로 처리한 실험군에서는 감소된 세포내 GSH 함유량이 정상세포 수준 가까이 회복되었다(Fig. 8B).

6.十全大補湯이 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 미토콘드리아 막전위차 변화에 미치는 영향

세포사멸 과정에 있어서 미토콘드리아는 상당한 손상을 입는다. 미토콘드리아를 특이적으로 염색하는 시약인 JC-1과 Rhodamine 123을 이용하여 대조군과 ZnCl<sub>2</sub>(0.2mM)을 8시간 처리한 실험군에 미토콘드리아 막전위의 변화를 관찰하였다. JC-1으로 염색한 경우(upper panel), 대조군 C6 세포의 미토콘드리아는 핵 주위로 분포되어 있고, JC-1의 정상적인 형광인 오렌지색을 띄고 있었으며, ZnCl<sub>2</sub> 처리군 C6 세포의 미토콘드리아는 형광이 녹색으로 변해있음을 관찰할 수 있었다. Rhodamine 123으로 염색한 경우(low panel), 대조군 C6의 미토콘드리아가 세포질에 국한되어 점을 찍은 듯이 모여있으며(punctuated form), ZnCl<sub>2</sub> 처리군 C6 세포의 미토콘드리아에서는 세포질과 핵 전체에 퍼져 있음(diffused form)을 관찰할 수 있었다(Fig. 9B). 이 결과는 ZnCl<sub>2</sub> 처리에 의한 대조군 C6 세포의 미토콘드리아 막전위에 변화가 있음을 의미하였다. 다음으로 C6 세포에 ZnCl<sub>2</sub> 0.2mM과十全大補湯 800µg/ml을 8시간 처리하여 미토콘드리아의 막전위 변화를 관찰한 결과 정상수준으로 회복되었다(Fig. 9C).

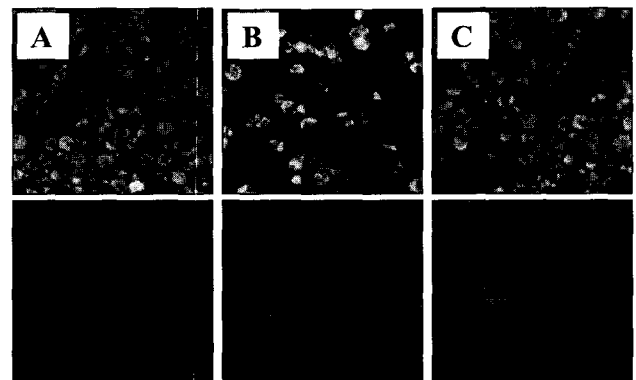


Fig. 9. SJDB-Tang protected the change of mitochondrial permeability transition (MPT) by ZnCl<sub>2</sub> in C6 glial cells. Cells were treated with 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> for 8 hr. Others were treated with SJDB-Tang (800 µg/ml) and followed by the addition of 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> for 8 hr. Mitochondria were stained with JC-1(upper panel) and Rhodamine 123(low panel). (A), control cells, (B), cells treated with 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> for 8 hr, (C), cells treated with SJDB-Tang (800 µg/ml) and followed by the addition of 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub>.

7.十全大補湯이 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 단백질 발현변화에 미치는 영향

ZnCl<sub>2</sub>에 의한 신경교세포 C6의 단백질 발현변화와十全大補湯의 효과를 알아보고자 2-dimensional 전기영동으로 단백질 발현변화를 관찰하였다. 대조군 C6 세포와 0.2mM ZnCl<sub>2</sub>를 8시간 처리한 실험군 세포의 단백질 발현을 비교하기 위하여 silver 염색정도가 현저히 차이나는 spot을 Gate로 나누어 그룹 지었다(Fig. 10). 이 가운데 ZnCl<sub>2</sub> 처리에 의해 감소된 Gate 1과 Gate 2의 spots이十全大補湯을 처리한 실험군에서는 다시 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 11). 전체적으로 ZnCl<sub>2</sub> 단독 처리군은 silver 염색에 의해 spot의 발현이 감소되었으며,十全大補湯과

ZnCl<sub>2</sub>를 함께 처리한 실험군은 정상세포와 같은 수준으로 spot의 발현이 다시 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 11, 12).

## 고찰

노화현상의 기본적인 변화는 세포 분열, 세포 성장과 조직 회복력의 감소, 세포의 위축과 변성, 조직의 탄성 감소와 탄성 결합조직의 변성, 신경계의 퇴행성 변성과 신경·근 반응속도의 감소, 골 강도와 내성감소, 기초대사율 저하, 및 점진적인 조직 탈수장에 등으로 볼 수 있다. 나이가 증가함에 따라 나타나는 뇌 구조의 변화와 기능 감소는 뇌의 노화에 따른 신경계 질환을 유발시키므로 점점 더 사회적인 문제로 관심이 모아지고 있으나, 신경계 질환은 그 중요성에도 불구하고 효과적인 치료가 불가능한 것으로 인식되어 기초의학 및 임상적 연구의 중심적 영역에서 소외되어 왔다. 그러나, 다행히 최근에 여러 신경계 질환들의 병리적 기전들이 분자생물학의 발달로 인해 점차 밝혀지고 있다<sup>12)</sup>. 많은 신경계 질환의 증상 발현에는 중추신경세포의 사멸이 주요한 원인으로 신경세포들이 선택적으로 퇴행, 사멸함으로써 신경세포의 인지 및 기능에 이상이 생겨 신경계 질환이 유발된다고 알려져 있다. 중추신경 세포들은 대사성 손상을 비롯한 여러 종류의 화학적, 물리적 손상에 아주 민감하며 간세포나 근육에는 전혀 손상을 입지 않는 짧은 시간 동안의 허혈로 과다 방출된 아미노산 글루타메이트(glutamate)에 의해 흥분독성(excitotoxicity)이 이루어지고, 신경세포는 비가역적인 손상을 입게 된다. 현재 많은 연구에서 이러한 흥분독성이 신경세포 사멸의 주요 기전으로 인식되고 있지만, 흥분독성 이외에 직접적인 산화적 손상도 중추신경 세포 사멸의 중요한 기전의 하나로 논의되고 있다.

한의학에서는 노화의 기전에 대하여 『素問·陰陽應象大論』<sup>13)</sup>에서 “年四十, 而陰氣自半也, 起居衰矣. 年五十, 體重, 耳目不聰明矣. 年六十, 陰痿, 氣大衰, 九竅不利”라 하였고, 『靈樞·天年篇』에 “血氣虛, 脈不通, 眞邪相攻, 亂而相引, 故中壽而盡也”라 하였고, 『靈樞·營衛生會篇』에서는 “壯者之氣血盛, 其肌肉骨, 氣道通, 營衛之行, 不失其常……老者之氣血衰, 其肌肉枯, 氣道澁, 五臟之氣相搏, 其營氣衰少”라 하여 年齡의 증가에 따라 氣血이 不足하게 되어 身體의 각 부분에 이상 변화가 생기고, 오장기능의 협조가 순조롭지 못하게 됨을 설명하고 있다. 뇌에 대하여 『靈樞·海論篇』에서는 “腦爲髓之海”라 하였고, 『類經·失寸失強者死篇』에서는 “五臟六腑之精氣, 皆上升于頭以成七竅之用 故爲精明之府”라 하여 精神, 意識, 思惟, 聰明 등의 정신활동을 주관하는 중추로 인식하고 있다<sup>15)</sup>. 뇌의 노화는 『靈樞·海論篇』에 “髓海有餘, 則輕勁多力, 自過其度; 髓海不足, 則腦轉耳鳴, 脛痠眩暈, 目無所見, 解脛安臥.”라고 하여 腦髓의 充足與否가 정신 및 신체활동의 老衰와 관련되어 있음을 기술하고 있으며, 뇌의 기능이 失調되거나 減退되면 眩暈, 耳鳴, 失眠, 虛勞, 健忘, 痴呆 등의 임상증상이 나타난다고 하였고<sup>16)</sup>, 그 원인은 稟受不足, 情緒의 影響, 年高體弱에 따른 腎精虧虛과 氣血不足으로 인한 臟腑機能의 失調, 瘀血內阻 등이 제시되고 있다. 氣血의 기능에 대하여 『難經·二十二難』에 “氣主煦之. 血主濡之”라 하여 氣의 작용은 주로 인체를 溫煦하게 하는 것이며, 血의 작용은 주로 筋骨臟腑를 濡養하는 것으로 氣와 血의 기능상 차이를 설명하고 있다<sup>17)</sup>. 『素問·調經論』<sup>13)</sup>에서는 “血氣不和, 百病乃變化而生”이라 하였는데, 氣와 血 사이의 相互依存, 相互爲用

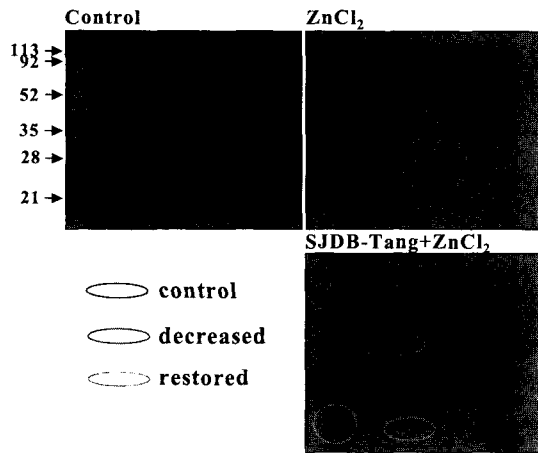


Fig. 10. Silver-stained 2D gel of total proteins from C6 glial cells. Cells were treated with 0.2 mV ZnCl<sub>2</sub> for 8 hr. Others were treated with SJDB-Tang (800 μg/ml) and followed by the addition of 0.2 mV ZnCl<sub>2</sub> for 8 hr. Then, cell lysates were quantified by Bradford method and the Molecular imager FX multimager system (BioRad). Significant spots were gated by computer analysis.

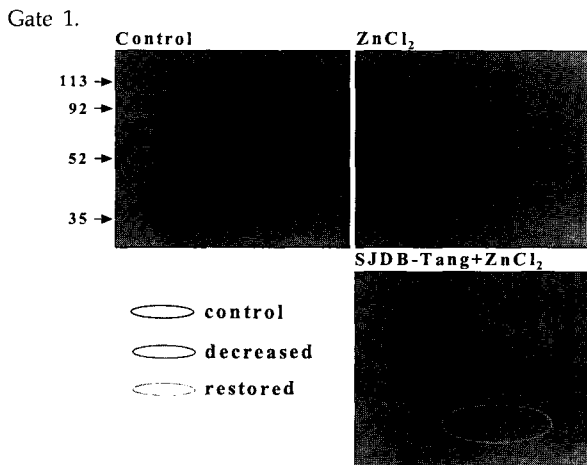


Fig. 11. Silver-stained 2D gel of total proteins from C6 glial cells. After silver staining, gels were scanned using the Max scan system(BioRad). Significant spots were gated in gate by computer analysis (Gate 1 and Gate 2) was labelled.

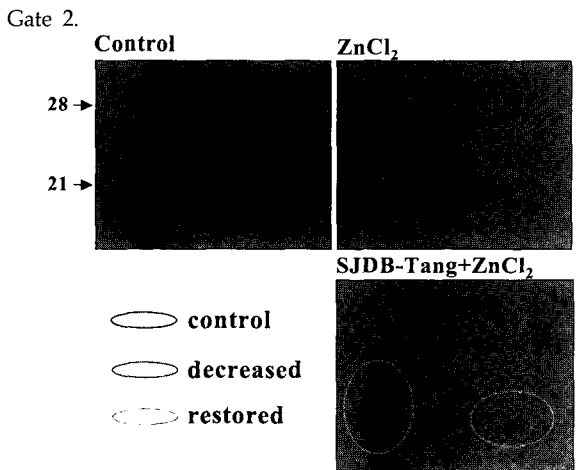


Fig. 12. Silver-stained 2D gel of total proteins from C6 glial cells. After silver staining, gels were scanned using the Max scan system (BioRad). Significant spots were gated in gate by computer analysis (Gate 1 and Gate 2) was labelled.

관계가 失調될 때는 氣血不和로 인하여 각종 질병이 발생한다<sup>18)</sup>. 氣血不足하면 失眠, 多夢, 心悸, 健忘, 肢體麻木, 運動不便 등의 증상이 나타날 수 있고, 氣虛하면 氣의 推动作用이 무력해지고 血行이 느려져 뇌에 血瘀가 발생하여 뇌의 노화가 발생하기 쉽다.

十全大補湯은 氣血不足으로 인한 久病虛勞, 五勞七傷, 自汗盜汗, 虛勞咳嗽, 食少遺精, 脚膝無力, 瘡瘍不斂, 婦女崩漏, 失血等症에 사용되고 있으며, 小兒解脛, 癰疽潰後, 수술 후의 排膿, 척추염, 백혈병, 폐결핵, 자궁암, 갱년기장애, 신경쇠약 등 많은 질환에 활용되고 있다<sup>7-10,19)</sup>.十全大補湯의 처방은 四君子湯과 四物湯의 合方인 八物湯에 肉桂·黃芪를 加하여 구성되어 있으며, 四君子湯의 구성약물인 人蔘·白朮·白茯苓·甘草는 氣를 補하고 비위활동을 잘하게 하고, 四物湯의 구성약물인 當歸·白芍藥·川芎·熟地黃은 血을 만들고 그 枯燥를 潤滑하게 하여 心과 肝의 기능을 왕성하게 하고, 肉桂·黃芪는 四君子湯·四物湯의 작용을 보강한다<sup>19,20)</sup>.

이에 저자는 十全大補湯이 노화의 원인이 되는 세포내의 산화적 손상에 미치는 영향을 구명하고자 신경교세포 C6 세포에 ZnCl<sub>2</sub>를 처리하여 어떠한 산화적 손상이 유발되는 지를 알아보고, 이에 대한 十全大補湯의 방어효과를 관찰하였다.

중추신경계에 존재하는 ZnCl<sub>2</sub>는 많은 종류의 단백질들이 제 기능을 수행하는데 필요한 금속으로 특히 뇌의 정상 기능에 중요한 역할을 하는데, 다른 금속에 비하여 비교적 독성이 적다고 알려져 있으나, 최근 여러 증거들이 특정 신경계 질환에서 ZnCl<sub>2</sub>가 세포사멸의 주된 원인으로 작용하리라는 것을 시사하면서 세포 내 ZnCl<sub>2</sub>의 유입으로 인한 체내 독성 및 반응에 관심이 모아지게 되었으며, 일차적으로 발생하는 면역계 독성반응과 함께 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 뇌 신경계 세포에서의 독성과 신경계 질환과의 관련성에 많은 관심이 집중되고 있다. 즉, 중추신경세포 발달에는 상당량의 ZnCl<sub>2</sub>가 시냅스 소포체 안에서 존재하고 신경세포 활동과 함께 세포 밖으로 방출되는데, 방출된 ZnCl<sub>2</sub>의 일부는 칼슘 통과이온 통로를 통하여 시냅스 이후 신경세포로 이동하게 되고 이때 과다한 양의 ZnCl<sub>2</sub>가 세포 내로 유입되면 신경세포 사멸의 원인이 된다. ZnCl<sub>2</sub>의 유입이 세포 안에서 어떠한 대사적 경로를 통하여 신경세포 사멸을 일으키는지는 아직 명확히 알려져 있지는 않지만 아마도 자유라디칼 생성에 의한 산화적 손상이 관여한다고 보여지고, 이러한 세포손상 기전들이 단독 또는 복합적인 기전으로 작용함으로써 신경세포 사멸을 초래하여 신경계 질환들이 유발된다고 보고되고 있다. 세포 내 ZnCl<sub>2</sub>의 유입으로 인한 세포 독성 및 작용기전에 관심이 모아지기 시작하면서 특히 체내 일차적인 방어작용을 담당하는 면역체계에서 ZnCl<sub>2</sub>의 독성기전 연구가 이루어지고 있고 여기에 세포고사(apoptosis)가 관여한다는 연구결과들이 제시되면서 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 세포고사 기전에 많은 관심이 집중되고 있다<sup>21)</sup>. ZnCl<sub>2</sub>에 의한 신경세포 사멸이 어떤 형태로 나타나는지에 대하여는 이견이 있으나, 고농도의 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 신경세포 사멸은 확실한 세포괴사(necrosis)이지만 저농도에서 서서히 진행되는 신경세포 사멸은 세포고사(apoptosis)라고 보고되고 있다. ZnCl<sub>2</sub>에 의한 신경세포 사멸원인의 하나는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이며, 활성산소종에 의하여 유

도되는 세포사멸은 산화적 손상의 정도에 따라서 세포괴사와 세포고사를 유발한다<sup>22)</sup>. 이러한 활성산소종은 singlet 산소를 함유하고 있는 물질을 총칭하는 명칭으로 superoxide anion(O<sup>2-</sup>), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical(OH) 외에도 lipid peroxide, nitric oxide(NO), peroxyxynitrite(ONOO), thiol peroxy radical(RSOO) 등이 활성산소종에 속한다. 활성산소종 중에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 가장 주목을 받고 있는 이유는 구리나 철과 같은 전이금속과 반응하지 않으면 상대적으로 안정되어 쉽게 세포막을 통과할 수 있으므로 외부자극에 반응하여 빠른 시간 내에 생성·소멸되어야 하는 신호전달물질로 적합하기 때문이며, 호기성 생물의 대사과정 산물인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 fenton 반응을 통하여 hydroxyl radical로 전환되어 여러 생체 조직에 손상을 일으킬 수 있는 생체 독성물질임이 이미 알려져 있다<sup>23,24)</sup>.

따라서, 본 연구에서는 산화적 손상을 일으키는 활성산소종의 하나인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 신경교세포 C6에서 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 세포사멸에 미치는 영향과 이에 대한 十全大補湯의 효과를 조사하였다. 뇌에 ZnCl<sub>2</sub>가 축적되면 뇌 신경세포와 주변세포에 독성을 유발한다는 많은 보고들이 있다. ZnCl<sub>2</sub>에 의한 신경세포 독성은 핵 분절 및 DNA 분절현상을 통한 세포고사 기전으로 보고되어 있는데<sup>25)</sup>, 이러한 ZnCl<sub>2</sub>의 독성은 신경세포를 지지하는 신경교세포 C6에서도 마찬가지로 농도 의존적, 시간 의존적으로 세포독성을 보여 선명한 사다리 모양의 DNA 분절현상과 염색질 응축현상을 수반하는 세포고사를 확인할 수 있었으며, ZnCl<sub>2</sub>의 세포독성을 十全大補湯이 농도 의존적으로 감소시키고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 ZnCl<sub>2</sub>의 세포독성 기전은 세포내에서 활성산소종을 생성하여 세포에 산화적 손상을 초래한다.

본 연구에서도 신경교세포 C6에 ZnCl<sub>2</sub>를 단독 처리한 실험군은 정상 대조군과 비교하여 1.8배 이상의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생성하였다. GSH, NAC, PDTC 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 대사효소인 catalase와 같은 항산화제를 ZnCl<sub>2</sub>와 같이 처리한 실험군은 세포생존율을 정상 대조군 수준으로 유의하게 회복시켰다. 또한, ZnCl<sub>2</sub>를 단독 처리한 실험군은 정상 대조군과 비교하여 세포내 GSH 함유량이 20% 감소되었다. 이 결과는 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 신경교세포 C6의 세포사멸이 세포내 GSH 함유량의 감소 및 세포독성을 초래하는 활성산소종 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 증가에 의하여 매개되어지는 산화적 손상 기전임을 시사한다. 실제로 세포내 GSH 함유량이 ZnCl<sub>2</sub> 처리 후 시간 의존적으로 감소하였고, ZnCl<sub>2</sub> 처리 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양이 증가함을 확인하였다. 또한 十全大補湯이 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성과 세포내 감소된 GSH 함유량을 농도 의존적으로 유의하게 방어하고 있음을 관찰하였다. 세포고사가 일어나는 세포의 미토콘드리아는 치명적인 손상을 입는데, 그 손상은 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 세포질로 방출하고 방출된 cytochrome c와 Apaf-1(apoptotic protease activating factor-1)이 caspase-9 protease를 활성화시키고, 활성화된 caspase-9 protease가 caspase-3 protease를 활성화시킨다. 하지만 본 연구에서는 JC-1, Rhodamine 123을 이용하여 미토콘드리아만을 염색한 결과, caspase proteases의 활성변화 없이 미토콘드리아 막전위 변화가 관찰되었으며, 十全大補湯이 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 미토콘드리아 막

전위의 변화를 유의하게 회복시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 세포고사를 조절하는 유전자 중의 하나인 Bcl-2 family는 크게 두 부류로 나누어지며 세포사멸을 억제하는 기능과 세포사멸을 촉진하는 기능을 가진다<sup>26-29</sup>. 본 연구에서는 세포고사를 조절하는 중요한자인 caspase proteases의 활성을 경유하지 않으면서 미토콘드리아 막전위에 변화를 가져온 단백질들을 찾고자 2-dimensional 전기영동을 통한 단백질 발현변화를 관찰하였다. 정상 대조군과 비교하여 ZnCl<sub>2</sub> 단독 처리군은 silver 염색에 의해 spot의 발현이 전체적으로 감소하였다. Gate 1과 Gate 2의 ZnCl<sub>2</sub>를 단독 처리한 실험군을 보면, Gate 1에서 35-52kDa 사이의 spot들이 많이 감소하였고, Gate 2에서 20kDa 주변의 spot들이 많이 감소한 것을 알 수 있었다. 이 결과는 20-29kDa 크기의 Bcl-2 family 중 세포사멸 촉진기능을 하는 Bad, Bak, Bid, Bim 등과 같은 단백질이 cytochrome c의 방출을 촉진하고 미토콘드리아 막전위를 변화시켜 세포고사를 유도하였을 가능성을 시사하는데,十全大補湯과 ZnCl<sub>2</sub>를 함께 처리한 실험군에서는 정상 대조군과 비슷한 수준으로 전체적으로 spot의 발현이 다시 회복되었다.

이상의 결과를 종합해 보면十全大補湯은 ZnCl<sub>2</sub>에 유발된 신경교세포 내의 염색사 응축과 핵 분열의 감소, ROS 증가, 세포내 GSH 함유량 감소, 미토콘드리아 막전위차의 변화, 및 단백질 발현변화와 같은 산화적 손상을 방어하는 효과가 있음을 알 수 있었으며, 이외의 작용기전에 대하여는 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

ZnCl<sub>2</sub>에 의한 신경교세포 C6의 세포독성과十全大補湯의 방어효과에 관한 실험을 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

十全大補湯은 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 C6의 세포독성을 농도 의존적으로 방어하였다.十全大補湯은 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 C6의 세포고사 현상을 억제하였다.十全大補湯은 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 C6 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성량의 증가를 유의하게 억제하였다.十全大補湯은 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 C6 세포내 GSH 함유량의 감소를 일정수준 회복시켰다.十全大補湯은 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 미토콘드리아 막전위 변화를 정상세포 수준으로 회복시켰다.十全大補湯은 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 단백질 발현변화를 유의하게 회복시켰다.

이상의 결과로 보아十全大補湯은 자유유리기에 의한 C6 신경교세포의 산화적 손상을 방어하는 효과가 있으므로 임상에서 뇌의 산화적 손상으로 인한 질환의 예방 및 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 조유향. 노인보건. 서울: 현문사, p.43-49, 1995.
2. 배철영, 이영진. 노인의학. 서울: 고려의학, p.21, 24-27, 30-31, 1996.
3. 杜建主. 中西醫臨床老年病學. 北京: 中國中醫藥出版社, p.9-13, 1998.
4. 施紀·周康. 臨床中醫腦病學. 北京: 上海堯成印刷所, p.11-12, 267-268, 1997.

5. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北: 旋風出版社, p.318, 1975.
6. 金吉萱 등.十全大補湯 Extract 투여가 Rat의 성장에 미치는 영향. 慶熙韓醫大論文集, 1(1):101, 1978.
7. 辛美香.十全大補湯이 生肌作用에 미치는 影響. 大田大學校 大學院. 1993.
8. 韓東元.十全大補湯加味方이 Hydrogen Peroxide에 의해 損傷된 培養 育髓感覺細胞에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院. 2001.
9. 金在燮.十全大補湯 煎湯역기스가 생쥐의 細胞性 및 體液性 免疫反應에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院. 1984.
10. 辛京兒.十全大補湯加味方이 마우스의 食食細胞機能 및 腫瘍 免疫反應에 미치는 영향. 圓光大學校 大學院. 1998.
11. 許竣寧.十全大補湯의 抗酸化作用에 관한 研究. 大田大學校 大學院. 2000.
12. Dugan L.L, Sensi S.L, Canzoniero L.M.T and Choi D.W. Mitochondria production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. J Neurosci 15:6377-6388, 1995.
13. 洪元植 編. 黃帝內經素問. 서울: 傳統文化研究會, p.46, 345, 1993.
14. 張介賓. 類經(下). 서울: 大星文化社. p.411, 1990.
15. 許美晶 外. 內經의 腦學說에 대한 文獻的 考察. 惠和醫學. 6(1):175-200, 1997.
16. 郭宇鵬 등. 謝海洲治療腦萎縮經驗. 中醫雜誌. 38(10):586-587, 1997.
17. 최승훈. 難經入門. 서울: 범인문화사. p.136-137, 1998.
18. 羅昌洙 등. 한의학 기초 이론. 서울: 醫聖堂. p.481-482, 2000.
19. 矢敷導明. 韓方處方解說. 大邱: 東洋綜合通信教育院出版部. p.267-277, 1986.
20. 許濟群·王綿之. 中醫方劑學. 서울: 陰陽脈診出版社. p.188-289, 1977.
21. 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 187:1256-1261, 1992.
22. Shirlee Tan, Yutaka Sagara, Yuanbin Liu. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. J Cell Biol 141:1413-1432, 1998.
23. Bae Y.S, Kang S.W, Seo M.S, Bains I.C, Tekle E, Chock P.B., Rhee S.G. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. J Biol Chem 272:217-221, 1997.
24. Sundaresan M, Yu Z.Y, Ferrans V.J, Irani K. and Finkel T. Requirement for Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for Platelet Derived Growth Factor Signal Transduction. Science 270:296-299, 1995.
25. Dipasquale B, Marini A.M, Youle R.J. Apoptosis and DN degeneration induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in neurons. Biochem Biophys Res Commun 181:1442-1448, 1991.
26. Liu D, Lu C, Wan R, Auyeung W.W, Mattson M.P. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. J Cereb Blood Flow Metab 22(4):431-443, 2002.



27. Gibson E.M, Henson E.S, Villanueva J, Gibson S.B. MEK kinase 1 induces mitochondrial permeability transition leading to apoptosis independent of cytochrome c release. *Biol Chem* 277(12):10573-10580, 2002.
28. Thomas D.A, Scorrano L, Putcha G.V, Korsmeyer S.J, Ley T.J. Granzyme B. can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX and BAK. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(26):14985-14990, 2001.
29. Zhang H, Holzgreve W, De Geyter C. Bcl-2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. *Hum Mol Genet* 10(21):2329-2339, 2001.