동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 20. No. 1, 2009

歸脾湯과 歸脾湯加味方의 항산화 효과 및 6-Hydroxydopamine에 대한 PC12 세포 보호효과 비교연구

임재환, 김종우, 정선용, 조성훈, 오명숙*, 황의완
경희대학교 한의과대학 한방신경정신과 교실, 경희대학교 약학대학 한약학과*

The Antioxidative and Neuroprotective Effect of *Guibi-tang(Guipitang)* and *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)* on PC12 cells.

Jae-Whan Lim, Jong-Woo Kim, Sun-Yong Chung, Sung-Hoon Cho, Myung-Sook Oh*, Wei-Wan Hwang
Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University
Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung-Hee University*

Abstract

Objectives :
This Study was performed to assess the antioxidative and neuroprotective effect of *Guibi-tang(Guipi-tang)* and *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)* on PC12 cells.

Methods :
The antioxidative effect was investigated through the DPPH radical and ABTS cation scavenging methods and total polyphenol amount of *Guibi-tang(Guipitang)* and *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang).* The neuroprotective effect of *Guibi-tang(Guipitang)* and Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang) was assessed using MTT assay in PC12 cells. The scavenging effect of *Guibi-tang(Guipitang)* and *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)* on NO and ROS production induced by 6-OHDA in PC12 cells was evaluated, as well as the attenuating effect of *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)* on GSH reduction.

Results :
1. *Guibi-tang(Guipitang)* and *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)* had concentration-dependent scavenging activities of DPPH radical.

투고일 : 2/10 수정일 : 3/4 채택일 : 3/8
교신저자 : 황의완, 서울특별시 동대문구 회기동 경희의료원 한방병원 한방신경정신과
Tel : 02-958-9188, Fax : 02-958-9189, E-mail : aromaqi@khu.ac.kr

2. *Guibi-tang(Guipitang)* and *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)* had concentration-dependent scavenging activities of ABTS cation.
3. Total polyphenol amount of *Guibi-tang(Guipitang)* and *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)* was calculated 79.10±2.20 ㎍/10 ㎎ and 121.03±1.11 ㎍/10 ㎎, respectively.
4. Cell viability of *Guibi-tang(Guipitang)* was increased in a dose dependent manner. *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)* was increased at low concentrations, but decreased at high concentrations.
5. In *Guibi-tang(Guipitang)*, cell viability of PC12 cell treated with 6-OHDA was decreased by pre-treatment, and increased by post- and co- treatment. Cell viability of *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)* showed variable effects by pre-treatment, but increased by post- and co- treatment.
6. NO production rate of *Guibi-tang(Guipitang)* didn't show a significant effect, but that of Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang) was decreased in a dose dependent manner.
7. ROS production rate of *Guibi-tang(Guipitang)* was decreased at some concentrations. In *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)*, ROS production rate was decreased at high concentrations.
8. *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)* protected the 6-OHDA-induced GSH reduction.

Conclusions :
These results demonstrate that both *Guibi-tang(Guipitang)* and GBTGMB have antioxidative and neuroprotective effect, but *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)* has more antioxidative and neuroprotective effect than *Guibi-tang.*

Keywords :
Guibi-tang(Guipitang), *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)*, Antioxidative, Neuroprotective

Ⅰ. 서 론

활성산소(reactive oxygen species : ROS)란 산소가 가지는 화학적 특성으로 인하여 생성되는 산소 프리라디칼(oxygen free radical) 및 이것으로부터 유래된 일군의 산소화합물을 일컬으며 이들은 모두 반응성이 크다는 공통적인 특징을 갖고 있다[1]. 보통 Superoxide radical(O_2^-), Hydroxyl radical(OH), Hydrogen peroxide(H_2O_2), Singlet oxygen ($^1O_2$) 등을 ROS라 하며, 이들은 모두 반응성이 커서 생체 내의 단백질, 지질, DNA, 혈액, 근육 및 뼈 등을 산화시키며 손상을 준다[2]. ROS는 주로 세포막의 불포화지방산들과 결합하여 지질과산화(lipid peroxidation) 반응을 일으키며, 세포 내의 산화적 손상(oxidative damage)을 야기하여[3-6] 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자가면역질환 등의 각종 질병의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[7,8].

ROS에 의한 세포의 피해는 괴사(necrosis)와 자연사(apoptosis)라는 두 가지 형태로 나타난

다[9]. 자연사(apoptosis)는 특징적으로 세포핵의 변화, 크로마틴의 생화학적 변화를 동반하며 암, 뇌질환 등 여러 질병에 영향을 미치는데, 고농도의 ROS에 의해 세포내의 미토콘드리아가 손상 받아 미토콘드리아의 막전위가 감소되면 early apoptosis가 유발된다. 이러한 기전의 세포사는 신경전달 실조와 신경퇴화를 유발하여 파킨슨병, 알츠하이머병과 같은 신경퇴행성 질환을 야기한다[10]. 대표적인 신경퇴행성 질환인 파킨슨병의 발병원인 중 하나는 dopamine(DA)의 대사과정에서 발생하는 ROS이고, 이 ROS가 substantia nigra pars compacta(SNpc)부위의 dopaminergic neuron을 사멸시키고, 이에 따라 striatum에서 DA deficiency를 초래하게 되어 파킨슨병이 발병하게 된다[11].

歸脾湯은 宋代 嚴用和[12]가 처음 창방한 것이며, 明代 薛己[13]가 當歸와 遠志를 첨가하여 완성된 것으로, 東醫寶鑑[14] 內經篇의 神門에 憂思로 因하여 心脾의 二臟을 勞傷하여 발생한 健忘과 怔忡을 치료한다고 소개되어 있고, 최근 歸脾湯은 뇌신경계 질환, 심인성 질환에 광범위하게 활용되고 있다[15-18]. 또한, 歸脾湯에 대해서 박[19]의 歸脾湯 및 그 구성 약물군이 抗酸化 效果에 미치는 영향, 박[20]의 脾機能이 학습과 기억에 미치는 영향에 대한 실험적 연구, 강[21]의 歸脾湯이 glutamate에 의한 C6 glial cell의 apoptosis에 미치는 영향, 전[22]의 歸脾湯이 glutamate에 의한 성상세포의 손상에 미치는 영향, 오[23]의 歸脾湯이 흰쥐의 기억력 향상과 해마부위의 세포증식에 미치는 영향에 대한 연구 등의 항산화 효과 및 뇌기능 관련 연구가 많이 있었다. 이에 본 연구에서는 歸脾湯과 항산화 효과가 우수한 山茱萸[24], 五味子[25,26]가 가미된 歸脾湯加味方의 항산화 효과, 뇌세포 보호효과를 비교해서 알아보기 위한 연구를 시행하였다.

본 연구에서 항산화 효과 측정은 항산화 활성 연구에 보편적으로 쓰이는 DPPH radical 및 ABTS cation 소거 작용 측정법을 사용하였고, 항산화 효과의 지표로 많이 사용되는 총 폴리페놀 함량을 측정하여 평가하였다. 뇌세포 보호효과 측정은 PC12 세포에 신경퇴행성 질환인 파킨슨병의 모델에서 toxin으로 사용되는 6-OHDA과 약물을 투여하고 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였으며, nitric oxide(NO) 및 ROS 생성량의 변화와 glutathione(GSH) 함량 변화를 함께 측정하여 뇌세포 보호효과를 평가한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 歸脾湯은 동의보감의 처방에 의해 구성되었으며, 歸脾湯加味方은 歸脾湯에 山茱萸, 五味子를 가미한 처방이다. 각 약재들은 정도약업사(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 약재의 구성 및 용량은 다음과 같다(Table Ⅰ, Ⅱ).

2) 시료제조

歸脾湯 및 歸脾湯加味方 구성약재 40.2 g, 56.2 g에 70% ethanol 402 mL, 562 mL를 각각 가하여 상온에서 24 시간 동안 stirring 상태에서 침출시킨 후 여과하였다(Whatman filter paper #2). 여액을 50℃에서 감압 농축(Rotavapor R-200, heating bath B-490, BUCHI; Flawil, Swizerland)한 후 동결건조(Eyela FDU-550R; Tokyo, Japan)하여 -20℃에서 보관하였다. 매 실험시 적절한 용매에 용해

Table Ⅰ. The Composition of *Guibi-tang(Guipitang)*

Herbs	Pharmaceutical Name	Scientific Name	Amount(g)
當歸	*Angelicae Gigantis Radix*	Angelica gigas Nakai	4
龍眼肉	*Longanae Arillus*	Dimocarpus longan Lour	4
酸棗仁	*Zizyphi Semen*	Zizyphus jujuba Miller	4
遠志	*Polygalae Radix*	Polygala tenuifolia Willd	4
人蔘	*Ginseng Radix Alba*	Panax ginseng C. A. Mey	4
黃芪	*Astragali Radix*	Astragalus membranaceus Bunge	4
白朮	*Atractylodis Rhizoma Alba*	Astractylodes macrocephala Koidz	4
茯神	*Hoelen Cum Radix*	Poria cocos Wolf	4
木香	*Aucklandiae Radix*	Saussurea costus Lipsch	2
甘草	*Glycyrrhizae Radix*	Glycyrrhiza uralensis Fisch	1.2
生薑	*Zingiberis Rhizoma Crudus*	Zingiber officinale Roscoe	3
大棗	*Zizyphi Fructus*	Zizyphus jujuba var. inermis Rehder	2
Total			40.2

Table Ⅱ. The Composition of *Guibi-tang gamibang(Guipitang jiaweifang)*

Herbs	Pharmaceutical Name	Scientific Name	Amount(g)
	GBT		40.2
山茱萸	*Corni Fructus*	Cornus officinals Siebold et Zucc	8
五味子	*Schisandrae Fructus*	Schizaudra chinensis Baillon	8
Total			56.2

하여 사용하였다. 수득율은 歸脾湯이 19.46%, 歸脾湯加味方이 22.16% 였다.

3) 시약

세포배양에 필요한 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), fetal bovine serum (FBS), horse serum, penicillin-streptomycin은 Gibco사 (Auckland, NZ)에서 구입하여 사용하였다.

3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 6-hydroxydopamine (6-OHDA), 1.1-diphenyl-2- picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), potassium persulfate, dimethyl sulfoxide (DMSO), griess reagent, 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2 DCF-DA), hydroxychloride (HCL)는 Sigma사 (St.Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Total glutathione quantification kit은 Dojindo molecular tech.(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용 하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 항산화 효과 측정

(1) DPPH radical 소거 작용 측정

DPPH radical에 대한 소거활성은 Blois[27]의 방법으로 측정하였다. 0.2 mM DPPH 100 μL에 歸脾湯과 歸脾湯加味方 추출동결건조물 10~10000 μg/mL의 농도별 시료를 100 μL씩 가하여 잘 혼합한 후, 37℃에서 5 분 간격으로 30 분까지 spectrophotometer(Versamax, USA)로 517 nm에서의 흡광도를 측정하여 결과값은 다음과 같이 계산하였다.

DPPH radical inhibition activity(%)=(control O.D.-(sample O.D . -blank O.D.))/control O.D.

(2) ABTS cation 소거 작용 측정

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS cation decolourization assay에 의하여 시행하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24 시간 동안 방치하여 ABTS+을 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02이 되게 하여 phosphate buffer saline(PBS pH7.4)로 희석하였다. 희석된 ABTS+용액 950 μL에 歸脾湯과 歸脾湯加味方 추출동결건조물을 10~10000 μg/mL의 농도별 50 μL씩 가하여 정확히 5 분 동안 방치한 후 spectrophotometer로 732 nm에서 흡광도를 측정하여 결과 값은 다음과 같이 계산하였다.

ABTS cataion inhibition activity(%)=(control O.D.-sample O.D.)/control O.D.

(3) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법[28]을 응용하여 측정하였다. 歸脾湯과 歸脾湯加味方 추출동결건조물 10 mg/mL를 증류수를 이용해 희석하여 2 N folin 200 μL와 Na_2CO_3 2 mL를 첨가하여 실온에서 1 시간 동안 방치한 후 spectrophotometer를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 함량을 구하였다.

2) PC12 세포 보호효과 측정

(1) 세포배양

본 실험에 사용된 세포주는 수컷 rat의 pheochromocytoma인 PC12 세포이며, American Type Culture Collection (Rockville, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 5% (v/v) FBS, 10% horse serum, 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 RPMI 배지를 사용하였으며 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

(2) Cell viability 측정

96 well plate에 $2.5X10^4$/well 의 PC12 세포를 분주하고 48 시간 후, 歸脾湯과 歸脾湯加味方 추출동결건조물을 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/mL 농도로 24 시간 동안 처리하였다. MTT를 처리하여 3 시간 배양 후, DMSO를 이용해 decrystalize시켜 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율을 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

(3) 6-OHDA에 대한 뇌세포 보호효과 측정

96 well plate에 $2.5X10^4$/well의 PC12 세포를 분주하고 48 시간 동안 배양하였다. 歸脾湯과 歸脾湯加味方 추출동결건조물을 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/mL 농도로 21 시간 처리 후 6-OHDA(300 μM)을 3 시간 처리 하거나, 6-OHDA (250 μM) 3 시간 처리 후, 歸脾湯과 歸脾湯加味方 추출동결건조물을 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/mL 농도로 21 시간 처리 하였다. 또한, 歸脾湯과 歸脾湯加味方 추출동결건조물을 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/mL 농도로 처리 3시간 후, 6-OHDA(250 μM)을 처리하여 21 시간을 더 반응하였다. 반응 종료 후 MTT를 처

리하여 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율을 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

(4) 6-OHDA에 의한 NO 생성에 대한 영향 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite농도를 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. PC12 세포에 1, 5, 10, 50, 100, 200 ㎍/mL 농도의 歸脾湯, 歸脾湯加味方을 추출동결건조물 처리 3 시간 후 250 ㎛M의 6-OHDA을 처리하여 21 시간 배양하였다. 배양액을 회수하여 NO 생성량 측정에 사용하였다. 배양액 100㎖에 Griess reagent 100mL를 10 분 동안 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 이용해 표준곡선을 그렸으며 흡광도 대비 NO 농도를 결정하였다.

(5) 6-OHDA에 의한 ROS 생성에 관한 영향 측정

ROS 측정은 2,7-dichlorodihydro-fluorescein diacetate(H_2 DCF-DA)를 사용해 fluorescence를 측정하는 방법을 이용하였다. 96 well black-plate에 $2.5X10^4$/well의 PC12 세포를 분주하고 48 시간 후 歸脾湯과 歸脾湯加味方 추출동결건조물을 1, 5, 10, 50, 100, 200 ㎍/mL 농도를 처리 한 후 6-OHDA을 처리하였다. 20 ㎛M H_2 DCF-DA를 넣은 후 30 분간 배양 하였다. PBS로 세척 후, fluorescence excitation 495 nm, emission 530 nm로 형광강도를 측정하였다.

(6) 6-OHDA에 의한 GSH 함량에 대한 영향 측정

歸脾湯加味方 추출동결건조물과 6-OHDA의 처리 및 cell collection 과정을 거친 후 상층액을 제거하고 10 mmol/L의 HCl을 넣고 freezing 및 thawing을 2번 반복하였다. 그 후 5% SSA 넣고 800 g, 4℃에서 10 분간 원심분리 하였다. 96 well plate에서 각 well에 Co-enzyme working solution과 buffer solution, enzyme working solution을 넣고 37℃에서 5 분 incubation한 후 GSH standard solution과 sample solution을 넣고 37℃에서 10 분 incubation하였다. Substrate working solution을 넣고 실온에서 10 분간 incubation 한 후 spectrophotometer 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계처리

결과 data는 Mean±S.E.M.으로 표시하였고 유의성 평가는 SPSS 12.0K for windows(SPSS Inc., USA) 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA 방법을 실시하였다. 후검정은 LSD를 실시하였으며 평균값의 유의성을 5% 미만의 한계로 조사하였다.

Ⅲ. 실 험 결 과

1. 항산화 효과

1) DPPH radical 소거 효능

DPPH radical 소거 효능은 DPPH시약과 약재 추출물이 만나 자색 시료의 흡광도가 감소되는 것을 소거 활성으로 나타내는 것으로, 歸脾湯과 歸脾湯加味方의 농도별, 시간대별 DPPH radical 소거 활성을 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. 歸脾湯은 10~10000 ㎍/mL의 농도에서 9.70~98.45%의 소거 활성을 나타내었으며, 歸脾湯加味方은 10~10000 ㎍/mL의 농도에서 14.31~99.78%의 소거 활성을 나타내었다. 歸脾湯과 歸脾湯加味方의 농도별 DPPH

radical 소거 활성을 비교한 결과, 歸脾湯加味方이 歸脾湯보다 우수하게 나타났으며(Fig. 3), DPPH radical의 50% 소거 활성에 필요한 농도인 IC_{50} value 역시 歸脾湯加味方(544.20 ㎍/mL)이 歸脾湯(552.20 ㎍/mL)보다 낮아, 歸脾湯加味方이 歸脾湯보다 DPPH radical 소거 효능이 약간 강한 것으로 나타났다.

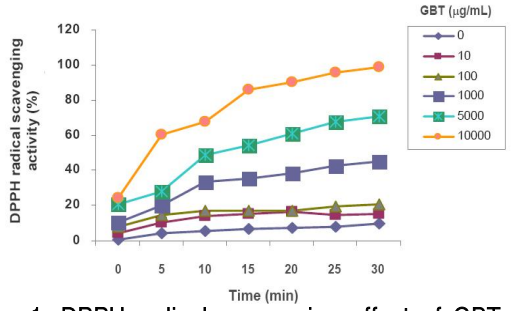


Fig. 1. DPPH radical scavenging effect of GBT according to time and concentration.

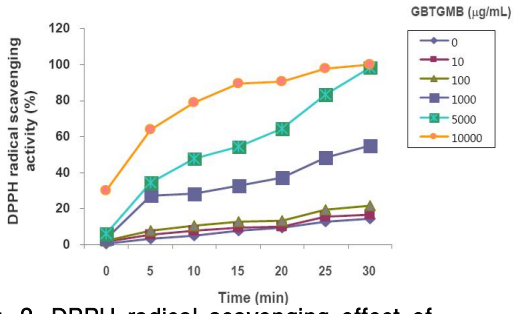


Fig. 2. DPPH radical scavenging effect of GMTGMB according to time and concentration.

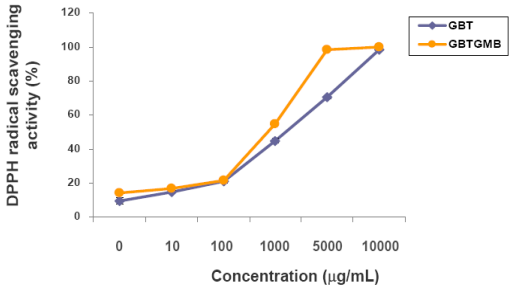


Fig. 3. DPPH radical scavenging effect of GBT and GMTGMB according to concentration at 30 min.

2) ABTS cation 소거 효능

ABTS cation을 이용한 항산화력 측정은 ABTS cation과 약재 추출물이 만나 청색 시료의 흡광도가 감소되는 것을 소거 활성으로 나타내는 방법으로, 歸脾湯은 10~10000 ㎍/mL의 농도에서 1.45~99.98%의 소거 활성을 나타내었으며, 歸脾湯加味方은 10~10000 ㎍/mL의 농도에서 6.31~99.99%의 소거 활성을 나타내었다. 歸脾湯과 歸脾湯加味方의 농도별 ABTS cation 소거 활성을 비교한 결과, 歸脾湯加味方이 歸脾湯보다 우수하게 나타났으며(Fig. 4), ABTS cation의 50% 소거 활성에 필요한 농도인 IC_{50} value 역시 歸脾湯加味方(191.90 ㎍/mL)이 歸脾湯(279.10 ㎍/mL)보다 낮아, 歸脾湯加味方이 歸脾湯보다 ABTS cation 소거 효능이 강한 것으로 나타났다.

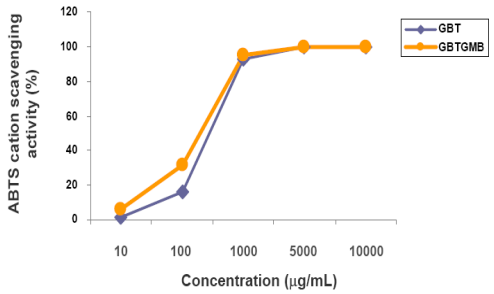


Fig. 4. Scavenging effect of GBT and GBTGMB on ABTS cation.

3) 총 폴리페놀 함량

폴리페놀 화합물은 항산화효과 등의 생리활성 기능을 가지고 있는 2차 대사산물의 하나로, 歸脾湯과 歸脾湯加味方의 총 폴리페놀 함량은 Tannic acid의 표준곡선을 이용하여 구하였다. Tannic acid의 검량선은 y = 0.009x + 0.0734, R^2 = 0.9525 이었으며, 총 폴리페놀 함량은 10 mg의 歸脾湯과 歸脾湯加味方에서 각각 79.10 ㎍, 121.03 ㎍을 보여 歸脾湯加味方이 歸脾湯보다 총 폴리페놀 함량이 53% 높은 것으로 나타났다(Fig. 5).

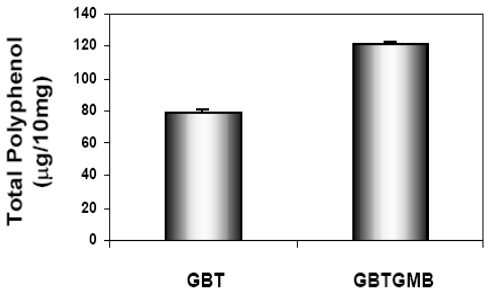


Fig. 5. Total polyphenol concentration of GBT and GBTGMB.

2. PC12 세포 보호효과

1) Cell viability

歸脾湯과 歸脾湯加味方이 PC12 세포생존율에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 MTT assay를 실행하였다. 歸脾湯의 생존율은 대조군에 비해 10 μg/mL, 100 μg/mL, 200 μg/mL의 농도에서 각각 107.69%, 108.67%, 114.89%로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 歸脾湯加味方의 생존율은 대조군에 비해 5 μg/mL, 10 μg/mL의 농도에서 각각 104.47%, 105.29%로 대조군에 비해 유의하게 증가하였으나, 100 μg/mL, 200 μg/mL의 농도에서는 각각 93.46%, 91.31%로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig 6).

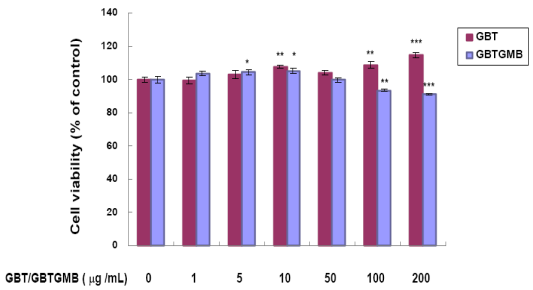


Fig. 6. The effect of GBT and GBTGMB on the cell viability

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, compared to the 6-OHDA only treated group.

2) 6-OHDA에 대한 뇌세포 보호효과

PC12 세포에 대한 cell viability에 근거하여 歸脾湯과 歸脾湯加味方을 전처리, 후처리, 동시처리하여 6-OHDA에 의한 toxicity 감소 정도를 측정하였다.

(1) 歸脾湯과 歸脾湯加味方의 전처리시 뇌세포 보호효과

PC12 세포에 歸脾湯과 歸脾湯加味方을 농도별로 21시간 처리한 다음 이을 제거한 후 6-OHDA을 3시간 처리하여 cell viability를 MTT assay를 통해 측정하였다. 6-OHDA 단독처리군은 歸脾湯과 歸脾湯加味方 처리군에서 대조군에 비해 각각 62.10, 66.21%로 cell viability가 유의하게 감소하였다(p<0.001). 歸脾湯 처리군은 200 μg/mL에서 45.80%로 6-OHDA 단독처리군에 비해 유의하게 감소하였다(p<0.001). 歸脾湯加味方 처리군은 5, 10, 50, 100 μg/mL의 농도에서 각각 73.70, 76.55, 74.63, 78.60%로 6-OHDA 단독처리군에 비해 유의하게 증가하였으나(p<0.01, p<0.001), 200 μg/mL의 농도에서는 55.18%로 6-OHDA 단독처리군에 비해 유의하게 감소하였다(p<0.001)(Fig. 7).

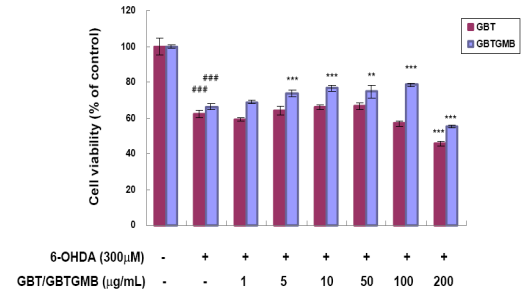


Fig. 7. The effect of pre-treatment of GBT and GBTGMB on 6-OHDA induced cell death

###: p<0.001, compared to the control

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, compared to the 6-OHDA only treated group.

(2) 歸脾湯과 歸脾湯加味方의 후처리시 뇌세포 보호효과

PC12 세포에 6-OHDA을 먼저 3시간 처리한 다음 이를 제거한 후 歸脾湯과 歸脾湯加味方을 농도별로 21시간 처리하여 cell viability를 MTT assay를 통해 측정하였다. 6-OHDA 단독처리군은 歸脾湯과 歸脾湯加味方 처리군에서 대조군에 비해 각각 61.35, 54.55%로 cell viability가 유의하게 감소하였다(p<0.001). 歸脾湯 처리군은 50, 100, 200 ㎍/mL에서 각각 69.49, 69.74, 68.57%로 6-OHDA 단독처리군에 비해 유의하게 증가하였다(p<0.01). 歸脾湯加味方 처리군은 10, 50, 100, 200 ㎍/mL의 농도에서 각각 61.44, 65.45, 71.31, 71.50%로 6-OHDA 단독처리군에 비해 유의하게 증가하였다(p<0.05, p<0.001)(Fig. 8).

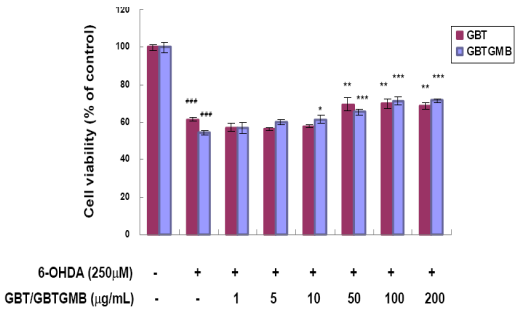


Fig. 8. The effect of post-treatment of GBT and GBTGMB on 6-OHDA induced cell death

###: p<0.001, compared to the control
*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, compared to the 6-OHDA only treated group.

(3) 歸脾湯과 歸脾湯加味方의 동시처리시 뇌세포 보호효과

PC12 세포에 歸脾湯과 歸脾湯加味方을 농도별로 3시간 처리한 다음 이을 제거하지 않고 6-OHDA을 21시간 더 처리하여 cell viability를 MTT assay를 통해 측정하였다. 6-OHDA 단독처리군은 歸脾湯과 歸脾湯加味方 처리군에서 대조군에 비해 각각 66.59, 58.57%로 cell viability가 유의하게 감소하였다(p<0.001). 歸脾湯 처리군은 5, 10, 50, 100 ㎍/mL에서 각각 70.64, 72.45, 75.65, 79.35%로 6-OHDA 단독처리군에 비해 유의하게 증가하였다(p<0.05, p<0.01, p<0.001). 歸脾湯加味方 처리군은 1, 5, 10, 50, 100, 200 ㎍/mL의 모든 농도에서 각각 66.85, 69.09, 70.15, 70.46, 80.54, 79.29%로 6-OHDA 단독처리군에 비해 유의하게 증가하였다(p<0.01, p<0.001)(Fig. 9).

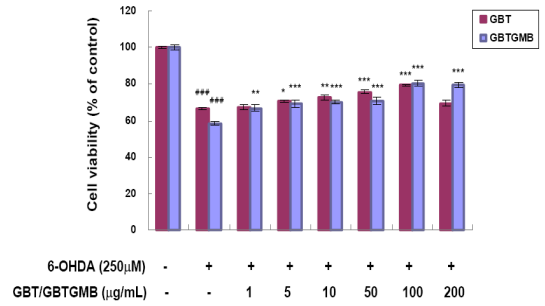


Fig. 9. The effect of co-treatment of GBT and GBTGMB on 6-OHDA induced cell death

###: p<0.001, compared to the control
*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, compared to the 6-OHDA only treated group.

3) 6-OHDA에 의한 NO 생성에 대한 영향

PC12 세포에 歸脾湯과 歸脾湯加味方을 농도별로 3시간 처리한 다음 이를 제거하지 않고 6-OHDA을 21시간 더 처리하여 6-OHDA에 의해 유도되는 NO의 생성량 변화를 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. 6-OHDA 단독처리군은 歸脾湯과 歸脾湯加味方 처리군에서 대조군에 비해 각각 2.22, 2.92배 유의하게 증가하였다(p<0.001). 歸脾湯 처리군은 모든 농도에서 6-OHDA 단독처리군에 비해 유의한 차이가 없었다. 歸脾湯加味方 처리군은 1, 5, 10, 50, 100, 200 ㎍/mL의 모든 농도에서 대조군에 비해 각각 2.46, 2.59, 2.60, 2.15, 1.99,

2.34배 증가하는데 그쳐 6-OHDA 단독처리군에 비해 유의하게 감소하였다($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$)(Fig. 10).

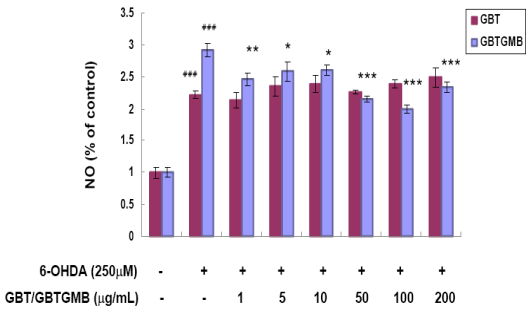


Fig. 10. The effect of GBT and GBTGMB on 6-OHDA induced NO generation

###: p<0.001, compared to the control
*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, compared to the 6-OHDA only treated group.

4) 6-OHDA에 의한 ROS 생성에 대한 영향

PC12 세포에 歸脾湯과 歸脾湯加味方을 농도별로 3시간 처리한 다음 이를 제거하지 않고 6-OHDA을 21시간 더 처리하여 6-OHDA에 의해 유도되는 ROS의 생성량 변화를 DCF 형광 정도로 측정하였다. 6-OHDA 단독처리군은 歸脾湯과 歸脾湯加味方 처리군에서 대조군에 비해 각각 123.38, 114.94%로 유의하게 증가하였다($p<0.001$).

歸脾湯 처리군은 100 ㎍/mL의 농도에서 110.39%로 6-OHDA 단독처리군에 비해 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 歸脾湯加味方 처리군은 10, 50, 100, 200 ㎍/mL의 농도에서 각각 108.05, 108.05, 101.15, 100.00%로 6-OHDA 단독처리군에 비해 유의하게 감소하였다($p<0.01$, $p<0.001$)(Fig. 11).

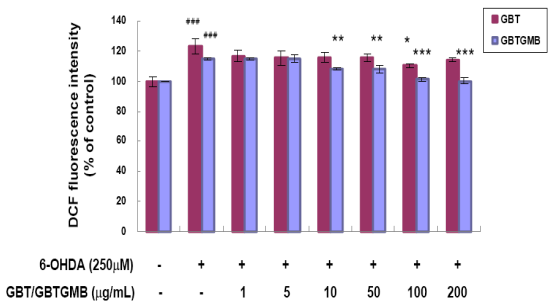


Fig. 11. The effect of GBT and GBTGMB on 6-OHDA induced ROS generation

###: p<0.001, compared to the control
*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, compared to the 6-OHDA only treated group.

5) 6-OHDA에 의한 GSH 함량에 대한 영향

PC12 세포에 농도별 歸脾湯加味方과 6-OHDA을 처리한 후 GSH 함량을 측정하였다. 6-OHDA 단독처리군은 대조군에 비해 59.24%로 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 歸脾湯加味方 처리군은 50, 100 ㎍/mL의 농도에서 각각 128.20, 105.89%로 6-OHDA 단독처리군에 비해 유의하게 증가하였다($p<0.05$, $p<0.01$)(Fig. 12).

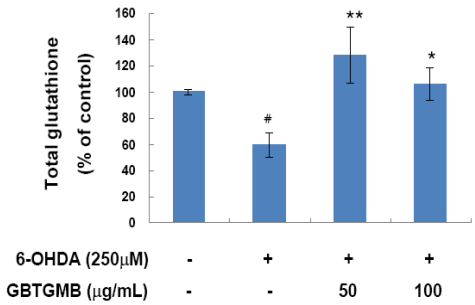


Fig. 12. The effect of GBTGMB on 6-OHDA induced GSH reduction

#: p<0.05, compared to the control
*: p<0.05, **: p<0.01, compared to the 6-OHDA only treated group.

Ⅳ. 고 찰

산소는 생명유지를 위한 물질대사와 에너지 생산을 위해 절대적으로 필요하며 대사를 거쳐 정상적으로는 물과 이산화탄소로 배출되지만, 일부는 체내에서 여러 과정을 거쳐 ROS가 되어 세포와 조직에 강력한 독성작용을 한다. ROS에 의한 산화적 손상을 예방 혹은 치료하기 위해서는 항산화제나 산소라디칼 제거제 등의 역할이 중요하다.

ROS를 제거하기 위한 생체 방어 시스템은 효소계열의 예방적 항산화제인 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등과 천연 항산화제인 phenol성 화합물, flavone 유도체, tocopherol, ascorbic acid, carotenoid, glutathione 등이 있으며 합성 항산화제로는 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), propyl gallate(PG), t-butylhydroquinone(TBHQ) 등 많은 항산화제가 개발되어 있다[29-31]. 그러나 BHT와 BHA는 탁월한 효과와 경제성 때문에 폭넓게 사용되고 있으나 열 안정성이 떨어지고 발암의 위험성이 제기되고 있으며, tocopherol과 같은 천연물은 안전하기는 하나 단독으로는 산화 연쇄반응 저지 능력이 낮고 가격이 비싼 단점이 있다. 따라서 각종 생약 추출물 등에서 보다 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제를 개발하기 위한 많은 연구가 활발히 이뤄지고 있다[31].

노화란 시간이 지남에 따라 세포 기능이 저하되어 내적, 외적인 자극이나 도전에 대해 대처능력이 소실되는 것이다[32]. 노화 과정에서는 생체의 기능이 현저히 저하되는데, 그 기전을 설명하기 위해 많은 가설들이 제안 되었으며, 그 중에서 산화스트레스 가설이 가장 주목을 받고 있다. 이러한 산화스트레스는 노화과정에서 일어나는 미세한 염증반응 즉, 분자염증반응에서 과량 생성되며, 특히 ROS로부터 염증발현 유전자인 cyclooxygenase(COX)-2와 induicible nitric oxide synthase(iNOS)가 발현되고, 이들로부터 유래되는 ROS와 reactive nitrogen species(RNS)에 기인한다[33]. 이처럼 산화스트레스(oxidative stress)는 노화와 밀접한 관계를 맺고 있다.

신경퇴행성 질환은 중추신경세포의 손상으로 발생하는 질환으로 ROS에 의한 손상기전은 급격한 외부자극에 의한 손상을 입었을 경우에는 세포막의 파괴로 이어지는 괴사(necrosis)의 형태로 나타나지만, 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성측삭경화증 등과 같이 서서히 세포사가 진행되는 경우는 세포핵의 변화, 크로마틴의 변화로 이어지는 자연사(apoptosis)의 형태로 나타나게 된다[34].

파킨슨병은 알츠하이머병과 함께 대표적인 신경퇴행성 질환으로 생체 내부의 독소에 의하여 발병된다는 가설이 있다. 즉, 정상적으로 분해되거나 만들어지지 않은 대사 물질이 독소를 띄게 되고, 이로 인해 유전적 돌연변이가 발생한다는 가설이다. 한 가지 내부 독소의 가능 물질로는 DA이 될 수 있다. 이 물질은 ROS를 생산할 수 있는 잠재성을 가진 물질로, 이러한 ROS가 세포내의 단백질이나 DNA, 지질에 해로운 영향을 줌으로써 파킨슨병을 발생 시킬 수 있다[36].

6-OHDA는 30여 년 전부터 파킨슨병의 동물모델을 연구하는데 이용되었다. 세포마다 6-OHDA을 흡수하는 능력의 차이로 인해, 6-OHDA의 독성은 monoaminergic neuron에 선택적으로 작용한다. 세포내로 들어간 6-OHDA는 cytosol에 머물며 ROS를 생성, 세포내의 macromolecule들을 공격, 결국 세포사멸을 유도한다[37]. 즉, 6-OHDA에 의한 DA neuron의 사멸에서는 초기에 ROS가 생성되고

세포 사멸의 신호가 mitochondria에 전달, cytochrome c 가 분비되며, 그 후 apoptosome 형성, 그리고 caspase-9, -3 의 활성화가 진행되어 apoptotic cell death 가 일어난다[35].

한의학에서 파킨슨병과 관련된 자료는 『內經』[38]에서 "諸風掉眩 皆屬於肝·····, 諸暴强直 皆屬於風"이라고 하여, 震顫, 强直 및 기타 파킨슨병의 증상에 대한 병리 및 생리를 최초로 언급하였고, 이후 이를 근거로 하여 문헌에서 더욱 많은 언급을 하게 되었다. 이를 바탕으로 중국의 중의학 서적 및 잡지 등을 위주로 한 현대문헌에서는 風 , 火 , 痰 , 瘀 및 心肝腎의 虛證의 병리를 바탕으로 肝腎陰虛, 氣血兩虛, 痰熱內阻 , 氣滯血瘀 등으로 변증치료 및 침구치료에 관한 연구가 이루어지고 있고, 파킨슨병의 운동장애라는 측면에서 볼 때 파킨슨병은 한의학적 역대 문헌에서 보면 震顫, 痓, 痙, 瘲瘓, 攣, 中風의 偏枯, 癱瘓, 中腑症 등의 병증과 유사하다[39].

본 연구에서는 최근 뇌신경계 질환, 심인성 질환에 광범위하게 사용되고[15-18] 있는 歸脾湯과 腎精을 補하고 精氣를 固하는 효능이 있는 산수유[41], 오미자[41]가 가미된 歸脾湯加味方을 사용하여 노화의 주요 원인중 하나인 ROS에 대한 항산화 효과를 비교 연구하였고, 신경퇴행성 질환 특히 파킨슨병의 연구에 많이 사용되는 6-OHDA의 신경독성에 대한 보호효과를 비교하는 연구를 수행하였다.

歸脾湯은 血을 引하여 歸脾케 한다는 의미이며, 歸脾湯이 처음 문헌에 기재된 것은 宋代 嚴用和의 濟生方[42]으로서 治思慮過度 勞傷心脾 健忘 怔忡이라고 수록된 후 역대 의가들에 의해 思慮過度하고 勞傷心脾 하여 怔忡 健忘하고 驚悸 盜汗하며 發熱 體倦하고 食少 不眠하며 혹은 脾虛로 血을 能攝하지 못하여 나타나는 血의 妄行症을 治하고 婦人의 經病 帶下를 治하는데 운용되어 왔다. 歸脾湯은 當歸, 龍眼肉, 酸棗仁, 遠志, 人蔘, 黃芪, 白朮, 茯神, 木香, 甘草, 生薑, 大棗의 12味의 약물로 구성되어 있는데 인삼과 황기는 君藥으로 補氣健脾하고, 당귀와 용안육은 臣藥으로 養血和營하며, 君藥과 배합하여 益氣養血한다. 백출과 목향은 健脾理氣하고 補하되 滯하지 않게 하고, 복신 원지 산조인 등은 養心 安神케 하므로 함께 佐藥이 되며, 감초 생강 대조는 使藥으로 和胃健脾하고 生化를 도와 氣는 旺盛여지고, 血은 充孕하게 한다. 이와 같이 각 약물을 合用하면 心脾가 補益하게 되고 氣旺生血하게 되어 失眠, 驚悸, 健忘 등의 諸症이 自愈하게 된다[43]. 歸脾湯은 益氣補血 健脾養心하는 효능이 있어 心失所養으로 인한 心悸怔忡, 健忘失眠 등의 증상과 脾虛血少에 의한 食少體倦, 面色萎黃, 神疲乏力 등의 증상에 사용한다.

歸脾湯加味方에는 위의 歸脾湯의 약재에 산수유, 오미자가 가미된 처방으로 산수유, 오미자의 性味와 效能 및 약리작용을 살펴보면 다음과 같다. 산수유는 補益肝腎, 澁精固脫의 효능이 있으며[41], 산수유의 약리작용으로는 신경안정, 이뇨작용, 혈압강하작용, 항암 및 항균작용 등이 있는 것으로 알려져 있고[44,45], 항산화 작용[24,46], 항당뇨, 항염증 작용[47,48]이 있음이 보고되었다. 오미자는 斂肺, 滋腎, 生津, 收汗의 효능이 있으며[41], 오미자의 약리작용으로는 항산화 작용 및 알콜해독 작용이 뛰어난 것으로 보고되어 있다[25,26,49].

歸脾湯과 歸脾湯加味方의 항산화 효과를 비교 평가하기 위해 DPPH radical과 ABTS cation을 이용하였고 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. DPPH radical 소거 작용 측정법은 항산화 물질의 활성을 측정하기 위해 보편적으로 쓰이는 실험방법이다[27]. 이 DPPH radical hydrazyl의 질소원자가 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소 원자를 받아들이는 성질을 가지고 있다. 따라서 항산화성 물질과 반응하여

수소 원자를 받아들임으로서 자체의 정색성을 잃게 되는 성질을 이용하여 항산화능의 정도를 측정할 수 있게 된다. 또한 일종의 전자공여능을 측정하는 방법으로서 환원력이 클수록 강력한 항산화제가 된다는 것에 착안하여 DPPH의 환원정도를 기준으로 측정물질의 환원력과 항산화력을 가늠하게 된다. 즉 DPPH는 질소를 중심으로 안정한 라디칼 구조를 하고 있는데, 515-517 ㎚에서 최대 흡수를 나타내다가 환원이 되어 라디칼이 소실하게 되면, 측정 파장대에서 흡수가 없어지게 되므로 대조구의 흡광도 값과 비교하여 백분율로 나타내어 시료의 환원력 크기, 라디칼 소거활성, 항산화 활성으로 표시하게 된다. ABTS cation 소거 작용 측정법은 재현성이 좋고 실험과정이 간단하여 항산화능 측정에 널리 쓰이는 방법이다[50,51]. ABTS는 원래 무색으로 peroxidase와 H_2O_2에 의해 산화가 되면 특징적인 청록색을 띄는 ABTS cation이 형성되는데 이 청록색의 ABTS cation은 항산화 능력을 가지고 있는 물질과 만나 반응하면 그와 반응한 물질은 산화가 일어나고 ABTS cation은 본래의 무색으로 환원되므로 734 ㎚에서 흡광도의 감소를 확인하여 반응물질의 총산화 능을 쉽게 측정할 수 있다. 항산화 실험 결과 歸脾湯, 歸脾湯加味方 모두 농도가 증가 할수록 DPPH radical과 ABTS cation을 제거하는 효능이 증가됨을 보였으며, DPPH radical 소거 실험과 ABTS cation 소거 실험 결과 歸脾湯加味方이 歸脾湯보다 뛰어난 소거능을 보였다(Fig 3, 4).

폴리페놀(polyphenol)은 수산기(OH^-)를 2개 이상 갖고 있는 천연 물질이다. 페놀은 aromatic ring에 수산기가 결합한 것으로 2개 이상의 수산기가 결합한 것을 폴리페놀이라 한다. 이 폴리페놀은 식물 내에 존재하는 여러 페놀화합물의 총칭이고 식물이 성장하면서 여러 가지 환경으로부터 자신을 보호하기위한 보호물질이다. 페놀은 다양한 구조와 분자량을 가지고 있으며 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 가진다. 폴리페놀의 이러한 뛰어난 전자 공여 능력은 SOD와 유사한 효과를 나타내어 산화를 억제해 주기 때문에 항산화 효과 등의 생리활성 기능을 가진다. 페놀은 다른 물질과 결합해 폴리페놀이 만들어지면 더 이상 독극물이 아닌 항산화제로써 효과를 나타내고 이로 인해 노화를 억제하고 질병을 예방하는 역할을 하며, 어떤 폴리페놀 이든 인간이 섭취할 때 공통으로 나타나는 기능은 항산화 효과와 항암효과이다. 폴리페놀화합물에는 free radical들과 쉽게 수소교환반응을 일으킬 수 있는 활성을 가진 수소원자가 존재하며 공명으로 안정화될 수 있는 구조를 가지고 있다. 또한 radical 생성 촉진물질인 metal ion(Fe, Cu)과도 쉽게 결합하여 free radical의 생성을 억제하므로 천연에 존재하는 많은 페놀화합물들이 항산화활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[53]. 그렇기 때문에 총 폴리페놀의 함량의 측정은 그 추출물의 항산화능력을 증명하는데 좋은 지표로 사용되고 있다. 폴리페놀은 크게 탄닌과 플라보노이드 계열로 나눌 수 있다. 플라보노이드는 심장, 혈관 질환과 암의 발생 위험을 줄여주는 것으로 알려져 있다. 최근 폴리페놀 계통이 주목받고 있는 이유는 생체 내에서 항산화제로 작용함으로써 건강유지와 심장질환, 암 예방 등에 효과를 보일 것으로 기대되고 있으며, 또한 폴리페놀류는 콜레스테롤이 소화관으로 흡수되는 것을 막아주기 때문에 혈중 콜레스테롤의 수치를 낮게 해주는 작용도 있다[53,54]. 총 폴리페놀 함량을 측정해 본 결과 歸脾湯加味方이 歸脾湯보다 함량이 높게 나타났다(Fig. 5).

歸脾湯과 歸脾湯加味方의 뇌세포 보호효과 비교 측정은 PC12 세포에 신경퇴행성 질환인

파킨슨병의 모델에서 toxin으로 사용되는 6-OHDA과 약물을 투여하고 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였으며, NO 및 ROS 생성량의 변화와 GSH 함량 변화를 측정하여 평가하였다.

MTT assay는 MTT가 세포내로 들어가 효소들에 의해 formazan crystal로 환원되는데 이것은 거의 용해되지 않기 때문에 세포내에 축적된다. 이 축적된 양은 세포의 환원능력을 보여 주는 것으로 미토콘드리아와 소포체의 능력을 이용하는 검사법이다. 이러한 점에 근거하여 MTT assay는 산화성 손상을 입은 세포의 항산화능력을 평가하기 위해 사용된다. MTT assay상의 수치 증가는 세포의 산화성 손상의 감소와 산화성 손상과정에서 주로 미토콘드리아를 매개로하여 야기되는 apoptosis의 발현을 억제한다고 해석할 수 있다. 전에는 이 결과를 단순히 세포증식으로 해석하기도 했는데[55], 이유는 formazan crystal의 형성이 주로 미토콘드리아에 있는 환원효소에 의한 것이라고 가정했기 때문이다. 미토콘드리아에는 일정량의 효소가 있으며 이 효소양이 증가했다는 것은 미토콘드리아의 수, 즉 세포수가 많다고 해석을 하였다. 따라서 韓藥物의 투여시 MTT 값이 높게나오면 단순히 세포수가 상대적으로 많다고 해석하였다. 하지만 최근에는 이 환원반응이 미토콘드리아 뿐 아니라 lysosome 등 다른 소포체에 의해서 나타난다는 보고들이 증가하고 있으며[56], 이러한 이유로 최근에는 MTT의 증가가 세포보호로 해석되지 않고 세포의 환원활성 능력의 증가로 해석된다. 歸脾湯과 歸脾湯加味方이 PC12 세포에 미치는 영향을 측정한 결과 10 ㎍/mL의 농도에서는 두 약물 모두 세포생존율이 증가하였으나 100, 200 ㎍/mL의 고농도에서는 歸脾湯은 세포생존율이 증가하고, 歸脾湯加味方은 감소하였다(Fig. 6). 이는 歸脾湯에서는 세포독성이 나타나지 않았으나 고농도의 歸脾湯加味方에서 세포독성이 나타나 세포생존율을 감소시킨 것으로 사료된다. 약물을 전처리하고 독성물질인 6-OHDA을 가한 결과, 歸脾湯은 독성처리군과 차이를 보이지 않았으나, 歸脾湯加味方은 1~100 ㎍/mL의 농도에서 유의하게 뇌세포 보호효과를 보였다(Fig. 7). 먼저 6-OHDA을 가하고 약물을 후처리한 결과, 歸脾湯은 50~200 ㎍/mL에서만 뇌세포 회복효과를 보였으나 歸脾湯加味方에서는 전체농도에서 뇌세포 회복효과를 보였다(Fig. 8). 약물과 6-OHDA을 동시처리한 결과, 歸脾湯은 5~100 ㎍/mL의 농도에서 유의하게 뇌세포 독성을 회복시켰으나 歸脾湯加味方은 모든 농도에서 유의하게 뇌세포 독성을 회복시켰으며, 두 약물 모두 100 ㎍/mL의 농도에서 뛰어나게 뇌세포 독성을 회복시켰다(Fig. 9).

RNS및 ROS는 반응시간은 매우 짧은 반면에 반응력은 매우 커서 생체 내에서 각종 단백질의 변성, 지질과산화, DNA 변이 등과 같은 유해한 작용을 하는 것으로 알려져 있다[57]. NO는 최근 혈압강하, 면역, 신경계의 기능 등 광범위한 세포 기능에 관여하는 물질로, ROS와 마찬가지로 반응성이 큰 라디칼의 일종이다. NO는 두 원자가 이루는 분자로 몸집이 매우 작고 무색의 가스형태로 외각에 단일 전자가 하나 있어 반응성이 크며, 전기적으로 중성이고 물에 잘 녹기 때문에 주위 조직으로 빠르게 확산이 가능하다. 다른 신호전달 물질이 세포안과 밖에서 제한된 역할을 수행하는데 반해, NO는 세포막을 자유로이 이동하며 생체내 각종 물리 화학적 반응에 관여하고 있다. NO는 세포내에서 Nitric oxide synthase(NOS)에 의해 arginine을 기질로 하여 생성되고, 그 자체로도 DNA 손상, 단백질의 tyrosine, tryptophan기의 nitro화를 유도하지만 NO와 superoxide anion radical이 반응하여 생성된

peroxynitrite(ONNOO-)가 세포에 더 치명적인 손상을 초래하는 것으로 알려져 있다[58]. NO는 생체 내에서 과도한 양이 발생할 경우 주변 조직에 nitrosative stress를 주어 세포에 치명적인 손상을 주는 것으로 알려져 있다[59]. 대표적인 항산화 효소인 glutathione peroxidase와 glutathione reductase가 NO에 의해 불활성됨이 밝혀졌는데[60,61] 이런 NO에 의한 항산화 효소의 손상이 전체 항산화계를 점차적으로 파괴하여 세포의 손상을 가속화하는 결과를 초래하는 것이다. 歸脾湯과 歸脾湯加味方이 PC12 세포에 독성물질인 6-OHDA를 처리하여 발생되는 NO의 생성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 歸脾湯은 NO의 생성에 유의한 변화를 일으키지 못했으나 歸脾湯加味方에서는 6-OHDA에 의해 2.92배 까지 증가된 NO의 양을 1~200 ㎍/mL의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다(Fig. 10).

ROS는 외부물질을 해독화 하는 과정, 식세포의 식균작용, 세포내의 다양한 산화효소들의 정상적인 물질대사 과정에서도 생성될 수 있고, 생명을 유지하는 동안 체내에서 계속해서 생성되게 된다[62]. 세포의 생체막 불포화지방산을 공격하여 세포의 항상성 상실을 가져와 뇌질환을 가져오게 하는 인자로서 작용하므로 ROS 수치를 줄이는 것은 항산화기능이 있음을 의미한다. 歸脾湯과 歸脾湯加味方이 PC12 세포에 독성물질인 6-OHDA를 처리하여 발생되는 ROS의 생성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 歸脾湯은 100 ㎍/mL에서만 유의하게 ROS의 생성을 감소시켰으나 歸脾湯加味方에서는 10~200 ㎍/mL의 농도에서 농도의존적으로 ROS의 생성을 감소시켰다(Fig. 11).

GSH는 microsomal enzyme에 의하여 생성된 친전자성 외부 독성물질이나 산화적 반응으로 생성된 radical species를 제거하여 해독화 하는데 매우 중요하다[63]. GSH는 주로 간에서 합성되어 체내에서 환원상태로 혈액을 통해 다른 장기로 이동하는데 glutathione peroxidase에 의하여 과산화지질을 환원시키고 세포막을 산화적 손상으로부터 보호하는 작용을 한다. glutathione reductase 는 NADPH를 NADP로 산화시키면서 glutathione peroxidase에 의해 생성된 glutathione disulfide를 환원시켜 환원형 glutathione의 세포내 수준을 유지시킨다. 그런데 oxidative stress 환경 하에서 세포는 많은 양의 H_2O_2나 organic hydroperoxide를 처리해야 하므로 산화형 glutathione이 미처 환원되지 못한 채 세포내 축적되고 세포는 손상을 줄이기 위한 방어기전으로 산화형 glutathione을 배설하게 된다. 따라서 세포내 glutathione이 고갈되고 glutathione 대사계의 활성은 점차 떨어지게 되어 세포손상을 일으키게 된다[64]. 歸脾湯加味方이 PC12 세포에 독성물질인 6-OHDA를 처리하여 유발되는 GSH의 감소에 미치는 영향을 살펴본 결과 歸脾湯加味方이 유의하게 GSH 함량을 증가시켰다(Fig. 12).

이상의 실험 결과 歸脾湯, 歸脾湯加味方 모두 양호한 항산화 효과가 있고, 6-OHDA로 부터 세포를 보호하는 효과가 있음이 밝혀졌으며 歸脾湯加味方이 歸脾湯보다 우수한 효과를 보였다. 이는 歸脾湯에 腎精을 補하고 精氣를 固하는 산수유와 오미자를 가한 歸脾湯加味方이 우수한 항산화 효과가 있으며, ROS로부터 세포를 보호하여 노화를 막아주고, 신경퇴행질환 치료에 유효할 것으로 사료된다. 특히 歸脾湯加味方이 파킨슨병의 지적 기능장애로 인한 치매나, 건망 및 우울에 효과적일 것으로 추정되며 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 보여진다. 또한 이를 바탕으로 노화나 파킨슨병을 포함한 신경퇴행성 질환의 치료제 개발에 유용하게 응용될 수 있으리라 사료된다.

Ⅴ. 결 론

歸脾湯과 歸脾湯加味方의 항산화 효과와 PC12 세포 보호효과에 대한 연구를 한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 항산화 효과

1) DPPH radical의 소거 작용을 측정한 결과 歸脾湯, 歸脾湯加味方 모두 농도 의존적으로 소거작용이 있었으나 歸脾湯加味方이 歸脾湯보다 강하게 나타났다.

2) ABTS radical 소거 작용을 측정한 결과 歸脾湯, 歸脾湯加味方 모두 농도 의존적으로 소거작용이 있었으나 歸脾湯加味方이 歸脾湯보다 강하게 나타났다.

3) 총 폴리페놀 함량을 측정해 본 결과 歸脾湯加味方이 歸脾湯보다 높게 나타났다.

2. PC12 세포 보호효과

1) PC12 세포생존율을 살펴본 결과, 歸脾湯에서는 농도 의존적으로 증가하였고 歸脾湯加味方은 저농도에서는 증가하였으나, 고농도에서는 오히려 저하되었다.

2) 뇌세포 보호효과로써 6-OHDA로 처리된 PC12 세포의 생존율을 살펴본 결과, 歸脾湯은 후처리와 동시처리에서 일부 농도에서 증가하였으나, 歸脾湯加味方은 전처리, 후처리, 동시처리에서 농도 의존적으로 증가하였다.

3) 6-OHDA로 처리된 PC12 세포의 NO 생성률에 미치는 영향을 측정해 본 결과, 歸脾湯은 차이가 없었으나, 歸脾湯加味方은 모든 농도에서 감소하였다.

4) 6-OHDA로 처리된 PC12 세포의 ROS 생성률에 미치는 영향을 측정해 본 결과, 歸脾湯은 일부 농도에서 감소하였고, 歸脾湯加味方은 농도 의존적으로 감소하였다.

5) 歸脾湯加味方의 6-OHDA로 처리된 PC12 세포의 GSH 함량이 증가하였다.

이상의 결과로 보아 歸脾湯과 歸脾湯加味方 모두 항산화 효과 및 PC12 세포 보호효과가 있었으나 歸脾湯加味方이 더 우수한 것으로 나타나서 항노화 및 파킨슨병을 비롯한 신경퇴행성 질환에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 최병기, 정세영, 박광식, 조정희. 활성산소와 질환. 서울:신일상사. 2004:3
2. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. Science. 1992;257(5074):120-4.
3. Gutteridge JM, Halliwell B. Comments on review of free radicals in biology and medicine. Free Radicals in biology and medicine. 1992;12(1):93-5.
4. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxidative stress and disease. Free radicals in biology and medicine. Oxford:Oxford University Press. 2000:617-783.
5. Yagi, K. Lipid peroxides and human disease. Chem. Phys. Lipids. 1987;45:337.

6. Kikuchi S, Kim SU, Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in culture. J Neuosci Res. 1993;36:558-69.
7. Adelson R, Saul RL, Ames BN. Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic and life span. Natl Acad Sci USA. 1998;85:2706-8.
8. Bendich A, Machlin LJ, Scadurra O, Burton GW. DDM : The antioxidant role of vitamin C. Free Radical Biol Med. 1986;2:419-44.
9. Christian Bhel. Alzheimer's disease and Oxidative stress, Progress in Neurobiology. 1999;57:301-23.
10. Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey c, Schussel K, Muller WE. Mitochondrial dysfunction , apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. Biochem Parm. 2003;66(8):1627-34.
11. 양준영. 6-OHDA에 의해 유도된 파킨슨질환 동물 모델에서 GAPDH 단백질의 변화에 대한 연구. 연세대학교 대학원. 2004.
12. 嚴用和. 濟生方. 北京:人民衛生出版社. 1980:117.
13. 薛己. 內科摘要. 江蘇:江蘇科學技術出版社. 1985:41-2.
14. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1966:47.
15. 강순수. 바른방제학. 서울:대성문화사. 1996:190-1.
16. 동의과학원. 동의처방대전. 서울:여강출판사(1). 1993:114.
17. 윤용갑. 東醫方劑와 處方解說. 서울:의성당. 2002:631-5.
18. 윤길영. 동의임상방제학. 서울:명보출판사. 1992:516.
19. 박선동, 박현준, 주왕석. 歸脾湯및 그 構成藥物群이 抗酸化 效果에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001;16(1):11-27.
20. 박찬원, 이진우, 채한, 홍무창, 신민규. 脾機能이 學習과 記憶에 미치는 影響에 대한 實驗的 연구. 대한한의학회지. 2000;20(4):39-49.
21. 강익현. 歸脾湯이 Glutamate에 의한 C6 glial Cell의 Apoptosis에 미치는 영향. 원광대 대학원. 2001.
22. 전희준. 歸脾湯이 Glutamate에 의한 성상세포의 손상에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 2002.
23. 오명숙, 허영범, 배현수, 안덕균, 박성규. 歸脾湯이 흰쥐의 기억력 향상과 해마부위의 세포증식에 미치는 영향에 대한 연구. 醫林. 2005;320:46-9.
24. Seo KI, Lee SW, Yang KH. Antimicrobial and antioxidatice activities of Corni Fructus extracts. Korean J Postharvest Sci Technol. 1999;6:99-103.
25. 김좌숙, 최선영. 오미자의 이화학적 특성 및 항산화 활성. 한국식품영양학회지 2008;21(1):35-42.
26. Lee JS, Lee MG, Lee SW. A study on the general components and minerals in parts of Omija(Schizandra chinensis Baillon). Kor J Dietry culture. 1989;4:173-6.
27. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1958;181:1190-200.
28. George P. Dimltrios B. Antioxidant Effect of Natural Phenols on Olive Oil. Journal of the American Oil Chemists' Society. 1991;68:669-71.
29. Branen AL. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole. J. Am. Oil.

Chem. Soc. 1975;52:59-63.
30. Hatano T. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols. Natural Medicines. 1995;49:357.
31. Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, and Sakurai H. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. Biol. Pharm. Bull. 1995;18:162.
32. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. Physiol Rev. 1998;78:547-81.
33. Chung HY, Kim HJ, Kim JW, Yu BP. The inflammation hypothesis of aging : molecular modulation by calorie restriction. Ann NY Acad Sci. 2001;928:327-35.
34. Vincenzo DM and Ennio E. Biochemical and Therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Amyotrophic lateral sclerosis. CNS & Neurological disorders. 2003;2:95-107.
35. 한백수. 6-hydroxydopamine과 1-methyl-4-phenylpyridinium에 의해 유도된 도파민성 신경세포 사멸에 대한 특성 연구. 연세대 대학원. 2003.
36. Cohen G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. Neurotoxycology. 1984;5:77-82.
37. Cohen G, Werner P. Free radicals, oxidative stress, and neurodegeneration. In Neurodegenerative Disease, Calne DB ed(Philadelphia: W.B.). 1994.
38. 홍원식. 校編 精校黃帝內經素問. 서울:동양의학연구원출판부. 1985:23-25, 39-40, 119, 303-4.
39. 박상민, 이상훈, 인창식, 강미경, 장대일, 강성길, 이윤호. 파킨슨병의 한의학적 고찰-病因病理와 鍼灸療法을 중심으로. 대한침구학회지. 2004;21(1):202-10.
40. 張從正. 儒門事親. 台北:旋風出版社. 1967;6:1-2.
41. 한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:도서출판영림사. 1992:137, 303, 353, 494, 496, 532, 535-6, 54-2, 579, 586, 623, 626.
42. 嚴用和. 重訂嚴氏濟生方. 북경:인민위생출판사. 1980:115, 117.
43. 한의과대학 방제학교수 공편저. 방제학. 서울:도서출판영림사. 1999:290-2.
44. Park YK, Whang WK, Kim IH. The antidiabetic effects of from Cornus officinalis seed. Chung-Ang J Pharm Sci. 1995;9:13-22.
45. Chung SR, Jeune KH, Park SY, Jang SJ. Toxicity and lectins constituents from the seed of Cornus officinalis. Korean J Pharmacogn. 1993;24:177-82.
46. 전연희, 김미현, 김미라. 산수유(Cornus officianalis) 에탄올 추출물의 항산화, 항돌연변이 활성 및 암세포 성장 억제 효과. 한국식품영양학회지. 2008;37(1):1-7.
47. Dai Y, Hang B, Huang Z. Inhibition of Corni fructus on experimental inflammation. Chung Kuo Chung Yao Ts Chih. 1992; 17:307-9.
48. Yamahara J, Mibu H, Sawada T, Fujimura J, Takino S.. Antidiabetic principles of Corni Fructus experimental diabetes induced by streptozotocin. Yakugaku Zasshi. 1981;101:86-90.
49. Lee JS, Lee SW. Effect of water extracts in Omija(Schizandra chinensis Baillon) on

alcohol metabolism. Kor J Dietry culture. 1990;5:259-63.
50. Brand-Williams W, Cutelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensm. Wiss. Technol. 1995;28:25-30.
51. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Bio. Med. 1999;26:1231-7.
52. 김진율. 제조 공정에 따른 커피 항산화능의 변화와 커피 박 추출물의 식품 소재화. 부경대학교 산업대학원. 2008.
53. Kochi K, Hajime O, Hisaji T. Synthesis of Novel Polyphenols Consisted of Ferulic and Gallic Acids, Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2002;10:1069-75.
54. Zhentian L, Judith J, Richard F. Use of Methanolysis for the Determination of Total Ellagic and Gallic Acid Contents of Wood and Foods Products. J. Agric. Food Chem. 2001;49:1165-8.
55. Sladowski D, Steer SL, Clothier RH, and Balls M. An improved MTT assay. J Immunol Methods. 1993;157:203-7.
56. Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT : Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO Mitochondrial fluorescent probes. Cytometry. 2002;47:236-42.
57. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine(3rd ed.). Oxford:Oxford University Press. 1999.
58. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990;87:1620-4.
59. Stamler JS, Hauslauden A.. Oxidative modifications in nitrosative stress. Nat. Stract Biol. 1998;5:247-9.
60. Ashai M, Fujii J, Suzuki K, Seo HG, Kuzuya T, Hori M, Tada M, Fujii S, Taniguchi N. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxity, J. Biol. Chem. 1995;270:21335-9.
61. Becker K, Gui M, Schirmer RH. Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione. Eur. J. Biochem. 1995;234:472-8.
62. Park SN. Skin aging and antioxidants. J. Korean Soc. Cosmetic Chem. 1997;23:75-132.
63. Antebi H, Ribiere C, Sinaceur J, Abu-Murad C, Normann R. Oxygen Tadical in Chemistry and Biology. New York. 1984:757-60.
64. Sies H, Akerboom TP. Glutathione disulfide(GSSG) efflux from cells and tissues. Methods Enzymol. 1984;105:445-51.
65. Orrenius S. Mechanism of oxidative cell damage. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. 1993:47-63.