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

淸血丹의 6-hydroxydopamine에 의해 유발된 독성에 대한 신경세포보호효과

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

The Protective Effect of *Chunghyul-dan(Qingxuedan)* Against 6-hydroxydopamine Induced Neurotoxicity.

Gwang-Ho Kim, Jong-Woo Kim, Sun-Yong Chung, Sung-Hoon Cho, Myun-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 antioxidant and neuroprotective effect of *Chunghyul-dan(Qingxuedan)* in PC12 cells and primary rat mesencephalic dopaminergic neurons.

Methods :
The anioxidant effect was investigated using the DPPH radical and ABTS cation scavenging assays and total polyphenol amout of *Chunghyul-dan(Qingxuedan)*. The neuroprotective effect of *Chunghyul-dan(Qingxuedan)* in PC12 cells was evaluated using MTT assay. The scavenging activity of *Chunghyul-dan(Qingxuedan)* on ROS production induced by 6-OHDA(6-hydroxydopamine) in PC12 cells was evaluated, as well as the attenuating effect on GSH reduction. Finally, we examined the neuroprotective effect of *Chunghyul-dan(Qingxuedan)* against 6-OHDA-induced toxicity in the primary culture of rat mesencephalic doperminergic neurons.

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

Results :
Chunghyul-dan(Qingxuedan) showed concentration-dependent scavenging activities in DPPH radical and ABTS cation scavenging assays and it was not cytotoxic to PC12 cells. In post- and co-treatment, *Chunghyul-dan(Qingxuedan)* protected PC12 cells from the 6-OHDA induced toxicity at 50 and 100 μg/mL significantly. And *Chunghyul-dan(Qingxuedan)* decreased the 6-OHDA induced ROS production at a dose dependent manner, while increaing the 6-OHDA induced GSH reduction at 50 and 100 μg/mL significantly. Finally, *Chunghyul-dan(Qingxuedan)* showed signicant protection of rat mescencephalic dopaminergic neurons from 6-OHDA at 1 μg/mL.

Conclusions :
These results demonstrate that *Chunghyul-dan(Qingxuedan)* has the antioxidant and neuroprotective effect against 6-OHDA induced cytotoxicity through decreasing ROS production and increasing GSH reduction.

Key Words :
Chunghyul-dan(Qingxuedan), Antioxidant, Neuroprotective, DPPH radical, ABTS cation, ROS.

Ⅰ. 서 론

Free radical이란 화학적으로는 쌍을 이루고 있지 않은 하나 또는 그 이상의 전자를 포함하는 원자 또는 분자이다. 이들은 거의 모두가 불안정하여 전자를 잃거나 혹은 주위로부터 전자를 하나 더 얻어 보다 안정된 상태로 가려는 성질을 가지고 있다. 이러한 free radical은 활성산소와는 동일한 의미로 사용되는데 일반적으로 문제가 되는 free radical은 주로 활성산소를 의미한다. 대표적 무기 free radical로는 superoxide anion radical(O_2^-), hydroxyl radical(·OH), hydroperoxyl radical(HO_2)이 있으며 과산화수소(H_2O_2) 역시 이들과 관련되고, 질소 radical로는 이산화질소 radical(·NO_2), 일산화질소 radical(·NO)이 있으며, 유기 free radical로는 지질 alkoxyl radical, 지질 peroxyl radical 등이 있다[1,2]. 이러한 free radical은 세포막의 불포화지방산들과 결합하여 지질과산화(lipid peroxidation) 반응을 일으켜 세포를 손상시키는 것[3] 외에, 고혈압[4], 당뇨병[5], 암[6], 노화[7,8] 및 염증[2]과 관련된다.

이 중, 신경정신과 영역에서 관심이 높은 노화 과정의 본질 특히, 신경의 퇴행은 많은 연구들의 주제였다. 그동안 쌓인 증거들은 세포들과 조직을 통해 끊임없이 진행되는 해로운 free radical 반응들이 노화 과정에 기여를 하거나 또는 그것이 주요 기여자라는 것을 말해주고 있다. 포유동물에서는 free radical 반응들이 대부분 산소와 관련된 것들이다[9]. 특히, 중추신경계는 높은 산소 이용률과 상대적으로 빈약한 농도의 고전적 항산화제(classical antioxidant) 및 연관효소들이 있고, 산화에 가장 영향을 잘 받는 생체 거대분자인 다중불포화 지질(polyunsaturated lipids)을 많이 포함

하고 있기 때문에 산화적 공격에 취약하다. 그러므로, 산화적 스트레스가 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disease)에서 주요 주제가 되는데, 그 주요 내용은 뉴런에 대한 손상은 산화적 과정(oxidative process)의 증가와 항산화적 방어(antioxidant defense)의 감소라고 할 수 있다[10].

한편, 이러한 산화적 스트레스로 인한 손상을 억제하기 위한 한방 약물을 이용한 연구들이 있어왔는데, 實邪를 瀉하는 약물로서 消食의 효능이 있는 山査[11], 發散風熱의 효능이 있는 葛根[12,13]및 桑葉[14], 苦寒하여 淸熱의 효능이 있는 豨簽[15], 黃柏[16], 白殭蠶[17] 및 玄蔘[18], 그리고 活血祛瘀의 효능이 있는 紅花[19] 등이 항산화 효능이 있는 것으로 밝혀졌으며, 補益하는 약물들로는 補氣의 효능 있는 人蔘[20,21], 補陽의 효능이 있는 免絲子[22]와 補骨脂[23], 補血의 효능이 있는 當歸[24] 및 熟地黃[25] 등과 같은 약물들도 항산화작용이 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, 복합 한방 약물의 항산화효과에 대한 연구들도 있었는데, 補氣의 효능이 있는 歸脾湯[26], 補中益氣湯[27], 加味香砂六君子湯[28] 등과 精을 補하는 瓊玉湯[29] 및 左歸飮과 右歸飮[30] 등이 항산화효능이 있는 것으로 밝혀졌다.

본 연구에서 복합 한방약물의 항산화 효능을 검정하기 위해 淸血丹(*Chunghyul-dan*, CHD)을 이용하였는데, 이는 黃連解毒湯에 大黃을 가한 처방이다. 黃連解毒湯은 약성은 苦寒하여 淸熱解毒, 健裏平肝 등의 효능이 있어 일체의 實熱火毒이 三焦에 가득차서 나타나는 大熱煩渴, 口燥咽乾, 錯語不眠 등의 증상과 또는 熱病으로 인한 吐血, 衄血, 심한 열로 인한 發斑, 身熱下痢, 濕熱黃疸, 小便黃赤, 舌紅苔黃, 脈數有力 등의 증상에 사용되어 왔다[31]. 黃連解毒湯에 대한 연구결과, 실험적으로 혈압강하 효과 및 혈중지질 감소효과[32], 면역반응 억제 효과[33], 해열, 진통 및 진정작용[34], 뇌허혈에 대한 신경 보호작용[35], 심혈관계에 대한 보호효과[36]가 있는 것으로 밝혀졌으며, 淸血丹은 고지혈증에 효과가 있고[37], 항산화 효과 및 NO 생성을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다[38].

이렇게 항산화 효과가 있는 것으로 알려진 黃連解毒湯에 大黃을 가한 淸血丹은 淸熱하는 효능을 지니는[39] 黃芩, 黃蓮, 黃柏, 梔子 및 大黃으로 구성되어 있으며, 개개의 약물이 모두 항산화작용이 있는 것으로 나타났다[40-44]. 따라서 항산화효과가 있는 것으로 입증된 약물들로 구성된 淸血丹 또한 의미 있는 항산화효과를 가질 것으로 생각되었으며, 이에 대한 검증을 위해 이미 항산화 효과가 있는 것으로 알려진 비타민 C와 비타민 E[45] 그리고 黃芩[42]을 대조군으로 설정하여 淸血丹의 free radical 제거효과에 대해서 알아보고자 하였다. 또한 신경세포의 퇴행에 산화적 스트레스가 관여한다는 사실에 근거하여, 淸血丹이 산화적 스트레스로부터 신경세포를 효과적으로 보호할 수 있는지를 알아보고자 하였으며, 이를 위해 rat의 pheochromocytoma인 PC12 세포와 rat의 태아 중뇌세포배양에서 6-OHDA에 대한 淸血丹의 보호효과를 실험한 후 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험약재

본 실험에서 사용한 淸血丹은 경희의료원 처방에 의해 판매되는 HH333을 사용하였으며, HH333의 동결건조물을 시료로 사용하였다. 淸血丹은 경희대학교 한의과대학 부속한방병원

약제과에서 조제된 것이다. 방법은 각 한약재의 추출에 적합하도록 조말로 분쇄하고 각 1 kg씩을 취하여 환류냉각기에 옮기고 80% 에탄올로 2시간 동안 환류냉각 시키면서 추출여과하고 잔사에 대해 같은 방법으로 추출하여 추출액을 합하여 감압 하에 수분이 50%가 되도록 농축하고 동결 건조하여 분말로 만들어 사용하였다(yield = 300 mg / 1.2 g × 100 = 25%). 淸血丹은 같은 무게의 비율의 약재로 구성되어 있으며, 그 구성은 다음과 같다(Table Ⅰ).

Table Ⅰ. The Contents of *Chunghyul-dan(Qingxuedan)*

Herb	Pharmaceutical Name	Scientific Name
黃蓮	*Coptis Rhizoma*	Coptis japonica MAKINO from Japan
黃柏	*Phellodendri Cortex*	Phellodendron amurense RUPPECHT from China
黃芩	*Scutellariae Radix*	Scutellaria baicalensis GEORGI from Young-am, Korea
梔子	*Gardeniae Fructus*	Gardenia jasminoides ELLIS from Young-am, Korea
大黃	*Rhei Rhizoma*	Rheum palmatum LINNE from China

2) 실험시약

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-picryl hydrazyl(DPPH), 2,2'-azinobis- (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS), potassium persulfate, dimethyl sulfoxide (DMSO), para-formaldehyde (PFA), 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 사용하였다. Rabbit anti-tyrosine hydroxylase(TH) affinity purified polyclonal antibody는 Chemicon (Temecula, USA), biotinylated anti-Rb antibody와 ABC standard kit은 Vector(Burlingame, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 淸血丹의 항산화능 측정

(1) DPPH radical 소거 작용 측정

DPPH radical에 대한 소거활성은 Blois의 방법[46]으로 측정하였다. 0.2 mM, DPPH 100 μL에 淸血丹을 2-1000 μg/mL의 농도별로 100 μL씩 가하여 잘 혼합한 후, 37℃에서 5분 간격으로 30분 까지 Spectrophotometer(Versamax, Molecular Devices, USA)로 517 nm에서의 흡광도를 측정하여 계산하였다.

DPPH radical inhibition activity(%)=(control O.D.-(sample O.D.-blank O.D.)) /control O.D. × 100

(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 24시간 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 용액

950 μL에 2-1000μg/mL의 농도의 淸血丹을 50 μL 씩 가하여 정확히 5분 동안 방치한 후 spectrophotometer로 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS cation inhibition activity(%)=(control O.D.-sample O.D.)/control O.D. × 100

(3) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법[47]을 응용하여 측정하였는데, 총 폴리페놀의 함량이 높으면 항산화능력이 높다는 것을 의미한다. 淸血丹을 증류수를 이용해 희석하여 2N 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) 淸血丹의 PC12 cell에 대한 영향

(1) 세포배양

본 실험에 사용된 세포주는 수컷 Sprague-Dawley계 rat의 pheochromocytoma인 PC12 세포이며, American Type Culture Collection (Rockville, USA)에서 분양받아 사용하였다. 5% (v/v) FBS, 10% horse serum, 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 RPMI 배지를 사용하였으며 37℃, 5% CO_2 , 95% air 조건에서 배양하였다.

(2) MTT assay를 이용한 Cell viability 측정

96 well plate에 $2.5X10^4$ /well 의 PC12 세포를 분주하고 48 시간 후, 淸血丹을 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/mL 농도별로 24시간 동안 처리하였다. MTT를 처리하여 3시간 배양 후, DMSO를 이용해 decrystalize시켜 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

(3) 6-OHDA에 대한 세포 보호 효과 측정

96 well plate에 $2.5X10^4$ /well 의 PC12 세포를 분주하고 48시간 배양하였다. 이후 淸血丹을 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/mL의 농도로 21시간 처리하고 淸血丹 제거후 6-OHDA(300 μM)을 3시간 처리하거나, 6-OHDA(250 μM) 3시간 처리 후 제거한 다음 淸血丹을 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/mL의 농도로 21 시간 처리하였다. 또한, 淸血丹을 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/mL의 농도로 3시간 처리 후 이를 제거하지 않고, 250 μM의 6-OHDA을 21시간 더 반응시켰다. 반응 종료 후 MTT를 처리하여 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율을 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

(4) 6-OHDA에 의한 ROS 측정

ROS 측정은 2,7-dichlorodihydro-fluorescein diacetate(H_2 DCF-DA)를 사용해 fluorescence를 측정하는 방법을 이용하였다. 96 well plate에 $2.5X10^4$/well 의 PC12 세포를 분주하고 48시간 후 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/mL의 농도별로 淸血丹을 3시간 처리한 후 6-OHDA를 21시간 처리하였다. 20 μM H_2 DCF-DA를 넣은 후 30 분간 배양하였다. PBS로 세척 후, fluorescence excitation 495 nm, emission 530 nm로 측정하였다.

(5) 6-OHDA에 의한 glutathione(GSH) 측정

淸血丹의 3시간 처리 및 6-OHDA 21시간 처리 후 cell collection 과정을 거친 후 상층액을 제거하고 10 mmol/L의 HCl을 넣고 냉동(freezing) 및 해동(thawing)을 2번 반복하였다. 그 후 5% SSA(sulfosalicylic acid)를 넣고 800

g, 4℃에서 10분간 원심분리 하였다. 96 well plate에서 각 well에 co-enzyme working solution과 buffer solution, enzyme working solution을 넣고 37℃에서 5분간 배양한 후 GSH standard solution과 sample solution을 넣고 37℃에서 10분간 배양하였다. Substrate working solution을 넣고 실온에서 10분간 배양한 후 spectrophotometer 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Primary culture에서 淸血丹의 6-OHDA에 대한 뇌세포 보호효과 측정

(1) 태아중뇌 배양 및 약물처리

Sprague-Dawley 14일 태아의 중뇌 조직을 박리하여, 포셉을 이용하여 기계적으로 분리하였다. 조직에 trypsin을 처리하여 세포 숫자를 세고 PLL(poly-L-lysine)로 미리 코팅한 coverslip에 seeding 한 후 37℃ 배양기에서 10% FBS를 포함하는 배양액으로 5일 동안 증식시켰다. FBS가 없는 배지에 淸血丹을 0.1, 1 μg/mL의 농도로 처리하고 6시간 후 10 μM의 6-OHDA를 처리하였다. 18 시간 후 4% PFA로 고정하고 PBS로 세척하였다.

(2) 면역조직화학법

PBS로 세척 후, 1% bovine serum albumin과 0.1% Triton X-100를 포함하는 PBS로 primary antibody(1:2000 rabbit anti rat TH)를 희석하여 상온에서 하룻밤 반응시켰다. PBS로 세척 한 후 secondary antibody로 biotinylated anti rabbit IgG(H+L)을 이용하여 반응시켰다. ABC solution에 90분간 반응시킨 후 DAB(diaminobenzidine)로 발색하였다. Gelatin이 코팅된 슬라이드에 coverslip을 mounting 하였다. 현미경(Zeiss Axioskop, Germany)을 사용하여 淸血丹의 뇌세포에 대한 영향을 관찰하였다.

3. 통계처리

모든 측정값은 평균값과 표준오차로 표시하였다. 각 실험군의 통계학적 분석은 SPSS 12.0 K for windows 에서 one-way ANOVA 방법을 사용하였다. 후검정은 Least Significant Difference를 실시하였으며 평균값의 유의성을 5% 미만의 한계로 조사하였다.

Ⅲ. 결 과

1. DPPH radical 소거 작용

비타민 E(Vit E), 비타민 C(Vit C), 黃芩(HG) 및 淸血丹(CHD)의 농도별 DPPH radical 소거 작용 측정의 결과, 농도의 증가에 따라 DPPH radical의 소거 작용도 증가되는 것으로 나타났다. 淸血丹은 2-1000 μg/mL의 농도에서 9.63-90.27% 소거 활성을 나타내었으며, 50% 소거 활성에 필요한 淸血丹의 농도는 88.35 μg/mL를 보였다. 한편, DPPH radical을 50% 소거 활성에 필요한 농도는 비타민 E가 가장 낮았으며(7.95 μg/mL), 비타민 C(23.13 μg/mL), 黃芩(33.89 μg/mL) 그리고 淸血丹(88.35 μg/mL) 순서로 50% 소거하는데 필요한 농도가 높아지는 경향이 나타났다(Fig. 1, 2).

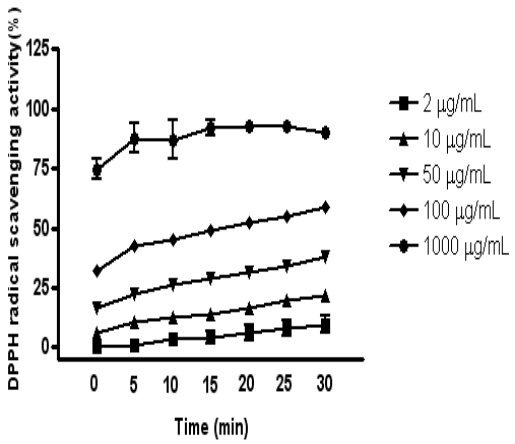


Fig. 1. Scavenging effect of *Chunghyul-dan(Qingxuedan)* on DPPH radical according to concentration.

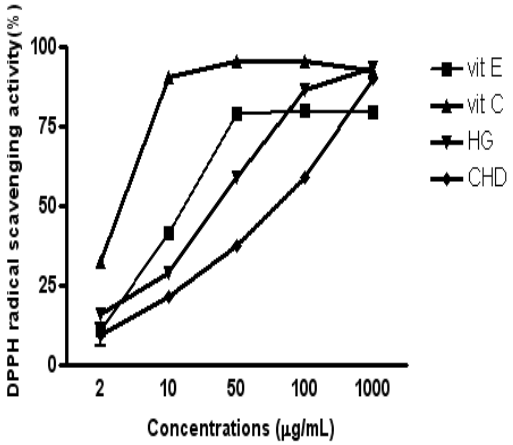


Fig. 2. Comparison of scavenging effect among Vit E, Vit C, HG and CHD on DPPH radical.

Vit E: Vitamine E, Vit C: Vitamine C, HG: Hwangguem, CHD : *Chunghyul-dan(Qingxuedan)*

2. ABTS cation 소거 작용

비타민 E, 비타민 C, 黃芩 및 淸血丹의 농도별 ABTS cation 소거 작용 측정의 결과, 농도의 증가에 따라 ABTS cation의 소거 작용도 증가되는 것으로 나타났다. 淸血丹은 2-1000 μg/mL 의 농도에서 5.31-92.89% 소거 활성을 나타내었으며, 50% 소거 활성에 필요한 淸血丹의 농도는 5.76%였다. 한편, ABTS cation을 50% 소거 활성에 필요한 농도는 비타민 E가 가장 낮았으며(0.03 μg/mL), 비타민 C(1.26 μg/mL), 淸血丹(5.76 μg/mL) 그리고 黃芩(13.71 μg/mL) 순서로 ABTS cation 50%를 소거 활성에 필요한 농도가 높아지는 경향이 나타났다(Fig. 3).

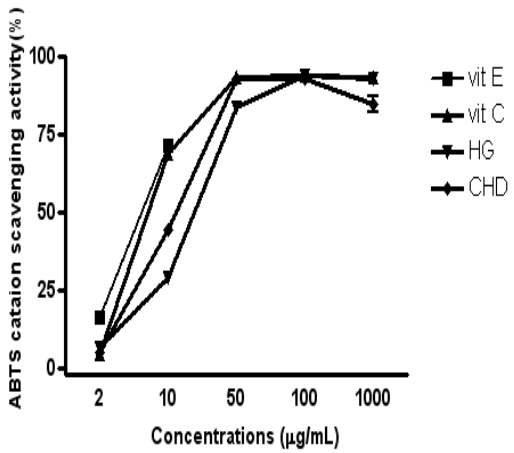


Fig. 3. Comparison of scavenging effect of Vit E, Vit C, HG and CHD on ABTS cation.

Vit E: Vitamine E, Vit C: Vitamine C, HG: Hwangguem, CHD: *Chunghyul-dan(Qingxuedan)*

3. 총 폴리페놀 함량

淸血丹에 함유되어 있는 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 함량을 구하였다. 이때 이용된 공식은 다음과 같다 ;

$$y = 0.009x + 0.0734,\ R^2=0.9525$$

이 공식을 이용한 결과, 淸血丹 10 mg에 함유되어 있는 총 폴리페놀 화합물의 양은 157.20 ± 3.26 μg 이었다.

4. PC12 cell viability에 미치는 영향

PC12 cell에 淸血丹을 투여한 후 세포의 생존율을 조사하였으며, 淸血丹만을 단독 투여했을 때는 세포에 독성작용이 없는 것으로 나타났으며, 100 μg/mL, 200 μg/mL 농도에서는 formazan crystal로 변환되어 세포에 침착되는 MTT의 양이 증가하여 cell viability를 높혔다(Fig. 4).

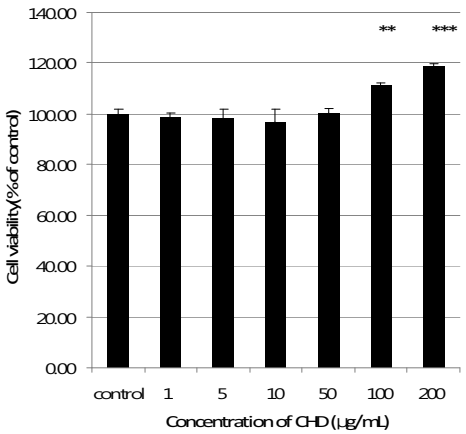


Fig. 4. The effect of CHD on the cell viability.
**: p<0.01 , ***: p<0.001 compared to the control group
CHD: *Chunghyul-dan(Qingxuedan)*

5. 6-OHDA에 대한 PC12 cell 보호효과

1) 淸血丹 전처리의 세포보호 효과

淸血丹을 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/mL의 농도로 21 시간 처리한 다음 이를 제거한 후 6-OHDA를 3시간 처리한 경우, 5-50 μg/mL의 농도에서는 보호효과를 농도 의존적으로 나타내었으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 5).

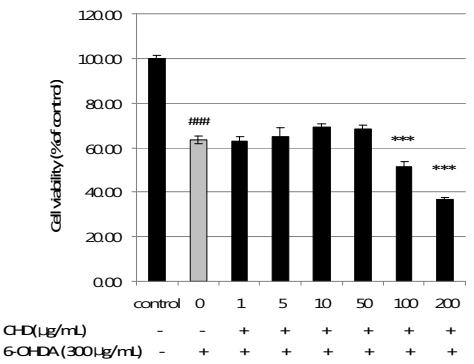


Fig. 5. The effect of pre-treatment of CHD on 6-OHDA induced cell death.
###: p<0.001 compared to the control group
***: p<0.001 compared to the 6-OHDA only treated group
CHD: *Chunghyul-dan(Qingxuedan)*

2) 淸血丹 후처리의 세포보호 효과

6-OHDA를 먼저 3 시간 처리한 다음 이를 제거 후 淸血丹을 농도별로 21 시간 투여했을 때, 淸血丹의 농도에 따라 보호효과가 증가되는 경향이 있었으며, 50, 100, 200 μg/mL의 淸血丹 농도에서는 유의한 세포보호 효과를 얻을 수 있었다(Fig. 6).

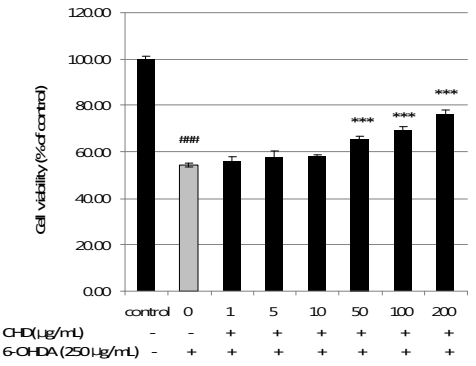


Fig. 6. The effect of post-treatment of CHD on 6-OHDA induced cell death.
###: p<0.001 compared to the control group
***: p<0.001 compared to the 6-OHDA only treated group
CHD: *Chunghyul-dan(Qingxuedan)*

3) 淸血丹 동시처리의 세포보호 효과

淸血丹을 농도별로 3 시간 처리한 후 이를 제거하지 않고 여기에 동시에 6-OHDA를 처리하였을 때, 1-100 μg/mL 농도에서는 농도의존적 세포보호효과를 보였으며, 50, 100, 200 μg/mL의 淸血丹 농도에서는 유의한 세포보호 효과를 얻을 수 있었다(Fig. 7).

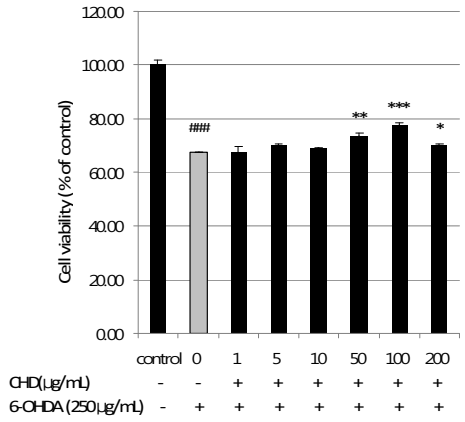


Fig. 7. The effect of co-treatment of CHD on 6-OHDA induced cell death.

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

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

CHD: *Chunghyul-dan(Qingxuedan)*

6. 6-OHDA에 의한 ROS 생성 억제

淸血丹을 농도별로 3 시간 먼저 PC12 cell에 처리한 후, 6-OHDA를 淸血丹과 함께 21 시간 동안 처리하였을 때의 ROS 생성의 양을 상대적으로 측정한 결과, 농도의존적으로 100, 200 μg/mL 농도의 淸血丹 처리에서 6-OHDA에 의한 ROS의 생성이 유의하게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 8).

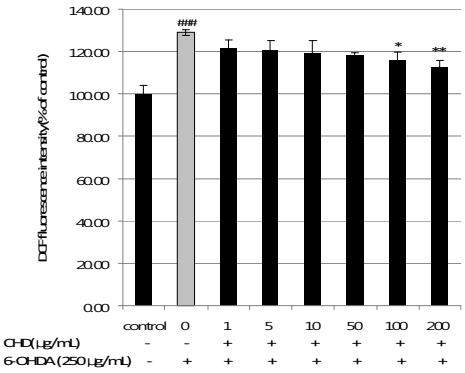


Fig. 8. The effect of CHD on 6-OHDA induced ROS production.

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

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

CHD: *Chunghyul-dan(Qingxuedan)*

7. 6-OHDA에 의한 Glutathione(GSH) 감소 억제

농도별 淸血丹 및 6-OHDA를 PC12 cell에 처리한 후, Glutathione의 양을 측정한 결과, 50 μg/mL, 100 μg/mL 농도의 淸血丹 처리에서 6-OHDA에 의해 감소된 Glutathione의 양이 유의하게 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 9).

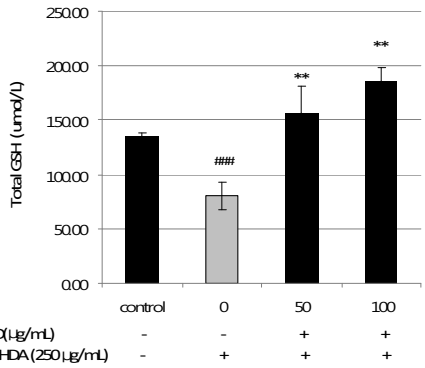


Fig. 9. The effect of CHD on 6-OHDA induced GSH reduction.

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

**: p<0.01 compared to the 6-OHDA only treated group

CHD: *Chunghyul-dan(Qingxuedan)*

8. Primary culture에서 6-OHDA에 대한 도파민 세포보호효과

淸血丹을 농도별로 6시간 동안 rat의 태아 중뇌세포에 처리한 후 18시간 동안 6-OHDA를 처리한 결과, 51.75%로 감소한 도파민성 태아 중뇌세포가 1μg/mL 농도의 淸血丹에 의해 88.64%까지 증가되었다. 즉, 1 μg/mL 농도의 淸血丹이 6-OHDA로 인한 세포의 손상을 유의하게 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 10).

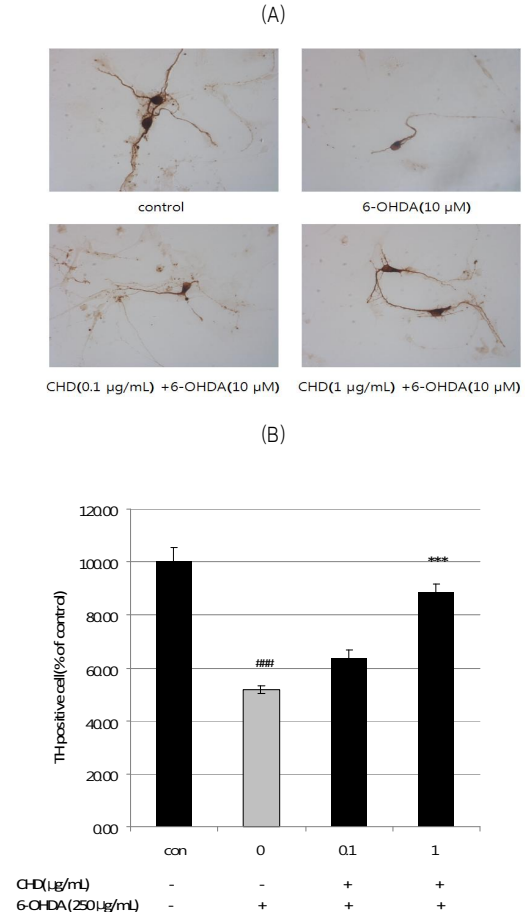


Fig. 10. The effect of CHD on primary culture of dopaminergic cells.

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

***: p<0.001 compared to the 6-OHDA only treated group

CHD: *Chunghyul-dan(Qingxuedan)*

Ⅳ. 고 찰

Oxigen free radical란 호흡과정에서 몸속으로 들어간 산소가 산화과정에 이용되면서 여러 대사과정에서 생성되어 생체조직을 공격하고 세포를 손상시키는 산화력이 강한 산소를 지칭하는데, 이들은 반응성이 매우 크다[48]. 산화적 손상은 지질의 과산화, 세포막의 손상, 단백질의 산화 및 절단(fragmentation)을 일으키며, 다양한 생물학적 과정 예를 들어 감염, 암의 발생, 돌연변이의 발생, 노화, 방사능에 의한 손상 그리고 광학생물학적 효과(photobiological effect)와 같은 것들도 반응성 산소종과 연관이 있는 것으로 나타났다[45,49]. 이러한 free radical은 정상 세포에서도 대사과정 중에 생성되지만 생체 내에는 superoxide dismutase(SOD), catalase, peroxidase 등의 항산화 효소와 함께 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone, 요산 등과 같은 항산화 물질이 존재하여 스스로를 보호하고 있다[50].

노화와 연관된 다양한 종류의 신경퇴행성(neurodegenerative) 질환들이 있는데, 여기에는 4가지의 중요한 실마리가 관련되어 있다. 첫째는 신경염증성(neuroinflammatory) 물질과 만성적인 산화적 스트레스 사이의 상호작용이다. 이는 신경염증과 산화적 스트레스가 신경퇴행성 질환과 깊은 관련이 있다는 것을 의미한다. 최근의 연구들에서, 염증성 신호(inflammatory signaling)에서의 second messenger로서 NO(nitric oxide)가 superoxide와 함께 활성화된 대식세포(중추신경에서는 미세아교세포)에서 효소로부터 방출된다는 것이 밝혀졌다. 많은 양으로 축적된 확산성(diffucible) NO와 superoxide은 peroxynitrite를 만들어낸다. NO_2 및 연관된 반응성 질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 산화와 질

산화 모두 가능한 화학물질로서[51], 소위 "질산화 스트레스(nitrosative stress)"의 상태를 초래하는데, 반응성 산소종(ROS)와 반응성 질소종(RNS)은 함께 퇴행성질환에서 어떤 손상을 매개하는 것으로 받아들여지고 있다[52-55]. 미세아교세포(microglial cell)에서 유래한 반응성 산소종과 질소종은 주위 신경들을 자극할 수 있으며, 또한 역으로, 산화제들은 신경교세포 안에서 전구염증성 유전자(pro-inflammatory gene)의 전사를 자극할 수 있다. 둘째는 뇌세포안에 펼쳐진(unfolded) 또는 잘못 접혀진(misfolded) 단백질들의 축적이며, 이것은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 근위축성 측삭경화증(ALS)에서 언급되어 진다. 셋째는 알츠하이머병, 파킨슨병 및 다발성 경화증에서 가장 흔한 것인데, 산화환원-반응성 금속이온(redox-active, 예: Cu, Fe), 산화환원-비반응성 금속이온(redox-inactive, 예: Zn) 양쪽 모두의 잘못된 항상성(dyshomeostasis)이다[56-58]. 넷째는 미토콘드리아의 비정상적 작용[59]이다. 하지만 이러한 요소들은 독립적인 것이 아니고 서로 연관되어 있다.

특히, 미토콘드리아 내에서의 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)는 반응성 산소종의 주요 원천이기 때문에, 신경퇴행성 질환에서의 미토콘드리아의 비정상과 산화적 스트레스 사이에는 본질적 연관이 있다. 정상 생리적 상황하에서는 미토콘드리아는 스스로를 보호하기 위해, 이중막 중 내측 막(inner membrane)에 free radical 제거제(scavenger)와 효소에 의한 반응성 산소종 제거 시스템을 갖고 있다. 그러나 어떤 병리적 상황 하에서는 미토콘드리아의 방어가 위태롭게 되는 것으로 나타났는데, 이는 유전적 변이발생(genetic mutation)이나 radical 생산의 증가 때문이다. 미토콘드리아의 결함이 세포독성의 일차적 원인인지 아니면 이차적으로 생긴 손상인지 명확히 구별하기는 어렵지만, 미토콘드리아로부터 기원한 산화적 스트레스가 신경 퇴화와 관련있는 일차적 사건(primary event)이라는 증거가 점점 더 나타나고 있다[60]. 더욱이, 미토콘드리아의 반응성 산소종이 호흡성 연쇄(respiratory chain)에 대한 자해적 손상을 일으킨다는 인식이 대두되고 있는데, 이러한 것은 반응성 산소종의 생산을 증가시키고 일련의 더 심한 미토콘드리아의 단백질 손상을 초래한다. 노화 즉, 연령의 경과와 관련되어 나타나는 알츠하이머병과 파킨슨병은 미토콘드리아의 이상(aberration), 대사적 불균형 및 그로 인한 산화적 스트레스의 역할이 중요한 역할을 하는 질병이다[61-63]. 알츠하이머병과 파킨슨병에서의 산화적 스트레스에 대한 증거는 이 질환으로 영향받은 뇌의 영역들이 비정상적으로 높은 수준의 산화환원-활성(redox-active) 금속, 특히 철을 함유하고 있다는 소견과 일치한다. 산화환원-활성(redox-active) 금속의 과잉은 적어도 단백질, 다중불포화 지질 및 DNA와 RNA에서 관찰되는 산화적 손상에 최소한 부분적으로라도 책임이 있을 것으로 생각된다[64-66].

본 연구에서는 세포의 자가사멸(apoptosis)를 유도하기 위해, 6-hydroxydopamine(6-OHDA)가 사용되었다. 6-OHDA는 in vitro 와 in vivo 에서 파킨슨병을 만들어 내기위해 광범위하게 사용되었던 선택적 카테콜아민성 신경독소(catecholaminergic neurotoxin)이며, 파킨슨병의 신경병리학적 및 생화학적 특징을 모방하는 독성을 유발하는 것으로 받아들여진다[67]. 6-OHDA는 in vitro 모델에서, 인간의 신경아세포 라인(neuroblastoma cell line)[68,69], primary neuronal culture[70,71] 및 쥐의 부신흑색세포종 세포 라인(adrenal pheochromocytoma cell line)인 PC12[72,73]와 같은 넓은 영역의 신경세포에서 독성을 유발하는 것으로 나타났다. PC12 세포에서는 6-OHDA가 세포의 자가사멸을 유

도하는 것으로 나타났고, 또한 6-OHDA에 의해 시작된 미토콘드리아의 기능장애가 cytochrome *c*의 유리와 caspase-3의 활성을 유도하는 것으로 나타났다[72,74-76]. 6-OHDA는 산소분자에 의해 빠르게 산화되어 superoxide anion(O_2^-)과 hydrogen peroxide(H_2O_2) 그리고, 2-hydroxy-5-(2-aminoethyl)-1,4-benzoquinone(p-quinone)을 만들며, 이때 만들어진 superoxide anion(O_2^-)과 hydrogen peroxide(H_2O_2)은 세포독성의 작용을 가진다[77]. 반면에, *p*-quinone이 6-OHDA로 유발된 세포사에 매개역할을 한다는 보고도 있다[78]. 그러나 반응성 산소종의 생산과 세포독성 유발의 정확한 메커니즘은 일부분 caspase 활성과 관련이 있긴 하지만, 아직 완전하게 명확하게 밝혀지진 않았다.

6-OHDA는 도파민과 유사한 구조를 가지고 있어, 도파민 친화성 신경과 관련된 질환 특히, 파킨슨병의 연구에 많이 사용된다[79]. James Parkinson에 의해 1871년 처음 진전마비로 묘사된 파킨슨병은 독특하며 착색된 흑질성 도파민성 신경세포의 점진적인 퇴행의 결과이다. 파킨슨병의 증상들은 흑질에서 도파민성 신경의 결손이 최소 50%이상 되었을 때, 그리하여 도파민의 레벨이 80%이상 감소되었을 때 나타난다[80,81]. 주요 임상증상으로는 자발적 동작을 시작하는데 어려움이 있고(akinesia), 느리고 감소된 범위의 움직임(bradykinesia), 휴식기 동안의 리듬있는 5-7 Hz의 비자발적 떨림 그리고, 주요 근육군들이 딱딱하게 되는 추체외로계성 강직 등이 있다. 경도우울(hypomania)과 눈반짝거림(eye blinking) 및 발성의 감소(hypophonia) 또한 이 질환의 초기 발현모습이다[81].

많은 가설들이 파킨슨병에서의 도파민성 신경세포들의 손상에 대해 제안되어져 왔는데, 특히 산화적 스트레스는 도파민성 신경세포에 만연한 높은 산화적 조건(oxidative condition) 때문에, 파킨슨병의 발전과 일관되게 관련되어져 왔다. 뇌에서 산화적 스트레스는 반응성 산소종의 생산이 내재적 항산화 시스템의 능력을 넘어설 때 발생하는데, 이는 결국 핵산, 지질 및 단백질의 변형으로 인한 세포 손상과 자가사멸을 초래한다[82]. 모든 조직이 산화적 스트레스의 결과로 손상받을 수 있지만, 뇌는 엄청난 산소 요구량 때문에 특히 취약한 편이다[63]. 이중 흑질이 산화적 스트레스에 매우 취약한 것으로 보이는데 이는 많은 수의 도파민성 신경세포 때문이며, 이러한 것이 결국 아주 많은 양의 반응성 산소종을 생산하게 한다.

도파민 대사는 반응성 산소종의 증가와 관련이 있다. 즉, 흑질의 도파민은 일반적으로 MAO(monoamine oxidase)에 의해 탈아민화되며, 결국 dihydroxyphenylacetic acid와 H_2O_2를 생산하지만[83], 구조단백질의 변형과 glutathione의 감소에 역할을 하는 H_2O_2, Dopamine quinone 및 semi-quinone의 형성을 초래하는 자가산화(auto-oxidation)에 의해 대사되기도 한다[84-86]. 이렇게 생산된 H_2O_2는 Fenton 반응에 의해 매우 파괴성있는 hydroxyl radical(·OH)로 변환된다. 이러한 hydroxyl radical(·OH)은 거의 모든 세포성 거대분자들과 연속적으로 반응하며 그럼으로써 광범위한 세포 손상을 초래한다[63].

따라서, 이와 같이 여러 종류의 세포의 퇴행이나 자가사멸과 깊은 관련이 있는 반응성 산소종으로부터 세포들을 효과적으로 보호할 수 있는 한약물이 필요하다고 생각되어 본 연구를 시행하게 되었는데, 반응성 산소종들 즉, superoxide anion(O_2^-)과 hydrogen peroxide(H_2O_2)을 만들어내는 6-OHDA의 작용을 이용하여 淸血丹이 6-OHDA와 연관된 작용을 효과적으로 차단할 수 있는지 또는 반응성 산소종들을 제거할 수 있는지를 검토하고자 하였고, 또한 반응성 산소종을 효소계의 활성을 통해 제거할 수 있는지의 여부를 알아보

기 위해 6-OHDA에 의해 감소되는 glutathione의 양도 측정하였다.

淸血丹은 기존의 黃連解毒湯에 大黃을 가한 처방이며 본 실험에서는 80% 에탄올 추출물을 사용하였고 黃芩, 黃蓮, 黃柏, 梔子 및 大黃으로 구성되었다. 黃連解毒湯은 淸熱瀉火解毒의 효능이 있는 처방으로 傷寒의 大熱과 煩燥로 인하여 不眠하고, 혹은 병이 나은 뒤에 술을 마셔 다시 심해진 증과 일체의 熱毒을 다스리는 효과가 있는 약물이다[87]. 黃連解毒湯의 주요 작용으로는 혈중 지질을 낮추는 작용[88], 허혈 및 재관류로 인한 뇌손상을 감소시키는 작용[89], 간세포에서의 지질 과산화를 억제하는 작용[104], 고콜레스테롤혈증 동물모델에서 동맥경화의 진행을 억제하는 작용[91], 혈압강하 효과[92] 및 소염작용[93]이 보고되었다. 淸血丹 역시 항염증[38,94], 혈압강하[95], 혈청지질 강하[96,97] 등의 효과가 있음이 여러 실험을 통하여 밝혀졌다. 특히, 혈청지질 강하에 대한 실험에서, 淸血丹은 cholesterol의 생합성을 제어하는 HMG-CoA(hydroxymethylglutaryl-coenzyme A) reductase와 pancreatic lipase의 작용을 억제함으로써 혈중 지질을 낮추는 효과가 있는 것으로 관찰되었다[96]. 또한, oxazolone으로 유발시킨 피부염에 관한 연구에서 淸血丹이 염증과 관련있는 COX - 2 (cyclooxygenase - 2)의 mRNA 수준을 감소시켰으며[94], lipopolysaccharide로 유발시킨 염증에서 淸血丹이 PGE2 (prostaglandin E2), NO의 생산을 감소시키고, iNOS와 COX - 2의 expression을 억제하는 것으로 나타나[38], 淸血丹이 유의한 항염증 효능이 있는 것으로 나타났다.

항산화작용이 있는 黃蓮[99,100], 黃芩[101, 102], 黃柏[103], 梔子[104], 大黃[105]으로 구성된 淸血丹 역시 항산화 작용이 있을 것으로 예상하여, free radical 제거 능력을 평가하기위해 DPPH radical과 ABTS cation을 이용하였으며, 그 효과를 비교하기 위해 이미 뛰어난 free radical 제거능력이 입증된 비타민 E, 비타민 C[45] 및 黃芩[106]을 이용하였다. 淸血丹은 농도가 증가할수록 DPPH radical 및 ABTS cation을 제거하는 효능이 증가됨을 보였다(Fig. 1, 3). DPPH radical의 50%를 소거하는데 필요한 농도는 淸血丹이 가장 높아 비타민 E, 비타민 C 및 黃芩의 free radical 소거능력에 미치지 못하였으며(Fig. 2), ABTS cation의 50%를 소거하는 효능은 淸血丹이 黃芩보다는 높았으나 다른 대조 시료들보다는 높았다(Fig. 4). 그러나 농도가 점차 증가됨에 따라 다른 시료들과 비슷한 소거능력을 나타내게 되었으며, ABTS cation 제거 능력에서는 오히려 黃芩보다도 뛰어난 효과가 있는 것으로 나타났다. 따라서, 淸血丹을 단기간 적은 농도로 투여하기 보다는, 어느 정도 장기간 투여하게 되면 뛰어난 free radical 소거능력을 발휘하게 되어 우수한 항산화 효과를 보이게 될 수 있으리라 사료된다.

폴리페놀은 채소와 과일 등에 함유되어 있으며 그 화학적 구조에 따라 8000여 가지가 있는데, 가장 많은 것은 flavonoid와 phenolic acid들로 각각 식용 폴리페놀의 60%와 30%를 차지한다. 이중 몇몇 폴리페놀은 in vitro에서 확실히 항산화적 역량을 보여주었으며, 지질, 단백질 또는 DNA를 산화적 손상으로부터 보호하는 능력을 지녔다[107]. 따라서 이러한 폴리페놀을 함유하고 있다는 것은 항산화기능이 있다는 것을 의미한다고 해석할 수 있는데, 본 연구에서 淸血丹의 폴리페놀의 양을 tannic acid의 표준곡선을 이용하여 측정한 결과 淸血丹 10 mg 당 157.20 μg의 폴리페놀을 함유하고 있었다. 아르헨티나에서 길러지는 녹차(Camellia sinensis)의 경우 폴리페놀을 gallic acid equivalent의 21.02 - 14.32%로 함유하는 것으로 나타났으며[108], 엉겅퀴과 식물인 silymarin의 경우에는 같은 조건에서 녹차는

평균 0.313 mg을 함유하고 있는 것과 비교할 때 gallic acid equivalent 기준으로 mg 당 평균 0.484 mg을 함유하는 것으로 조사되었다[109].

淸血丹이 PC12 cell에 대해 세포 독성이 있는지를 알아보기 위해 淸血丹을 단독 처리 한 후 MTT assay를 이용하여 淸血丹이 세포 독성이 있는지의 여부를 검사하였으며, 6-OHDA에 의해 발생되는 산화적 스트레스로부터 淸血丹이 얼마나 세포를 잘 보호할 수 있는지를 알아보기 위해서도 MTT assay를 이용하였다. MTT는 세포내로 들어가 효소들에 의해 formazan crystal로 환원되는데 이것은 거의 용해되지 않기 때문에 세포내에 축적된다. 이 축적된 양은 세포의 환원능력을 보여주는 것으로 미토콘드리아와 소포체의 능력을 이용하는 검사법이다. 이러한 점에 근거하여 본 실험에서는 산화적 손상을 입은 세포의 항산화능력을 평가하기 위해 MTT assay를 이용한 것이다. MTT assay 상의 수치의 증가는 세포의 산화성 손상의 감소와 산화성 손상과정에서 주로 미토콘드리아를 매개로하여 야기되는 세포의 자기사멸의 발현을 억제한다고 해석할 수 있다. 전에는 이 결과를 세포가 증식했다는 식으로 해석하기도 했는데[110] 그 이유는 formazan crystal의 형성이 미토콘드리아에 있는 환원효소에 의한 것이라고 가정했기 때문이다. 미토콘드리아에는 일정량의 효소가 있을 것이고 이 효소양이 증가했다는 것은 미토콘드리아의 수, 즉 세포수가 많다는 의미를 가질 것이고 따라서 어떤 약물의 투여시 MTT 감소비율의 값이 높게 나오면 세포수가 상대적으로 많다, 즉 세포를 보호했다는 뜻으로 해석되었던 것이다. 하지만 이러한 결과는 이때의 환원반응이 미토콘드리아뿐만 아니라 lysosome 등 다른 소포체에 의한 것들도 상당량 있다는 의견이 제시되었다[111]. 이러한 이유로 최근에는 MTT 감소비율의 증가가 세포보호로 해석되지 않고 세포의 환원활성 능력의 증가로 해석된다. 본 실험에서 淸血丹이 세포 독성있는지의 여부를 검사하기 위해 MTT assay를 시행한 결과, 농도가 증가함에 따라 formazan crystal로 변환되는 MTT의 양이 증가하는 것으로 나타나 淸血丹이 세포에 대한 독성작용은 없는 것으로 나타났다(Fig. 5).

다음으로 淸血丹을 6-OHDA와 함께 전처리, 후처리 및 동시처리하여 6-OHDA에 의해 만들어지는 산화적 스트레스로부터 PC12 cell을 보호할 수 있는지를 검사하였다. 淸血丹 전처리 과정은 6-OHDA에 의한 세포손상으로부터 세포를 보호할 수 없었으며 오히려 100 μg/mL와 200 μg/mL의 용량에서는 6-OHDA에 의한 세포손상을 더욱 악화시키는 상황을 초래하였으나(Fig. 6), 淸血丹 후처리 과정은 투여된 淸血丹의 농도가 증가함에 따라 6-OHDA에 의한 세포손상에 대한 세포보호효과가 증가됨을 보였으며, 특히 50 μg/mL, 100 μg/mL 및 200 μg/mL에서는 유의한 세포보호효과를 보여주었다(Fig 7). 또한 淸血丹 동시처리 과정에서는 50 μg/mL, 100 μg/mL 및 200 μg/mL의 농도에서 淸血丹이 6-OHDA로부터 세포를 보호하는 효과가 있음을 보여주었다(Fig. 8). 이러한 결과는 6-OHDA에 의해 세포가 손상되기 전 상태에서 淸血丹을 투여하는 것 보다는, 세포손상이 이미 일어난 후 또는 세포 손상을 일으키는 원인이 계속 존재하고 있을 때, 淸血丹을 지속적으로 투여하는 것이 더 우수한 세포 보호효과를 갖게 됨을 보여주는 것이라 생각된다.

淸血丹의 6-OHDA로부터 세포를 보호하는 기전연구를 위하여, 淸血丹의 투여가 6-OHDA 투여에 의해 증가되는 ROS의 생성을 억제할 수 있는지를 알아보았다. 그 결과, 6-OHDA에 의해 생성된 ROS의 양이 100 μg/mL와 200 μ

g/mL 농도의 淸血丹 투여에 의해 감소됨이 관찰되었다(Fig. 9). 이러한 결과는 淸血丹이 6-OHDA으로 유발된 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 유의한 효과가 있음을 보여주는 것이다.

6-OHDA로 유발된 GSH(glutathione)의 감소에 대한 淸血丹의 효과를 알아보았는데, GSH는 thiol(SH)을 갖는 화합물로서 거의 모든 진핵세포에 주요한 저분자 thiol로 존재한다. 환원형 GSH의 순수용액은 산소의 존재 하에 비교적 안정한데, 미량의 금속이온(Cu^{2+}, Fe^{3+} 등)이 공존하면 산소와 신속히 반응하고 산화되어 산화형 GSSG(oxidized form glutathione)가 된다. 또한 분자형태의 산소로부터 생긴 활성 산소종과 반응하면 다음의 반응을 일으킨다.

$$GSH + O_2^- + H^+ \rightarrow GS\cdot + H_2O_2$$
$$GSH + HO\cdot \rightarrow GS\cdot + H_2O$$
$$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$$
$$GS\cdot + GS\cdot \rightarrow GSSG$$

또한 GSH는 비효소적으로 H_2O_2와 반응하여 GSSG를 생성하는데 포유동물에서는 glutathione peroxidase가 광범위하게 존재하여 다음의 반응을 한다.

$$GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$$

이와 같이 GSH는 free radical인 O_2^-, H_2O_2 및 $HO\cdot$를 효과적으로 제거하여 생체를 보호하는 기능을 한다[2]. 이러한 GSH가 6-OHDA를 처리했을 때, 유의하게 감소됨이 나타났으며 이러한 감소는 淸血丹에 의해 상쇄되는 결과가 나타났다(Fig. 10). 따라서 淸血丹은 free radical을 직접적으로 제거하는 방식 외에도, GSH의 감소를 억제함으로서 그 양을 늘려 GSH가 꾸준히 free radical을 제거할 수 있는 환경을 유지시켜주는 효과가 있다고 할 수 있을 것이다.

마지막으로, 淸血丹이 6-OHDA에 의해 발생되는 산화적 스트레스로부터 뇌세포를 효과적으로 보호 할 수 있는지의 여부를 알기위해 태아 중뇌세포를 이용하였다. 6-OHDA 처리에 의해 태아 중뇌세포가 손상되는 결과가 나타났으나, 동시처리된 0.1 μg/mL 농도의 淸血丹에 의해 손상의 감소가 나타나기 시작하였으며, 1 μg/mL 농도의 淸血丹에서는 유의한 세포보호효과가 나타났다(Fig. 11).

이상의 실험의 결과들은 淸血丹이 뛰어난 항산화 효과를 갖고 있음을 보여주는 증거들이라 할 것이며, 따라서 淸血丹이 세포를 보호하는 기전이 반응성 산소종을 감소시키고, GSH을 증가시키는 것에 의한 것임을 알 수 있다. 또한 淸血丹이 PC12 cell 뿐만 아니라, 태아 중뇌세포의 도파민성 신경에 대해서도 6-OHDA로 야기되는 산화적 스트레스를 효과적으로 차단하는 작용이 있음이 입증된 바, 향후 파킨슨병을 비롯한 여러 뇌의 퇴행성 질환에 유용하게 응용될 수 있는 한약처방이 되리라 생각한다.

Ⅴ. 결 론

淸血丹의 항산화 효과 및 뇌세포 보호효과에 대한 실험에서 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. In vitro에서의 free radical 소거 효과 측정

1) 淸血丹은 DPPH radical을 소거하는 효능이 농도에 의존적으로 있었다.
2) 淸血丹은 ABTS cation을 소거하는 효능이 농도에 의존적으로 있었다.
3) 淸血丹의 총 폴리페놀의 양은 157.20±3.26 μg/10mg 이었다.

2. PC12 cell에서의 항산화 효과 측정

1) 淸血丹은 PC12 cell에 대한 세포 독성이 없었다.
2) 淸血丹은 6-OHDA에 의해 유발되는 독성으로부터 PC12 cell을 보호하였다.
3) 淸血丹은 6-OHDA에 의해 생산되는 반응성 산소종(ROS)를 감소시켰다.
4) 淸血丹은 6-OHDA에 의해 감소되는 glutathione(GSH)를 증가시켰다.

3. Primary culture를 통한 뇌세포 보호효과 측정

淸血丹은 6-OHDA에 의해 야기되는 독성으로부터 dopaminergic cell을 보호하였다.

이상의 결과들을 통해 淸血丹은 우수한 항산화 효과가 있으며, 아울러 산화적 스트레스로 야기되는 신경퇴행성 질환에도 응용되어 세포의 퇴행을 억제할 수 있는 처방으로 활용될 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. FASEB J. 1987; 1(5):358-64.
2. 최병기, 정세영, 박광식, 조정희. 활성산소와 질환. 서울:도서출판 신일상사. 2007: 3,214-23, 311-12.
3. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr. 1993;57(suppl):715S-25S.
4. Rubanyi GM. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. Free Radic Biol Med. 1998;4(2):107-20.
5. Lee EY, Lee MY, Hong SW, Chung CH, Hong SY. Blockade of oxidative stress by vitamin C ameliorates albuminuria and renal sclerosis in experimental diabetic rats. Younsei Med J. 2007;48(5):847-55.
6. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. Cancer Res. 2001;61(12):4756-60.
7. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol. 1956; 11:298.
8. Harman D. Free radical theory of aging : dietary implications. Am J Clin Nutr. 1972;25(8):839-43.
9. Harman D. The aging process. Proc Natl Acad Sci USA. 1981;78(11):7124-8.
10. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. Chem Res Toxicol. 2008;21:172-88.
11. 손창우, 채종구, 김길훤, 신흥물. 산사의 혈관이완 효능과 항산화 작용. 대한동의병리학회지. 2002;16(1):67-71.
12. 임규, 박용기, 강병수. 칡의 부위별 항산화 작용에 관한 연구. 대한본초학회지. 2001;16(2):101-11.
13. 최호정, 신흥묵. 갈근이 항산화작용에 의한 위점막 보호효과와 내인성 sulfhydryl 화합물의 영향. 대한동의생리학회지. 1999;14(2):1-9.
14. 이지은, 송윤경, 임형호. 상엽추출물의 항산화효과에 대한 연구. 대한한의학회지. 2007;8(1):148-58.
15. 신흥묵. 희첨의 혈관이완 효능과 항산화

동태에 관한 연구. 대한한의학회지. 2000;6(1):104-11.
16. 이문조, 박진우, 김동주, 김준기, 최달영, 김철호. 황백 열수출출물의 항산화활성과 아질산염 소거작용에 관한 연구. 대한동의병리학회지. 1999;13(1):112-8.
17. 이무형, 윤철호, 정지천. 신장조직에서 백강잠 추출물의 항산화 작용에 관한 연구. 동국대논문집. 1998;7(1):87-98.
18. 박용기. 현삼의 항산화 작용에 관한 연구. 대한본초학회지. 1998;13(1):201-20.
19. 유진숙, 송윤경, 임형호. 홍화추출물의 항산화효과에 대한 연구. 대한한의학회지. 2007;28(1):137-47.
20. 박시홍, 강경수, 박용기. 인삼의 배합에 따른 수종 한약재의 항산화작용에 관한 연구(Ⅰ). 대한본초학회지. 1999;14(1):45-54.
21. 박시홍, 강경수, 박용기. 인삼의 배합에 따른 수종 한약재의 항산화작용에 관한 연구(Ⅱ). 대한본초학회지. 1999;14(2):23-32.
22. 김봉수, 박용기, 강병수. 토사자류의 항산화 작용에 대한 연구. 대한본초학회지. 1997;12(1):67-84.
23. 박용기, 강병수. 보골지의 항산화 작용에 관한 연구. 대한본초학회지. 1996;11(2):101-14.
24. 정미영, 박희준, 정지행, 김진용, 강전모, 이나경, 임사비나. 대식세포에서 산화질소 생성에 대한 당귀 에탄올 추출물의 억제효과. 대한한의학회지. 2007;28(2):155-65.
25. 안상원, 이철완. 숙지황과 육미지황탕이 노화과정 흰쥐에서의 항산화 기전에 미치는 영향. 대전대논문집. 1999;8(1):593-623.
26. 박선동, 박현준, 주왕석. 귀비탕 및 그 구성약물군이 항산화 효과에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001;16(1):11-27.
27. 박선동, 서효수, 박원환. 보중익기탕과 소음인 보중익기탕 및 그 구성약물군이 고혈당 백서의 항산화 효과에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001;16(2):113-26.
28. 김경선, 신홍묵. 가미향사육군자탕의 indomethacin 유도 위점막손상에 미치는 항산화 효과. 대한한의학회지 1998;19(1):165-78.
29. 김병탁. 경옥탕의 항산화 작용에 대한 실험적 연구. 대전대논문집. 1998;7(1):741-8.
30. 정지천. 좌귀음과 우귀음에 의한 활성 산소류의 소거작용과 항산화 효소계의 활성증가 효과에 대한 연구. 대한한의학회지. 1996;17(1):21-36.
31. 김동찬, 노승현, 이상인, 이영종, 주영승. 방제학. 서울:영림사. 1990:111-13, 263-4.
32. 김은선, 박치상, 박창국. 황련해독탕과 온청음이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1999;20(1):185-96.
33. 송호준. 황련해독탕이 면양적혈구에 대한 면역반응에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1985;6(1):104-11.
34. 두호경, 박헌재. 황련해독탕의 약리학적 연구. 경희대논문집 1982;5:103-14.
35. 이민정, 김영옥, 이강진, 유영법, 김선여, 김성수, 김호철. 황련해독탕의 4-VO로 유발한 흰쥐뇌허혈에 대한 신경보호효과. 대한한의학회지. 2002;23(4):161-8.
36. Fujiwara M, Iwasaki K. Toki-shakuyaku-San and Oren-Gedoku-To improve the disruption of spatial cognition induced by cerebral ischemia and central cholinergic dysfunction in rats. Phytotherapy Research. 1993;7:S60-2.
37. 정기현, 최요섭, 김이동, 김정렬, 정우상, 문상관, 조기호. 淸血丹이 고지혈증 환자의 혈청지질에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2003;24(3): 543-50.

38. Cho KH, Kim YS, Bea HS, Moon SK, Jung WS, Park EK, Kim DH. Inhibitory effect of Chunghyuldan in prostaglandin E2 and nitric oxide biosynthesis of lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. Biol Pharm Bull. 2004;27(11):1810-3.
39. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사. 1992:167-8, 178-83, 242-3.
40. Cho EJ, Yokozawa T, Rhee SH, Park KY. The role of Coptidis Rhizoma extract in a renal ischemia-reperfusion model. Phytomedicine. 2004;11(7-8):576-84.
41. Leu CH, Li CY, Yao X, Wu TS. Constituents from the leaves of Phellodendron amurense and their antioxidant activity. Chem. Pharm. Bull. 2006;54(9):1308-11.
42. Huang WH, Lee AR, Yang CH. Antioxidative and Anti-Inflammatory Acivities of Polyhydroxyflavonoids of Scutellaria baicalensis GEORGI. Biosci Biotechnol Biochem. 2006;70(10):2371-80.
43. Choi SJ, Kim MJ, Heo HJ, Hong B, Cho HY, Kim YJ, Kim HK, Lim ST, Jun WJ, Kim EK, Shin DH. Ameliorating effect of Gardenia jasminoides extract on amlyoid beta peptide-induced neuronal cell deficit. Mol Cells. 2007;24(1):113-8.
44. Wojcikowski K, Stevenson L, Leach D, Wohlumuth H, Gobe G. Antioxidant capacity of 55 medical herbs traditionally used to treat the urinary system: a comprarison using a sequential three-solvent extraction process. J Altern Complement Med. 2007;13(1):103-9.
45. Sies H. Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem. 1993;215:213-9.
46. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1958;181:1190-200.
47. George P, Dimltrios B. Antioxidant effect of natural phenols on Olive oil. J Am Oil Chem Soc. 1991;68:669-71.
48. Stadtman ER. Protein oxidation and aging, Science. 1992;257(5074):1220-4.
49. Mascio PD, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems:the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. Am J Clin Nutr. 1991;53:194S-200S.
50. Gutteridge JM, Halliwell B. Comments on review of free radicals in biology and medicine. Free Radic Biol Med. 1992;12(1):93-5.
51. Alvarez B, Radi R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. Amino Acids. 2003;25:295-311.
52. Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative disease: an hypothesis to explane the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. Free Radical Biol Med. 1999;26:1346-55.
53. Calabrese V, Bates TE, Stella AM. NO synthase and NO-dependent signal pathway in brain aging and neurodegenerative disorders:The role of oxidant/antioxidant balance. Neurochem Res. 2000;25:1315-41.
54. Contestabile A, Monti B, Contestabile A, Ciani E. Brain nitric oxide and its dual role in neurodegeneration/neuroprotection: understanding molecular mechanisms to

devise drug approaches. Curr Med Chem. 2003;10(20):2147-74.

55. Chung KK, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide, S-nitrosylation and neurodegeneration. Cell Mol Biol(Noisy-le-grand). 2005;51(3):247-54.
56. Sayre LM, Moreira PI, Smith MA, Perry G. Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. Ann Ist Super Sanita. 2005;41(2):143-64.
57. Donnelly PS, Xiao Z, Wedd AG. Copper and Alzheimer's disease. Curr Opin Chem Biol. 2007;11(2):128-33.
58. Salazar J, Mena N, Nunez MT. Iron dyshomeostasis in Parkinson's disease. J Neural Transm. Suppl. 2006;71:205-13.
59. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature. 2006;443:787-95.
60. Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. J Alzheimers Dis. 2006; 10(1):59-73.
61. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration:cause or cosequence? Nat Med. 2004;10(Suppl):S18-25.
62. Sayre LM, Smith MA, Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. Curr Med Chem. 2001;8(7):721-38.
63. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration:where are we now? J. Neurochem. 2006;97(6):1634-1658.
64. Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, Smith MA. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. J Neurosci. 1999;19:1959-64.
65. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol. 2001;60:759-67.
66. Nunomura A, Chiba S, Kosaka K, Takeda A, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of dementia with Lewy bodies. Neuroreport. 2002;13:2035-39.
67. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, doparmine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. Prog Neurobiol. 2001;65(2):135-72m.
68. Jordan J, Galindo MF, Tornero D, Gonzalez-Garcia C, Cena V. Bcl-x blocks mitochondrial multiple conductance channel activation and inhibits 6-OHDA-induced death in SH-SY5Y cells. J Neurochem. 2004;89(1):124-33.
69. Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Takahashi K, Ariga H. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. EMBO Rep. 2004;5(2):213-18.
70. Choi WS, Eom DS, Han BS, Kim WK, Han BH, Choi EJ, Oh TH, Markelonis GJ, Cho JW, Oh YJ. Phosphorylation of p38 MAPK induced by oxidative stress is linked to activation of both caspase-8 and

-9-mediated apoptotic pathways in dopaminergic neurons. J Biol Chem. 2004;279(19):20451-60.

71. Liang Q, Liou AK, Ding Y, Cao G, Xiao X, Perez RG, Chen J. 6-Hydroxydopamine induces dopaminergic cell degeneration via a caspase-9-mediated apoptotic pathway that is attenuated by caspase-9dn expression. J Neurosci Res. 2004;77(5):747-61.
72. Hanrott K, Gudmunsen L, O'Neill MJ, Wonnacott S. 6-Hydroxdopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta. J Biol Chem. 2006;281(9):5373-82.
73. Chen ZH, Saito Y, Yoshida Y, Sekine A, Noguchi N, Niki E. 4-Hydroxynonenal induces adaptive response and enhances PC12 cell tolerance primarily through induction of thioredoxin reductase 1 via activation of Nrf2. J Biol Chem. 2005; 280(51):41921-27.
74. Ochu EE, Rothwell NJ, Waters CM. Caspases mediate 6 - hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. J Neurochem. 1998;70(6):2637-40.
75. Xu R, Liu J, Chen X, Xu F, Xie Q, Yu H, Guo Q, Zhou X, Jin Y. Ribozyme-mediated inhibition of caspase-3 activity reduces apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in PC12 cells. Brain Res. 2001;899(1-2):10-9.
76. Eminel S, Klettner A, Roemer L, Herdegen T, Waetzig V. JNK2 translocates to the mitochondria and mediates cytochrome c release in PC12 cells in response to 6-hydroxydopamine. J Biol Chem. 2004;279(53):55385-92.
77. Cohen G, Heikkila RE. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. J Biol Chem. 1974;249(8):2447-52.
78. Izumi Y, Sawada H, Sakka N, Yamamoto N, Kume T, Katsuki H, Shimohama S, Akaike A. p-Quinone mediates 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neuronal death and ferrous iron accelerates the conversion of p-quinone into melanin extracellularly. J Neurosci Res. 2005;79(6):849-60.
79. Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. NeuroRx. 2005;2(3):484-94.
80. Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. N Engl J Med. 1998;339(15):1044-53.
81. Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. Exp Neurol. 2002; 175(2):303-17.
82. Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? Exp Neurol. 2005;193(2):279-90.
83. Götz ME, Künig G, Riederer P, Youdim MB. Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. Pharmacol Ther. 1994;63(1):37-122.
84. Tse DC, McCreery RL, Adams RN.

Potential oxidative pathways of brain catecholamines. J Med Chem. 1976;19(1):37-40.

85. Graham DG, Tiffany SM, Bell WR Jr, Gutknecht WF. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. Mol Pharmacol. 1978;14(4):644-53.
86. Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. J Neurosci Res. 1999;55(6):659-65.
87. 허준. 원본동의보감(신증판). 서울:남산당. 1998:396.
88. Sekiya N, Kogure T, Kita T, Kasahara Y, Sakakibara I, Goto H, Shibahara N, Shimada Y, Terasawa K. Reduction of plasma triglyceride level and enhancement of plasma albumin concentration by Oren-gedoku-to administration. Phytomedicine. 2002;9(5):455-60.
89. Hwang YS, Shin CY, Huh Y, Ryu JH. Hwangryun-Hae-Dok-tang (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract and its constituents reduce ischemia-reperfusion brain injury and neutrophil infiltration in rats. Life Sci. 2002;71(18):2105-17.
90. Hayashi T, Ohta Y, Inagaki S, Harada N. Inhibitory action of Oren-gedoku-to extract on enzymatic lipid peroxidation in rat liver microsomes. Biol Pharm Bull. 2001;24(10):1165-70.
91. Sekiya N, Kainuma M, Hikiami H, Nakagawa T, Kouta K, Shibahara N, Shimada Y, Terasawa K. Oren-gedoku-to and Keishi-bukuryo-gan-ryo inhibit the progression of atherosclerosis in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. Biol Pharm Bull. 2005;28(2):294-8.
92. Sanae F, Komatsu Y, Amagaya S, Chisaki K, Hayashi H. Effects of 9 Kampo medicines clinically used in hypertension on hemodynamic changes induced by theophylline in rats. Biol Pharm Bull. 2000;23(6):762-5.
93. Mizukawa H, Yoshida K, Honmura A, Uchiyama Y, Kaku H, Nakajima S, Haruki E. The effect of orengedokuto on experimentally-inflamed rats. Am J Chin Med. 1993;21(1):71-8.
94. Wee SS, Shin YW, Bae EA, Kim DH. Effect of chunghyuldan in chronic oxazolone-induced mouse dermatitis. Biol Pharm Bull. 2005;28(6):1079-82.
95. Yun SP, Jung WS, Park SU, Moon SK, Ko CN, Cho KH, Kim YS, Bae HS. Anti-hypertensive effect of chunghyul-dan (qingxue-dan) on stroke patients with essential hypertension. Am J Chin Med. 2005;33(3):357-64.
96. Kim YS, Jung EA, Shin JE, Chung JC, Yang HK, Kim NJ, Cho KH, Bae HS, Moon SK, Kim DH. Daio-Orengedokuto inhibits HMG-CoA reductase and pancreatic lipase. Biol Pharm Bull. 2002;25(11): 1442-5.
97. Cho KH, Kang HS, Jung WS, Park SU, Moon SK. Efficacy and safety of chunghyul-dan (qingwie-dan) in patients with hypercholesterolemia. Am J Chin Med. 2005;33(2):241-8.

98. Cho JY, Baik KU, Yoo ES, Yoshikawa K, Park MH. In vitro antiinflammatory effects of neolignan woorenosides from the rhizomes of Coptis japonica. J Nat Prod. 2000;63(9):1205-9.
99. Liu F, Ng TB. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. Life Sci. 2000;66(8):725-35.
100. Tang LQ, Wei W, Chen LM, Liu S. Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet in rats. J Ethnopharmacol. 2006;108(1):109-15.
101. Shang YZ, Qin BW, Cheng JJ, Miao H. Effect of Scutellaria falvonoids on KCN-induced damages in rat pheochromocytoma PC12 cells. Indian J Med Res. 2008;127(6):610-5.
102. Huang WH, Lee AR, Yang CH. Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxyflavonoids of Scutellaria baicalensis GEORGI. Biosci Biotechnol Biochem. 2006;70(10):2371-80.
103. Park EK, Rhee HI, Jung HS, Ju SM, Lee YA, Lee SH, Hong SJ, Yang HI, Yoo MC, Kim KS. Antiinflammatory effects of a combined herbal preparation (RAH13) of Phellodendron amurense and Coptis chinensis in animal models of inflammation. Phytother Res. 2007;21(8):746-50.
104. Liao H, Banbury LK, Leach DN. Elucidation of danzhixiaoyao wan and its constituent herbs on antioxidant activity and inhibition of nitric oxide production. Evid Based Complement Alternat Med. 2007;4(4):425-30.
105. Moon MK, Kang DG, Lee AS, Yeom KB, Kim JS, Lee HS. Anti-atherogenic effects of the aqueous extract of rhubarb in rats fed an atherogenic diet. Am J Chin Med. 2008;36(3):555-68.
106. Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of Scutellaria baicalensis Georgi. Biochim Biophys Acta. 1999;1472(3):643-50.
107. Giovannini C, Scazzocchio B, Varì R, Santangelo C, D'Archivio M, Masella R. Apoptosis in cancer and atherosclerosis: polyphenol activities. Ann Ist Super Sanita. 2007;43(4):406-16.
108. Anesini C, Ferraro GE, Filip R. Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (Camellia sinensis) in Argentina. J Agric Food Chem. 2008;56(19):9225-9.
109. Asghar Z, Masood Z. Evaluation of antioxidant properties of silymarin and its potential to inhibit peroxyl radicals in vitro. Pak J Pharm Sci. 2008;21(3):249-54.
110. Sladowski D, Steer SL, Clothier RH, Balls M. An improved MTT assay. J Immunol Methods. 1993;157:203-7.
111. 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.