동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 20. No. 3, 2009

加減蘇合香元 향기액이 세포활성에 미치는 영향과 항산화효과에 관한 연구

윤여국, 김근우, 구병수
동국대학교 한의과대학 신경정신과학교실

The Effect of *GagamSohabhwang-won*(*Jiajiansuhexiang-yuan*) Essential Oil on Cell Activity and Anti Oxidation

Yeo-Guk Kim, Geun-Woo Kim, Byung-Soo Koo
Dept. of Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Dong-Guk University

Abstract

Objectives :
The glial cell, located in between the blood vessel and nerve cell, takes charge of the cell support, nutrition supply, elimination of body waste, and cell action. *GagamSohabhwangwon* (GGSH), a chinese traditional medicinal prescription has been used orally for the treatment of seizures, infantile, convulsion, stroke and so forth. This paper examines the effect of the *GagamSohabhwangwon*(GGSH) essential oil on cell activity and anti oxidation.

Methods :
MTT assay methods were employed to measure the cell activity based on the amount of the *GagamSohabhwangwon*(GGSH) essential oil by using primarily cultivated glial cell. In addition, this paper measured a viability of the glial cell after a protein active retarder control to confirm the multiplication of the cell and examined the cell extinction by the active oxygen, an extinction shielding effect with different amount of the *GagamSohabhwangwon* (GGSH) essential oil to observe anti oxidation. Furthermore, this paper measured a viability of the cell and phosphorylation(phosphorylation) of the protein which affects the multiplication of the glial cell.

투고일 : 8/5 수정일 : 8/25 채택일 : 9/4
교신저자 : 구병수, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814 동국대학교 일산한방병원 신경정신과
Tel : 031-961-9140, Fax : 031-961-9009, E-mail : koobs@dongguk.ac.kr
이 논문은 2009년 2월 동국대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 석사학위 논문임

Results :
When controlling the amount of the *GagamSohabhwangwon*(GGSH), there was a multiplication effect of the primary glial cell, the multiplication of the cell was dependent on the density of the *GagamSohabhwangwon*. The multiplication power of the primary glial cell was suppressed by PKA inhibiter (H89). In compliance with the active oxygen the extinction of the primary glial cell was dependent on the density of the *GagamSohabhwangwon*, there was a shielding effect of the cell extinction when *GagamSohabhwangwon*(GGSH) was preprocessed. When inducing the multiplication of the primary glial cell, phosphorylation of the Akt, BDNF, CREB, ERK and ERM were increased.

Conclusions :
Based on the results, *GagamSohabhwangwon* essential oil will have the effect which activates the nervous system cell and protects the cell through anti oxidation.

Key Words :
GagamSohabhwangwon(*Jiajiansuhexiang-yuan*), Glial cell, Primary glial cell

Ⅰ. 서 론

생체내의 정상적인 대사과정에서나, 외부적인 원인으로 발생하는 superoxide anion(-O_2), hydroxyl radical(-OH), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen($^1O_2$) 등의 자유기(free radical) 및 활성산소종(reactive oxygen species)은 세포막을 구성하고 있는 고도의 불포화 지방산을 공격하여 연쇄적인 지질의 과산화 반응을 일으킨다. 또한 과산화반응으로 생성된 부산물들은 세포를 구성하고 있는 단백질과 DNA를 손상하여 세포막 구조의 변화, 효소활성의 저하 및 세포의 변이를 일으키는데 이는 노화, 암, 유전적 출산 결함, 심장질환 등을 초래하는 소인으로 인식되고 있다[1,2].

신경교세포는 신경세포에 필요한 물질을 공급하고 신경세포의 활동에 적합한 화학적 환경을 조성하는 기능을 하는 세포로 혈관과 신경세포 사이에 위치하여 신경세포의 지지, 영양 공급, 노폐물 제거, 식세포 작용 등을 담당한다. 신경계를 조직학(histology)적으로 보면, 신경세포(neurons)와 신경교세포(neuroglia)로 구분되는데, 중추신경계와 말초신경계는 각각 다른 종류의 다양한 신경세포와 신경교세포로 구성된다. 말초신경계에는 말초신경 축삭(axon)을 둘러싸서 수초(myelin sheath)를 형성하는 슈반세포(Schwann cells)와 신경절(ganglia)에 존재하여 말초신경세포를 지지하는 위성세포(satellite cells)가 존재한다. 중추신경계에 존재하는 신경교세포들의 수는 신경세포의 약 10배 정도이나 그 크기가 신경세포에 비해 작기 때문에 중추신경에서 차지하는 전체 부피는 신경세포와 비슷하다. 중추신경계에 존재하는 신경교세포

는 성상교세포(astrocytes), 미세교세포(microglia), 희돌기아교세포(oligodendrocyte), 뇌실막세포(ependymal cells)가 있다[3].

蘇合香元은 『太平惠民和劑局方』[4]에 蘇合香丸으로 수록된 이래 龔[5,6]은 中風, 中氣, 卒暴心疼, 小兒慢驚搐, 一切氣暴之症 등을 치료하는데 응용하였으며, 『東醫寶鑑』[7]에서는 中氣, 上氣, 氣逆, 氣鬱, 氣痛 및 일체 氣의 이상으로 생긴 병증에 사용되어 왔다[8].

加減蘇合香元은 溫通開竅 解鬱化濁의 효능이 있으며, 氷片, 蘇合香, 丁香, 檀香, 木香, 沈香, 香附子, 乳香, 安息香 등 다수의 香藥이 포함되어 있으므로 行氣解鬱 開竅散寒의 작용을 한다[9]고 알려져 있다.

일반적인 경구 투여가 아닌 향기액의 향기 흡입으로의 효능에 주목하여 이미 몇 가지 연구가 있어 왔다. 기존의 蘇合香元 향기의 효능 연구로 辛[10]은 蘇合香元 향기가 중추 신경 억제 및 뇌신경 수용체 활성에 미치는 영향에 대해 보고했으며, 具 등[11]은 蘇合香元 향기액이 중추 신경계에서 오는 경련을 억제시킨다고 하였다. 또, 千[12]은 加減蘇合香元의 향기액이 진통 및 항경련 효과가 있다고 했으며, 金[13]은 加減蘇合香元 향기액의 진통 작용 및 경구 투여시의 수면 증강 효과를, 金[14]은 신경계 암세포의 항암 효과 및 정상 신경계 세포를 보호하는 효과를, 李[15]는 뇌세포 손상에 미치는 효과에 대한 보고를 한 바 있으나, 加減蘇合香元의 향기액이 일차신경교세포(primary neuronal cell:PNC)의 세포활성과 항산화효과에 미치는 효과에 대한 연구는 아직 이루어진 바가 없다.

이에 본 저자는 加減蘇合香元이 일차신경교세포의 세포활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 실험동물모델을 통해 일차신경교세포를 분리, 배양하여 증식 활성에 대한 효과를 측정하였다. 또한 加減蘇合香元의 항산화 효과를 알아보기 위하여 일차신경교세포에 대한 산화적 독성 실험을 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 약재의 구성

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 일산한방병원에서 구입하여 정선한 것을 사용하였고, 加減蘇合香元 (modified Storax Pill) 처방구성은 『東醫寶鑑』[7]에 준하여 향 성분이 많이 추출될 수 있는 약재 위주로 加減하였다(Table Ⅰ).

Table Ⅰ. Composition of Modified Storax Pill Prescription

韓藥名	生藥名	重量
龍腦	*Borneol*	22.86 g
蘇合香	*Styrax Liquidus*	22.86 g
安息香	*Benzoinum*	22.86 g
木香	*Helenii Radix*	22.86 g
乳香	*Olibanum*	22.86 g
沈香	*Aquillariae Lignum*	17.14 g
丁香	*Caryophylli Flos*	22.86 g
檀香	*Santali Ligum album*	22.86 g
香附子	*Cyperi Rhizoma*	22.86 g
	總重量	200.02 g

2) 加減蘇合香元 향기액의 제조

加減蘇合香元 200 g을 분말로 만든 다음, *n*-hexane 2 ℓ를 넣고 실온에서 48시간 방치하여 추출하였다(Fig. 1). 방치하는 동안 12시간마다 1번씩 저어주면서 가능한 많은 精油 향기액이 추출되도록 하였다. 추출액을 여과한 다음, 여액인 *n*-hexane을 증류하여

제거하고 암록색의 맑은 精油 향기액 29.7 g을 얻었다.

세포주 실험을 위해 精油 향기액을 에탄올 및 Dimethyl superoxide (DMSO)에 50 mg/ml이 되도록 희석한 후 최종적으로 clean bench에서 pore size 0.2 um인 syringe filter (Nalgene, USA)로 여과하였다. 그런 다음 에탄올 및 DMSO에 희석하여 -20 ℃에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

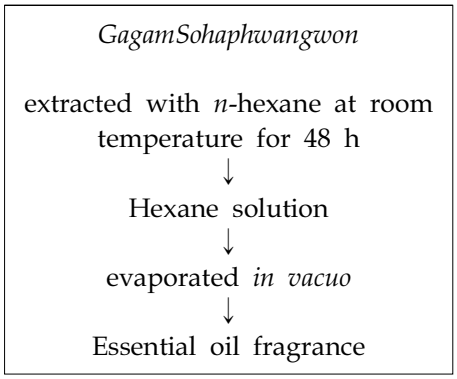


Fig. 1. Preparation of the essential oil fragrance from *GagamSohaphwangwon*.

2. 실험 방법

1) 일차 배양 신경교 세포 (primary glial cell culture)

신경교세포의 배양은 Liu[16]의 방법에 따라, 태어난 지 하루 된 쥐의 뇌를 사용하였다. 간단히 설명하면 menings와 blood vessels을 제거한 후 뇌조직은 분쇄하여 세포를 분리한 후 150 cm^2 flask에 $5x10^7$의 세포를 넣고 일주일 배양 후 배지를 갈아주었다. 그 다음 일주일이 지나 세포가 자란 후에 사용하였다. 배지는 10% FBS가 들어간 DMEM/F12을 사용하였다.

2) 세포 활성도 측정(MTT assay)

MTT (tetrazolium3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) assay는 Sladowski의 방법[17]을 따라 행하였다. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolum을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 세포의 능력을 이용하는 검사법이다. MTT formazan의 흡광도는 580 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 세포가 살아있고 대사가 왕성한 세포의 산화 환원력을 반영한다[18].

MTT assay는 우선 12 well plate에 glioma primary glial 세포 ($5x10^3$ cells/well)를 12시간 배양한 후 FBS를 첨가하지 않은 serum free medium, DMEM/F12 (Invitrogen)로 교환하여 16시간동안 안정화시키고, 여러 농도로 加減蘇合香元 精油 향기액을 첨가하여 48시간 동안 배양하였다.

그리고 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetra-zolium bromide (MTT. Sigma) 2 mg/ml를 넣고, incubator에서 4시간 배양한 후 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma)로 용해시켜 580 nm의 파장에서 microplate reader (Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

세포 생존율 (Cell Viability, %)은 다음과 같이 정의를 하였다. 정상군의 값을 control로 하고 이때의 O.D. 값을 세포의 생존도가 100%라고 정의하고, 나머지 군의 측정한 O.D. 값을 상대치로 환산을 하면 다음과 같다.

Cell Viability = (실험치 / control 군)

3) 억제 약물 처리

단백질 활성 억제제인 PKA inhibitor (H89), PI3K inhibitor (LY294002), MAPK inhibitor (PD98059), phosphatidylinositol 3′-kinase

inhibitor(wortmannin 30nM)는 加減蘇合香元 향기액을 처리하기 30분전에 미리 전 처리하고 48시간 후에 세포 생존율을 MTT법으로 시행하였다.

4) Western blotting analysis

Western blotting analysis는 앞서 언급된 이론과 관련하여 시행되었다. 모든 세포 용해질들은 표본 완충제 (62.5 mmol/1 Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)내에 boiling cell에 의해 만들어졌다. 단백질 정량은 bicinchoninic acid (BCA, Pierce)법을 사용하였다. 정량된 단백질 시료 50 ug을 4-12% sodium dodecylsulfate -polyacrylamide gradient gel (Invitrogen) 전기 영동법 (SDS-PAGE)으로 분리되었고, nitrocellulose paper (Amersham)로 옮겼다. 단백질이 옮겨진 막을 Ponceau-S로 염색하여 단백질이 완전하게 옮겨졌음을 확인하고 0.1% Tween 20을 포함하는 Tris-buffered saline (TBS-T)으로 씻은 후 5% 탈지 분유액으로 30분 이상 blocking하였다. 항 인산화 Akt(p-Akt, Ser473) 및 Akt 항체 (Cell signaling tech. USA), BDNF, β-actin, 항 인산화 CREB (p-CREB), CREB, 항 인산화 ERK (p-ERK), ERK, 항 인산화 ERM (p-ERM), ERM과 함께 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 후 막을 TBS-T에서 10분씩 3회 세척한 후 blot을 2차 항체와 함께 1시간동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 막을 씻고 enhanced chemiluminiscence system (ECL, Pierce)으로 원하는 단백질을 가시화 하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 image 장비 (LAS-3000, Fuji)를 이용하였다.

3. 통계 처리

모든 측정값은 평균값 표준편차(mean±S.D.)로 표시하였고, 각 실험군간의 통계학적 분석은 window용 SPSS Program의 one-way ANOVA를 시행하였으며, 사후 검증은 Tukey test를 통해 검증하였다. 전체 실험의 통계적인 유의성은 p값이 0.05이하인 경우에 유의한 것으로 인정하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. 신경교세포 증식에 미치는 영향

1) 농도에 따른 신경교세포의 증식 측정

加減蘇合香元 향기액을 일차 신경교세포(PNC: Primary neuroglial cell)에 처리한 결과 0.1-10 μg/ml의 농도에서 세포가 약간의 증식을 하였으며, 20 μg/ml의 농도로 처리했을 때, 처리하지 않았을 때 비해 약 90%정도 더 증식력이 증가함을 알 수 있다(Fig. 2).

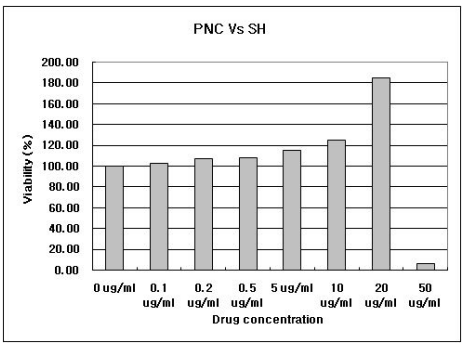


Fig. 2. GGSH Essential Oil-induced Proliferative Effect in Glial Cells.

Primary glial cells were exposed to different concentration of 1-50 ug/ml of GGSH essential oil in EtOH. Cell viability was measured by MTT assay at 48 h after GGSH essential oil addition. Data, expressed as percentage of control (Con), are the means±S.D. of three separate experiments.

2) 시간에 따른 신경교세포의 증식 측정

加減蘇合香元 향기액을 일차신경교세포에 10 μg/ml과 20 μg/ml로 처리하고 24시간, 48시간 후에 관찰한 결과 70-80% 정도 증식력이 증가하였으며, 10 μg/ml의 농도에서보다 20 μg/ml의 농도로 처리했을 때, 5-10% 정도 증식력이 증가하였음을 알 수 있다(Fig. 3).

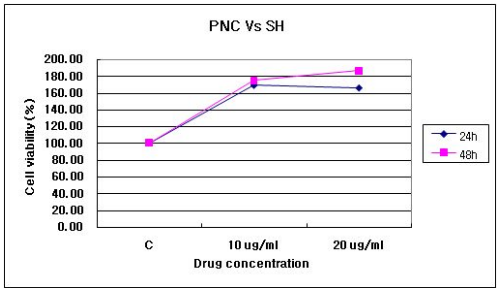


Fig. 3. GGSH Essential Oil-induced Proliferative Effect in Glial Cells.

Primary glial cells were exposed to different concentration of 10 or 20 ug/ml of GGSH essential oil in EtOH. Cell viability was measured by MTT assay at 24, 48 h after GGSH essential oil addition. Data, expressed as percentage of control (Con), are the means±S.D. of three separate

3) 증식에 관여하는 신호체계를 알아보기 위한 억제제 실험

PKA 억제제인 H89를 처리했을 때 일차신경교세포의 증식력이 현저히 떨어졌음을 알 수 있다(Fig. 4).

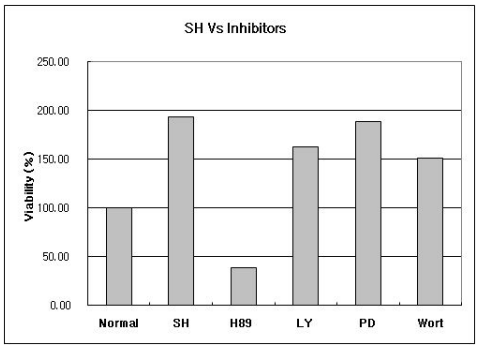


Fig. 4. GGSH Essential Oil-induced Proliferative Effect is Dependent on the PKA Activation in Glial Cells.

Glial cells were pre-treated with PKA inhibitor, H89 for 15 min before the addition of 10 ug/ml of GGSH essential oil in EtOH. Cell viability was measured by MTT assay at 48 h after GGSH essential oil addition. Data, expressed as percentage of control (Con), are the means±S.D. of three separate experiments.

4) 활성산소에 의한 세포 사멸 측정

활성산소종인 과산화수소를 50, 100, 200, 300, 400 μM의 농도로 48시간 동안 처리하고 MMT assay로 세포생존 정도를 정량하였다. 그 결과 세포독성이 농도 의존적으로 유도되었다(Fig. 5).

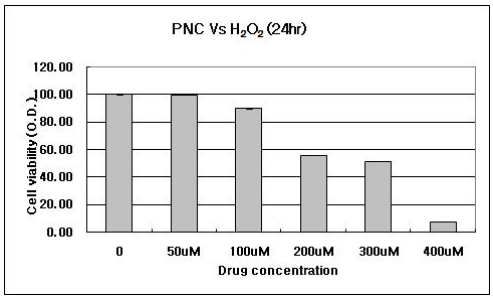


Fig. 5. A Does-dependent of H_2O_2.

H_2O_2-induced cytotoxicity was measured by MTT assay in glial cells. Cultured cells were exposed 50, 100, 200, 300 and 400 uM H_2O_2 for 48 hours. Data, expressed as percentage of control (Con), are the means±S.D. of three separate experiments.

5) 加減蘇合香元 전처리 후 활성산소에 의한 사멸 측정

加減蘇合香元 향기액을 10 μg/ml과 20 μg/ml으로 30분간 세포에서 전처리한 후에, 과산화수소에 48시간 동안 처리하고 MMT assay로 세포생존 정도를 정량하였다. 그 결과 가감소합향원 향기액을 10 μg/ml 전처리했을 때, 활성산소를 처리했을 때 보다 약 30%의 사멸 보호효과가 있음을 알 수 있다(Fig. 6).

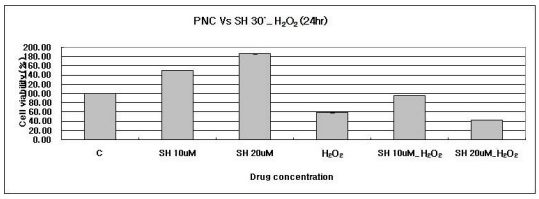


Fig. 6. Dose-response Relationship of GGSH Essential Oil for its Protective Effect on H_2O_2 -induced Cytotoxicity by MTT Assay in Glial Cells.

Cultured cells were preincubated with GGSH essential oil for 30 minutes before exposure to 10, 20 μM H_2O_2 for 48 hours. Data, expressed as percentage of control (Con), are the means±S.D. of three separate experiments.

2. 신경교세포 증식 기전에 관한 연구

1) Akt 단백질의 인산화 측정

세포 생존 및 분화에 중요한 역할을 하는 Akt 단백질에 대한 western blot검사 결과 加減蘇合香元 향기액을 투여한 군을 대조군과 비교했을 때, 일차신경교세포의 증식이 활성화됨을 알 수 있다(Fig. 7).

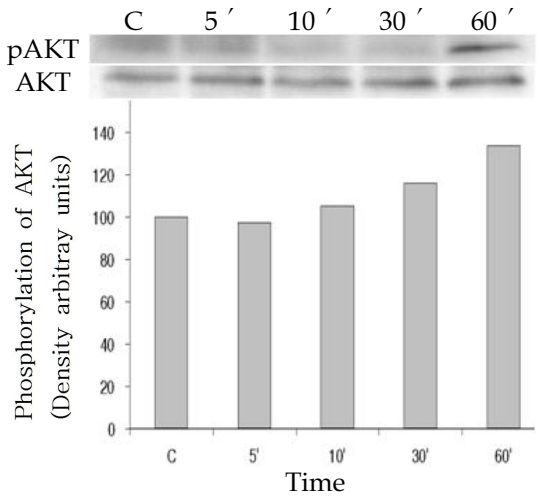


Fig. 7. GGSH Essential Oil Induces Phosphorylation of AKT in Primary Neuronal Cell.

primary neuronal cells were treated with 20 μg/ml for 5, 10, 30 and 60 min. C : non-treated primary neuronal cell.

2) BDNF 단백질의 인산화 측정

加減蘇合香元 향기액에 의한 일차신경교세포의 증식 활성에 대한 효과를 측정하기 위해 신경세포 분화에 관계하는 단백질인 BDNF에 대한 western blot검사 결과 加減蘇合香元 향기액을 투여한 군을 대조군과 비교했을 때, 일차신경교세포의 증식이 활성화됨을 알 수 있다(Fig. 8).

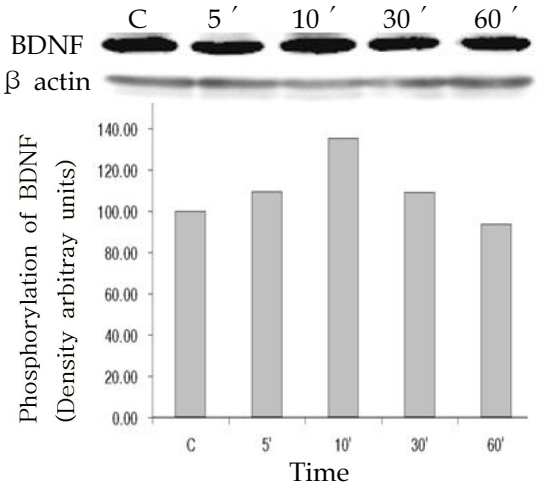


Fig. 8. GGSH Essential Oil Induces Phosphorylation of BDNF in Primary Neuronal Cell.

primary neuronal cells were treated with 20 μg/ml for 5, 10, 30 and 60 min. C : non-treated primary neuronal cell.

3) CREB 단백질의 인산화 측정

여러 유전자들에서 전사조절인자로 잘 알려져 있고 성장 조절유전자들의 활성화에 관여하며 세포증식, 분화 및 생존에 매우 중요한 세포내 인자인 CREB의 단백질에 대한 western blot검사 결과 加減蘇合香元 향기액을 투여한 군을 대조군과 비교했을 때, 일차신경교세포의 증식이 60분 후에 증가함을 알 수 있다(Fig. 9).

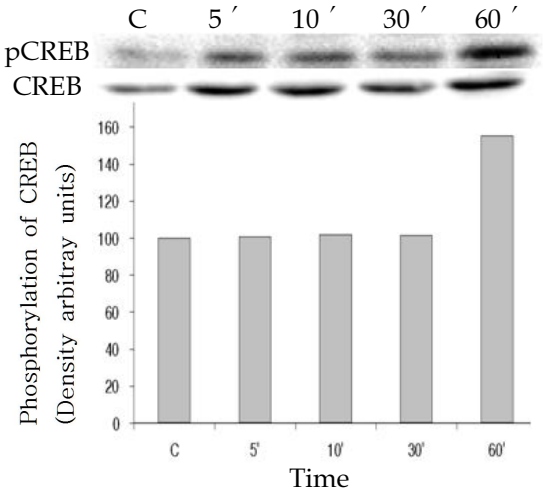


Fig. 9. GGSH Essential Oil Induces Phosphorylation of CREB in Primary Neuronal Cell.

4) ERK 단백질의 인산화 측정

세포의 성장을 촉진하는 ERK 단백질의 인산화가 加減蘇合香元 향기액을 처리한 후 60분에 증가함을 알 수 있다(Fig. 10).

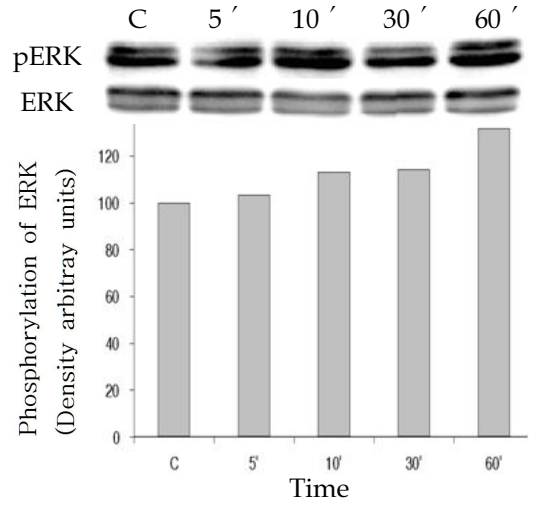


Fig. 10. GGSH Essential Oil Induces Phosphorylation of ERK in Primary Neuronal Cell.

primary neuronal cells were treated with 20 μg/ml for 5, 10, 30 and 60 min. C : non-treated primary neuronal cell.

5) ERM 단백질의 인산화 측정

세포 골격에 영향을 미치는 것으로 알려진 ERM 단백질의 활성 정도를 western blot검사로 살펴본 결과 加減蘇合香元 향기액을 투여한 군을 대조군과 비교했을 때, 일차신경교세포의 증식이 활성화됨을 알 수 있다(Fig. 11).

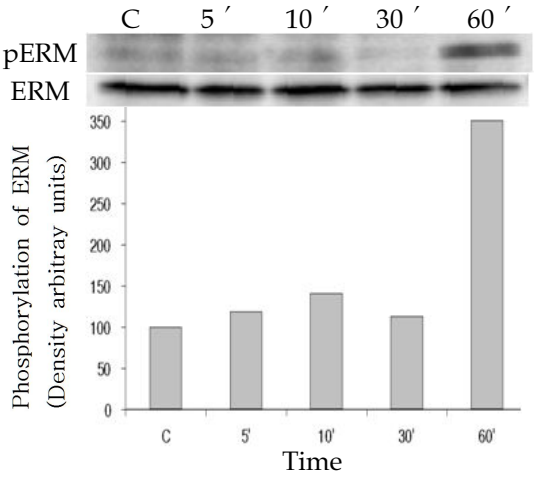


Fig. 11. GGSH Essential Oil Induces Phosphorylation of ERM in Primary Neuronal Cell.

primary neuronal cells were treated with 20 μg/ml for 5, 10, 30 and 60 min. C : non-treated primary neuronal cell.

Ⅳ. 고 찰

호기성 생물은 산소를 전자수용체로 하는 호흡을 통하여 에너지를 생산한다. 그러나 이 산소는 각종 물리적, 화학적 및 환경적 요인에 의하여 다양한 활성산소로 전환될 수 있다. 사람을 비롯한 생물은 항산화 메커니즘을 가지고 있어 산화적 손상으로부터 스스로를 보호할 수 있으나 이들 손상을 완전히 제거하기에는 충분하지 않다[19]. 항산화 메커니즘에 문제가 생겨 활성산소가 축적될 경우 산화적 스트레스(oxidative stress)가 야기되며, 세포 구성성분인 DNA, RNA, 단백

질과 지질에 손상을 주어 노화는 물론 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환 등 각종 질병을 초래하게 된다. 또한 활성산소에 의한 지질 과산화 결과로 생산된 과산화물도 세포에 대한 산화적 파괴로 각종 기능장애를 야기하는 것으로 알려져 있다. 자유기(free radical)을 소거할 수 있는 화합물(free radical scavenger)이나 과산화물 억제물질과 같은 항산화제를 함유한 약물은 인체의 산화적 스트레스에 의한 손상으로부터 보호해 줄 수 있을 것으로 생각된다.

항산화제에 대한 최근연구는 활성산소가 각종 질병 및 노화 등에 직접적인 원인으로 작용한다는 사실이 밝혀지면서 노화억제 및 질병치료제로서의 항산화제를 찾으려는 연구가 진행되고 있다. 하지만 항산화제는 독성, 저활성 및 용도의 한계성 등으로 인하여 사용에 제한을 받고 있다. 따라서 보다 안전하고 강한 항산화제를 천연물 또는 미생물 대사산물로부터 얻고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 항산화제의 대상은 지질과산화 생성 억제물질에서 생체 내에서 산화적 피해의 직접적인 원인이 되는 free radical 및 활성산소 생성 자체를 억제하는 예방적 항산화물질로 확산되고 있으며, SOD와 같은 고분자물질과 합성항산화제에서 실용성이 크고 안전한 저분자 천연항산화제로 연구의 방향이 전환되고 있다. 또한 산화적 손상 및 이로부터 유발되는 갖가지 질병으로부터 생물을 보호하기 위한 방어기구로서 천연항산화물질들의 규명과 항산화 방어 메커니즘 및 이들 항산화제들의 유전자발현 및 세포조절에 대하여 연구가 진행되고 있다. 국내에서의 항산화제 개발 연구는 현재 항염증제, 뇌신경세포보호제, 피부노화방지제 및 식품첨가물의 개발을 목적으로 연구가 이루어지고 있다[20].

인체는 40세 이후가 되면 신체 전반에 걸쳐 대사 작용이 감소하기 때문에 에너지도 그만큼 적게 생산하게 된다. 결과적으로, 각 세포들은 자유라디칼을 제거하고, 세포를 보호하는 항산화물질(antioxidants)을 덜 생산하게 된다. 그렇기 때문에 뇌세포의 사멸과 손상이 시작되는 40세 이후에는 산화적 뇌세포 사멸에 대한 위험도가 더 높아질 수 밖에 없다.

신경계는 해부학적으로 크게 중추신경계와 말초신경계로 나눌 수 있는데, 여기에는 서로 다른 종류의 신경교세포들이 존재한다. 말초신경계에는 말초신경의 축삭(axon)을 둘러싸서 수초(myelin sheath)를 형성하는 슈반세포(Schwann cells)와 신경절(ganglia)에 존재하여 말초신경세포를 지지하는 위성세포(satellite cells)가 존재한다. 중추신경계에 존재하는 신경교세포들의 수는 신경세포의 약 10배 정도이나 그 크기가 신경세포에 비해 작기 때문에 중추신경계에서 차지하는 전체 부피는 신경세포와 비슷하다. 교세포를 의미하는 glia는 그리스에서 유래한 말로써 glue(아교)를 뜻한다. 즉, 신경세포를 물리적으로 연결하고 지지해 주는 기능만을 담고 있다. 하지만 최근의 연구는 이들 신경교세포들이 단순한 지지역할을 벗어나서 다양한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 중추신경계에 존재하는 신경교세포는 성상교세포(astrocytes), 미세교세포(microglia), 희돌기아교세포(oligoendrocytes), 뇌실막세포(ependymal cells)가 있다[3].

한의학에서는 신경계, 호르몬계의 통합 조절 기능은 經絡과 腎, 命門, 三焦 등에 관련짓고, 정신사유기능과 의식 활동은 心에 속한다고 규정하고 있다. 여기서 주목할 점은, 서양의학에서의 뇌는 인체를 통합하는 역할

을 하고 있으며 그에 따른 생리병리기술도 매우 자세하지만 한의학에서는 단순히 奇恒之腑로 인식되며 생리기능과 병리변화도 매우 간략하게 서술된다는 점이다. 이것이 지금까지의 일반론이며 이는 한의학의 이론체계와 역사적 배경 때문에 생기는 한계일 수도 있다. 그렇지만 현대과학의 관찰 수준이 향상되면서 뇌의 의학적 역할과 비중이 더욱 중요시되는 추세에 따라 한의학에서도 뇌의 구조와 기능에 관한 종합적인 이해를 위해 새로운 인식론들이 제기되고 있다. 특히 삼사십 년 전 이래로 중의학에서 中醫腦病學의 발전에 따라 뇌의 해부, 생리기능에 대한 한의학적 인식들이 보다 계통적이고 명료해졌다.

『素問・五臟別論篇』[21]에서 "或而腦髓爲臟或而爲腑……故藏而不瀉, 名曰奇恒之府"라고 하여 奇恒之府 중의 하나로 보았으며, 『素問・陰陽應象大論篇』[21]에서는 "腎生骨髓"라 하여 뇌를 腎과 관련된 단순한 생리기관의 하나로 보았다.

『內經』 이후 뇌에 관한 연구가 심화되면서 明代의 李時珍[22]은 '腦爲元神之府'라 하여 뇌가 神을 총괄하는 주체적인 기관임을 주장하였다. 淸代의 王淸任은 『医林改錯・腦髓說』[23]에서 "兩耳通子腦, 所听之聲歸于腦, …兩目系如線.長于施, 所見之物歸于腦, …鼻通予腦, 所聞 香臭歸于腦."라 하였다. 이상의 논술들을 요약하면, 耳, 目, 口, 鼻가 외계자극을 받아들여 뇌에 전달하고, 뇌는 知覺을 만들고 相應反應을 일으킨다는 것이다.

內經시대의 臟象論的인 사고는 뇌의 기능을 心에 배속하여 이해하려 했으나, 후대에 이르러 뇌에 대한 인식이 구체화되면서 뇌의 지위와 기능에 대한 새로운 인식들이 부각되어, 明淸時代의 腦髓中心的인 思考로 변화되었음을 알 수 있다[24].

蘇合香元은 『外臺秘要』[25]에 吃力伽丸 혹 白朮丸이라하여 기재된 것을 『太平惠民和劑局方』에서 蘇合香丸으로 수록되었다. 이후 龔의 『壽世保元』[5]과 『萬病回春』[6]에서 男婦中風中氣, 牙關緊閉, 不省人事, 卒暴心疼, 小兒慢驚慆, 婦人産後中風 등 一切의 氣暴疾患에 順氣火痰의 효능으로 사용되었다. 『東醫寶鑑』[7]에서는 蘇合香元, 龍腦蘇合元이라고도 하여 中氣, 上氣, 氣逆, 氣鬱, 氣痛 등 一切의 氣疾에 사용하였다. 廉[26]은 邪祟, 氣病, 胸痛, 婦人譫語, 小兒客忤, 中惡, 驚風 등에 응용하였고, 최근에는 蘇合香元에 溫通開竅하고 行氣化濁하는 효능이 있어 中風, 氣厥, 痰厥을 치료하며 뇌혈관 질환이나 관상동맥질환 등에 응용되고 있다.

실험에 쓰인 蘇合香元은 『東醫寶鑑』의 蘇合香元에서 白朮, 朱砂, 架子皮, 揮發, 沒藥 등의 약재와 麝香, 犀角의 희귀성 약재를 거하고 그 나머지의 약재의 용량을 증가하여 향 성분이 좀 더 많이 추출될 수 있도록 증량한 것을 加減蘇合香元이라 명명하고 사용하였으며, 동일한 蘇合香元 향기액에 대한 기존 연구로는 이미 辛[10], 具[11], 千[12], 金[13], 金[14], 李[15] 등의 보고가 있다.

본 연구에서는 蘇合香元 향기액이 일차신경교세포의 세포 활성과 항산화효과에 미치는 영향을 실험적으로 평가함으로써 뇌세포의 활성과 보호 효과를 살펴보았다.

우선 일차신경교세포에 미치는 영향을 실험하였다. 실험 결과, MMT assay에서 加減蘇合香元 향기액의 농도가 높음에 따라 일차신경교세포의 세포 활성도가 증가됨을 확인할 수 있었다.

加減蘇合香元 향기액이 일차신경교세포 증식에 관여하는 신호체계를 알아보기 위하여 PKA

inhibitor인 H89, PI3K inhibitor인 LY94002, ERK inhibitor인 PD98059, phosphatidylinositol 3'-kinase inhibitor인 wortmannin(30 nmol/L)을 처리한 결과 PKA 억제제인 H89를 처리했을 때 일차신경교세포의 증식력이 현저히 떨어졌음을 알 수 있었다.

산화적 스트레스에 의한 보호효과를 알아보기 위하여 세포에 과산화수소를 처리하여 살펴본 결과, 과산화수소 농도에 의존하여 세포독성이 유도되었다. 加減蘇合香元 향기액을 전처리 한 후에 과산화수소를 처리한 경우를 살펴보면 신경세포의 산화적 세포사멸에 대한 보호효과를 알 수 있었다.

Western blot 분석법에서도 加減蘇合香元 향기액을 투여하지 않은 대조군에 비해 加減蘇合香元 향기액을 처리한 군은 5분, 10분, 30분, 1시간의 시간이 지남에 따라 Akt, BDNF, CREB, ERK, ERM 단백질의 인산화가 증가하였다. Akt 단백질은 신경세포의 분화와 밀접한 관련이 있는데 한번 활성화된 Akt 단백질은 세포괴사에 대항해서 세포들을 보호하며, 뇌하수체에 있는 활성화된 PKB/Akt는 저산소 스트레스와 독성에 대항하여 신경을 보호한다. 뉴런의 손상을 억제할 뿐 만 아니라 손상된 세포를 재생시키고, 신경세포의 손상과 성장을 조절하는 것을 알려진 신경영양성인자(neurotrophic Factors) 중의 하나인 BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) 단백질은 해마, 편도체, 시상, 후각계의 투사 영역, 신피질의 피라미드층, 담창구, 소뇌 등과 같은 광범위한 조직에 분포되어 있어 신경세포의 성장과 유지에 중요한 역할을 하고 있다. CREB 단백질은 신경세포의 가소성을 조절하여 신경세포의 성장에 관여한다. 해마에 있는 CREB 단백질은 항 우울제와 매우 유사한 행동 반응을 나타내며, 설치류에서 CREB 단백질의 증가는 항 우울제와 같은 반응을 보인다. ERK(Extracellular signal Reulated Kinase) 단백질은 세포의 성장이나 분화를 촉진하는 신호전달 과정에 관여하고 ERM 단백질은 세포질내에서 분자내 상호작용을 통해 불활성 상태로 존재하다가 외부에서 신호가 전달되면 그 결합이 풀리면서 활성화되어 세포막 단백질과 골격단백질을 연결시켜준다. 본 연구에서는 위의 Akt, BDNF, CREB, ERK, ERM 단백질의 인산화가 加減蘇合香元 향기액으로 처리한 후 증가되었음을 보여준다.

이상의 결과를 종합해 보면 加減蘇合香元 향기액이 정상 신경계 세포를 보호하고 증식에 관여한다는 단서를 제공한다. 따라서 추후 신경세포 보호 및 활성에 관한 加減蘇合香元 향기액에 관한 연구가 더 필요하다고 생각한다.

Ⅴ. 결 론

加減蘇合香元 향기액이 세포활성에 미치는 영향과 항산화효과를 알아보기 위해서 일차 배양된 정상 신경교세포를 배양하여, 蘇合香元 향기액의 첨가량에 따른 세포 활성도를 측정하였다. 또한 세포의 증식 기전을 확인키 위하여 단백질 활성 억제제 처리후의 신경교세포 생존율을 측정하고, 항산화효과를 알아보기 위해 활성산소에 의한 세포 사멸과 蘇合香元 향기액의 전처리 후 사멸보호효과를 살펴보았다. 또한 신경교세포의 증식에 영향을 미치는 단백질의 인산화와 세포 생존율을 측정하였다. 이상의 실험 연구를 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 加減蘇合香元을 처리하였을 때 일차신경교세포의 증식효과가 있었으며, 세포의 증식이 농도 의존적으로 유도되었다.

2. PKA억제제에 의해 일차신경교세포의 증식력이 억제되었다.

3. 활성산소에 의해 일차신경교세포의 사멸이 농도 의존적으로 유도되었으며, 加減蘇合香元을 전 처리 했을 경우 세포 사멸의 보호 효과가 있었다.

4. 일차신경교세포의 증식을 유도할 때 Akt와 BDNF, CREB, ERK, ERM의 인산화가 증가되었다.

이상의 연구 결과에서 加減蘇合香元 향기액이 신경계 세포를 활성화 시키고 항산화효과로 인하여 세포를 보호하는 효과가 있을 것으로 여겨지며, 계속적인 연구를 통해 치매 등의 뇌질환에 임상응용이 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer : a hypothesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1981;78(11):6858-62.
2. Aruoma OI, Kaur H, HalliwellB. Oxygen free radicals and human diseases. J R Soc Health. 1991;111(5):172-7.
3. 박성일. 희돌기아교세포 연구의 최근 동향. 생화학분자생물학뉴스. 2002;22(2):142-50.
4. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北:旋風出版社. 1977:126.
5. 龔廷賢. 壽世保元. 서울:醫聖堂. 1993:307, 661, 702.
6. 龔延賢. 萬病回春. 서울:행림서원. 1972:62.
7. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:남산당. 1987:94-105, 175-77, 362-63, 491.
8. 동양의학대사전편찬위원회. 동양의학대사전 권5. 서울:경희대학교 출판국. 1999:501-2.
9. 陳存仁. 圖說漢方醫藥大事典 권2, 4. 서울:圖書出版 松嶽. 1990:210-1, 214-5, 218-9, 222-3, 234-5. / 62-3, 70-1, 78-9, 138-9.
10. 辛容玹. 蘇合香元 향기 및 癇寶丹이 중추신경 억제 및 뇌신경수용체 활성에 미치는 영향. 동국대학교 대학원 박사학위논문. 2000.
11. Koo BS, Lee SI, Ha JH, Lee DU, Inhibitory effects of the essential oil from SuHeXiang Wan on the central nervous system after inhalation. Bio. Pharm. Bull. 2004;27(4):515-9.
12. 천수영. 加減蘇合香元 향기액 흡입에 의한 항경련작용의 기전에 관한 연구. 동국대학교 대학원 석사학위논문. 2001.
13. 김성수. 加減蘇合香元 향기액의 鎭痛作用 및 경구투여시의 睡眠增進效果에 관한 硏究. 동국대학교 대학원 석사학위논문. 2002.
14. 김성욱. 加減蘇合香元 향기액이 Glioma cell과 Primary Glial cell에 미치는 효과에 대한 실험적 연구. 동국대학교 대학원 박사학위논문. 2006.
15. 이인. 加減蘇合香元 향기액 흡입이 베타-아밀로이드로 유발된 뇌세포 손상에 미치는 효과에 관한 實驗的 硏究. 동국대

학교 대학원 박사학위논문. 2007.
16. Liu B, Wang K, Gao HM, Mandavilli B, Wang JY, Hong JS. Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. J Neurochem. 2001;77(1):182-9.
17. Sladowski, D., Steer, S. L., Clothier, R. H., and Balls M. An improved MTT assay. J. Immunol. Methods 1993;157:203-7.
18. Marshall, N. J., Goodwin, C. J., and Holt, S. L. A critical assessment of the use of microulture tetazolium assays to measure cell growth and function. Growth regul. 1995;5:69-84.
19. Simic, M. G. Mechnisam of inhibition of free radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. mutat. Res. 1998;202 :377-86.
20. 김현수, 함준상. 유산균의 항산화 효과. 한국축산식품학회지. 2003;23(2):186-92.
21. 山東中醫學院 校釋. 黃帝內經素問校釋. 서울:一中社. 1980:78, 163.
22. 李時珍. 本草綱目. 서울:高文社. 1973:603-4.
23. 陳大舞 外. 各家學說. 서울:대성의학사. 2001 :656-7.
24. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회 편. 한의신경정신과학. 경기:집문당. 2007:35-42.
25. 王燾. 外臺秘要. 서울:성보사. 1975:249-54, 840, 844, 848-9.
26. 廉泰煥. 東醫處方大典. 서울:杏林出版. 1995 :332-3.