

全蝎 전탕액이 XO/HX에 의해 손상된 배양 척수감각신경세포에 미치는 효과

양흥수 · 권강범 · 송용선¹ · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 원광대학교 한의과대학 재활의학과

Effects of *Scorpio* water extract on Cultured Spinal Sensory Neurons Damaged by Xanthine Oxidase/Hypoxanthine

Heung Su Yang, Kang Beom Kwon, Yong Sun Song¹, Do Gon Ryu*

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

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

To study the effects of *Scorpio* on oxygen free radical-mediated damage by xanthine oxidase/hypoxanthine (XO/HX) on cultured spinal sensory neurons, in vitro assays such as MTT assay were used in cultured spinal sensory neurons derived from mice. Spinal sensory neurons were cultured in media containing various concentrations of XO/HX for 6 hours, after which the neurotoxic effect of XO/HX was measured by in vitro assay. The protective effect of the herb extract, *Scorpio* water extract against XO/HX-induced neurotoxicity was also examined. The results are as follows : In MTT assay, XO/HX significantly decreased the cell viability of cultured mouse spinal sensory neurons according to exposure concentration and time in these cultures. The effect of *Scorpio* water extract on XO/HX-induced neurotoxicity showed a quantitative increase in neurofilament. These results suggest that XO/HX has a neurotoxic effect on cultured spinal sensory neurons from mice and that the herb extract, *Scorpio* water extract, was very effective in protecting XO/HX-induced neurotoxicity.

Key words : *Scorpio* water extract, mouse spinal sensory neurons, MTT, neurofilament

서 론

全蝎(*Scorpio*)은 절족동물인 鉗蠍科에 속한 전갈의 蟲體로 氣味는 鹹辛平有毒하며, 肝經으로 歸經한다^{1,7}. 이러한 全蝎은 熄風鎮痙 祛風止痛 解毒散結 尾攻強烈 등의 효능을 가지고 있고 肝經으로 歸經하므로 주로 風痰을 몰아내고 口眼喎斜를 낫게 하며 驚癇 痙攣을 멈출 수 있게 하는 약으로 인식되어 왔다⁸⁻¹². 全蝎의 약리작용은 신경계통 심혈관계통 호흡계통 소화계통 조혈계통 비뇨계통 등이 있으며 주로 神經系統의 抗痙攣 鎮痛作用이 주로 이르고 있다¹³⁻¹⁵. 산소자유기(oxygen free radical)는 신경퇴화(neuronal death)에 관련이 있는데 Bracco 등¹⁶이 amyotrophic lateral sclerosis(ALS) 환자의 뇌척수액에서 superoxide dismutase (SOD) 활성도가 대조군에 비하여 낮다는 보고와 Mano 등¹⁷이 ALS 환자의 뇌척수액에서 glutathione peroxidase를 활성화 시

키는 slenium의 농도가 낮다는 보고가 이를 뒷받침 한다. 또한 산소자유기는 또한 뇌허혈이나 다발성경화증의 병인으로 밝혀지면서 산소자유기의 신경독성에 대한 병리적 기전규명에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔다¹⁸⁻¹⁹. 최근에 이러한 산소자유기의 산화적 손상에 대하여 한약재가 효과적인 항산화작용을 나타낸다는 연구보고²⁰⁻²²들이 있으나 全蝎에 대한 보고는 접할 수가 없었다.

본 실험은 산소자유기를 유발하기 위하여 Xanthine Oxidase/Hypoxanthine (XO/HX)을 배양한 척수감각신경세포에 처리한 후 세포독성을 조사하였으며, 全蝎의 방어효과를 관찰하기 위하여 全蝎 전탕액을 배양 척수감각신경세포에 전처리 한 후 Neurofilament enzymeimmuno assay를 한 결과 유의한 방어효과를 관찰하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 약재

본 실험에 사용한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강상태

* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr Tel : 063-850-6846

· 접수: 2002/04/09 · 수정: 2002/05/30 · 채택 : 2002/06/04

가 양호한 생취를 사용하였고, 본 실험에서 사용된 쏘라노는 원광대학교 부속익산한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 검액의 조제

쏘라노(scorpio) 200g을 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 57.67g의 분말 시료를 얻었다.

2) 약제 제조

본 실험에 사용한 약제로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypo-xanthine(HX, Sigma)로서 XO는 100 mU/ml, 10 mU/ml, 1 mU/ml의 저장액을, HX는 100 mM, 10 mM, 1 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하여거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3) 세포배양

척수감각신경세포의 분리는 Michikawa 등²³⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생후 1~3일된 생취에서 적출한 척수조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36°C, 5% CO₂/95%air로 조절된 항온기 내에서 배양하였다. 배양 완료 후 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)으로 3회 세척 후 Pasteur 피펫으로 세포를 분리시켰다. 분리된 세포들은 Poly-L-lysine(Sigma)으로 전처리된 96-multiwell에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양후 본 실험에 사용하였다.

4) XO/HX의 처리

산소자유기가 생취의 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 신경세포를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 여러 농도의 xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)이 포함된 배양액에서 배양한 후 분석하였다.

5) 세포독성 및 방어효과 검정

(1) MTT 정량

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma)> 정량은 Mosmann의 방법²⁴⁾에 의하였다. 산소 자유기나 항산화제를 처리한 배양 신경세포를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk)를 처리한 다음 spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교 조사하였다.

(2) Neurofilament enzymeimmuno assay(EI)

배양중인 신경세포를 PBS로 3회 세척하여 알콜로 고정시킨 다음 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료 후 NE14(1:100, Sigma)로 1시간 동안 반응시킨 후 0.04% O-phenylenediamine(OPD, Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide 로 처리한 다음 Dynatech Microelisa reader로 490nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

6) 통계 처리

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

결 과

1. XO/HX의 독성효과

1) 세포생존율 분석: MTT 정량

산소자유기가 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 xanthine oxidase(XO)가 1 mU/ml에서 20 mU/ml까지의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 후 xanthine oxidase(XO)의 독성효과를 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 세포생존율이 감소하였으며 특히 10 mU/ml, 20 mU/ml XO 처리에서 세포의 생존율이 대조군100%에 비하여 51.4%(p<0.05), 31.4%(p<0.01)로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 1).

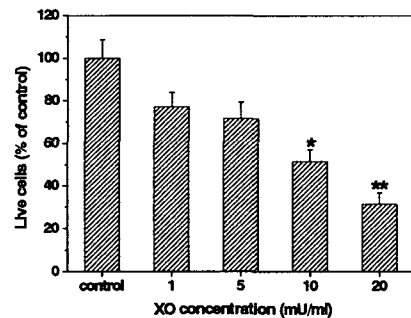


Fig. 1. Dose-dependency of xanthine oxidase(XO). XO-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 1, 5, 10 and 20 mU/ml XO for 6 hours, respectively. Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with various concentrations of XO for 6 hours. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

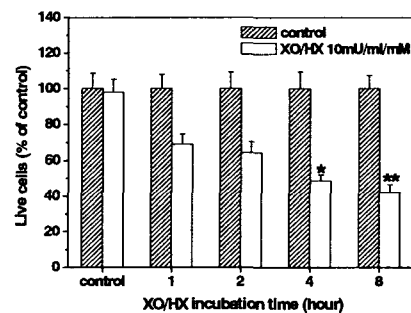


Fig. 2. Time-dependency of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine (HX) in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 10 mU/ml XO and 0.2 mM HX for 1, 3, 6 and 12 hours, respectively. Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with 10 mU/ml XO and 0.2 mM HX for various time intervals. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

Xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)이 시간에 따라 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.2 mM HX에 MCV값인 10 mU/ml XO가 포함된 배양액에서 척수감각신경세포를 각각 1~12시간 동안 배양한 후 세포의 생존율

을 MTT assay법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 XO를 처리한 후 바로 측정된 결과 시간이 지남에 따라 세포생존율이 감소하였으며 특히 6시간($P<0.05$), 12시간($p<0.01$) 후에 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 2).

2. 한약추출물의 효과

1) neurofilament 정량

(1) xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)의 영향
XO/HX 농도에 따른 neurofilament의 양적 측정을 위한 neurofilament EIA에 있어서 0.2 mM HX에 XO가 5-40 mU/ml 까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 척수감각신경세포를 6시간 동안 처리한 후 세포의 생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 XO를 처리한 농도에 비례하여 neurofilament의 양이 감소하였다. 특히 20 mU/ml, 40 mU/ml XO의 경우는 대조군에 비하여 각각 49.3%($p<0.05$), 31.3%($p<0.01$)로 유의한 감소를 나타냈으며 MCV값(midcytotoxicity value)은 20 mU/ml XO의 처리에서 나타냈다(Table 1).

Table 1. Dose-response relationship of xanthine oxidase/hypoxanthine (XO/HX) by neurofilament enzymeimmuno assay(EIA) in cultured mouse spinal sensory neurons

XO/HX(mU/ml/mM)	EI absorbance(490nm)	Decrease rate of neurofilament(%)
0(control)	1.34±0.17	-
5	1.16±0.15	13.4
10	0.84±0.09	37.3
20	0.66±0.05*	50.7
40	0.42±0.03**	68.7

Cultured mouse spinal sensory neurons were exposed to various concentrations of XO in 0.2 mM HX for 6 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

(2) 全蝎(Scorpio) 煎湯液의 효과

Table 2. Dose-response relationship of Scorpio water extract for its neuroprotective effect on xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX) in neurofilament

XO/HX (mU/ml/mM)	EI absorbance (490nm)				
	Concentration of Scorpio(μ g/ml)				
	0 μ g/ml	5 μ g/ml	15 μ g/ml	25 μ g/ml	50 μ g/ml
0	1.21±0.15	1.23±0.16	1.26±0.13	1.24±0.14	1.28±0.18
20	0.74±0.08	0.88±0.07	1.04±0.09*	1.13±0.11**	1.20±0.13**

Cultured mouse spinal sensory neurons were preincubated with various concentrations of Scorpio water extract for 3 hours, and then exposed to 20 mU/ml in 2 mM HX for 6 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from Scorpio non-treated group are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

배양 척수감각신경세포에 대한 XO/HX의 산화적 손상에 있어서 全蝎(Scorpio)의 효과를 neurofilament의 양적변화측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값(midcytotoxicity value)인 20 mU/ml XO/0.2 mM HX의 농도에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 5-50 μ g/ml 全蝎 전탕액이 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 neurofilament EIA법으로 조사하였다.

그 결과 neurofilament의 양적변화에 있어서 全蝎 煎湯液만을 처리한 경우 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml/mM XO/HX만을 처리한 경우 대조군100%에 비하여 61.2%로 나타나 유의한 독성을 나타냈다. 그러나 全蝎 煎湯液을 3시간 동안 전처리한 경우 농도의존적으로 XO/HX에 의하여 감소한 neurofilament의 양이 증가하여 XO/HX의 독성에 대한 방어효과를 보였다. 특히 15 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml 全蝎 煎湯液의 처리에서 대조군61.2%에 비하여 86.0%($p<0.05$), 93.4%($p<0.01$), 99.2%($p<0.01$)로 각각 유의한 증가를 나타냈다(Table 2).

고찰

한의학에서 全蝎은 熄風鎮痙, 祛風止痛, 解毒散結, 尾攻強烈 등의 효능을 가지고 있고 肝經으로 歸經하므로 주로 風痰을 몰아내고 口眼喎斜를 낫게 하며 驚癇 痙攣을 멈출 수 있게 하는 약으로 인식되어 왔다⁸⁻¹². 동물실험에 의하면 全蝎은 초산, strychnine, nicotine, pentylenetetrazole에 의한 痙攣에 대해 拮抗 작용을 가지고, 각성한 동물에 대해서 현저한 鎮靜작용을 가지며, 혈관운동중추에 작용하여 血管을 확장하고 adrenaline에 의한 血管收縮을 억제하여 血管을 압박하는 것으로 알려졌다²⁵. 이밖에도 근래 중국의 실험에 의하면 동물 신체 및 內臟痛에 중추와 통각과 관련한 신경원에 작용하여 鎮痛작용을 증강시킴이 밝혀졌다²⁶.

산소자유기는 xanthine 혹은 hypoxanthine이 oxygen에 의해서 산화되는데 이 반응은 xanthine oxidase에 의해서 촉매되어 superoxide radical(O₂⁻)과 hydrogen peroxide(H₂O₂)가 생산된다^{27,28}. 이렇게 생성된 산소자유기는 철(iron)과 반응하여 hydroxyl radical(OH[•])이 생성된다^{29,30}. 본 실험에서는 먼저 산소자유기를 유발하는 xanthine oxidase/hypoxanthine (XO/HX)을 배양 척수감각신경세포에 처리하여 XO/HX에 유발된 산소자유기가 세포독성을 유발하는지 MTT assay를 통하여 관찰하였다. MTT assay²⁴는 세포의 생존율을 측정하는 방법으로서 본 실험에서 XO/HX를 처리한 후 위의 방법에 의하여 세포의 생존율을 조사한 결과 농도와 시간에 의존적으로 생존율을 감소시켜(Fig. 1-2) Michikawa²³등이 보고한 결과와 일치하였다. 이러한 XO/HX의 neurotoxicity에 대한 全蝎 전탕액의 방어효과를 관찰하기 위하여 全蝎 전탕액을 배양 척수감각신경세포에 3시간 동안 전처리한 다음 XO/HX에 노출시킨 후 Neurofilament enzymeimmuno assay를 통하여 全蝎 전탕액의 방어효과를 관찰하였다. Neurofilament양의 감소는 퇴행성 뇌병변(neurodegenerative process)에서 흔하게 일어나는 일이다³¹. 본 실험에서도 XO/HX는 배양 척수감각신경세포에 처리한 농도에 비례하여 neurofilament의 양적 감소를 보여 세포에 독성을 나타냈으며 20 mU/ml XO/0.2 mM HX처리에서 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다(Table 1). 그러나 20 mU/ml XO/0.2mM HX를 6시간 동안 감각신경세포에 처리하기 전 5-50 μ g/ml의 全蝎 전탕액이 각각 포함된 배양액에서 3시간 동안 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 neurofilament의 양이 증가하였다(Table 2). 산소자유기에 의하여 유도된 neurotoxicity는 superoxide dismutase(SOD)나

catalase에 의하여 제거된다²³⁾. 본 실험에서 全蝎 전탕액은 XO/HX에 의하여 유도된 neurotoxicity에 대하여 방어효과를 나타냈으며 이러한 결과는 全蝎 전탕액은 SOD나 catalase와 같은 역할을 하리라 생각되며 앞으로 이에 대한 기전적인 연구가 필요하리라 사료된다.

결 론

全蝎이 산소자유기에 의한 신경독성을 방어하는 효과를 구명하기 위하여 신생 흰쥐에서 분리 배양한 척수감각신경세포를 여러농도의 xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)이 포함된 배양액에 全蝎 煎湯液을 3시간 동안 처리한 후 全蝎 煎湯液이 배양 척수감각신경세포에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

XO/HX는 배양 척수감각신경세포의 세포생존율을 농도와 시간에 의존적으로 감소시켰고, 全蝎 煎湯液은 XO/HX에 의하여 유발된 neurofilament의 감소를 유의하게 증가시켰다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2001-1-20500-018-1) 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. 辛民教 : 臨床本草學, 南山堂, 서울, pp.502-503, 1986.
2. 金最壽 : 標準本草學, 進命出版社, 서울, pp.518-520, 1975.
3. 胡世林 : 中國道地藥材原色圖說, 山東科學技術出版社, 山東, p.57, 1998.
4. 이순동 : 本草學, 여강출판사, 서울, pp.418-419, 1993.
5. 金先熙 外 : 本草學, 圖書出版 永林社, 서울, pp.506-507, 1998.
6. 安德均 : 現大本草學, 高文社, 서울, pp.337, 1972.
7. 李尚仁 : 本草學, 圖書出版 修書院, 서울, pp. 237-239, 1981.
8. 上海中醫學院:草藥學, 商務印書館香港分館, 香港, pp.346-347, 1983
9. 孟華燮 : 翻譯編註方藥合編, 圖書出版永林社, 서울, p.644, 1991.
10. 清. 黃官綉 : 本草求真, 圖書出版 醫聖堂, 서울, p.89, 1997.
11. 賈編組 外 : 中藥辭海, 中國醫藥科技出版社, 北京, pp. 2203-2206, 1993.
12. 高學敏 : 中藥學, 中國醫藥科技出版社, 北京, pp.301-302, 1990.
13. 丁林生 外 : 中國藥材學, 中國醫藥科技出版社, 北京, pp.1780-1782.
14. 丁 濤 : 中草藥不良反應及防治, 中國中醫藥 出版社, 北京, pp.307-309, 1992.
15. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균 : 中藥大辭典, 圖書出版鼎談, 서울, pp.4850-4851, 1998.
16. Bracco F., Scarpa M., Rigo A., Battistin L. : Determination of superoxide dismutase activity by the polarographic

- method of catalytic currents in the cerebrospinal fluid of aging brain and neurologic degenerative diseases. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 196:39-41, 1991.
17. Mano Y., Takayanagi T. : Mercury content of hair in ALS. In Iose FC and Norris (eds): "Amyotrophic Lateral Sclerosis." London: Smith-Gorden, pp.225-231, 1990.
18. Floyd, R. A : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J. 4:2587-2597, 1990.
19. Park, S. T., Lim, K. T., Chung, Y. T., Kim, S. U. : Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. Neurotoxicol. 17:37-46, 1996.
20. 金鍾寬 : 太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響. 益山, 圓光大學校 大學院, 1998.
21. 曺윤영 : 太陰人 清心蓮子湯이 Hydrogen Peroxide에 損傷된 白鼠의 大腦神經細胞에 미치는 影響. 益山, 圓光大學校 大學院, 1998.
22. 이영보, 송용선 : 加味十全大補湯 煎湯液이 Xanthine Oxidase/Xanthine에 의해 損傷된 培養 脊髓運動神經細胞에 미치는 影響. 韓方再活醫學科學會誌 Vol.9, No.1, 1999.
23. M. Michikawa, K. T. Lim, J. G. McLarnon, and S. U. Kim. :Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. Journal of Neuroscience Research. 37:62-70, 1994.
24. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Methods, 65:55-63, 1983.
25. 金成萬 外 : 漢藥의 藥理成分 臨床應用, 癸丑文化史, 서울, pp.837-839, 1982.
26. 王筠默 外 : 中藥現代研究與應用, 學苑出版社, 北京, pp.4898-4918, 1998.
27. Fridovich I. : Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical anion radical by milk xanthine oxidase. J. Biol. Chem., 245:4053-4057, 1970.
28. Killogg E. W., Fridovich I. : Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem., 252:6721-6728, 1977.
29. Harber F., Weiss J. : The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by anion salts. Proc. Roy. Soc. London A. 147:333-351, 1934.
30. Graf E., Mahoney J. R., Bryant R. G., Eaton J. W. : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation: Stringent requirement for free iron coordination site. J. Biol. Chem., 259:3620-3624, 1984.
31. Schaumburg H.H., Spencer P.S.: Clinical and experimental studies of distal axonopathy: a frequent form of nerve and brain damage produced by environmental chemical hazards. Ann. N. Y. Acad. Sci., 329, 14. 1979.