

## 調氣解瘀湯이 XO/XA에 의해 損傷된 大脳皮質 神經細胞에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 신경정신과학교실

이 용 근 · 강 형 원 · 류 영 수

### I. 緒 論

韓醫學에서 腦는 《靈樞·海論篇》<sup>1)</sup>에 “腦爲髓之海”라 하여 단순한 腎의 生理作用의 發現 場所로 認識되어 왔다. 以後 後世에 이르러 “腦爲元神之府”<sup>2)</sup>, “人之記性 皆屬腦中”<sup>3)</sup> 이라 하여 腦의 精神 및 記憶作用을 말하였으며, 張은 腦와 心에 대한 進一步된 見解로 “腦爲元神, 心爲識神, 腦中之神, 體也; 心中之神, 用也”라 하여 心腦共主神明說을 주장하여 臨床에서도 이를 적극적으로 活用하여 왔다.<sup>4,5)</sup>

따라서 腦의 病理는 《靈樞·海論篇》<sup>1)</sup>에 “髓海有餘 輕徑多力……髓海不足 腦轉耳鳴 脛痠眩暈……”라고 하였으며, 腦髓의 이런 機能이 失調되거나 減退되면 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘, 知能低下, 痴呆 등의 臨床症狀이 나타나고<sup>7-10)</sup> 그 主要原因에 對해서는 肝腎虛弱, 稟受不足, 心脾陽虛, 痰瘀 등이라고 하였다<sup>11,12)</sup>.

西洋醫學에서 腦의 病理變化로는 甚한 彌滿性 腦萎縮과 腦神經細胞의 消失 등 器質的 變성과 腦의 各種 神經傳達物質의 減少 등 生化學的 變化를 招來함으로써 記憶力과 知能低下 등 高等精神活動에 障礙를 일으키는데 이는 人間の 老化로 인한 腦의 退行性 疾患과 不可分의 關係를 가지고 있다.<sup>13-16)</sup>

일반적으로 老化란 한 개체에서 時間의 進行에 비례하여 일어나는 漸進的이고 不可逆的인 退行性 變化로서, 構造的·機能的 變化가 초래되어 外部環境에 대해 反應하는 能力이 떨어지는 現象이다.<sup>17-20)</sup>

老化의 原因은 아직 明確하게 밝혀지지 않아 다양한

假說들이 발표되어 왔는데, 最近에는 연령의 增加에 따라 自由基가 生체에 축적되어 각 세포 성분 機能을 低下시키고 老化를 가져온다는 自由基說(free radical theory)에 관련된 研究가 多樣하게 進行되고 있다.<sup>19, 22)</sup>

특히 代謝過程中 生成되는 毒性物質의 一種인 酸素自由基(oxygen radical)는 中樞神經系를 비롯하여 末梢神經系에 影響을 미침으로써 파킨슨씨병, 알츠하이머병 등과 같은 神經疾患을 誘發하는 病因으로 밝혀지면서 酸素自由基의 神經毒性에 대한 病理的 機轉糾明과 關聯 疾患에 대한 治療의 接近이 활발하게 研究되어지고 있다.<sup>21, 23-25)</sup>

調氣解瘀湯은 蔡<sup>26)</sup>의 《漢方臨床學》에 처음 記載된 處方으로, 韓醫學의 癲, 呆, 痴, 臟躁, 狂 등의 範疇에 속하는 精神分裂症의 주기성 加중발작증을 반복하는 경우에 活用하는 臨床經驗方이라 하였다.

最近 腦에 關한 實驗的 研究로, 黃<sup>27)</sup>은 遠志가 腦神經膠細胞로부터 分泌된 炎症性 腦細胞活性物質에 대한 抑制效果가 있음을, 崔<sup>28)</sup>은 定志丸이 老化된 腦機能을 改善시키고 神經細胞毒性에 防禦效果가 있음을, 趙<sup>29)</sup>는 荊防地黃湯이 알츠하이머형 치매 모델 백서에 投與하여 學習과 記憶을 增進시키는 效果가 있음을 보고하였고, 이외에도 다수의 研究 報告가 發表된 바 있다.<sup>30-37)</sup> 그러나 調氣解瘀湯에 關한 實驗的 研究는 아직 報告된 바가 없다.

따라서 酸素自由基의 神經毒性에 대한 調氣解瘀湯의 影響을 究明하기 위하여 生體 생쥐에서 순수 분리한 大脳神經細胞를 培養하여 XO/XA에 노출시킨 후 이의 毒性效果를 測定하였으며, 또한 調氣解瘀湯을 投與한 후 後 XO/XA에 의하여 誘發된 毒性에 대한 防禦 效果에 대한

유의성있는 결과를 얻었기에 報告하는 바이다.

## 2. 實驗方法

### II. 實驗材料 및 方法

#### 1. 材料

##### 1) 動物

本 實驗에 使用한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강 상태가 양호한 생쥐를 使用하였다.

##### 2) 藥材

本 實驗에 使用한 調氣解瘀湯의 處方內容은 《漢方臨床學》<sup>26)</sup>에 依據하였으며, 藥材는 圓光大學校 附屬益山韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였고, 調氣解瘀湯의 內容과 分量은 다음과 같다.

#### Prescription of Jokihaeatangga(JHT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
柴胡	<i>Radix Bupleuri</i>	8g
丹蔘	<i>Radix Salviae</i>	8g
牡丹皮	<i>Radix Moutan Cortex</i>	8g
龍骨	<i>Mastodi Fossilia Ossis</i>	12g
牡蠣	<i>Concha Ostreae</i>	12g
半夏	<i>Tuber Pinelliae</i>	6g
黃芩	<i>Radix Scutellariae</i>	6g
桃仁	<i>Semen Persicae</i>	6g
紅花	<i>Flos Carthami</i>	6g
芍藥	<i>Radix Rubra Paeoniae</i>	8g
香附子	<i>Rhizoma Cyperi</i>	8g
青皮	<i>Pericarpium Aurantii</i>	8g
陳皮	<i>Pericarpium Aurantii Nobilis</i>	8g
大黃	<i>Rhizoma Rhei</i>	8g
甘草	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	4g
生薑	<i>Rhizoma Zingiberis</i>	3g
總計		119g

##### 1) 檢液의 調劑

調氣解瘀湯 1.7貼 分量인 202.3g을 각각 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 2시간동안 電熱器로 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 凍結乾燥器에서 24시간 凍結乾燥하여 각각 37.26g의 분말 시료를 얻었다.

##### 2) 藥劑 製造

本 實驗에 使用한 試料로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 xathine (XA, Sigma)으로서 XO는 100mU/ml, 10mU/ml, 1mU/ml의 저장액을, XA는 1M, 100mM, 10mM, 1mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 實驗 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 培養液에 첨가하여 使用하였다.

##### 3) 細胞培養

大腦神經細胞의 분리는 Michikawa 등<sup>30)</sup>의 方法에 따라 施行하였다. 즉 생후 1-3일된 생쥐에서 적절한 뇌조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline (PBS)으로 處理한 후 36°C, 5% CO<sub>2</sub>/95%air로 조절된 항온기 내에서 培養하였다. 培養 完了後 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 3×10<sup>6</sup>cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 培養液으로 교환하여 주었으며 7일동안 培養後 本 實驗에 使用하였다.

##### 4) 酸素自由基 處理

酸素自由基가 생쥐의 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調查하기 위하여 일정시간 培養한 神經細胞를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 실험 전날 제조한 여러 농도의 xanthine oxidase(XO)와 xanthine (XA)이 포함된 培養液에서 1-4시간 동안 處理後 分析하

였다.

#### 5) 細胞毒性 및 防禦效果 檢定

##### (1) 細胞生存率 分析

###### ① NR定量

Neutral red(NR, Sinma)의 定量은 Borenfreud와 Puerner (1984)<sup>39)</sup>의 方法에 따랐다. 즉 여러 濃度의 xanthine oxidase(XO)와 xanthine (XA)를 處理한 培養 神經細胞를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5mg/ml의 NR을 well당 最終濃度로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 로 조절된 培元기에서 培養하였다. 培養 完了後 PBS로 3회 세척 후 1% formalin 으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 處理한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다.

###### ② MTT定量

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma) 定量은 Mosmann<sup>40)</sup>의 方法에 의하였다. 酸素自由基나 항산화제를 處理한 培養 神經細胞를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50mg/ml의 MTT를 well당 최종 濃度로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 로 조절된 培元기에서 培養하였다. 培養 완료후 dimethylsulfoxide(DMSO, Merk)를 處理한 다음 spectrophotometer로 503nm에서 흡광도를 測定 후 對照群과 比較 調査하였다.

###### ③ Neurofilament enzymeimmuno assay(EIA)

培養中인 神經細胞를 PBS로 3회 세척하여 알콜로 고정시킨 다음 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척 完了後 NE14(1:100, Sigma)로 1시간 동안 반응시킨 후 0.04% O-phenylenediamine(OPD, Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide로 處理한 다음 Dynatech Microelisa reader로 490nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다.

###### ④ Lipid peroxidation 定量

Lipid peroxidation은 xanthine oxidase(XO), xanthine(XA)

나 調氣解瘀湯 抽出物을 일정시간 동안 處理한 大腦神經細胞의 상층액과 세포용해액내의 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)를 測定한 것으로, 위액에 12N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0ml와 0.3ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 TBA 를 1.0ml를 가한 후 90도에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각 후 n-butanol로 處理하였다. n-butanol 處理完了後 원침하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 測定하였다.

##### 6) 統計 處理

實驗 結果에 대한 유의성의 검정은 ANOVA 후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

### Ⅲ. 實驗 成績

#### 1. 酸素自由基의 毒性效果

##### 1) 細胞生存率 分析

###### (1) MTT 定量

酸素自由基가 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 xanthine oxidase(XO)가 10mU/ml에서 80mU/ml 까지의 각각의 濃度로 포함된 培養液에서 6시간 동안 培養한 후 XO의 毒性效果를 MTT assay법에 의하여 調査한 結果 10mU/ml XO 處理에서는 細胞의 生存率 이 對照群(100%)에 비하여 78.5%로 나타났다. 그러나 20mU/ml의 處理에서는 71.4%로 이보다 다소 낮게 나타났다. 또한 40mU/ml와 80mU/ml XO를 處理한 경우 이의 生存率은 각각 49.6%(p<0.05)와 26.4%(p<0.01)%로 對照群에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났다(Table 1, Fig. 1). XO가 시간에 따라 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 40mU/ml/mM XO/XA가 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 각각 2~8시간 동안 培養한 후 細胞의 生存率을 MTT assay法에 의하여 對照群과 比較 調査한 結果 2시간 培養에서는 對照群(100%)에 비하여 83.4%의 細胞生存率을 보였다. 또한 4시간 培養에 있어서는 78.5%로 對照群에 비하여 다소 낮은 生存率을 나타냈으

며 6시간 培養에서는 對照群에 비하여 51.4%(P<0.05)의 生存率을, 8시간 培養에 있어서는 46.4%(p<0.01)의 生存率을 각각 나타냈다(Table 2, Fig. 2).

Table 1. Absorbance (% of control) at 570nm wavelength for the MTT assay on xanthine oxidase(XO) in cultured mouse cerebral neurons

XO (mU/ml)	MTT absorbance(570nm)	Decrease of cell viability (%)
0	1.21±0.16	-
10	0.95±0.08	21.5
20	0.86±0.03	28.6
40	0.60±0.07*	50.4
80	0.32±0.05**	73.6

Cultured mouse cerebral neurons were treated with various concentrations of xanthine oxidase(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

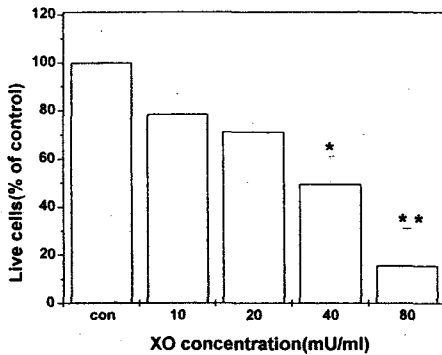


Fig. 1. Dose-dependency of xanthine oxidase(XO). XO-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to 10, 20, 40 and 80 mU/ml XO for 6 hours, respectively. The results indicate the mean±SE(n=6). \*\*p<0.01

Table 2. Time-response relationship of xanthine oxidase(XO) and xanthine(XA) by MTT assay in cultured mouse cerebral neurons

XO/XA (mU/ml/mM)	MTT absorbance(570nm)			
	2hr	4hr	6hr	8hr
0	1.52±0.15	1.58±0.11	1.46±0.13	1.51±0.10
40	1.27±0.17	1.24±0.15	0.75±0.04*	0.70±0.02**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with 40mU/ml XO and 0.5mM XA for various time intervals. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*p<0.05; \*\*p<0.01

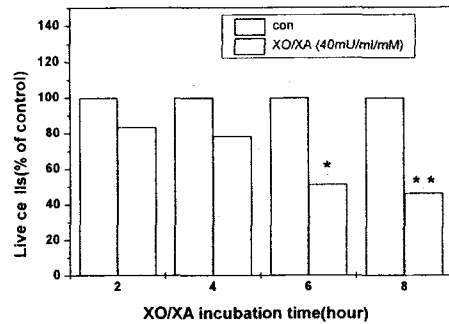


Fig. 2. Time-dependency of xanthine oxidase(XO) and xanthine(XA) in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to 40mU/ml XO and 0.5mM XA for 2, 4, 6 and 8 hours, respectively. Cell viability was measured by MTT assay. The results represent the mean±SE(n=6). \*p<0.05; \*\*p<0.01

## (2) NR 定量

培養中인 大腦神經細胞를  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 XO/XA가 20mU/ml에서 160mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 6시간 培養한 다음 이의 影響을 調査한 結果 20mU/ml의 處理에서 細胞의 生存率은 對照群(100%)에 비하여 81.4%로 나타났으며 40mU/ml와

80mU/ml에서는 각각 61.8%와 56.4% ( $p<0.05$ )로 나타났다. 또한 160mU/ml XO에서는 31.5%( $p<0.01$ )로 나타났다 (Table 3, Fig. 3). XO/XA가 培養時間에 따라 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 MCV(midpoint cytotoxicity value)값인 80mU/ml/mM XO/XA濃度에서 2~8시간 동안 培養한 후 각 시간별로 細胞의 生存率을 調査한 結果 2시간 培養에서는 對照群(100%)에 비하여 86.4%로 4시간 培養에서는 81.9%로 나타났으며 6시간 및 8시간에서는 각각 58.3%( $p<0.05$ ), 31.0%( $p<0.01$ )로 나타났다 (Table 4, Fig. 4).

Table 3. Absorbance (% of control) at 540nm wavelength for the NR assay on xanthine oxidase(XO) in cultured mouse cerebral neurons

XO(mU/ml)	NR absorbance(540nm)	Decrease of cell viability (%)
0	1.65±0.12	-
20	1.34±0.15	18.6
40	1.02±0.09	38.2
80	0.93±0.04*	43.6
160	0.52±0.01**	68.5

Cultured mouse cerebral neurons were grown in media containing various concentrations of xanthine oxidase(XO) for 6 hours. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

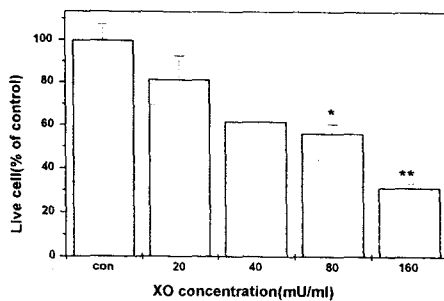


Fig. 3. Dose-response relationship of xanthine oxidase(XO) in cultured mouse cerebral neurons. Cytotoxicity was measured by NR assay. Cultures were exposed to 20, 40, 80 and 160 mU/ml XO for 6 hours, respectively. The results indicate the mean±SE(n=6). \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

Table 4. Time-response relationship of xanthine oxidase(XO) and xanthine(XA) by NR assay in cultured mouse cerebral neurons

XO/XA (mU/ml/mM)	NR absorbance(540nm)			
	2hr	4hr	6hr	8hr
0	1.76±0.14	1.71±0.15	1.75±0.17	1.74±0.12
80	1.52±0.18	1.40±0.16	1.02±0.05*	0.54±0.03* *

Cultured mouse cerebral neurons were incubated with 80mU/ml XO and 0.5mM XA for various time intervals. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

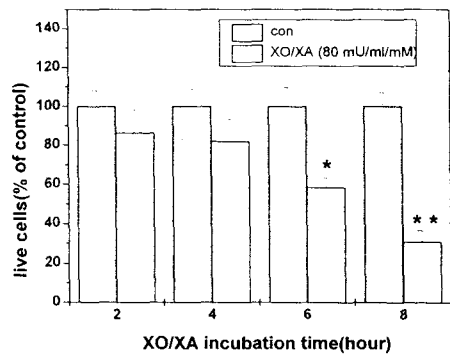


Fig. 4. Time-dependency of xanthine oxidase(XO) and xanthine(XA) in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to 80mU/ml XO and 0.5mM XA for 2, 4, 6 and 8 hours, respectively. Cell viability was measured by NR assay. The results represent the mean±SE(n=6). \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

## 2. 韓藥抽出物の 效果

### 1) neurofilament 定量

#### (1) XO/XA의 影響

XO/XA 따른 neurofilament의 量的 測定을 위한 neurofilament EIA에 있어서 XO/XA 5-60mU/ml/mM까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 6시간 동안 處理한 후 細胞의 生存率을 對照群과 比較 調査하였다. 그 結果 5mU/ml/mM XO/XA 處理에서는 細胞의 生存率은 對照群(100%)에 比하여 71.4%로 나타났으며, 15mU/ml/mM 處理에서는 67.3%로 나타났다. 또한 30mU/ml의 경우는 50.3%( $p < 0.05$ )의 生存率을 보여 MCV값 (midcytotoxicity value)을 나타냈으며, 60mU/ml/mM 21.1%( $p < 0.01$ )의 生存率을 나타냈다(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Dose-response relationship of xanthine oxidase (XO) and xanthine(XA) by neurofilament enzymeimmuno assay(EIA) in cultured mouse cerebral neurons

XO/XA (mU/ml/mM)	EI absorbance(490nm)	Decrease of neurofilament(%)
0	1.47±0.15	-
5	1.05±0.14	28.6
15	0.99±0.07	32.7
30	0.74±0.05 *	49.7
60	0.31±0.06 **	78.9

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to various concentrations of xanthine oxidase(XO) and xanthine(XA) 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. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

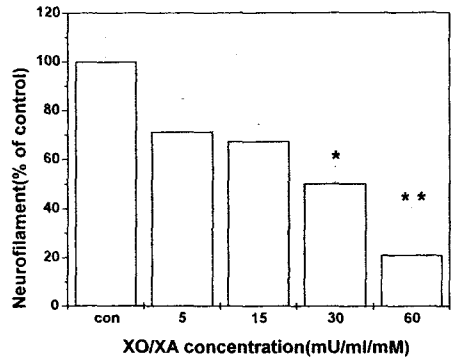


Fig. 5. Dose-dependency of xanthine oxidase(XO) and xanthine(XA) in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to 5, 15, 30 and 60 mU/ml XO and 0.5mM XA for 6 hours, respectively. Amount of neurofilament was measured at wavelength of 490nm. The results indicate the mean±SE(n=6). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

#### (2) 調氣解瘀湯(Jokihaeatang, JHT)의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 XO/XA의 酸化的 損傷에 있어서 調氣解瘀湯(JHT)의 效果를 neurofilament의 量的變化 측면에서 調査하기 위하여 XO/XA의 MCV값(midcytotoxicity value)인 30mU/ml/mM XO/XA 濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10-200μg/ml JHT가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어效果를 neurofilament EIA法으로 調査하였다. 그 結果 30mU/ml/mM XO/XA만을 處理한 경우 세포의 neurofilament의 양적변화는 對照群(100%)에 比하여 49.6%로 나타났다. 그러나 10μg/ml, 50μg/ml JHT의 處理에서는 對照群에 比하여 각각 70.2%, 75.3%로 나타났다. 또한 100μg/ml와 200μg/ml JHT處理에서는 각각 81.6% ( $p < 0.05$ )와 91.1%( $p < 0.01$ )로 나타났다.(Table 6, Fig. 6).

Table 6. Dose-response relationship of Jokihaeatang for its neuroprotective effect on xanthine oxidase(XO) and xanthine(XA) in neurofilament

concentration of Jokihaeatang	EI absorbance (490nm)	
	XO/XA 0 mU/ml/mM	XO/XA 30 mU/ml/mM
0	1.41±0.13	0.70±0.03
10	1.43±0.14	1.08±0.01
50	1.46±0.11	1.10±0.04
100	1.52±0.17	1.24±0.06*
200	1.58±0.15	1.44±0.09**

Cultured mouse cerebral neurons were preincubated with various concentrations of Jokihaeatang for 3 hours, and then exposed to 30mU/ml xanthine oxidase(XO) and 0.5mM xanthine(XA) for 6 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay (EIA). The values represent the mean±SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. \*p<0.05; \*\*p<0.01

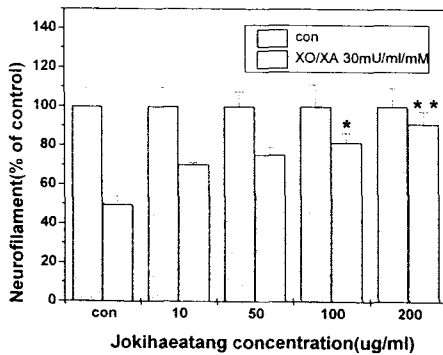


Fig. 6. Dose-dependency of Jokihaeatang for its protective effect on xanthine oxidase(XO) and xanthine(XA) in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were preincubated with 10, 50, 100 and 200µg/ml Jokihaeatang for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 30mU/ml XO and 0.5mM XA for 6 hours. Amount of neurofilament was measured at wavelength of 490nm. The results indicate the mean±SE(n=6). \*p<0.05; \*\*p<0.01

(1) XO/XA의 影響

XO/XA濃度에 따른 lipid peroxidation의 測定하기 위하여 XO/XA가 5-40mU/ml/mM까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 6시간 동안 處理한 후 細胞의 生存率을 對照群과 比較 調査하였다. 그 結果 5mU/ml/mM XO/XA 處理에서는 TBARS가 34.5로 나타났다. 또한 10mU/ml/mM, 20mU/ml/mM 및 40mU/ml/mM XO/XA 處理의 경우 TBARS가 각각 38.5(p<0.05), 48.1(p<0.01), 80.0(p<0.01)로 나타났다. 이에 대한 細胞生存率 減少는 21.1%, 51.3%, 151.6%로 각각 나타났으며 細胞生存率 減少의 MCV값은 20mU/ml/mM XO/XA處理에서 나타났다(Table 7, Fig. 7).

Table 7. Dose-response relationship of xanthine oxidase(XO) and xanthine(XA) on lipid peroxidation in cultured mouse cerebral neurons.

XO/XA (mU/ml/mM)	TBARS(pmol/10 <sup>6</sup> cells)	Decrease of cell viability(%)
0	31.8±4.7	-
5	34.5±5.4	8.5
10	38.5±6.2	21.1*
20	48.1±6.7	51.3**
40	80.0±7.5	151.6**

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to various concentrations of xanthine oxidase(XO) and xanthine(XA) for 6 hours. Thiobarbituric acid(TBA) fluorometric assay was adopted to analyse lipid peroxidation and TBA reactive substance(TBARS) were represented as pmol/10<sup>6</sup> cells. 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) Lipid peroxidation 定量

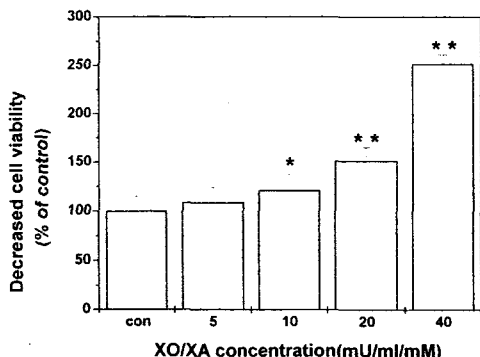


Fig. 7. Dose-dependency of xanthine oxidase(XO) and xanthine(XA) in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to 5, 10, 20 and 40 mU/ml XO and 0.5mM XA for 6 hours, respectively. Cell viability was determined as % of control. The results represent the mean±SE(n=6). \*p<0.05; \*\*p<0.01

(2) 調氣解瘀湯(Jokihaeatang, JHT)의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 XO/XA의 산화적 손상에 있어서 調氣解瘀湯(JHT)의 效果를 lipid peroxidation 側面에서 調査하기 위하여 XO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 20mU/ml/mM XO/XA濃度에서 6시간 동안 노출 시키기 3시간 전에 25-200µg/ml JHT가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어效果를 調査하였다. 그 結果 20mU/ml/mM XO/XA만을 處理한 경우 TBARS는 對照群 31.4에 비하여 96.4로 나타났다. 그러나 25µg/ml JHT의 處理에서는 對照群 35.6에 비하여 85.9로 나타났으며 50µg/ml, 100µg/ml JHT處理에서는 각각 對照群 34.2에 비하여 72.3로, 對照群 35.9에 비하여 69.6으로 나타났다. 또한 200µg/ml JHT處理에서는 對照群 38.4에 비하여 56.7(p<0.01)로 나타나 이는 XO/XA만의 處理에 비하여 매우 有意하게 減少하였다(Table 8, fig. 8).

Table 8. Dose-response relationship of Jokihaeatang for its neuroprotective effect on xanthine oxidase (XO) and xanthine(XA) in lipid peroxidation

XO/XA (mU/ml/mM)	TBARS(pmol/10 <sup>6</sup> cells)				
	concentration of Jokihaeatang(ug/ml)				
	0	25	50	100	200
0	31.4±5.7	35.6±5.1	34.2±4.6	35.9±5.3	38.4±4.9
20	96.4±4.6	85.9±4.8	72.3±4.1	69.6±3.9	56.7±3.7 **

Cultured mouse cerebral neurons were treated with Jokihaeatang. Cultures were preincubated with 25, 50, 100 and 200µg/ml Jokihaeatang for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 20mU/ml XO and 0.5mM XA for 6 hours. TBA reactive substance(TBARS) were represented as pmol/10<sup>6</sup> cells. The results represent the mean±SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. \*\*p<0.01

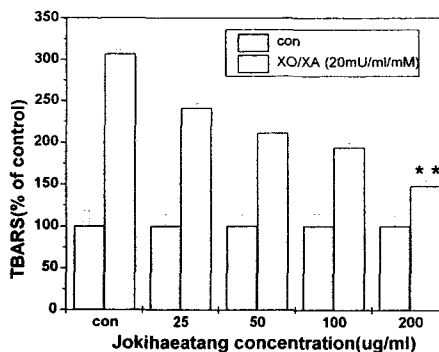


Fig. 8. Dose-dependency of Jokihaeatang for its protective effect on xanthine oxidase(XO) and xanthine(XA) in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were preincubated with 25, 50, 100 and 200µg/ml Jokihaeatang for 3 hours, respectively. TBARS(pmol/10<sup>6</sup> cells) was determined as % control. The result represent the mean±SE(n=6). \*p<0.01



#### IV. 考 察

최근들어 平均壽命의 延長과 老人 人口의 增加로 老化에 併發하는 慢性 退行性 疾病들이 急增하고 있고 사회적 문제로 대두되고 있다<sup>8)</sup>.

韓醫學에서 腦에 관한 記錄은 《素問·五臟別論篇》<sup>41)</sup>에 “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, 또한 內經에서는 “腎生骨髓”<sup>41)</sup> “腦爲髓之海”<sup>1)</sup>라 하여 腦를 腎과 관련된 단순한 生理器管의 하나로 認識하였다<sup>42-46)</sup>. 以後 後世에 이르러 “腦爲元神之府”<sup>2,43,47)</sup>, “人之記性 皆屬腦中”<sup>4)</sup>라 하여 腦의 精神 및 記憶作用을 언급하여 오늘날 西洋醫學의 腦와 類似한 概念으로 認識하였다<sup>5,43,48)</sup>.

특히, 張은 腦와 心에 대한 進一步된 見解로 “腦爲元神, 心爲識神, 腦中之神, 體也; 心中之神, 用也”라 하여 人間의 高位精神機能인 ‘神明’을 元神과 識神으로 區別하여 腦·心 모두가 精神機能을 主管한다는 心腦共主神明說을 주창하여 臨床에서도 이를 적극적으로 活用하여 왔다<sup>4,5,47,49)</sup>.

따라서 腦의 病理로는 《靈樞·海論篇》<sup>1)</sup>에 “髓海有餘 輕徑多力……髓海不足 腦轉耳鳴 脛痠眩暈……”라고 하여 腦髓의 充足與否에 따라 精神 및 身體 活動의 盛衰도 關係됨을 말하였으며<sup>5,43,44,47)</sup>, 腦의 이런 機能이 失調되거나 減退되면 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘, 知能低下, 痴呆 등의 臨床症狀이<sup>7-10)</sup> 나타나고, 그 主要原因에 對해서는 肝腎虛弱, 痰濁, 瘀血이라고 하였다<sup>11,12)</sup>.

西洋醫學에서 人間의 高位精神機能은 大腦皮質의 神經細胞活動으로 나온다고 認識하는데, 즉 腦가 人間活動의 全領域을 統括하는 Control center로서 認識, 思考, 判斷 등의 力動的인 意識活動과 다양한 感情, 行動 그리고 더 나아가 高次元의 精神世界까지도 담당하는 것으로 알려져 있다<sup>8,50,51)</sup>. 한편 腦의 病理變化로는 甚한 彌滿性 腦萎縮과 腦神經細胞의 消失 등 器質的 變성과 腦의 各種 神經傳達物質의 減少 등 生化學的 變化를 招來함으로써 記憶力과 知能低下 등 高等精神活動에 障礙를 일으키는데 이는 人間의 老化로 인한 腦의 退行性 疾患과 不可分의 關係를 가지고 있다<sup>13-16)</sup>.

韓醫學에서는 人間의 壽命을 대략 100에서 120歲로 보고 있으며, 內經 《靈樞·天年篇》<sup>1)</sup>을 보면 “……六十歲 心氣始衰故憂悲 血氣懈惰 故好臥 七十歲 脾氣虛 皮膚枯……八十歲 肺氣虛 魄離 故言善誤 九十歲 腎氣焦 四臟經脈空虛 百歲 五臟皆虛 神氣皆去 形骸獨居而終矣”라고 老化의 過程을 敘述하고 있는데, 六十歲의 心氣始衰하여 憂悲하고 八十歲에 魄離하여 言善誤라 하여 老化에 따른 精神的인 變化를 說明하였고, 또한 《素問·上古天真論》<sup>41)</sup>에 ‘女子 七歲, 腎氣盛……六七三陽脈衰于上, 面皆焦, 髮始白, 七七任脈衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形壞而無子也, 丈夫 八歲, 腎氣實……六八陽氣衰于上, 面焦, 髮髮頽去, 七八肝氣衰, 筋不能動, 天癸竭, 精少, 腎臟衰, 形體皆極, 八八則髮去’라고 하여 男·女의 연령에 따른 腎氣의 盛衰與否가 人體의 生殖·生長發育·老衰에 密接하게 關係하고 있음을 말하였으며, 虞<sup>52)</sup>는 ‘腎元盛即壽延, 腎元衰即壽夭’라고 하여 長壽하는 것이 腎氣에 의하여 決定된다고 하였다.

西洋醫學의 老化의 정의는 學說에 따라 다소 다르게 설명되나 정리해 보면 다음과 같이 2가지로 구분된다. 즉 하나는 老化가 受精에서 죽음까지의 生體의 變化를 말한다는 것이고, 다른 하나는 成熟期 이후의 生體의 變化를 말한다는 것이다. 전자는 加齡現象(aging)이라고 불리워지고 있으며, 후자는 협의의 노쇠(senescence)라고 불리운다<sup>19)</sup>. 즉 老化란 한 개체에서 시간의 진행에 비례하여 일어나는 漸進的이고 不可逆的인 退行性 變化로서, 構造的·機能的 變化가 초래되어 外部環境에 대해 反應하는 能力이 떨어지는 自然現象이다<sup>17-20)</sup>. 老化의 原因은 다양한 가설들이 존재하는데 이는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았기 때문이다. 현재까지 알려진 老化에 對한 가설(theory)로는 크게 消耗說(waste and tear theory)과 遺傳子說로 대별된다. 消耗說은 다시 직접적인 원인으로 생각되는 有毒代謝產物 蓄積과 free radical 理論, DNA 유전정보의 error로 발생되는 error 破滅說(error-catastrophe theory)과 생리과정 중 발생하는 Post-translation modifications 등으로 나누며 유전자설은 豫定說, DNA복제상에 나타나는 체세포 돌연변이설(somatic mutation theory)과 프로그램설(programmed aging theory) 등이 있다<sup>21,22)</sup>.

이중 가장 알려진 學說은 自由基說(free-radical theory)

로 최근 이를 뒷받침하는 證據들이 많이 나오고 있어 이에 대한 研究가 활발히 進行되고 있는 實情이다<sup>33-36)</sup>.

自由基說(free radical theory)은 세포내의 酸化酵素가 촉매로 작용하는 O<sub>2</sub>의 환원반응에서 自由基로 Hydroxyl radical(OH·), Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등이 생기며 이것이 세포성분과 임의로 반응하여 산화체 혹은 과산화체를 만들게 되면 단백질, 효소, DNA 등 각 세포성분 본래의 기능을 상실하게 되는데, 연령의 增加에 따라 이 自由基가 축적되면 생체에 유해하게 작용하여 老化의 原因이 된다는 假說이다<sup>17-22)</sup>.

老化는 生體內 모든 臟器에서 점차적으로 機能을 低下시키는 自然現象으로 그 중 腦의 老化는 腦神經細胞의 減數 및 萎縮을 비롯하여 神經原纖維의 엉킴, 老人性 神經斑, 顆粒空胞變性, Lewy小體 등이 出現하는 組織病理學的 變化 以外에도 Cholinergic系, Noradrenergic系, Dopamin과 같은 神經傳達物質의 減少 등 生化學的 變化를 誘發시키는 것으로 알려져 있다<sup>22)</sup>. 특히, 大腦皮質을 侵犯하는 代表的인 退行性 疾患으로는 알츠하이머병과 피크병이 있는데, 이들은 包括적으로 痴呆라고 부른다<sup>6,7,18,57-59)</sup>.

痴呆는 意識이 清明한 狀態에서 全般的인 認知機能의 障敝를 나타내는 疾患으로 보통 慢性, 또는 進行性 腦疾患에 의해 發生되며 記憶, 思考, 指南力, 理解, 計算, 學習, 言語, 判斷 등 多數의 高位大腦機能에 障敝가 나타나는 症候群이다<sup>60)</sup>. 痴呆는 여러 原因에 의해 發病할 수 있는데 痴呆를 惹起하는 原因疾患으로는 腦의 萎縮性 變化, 腦血管障敝, 梅毒이나 流行性 腦炎과 같은 腦의 炎症性障敝, korsakoff 症候群과 같은 代謝性 內分泌疾患, 腫瘍, 外傷, 中毒 등이며 이중 腦萎縮性變化에 의한 老年性 痴呆와 腦血管性 痴呆가 많은 比率을 차지하고 있다<sup>61)</sup>.

韓醫學에서 痴呆라는 病名은 張景岳의 《景岳全書·雜病謨》<sup>62,63)</sup>의 癡狂篇에서 痴瘖라고 처음 言及된 이후, 呆病<sup>64-66)</sup>, 癡狂<sup>67)</sup>, 健忘<sup>67-69)</sup>, 虛勞<sup>70)</sup> 등으로 記載되었으며<sup>71-75)</sup>, 主要原因으로는 鄭 등<sup>71)</sup>이 痰飲, 七情傷, 稟賦不足, 肝腎不足으로 크게 나누었고, 郭 등<sup>10)</sup>은 年老氣衰, 久病, 或은 內風卒中, 外傷頭腦, 或은 邪毒內竄 등으로 腦絡이 痰瘀로 凝結되면 善忘, 痴呆 등의 症狀을 發한다고 하였다. 陳<sup>65)</sup>은 呆病의 主要原因을 痰으로 보았고, 최근 張<sup>76)</sup>

도 呆從痰治으로 治痰하는 藥物을 使用하여 痴呆를 治療하였다고 報告하였다. 이와 같이 人間の 老化 와 腦의 退行性 病變과 관련되어 있는 痴呆의 病因病機는 臟腑的으로는 肝腎不足이 重要하게 作用하고 痰·瘀血·七情 등으로 腦竅가 阻滯되어 各種 症狀이 나타나는 것임을 알 수 있다<sup>11,12,77-79)</sup>.

調氣解瘀湯은 蔡<sup>36)</sup>의 《漢方臨牀學》에 처음 記載된 處方으로, 韓醫學의 癡, 呆, 痴, 臟躁, 狂 등의 範疇에 속하는 精神分裂症의 주기성 加중발작을 반복하는 경우에 活用하는 臨牀經驗方이라 하였다.

本 實驗에 使用한 調氣解瘀湯의 構成藥物의 效能을 本草學的으로 考察하면, 柴胡는 苦·涼하여 和解退熱·疏肝解鬱·升舉陽氣의 效能이 있고, 丹蔘은 苦·微寒하여 活血祛瘀·涼血安神하고 牡丹皮는 辛·苦·涼하여 清熱涼血·活血行瘀하며, 龍骨은 甘·澁·平하여 平肝潛陽·鎮驚固澁·鎮心安神의 效能이 있고, 牡蠣은 鹹·澁·涼하여 潛陽固澁·軟堅散結하며, 半夏는 辛·溫·有毒하여 降逆止嘔·燥濕祛痰·消痞散結하고 黃芩은 苦·寒하여 清熱燥濕·止血安胎한다. 桃仁은 苦·甘·平하여 破血祛瘀·潤燥腸滑하는 效能이 있고, 紅花는 辛·溫하여 活血通經·祛瘀止痛하며, 白芍藥은 苦·酸·涼하여 柔肝止痛·涼血斂陰·平抑肝陽하고 香附子는 辛·微苦·甘·平하여 理氣解鬱·調經止痛하며, 青皮는 苦·辛·微溫하여 疏肝破氣·散積化滯하고 陳皮는 辛·苦·溫하여 理氣健脾·燥濕化痰하며, 大黃은 苦·寒하여 攻積導滯·瀉火涼血·行瘀通經하고 甘草는 甘·平하여 補脾益氣·調和諸藥하고 生薑은 辛·溫하여 發汗解表·溫中止嘔·溫肺止咳하는 效能이 있다<sup>26,80,81)</sup>.

따라서 本方은 氣鬱血弱·痰迷心竅·瘀血阻滯 등으로 인한 癡狂, 痴呆, 臟躁 등과 같이 精神活動障敝의 症狀이 나타나는 疾患에 活用되는 處方이다<sup>11,26)</sup>.

韓醫學에서 腦에 關한 研究로는, 黃<sup>27)</sup>과 姜<sup>30)</sup>은 遠志 및 天門冬이 腦神經膠細胞로부터 分泌된 炎症性 腦細胞活性物質에 대한 抑制效果가 있음을, 李 등<sup>32)</sup>은 麝香이 損傷된 生쥐 腦組織에 對한 保護作用을, 崔<sup>29)</sup>는 定志丸이 老化된 腦機能을 改善시키고 神經細胞毒性에 防禦效果를, 우<sup>31)</sup>와 趙<sup>29)</sup>는 調胃升清湯 및 荊防地黃湯이 알츠하이머형 치

때 모델백서에 投與하여 學習과 記憶을 增進시키는 效果가 있음을, 金<sup>33)</sup>과 鄭<sup>34)</sup>은 洗心湯 및 溫膽湯이 腦組織의 抗酸化作用이 있음을 報告하였고, 이외에도 다수의 研究報告가 發表된 바 있다<sup>35-37)</sup>. 그러나 調氣解瘀湯을 投與한 後 大腦皮質에 미치는 影響을 研究한 實驗은 아직 없다.

人間の 腦에 酸素와 葡萄糖의 공급이 제한 받게 되면 腦組織에서의 에너지 消失이 招來되고, 神經細胞膜의 透과성의 變化로 인한 細胞內의 이온들의 動的平衡의 破壞, 神經組織의 酸性化, 腦浮腫의 形成, 神經傳達物質의 過多 生産으로 인한 腦組織의 損傷, 細胞內의 Ca<sup>2+</sup>의 增加로 인한 여러 가지 代謝物質의 生成 및 腦組織 生産物質의 增加, 神經細胞內 phospholipid 代謝의 變化, free radical 形成 등으로 因하여 腦組織은 不可逆的 損傷을 입게 된다. 이를 治療하는데, 神經組織의 酸素 및 葡萄糖 요구량을 減少시켜 자유기의 生成을 차단하거나 自由基를 제거하는 藥物에 대한 研究가 進行 中이다<sup>32,33)</sup>.

자유기는 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않은 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것으로서 이러한 특수구조 때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러 가지 병태 생리적인 반응에 參與하고 있음<sup>34)</sup>, 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시키는데<sup>35,36)</sup>, 특히 代謝過程中 生成되는 毒性物質의 일종인 酸素自由基는 흥분성아미노산(excitatory amino acids, EAA)의 分泌를 促進시키고, 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 濃度を 增加시켜 결국 세포의 死滅을 招來하며<sup>37,38)</sup>, 中樞나 末梢神經系를 구성하고 있는 神經細胞에 酸化的 損傷을 誘發함으로써 老人性 痴呆나 파킨슨씨병을 비롯하여 21,23,89-91), 腦虛血이나 腦卒中 등과 같은 各種 神經疾患을 誘發하는 病因으로 밝혀지면서<sup>92-95)</sup> 酸素自由基의 神經毒性에 대한 病理的 機轉糾明과 關聯 疾患에 대한 治療의 接近이 활발하게 研究되어지고 있다<sup>24,25,96-98)</sup>.

酸素自由基와 中樞神經損傷과의 關係에 대한 最近의 研究報告는 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)에 酸素自由基의 제거 효소 유전자인 superoxide dismutase(SOD)-1에 돌연변이가 일어남으로써 환자의 뇌속에 酸素自由基가 과다히 축적되어 결국 神經細胞에 酸化的 損傷을 주는 것으로 밝혀지면서<sup>99,100)</sup> 酸

素自由基가 많은 神經病變에 參與하고 있음이 證明되어 酸素自由基의 毒性現象에 대한 機轉糾明과 酸素自由基에 의하여 誘發되는 질환에 대한 治療적 접근을 위하여 國內外 많은 學者들이 動物을 대상으로 꾸준히 研究를 進行하여 왔다<sup>24,25)</sup>. 특히 酸素自由基는 세포막의 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐만아니라<sup>101)</sup>, 질소자유기의 하나인 nitric oxide(NO)와 상호 작용함으로써 毒性이 강한 物質인 Peroxynitrite을 생성하여 병변을 더욱 가속화 시킨다고 한다<sup>102)</sup>. 또한 酸素自由基는 Protein kinase C(PKC)나 Cyclic AMP와 같은 이차 전달자에 影響을 미침으로써 세포독성을 초래한다고 한다. 최근에 酸素自由基의 酸化的 損傷에 대하여 韓藥材의 抽出物이나 동식물에서 정제한 天然抽出物들이 강력한 항산화작용을 나타낸다는 實驗結果들이 報告되어 지고 있다. 더우기 近來에 細胞培養技術이 널리 보급되면서 實驗 目的에 적합한 세포종을 培養하여 病變의 모델을 만든 다음 各種 治療제나 韓藥抽出物이나 天然抽出物들을 處理함으로써 病變의 治療에 새로운 접근을 시도하고 있다.

本 實驗에서 XO/XA를 생쥐의 培養 大腦神經細胞에 노출시킨 후 NR assay와 MTT assay법으로 分析한 結果, XO/XA는 處理 濃度와 時間에 비례하여 細胞의 生存率을 현저하게 減少시켰다. 이같은 結果는 酸素自由基가 培養 生쥐의 척수신경절세포에, 소의 배양 희소돌기아교세포에 각각 독성을 나타냈다는 實驗 結果와 일치하였다<sup>47,103)</sup>. 이러한 현상은 酸素自由基가 中樞나 末梢神經細胞에 모두 細胞毒性을 가지고 있음을 證明해 주고 있다. 本 實驗에 있어서 酸素自由基가 생쥐의 培養 大腦神經細胞에 독성을 나타낸 것은 XO/XA가 항산화계에 손상을 줌으로써 항산화효소의 活性減少를 초래했거나 또는 酸素自由基중 superoxide와 같은 환원제가 세포내 Fe<sup>3+</sup>와 상호작용하여 毒性을 나타냈을 가능성도 배제할 수는 없지만<sup>100,104)</sup>, 本 實驗의 NR assay와 MTT assay를 비롯하여 lipid peroxidation 定量分析이나 neurofilament EIA 分析의 結果를 볼 때 XO/XA는 세포막의 지질과산화반응을 촉진을 비롯하여 neurofilament의 손상, 세포막의 손상 및 단백질 합성의 억제에 의한 것으로 생각된다<sup>92)</sup>.

酸素自由基가 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調

조사하기 위하여 10-80mU/ml의 XO가 각각 여러濃도로 포함된培養液에서 6시간 동안培養한 후 XO의毒性效果를 MTT assay法에 의하여調査하였다. 그結果 40mU/ml와 80mU/ml XO를處理한 경우 이의生存率은 각각 49.6%( $p < 0.05$ )와 26.4%( $p < 0.01$ )%로 對照群에 비하여 모두 有意性 있게 낮게 나타났다(Table 1, Fig. 1). 또한 XO가 시간에 따라培養大腦神經細胞에 미치는影響을調査하기 위하여 40mU/ml/mM XO/XA가 포함된培養液에서大腦神經細胞를 각각 2-8시간 동안培養한 후細胞의生存率을 MTT assay法에 의하여分析하였는데, 6시간培養에서는 對照群에 비하여 51.4%( $P < 0.05$ )의生存率을, 8시간培養에 있어서는 46.4%( $p < 0.01$ )의生存率을 각각 나타내 有意性 있는減少를 나타내었다(Table 2, Fig. 2). XO의 독성에 대한影響을調査하기 위하여 20mU/ml-160mU/ml의 XO가 각각 여러濃도로 포함된培養液에서大腦神經細胞를 시간별로培養한 후 NR assay에 의한細胞生存率을測定하였다. 그結果 XO/XA의處理濃도에 비례하여 有意하게細胞의生存率이減少하였다. 특히 80mU/ml에서는 對照群에 비해 56.4%( $p < 0.05$ )로減少하였고, 또한 160mU/ml XO에서는 31.5%( $p < 0.01$ )로 有意性 있는減少를 나타냈다(Table 3, Fig. 3). XO/XA가培養時間에 따라大腦神經細胞에 미치는影響을調査하기 위하여 MCV (midpoint cytotoxicity value)값인 80mU/ml/mM XO/XA濃度에서 2-8시간 동안培養한 후 각 시간별로細胞의生存率을調査한結果 6시간, 8시간培養에서 각각 對照群(100%)에 비하여 58.3%( $p < 0.05$ ), 31.0% ( $p < 0.01$ )로 나타나 有意하게減少하였다(Table 4, Fig. 4).

최근에는 韓藥抽出物을 비롯한 天然抽出物들이 항산화 효과나 세포성장인자들의 약리적 활성을 가지고 있어 腦나 脊髓의 神經病變을 비롯하여 中風이나 암과 같은 각종 난치성질환의 治療에 매우 效果가 뛰어나다는 研究들이 報告되고 있다. 本 實驗에서는 여러 腦病變의 原因이라고 밝혀진 酸素自由基에 대하여 이의 酸化的 損傷에 의한 韓藥抽出物의 效果를調査하기 위하여 생쥐에서 순수분리하여培養한 大腦神經細胞에 酸素自由基의 하나인 XO/XA를處理한 후 調氣解瘀湯의 效果를 neurofilament 定量과

lipid peroxidation의 測定 등에 의하여 調査하였다.

調氣解瘀湯(JHT)에 대한 neurofilament 測定을 위한 neurofilament enzymeimmuno assay (ELA)에 있어서 XO/XA는 培養大腦神經細胞에處理한濃도에 비례하여 neurofilament의 量的減少를 보였으며 30mU/ml의 경우에서는 對照群에 비해 50.3%( $p < 0.05$ )의生存率을 보여 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다(Table 5, Fig. 5). 그러나 30mU/ml/mM XO/XA濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10-200 $\mu$ g/ml JHT가 각각 포함된培養液에서 전처리 한 경우處理한濃도에 비례하여 neurofilament의 有意한 量的增加를 보였으며 특히 100 $\mu$ g/ml와 200 $\mu$ g/ml JHT處理에서는 각각 81.6%( $p < 0.05$ )와 91.1% ( $p < 0.01$ )로 나타나 有意性 있는增加를 나타냈다(Table 6, Fig. 6).

XO/XA가 지질과산화반응에 미치는影響을調査하기 위하여 5-40mU/ml /mM까지의濃도가 각각 포함된 배양액에서大腦神經細胞를 6시간 동안處理한 후 調氣解瘀湯에 대한 lipid peroxidation에 있어서細胞의生存率을 對照群과 比較調査하였다. 그結果培養大腦神經細胞에處理한濃도에 비례하여 TBARS의濃도를增加시켰으며細胞生存率減少의 MCV값은 20mU/ml/mM XO/XA處理에서 나타났다(Table 7, Fig. 7). 그러나 20mU/ml/mM XO/XA濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 25-200 $\mu$ g/ml 調氣解瘀湯(JHT)이 각각 포함된培養液에서 전처리 한 경우處理한濃도에 비례하여 TBARS濃도의增加를 보였으며 특히 200 $\mu$ g/ml JHT處理에서는 對照群 38.4에 비하여 56.7( $p < 0.01$ )로 나타나 이는 XO/XA만의處理에 비하여 매우 有意하게減少한 것으로 나타났다(Table 8, fig. 8).

이같은 實驗結果를 綜合해보면, XO/XA와 같은 酸素自由基는 酸化的 損傷에細胞生存率을減少시키고 神經細胞에 대하여 毒性을 나타내며, 이에 대한 調氣解瘀湯의 投與가 neurofilament의 量的增加와 lipid peroxidation의減少를 보여 老化抑制 및 痴呆治療에 일정한 藥理的 效果가 있는 것으로 나타났다.

## V. 結 論

本 研究에서는 XO/XA의 酸化의 損傷에 의한 毒性 效果를 糾明하고 이 毒性 效果에 대한 調氣解瘀湯의 效果를 確認하기 위해 新生 生쥐에서 분리 培養한 大腦 神經細胞를 對象으로 實驗하였다. 그 結果는 다음과 같다.

1. 酸素自由基인 XO/XA는 NR assay와 MTT assay에서의 細胞生存率을 減少시켰으며 또한 신경세사(neurofilament)도 減少시키고, lipid peroxidation을 增加시켜 생쥐의 培養 大腦神經細胞에 毒性을 나타내었다.

2. 調氣解瘀湯은 산소자유기에 의해 손상된 神經細絲(neurofilament)를 유의하게 增加시킨다.

3. 調氣解瘀湯은 생성된 과산화질(lipid peroxidation)을 유의하게 減少시켰다.

이상의 實驗結果에 따르면 調氣解瘀湯이 XO/XA와 같은 酸素自由基의 酸化의 損傷에 대한 防禦作用이 있어 老化 抑制 및 痴呆 治療에 대해 臨床의 活用價値가 있으리라 생각되며, 尙後 이에 대한 지속적인 研究가 進行되어야 할 것으로 思料된다.

## 參 考 文 獻

1. 楊維傑編 : 黃帝內經譯解(靈樞), 서울, 成輔社, pp.84-89, 104-145, 280-283, 1980.
2. 李時珍 : 本草綱目, 서울, 高文社, pp.603-604, 1973.
3. 王清任 : 醫林改錯, 臺聯, 國風出版社, pp.22-25, 1975.
4. 程如海 : 略論張錫純心腦共主神明說, 北京, 北京中醫藥大學學報, 19(6): 12, 1996.
5. 董蓮榮等編著 : 中醫形神病學, 北京, 光明日報出版社, pp.22-23, 1991.
6. 柳道坤 : 東醫生理學講義, 益山, 圓光大學校出版局, pp.267-270, 365-377, 413-415, 506-507, 1996.
7. 李京燮外 : 東醫心系內科學(上), 서울, 書苑堂, pp.36-37, 43-44, 1995.
8. 黃義完外 : 東醫神經醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp.256-257, 262-264, 269-271, p.266, 920, 1987.
9. 王乃石 : 益氣聰明湯治療腦血管神經性病變的体会, 湖北中醫雜誌, 18 (124):41, 1996.
10. 郭宇鵬外 : 謝海洲治療腦萎縮經驗, 北京, 中醫雜誌, 38 (10):586-587, 1997.
11. 張明准外 : 心-腦-神志病辨證論治, 黑龍江科學技術出版社出版, pp.5-10, 100-112, 1988.
12. 金利和外 : 痴呆治療의 最近 研究動向에 關한 考察, 大韓鍼灸學會誌 14 (2):115-126, 1997.
13. 지제근 : 치매(Dementia)의 병리, 大韓神經科學會誌, 3 (1):5-9, 1985.
14. 이근후 : 精神科 영역에서의 痴呆, 大韓神經科學會誌, 3(1):25-27, 1985.
15. 김진수 : Alzheimer's disease의 신경화학적 변화에 관한 고찰, 大韓神經科學會誌, 3(1):10-15, 1985.
16. 李文鎬外 : 內科學(상), 서울, 醫林社, pp.256-259, 1986.
17. 大韓皮膚科學會刊行委員會 : 皮膚科學, 서울, 麗文閣, p.23, 1994.
18. 의학교육연수원 편저 : 노인의학, 서울, 서울대학교출판부, p.3, 7, 9, 10, 14, 22, 27, 595, pp.29-31, 1997.
19. 조유향 : 노인보건, 서울, 현문사, pp.43-49, 1995.
20. 이철완 : 이철완교수의 노인병 연구, 서울, 일증사, pp.130-150, 1997.
21. 김승업 : 치매, 알츠하이머병, 서울, 삶과 꿈, pp.53-54, 57-62, 87-94, 1997.
22. 徐舜圭 : 成人病 老人病學, 서울, 高麗醫學, pp.10-13, 225-228, 1992.
23. Difazio MC, Hollingsworth Z, Young AB, Penny JB : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. Neurology., 42:402, 1992.
24. Floyd RA : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J., 4:2587-2597, 1990.
25. Park ST, Mun YJ, Oh JM, Kim JJ, Choi MK, Shim JH, Lim KT, Chung YT : Effect of iron-chelator on

- by oxygen radicals in culture oligodendrocytes. Korean J Phys Anthropol., 9:189-195, 1996.
26. 蔡仁植 : 漢方臨床學(辨證施治), 서울, 大星文化社, pp. 189-190, 1987.
27. 黃始榮 : 遠志에 의한 腦 星狀細胞로부터 炎症性 細胞 活性物質 分泌의 抑制 效果에 關한 研究, 圓光大學校 大學院 博士論文, 1997.
28. 崔龍垓 : 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗的 研究, 圓光大學校 大學院 博士論文, 1996.
29. 趙潤淑 : 荊防地黃湯이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 博士論文, 1997.
30. 강형원 : 天門冬에 의한 腦神經膠細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制效果, 圓光大學校 大學院 碩士論文, 1997.
31. 우주영 : 調胃升清湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 影響, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 8(1):69-79, 1997.
32. 李保英·姜錫峯 : 麝香이 생쥐이 腦損傷에 미치는 影響, 서울, 大韓韓醫學會誌, 16(2):299-311, 1995.
33. 金聖賢·李相龍 : 洗心湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2):39-50, 1997.
34. 鄭仁哲·李相龍 : 溫膽湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2):51-62, 1997.
35. 鄭智天 : 左歸飲과 右歸飲에 의한 活性 酸素類의 消去 作用과 抗酸化 酵素系의 活性 增加 效果에 대한 研究, 大韓韓醫學會誌, 17(1):21-36, 1996.
36. 尹哲浩外 : 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 腦 過酸化 脂質 生成 및 活性酸素 生成系 酵素 活性에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 16(2):348-364, 1995.
37. 손정석外 : 七福飲이 老化 白鼠 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2):25-38, 1997.
38. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU : Oxygen radical- induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J Neurosci Res., 37:62-70, 1994.
39. Borenfreund E, Puerner JA ; A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). J. Tiss cult Mett 9:1-9, 1984.
40. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol Methods., 65:55-63, 1983.
41. 楊維傑編 : 黃帝內經譯解(素問), 서울, 成輔社, pp.1-12, 42-61, 100- 103, 131-145, 206-211, 455-468, 701-704, 1980.
42. 金完熙外編著 : 東醫生理學, 서울, 慶熙大學校 出版局, p.384, 1993.
43. 成彊慶 : 腦의 機能에 對한 臟象論의 考察, 서울, 大韓韓醫學會誌, 16 (1):468-474, 1995.
44. 許美晶外 : 內經의 腦學說에 對한 文獻的 考察, 惠和醫學, 6(1) :175-200, 1997.
45. 이원철外 : 內經에 나타난 腦의 考察, 서울, 大韓韓醫學會誌, 4(2):73- 77, 1983.
46. 李清福·劉渡舟 編著 : 中醫精神醫學, 天津, 天津科學技術出版社, pp.211- 212, 1988.
47. 王彩霞 : 論腦爲元神之府, 中醫函授通訊, 16(2):11-12, 1997.
48. 張德祥 : 試論腦爲君主之官神明出焉, 甘肅中醫學院學報, 13(2):3-4, 1996.
49. 鄭彝倫 : 從腦神與五臟神相關學說探討郁症的治原則, 북경, 중의학연구, 14(7):3-4, 1998.
50. 金基錫譯, Richard F. Thompson著 : 腦, 서울, 星苑社, p.28, 35, 1989.
51. 丁彰炫 : 神에 대한 研究- 《黃帝內經》을 中心으로-, 慶熙大學校 大學院 博士論文, 1997.
52. 虞搏 : 醫學正傳, 서울, 成輔社, p.9, 1986.
53. Agarwal, S. DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies. Proceeding of the National of the National Academy of Science., 91(25):12332-12335,1994.
54. Ames, B. N. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of

- National Academy of sciences., 90(17):7915-7922, 1993.
55. Harman, D. The aging process: Major risk factor for disease and death. Proceeding of the Science., 88:5360-5363, 1991.
  56. Smith, C. D. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. Proceeding of the National Academy of Sciences., December 1; 88(23):10540-10543, 1991.
  57. 柳泳秀外 : 記憶障礙에 關한 東·西醫學의 比較, 研究, 東醫神經精神科學會誌, 7(1):155-166, 1996.
  58. 의학교육연구원 : 노인의학, 서울, 서울대학교출판부, p.595, 1997.
  59. Andrea Eggert, M. Lynn Crismon, Larry Ereshefsky. Alzheimer's Disease. In Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach. Dipro JT et al. Ed, New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1325-1344, 1996.
  60. 배영철外 : 老人醫學, 서울, 高麗醫學, pp.193-209, 1996.
  61. 이근후 : 최신임상정신의학, 서울, 하나의학사, p.138, pp.216-228, 1988.
  62. 張介賓 : 景岳全書, 上海, 上海科學技術出版社, p.576, 981, 1984.
  63. 張介賓 : 國譯 景岳全書 第三冊, 서울, pp.841-849, 1992.
  64. 錢鏡湖 : 辨證奇門全書, 서울, 甘地出版社, pp.233-235, 1990.
  65. 陳士鐸 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, p.102, 1984.
  66. 陳士鐸 : 辨證錄, 서울, 醫聖堂, pp.241-246, 1989.
  67. 李槌 : 編註醫學入門(卷二), 서울, 大成文化社, pp.180-182, 1984.
  68. 龔廷賢 : 增補萬病回春, 서울, 一中社, pp.229-230, 1994.
  69. 李中梓 : 醫宗必讀, 서울, 一中社, pp.323-324, 1991.
  70. 孫思邈 : 備急千急要方(卷四十), 서울, 杏林出版社, pp.12-13, 1976.
  71. 鄭仁哲外 : 痴呆에 對한 文獻的 考察, 東醫神經精神科學會誌, 7(1):77- 94, 1996.
  72. 黃義完外 : 치매에 대한 한의학적 임상연구, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 7(1):1-13, 1996.
  73. 金영근外 : 痴呆에 대한 文獻的 考察, 서울, 대한한방내과학회지 18(2):177-194, 1997.
  74. 裴旻星 : 老人性 痴呆에 關한 體質醫學의 研究, 大韓韓醫學會誌, 13(2):101-106, 1992.
  75. 李東垣外 : 痴呆에 關한 東西醫學의 比較 考察, 大韓韓方內科學會誌, 16(1):2-5, 11, 14, 1995.
  76. 張覺人 : 呆從痰治, 上海, 上海中醫藥雜誌, 3:20-21, 1995.
  77. 傅仁杰外 : 老人性 腦病의 中醫診斷治療, 中醫雜誌, 35(3):79-84, 1994.
  78. 劉昌群 : 中醫腦髓理論基礎乃辨證分析, 黑龍江中醫藥, 第3期, 1996.
  79. 袁立人外 : 中醫老年病學, 上海, 上海中醫藥出版社, pp.317-320, 1992.
  80. 辛民教 : 原色 臨床本草學, 서울, 三光印刷社, pp.175-177, 223-224, 253-256, 308-309, 372-374, 380-382, 385-387, 463-467, 538-540, 556-558, 363-366, 1996.
  81. 江蘇新醫學院編 : 中藥大辭典(上·下冊), 上海, 上海科學技術出版社, p.102, 478, 567, 625, 655, 706, 775, 1002, 1124, 1127, 1224, 1672, 1832, 1787, 2017, 1994.
  82. 醫學教材研究院 : 藥物療法, 서울, 서울대학교출판부, pp.399-403, 1996.
  83. 대한신경외과학회 : 신경외과학, 서울, 중앙문화사, pp. 276-279, 284- 285, p.299, 1997.
  84. Lehninger · Nelson · Cox 著, 蔡範錫 譯 : Lehninger 생화학 제2판, 서울, 서울외국서적, p.37, 324, 1996.
  85. Pellegrini-Giampietro D E, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. J. Neurochem., 51:1960- 1963, 1988.
  86. Pellegrini-Giampietro D E, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Morromi F : Excitatory amino acid and

- free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J. Neurosci.*, 10:1035-1041, 1990.
87. Mayer M L, Westbrook G L : Permeation and block of N-methyl- D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. *J. Physiol.*, 394:501-527, 1987.
88. Zeman S, Lloyd C, Meldrum B, Leigh P N : Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 20:219-231, 1994.
89. Bracco F, Scarpa M, Rio A, Battistin L : Determination of superoxide dismutase activity by the polarographic method of catalytic currents on the cerebrospinal fluid of aging brain neurologic degenerative disease. *Proc. So. Exp. Biol. Med.*, 196:36-41, 1991.
90. Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J : NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neuros. *Nature (London)*, 336:68-70, 1988.
91. Mattson M P, Cheng B, Smith-Swintosky V L : Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium and free radical mediated excitotoxic injury : Implications for treating neurogenerative disorders. *J. Exp. Neurol.*, 124:89-95, 1993.
92. Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T : A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpatocopherol administration. *Stroke.*, 14:977-982, 1983.
93. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.*, 59:1609-1623, 1992.
94. Vannucci R C, Vannucci S J : Cerebral metabolic response of hyperglycemic immature rats to hypoxia-ischemia. *Pediatr. Res.*, 21:524-529, 1987.
95. Tsai S Y, Tchen P H, Chen J D : The relation between motor evoked potentia and clinical motor status in stroke patients. *Electromyogr. Clin. Neurophysiol.*, 32:615-620, 1992.
96. 백봉숙 외 : 녹차로 부터 분리된 Epicatechin 3-O-Gallate의 항산화작용 機轉에 관한 研究, 釜山大學 校藥學研究誌, 29(2):49-56, 1995.
97. 成日煥 : 抗酸化作用에 대한 杜沖葉藥鍼의 實驗的 研究, 大田大學校 大學院, 1997.
98. Conradi S, Ronnevi L, Norris F : Amyotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP (ed) : *Human Motor Neuron Diseases*. New York Raven Press pp.35-56, 1982.
99. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto O, Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature(London)*, 362:59-62, 1993.
100. Halliwell B : Oxidants and human disease : Some new concepts. *FASEB J.*, 1:358-364, 1987.
101. Hall E. and Braugher J M : Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. *CNS Trauma.*, 3:281-294, 1986.
102. Zhang Y, Tatsuno T, Carney JM, Mattson MP : Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against iron- induced degeneration. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 13:378-388, 1993.
103. Kim YS and Kim SU : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci. Res.*, 29:100-106, 1991.
104. Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton Jw : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation : Stringent requirement for free iron coordination site. *J Biochem.*, 59:3620-3624, 1984.



=Abstract=

Effects of Jogihaeatang(調氣解瘀湯)  
on the Cerebral Cortex Neuron  
injured by XO/XA

Yong-keun Lee · Hyung-Won Kang · Yeoung-Su Lyu

Dept. of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental  
Medicine, Won Kwang University, Iksan, Korea

As the average life span has been lengthened and the rate of senile population has been raised, chronic degenerative diseases incident to aging have been increased rapidly and become a social problem.

With this social background, recently, oxygen radicals(OR) have toxic effects on Central Nervous

System and Peripheral Nervous System and cause neuropathy such as Parkinson's Disease, Alzheimer Disease

The purpose of this study is to examine the toxic effects caused by Xanthine Oxidase(XO) and the effects of herbal extracts such as Jokihaeatang(JHT) on the treatment of the toxic effects. For this purpose, experiments with the cultured cell from the cerebrums of new born mice were done.

The results of these experiments were as follows.

1. XO, an oxygen radical, decreased the survival rate of the cultured cells on NR assay, MTT assay and amount of neurofilaments and increased the amount of lipid peroxidation.

2. JHT have efficacy of increasing the amount of neurofilaments.