

地黃飲子와 加味地黃飲子 抽出液이 XO/HX로 손상된 배양 海馬神經細胞에 미치는 효과

이용근 · 김상호 · 민상준 · 양희숙 · 장현호 · 김태현 · 강형원* · 유영수

원광대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실

The Effects of Jihwangyeumja and GamiJihwangyeumja water extract on The Cultured Primary Hippocampal Cell Damaged by XO/HX

Yong Geun Lee, Sang Ho Kim, Sang Jun Min, Hee Suk Yang,
Hyun Ho Jang, Tae Hean Kim, Hyung Won Kang*, Yeoung Su Lyu

Department of Oriental Neuropsychiatry Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The purpose of this study is to examine the toxic effects caused by xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX) and the effects of herbal extracts such as JHYJ and GJHYJ on the treatment of the toxic effects. For this purpose, experiments with the cultured hippocampal cells from new born mice were done. The results of these experiments were as follows. 1. XO/HX, a oxygen radical-generating system, decreased the survival rates of the cultured cells on XTT assay and INT assay, the amount of DNA syntheses, and the amount of neurofilaments, and increased the lipid peroxidation. 2. JHYJ and GJHYJ have the efficacy of increasing the survival rates of the cultured cells. 3. JHYJ and GJHYJ have the efficacy of increasing the amount of neurofilaments and of decreasing the lipid peroxidation. 4. JHYJ and GJHYJ have the efficacy of increasing the amount of DNA syntheses. From the above results, it is suggested that Jihwangyeumja and Gamiijhwangyeumja have marked efficacy as a treatment for the damages caused by the XO/HX-mediated oxidative stress. And Jihwangyeumja and Gamiijhwangyeumja are thought to have certain pharmacological effects. Further clinical study of this pharmacological effects of Jihwangyeumja and Gamiijhwangyeumja should be complemented

Key words : Jihwangyeumja(地黃飲子), Gamiijhwangyeumja(加味地黃飲子), Hippocampal Cell

서 론

老化란 한 개체에서 시간의 진행에 비례하여 일어나는 점진적이고 非可逆적인 퇴행성 변화로서, 구조적·기능적 변화가 초래되어 외부환경에 대해 반응하는 능력이 떨어지는 현상이다¹⁾. 老化的 원인은 아직 명확하게 밝혀지지 않아 다양한 假說들이 발표되어 왔는데, 최근에는 연령의 증가에 따라 自由基가 생체에 축적되어 각 세포 성분의 기능을 저하시켜 老化를 가져온다는 自由基說(free radical theory)에 관련된 연구가 다양하게 진행되고 있다²⁻⁴⁾. 특히 代謝過程中 생성되는 毒性物質의 일종인 酸素自由基는 中樞神經系를 비롯하여 末梢神經系에 영향을 미

침으로써 파킨슨씨병, 알츠하이머병 등과 같은 神經疾患을 誘發하는 병인으로 밝혀지면서 酸素自由基의 神經毒性에 대한 병리적 기전규명과 관련 질환에 대한 치료 접근이 활발하게 연구되고 있다^{3,5)}. 한의학에서는 《靈樞·衛氣失常編》⁶⁾에서 “年五十以上爲老”라 하여 老化的 개념이 최초로 시작된 이후, 《靈樞·天年篇》⁶⁾에서 “五十歲 肝氣始…… 九十歲 腎氣焦……百歲 五臟皆虛……”이라 하였으며, 《素問·上古天眞論》⁷⁾에는 “丈夫…… 腎臟衰, 形體皆極”이라 하여 五臟의 衰弱, 특히 腎氣의 쇠퇴를 老化的 생리적 특징으로 보았다. 이같이 年齡에 따른 臟腑機能 衰弱 및 腦髓의 機能이 失調됨에 따라 健忘, 失眠, 耳鳴, 眩暈, 中風, 痿症 및 癱瘓 등의 각종 노인성 질환이 발생한다 하였다⁸⁾. 地黃飲子는 劉의 「宣明論方」⁹⁾에 처음 기재된 이래, 歷代醫書 및 임상에서 下元의 腎水가 虛衰하여 발생한 中風·舌瘖·足廢·腎虛弱 其氣厥不至舌下를 治한다 하였으며¹⁰⁾,

* 교신저자 : 강형원, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대군포한방병원
E-mail : dskhw@wonkwang.ac.kr Tel : 031-390-2762
· 접수: 2002/07/23 · 수정: 2002/09/02 · 채택 : 2002/09/27

실제 高血壓, 腦動脈硬化, 中風後遺症, 慢性腎炎 等に 多用하고 있는 處方이다^{11,12)}. 地黃飲子에 관한 연구로는, 洪¹³⁾은 地黃飲子가 endotoxin으로 혈전증을 유발시킨 흰쥐에서 유의성 있는 효과가 있음을, 서¹⁴⁾ 등은 地黃飲子에 覆盆子 등의 五子를 가미한 五子地黃飲子가 혈청성분의 cholinesterase의 활성을 증가시키고 활성산소의 생성과 노화물질의 축적을 막아 抗老化的 효과가 있음을 보고한 바 있으나, 酸素自由基에 의해 손상된 海馬神經細胞에서의 변화에 관한 연구는 아직 보고된 바 없었다. 이에 저자는 老化的 유력한 원인설 중 하나인 酸素自由基의 神經毒性에 대한 地黃飲子(Jihwangyeumja, JHYJ)와 加味地黃飲子(Gamijihwangyeumja, GJHYJ)의 영향을 究明하기 위하여 신생 생쥐에서 순수 분리한 海馬神經細胞를 培養하여 XO/HX에 노출시킨 후 이의 毒性效果를 측정하였으며, 또한 地黃飲子 및 加味地黃飲子 抽出液을 投與한 후 XO/HX에 의하여 유발된 毒性에 대한 防禦 效果를 比較 調査하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 약재

본 실험에 사용한 동물은 임신 14~16일의 250~300g의 Sprague-Dawley종의 건강상태가 양호한 생쥐를 사용하였다. 본 실험에 사용된 地黃飲子는 『東醫寶鑑』¹⁴⁾에 의거하였으며, 여기에 龍骨 · 牡蠣 · 枸杞子를 加한 加味地黃飲子の 내용과 1貼分量은 다음과 같다. 약재는 원광대학교 부속 익산한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였으며 처방내용은 Table 1, Table 2와 같다.

2. 檢液의 조제

地黃飲子와 加味地黃飲子 각각 4접 분량인 200g, 248g을 각각 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전당한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압 농축한 후 동결건조기에서 건조하여 각각 51.36g, 54.38g의 분말 시료를 얻었다.

Table 1. Prescription of Jihwangyeumja

韓藥名	生藥名	重量(g)
熟地黃	Radix Rehmanniae Preparata	4.0
巴戟	Radix Morindae Officinalis	4.0
山茱萸	Fructus Corni	4.0
肉蓯蓉	Herba Cistanches	4.0
石斛	Herba Dendrobii	4.0
遠志	Radix Polygalae	4.0
五味子	Fructus Schisandrae	4.0
白茯苓	Poria	4.0
麥門冬	Radix Ophiopogonis	4.0
附子	Aconiti lateralis Preparata Radix	2.0
肉桂	Cortex Cinnamomi	2.0
石菖蒲	Rhizoma Acori Graminei	2.0
生薑	Rhizoma Zingiberis	4.0
大棗	Fructus Zizyphi Jujubae	4.0
총 계		50.0

Table 2. Prescription of Gamijihwangyeumja

韓藥名	生藥名	重量(g)
熟地黃	Radix Rehmanniae Preparata	4.0
巴戟	Radix Morindae Officinalis	4.0
山茱萸	Fructus Corni	4.0
肉蓯蓉	Herba Cistanches	4.0
石斛	Herba Dendrobii	4.0
遠志	Radix Polygalae	4.0
五味子	Fructus Schisandrae	4.0
白茯苓	Poria	4.0
麥門冬	Radix Ophiopogonis	4.0
附子	Aconiti lateralis Preparata Radix	2.0
肉桂	Cortex Cinnamomi	2.0
石菖蒲	Rhizoma Acori Graminei	2.0
生薑	Rhizoma Zingiberis	4.0
大棗	Fructus Zizyphi Jujubae	4.0
生龍骨	Os Draconis	4.0
生牡蠣	Concha Ostreae	4.0
枸杞子	Fructus Lycii	4.0
총 계		62.0

3. 약제 제조

본 실험에 사용한 시약으로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypoxanthine(HX, Sigma)으로 XO의 경우 100mU/ml, 10mU/ml, 1mU/ml의 저장액을, HX의 경우 1M, 100mM, 10mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

4. 세포배양

임신 14~16일의 Sprague-Dawley종 흰쥐의 복강을 70% 알콜로 소독, 절개한 뒤 자궁을 적출하여 태아의 두경부를 절단하여 피부와 두개골을 제거한 뒤 후뇌에서 연수까지의 뇌를 꺼내어서 HBSS(Hank's balanced salt solution)에 모은 다음 현미경 하에서 뇌조직 주위의 뇌막을 제거 후 해마부위를 분리하였다. 분리된 조직에 0.25% trypsin과 0.01% DNase를 첨가하여 37℃ 수조에서 20분간 배양한 다음 HBSS로 3~4회 씻어내어 trypsin을 완전히 제거하고 조직 덩어리를 작은 입자덩어리로 만든 후 상층액을 취하여 HBSS를 첨가 후 세포를 분리하였다. 수차례 반복 후 상층액을 버리고 배지에 부유시켰다. 부유시킨 일부 세포를 취하여 trypan blue로 염색한 후 현미경하에서 hemacytometer를 이용하여 세포의 수를 측정한 다음 10⁴~10⁵개의 세포수를 B-27, 0.5mM L-glutamine, 25uM glutamine, 25uM 2-mercaptoethanol이 첨가된 Neurobasal media(Boehringer Mannheim, Germany)에 4일간 배양 후 glutamate가 없는 배지로 1/2 교환하고 2주간 배양하여 신경세포가 성숙한 다음 실험에 사용하였다.

5. XO/HX의 처리

산소자유기가 생쥐의 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 해마신경세포를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 후 xanthine oxidase(XO)에 다양한 농도의 hypoxanthine(HX)을 여러 농도로 조합하여 혼합한 다음 이들 각각의 배양액에서 처리한 후 분석하였다.

6. 세포독성 및 방어효과 검정

1) XTT 정량

XTT(Sigma)의 정량은 약제를 처리한 배양 신경세포를 Triton-X로 3회 세척 후, 전날 제조한 50 μ g/ml의 XTT를 well당 0.1ml씩 넣은 다음에 cooking foil로 싸서 빛을 차단한 후 5시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 배양한다. 배양 완료 후 spectrophotometer로 530nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사한다. XTT assay는 530nm에서 빛의 흡수량에 비례하여 세포의 생존율을 측정하는 분석법이다.

2) INT 정량

INT(Sigma) 정량은 Mosmann(1983)¹⁹⁾의 방법에 따랐다. 약제를 처리한 배양 신경세포를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 100 μ g/ml의 INT를 well당 0.05ml를 넣은 다음에 4시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 배양한다. 배양 완료 후 spectrophotometer로 202nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사한다. INT assay는 202nm에서 빛의 흡수량에 비례하여 세포의 생존율을 측정하는 분석법이다.

3) DNA synthesis

일정 시간동안 약제를 처리한 실험군과 약제처리를 하지 않은 대조군을 [3H]thymidine이 10 μ Ci/ml 포함된 배양액으로 교환하여 1시간동안 표식하였다. 100 μ g/ml의 sodium azide로 DNA합성을 억제시켜 Ca²⁺, Mg²⁺가 없는 PBS로 3회 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 부유시켰다. 세포를 Whatman GF/C glass filter paper로 수확한 후 여과지를 건조시켜 scintillation cocktail(PPO 4g, POPOP 0.1g/Toluene 1L)을 넣고 반응시킨 다음 액체상판계수기로 방사능을 측정하여 이를 대조군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

4) Neurofilament enzymeimmuno assay(EIA)

배양중인 해마신경세포를 PBS로 3회 세척하여 알콜로 고정시킨 다음 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료후 NE14(1:100, Sigma)로 1시간 동안 반응시킨 후 0.04% O-phenylenediamine(OPD, Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide로 처리한 다음 ELISA Reader로 490nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다. EIA는 490nm에서 빛의 흡수량에 의해 신경세사의 양을 측정하는 효소면역 분석법이다.

5) Lipid peroxidation 정량

XO나 XO/HX 및 한약추출물을 여러 농도로 처리한 후 Lipid peroxidation의 측정은 일정시간 동안 처리한 해마신경세포의 상층액과 세포용해액내의 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)를 측정하는 것으로, 위의 액에 12N H₂SO₄와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0ml와 0.3ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응완료 후 TBA 를 1.0ml를 가하고 다음 90도에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각 후 n-butanol로 처리하였다. n-butanol 처리완료 후 원침하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 측정하였다. Lipid peroxidation 측정은 553nm에서 빛흡수량에 의한 세포의 지질과산화 반응량을 측정하는 형광분석법이다.

7. XO/HX/TNF- α

한약추출물이 XO/HX/TNF- α 에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MCV값인 XO/HX 에 TNF- α 를 0.25~2.0 ng/ml까지 각각 혼합한 배양액에서 세포를 5시간동안 배양한 다음 이의 영향을 XTT assay에 의하여 조사하였다.

8. 통계 처리

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

실험성적

1. 산소자유기의 독성

1) 세포생존율 분석

(1) XTT 정량

XO가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 xanthine oxidase(XO)가 1mU/ml에서 60mU/ml까지의 각각의 농도로 포함된 培養液에서 5시간 동안 培養한 후 XO의 독성을 XTT assay법에 의하여 조사한 결과 1mU/ml XO 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 86.8%로 나타났으며 5mU/ml의 처리에서는 60.1%로 나타났다. 그러나 30, 60mU/ml XO를 처리한 경우 세포 생존율은 각각 49.1%(p<0.05)와 35.8 %(p<0.01)로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났다(Table 3, Fig. 1).

Table 3. Dose-dependency of xanthine oxidase (XO) in the cultured hippocampal cells

XO(mU/ml)	XTT absorbance (530nm)	Decrease rate of cell viability(%)
0	0.53 \pm 0.08	-
1	0.46 \pm 0.03	13.2
5	0.32 \pm 0.04	39.9
30	0.26 \pm 0.02*	50.9
60	0.19 \pm 0.01**	64.2

The cultured hippocampal cells were treated with various concentrations of xanthine oxidase (XO) for 5 hours. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. The significant differences from the control are marked with the asterisks. *p<0.05; **p<0.01

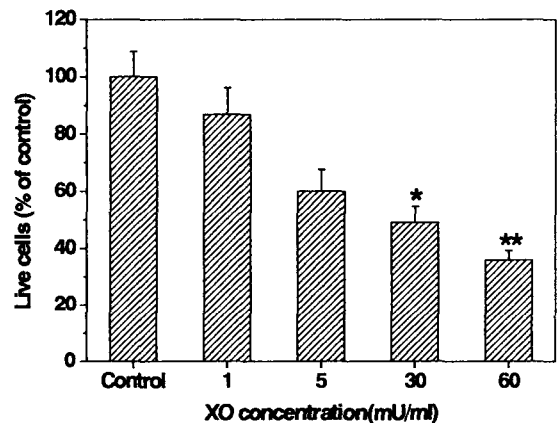


Fig. 1. Dose-dependency of xanthine oxidase (XO) in the cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 3. *p<0.05; **p<0.01

XO/HX가 시간에 따라 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30mU/ml XO/0.1mM HX가 포함된 培養液에서 海馬神經細胞를 각각 1~7시간 동안 培養한 후 세포의 생존율을 XTT assay법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 특히 5시간, 7시간에서는 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Table 4, Fig. 2).

Table 4. Time-response relationships of xanthine oxidase (XO) in the cultured hippocampal cells

XO/HX (mU/ml/mM)	XTT absorbance(530nm)			
	1 hr	3 hr	5 hr	7 hr
0	0.67±0.09	0.54±0.08	0.62±0.04	0.43±0.02
30	0.53±0.06	0.34±0.05	0.32±0.03*	0.10±0.01**

The cultured hippocampal cells were treated with various time intervals at a the concentration of 30mU/ml XO in 0.1mM HX. The values are the mean±SE for 6 experiments. The significant differences between groups are marked with the asterisks. *p<0.05; **p<0.01

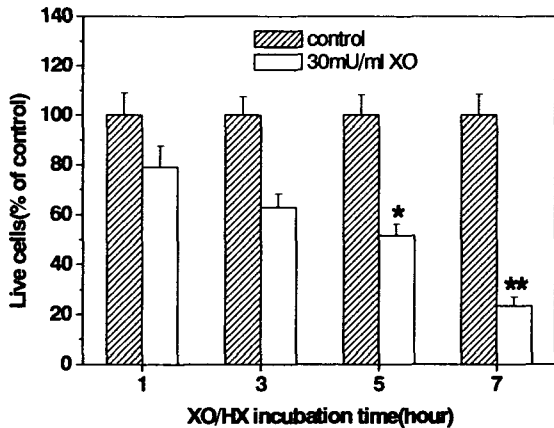


Fig. 2. Time-response relationship of xanthine oxidase (XO) in hypoxanthine (HX) on the cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 4. *p<0.05; **p<0.01

(2) INT 정량

XO가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 xanthine oxidase(XO)가 5mU/ml에서 40mU/ml까지의 각각의 농도로 포함된 培養液에서 5시간 동안 培養한 후 XO의 독성을 INT assay법에 의하여 조사한 결과 5mU/ml XO 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 80.4%로 나타났으며 10mU/ml의 처리에서는 73.9%로 나타났다. 그러나 20, 40mU/ml XO를 처리한 경우 세포 생존율은 각각 52.2%(p<0.05)와 43.5%(p<0.01)로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났다(Table 5, Fig. 3).

Table 5. Absorbance (% of control) at 202nm wavelength for the INT assay on xanthine oxidase (XO) in the cultured hippocampal cells.

XO(mU/ml)	INT absorbance (202nm)	Decrease rate of viability(%)
0	0.46±0.08	-
5	0.37±0.05	19.6
10	0.34±0.04	26.1
20	0.24±0.02*	47.8
40	0.20±0.03**	56.5

The cultured hippocampal cells were grown in the media containing various concentrations of xanthine oxidase (XO) for 5 hours. The values represent the mean±SE for 6 experiments. The significant differences from the control are marked with the asterisks. *p<0.05; **p<0.01

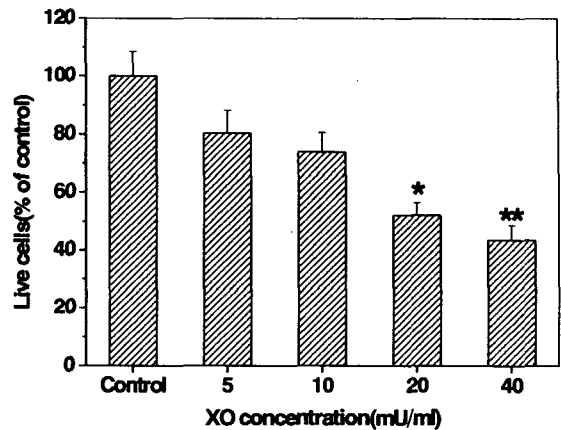


Fig. 3. Dose-response relationships of xanthine oxidase (XO) in the cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 5. *p<0.05; **p<0.01

XO/HX가 시간에 따라 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 20mU/ml XO/0.1mM HX가 포함된 培養液에서 海馬神經細胞를 각각 1~7시간 동안 培養한 후 세포의 생존율을 INT assay법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 특히 5시간 (p<0.05), 7시간(p<0.01)에서는 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Table 6, Fig. 4).

Table 6. Time-response relationships of xanthine oxidase (XO) in hypoxanthine (HX) by INT assay in the cultured hippocampal cells.

XO/HX (mU/ml/mM)	INT absorbance(202nm)			
	1 hr	3 hr	5 hr	7 hr
0	0.37±0.04	0.34±0.02	0.28±0.03	0.24±0.01
20	0.27±0.03	0.20±0.04	0.13±0.02*	0.10±0.01**

The cultured hippocampal cells were incubated with 20mU/ml xanthine oxidase (XO) in 0.1mM hypoxanthine (HX) for various time intervals. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with the asterisks. *p<0.05; **p<0.01

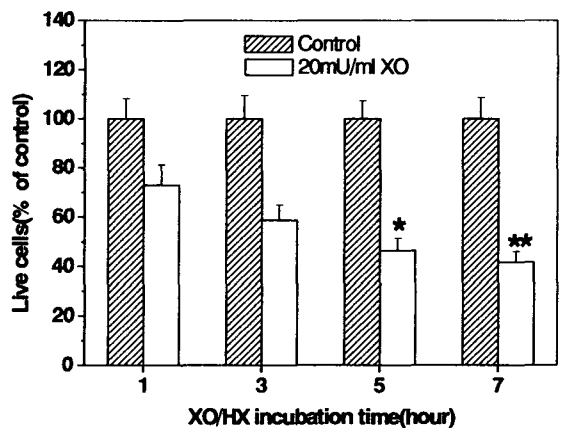


Fig. 4. Time-dependency of xanthine oxidase (XO) in hypoxanthine (HX) in the cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 6. *p<0.05; **p<0.01

2. 韓藥抽出物의 효과

1) 세포생존율에 대한 영향

(1) XO/HX/TNF-α의 독성

XO/HX/TNF-α가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 xanthine oxidase (XO)가 20mU/ml의 농도에서 TNF-α가 0.25ng/ml에서 2.0ng/ml까지 5시간 동안 처리한 후 XTT assay를 이용하여 세포생존율을 조사한 결과 처리한 농도에 비례하여 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 1.0 ng/ml, 2.0ng/ml의 TNF-α를 처리한 군에서는 세포 생존율은 대조군에 비하여 각각 54.2%(p<0.05)와 27.1%(p<0.01)로 유의하게 낮게 나타났다 (Table 7, Fig. 5).

Table 7. Dose-response relationships of XO/HX/TNF-α by XTT assay in the cultured hippocampal cells.

XO/HX(mU/ml/mM) /TNF-α(ng/ml)	XTT absorbance (530nm)	Decrease rate of cell viability(%)
20/0	0.48±0.06	
20/0.25	0.33±0.04	31.2
20/0.5	0.29±0.02	39.6
20/1.0	0.26±0.03*	45.8
20/2.0	0.13±0.01**	72.9

The cultured hippocampal cells were exposed to various concentrations of TNF-α in 20mU/ml XO/ 0.1mM HX for 5 hours. Cell viability was measured by XTT assay. The values are the mean±SE for 6 experiments. The significant differences from the control are marked with the asterisks. *p<0.05; **p<0.01

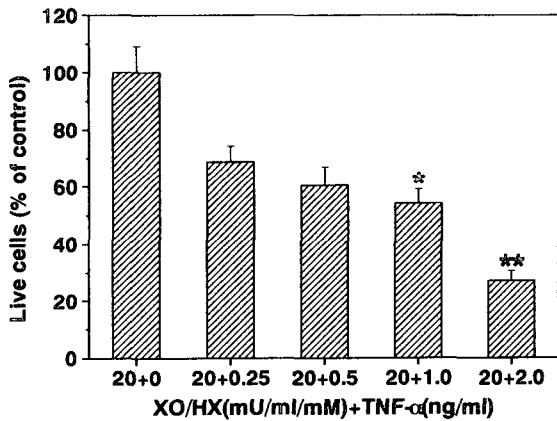


Fig. 5. Dose-dependency of XO/HX/TNF-α by XTT assay in the cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 7. *p<0.05; **p<0.01

(2) 地黃飲子和 加味地黃飲子 抽出液의 효과

① 地黃飲子の 효과

XO/HX/TNF-α에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 JHYJ의 효과를 세포생존율의 측면에서 조사하기 위하여 20mU/ml XO/HX/TNF-α 1.0ng/ml의 농도에서 培養 海馬神經細胞를 5시간 동안 노출시키기 3시간 전에 20~160μg/ml JHYJ가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 XTT assay법으로 조사하였다. 20μg/ml, 40μg/ml, 80μg/ml JHYJ를 처리한 경우 세포의 생존율은 JHYJ를 처리하지 않은 대조군(100%)에 비하여 각각 57.9%, 69.0%, 77.8%로 나타나 XO/HX/TNF-α을 처리한 군 52.8%에 비하여 세포의 생존율을 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 160μg/ml의 농도에서는 83.7%로(p<0.05) 유의한 증가를 나타냈다(Table 8, Fig. 6).

② 加味地黃飲子の 효과

XO/HX/TNF-α에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 GJHYJ의 효과를 세포생존율의 측면에서 조사하기 위하여 20mU/ml XO/HX/TNF-α 1.0ng/ml의 농도에서 培養 海馬神經細胞를 5시간 동안 노출시키기 3시간 전에 20~160μg/ml GJHYJ가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 XTT assay법으로 조사하였다. 20μg/ml, 40μg/ml GJHYJ를 처리한 경우 세포의 생존율은 GJHYJ를 처리하지 않은 대조군(100%)에 비하여 각각 62.7%, 72.9%로 나타나 XO/HX/TNF-α을 처리한 군 45.5%에 비하여 세포의 생존율을 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 80μg/ml, 160μg/ml의 GJHYJ의 농도에서는 각각 81.1%(p<0.05), 86.0%(p<0.01)로 유의한 증가를 나타냈다(Table 8, Fig. 6).

Table 8. Dose-response relationships of JHYJ and GJHYJ for their neuroprotective effects on XO/HX /TNF-α induced cell viabilities in the hippocampal cells.

Herb extract (μg/ml)	JHYJ		GJHYJ	
	XO/HX+TNF-α 20/0	XO/HX+TNF-α 20/1	XO/HX+TNF-α 20/0	XO/HX+TNF-α 20/1
Control	0.36±0.02	0.19±0.02	0.44±0.03	0.20±0.01
20	0.38±0.04	0.22±0.03	0.51±0.05	0.32±0.04
40	0.42±0.03	0.29±0.05	0.48±0.04	0.35±0.03
80	0.45±0.05	0.35±0.04	0.53±0.06	0.43±0.05*
160	0.49±0.07	0.41±0.06*	0.57±0.05	0.49±0.07**

The cultured hippocampal cells were preincubated with various concentrations of JHYJ and GJHYJ for 3 hours, and then exposed to various concentrations of TNF-α in 20mU/ml XO/ 0.1mM HX for 5 hours. Cell viabilities were measured by XTT assay. The values represent the mean±SE for 6 experiments. The significant differences between groups are marked with the asterisks. **p<0.01

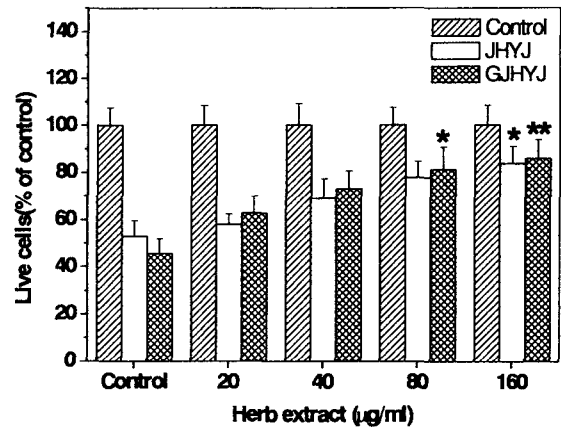


Fig. 6. Dose-response relationships of JHYJ and GJHYJ for their neuroprotective effects on XO/HX /TNF-α induced cell viabilities in the hippocampal cells. Other legends are the same as table 8. *p<0.05; **p<0.01

2) DNA synthesis 정량

(1) XO/HX의 영향

XO/HX가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 DNA 합성량을 이용하여 조사하기 위하여 XO/HX가 5mU/ml~50mU/ml의 농도까지 5시간 동안 처리한 후 DNA 합성량을 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 세포의 DNA 합성량이 감소하

였으며 특히 35mU/ml, 50mU/ml의 농도에서는 대조군에 비하여 각각 49.4%(p<0.05)와 33.6%(p<0.01)로 유의하게 감소하였다 (Table 9, Fig. 7).

Table 9. Dose-response relationships of XO/HX on DNA syntheses in the cultured hippocampal cells

XO/HX(mU/ml/mM)	Decrease rate of DNA viability(%)
0	-
5	23.7
20	36.4
35	51.6*
50	66.4**

The cultured hippocampal cells were treated with various concentrations of xanthine oxidase (XO) in 0.1mM hypoxanthine (HX) for 5 hours. DNA syntheses were measured as "material method". The values are the mean±SE for 6 experiments. The significant differences from the control are marked with the asterisks *p<0.05; **p<0.01

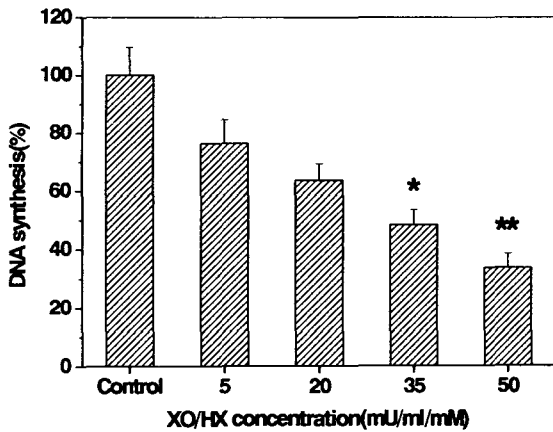


Fig. 7. Dose-response relationships of XO/HX on DNA syntheses in the cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 9. *p<0.05; **p<0.01

(2) 地黃飲子와 加味地黃飲子 抽出液의 효과

① 地黃飲子の 효과

XO/HX에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 JHYJ의 효과를 DNA 합성량의 측면에서 조사하기 위하여 35mU/ml XO/HX의 농도에서 培養 海馬神經細胞를 5시간 동안 노출시키기 3시간 전에 40~100µg/ml JHYJ가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 DNA 합성량의 측면에서 조사하였다. 40µg/ml, 60µg/ml, 80µg/ml JHYJ를 처리한 경우 세포의 생존율은 JHYJ를 처리하지 않은 대조군(100%)에 비하여 각각 76.5%, 112.4%, 117.5%로 나타나 XO/HX를 단독 처리한 군 59.4%에 비하여 세포의 생존율을 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 100µg/ml의 농도에서는 127.3%(p<0.05)로 유의한 증가를 나타냈다 (Table 10, Fig. 8).

② 加味地黃飲子の 효과

XO/HX에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 GJHYJ의 효과를 세포생존율의 측면에서 조사하기 위하여 35mU/ml XO/HX의 농도에서 培養 海馬神經細胞를 5시간 동안 노출시키기 3시간 전에 40~100µg/ml GJHYJ가 각각 포함된 培養液에서

전처리한 후 이의 방어효과를 DNA 합성량의 측면에서 조사하였다. 40µg/ml, 60µg/ml GJHYJ를 처리한 경우 세포의 생존율은 JHYJ를 처리하지 않은 대조군(100%)에 비하여 각각 86.7%, 118.7%로 나타나 XO/HX를 단독 처리한 군 65.3%에 비하여 세포의 생존율을 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 80µg/ml, 100µg/ml의 GJHYJ의 농도에서는 각각 125.7%(p<0.05), 131.7%(p<0.01)로 유의한 증가를 나타냈다 (Table 10, Fig. 8).

Table 10. Dose-response relationships of JHYJ and GJHYJ for its neuroprotective effects on DNA syntheses in hippocampal cells

Herb extract (µg/ml)	DNA synthesis(% of control)			
	JHYJ		GJHYJ	
	XO/HX 0 mU/ml/mM	XO/HX 35 mU/ml/mM	XO/HX 0 mU/ml/mM	XO/HX 35 mU/ml/mM
Control	100	59.4±6.8	100	65.3±7.2
40	100	76.5±5.3	100	86.7±6.5
60	100	112.4±9.1*	100	118.7±10.6
80	100	117.5±11.4*	100	125.7±11.8*
100	100	127.3±9.5**	100	131.7±1.9**

The cultured hippocampal cells were treated with 40, 60, 80 and 120 µg/ml concentration of JHYJ and GJHYJ for 3 hours, after then the cultures were exposed to 35mU/ml xanthine oxidase (XO) in 0.1mM hypoxanthine (HX) for 5 hours. DNA syntheses were measured as "material method". The values are the mean±SE for 6 experiments. The significant differences from the control are marked with the asterisks *p<0.05

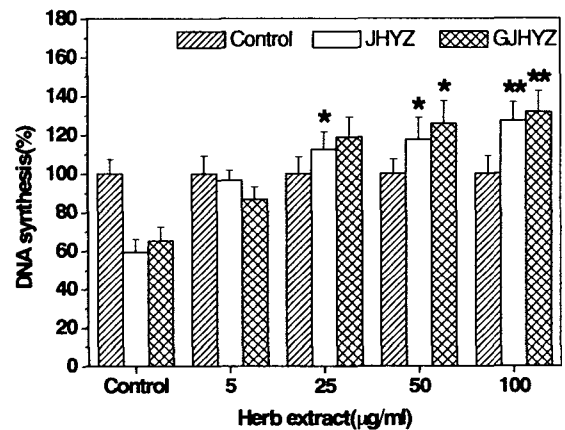


Fig 8. Dose-response relationships of JHYJ and GJHYJ for their neuroprotective effects on DNA synthesis in the hippocampal cells. Other legends are the same as Table 10. The significant differences between groups are marked with the asterisks *p<0.05; **p<0.01

3) Neurofilament 정량

(1) XO/HX의 영향

XO/HX가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 neurofilament의 양적변화 측면에서 조사하기 위하여 xanthine oxidase (XO)가 5mU/ml~30mU/ml의 농도까지 5시간 동안 처리한 후 신경세사의 양을 neurofilament enzymeimmuno assay를 이용하여 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 세포의 신경세사의 양이 감소하였으며 특히 25mU/ml, 35mU/ml의 농도에서는 대조군에 비하여 각각 53.2%(p<0.05)와 32.5%(p<0.01)로 유의하게 감소하였다 (Table 11, Fig. 9).

Table 11. Dose-response relationships of xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine (HX) by the neurofilament enzymeimmuno assay (EIA) in the cultured hippocampal cells

XO(mU/ml)	EI absorbance(490nm)	Decrease of neurofilament(%)
0	1.54±0.18	-
5	1.14±0.13	26.0
15	1.04±0.11	32.5
25	0.82±0.06*	46.8
35	0.50±0.03**	67.5

The cultured hippocampal cells were exposed to various concentrations of xanthine oxidase(XO) in 0.1mM hypoxanthine(HX) for 5 hours. Amount of neurofilaments were measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values are the mean±SE for 6 experiments. The significant differences from the control are marked with the asterisks. *p<0.05 **p<0.01

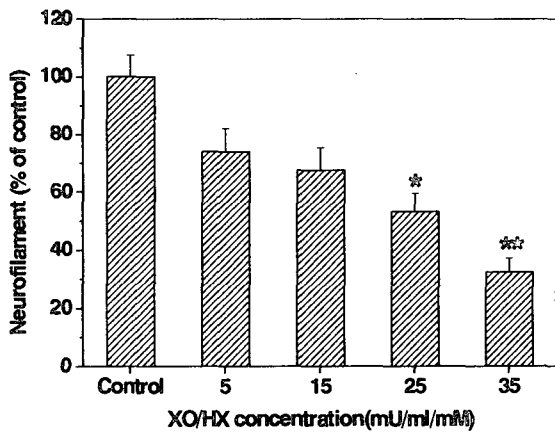


Fig. 9. Dose-dependency of xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine (HX) in the cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 11. The significant differences between groups are marked with the asterisks *p<0.05. **p<0.01

(2) 地黃飲子와 加味地黃飲子 抽出液의 효과

① 地黃飲子の 효과

XO/HX에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 JHYJ의 효과를 neurofilament의 양적변화 측면에서 조사하기 위하여 25mU/ml XO/HX의 농도에서 培養 海馬神經細胞를 5시간 동안 노출시키기 3시간 전에 25~200µg/ml JHYJ가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 neurofilament enzymeimmuno assay를 이용하여 조사하였다. 25µg/ml, 50µg/ml JHYJ를 처리한 경우 신경세사의 양은 JHYJ를 처리하지 않은 대조군(100%)에 비하여 각각 58.0%, 63.0%로 나타나 XO/HX를 단독 처리한 군 52.6%에 비하여 신경세사의 양을 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 100µg/ml, 200µg/ml의 농도에서는 각각 71.0%(p<0.05), 78.0%(p<0.05)로 유의한 증가를 나타냈다(Table 12, Fig. 10).

② 加味地黃飲子の 효과

XO/HX에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 GJHYJ의 효과를 neurofilament의 양적변화 측면에서 조사하기 위하여 25mU/ml XO/HX의 농도에서 培養 海馬神經細胞를 5시간 동안 노출시키기 3시간 전에 25~200µg/ml GJHYJ가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 neurofilament enzymeimmuno assay를 이용하여 조사하였다.

GJHYJ를 전처리한 농도에 비례하여 신경세사의 양이 증가하여 방어효과를 나타냈으며 특히 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml GJHYJ를 처리한 경우 신경세사의 양이 GJHYJ를 처리하지 않은 대조군(63.0%)에 비하여 각각 78.0%(p<0.05), 82.0%(p<0.01), 92.0%(p<0.01)로 나타나 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다 (Table 12, Fig. 10).

Table 12. Dose-response relationships of JHYJ and GJHYJ for their neuroprotective effects on xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine (HX) in the neurofilaments.

Herb extract (µg/ml)	EI absorbance(490nm)			
	JHYJ		GJHYJ	
	XO/HX 0 mU/ml/mM	XO/HX 25 mU/ml/mM	XO/HX 0 mU/ml/mM	XO/HX 25 mU/ml/mM
Control	1.37±0.15	0.72±0.08	1.27±0.15	0.80±0.06
25	1.38±0.12	0.80±0.06	1.29±0.13	0.87±0.07
50	1.42±0.14	0.90±0.09	1.34±0.14	1.05±0.09*
100	1.46±0.15	1.04±0.13*	1.37±0.16	1.13±0.13**
200	1.48±0.13	1.16±0.18*	1.42±0.13	1.30±0.15**

The cultured hippocampal cells were preincubated with JHYJ and GJHYJ for 3 hours respectively. After then cultures were exposed to 25mU/ml xanthine oxidase(XO) and 0.1mM hypoxanthine(HX) for 5 hours. Amount of neurofilaments were measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values are the mean±SE for 6 experiments. The significant differences from the control are marked with the asterisks. *p<0.05 **p<0.01

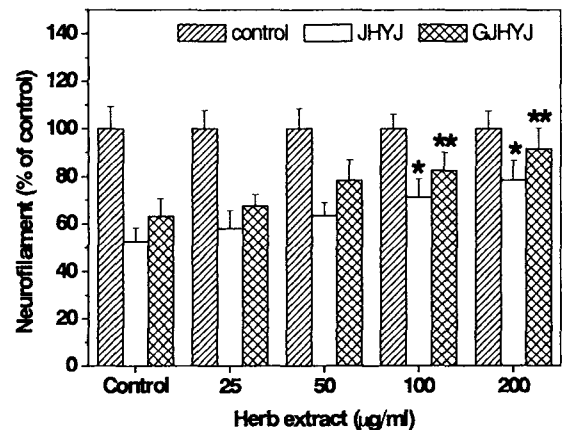


Fig. 10 Dose-response relationships of JHYJ and GJHYJ for their neuroprotective effects on xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine (HX) in the neurofilaments. Other legends are the same as Table 12. The significant differences from the control are marked with the asterisks *p<0.05; **p<0.01

4) Lipid peroxidation 정량

(1) XO/HX의 영향

XO/HX가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 lipid peroxidation의 양적변화 측면에서 조사하기 위하여 xanthine oxidase(XO)가 10mU/ml~80mU/ml의 농도까지 5시간 동안 처리한 후 신경세사의 양을 TBARS assay를 이용하여 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 세포생존율이 감소하였으며, 특히 20mU/ml, 40mU/ml, 80mU/ml의 농도에서는 대조군에 비하여 각각 73.7%(p<0.05), 43.2%(p<0.05), 12.1%(p<0.01)로 유의하게 감소하였다(Table 13, Fig. 11).

Table 13. Dose-response relationships of xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine (HX) on the lipid peroxidation in the cultured hippocampal cells

XO/HX(mU/ml/mM)	TBARS(pmol/10 ⁶ cells)	Decrease rate of cell viability (% of control)
0	43.7±5.6	-
10	50.1±6.7	14.6
20	55.2±5.8*	26.3
40	68.5±7.2*	56.8
80	82.1±7.9**	87.9

The cultured hippocampal cells were exposed to various concentrations of xanthine oxidase (XO) in 0.1mM hypoxanthine (HX) for 5 hours. Thiobarbituric acid (TBA) fluorometric assay was adopted to analyse lipid peroxidation and TBA reactive substances(TBARS) were represented as pmol/10⁶ cells. The values are the mean±SE for 6 experiments. The significant differences from the control are marked with the asterisks. *p<0.05; **p<0.01

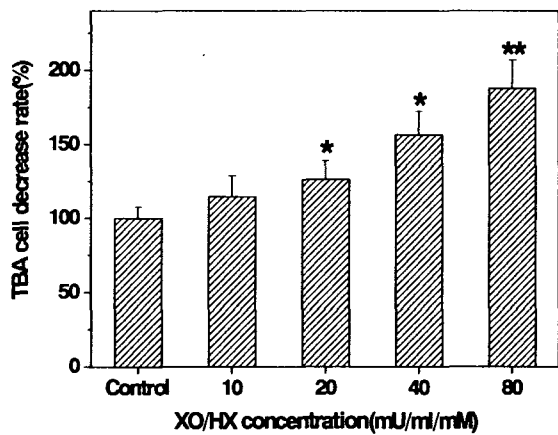


Fig. 11. Dose-response relationships of xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine (HX) on the lipid peroxidation in the cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 13. Significant differences from the control are marked with the asterisks *p<0.05; **p<0.01

(2) 地黃飲자와 加味地黃飲자의 효과

① 地黃飲자의 효과

XO/HX에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 JHYJ의 효과를 세포생존율의 측면에서 조사하기 위하여 40mU/ml XO/HX의 농도에서 培養 海馬神經細胞를 5시간 동안 노출시키기 3시간 전에 20~100µg/ml JHYJ가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 TBARS assay법으로 조사하였다. 20 µg/ml, 40µg/ml, 80µg/ml JHYJ를 처리한 경우 TBARS의 양은 JHYJ를 처리하지 않은 대조군(100%)에 비하여 각각 173.0%, 168.4%, 164.2%로 나타나 XO/HX를 단독 처리한 군 180.0%에 비하여 TBARS의 양을 감소시키는 것으로 나타났다. 특히 100µg/ml의 농도에서는 147.8%(p<0.05)로 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Table 14, Fig. 12).

② 加味地黃飲자의 효과

XO/HX에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 GJHYJ의 효과를 세포생존율의 측면에서 조사하기 위하여 40mU/ml XO/HX의 농도에서 培養 海馬神經細胞를 5시간 동안 노출시키기 3시간 전에 20~100µg/ml GJHYJ가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 TBARS assay법으로 조사하였다. 20µg/ml, 40µg/ml GJHYJ를 처리한 경우 TBARS의 양은 GJHYJ

를 처리하지 않은 대조군(100%)에 비하여 각각 163.7%, 157.9%로 나타나 XO/HX를 단독 처리한 군 169.5%에 비하여 TBARS의 양이 감소하여 세포의 생존율을 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 80µg/ml, 100µg/ml의 GJHYJ의 농도에서는 각각 151.3%(p<0.05), 137.2%(p<0.01)로 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다 (Table 14, Fig. 12).

Table 14. Dose-response relationships of JHYJ and GJHYJ for their neuroprotective effects on xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine (HX) in the lipid peroxidation

Herb extract (µg/ml)	TBARS(pmol/10 ⁶ cells)			
	JHYJ		GJHYJ	
	XO/HX 0 mU/ml/mM	XO/HX 40 mU/ml/mM	XO/HX 0 mU/ml/mM	XO/HX 40 mU/ml/mM
Control	52.3±4.8	94.0±8.4	42.8±6.3	72.3±6.9
20	50.4±6.3	87.0±7.5	41.2±5.8	67.1±5.8
40	48.6±5.7	81.6±6.6	36.9±2.7	57.8±4.7
80	45.3±6.7	74.2±7.1	33.7±4.4	51.0±6.3*
100	42.7±3.2	62.9±5.8**	31.4±2.6	43.0±3.6**

Cultured hippocampal cells were treated with 20, 40, 80 and 100 µg/ml JHYJ and GJHYJ respectively. The cultures were preincubated with JHYJ and GJHYJ for 3 hours respectively. After then the cultures were exposed to 40mU/ml xanthine oxidase (XO) in 0.1mM hypoxanthine (HX) for 5 hours. TBA reactive substances (TBARS) were represented as pmol/10⁶ cells. The significant differences from the control are marked with the asterisks. *p<0.05; **p<0.01

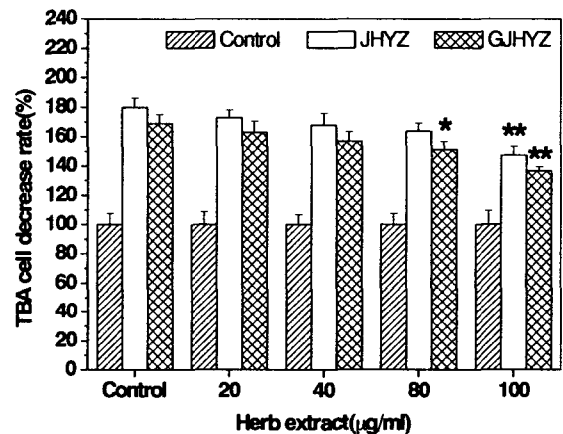


Fig. 12. Dose-response relationships of JHYJ and GJHYJ for their neuroprotective effects on xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine (HX) in lipid peroxidation. Other legends are same as the Table 14. The significant differences from the control are marked with the asterisks. *p<0.05; **p<0.01

고찰

최근 들어 한국사회도 평균수명의 연장에 따른 노인 인구의 증가로 고령화 사회로 접어들게 됨에 따라 老化에 併發하는 만성 퇴행성 질병들이 급증하고 있어 사회적 문제로 대두되고 있다¹⁵⁾. 한의학에서는 인간의 壽命을 대략 100에서 120歲로 보고 있으며, 內經(靈樞·天年篇)⁶⁾에 “……六十歲 心氣始衰故憂悲,七十歲 脾氣虛……,八十歲 肺氣虛 魄離 故言善誤,九十歲 腎氣焦……,百歲 五臟皆虛 神氣皆去 形骸獨居而終矣”라고 老化의 過程을 五臟衰弱과 연관시켜 說明하였다. 아울러 한의학에서 腦는 奇恒之府의 하나로 腎과 매우 밀접한

관계를 가지고 있다 하였으니¹⁶⁾, 나이가 들어 老化가 진행됨에 따라 腎氣가 점차 衰하여 陰精이 虧損하게 되면 腎精이 결핍되어 腦에 上衝하지 못해 髓海가 空虛해지게 되어 頭痛이나 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘 등의 증상과 함께 심하면 知能低下, 痴呆 등을 발생하게 된다 하였다¹⁷⁾. 老化의 원인은 다양한 가설들이 존재하는데 이는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았기 때문이다. 현재까지 알려진 老化에 대한 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 발생하는 error 과멸설(error-catastrophe theory)과 생리과정 중 발생하는 post-translation modifications 등으로 나누며 유전자설은 예정설, DNA복제상에 나타나는 체세포 돌연변이설(somatic mutation theory)과 프로그램설(programmed aging theory) 등이 있다¹⁸⁾. 이 중 가장 알려진 學說은 自由基說(free radical theory)로 최근 이를 뒷받침하는 증거들이 많이 나오고 있어 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다¹⁹⁾. 老化의 대표적인 질환으로 痴呆를 들 수 있는데, 痴呆는 意識이 清明한 狀態에서 全般的인 認知機能의 障礙를 나타내는 疾患으로 보통 慢性, 또는 進行性 腦疾患에 의해 발생되며 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 障礙가 나타나는 症候群이다¹⁹⁾. 한의학에서 痴呆는 明代 張²⁰⁾의 《景岳全書·雜證謨》 癡狂篇에서 처음으로 ‘痴狀’이라고記載되어 있으며, 清代 陳²¹⁾에 의해 西洋醫學에서 말하는 痴呆의 概念과 유사한 뜻으로 상세하게 기술하였다. 地黃飲子は 八味丸에서 山藥, 澤瀉, 牡丹皮를 去하고 巴戟, 肉蓯蓉, 石斛, 遠志, 五味子, 麥門冬, 石菖蒲를 加味한 方劑로²²⁾, 下元의 腎水가 虛衰하여 虛陽이 上浮해서 痰濁이 上으로 泛迫하여 竅道를 壅塞하므로 下厥上冒한 中風 舌瘖 足廢 腎虛弱 其氣厥不至舌下를 治療하는 手足少陰太陰厥陰藥이다^{12,23)}. 地黃飲子 本方에 加味한 藥材를 考察해보면, 龍骨은 甘·澀·平하여 平肝潛陽·鎮驚固澀·鎮心安神하고, 牡蠣은 鹹·澀·涼하여 潛陽固澀·軟堅散結하고, 枸杞子는 甘·平하여 滋補肝腎·益精明目하므로^{24,25)}, 老化에 따른 平肝潛陽, 補肝腎의 效능을 강화할 목적으로 본 藥材를 加味하였다.

최근 抗酸化作用에 관한 연구를 살펴보면 백²⁶⁾ 등은 綠茶로부터 分離된 epicatechin 3-O-gallate의 抗酸化作用기전에 관하여, 李²⁷⁾ 등은 浮萍草의 化學成分 및 抗酸化效果에 관한 연구를 하였으며, 蘇²⁸⁾는 鹿蔘地黃湯을, 崔²⁹⁾는 定志丸을, 尹³⁰⁾ 등은 左歸飲과 右歸飲을 利用하여 腦內에서의 抗酸化作用에 관한 보고를 하였다. 그 외 한의학에서 腦에 관한 연구로는, 黃³¹⁾과 姜³²⁾는 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²⁹⁾ 등은 麝香이 損傷된 생쥐 腦組織에 대한 保護作用을, 崔³³⁾ 등은 七福飲, 七福飲加石菖蒲, 石菖蒲 抽出液이 GO에 의하여 誘發된 毒性에 대한 防禦 효과가 있음을 보고하였고, 이외에도 다수의 연구보고가 발표된 바 있다. 서양의학에서 인간의 高位精神機能은 大뇌피질의 神經細胞活動으로 나온다고 인식하는데, 즉 腦가 인간활동의 全領域을 통괄하는 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의인 精神世界까지도 담당하는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. 특히 海馬는 大뇌변연계에서 기억의 중요한 역할을 담당하며, 기억은 학습의 결과 얻어진 지식을 그대로 보유하여 저장하는 과정으로, 감각과 운동 등을 되풀이하여, 그것을 마음속에 아로 새겨두었다가 이것을 다시 되새기는 능력을 말한다³⁵⁾. 실제로 동물실험에서 해마를 손상시키면 자극들간의 관계를 기억해야 하는 과제에서 수행에 결함을 보이는 것으로 보고되고 있어 학습의 인지 및 기억 등에 해마 신경세포가 매우 밀접하게 관여하는 것으로 알려져 있다³⁶⁾. 腦의 병리변화로는 심한 彌滿性 腦萎縮과 腦神經細胞의 消失 등 器質的 變成과 腦의 各種 神經傳達物質의 減少 등 생화학적 변화를 초래함으로써 記憶力과 知能低下 등 高等精神活動에 장애를 일으키는데 이는 인간의 老化로 인한 腦의 退行性 疾患과 불가분의 관계를 가지고 있다³⁷⁾. 특히, 인간의 腦에 산소와 포도당의 공급이 제한 받게 되면 뇌조직은 非可逆的 손상을 입게 되는데, 이를 치료하는데 있어 최근에는 神經組織의 산소 및 포도당 요구량을 減少시켜 自由基의 生成을 차단하거나 自由基를 제거하는 藥物에 대한 研究가 進行 중이다^{38,40)}. 自由基는 最외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것으로서 이러한 특수구조 때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러 가지 병태 생리적인 반응에 관여하고 있으며⁴¹⁾, 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시키는데⁴²⁾, 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, EAAs)의 분비를 촉진시키고, 세포내 Ca⁺⁺의 농도를 增加시켜 결국 세포의 死滅을 초래하며⁴³⁾, 中樞나 末梢神經系를 구성하고 있는 神經細胞에 酸化的 損傷을 유발함으로써 老人性 痴呆나 파킨슨씨병을 비롯하여 腦虛血이나 腦卒中 등과 같은 각종 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 機轉究明과 關聯 疾患에 대한 治療的 接近이 활발하게 연구되고 있다^{44,45)}. 酸素自由基와 中樞神經損傷과의 관계에 대한 최근의 연구보고는 근위측성측삭경화증(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 과다하게 축적되어 결국 神經細胞에 酸化的 損傷을 주는 것으로 밝혀지면서⁴⁶⁾ 酸素自由基가 많은 神經病變에 관여하고 있음이 증명되어 酸素自由基의 毒性現象에 대한 機轉糾明과 酸素自由基에 의하여 유발되는 疾患에 대한 治療的 접근을 위하여 국내외 많은 학자들이 동물을 대상으로 꾸준히 연구를 진행하여 왔다⁴⁷⁾. 최근에 酸素自由基의 酸化的 損傷에 대하여 한약재의 抽出物이나 동물에서 정제한 天然抽出物들이 강력한 항산화작용을 나타낸다는 실험결과들이 보고되고 있다^{26,44)}. 더욱이 근래에 細胞培養技術이 널리 보급되면서 실험 목적에 적합한 세포종을 培養하여 病變의 모델을 만든 다음 각종 치료제, 韓藥抽出物이나 天然抽出物들을 처리함으로써 병변의 치료에 새로운 접근을 시도하고 있다. 따라서 培養細胞를 이용한 시험관내 실험은 培養細胞가 생체내와 같이 형태학적 특징은 물론 생리나 生化學的 性質을 그대로 가지고 있어 각종 약제의

효능이나 毒物質의 안전성 검색 등에 매우 적합한 실험방법으로 되고 있다. 최근에는 면역세포화학염색법이 발달하게 되자 이를 이용하여 순수한 세포종의 판별과 이의 순수 培養이 가능하게 되면서 培養細胞를 재료로 한 실험은 시험관내의 매우 적합한 분석도구로 되었다. 酸素自由基의 신경독성을 조사하기 위하여 본 실험에서는 순수분리 배양한 생쥐의 海馬神經細胞에 여러 농도의 XO/HX에 노출시킨 후 XTT assay와 INT assay법을 시행한 결과 XO/HX를 배양 신경세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 대조군에 비하여 세포생존율의 유의한 감소를 보였다. 특히, XTT assay에 있어서 30, 60mU/ml XO를 처리한 경우에서 세포 생존율은 각각 49.1%($p<0.05$)와 35.8 %($p<0.01$)로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났고(Table 3, Fig. 1), 30mU/ml XO/0.1mM HX의 세포생존율 분석에서는 대조군과 비교하여 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며, 특히 5시간, 7시간에서는 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Table 4, Fig. 2). XO와 XO/HX의 독성을 INT assay법에 의하여 조사한 결과는 20, 40mU/ml XO를 처리한 경우 세포 생존율은 각각 52.2%($p<0.05$)와 43.5 %($p<0.01$)로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났으며(Table 5, Fig. 3), 20mU/ml XO/0.1mM HX 처리 후 대조군과 비교 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며, 특히 5시간($p<0.05$), 7시간($p<0.01$)에서는 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Table 6, Fig. 4). 本實驗의 이 같은 결과는 XO/HX가 海馬神經細胞에 독성을 가지고 있음을 말하는 것이다. 따라서 이 같은 연구결과들은 酸素自由基의 산화적 손상이 신경독성에 관여하고 있음을 말해 주고 있다. 이러한 현상은 아마도 酸素自由基가 세포내 손상을 주어 그 결과 항산화효소의 酸素自由基의 제거 능력이 감소된 결과일 가능성이 클 것으로 생각된다. 이러한 가설의 증명의 하나로 xanthine oxidase(XO)를 신경세포에 처리한 후 SOD와 같은 항산화제로 처리한 결과 세포의 생존율이 크게 증가되었다는 많은 연구들이 보고된 바 있다^{5, 47}. TNF- α 는 염증반응에 있어 중요한 역할을 하는데 이는 주로 대식세포에서 분비되는 cytokine으로 최근에는 대식세포가 아닌 다른 종류의 세포에서도 분비된다는 보고가 있다⁴⁸. TNF- α 는 특정세포에 독성을 나타낸다는 것이 밝혀진 바 있으며, 특히 염증성질환에서 이의 발현이 매우 높다고 한다⁴⁹. 따라서 본 연구에서는 한약추출물이 XO/HX/TNF- α 에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 XO/HX의 MCV값인 20mU/ml XO/0.1mM HX에 TNF- α 가 0.25ng/ml에서 2.0ng/ml까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 5시간 동안 처리한 후, 이의 영향을 XTT assay에 의한 생존율 측면에서 조사하였다. 그 결과 TNF- α 의 처리 농도에 비례하여 세포의 생존율이 점점 감소하였으며 이때 MCV값은 20mU/ml XO/0.1mM HX/1.0ng/ml TNF- α 의 처리에서 나타났다(Table 7, Fig 5). 위와 같은 실험 결과는 TNF- α 가 세포독성을 가지고 있음을 말해주고 있으나⁴⁹, TNF- α 가 신경세포에서 직접 분비되는 지는 알 수 없었다. 한편, XO/HX/TNF- α 에 대한 한약추출물의 영향에 대한 조사를 위하여 XO/HX/TNF- α 의 MCV값인 20mU/ml XO/0.1mM HX/1.0ng/ml TNF- α 에서 신경세포를 5시간 동안 처리하기 3시간 전

에 20-160 μ g/ml JHYJ와 GJHYJ가 각각 포함된 배양액에서 배양 후 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 JHYJ나 GJHYJ를 처리한 경우 세포의 생존율이 20mU/ml XO/0.1mM HX만의 처리에 비하여 모두 증가하였으며, JHYJ의 경우 160 μ g/ml 처리에서는 XO/HX/TNF- α 만의 처리(52.8%)에 비하여 83.7%($p<0.05$)로서 약 1.6배 정도 유의하게 증가하였다. 또한 GJHYJ의 경우에서도 80 μ g/ml에서 세포생존율이 81.1%($p<0.05$), 160 μ g/ml에서는 86.0% ($p<0.01$)로 나타나 이는 XO/HX/TNF- α 만의 처리인 45.5%에 비하여 약 1.9배로 높게 증가하였다(Table 8, Fig. 6). 이는 JHYJ와 GJHYJ가 XO/HX/TNF- α 에 의한 독성을 방어하였음을 말해 주고 있다. DNA합성은 세포의 증식이나 분화를 비롯하여 DNA복제나 DNA손상에 대한 회복기전을 조사하는 지표로서 많이 활용하고 있다⁵⁰. 따라서 본 실험에서는 한약추출물인 JHYJ와 GJHYJ가 DNA합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 XO/HX가 DNA합성에 대한 영향을 조사하였다. 그 결과 XO/HX는 신경세포에 처리한 농도에 비례하여 DNA합성을 감소시켰다(Table 9, Fig 7). 이는 아마도 XO/HX의 산화적 손상이 DNA의 염기에 손상을 주었거나 또는 세포의 분화능을 저해한 결과일 것으로 생각된다¹⁰¹. 한편, XO/HX에 의한 DNA 합성억제에 대한 한약추출물의 영향에 있어서 JHYJ나 GJHYJ를 XO/HX에 노출시키기 3시간 전에 신경세포에 처리한 결과 DNA합성은 XO/HX만의 처리에 비하여 유의하게 증가하였다. 특히, JHYJ의 경우 100 μ g/ml의 농도에서 DNA의 합성율은 대조군에 비하여 127.3%($p<0.05$)로 유의하게 증가하였으며 GJHYJ의 경우도 80 μ g/ml와 100 μ g/ml의 농도에서 DNA합성율이 대조군에 비하여 각각 125.7%($p<0.05$)와 131.7%($p<0.05$)로 나타났으며 이는 XO/HX만의 처리에 비하여 모두 유의하게 증가하였다(Table 10, Fig 8). 본 실험의 이같은 결과는 아마도 한약추출물인 JHYJ와 GJHYJ가 XO/HX에 의한 DNA손상이나 또는 세포분화능의 저해로부터 방어하는 작용이 있는 것으로 생각된다⁵². XO/HX가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 neurofilament의 양적변화를 neurofilament enzymeimmuno assay를 이용하여 분석한 결과, 농도에 비례하여 세포의 신경세사의 양이 감소하였으며, 특히 25mU/ml, 35mU/ml의 농도에서는 대조군에 비하여 각각 53.2%($p<0.05$)와 32.5%($p<0.01$)로 유의하게 감소하였고(Table 11, Fig. 9), XO/HX에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 JHYJ와 GJHYJ의 방어효과는 JHYJ와 GJHYJ를 전처리한 농도에 비례하여 신경세사의 양이 증가하여 방어효과를 나타냈다. 특히 JHYJ와 GJHYJ이 100 μ g/ml, 200 μ g/ml의 농도에서 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다(Table 12, Fig. 10). XO/HX가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 lipid peroxidation의 양적변화 측면을 TBARS assay를 이용하여 조사한 결과에서도 처리한 농도에 비례하여 뚜렷한 세포생존율 감소를 보였다(Table 13, Fig. 11). 이 같은 결과는 酸素自由基가 세포막의 인지질과 작용하여 막손상을 초래한 결과로서 결국 세포의 퇴화나 사멸을 일으키게 된다⁵³. 한편, XO/HX에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 JHYJ와 GJHYJ의 방어효과를 TBARS assay법으로 조사한 결과, JHYJ와 GJHYJ를 전처리한 농도에 비례하여 TBARS의 양을 감소

시키는 것으로 나타났다(Table 14, Fig. 12). 本實驗에서 XO/HX 를 생쥐의 培養 海馬神經細胞에 노출시킨 후, XTT assay법, INT assay법 및 DNA synthesis법으로 분석한 결과, XO/HX는 處理 농도와 시간에 비례하여 細胞의 生存率을 현저하게 감소시켰다. 이 같은 결과는 酸素自由基가 培養 생쥐의 척수신경절세포에, 소의 배양 희소돌기아교세포에 각각 毒性을 나타냈다는 실험 결과와 일치하였다⁵⁴). 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 海馬神經細胞에 독성을 나타낸 것은 XO/HX가 항산화계에 손상을 줌으로써 항산화효소의 活性減少를 초래했거나 또는 酸素自由基 중 superoxide와 같은 환원제가 세포내 Fe³⁺와 상호작용하여 毒性을 나타냈을 가능성도 배제할 수는 없지만, 본 실험의 XTT assay법과 INT assay법을 비롯하여 lipid peroxidation 정량분석이나 neurofilament EIA, DNA 합성량 분석의 결과를 볼 때 XO/HX는 세포막의 지질과산화반응의 촉진을 비롯하여 neurofilament의 손상, 세포막의 손상 및 단백질합성의 억제에 의한 것으로 생각된다⁵⁵). 이와 같은 실험 결과를 종합해보면, XO/HX와 같은 酸素自由基는 酸化的 損傷에 의해 細胞 生存率을 減少시키고 神經細胞에 대하여 毒性을 나타내며, 이에 대한 地黃飲子(JHYJ) 및 加味地黃飲子(GJHYJ)의 投與가 大腦海馬神經細胞에서 neurofilament의 量的 증가, lipid peroxidation의 감소 및 DNA 합성량 증가를 보여주는 결과로 미루어 볼 때 地黃飲子 및 加味地黃飲子は 海馬神經細胞의 老化를 抑制하고 海馬에서 담당하는 기억을 유지하여 腦의 退行性 疾患 및 痴呆 治療에 일정한 藥理的 효과가 있을 것으로 추정된다.

결 론

신생 생쥐에서 분리 배양한 海馬神經細胞에 대한 xanthine oxidase/ hypoxanthine(XO/HX)의 酸化的 損傷에 의한 毒性을 糾明하고 이 毒性에 대한 地黃飲子 및 加味地黃飲子 抽出液의 효과를 측정 한 결과, 酸素自由基인 XO/HX는 XTT assay와 INT assay에서 培養 海馬神經細胞에 毒性을 나타내어 細胞生存率을 감소시켰고, 地黃飲子(JHYJ)와 加味地黃飲子(GJHYJ)는 XO/HX/TNF- α 에 의해 손상된 培養 海馬神經細胞에 대해 細胞生存率을 유의성 있게 증가시켰으며, DNA 합성율을 유의성 있게 증가시켰고, 신경세포를 유의성있게 증가시켰다. 또 지질과산화반응(lipid peroxidation)에 유의성 있는 억제를 보였다.

이상의 實驗結果, 地黃飲자와 加味地黃飲子は 培養 海馬腦神經細胞에 대해 XO/HX와 같은 酸素自由基의 酸化的 損傷에 대한 防禦作用이 있어 腦細胞의 老化 豫防 및 治療에 대해 效果的으로 活用할 수 있을 것으로 사료되며, 向後 이에 대한 臨床的인 研究가 보완되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 조유향 : 노인보건, 서울, 현문사, pp.43-49, 1995.

2. 이철완 : 이철완교수의 노인병 연구, 서울, 일지사, pp. 130-150, 1997.

3. 김승업 : 치매, 알츠하이머병, 서울, 삼과 꿈, pp.53-54, 57-62, 87-94, 1997.

4. 徐舜圭 : 成人病 老人病學, 서울, 高麗醫學, pp.10-13, 225-228, 1992.

5. Difazio MC. Hollingsworth Z. Young AB. Penny JB : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. Neurology., 42:402, 1992.

6. 楊維傑編 : 內經靈樞譯解, 서울, 大成文化社, pp.394-399, 1990.

7. 楊維傑編 : 內經素問譯解, 서울, 大成文化社, pp.1-12, 1990.

8. 李聰甫 主編 : 傳統老年醫學, 中國, 湖南科學技術出版社, p3, 174, 1988.

9. 劉完素 : 宣明論方, <中國醫學大系> 圖書出版鼎談 p.745, 750, 1990.

10. 許浚 原著 : 東醫寶鑑 雜病篇, 서울, 大星文化社, p.65, 1992.

11. 謝觀 : 동양의학대사전, 서울, 고문사, p.251, 1993.

12. 姜敏수 외 ; 방제학, 서울, 계축문화사, p.133, 1992.

13. 洪律憲 : 地黃飲子가 흰쥐의 血栓症에 미치는 影響에 관한 研究, 東國大學校大學院, 1991

14. 서경석 외 : 오자지황음자가 노화백서의 혈액 변화와 혈청·뇌조직의 항산화활성에 미치는 영향, 東醫神經精神科學會誌, 10(1):79-93, 1999.

15. 의학교육연수원 편저 : 노인의학, 서울, 서울대학교출판부, p.3, 7, 9, 10, 14, 22, 27, 595, pp.29-31, 1997.

16. 金完熙外 編著 : 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, p.47, 1985.

17. 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.

18. 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.

19. 배영철외 : 老人醫學, 서울, 高麗醫學, pp.193-209, 1996.

20. 張介賓 : 景岳全書, 上海, 上海科學技術出版社, pp.573-578, 1985.

21. 陳士鐸 : 辨證錄, 서울, 醫聖堂, pp.241-246, 1989.

22. 윤용갑 : 東醫方劑와 處方解說, 서울, 도서출판의성당, pp.373-374, 1998.

23. 채인식 외 : 國譯醫方集解, 서울, 대성문화사, pp.297-299, 1992.

24. 康秉秀·金永坂 : 臨床配合本草學, 서울, 永林社, 134, 135, 144, 158 159, 173, 180, 193, 203, 309, 339, 540, 668, 672, 1994.

25. 王筠默·王恒芬 輯著 : 神農本草經校証, 吉林, 吉林科學技術出版社, pp. 140-144, p.150, 184, 219, 256, 305, 377, 490, 1973.

26. 백봉숙 외 : 녹차로부터 분리된 Epicatechin 3-O-Gallate의 抗酸化作用 機轉에 관한 研究, 釜山大學校藥學研究誌,

- 29(2):49-56, 1995.
27. 이효은 외 : 浮萍草의 化學成分 및 抗酸化效果에 관한 研究, 釜山大學校 藥學研究誌, 29(2):29-39, 1995.
 28. 蘇敬順 외 : 鹿蔘地黃湯이 抗老化에 미치는 影響, 서울, 慶熙 韓醫大論文集, 18(2):127-148, 1995.
 29. 李保英 · 姜錫峯 : 麝香이 생쥐의 腦損傷에 미치는 影響, 서울, 大韓韓醫學會誌, 16(2):299-311, 1995.
 30. 尹哲浩 외 : 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.
 31. 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 관한 研究, 圓光大學校 大學院 博士 論文, 1997.
 32. 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.
 33. 최공한 · 강형원 · 유영수 : 七福飲加味方이 Glucose Oxidase 에 의해 손상된 大腦皮質神經細胞에 미치는 影響, 東醫神經 精神科學會誌, 10(1):53-78, 1999.
 34. 黃義完 외 : 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.
 35. 피터 두스 : 신경국소진단학, 서울, (주)과학서적센터, p.201, 1995.
 36. Fredholm BB, Jonzon B and Lindstrom K : Adenosine receptor mediated increases and decreases in cyclic AMP in hippocampal slices treated with forskolin. Acta Physiol Scand 117: 461-463, 1983.
 37. 지제근 : 치매(Dementia)의 병리, 大韓神經科學會誌, 3(1):5-9, 1985.
 38. 醫學教材研究院 : 藥物療法, 서울, 서울대학교출판부, pp.399-403, 1996.
 39. 대한신경외과학회 : 신경외과학, 서울, 중앙문화사, pp.276-279, 284- 285, p.299, 1997.
 40. 이광우 외: 임상 신경학, 서울, 고려의학, pp.394-399, 1997.
 41. 대한병리학회 편저 : 병리학, 서울, 고문사, pp. 36-40, 1990.
 42. 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.
 43. Zeman S, Lioyd 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.
 44. 成日煥 : 抗酸化作用에 대한 杜冲葉藥鍼의 實驗的 研究, 大田 大學校 大學院, 1997.
 45. Conradi S, Ronnevi L, Norris F : A myotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP (ed) : Human Motor Neuron Diseases. New York Raven Press pp.35-56, 1982.
 46. 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.
 47. Park ST, Mun YJ, Oh JM, Kim JJ, Choi MK, Shim JH, Lim KT, Chung YT : Effect of iron-chelator by oxygen radicals in culture oligodendrocytes. Korean J Phys Anthropol., 9:189-195, 1996.
 48. Yan SD, Huang CC : The role of tumor necrosis factor alpha in bone resorption of cholesteatoma. American J of Otolaryngol 12(2):83-89, 1991.
 49. Sugita T, Huang CC. Abramson M : Effect of endotoxin on keratine production of kertatinocytes in vitro. Am J Otolaryngol 17:42-46, 1986.
 50. Friedberg, E.C. : DNA damage : In DNA repair. Freeman, New york, 1-78, 1985.
 51. Waalkes, M.P. and Poirier, L.A. : In vitro cadmium-DNA interactions : Cooperativity of binding and competitive antagonism by calcium, magnesium and zinc. Toxicol. Appl. Pharmacol., 75, 539-546, 1984.
 52. Koizumi, T. and Waalkes, M.P. : Interaction of cadmium with rat testicular interstitial cell nuclei : Alterations induced by zinc pretreatment and cadmium binding proteins. Toxicoa. In Vitro. 3, 215-220, 1989.
 53. Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU : Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists, Neurotoxicology 17:37~46, 1996.
 54. Andrea Eggert, M. Lynn Crismon, Larry Ereshefsky. Alzheimer's Disease. In Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach. Dipiro JT et al. Ed., New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1325-1344, 1996.
 55. 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 administrtion. Stroke., 14:977-982, 1983.