

# 六味地黃湯 구성약물이 PC12 세포의 酸化抑制에 미치는 영향

서영은 · 이은아<sup>1</sup> · 배현수 · 신민규 · 홍무창\*

경희대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 퓨리메드(주) 기업부설연구소

## Antioxidant effects of the Herbs Composing Yukmijihwang-tang on PC12 Cell

Young Eun Seo, Eun-A Lee<sup>1</sup>, Hyun Su Bae, Min Kyu Shin, Moo Chang Hong\*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, 1: Purimed R&D Institute

Antioxidant effects of *Rehmannia vaporata*, *Discorea Radix*, *Corni Fructus*, *Hoelen*, *Alismatis Radix*, and *Mountain Cortex Radicis* composing Yukmijihwang-tang were studied. The results are as follows; 1. As a result of detecting the defensive effect of each component on cell damage, only the survival rate of cells with 10 mg/ml Mountain Cortex Radicis was significantly increased. 2. Next, we examined the inhibitory effects of them on ROS occurrence. The result showed significant inhibition of ROS occurrence in cells with 10 mg/ml *Rehmannia vaporata*, cells with 10 mg/ml *Corni Fructus*, and cells with 10 mg/ml Mountain Cortex Radicis. Since the cells with 10 mg/ml *Rehmannia vaporata*, however, showed significant cytotoxicity, its result is not meaningful. 3. Finally, the investigation of ROS occurrence / cell found that *Corni Fructus* and *Mountain Cortex Radicis* had significant inhibitory effect on ROS occurrence.

Key words : Yukmijihwang-tang(六味地黃湯), Antioxidant effect, PC12 cell, aging, ROS

### 서 론

인간이 의학을 연구한 이래 지금까지는 단순히 질병을 치료 하는 것에 역점을 두었으나, 20세기를 지나면서 질병치료 뿐만 아니라 동시에 삶의 질을 향상시키고 수명을 연장시키는 것에 대한 연구가 활발해지고 있다. 이중에서, 노화에 관한 관심이 큰 쪽으로 증가하면서 이에 대한 많은 연구가 이루어져 오고 있다. 특히, 1950년대에 산화적 자극이 노화의 원인일지 모른다는 가설이 제창된 이래 최근 인류의 수명연장과 더불어 알츠하이머, 파킨슨병 및 치매 등 퇴행성 뇌질환에 대한 관심이 증가하면서 이들 퇴행성 뇌질환 치료제로서의 항산화물질에 대한 연구가 한층 활성화되고 있다.

한편 한의학에서는 이미 『素問·上古天真論』<sup>1)</sup>에 “女子七七 腎氣盛 …… 七七 任脈虛 太衝脈衰少 天癸竭 地道不通 故形壞而無子也. 丈夫八歲 腎氣實 …… 八八 則齒髮去 腎者主水 受五臟六腑之精而藏之”, “天壽過度 氣脈相通 而腎氣有餘也”라 하였고, 『靈樞·天年篇』에 “五十歲, 肝氣始衰 …… 六十歲, 心氣始衰 …… 七十歲, 脾氣虛 …… 八十歲, 肺氣衰 …… 九十歲, 腎氣

焦 …… 百歲, 五臟皆虛, 神氣皆去”라 하여 腎氣虛衰가 노화와 관련이 있다고 하였다.

이에 腎虛症에 사용하는 대표처방인 六味地黃湯을 지정하여 각각의 구성약물이 노화를 방지하는 항산화작용에 있어서 얼마만큼의 유의성을 가지고 있는지에 대하여 알아보려고 하였다. 우선, hydrogen peroxide에 의해 발생하는 PC12 세포손상에 대한 각 약물의 방어효과를 보기 위하여 ethyl alcohol 추출물을 시료로 하여 세포에 전처리한 후 hydrogen peroxide를 처리한지 24 시간 후에 세포생존율을 측정하는 방법을 시행하고, 동시에 형광 처리한 Free radical의 감소하는 숫자를 세어 산화의 발생, 억제 정도를 관찰하였다.

위의 두 실험 data를 토대로 각 약물시료의 PC12세포 숫자당 Free radical 감소정도를 최종적으로 확인하여 항산화작용에 유의한 결과를 얻은 약물을 알아보려고 하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재료

##### 1) PC12 세포

PC12 세포주 (Rat, pheochromocytoma)는 한국 세포주 은행에서 구입하여 사용하였다 (KCLB # 21721).

\* 교신저자 : 홍무창, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학

E-mail : hongmc@khu.ac.kr Tel : 02-961-0323

· 접수 : 2002/12/06 · 수정 : 2003/01/10 · 채택 : 2003/02/07

## 2) 약재

목단피, 백복령, 산수유, 산약, 숙지황, 택사는 한국생약협회에서 구입하여 사용하였다. 약재의 목록은 Table 1과 같다.

Table 1. List of herbs

약물명	생약명	원산지
熟地黄	Rehmannia Radix vaporata	한 국
山藥	Discorea Radix	한 국
山茱萸	Corni Fructus	한 국
白茯苓	Hoelen	한 국
澤瀉	Alismatis Radix	한 국
牡丹皮	Mountain Cortex Radicis	한 국

## 3) 시약

PC12 세포의 배양에 사용된 RPMI 1640 배지와 penicillin-streptomycin, 0.25% trypsin-1mM EDTA는 GIBCO BRL (USA)에서 구입하여 사용하였고, fetal bovine serum (FBS)은 HyClone (USA)사에서, 그리고 30% hydrogen peroxide는 Sigma (USA)사의 제품을 구입하여 사용하였다. MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) assay에 사용된 CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit는 Promega (U.K.)에서, 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA)는 Molecular Probes (USA)에서 구입하였고, 그 밖의 시약은 모두 GR급 이상을 사용하였다.

## 4) 기기

약재의 추출과 농축에는 sonicator (Branson, USA), evaporator (EYELA, Japan)와 lyophilizer(EYELA, USA)를 사용하였고, MTS assay에 사용된 microplate reader는 E09090 (Molecular Device, USA)를 사용하였다. ROS 측정에는 Fluorocan Ascent FL (Thermo Labssystem, Finland)을 사용하였다.

## 2. 방법

## 1) 시료의 조제

건조된 약재 500 g을 분쇄기로 분말화하여 70% ethyl alcohol(덱산화하) 1 l가 담긴 플라스크에 넣고 실온에서 sonicator (Branson, USA)로 10분간 추출하여 상청액을 포집하였다. 이를 85%, 100% ethyl alcohol을 이용하여 같은 방법으로 추출한 후 상청액을 모두 혼합하였다. 거즈로 여과한 여액을 evaporator (EYELA Co., Japan)로 농축한 후, lyophilizer (EYELA Co., Japan)로 동결건조하여 건조추출물을 얻었으며 회수율은 목단피 10.4%, 백복령 1.1%, 산약 10.2%, 산수유 41.6%, 숙지황 19.8%, 택사 21.5%이었다. 건조추출물은 1 mg/ml 농도로 증류수에 녹이고 10,000 × g에서 15분간 원심분리를 실시하여 불용성 물질을 제거한 후, 0.22 μm filter를 통과시켜 실험에 사용하였다.

## 2) PC12 세포의 배양

PC12 cell (Rat, pheochromocytoma)은 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, USA) 및 1% penicillin-streptomycin (Gibco

BRL, USA)이 함유된 RPMI 1640 배지 (Gibco BRL, USA)를 사용하여, 온도와 습도가 유지되는 37°C 배양기에서 95%의 공기와 5% CO<sub>2</sub>의 혼합기체를 지속적으로 공급하면서 배양하였다.

## 3) 시료와 hydrogen peroxide의 처리

1 × 10<sup>5</sup> cells/ml의 PC12를 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 37°C incubator에서 배양하였다. 배양액을 제거하고 상기 방법으로 추출한 건조추출물을 최종농도가 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml 농도가 되도록 배지에 희석하여 cell에 처치하고 37°C에서 24시간 동안 전처리 하였다. 24시간 후 cell을 같은 배지로 1회 수세하고 250 μm hydrogen peroxide (Sigma, USA)가 포함된 배지를 30분간 처치하였다.

## 4) MTS assay

세포증식 및 세포독성을 측정하기 위해 CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, U.K.)를 사용하여 수행하였다. 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml의 PC12를 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 37°C incubator에서 배양하였다. 세포에 각각의 약재를 포함하는 배지를 넣고 동일한 조건에서 24시간 배양하였다. 세포를 배지로 1회 수세한 다음 hydrogen peroxide를 30분간 처리하고 각각의 well에 세포액 100 μl당 20 μl의 MTS 용액을 넣고 37°C incubator에서 1시간 동안 반응 후 microplate reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 490 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

## 5) ROS (Reactive Oxygen Species) 측정

ROS 측정은 Hai Yan Zhang 등<sup>2)</sup>의 방법을 응용하여 실시하였다. 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml의 PC12를 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 37°C incubator에서 배양하였다. 세포에 각각의 약재를 포함하는 배지를 넣고 동일한 조건에서 24시간 배양하였다. 세포를 FBS-free 배지로 1회 수세한 다음 hydrogen peroxide를 30분간 처리하고, N,N-dimethyl formamide (amresco, USA)에 용해된 H2DCFDA (Molecular Probes, USA)를 최종농도가 50 μm이 되도록 처리하여 37°C water bath에서 1시간 반응하였다. 발생된 형광은 Fluorocan Ascent FL (Thermo Labssystem, Finland)을 이용하여 excitation 485 nm / emission 538 nm에서 측정하였다.

## 3. 통계처리

실험의 결과 data는 평균값으로 표시하였으며 약물의 효과를 판정하기 위하여 각 실험군을 대조군과 비교하는데는 SPSS 8.0 for windows (SPSS Inc., USA)를 사용하여 Student's t-test로 처리하였다.

## 결 과

## 1. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 세포손상에 대한 육미지황탕 구성약물추출액의 방어효과

각 한약추출액의 세포손상에 대한 방어효과를 관찰하기 위하여 PC12 세포를 96 well plate에 1 × 10<sup>5</sup> cells/well로 이식하고 37°C에서 incubation하여 cell이 잘 부착된 것만 실험에 사용하였다. 24시간 후에 한약추출물을 0, 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 mg/ml이

되도록 제조하여 24시간 배양한후 hydrogen peroxide를 30분간 처리하였다. 그 후 각각의 well에 세포액 100  $\mu$ l당 20  $\mu$ l의 MTS 용액을 넣고 37 $^{\circ}$ C incubator에서 1시간 동안 반응 후 microplate reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 490 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다 (Fig. 1).

그 결과 한약추출액 처리를 하지 않은 대조군에 비하여 세포생존율이 증가한 군은 목단피를 1 mg/ml로 투여한 군에서만 121% ( $P < 0.01$ )로 증가하였으며 다른 약물군에서는 유의성이 없었다.

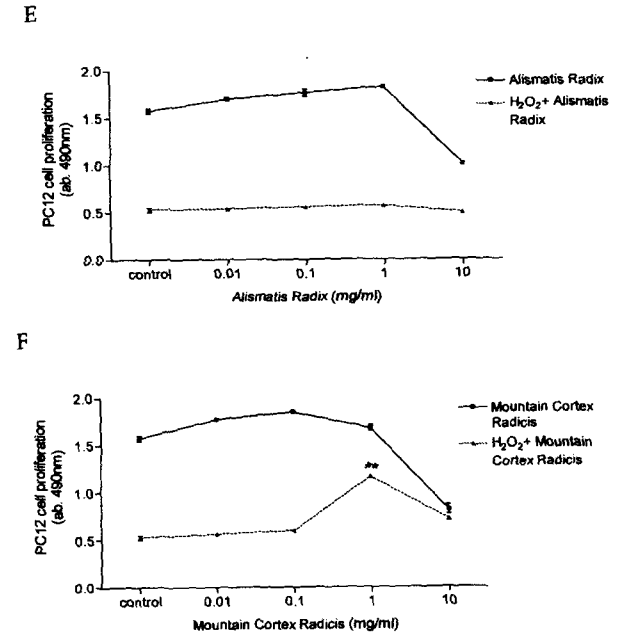
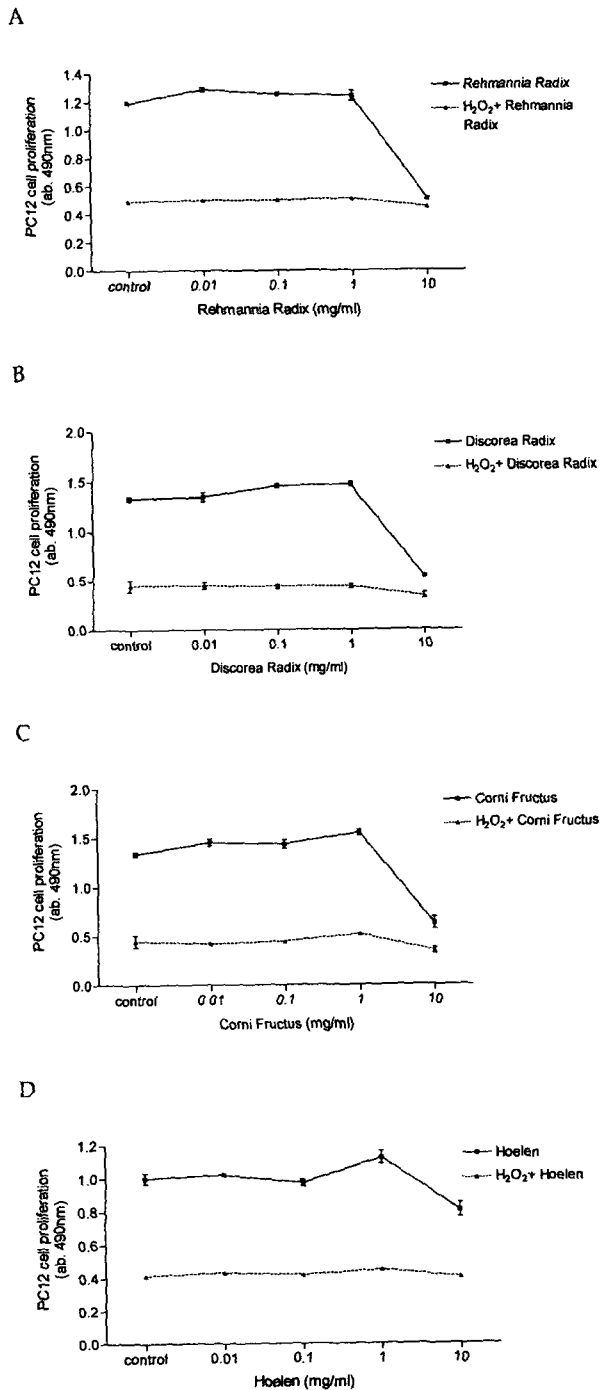
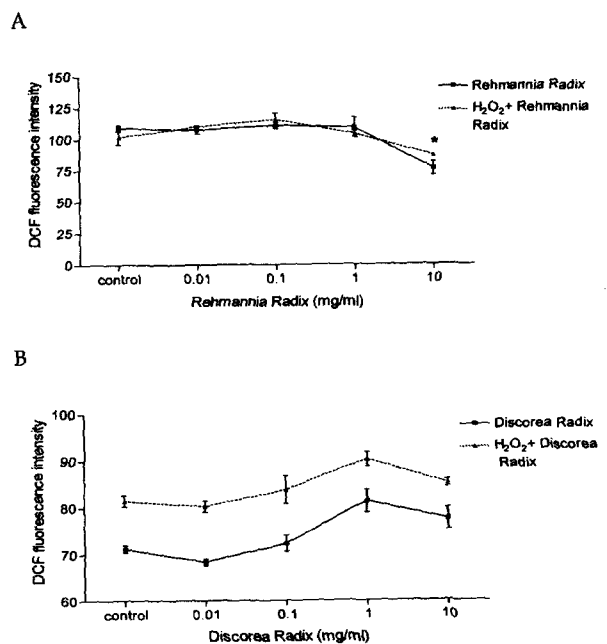


Fig. 1. Proliferation of PC12 cells in medium containing various concentration of each herbal extract after 24hr. Cell proliferation were quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. \*\*  $P < 0.01$  vs. respective control.

2. Hydrogen peroxide 노출에 의해 유도된 PC12 세포손상에 대한 육미지황탕 구성약물추출액의 ROS 발생억제효과

$1 \times 10^5$  cells/ml의 PC12를 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C incubator에서 배양한 후, 세포에 각각의 약재를 포함하는 배지를 넣고 동일한 조건에서 24시간 배양하였다. 세포를 FBS-free 배지로 1회 수세한 다음 hydrogen peroxide를 30분간 처리하고, N,N-dimethyl formamide (amresco, USA)에 용해된 H2DCFDA (Molecular Probes, USA)를 최종농도가 50  $\mu$ M이 되도록 처리하여 37 $^{\circ}$ C water bath에서 1시간 반응한 후 ROS 발생을 측정하였다 (Fig. 2).



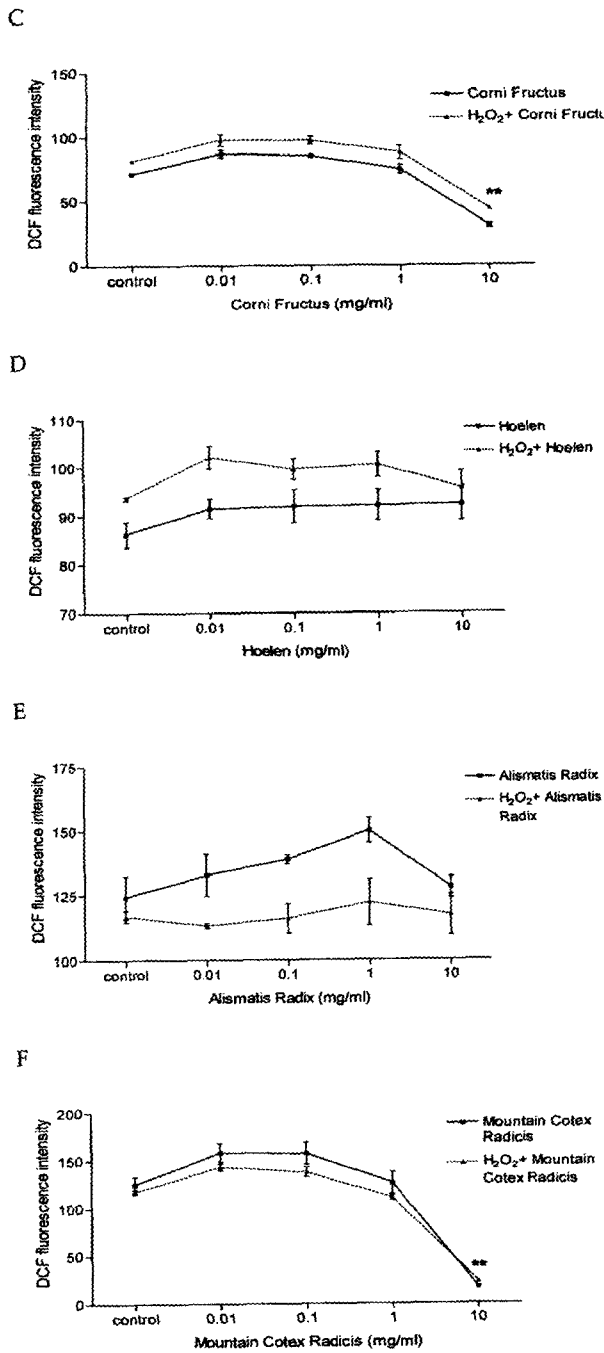


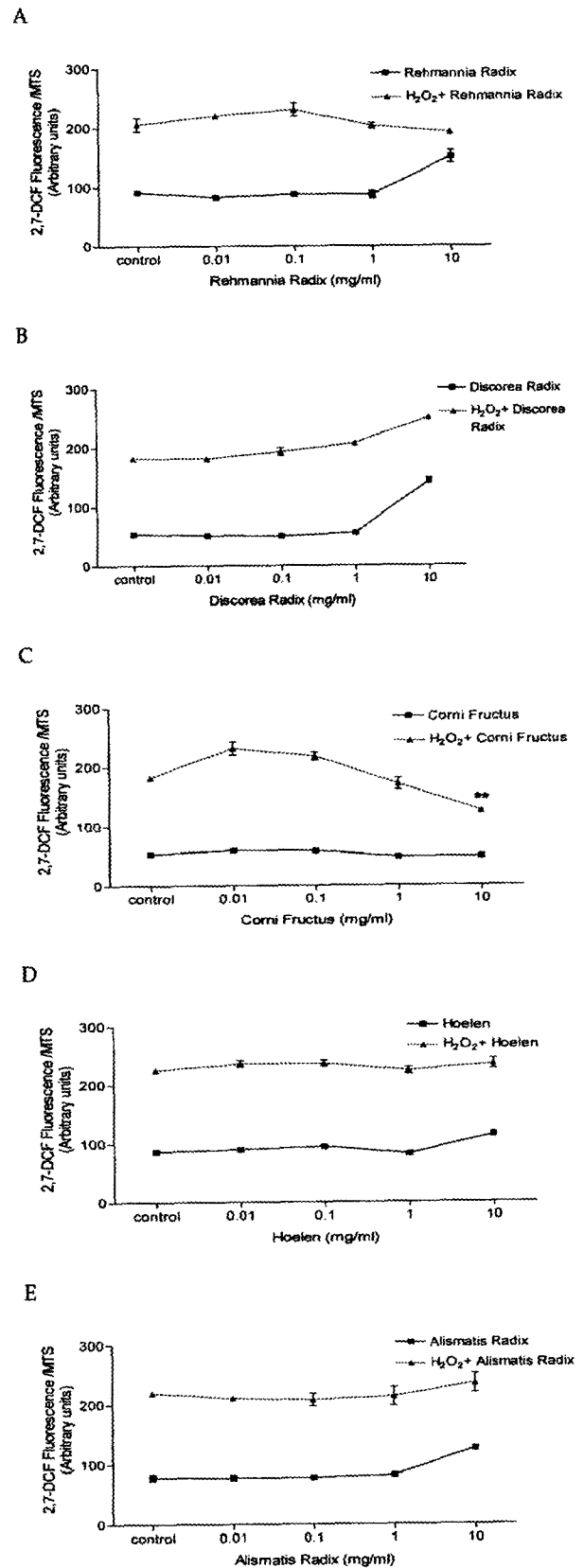
Fig. 2. ROS measurement of PC12 cells in medium containing various concentration of each herbal extract after 24hr. ROS of each samples were quantified by DCF fluorescence intensity (excitation 485 nm / emission 538 nm). Error bars indicate S.E.M. \* P<0.05 vs. respective control. \*\* P<0.01 vs. respective control.

그 결과 된 속자황 10 mg/ml 투여군에서 14.6% ( $P<0.05$ ), 산수유 10 mg/ml 투여군에서 46.4% ( $P<0.01$ ), 목단피 10 mg/ml 투여군에서 80.5% ( $P<0.01$ )의 유의한 발생억제를 보였다.

### 3. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 세포의 손상에 있어서의 세포수 당 ROS 발생억제 효과

PC12 cell에서의 ROS 발생량을 MTS 결과 나타난 세포수

로 나뉘어서 세포 숫자당 ROS 발생량을 확인한 결과는 다음과 같다(Fig. 3).



F

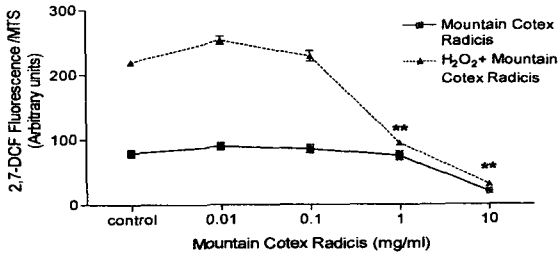


Fig. 3. ROS of PC12 cell in medium containing various concentration of each herbal extract after 24hr. Each ROS measurements were normalized with cell proliferation. Error bars indicate S.E.M. \*\* P<0.01 vs. respective control.

산수유 10 mg/ml 투여군에서 30.7% (P<0.01), 목단피 1 mg/ml 투여군에서 56.9% (P<0.01), 10 mg/ml 투여군에서 85.6% (P<0.01)의 발생억제 효과를 나타내었다.

## 고찰

노화란 인체의 노년기에 나타나는 노인성 변화로, 발육, 성장, 성숙과 노화의 생물학적 과정에서, 형태적·기능적 퇴축, 예비력과 적응력의 저하로 사망에 귀착되는 보편적인 생리현상을 말하며, 노화현상으로는 두발, 피부 등의 외관상 변화와 신체 및 장기중량감소 등의 형태적 변화와, 지적, 인격적 기능저하, 심리적 변화등이 나타나는 것이 일반적인 특징이다.

서양의학에서 보는 노화의 원인에 대해서 생물학적 원인설로 소모설, 신진대사속도설, 내분비설, 생기설, 충격설, 중독설, 장기의 원발성위축설, 세포화설, 돌연변이설, 세포유전학설, 자기면역설 등이 있고, 생화학적 원인설로는 DNA설, 화학반응설, collagen의 노화설, free Radical설, 효소작용장애설 등이 있으며, 형태학적 원인설로는 조직재생기능의 노화, 세포수의 변화와 노화, 핵의 변화와 노화, 결합조직의 노화 등이 있으며, 생리학적 원인으로는 항상성의 파탄, 적응력의 결함, 반응력의 변화, 장기들의 예비력감소설 등이 있는데, 최근에는 Harman에 의해 제창된 free radical에 의한 연쇄적인 유해반응의 결과로 노화과정이 진행된다는 학설이 유력한 것으로 보고되고 있다.

Free radical은 인체의 radiation에 의한 노출이나 내부효소반응에 의하여 생성되는데, 단백질의 -SH기와 반응하여 효소의 활성을 잃게 되거나 假橋結合의 促進, DNA, RNA, 효소 및 membrane에 손상을 일으켜 세포괴사를 유발한다. 즉, free radical theory는 대사과정에서 발생하는 superoxide anion (O<sup>2-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 및 hydroxy radical (OH) 등의 free radical이 세포나 결합조직에 작용하여 해로운 물질을 생성하게 되고 이것이 축적된 결과가 노화와 만성 퇴행성 질병의 근본적인 원인이라고 보는 것으로, free radical이 축적되는 것을 방지하기 위하여 정상세포는 O<sup>2-</sup>를 분해하는 SOD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해하는 catalase같은 효소들을 가지게 된다.

酸化的刺戟 (Reactive Oxygen Species; ROS)이란 쌍을 이루지 못한 전자를 외각에 가진 모든 물질을 지칭하는 말로서 생체

내 구조를 이루는 단백질, 핵산 등의 물질과 반응함으로써 그 구조와 기능에 손상을 주는, 심한 경우 세포의 자연발생적 세포사멸을 초래할 수도 있는 물질이다. 이들의 예로는 superoxide radical (O<sup>2-</sup>), hydroxyl radical (OH), proxyl radical (RO<sup>2-</sup>) 등과 radical이 아니지만 생체에 유독한 물질인 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hypochlorous acid (HOCl), singlet oxygen, peroxynitrite (ONOO) 등이 있는데, 이들은 정상적인 대사과정 중에도 항상 생성되므로, 생체내에는 항산화기제가 동시에 존재한다. 항산화기제로 대표적인 것이 ascorbate, α-tocopherol 등의 세포내에 미량으로 존재하는 항산화물질들과 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px)와 같은 항산화효소들이다. ROS가 노화의 원인일지도 모른다는 가설이 1956년경에 제시된 이후 이들의 역할, 생성 및 작용경로에 대해 많은 연구들이 이루어지고 있으며 알츠하이머, 파킨슨병을 비롯한 각종 퇴행성신경질환의 치료제로서의 항산화작용물질의 개발 등이 큰 관심을 모으고 있다.

한의학에서는 『素問·上古天真論』<sup>1)</sup>에 “女子七歲 腎氣盛……七七 任脈虛 太衝脈衰少 天癸竭 地道不通 故形壞而無子也. 丈夫八歲 腎氣實……八八 則齒髮去 腎者主水 受五臟六腑之精而藏之”, “天壽過度 氣脈相通 而腎氣有餘也”라 하였고, 虞는 “腎氣盛則壽延, 腎元衰則壽夭”라하여 腎臟의 盛衰가 노화와 壽命에 깊은 관련이 있음을 언급하였다. 『素問·陰陽應象大論』<sup>2)</sup>에 “年四十, 而陰氣自半也, 起居衰矣. 年五十, 體重, 耳目不聰明矣, 年六十, 陰痿, 氣大衰, 九竅不利, 下虛上實, 涕泣俱出矣”라 하였고, 『靈樞·天年篇』<sup>3)</sup>에 “五十歲, 肝氣始衰……六十歲, 心氣始衰……七十歲, 脾氣虛……八十歲, 肺氣衰……九十歲, 腎氣焦……百歲, 五臟皆虛, 神氣皆去”라 하여 加齡에 따른 각 기관의 구조적, 기능적 변화를 언급하였다. 임상에서 노쇠로 인하여 나타나는 耳目不聰, 心失神則健忘, 飲食無味, 腰痠, 陰虧 증상과 각종 운동기장애 등이 주로 腎과 상생관계에 있는 肝의 기능저하에 의해 유발되므로, 肝, 腎의 기능이 노화와 밀접한 관련이 있는 것으로 사려된다.

六味地黃湯은 張中景의 『金匱要略』<sup>4)</sup>의 八味腎氣丸에서 小兒의 特性에 附合하도록 肉桂와 附子를 去하여 立方한 것이다. 錢은 方義를 “治腎怯失音 顛開不合 神不足 目中白睛多 面色晄白 等方”이라 하였는데<sup>5,7)</sup>, 이후 여러 醫家들에 의하여 腎水不足, 陰虛陽亢, 先天元氣不足, 腎精不足 등에 補腎의 목적으로 廣範圍하게 應用되었다<sup>8-11)</sup>. 근대에 尹<sup>12)</sup>은 滋陰補腎의 基礎方劑로 體內 生熱 energy源의 부족으로 대사가 침체된 상태, 즉 陰虛로 因하여 발생하는 一切病證에 加減하여 응용한다고 하였고, 安<sup>13)</sup>은 急性腎不全에 유효함을 보고하였다. 이러한 관점에서 六味地黃湯은 각종 陰虛證에 滋陰補腎의 효능을 가진 기본적인 통용 方劑로 널리 응용되고 있다. 六味地黃湯을 구성하는 재료의 약성과 주지증을 살펴보면, 熟地黃은 氣味가 甘微苦微溫하며, 補血, 滋腎水, 益陰한다. 山藥은 氣味가 甘溫하며 補氣虛損補虛扶弱, 補中益氣力, 虛勞羸瘦, 健脾胃, 充五臟한다. 酸棗英은 氣味가 酸溫이며 補肝腎, 滋陰養血, 補腎氣, 澆精氣, 固氣, 溫中, 溫肝, 強陰益精, 安五臟한다. 牡丹皮는 氣味가 辛苦微寒하며 理血消瘀血,

涼血熱, 清伏火한다. 茯苓은 氣味가 甘淡平하며 和中益氣, 滲水行痰한다. 澤瀉는 氣味가 甘鹹寒하며 滲濕利水, 補虛損, 滲濕熱한다<sup>14,15</sup>. 六味地黃湯의 효능에 대한 약리연구 분야로는 혈당조절, 혈압강하, 물질대사, 부신피질호르몬 조절작용 등의 방향으로 진행되었고, 임상연구 분야에서는 각과별로 신장질환, 당뇨병, 화학요법부작용, 종양, 피부질환, 盜汗, 골밀도 등의 방향으로 연구되고 있다<sup>16,17</sup>. 金<sup>18</sup> 등은 六味地黃湯 투여가 혈중 cortisol의 양을 증가시킨다고 보고하였고, 韓<sup>19</sup> 등은 六味地黃湯이 腹腔大食細胞의 활성을 증가시킨다고 보고하였는데, 이는 六味地黃湯이 천식의 기관지 염증반응을 억제할 가능성을 시사하는 것이다. 또한, 柳<sup>20</sup>는 馬杉腎炎에 유효하다 하였고, 李<sup>21</sup>는 腎性高血壓 白鼠에 血漿 renin 活性도를 억제하여 혈압을 강하시킨다고 보고하였으며, 杜<sup>22</sup> 등은 六味地黃湯에 鹿茸을 가한 煎湯液이 급성신부전에 유효하다고 하였다.

본 실험은 六味地黃湯의 6가지 구성약물이 PC12 cell 산화억제에 미치는 영향을 살펴본 것으로 먼저 MTS assay를 土蠶로 ROS 발생량을 확인한 결과 山茱萸 10 mg/ml 투여군에서만 유의성 있는 발생억제효과를 나타내었다. 六味地黃湯은 腎虛證의 대표적인 方劑로 補腎의 작용으로 노화억제가 기대되는 관점에서 본 실험을 시행하였으나, 그 중 山茱萸, 牡丹皮만이 항산화작용이 유의성있게 관찰되었다. 비록, 6가지 약물 모두에게서 노화억제의 효과는 기대할 수는 없었으나, 君臣佐使의 원칙에의한 약리의 변화를 더욱 심도 있게 살펴보는 연구가 앞으로 필요하다 하겠다.

## 결 론

본 연구는 六味地黃湯의 구성약물, 즉 熟地黃, 山藥, 山茱萸, 茯苓, 澤瀉, 牡丹皮의 抗酸化作用을 관찰하는 것을 목표로 하고 있으며, 실험결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

각 한약추출액의 세포손상에 대한 방어효과를 관찰한 결과 牡丹皮를 10 mg/ml로 투여한 군에서만 세포생존율이 유의성있게 증가하였다. Hydrogen peroxide 노출에 의해 유도된 PC12 세포손상에 대한 六味地黃湯 구성약물추출액의 ROS 발생억제효과를 확인한 결과, 熟地黃 10 mg/ml 투여군, 山茱萸 10 mg/ml 투여군, 牡丹皮 10 mg/ml 투여군에서 유의성있는 발생억제를 보였다. 세포 숫자당 ROS 발생량을 확인한 결과, 山茱萸 10 mg/ml 투여군, 牡丹皮 1 mg/ml 투여군, 10 mg/ml 투여군에서 유의성있는 발생억제효과를 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 벤처 및 중소기업기술개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (01-PJ4-PG4-01VN01-0372).

## 참고문헌

1. 洪元植 譯. 黃帝內經素問, p.19-20,46, 傳統文化硏究會, 서울, 1993.
2. Hai Yan Zhang, Xi Can Tang. Huperzine B, a novel acetyl-cholinesterase inhibitor, attenuates hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells. Neuroscience Letters 292:41-44, 2000.
3. 洪元植 譯. 黃帝內經靈樞, p 366, 傳統文化硏究會, 서울, 1993.
4. 張景岳. 完譯金匱要略, p 157, 384-385, 서원당, 서울, 1986.
5. 錢乙. 小兒藥證直訣 p 56, 人民衛生出版社, 北京, 1991.
6. 錢乙. 小兒藥證直訣 p 47, 醫聖堂, 서울, 1994.
7. 錢乙. 小兒藥證直訣(下), p 1, 癸丑文化社, 서울, 1973.
8. 孫思邈. 千金要方, p 27, 大星文化社, 서울, 1984.
9. 신재용 編. 方藥合編解說, pp 45-47,62-69, 成輔社, 서울, 1989.
10. 조명신. 醫門寶鑑, p 77, 450, 一中社, 서울, 1985.
11. 許浚. 東醫寶鑑, p 113, 449, 南山堂, 서울, 1987.
12. 尹吉榮. 東醫臨床方劑學, p254-255,319-322, 成輔社, 서울,1994.
13. 안세영. 五苓散 및 六味地黃湯이 Gentamicin Sulfate로 誘發된 白鼠의 急性腎不全에 미치는 影響, 慶熙大學校大學院, 1993.
14. 이상인 외. 本草學, pp 193-195, 302-306, 409-410, 537-538, 578-583, 626-627, 永林社, 서울, 1991.
15. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學, p 121, 237, 484, 509, 537, 540, 580, 626, pp 193-195, 289-292, 294-296, 302-306, 315-316, 永林社, 서울, 1992.
16. 김시영, 이인산. 韓方婦人科領域에서 六味地黃湯과 부익지황환의 효능에 관한 문헌적 고찰. 대한한방방부인과학회지 10, 133-150, 1997.
17. 이원석, 박선동. 六味地黃湯에 대한 문헌적 고찰. 동국대논문집 5, 149-166, 1986.
18. 김영권, 류봉하, 박동원, 류기원. 六味地黃湯이 생리활성지표와 임파구세포수에 미치는 影響. 대한한방중양학회지 4:89-110, 1998.
19. 한일수, 김철중. 六味地黃湯, 八味地黃湯 및 加味地黃湯이 생쥐의 복강대식세포활성에 미치는 影響. 大田大學校 韓醫大論文集 6, 331-347, 1997.
20. 유지윤. 六味地黃湯 및 八味地黃湯 투여가 항개량형 마찰신염에 미치는 影響. 圓光韓醫大 論文集 3, 541-564, 1983.
21. 이언정. 六味地黃湯 煎湯液이 腎性高血壓 백서의 혈압 및 혈장 renin 활성도에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院, 1985.
22. 두호경 외. 加味五苓散, 加味六味地黃湯 및 식초가 Gebtamicin sulfate로 유발된 백서 급성신부전에 미치는 影響. 慶熙醫學 7, 287-311, 1991.