동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 16. No. 1, 2005

星香正氣散加蒲公英과 單味들이 Hypoxia-reoxygenation 에 의해 손상받은 Mouse Neuroblastoma 2a Cells에 미치는 影響

유진석, 김종우, 강철훈*, 황의완
경희대학교 한의과대학 신경정신의학교실, 경희대학교 동서의학대학원*

The effects Sunghyangjungkisan-ga-pogongng and herbs on Mouse neuroblastoma 2a cells damaged by hypoxia-reoxygenation.

Jin Suk Yoo, Jong Woo Kim, Chul Hun Kang*, Wei Wan Whang

Dept. of Neuropsychiatry, college of Oriental Medicine, Kyung Hee University
Graduate School of East-West Medical Science*

ABSTRACT

Object : This study was designed to asses the effect of Sunghyangjungkisan-ga-pogongng and herbs on Mouse neuroblastoma 2a cells damaged by hypoxia-reoxygenation.

Method : Mouse neuroblastoma 2a (N2a) cells were measured by MTT assay and LDH assay after 48h hypoxia and 6h reoxygenation. Mouse neuroblastoma 2a (N2a) cells were treated by SHJG+P and herbs.

Result :

1. SHJG+P was effective on LDH assay of hypoxia and reoxygenation.
2. The herbs were generally effective on LDH assay of hypoxia and reoxygenation. In MTT assay of hypoxia JP and GC were effecctive.

In LDH assay of hypoxia all of herbs were effective. DMH, BC, SY, NS were more effective than other herbs. In LDH assay of reoxygenation KH, BH, BBR, DMH were especially effective.

In MTT assay of reoxygenation most of herbs were not effective. But GC, SY, BH, JP were effective.

Conclusion : The results imply that SHJG+P and all of berbs may have protective effect on dementia and GC, SY, BH, JP may have protective effect.

Key Words : Sunghyangjungkisan-ga-pogongng, herb, hypoxia-reoxygenation, dementia

◆ 투고 : 5/24 수정 : 6/9 채택 : 6/10
교신저자: 황의완, 서울특별시 동대문구 회기동 경희의료원 한방병원 신경정신과학교실,
Tel : 02-958-9188, Fax : 02-958-9104, E-mail : aromaqi@khu.ac.kr

I 緖 論

腦 疾患에 있어서 산소의 역할은 腦 虛血에 의한 산소부족과 활성산소에 의한 손상이라는 두 가지 경우로 대별된다.

腦 虛血에 의한 손상은 外傷, 血管痙攣, 粥狀斑, 塞栓, 혹은 動脈硬化症 등에 의하여 腦血流가 易置 以下로 減少되어 산소부족이 야기되면 腦神經 細胞의 機能喪失과 더불어 細胞壞死가 나타나는 것이다[1].

활성산소에 의한 腦神經細胞의 損傷은 腦 虛血 이후 산소 재공급, 염증, 산화제 사용 등으로 인하여 야기되는데, 대부분의 腦 虛血은 일시적이며 腦 虛血 당시보다는 再灌流시에 산소가 組織으로 再供給될 때 활성산소가 생성되어 組織 損傷이 더욱 강하게 일어난다[2].

痴呆의 대부분을 차지하는 알츠하이머형 痴呆와 혈관성 痴呆[3]의 병리에 산소 부족과 산화적 스트레스가 치매의 중요한 병리과정의 하나로 주목받고 있다[4].

치매의 대표적인 형태인 알츠하이머형 치매에 관해서는 많은 유발인자들이 제시되어 있지만, 활성산소 과잉과 항산화능력의 저하에 의한 腦神經細胞 파괴가 중요한 병리기전으로도 제안되고 있다[5].

혈관성 치매는 腦血管 病變으로 인한 腦의 器質性 障碍에 의해 유발된 知的機能의 持續的 低下 狀態를 말하는 것으로, 대다수는 腦卒中 後에 나타난다. 腦卒中에 의한 腦神經細胞 損傷은 虛血에 의한 산소부족과 再灌流시에 나타나는 활성산소에 의한 것이 있는데, 그 피해 정도는 활성산소에 의한 것이 더 크다[2].

치매에 대한 최근의 한약에 대한 연구는 단미로써 石菖蒲[6], 日黃連[7], 香附子[8] 등과 복합처방으로 天王補心丹[9], 加減固本丸[10]이 치매에 유효한 효과가 있다는 보고들이 있고, 調胃升淸湯에 대해서는 동물실험에서 학습과 기억을 증진시키는 효과가 있고[11,12], 임상실험에서는 조[13]와 김[14]이 초기 Dementia of Alzheimer Type 환자의 인지기능 개선효과를 보고하였다.

星香正氣散은 한국에서 急性期 中風에 가장 많이 사용되고 있는 처방 중에 하나[15]로 理氣消痰하여 中風의 진행을 억제하고 운동기능을 회복시켜주는 효과가 있으며[16], 蒲公英을 加하여 腦神經變性에 의한 疾患에 사용되고 있는데, 星香正氣散加蒲公英은 腦虛血 성상세포에서 염증성 매개물질을 억제하여, Aβ 응집과 세포파괴가 악순환되는 것을 억제한다고 보고 되었다[17].

星香正氣散의 약리 효과 및 기전에 관한 연구로는 이[18]가 산화성 세포 손상에 미치는 효과를, 이[19]가 혈압, 국소뇌혈류량 및 뇌연막동맥에 미치는 영향에 대하여, 박[20]이 학습 및 기억력장애에 미치는 영향에 대하여, 예[21]가 白鼠의 신경전달물질에 미치는 영향을 연구보고 하였다.

그러나 기존 星香正氣散 관련 연구에는 산소의 차단과 재공급에 의해 야기되는 뇌신경세포손상에 대한 효과를 비교 연구한 것은 없었다.

따라서 본 연구에서는 痴呆의 대부분을 차지하는 혈관성 치매와 알츠하이머형 치매가 산소의 부족과 활성산소에 의한 세포손상에 야기될 수 있다는 점에 근거하여, 이들 한약물이 산소 공급 차단에 의한 세포사와 세포활성저하, 그 이후의 산소 재공급에 의한 세포사와 세포활성저하에 미치는 효과를 검토하여 임상적 효과를 설명할 수 있는 기전을 제공하기 위한 기반연구를 실시하였다.

본 실험에 사용된 Neuroblastoma는 약물의 항 치매효과 연구[22]와, 산화성 신경손상 연구[23,24]에 이용되고 있고, 세포에 hypoxia를 유발할 경우 조직의 hypoxia와 유사한 생화학적 반응이 예상되며[25], reoxygenation을 유발할 경우 free radical에 의한 손상이 야기되어[26] 동물실험에서의 虛血後 再灌流의 손상과 공통점이 있다.

이런 이유로 hypoxia-reoxygenaion에서의 neuroblastoma 세포주를 이용한 세포손상모델은 虛血 및 再灌流에 의한 손상에 약물이 미치는 효과의 세포연구에 적합한 모델이다.

이에 저자는 mouse Neuroblastoma 2a 세포를 대상으로, 한약물이 정상세포와 hypoxia - reoxygenation 조건을 부여한 세포의 세포활성과 세포손상정도에 미치는 효과를 각기 조사하였고, hypoxia 처리된 경우와 reoxygenation 처리된 경우 모두 세포의 활성 (MTT assay)과 세포손상

(LDH assay) 정도를 측정, 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ 實 驗

1. 材料.

1) 藥材

(1) 藥材의 構成

본 실험에 사용된 약재는 경희대학교 한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

실험에 사용된 한약물은 星香正氣散加蒲公英과 星香正氣散을 구성하는 單味들이다.

星香正氣散加蒲公英은 慶熙醫療院 韓方製劑解說集[27]을 근거로 星香正氣散 1貼 分量에 蒲公英 4g을 가하였다.

각 韓藥材의 生藥名과 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.(Table 1.2.).

(2) 藥材의 抽出

각 약물을 경희의료원 약재과로부터 획득하여 각 50g 을 70% 메탄올 수용액에 4℃에서 냉침하여 추출하였다.

추출액은 매 3시간마다 분광기로 400nm 에서 흡광도를 측정하여 추출과정을 추적하였으며 변화량이 3시간에 5% 미만으로 둔화되었을 때 추출이 완료된 것으로 간주하였고 대개 24시간에서 48시간이 소요되었다.

각 약물을 여과지로 걸러 침전물을 제거하여 얻어진 추출액을 둥근바닥플라스크로 옮기고 용매를 감압 하에서 회전식 증발기로 제거하였다.

완전히 용매가 제거되기 전에 물을 더하여 얼리고 동결건조기로 분말을 얻었고 실험에 사용할 때까지 -80℃ 냉동고에 보관하였다.

동결건조기에 말린 분말을 media에 녹여 보관용액을 만들고 사용하기 직전에 0.4㎛ 실린지로 여과하여 가능한 침전물을 제거하여 사용하였다.

Table 1. Names of Herbs Used in the Experiment.

Herb Name	Botanical Nme
星香正氣散加蒲公英	
藿香	Pogostemonis Herba
蘇葉	Perillae Folium
南星	Arisaematis Rhizoma
唐木香	Aucklandiae Radix
大腹皮	Arecae Pericarpium
白茯苓	Poria
白朮	Atractyldis Macrocephalae Rhizoma
陳皮	Citri Pericarpium
半夏	Pineliae Rhizoma
甘草	Glycyrrhiza Uralenisis Fisch
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens

Table 2. Prescription of Sunghyangjungkisan-ga-pogongyoun

Herb Name	Botanical Nme	Dose(g)
藿香	Pogostemonis Herba	6
蘇葉	Perillae Folium	4
南星	Arisaematis Rhizoma	4
唐木香	Aucklandiae Radix	4
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	4
大腹皮	Arecae Pericarpium	4
白茯苓	Poria	4
厚朴	Mgnolae Cortex	4
白朮	Atractyldis Macrocephalae Rhizoma	4
陳皮	Citri Pericarpium	4
半夏	Pineliae Rhizoma	4
桔梗	Platycodi Radix	2.5
甘草	Glycyrrhiza Uralenisis Fisch	2.5
大棗	Jujubae Fructus	4
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens	6
蒲公英	Taraxacl Herba	4
Total amount		65

2) 細胞

Mouse neuroblastoma 2a (N2a) cells은 American-type culture collection (ATCC)사 (Manassas, VA, USA)에서 구입된 것을 강인숙 교수(경희대, 의대) 연구팀에서 불하받은 것을 5% dimethylsulfoxide(DMSO), 10% fetal serum albumin(FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배지에 액체질소탱크에 보관하여 필요할 때마다 증식하여 사용하였다.

3) 試藥

DMSO와 3-(4, 5-dimethyltiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay kit는 Sigma Cooperation(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, lactate dehydrogenase (LDH) assay kit는 Roche Applied Science(Penzberg, Germany)에서 구입하였다.

Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Trypsin, Penicillin / streptomycin (PS)는 Invitrogen Cooperation(NY, USA)에서 구입하였으며 Fetal serum albumin(FBS)는 JBI (대구, 한국), 96-well plate는 SPL(포천, 한국)에서 각기 구입하였다.

2. 方法

1) 細胞의 培養

Mouse neuroblastoma 2a 세포의 배양액은 DMEM + FBS 10%(v/v) + PS 1%(v/v)을 사용하였으며 직경 100mm 둥근 플레이트를 사용하여 세포를 증식하였다. Confluence가 80% 가 되었을 때 trypsin(0.5g/100ml, 최종농도)으로 세포를 회수한 후 플레이트 당 1 × 106 개씩 배양하였다. 세포배양조건이 37℃, 5% 의 CO2 조건에서 대개 2-3일 정도씩 소요되었다.

2) Hypoxia와 Reoxygenation

Hypoxia 조건은 hypoxic chamber(H2 5%, CO2 10% N2 85%)를 이용하여 산소의 공급이 차단된 상태에서 적당한 시간동안 세포가 배양되었고 reoxygenation 조건은 hypoxia 조건에서 배양된 세포를 일정시간 후 정상적인 조건의 배양기로 옮겨 배양하였다.

3) 細胞活性度 測定(MTT assay)

MTT assay는 Sladowski(1993)의 방법을 따라 행하였다[28]. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT formazan(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-25-diphenyl-tetra-zolium bromide)으로 환원시키는 세포의 능력을 이용하는 검사법이다. MTT formazan의 흡광도는 540nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 산화환원력을 반영한다[29].

N2a 세포를 96 웰플레이트에 웰당 100㎕ 의 배양액과 함께 1×104개로 준비하여 약 24시간동안 산소의 공급 하에서 37℃로 배양하고 한약물 추출액을 각 농도로 처리하였다. 각 실험 조건에 hypoxia condition을 준 후 10㎕ 의 MTT solution을 첨가한 후 2시간 배양한다. 약 3시간 후 10㎕ 의 준비된 MTT 용액 (회사에서 제공한 시약을 5mg/ml 로 PBS용액에 녹이고 0.4㎛ 실린지로 여과하여 얻음)을 더하고 2시간 더 배양하고 배양액은 제거되었다. 각 웰 내에 형성된 포마잔(formazan)을 100 ㎕의 DMSO로 녹이고 ELISA reader(Emax, U.S.A)를 사용하여 490nm 에서 흡광도를 특정하였다. 세포활성도(Cell Viavility, %)는 다음과 같이 정의하였다.

정상군의 값을 control로 하고 이때의 O.D.값을 세포의 활성도가 100% 라고 정의하고, 나머지 군의 측정한 O.D. 값을 상대치로 환산하면

Cell Viability = (실험치÷control 군)

한약물이 미치는 효과는 배양액에서의 약물의 농도를 기준으로 최소 50μg/ml에서 최고 1,000μg/ml를 포함하여 5개의 농도에서 실시하였다.

4) 細胞毒性 測定 (LDH assay)

Roche Applied Science사에서 제공된 LDH assay kit를 사용하여 측정하였다. LDH (lactate dehydrogenase)는 세포질에 존재하는 효소로서 정상의 경우 세포막을 투과하지 않지만, 세포막

이 손상을 입을 경우 세포 밖으로 분비되어 배지 내로 방출된다. 방출된 LDH는 젖산과 Nad+ 로부터 피루빈산과 NadH를 생성시키며, 이때 Nad+가 산화됨에 따라 340nm 에서 흡광도가 변화하는 것으로부터 세포밖에 방출된 LDH의 활성도를 측정할 수 있다30).

LDH (lactate dehydrogenase)는 세포질에 존재하는 효소로서 정상의 경우 세포막을 투과하지 않지만, 세포막이 손상을 입을 경우 세포 밖으로 분비되므로 LDH의 활성이 줄어들었다면 산소의 의한 세포막 손상을 보호한 효과가 있다고 결론지을 수 있다. 즉 세포막 파괴로 결론지어지는 세포의 괴사를 막는 효과가 있다고 볼 수 있다. 480nm 에서 이의 량을 측정하는 방법을 사용하고 있다. 간단하게 살펴보면, MTT assay와 유사한 방법으로 계획된 조건에 따라 준비된 세포배양조건에서 배양액을 취하고 남아 있을 수도 있는 세포를 제거하기 위하여 간단히 원심분리(250×g, 4분)하였다. 상등액(100μl)은 새로운 96 웰플레이트로 옮기고 100μl의 제공된 반응용액을 더하여 잘 섞은 후 30분간 상온에서 보관하여 반응을 시켰다. 그 후 50μl의 1N HCl을 더하여 반응을 중단시킨 후 ELISA reader (Emax, U.S.A)로 490 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이때 (+)control 군의 값은 세포에 100 μl, 2% triton X-100을 더하여 세포벽을 파괴하여 세포내의 LDH를 모두 배양액으로 유출시킨 다음, 측정한 LDH의 활성값을 사용하였으며 (-)control 군의 값은 정상적인 세포에서 얻어진 배양액이 주는 값과 세포가 없는 상태의 배양액이 주는 값의 차로 결정하였다. 세포독성(Cytotoxicity, %)은 다음과 같이 정의하였다.

Cytotoxicity (%) =
{[실험치 - (-)control군의 값]÷[(+) control군의 값 - (-)control군의 값]}×100

한약물이 미치는 효과는 배양액에서의 농도를 기준으로 최소 50μg/ml에서 최고 1,000μg/ml를 포함하여 5개의 다른 농도에서 실시하였다.

5) 統計處理

실험에서 얻어진 모든 자료는 윈도우용 SPSS (버전 11.0)을 이용해 통계 분석하였다. 각 수치는 base line에 대하여 각 dose 별로 independent samples t-test를 시행하였고, 결과의 통계적 유의성 여부는 $p<0.05$ 수준에서 판단하였다.

Ⅲ 結 果

1. 韓藥物의 收得率

4℃에서 70% 메탄올 수용액으로 냉침을 한 결과 50g의 비교적 적은 량의 약재를 사용했음에도 불구하고 실험에 충분한 량이 얻어졌으며 다음의 표(Table 3.)에 보이는 결과를 얻었다.

이 중 大腹皮의 경우 가장 낮은 0.92% 의 수득율을 보였으며 木香의 경우 13.54%, 白朮의 경우 18.4% 의 높은 수득율을 보였다. 그러나 이는 약재가 유기용매 등에 녹는 성분의 함량을 의미할 뿐 약효에 관한 특정한 유의성을 보이는 결과라고 생각되지는 않았다. 星香正氣散加蒲公英 , 茯苓, 生薑의 경우는 수득율이 확보되지 않았으나 실험결과에 영향이 없을 것으로 사료되어 未定으로 두었다.

Table 3. The Rate of Extraction from Herbs.

Herb Botanical Name	Rate of Extraction%)
SHJG+P	N. D.
Aucklandiae Radix	0.92
Pogostemonis Herba	2.94
Perillae Folium	2.86
Atractyldis Macrocephalae Rhizoma	18.4
Aucklandiae Radix	13.54
Pineliae Rhizoma	3.48
Poria	N. D.
Citri Pericarpium	8.66
Arisaematis Rhizoma	9.38
Zingiberis Rhizoma Recens	N. D.
Glycyrrhiza Uralenisis Fisch	9.36

N.D. means not determined.

2. 成績

1)事前 實驗

우선 韓藥物이 hypoxia-reoxygenation에 의해 손상된 mouse neuoblastoma 2a 細胞에 미치는 영향을 알아보기 위하여 우선 韓藥物이 正常상태의 細胞에 미치는 독성효과와 hypoxiareoxygenation이 細胞 生存과 細胞死 정도를 파악하기 위한 실험을 실시하였다.

① 韓藥物이 正常의 N2a 細胞에 미치는 效果

韓藥物이 正常的인 狀態에서의 細胞에 미치는 효과를 조사하기 위하여 각기 1mg/ml 의 농도에서 MTT assay와 LDH assay를 실시하여 그 결과를 각기 Fig. 1 (A).와 (B).로 나타내었다. Fig. 1(A).에 나타난 바와 같이 MTT assay에는 정상군에 비해 약물이 투여된 경우 세포 환원활성도는 더 낮아졌다.

Fig. 1(B). LDH assay에서도 半夏를 제외하고 모든 한약물들이 정상군에 비해 약간 높거나 유사한 값을 나타내었다. 따라서 본 연구에 사용된 거의 모든 單味들이 정상적인 세포에는 세포증식이나 세포손상에 관여하고 있지 않다는 것을 의미하고 있다. 半夏의 경우 1mg/ml 의 농도에서 LDH assay의 결과는 그 자체로 세포사를 유발하기 때문에 차후의 실험에서 이의 효과가 감안되었다.

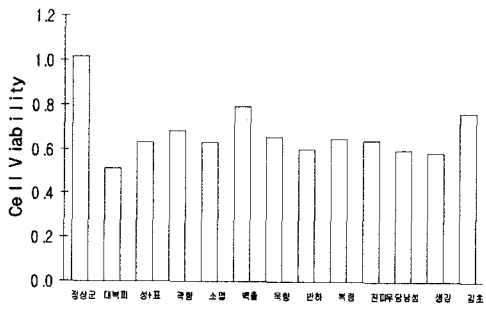

Fig. 1(A). Cell viability of mouse neuroblastoma 2a cell influenced by herbs

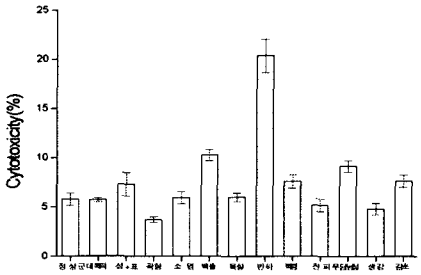

Fig. 1(B). Cytotoxicity of mouse neuroblastoma 2a cell influenced by herbs

② Hypoxia, reoxygenation이 細胞生存과 細胞死에 미치는 效果

세포의 생존과 사멸에 미치는 산소공급의 영향을 조사하기 위하여 여러 배양조건에서 실험을 실시하여 아래의 Fig. 2 (A)와 (B)와 같은 결과를 얻었다.

Hypoxia 조건에서 MTT assay로 확인한 결과 N2a 세포는 약 24 시간 동안 산소를 차단하였을 경우(H24), 세포의 증식속도에 아무런 영향을 주지 않았음이 관측되었으며, 산소의 차단이 48시간(H48)에 이르면 세포의 증식은 억제되어 같은 조건의 정상상태(N48)에 비해 세포가 25% 이상 감소되었음을 보여주고 있다.

Hypoxia 조건에서 LDH assay로 확인한 결과는 Fig. (B)와 같이 48시간 산소차단 시에 정상군에 비해 2.3배 이상 LDH활성이 증가되어 세포막의 심각한 손상이 일어났음을 보여준다.

한편 reoxygenation 조건에서 MTT assay의 결과는 24시간 산소차단 후 산소재공급은 아무런 영향을 주지 않았으며, 48시간 산소차단 후 산소재공급도 산소차단시의 결과에 별다른 추가적인 영향이 없었다.

하지만 같은 조건의 LDH assay는 48시간의 산소공급차단 후 추가적으로 6시간 산소재공급이 되었을 때 세포손상을 보여주었다. 이는 48시간의 산소공급차단 후 추가적인 산소의 재공급은 N2a 세포에 일정정도 세포사가 진행되었지만, 즉 세포수가 감소되었지만 전체 환원력의 변화는 없었다.

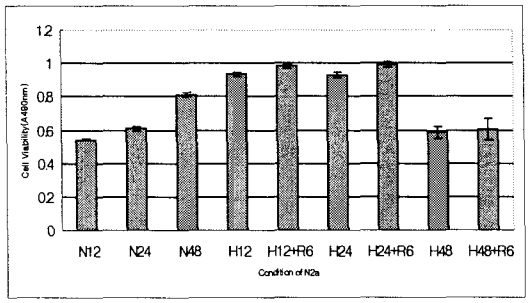

Fig. 2(A). MTT assay of hypoxia-reoxygenation injured mouse neuroblastoma 2a Cell.
N: normal condition, H: hypoxia condition, R: reoxygenation condition

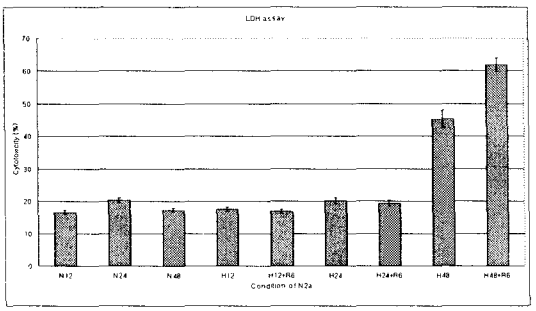

Fig. 2(B). LDH assay of hypoxia-reoxygenation injured mouse neuroblastoma 2a Cell.
N: normal condition, H: hypoxia condition, R: reoxygenation condition

2) 星香正氣散加蒲公英이 細胞損傷과 保護에 미치는 效果

星香正氣散加蒲公英은 hypoxia조건의 LDH assay에는 0에서 50μg/ml 사이에서 보호효과가 증대되고 50에서 500μg/ml 사이에서는 완만한 효과 증대, 그리고 500과 1,000μg/ml 에서 또 다른 급격한 효과 증대가 관찰되었으며, reoxygenation 조건의 LDH assay에는 50μg/ml까지 효과를 나타내다가 약 200-500μg/ml 에서 추가적인 효과가 있었다.

Reoxygenation 조건의 MTT assay에는 별다른 차이가 없었으며, hypoxia조건의 MTT assay에는 별다른 차이가 없었으나 100에서 500μg/ml 사이에서 활성도가 증가하였다.

Table 4. Effect of Sunghyangjungkisan-ga-pogongyoun on Cellular Viability and Cytotoxicity of Hypoxia-Reoxigenation Injured Mouse Neuroblastoma 2a Cell

(unit:μg/ml)

dose / assay	0	50	100	200	500	1000
LDHH	25.01± 2.9	19.26± 1.9**	18.27± 1.5**	17.69± 1.1**	16.13± 1.4**	9.69±1 .5**
LDHHR	42.06± 3.6	29.44± 2.9**	31.26± 2.8**	32.95± 2.4**	26.76± 2.6**	25.08± 1.4**
MTTH	0.75±0 .06	0.68±0 .1	0.63±0 .1	0.67±0 .1	0.74±0 .1	0.69±0 .0
MTTHR	0.62±0 .05	0.61±0 .1	0.61±0 .1	0.53±0 .0	0.59±0 .0	0.64±0 .0

all values are mean(S.D).
* : p<.05, ** : p<.01

3) 星香正氣散의 單味들이 細胞損傷과 保護에 미치는 效果

① Hypoxia 조건의 LDH Assay

Neuroblastoma 2a 세포주에 가해진 hypoxia에 의한 손상에 甘草 등 星香正氣散에 포함된 11개 單味가 미치는 효과를 연구하기 위하여 hypoxic 조건의 세포배양액에 유출된 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성을 조사하였다.

각 한약물은 최소 50 μg/ml 에서 1,000 μg/ml 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 한약물이 투여되지 않았을 때를 포함하여 그 결과는 Table 5와 Fig. 3에 요약되었다. Fig. 3.의 각 약물 0 μg/ml 에 보이듯이 정상적인 조건에 비해 hypoxia를 유발한 경우 세포의 약 25% 가 세포막 손상으로 인해 손상된다. Hypoxic 조건에 의해 유발된 세포손상에 대해 실험에 사용한 모든 약재는 일정정도의 LDH 활성감소를 보이고 있으며 즉 세포보호효과를 보이고 있다.

한약물의 농도의존 양태는 매우 다양한 양태를 보이고 있다. 藿香, 白朮, 蘇葉, 茯笭, 生薑, 大腹皮, 木香, 牛膽南星은 세포독성이 농도에 따라 지속적으로 감소되고 있는 현상을 보인 반면 甘草, 半夏, 陳皮의 경우 낮은 농도에서는 보호효과를

보이다가 농도가 500내지 1,000 μg/ml 에서는 오히려 세포독성이 증가하는 모습을 보이고 있다. 농도 의존적으로 보호효과를 보이는 약물 중에는 藿香, 茯苓, 生薑, 大腹皮, 木香, 牛膽南星은 농도가 50 μg/ml 에서 1,000 μg/ml 으로 증가함에 따라 보호효과가 완만하게 호전됨이 관찰되었는데 이는 약물의 유효성분이 약한 potency를 가지고 있음을 나타내고 있다. 하지만 농도의존적인 호전효과를 보인 약물 중 가장 유효한 경우 세포독성이 5 내지 10 % 까지 감소되기도 하는데 藿香의 경우 50 μg/ml 의 농도에서 10.8 ± 1.0 %이며 1,000 μg/ml 의 경우 2.5 ± 1.0 % 까지 감소하여 potency가 약함에서 불구하고 본 실험에서 가장 우수한 효과를 보였다. 그 외 牛膽南星과 大腹皮도 최대보호효과만을 고려하면 각기 5.6 ± 1.6 %, 6.9 ± 1.5 % 로 우수한 보호효과를 보였다.

보호효과를 보인 약물 중에 白朮와 蘇葉은 50 μg/ml 에서 이미 최고의 효과를 보이고 그 이상의 약물농도 증가는 추가적인 효과를 보이지 않았다. 즉 우수한 보호효과를 보임에도 불구하고 농도의존적인 양태를 보이지 않았다. 이들 약물은 유효성분의 potency가 매우 강해 낮은 농도에서도 보호효과를 보이는 성분이 있던지 혹은 유효성분의 함량이 매우 높아 효과가 이미 이들 농도에서 포화되었음을 의미한다. 따라서 이들 약물의 약리효과는 약학적인 관점에서도 추가적으로 연구할 만한 가치가 있다고 보인다. 이중 특히 白朮은 50 μg/ml 에서 세포독성이 8.6 ± 0.9 % 로 가장 우수한 효과를 보였다.

본 실험에 사용된 약물 중 甘草, 半夏, 그리고 陳皮는 낮은 농도에서는 보호효과를 보였지만 농도가 높아짐에 따라 효과가 오히려 감소되는 면을 보이는데 이는 이들 약물이 낮은 농도에서 보호효과를 보이는 성분과 높은 농도에서 세포독성을 보이는 다른 성분도 가지고 있기 때문으로 생각된다. 이러한 현상은 半夏의 경우 Fig. 1.에서 보이는 대로 정상세포에 관하여도 1,000 μg/ml 의 농도에서 세포독성을 나타내었기 때문에 hypoxia 조건의 세포에도 세포독성을 보일 수 있을 것이라는 예상과 일치하고 있다. 하지만 甘草와 陳皮의 경우 농도가 높을 때 정상세포에서는 독성을 보이지 않고 오직 hypoxic 조건의 세포에만 독성을 보이는 면이 흥미로운 결과이다. 일반적으로 식물의 추출액은 사포닌 등 세포막 용해 물질이 있는데 hypoxic 조건에서 세포막의 변화되고 이에 이들 물질이 작용했을 가능성도 있는데 半夏의 경우 이러한 설명이 가능하나 자세한 성분에 관한 연구가 더욱 진행될 수 있을 것이라 생각된다.

본 실험에서 보인 바와 같이 hypoxia에 의한 세포손상모델에서는 모든 약물이 일정 이상의 보호효과를 보였다. 하지만 hypoxia에서 두드러진 세포보호 효과를 보인 약물은 藿香, 白朮, 蘇葉, 牛膽南星로 집약될 수 있다.

Table 5. Effect of Herbs on Cytotoxicity of Hypoxia Injured N2a Cell.

(unit: μg/ml)

dose / herb	0	50	100	200	500	1000
GC	25.01± 2.9	10.3± 1.0**	21.3± 2.3	19.0±1. 4*	14.3± 2.7**	21.0± 3.1
KH	25.01± 2.9	10.8± 1.0**	8.75± 2.3**	5.93±1. 2**	3.63± 1.6**	2.54± 1.1**
DBP	25.01± 2.9	16.3± 2.2**	17.8± 0.7**	19.1±1. 4*	10.1± 3.1**	6.91± 1.5**
DMH	25.01± 2.9	17.7± 2.1**	19.4± 2.5*	17.9±3. 2**	17.9± 1.9**	13.2± 1.8**
BH	25.01± 2.9	15.8± 0.7*	17.5± 5.3	13.0±1. 3**	11.8± 1.1**	22.5± 5.6
BC	25.01± 2.9	8.56± 0.9**	9.37± 1.9**	12.7±2. 0**	9.75± 1.6**	10.6± 1.9**
BBR	25.01± 2.9	16.2± 1.3**	14.5± 1.2**	15.4±2. 0**	12.0± 2.1**	10.4± 0.8**
SG	25.01± 2.9	20.8± 1.9*	16.7± 1.0**	15.71±1 .1**	15.0± 1.4**	11.8± 1.3**
SY	25.01± 2.9	10.6± 1.8**	10.1± 1.6**	9.21±1. 5**	4.97± 1.1**	12.1± 2.8**
NS	25.01± 2.9	19.0± 3.4	17.0± 6.3	11.2±4. 0**	6.72± 3.3**	5.62± 1.6**
JP	25.01± 2.9	11.8± 1.7**	11.1± 1.4**	13.7±1. 4**	19.8± 1.6**	15.4± 1.2**

all values are mean(S.D).
* : p<.05, ** : p<.01

② Reoxygenation 조건의 LDH Assay

甘草 등 星香正氣散에 포함된 11개 單味가 neuroblastoma 2a 세포주의 reoxygenation에 의한 손상에 미치는 효과를 연구하기 위하여 세포 배양액에 유출된 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성을 조사하였다.

각 약물은 최소 50 μg/ml에서 1,000 μg/ml 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 약물이 투여되지 않았을 때를 포함하여 그 결과를 Table 6과 Fig. 4에 보였다.

Fig. 3의 dose 0에서 보이듯이 reoxygenation을 유발한 경우 hypoxia 조건의 세포에 비하여 약 42 %의 세포가 세포막 손상으로 인해 사멸한다.

Reoxygenation 조건에 의한 세포손상에 대해 실험에 사용한 모든 약재는 일정정도의 세포보호 효과를 보이고 있지만 그 양태는 hypoxia 조건에 비해서 더욱 다양한 양태를 보이고 있다.

半夏, 木香, 生薑, 茯苓은 초기 50 μg/ml 이상의 모든 농도에서 비슷한 정도의 세포독성을 보인 반면, 藿香, 陳皮, 蘇葉, 牛膽南星은 세포독성이 약물의 농도 증가에 따라 지속적으로 감소되지만 높은 농도의 한약물에서 약간의 증가를 보였다. 甘草, 白朮, 大腹皮는 cytotoxicity가 약물의 농도가 증가함에 따라 세포독성이 증감을 반복하는 양태를 보여 불규칙한 경향성을 보였다.

보호효과를 보인 약물 중에 半夏, 木香, 生薑, 茯苓은 실험에 사용한 전 범위의 농도에서 같은 정도의 효과만 보이며 농도의존적인 양태를 보이지 않았다.

이는 이들 약물의 유효성분이 매우 potency가 강해 50 μg/ml에서 이미 최고의 효과를 보였기 때문으로 보인다. 즉 이들 약물은 낮은 농도에서도 보호효과를 보이는 성분이 있던지 혹은 유효성분의 함량이 매우 높음을 의미하여 약학적인 관점에서도 고려해 볼만한 약물이다.

이 중 木香, 半夏, 茯苓은 우수한 보호효과를 보이며 木香은 14.5 ± 0.5 % (1,000 μg/ml), 半夏는 15.6 ± 1.6 % (500 μg/ml) 그리고 茯苓은 16.1 ± 0.7 % (500 μg/ml)의 효과를 보였다.

生薑은 21.8 ± 0.8 % (1,000 μg/ml)로 이 군의 다른 약물에 비해 약간 감소된 효과를 보였다.

藿香, 陳皮, 蘇葉, 牛膽南星은 저농도에서는 강한 효과를 보이지 않았으나 250내지 500 μg/ml까지 지속적으로 세포독성이 감소하다가 1,000 μg/ml 에 이르면 오히려 증가하는 경향을 보이고 있다. 그럼에도 불구하고 가장 세포독성이 감소된 정도를 고려하면 藿香은 10.5 ± 1.5 %(500 μg/ml), 蘇葉은 14.4 ± 2.0 %(500 μg/ml), 陳皮는 17.7 ± 1.2 %(200 μg/ml), 牛膽南星는 19.0 ± 0.7 %(500 μg/ml) 순으로 효과가 있었으며 이 중 藿香와 蘇葉는 상당정도의 세포사 보호효과가 있다고 평가되었고 藿香은 특히 reoxygenation 조건에서 가장 우수한 효과를 보여주었다.

甘草, 大腹皮, 白朮은 일정한 경향을 보이지 않지만 大腹皮의 경우 1,000 μg/ml 의 농도에서 14.7 ± 3.6 % 의 세포사를 보여 양호한 세포보호 효과를 보였다. 甘草와 白朮는 모든 농도구간에서 20 % 이상의 세포사를 보여 특별한 보호효과는 없는 것으로 생각되었다.

藿香, 陳皮, 蘇葉, 牛膽南星 등 약물이 고농도에서 세포독성이 외형상으로 증가하는 것은 다양한 이유가 예상되나 이들 약물의 경우 Fig. 1에서 보인 바와 같이 정상세포에서는 세포독성을 보이지 않다가, reoxygenation 조건에서 고농도일 경우 세포독성을 보이는 흥미로운 결과를 보이고 있다. 반면, 半夏의 경우 정상세포에서 hypoxia 조건에서 세포독성을 보였던 것과는 달리 reoxygenation 조건에서는 같은 농도구간에서 미미한 증가를 보이는데, 이것은 半夏의 reoxygenation 조건에서의 손상에 특별히 항산화 능력에 의한 세포보호 효과가 강하게 발현된다고 생각할 수 있다.

본 실험에서 보인 바와 같이 reoxygenation에 의한 세포손상모델에서는 모든 약물이 일정 이상의 보호효과를 보였다. 하지만 두드러진 효과를 보인 약물은 藿香, 半夏, 茯苓, 木香으로 집약될 수 있다.

Table 6. Effect of Herbs on Cytotoxicity of Reoxygenation Injured N2a Cell.

(unit: μg/ml)

herb \ dose	0	50	100	200	500	1000
GC	42.06±3.6	26.28±1.0**	30.21±1.8**	26.25±1.0**	22.51±2.2**	28.69±2.1**
KH	42.06±3.6	25.39±3.0**	18.75±1.3**	12.61±1.9**	10.52±1.4**	14.81±3.4**
DBP	42.06±3.6	28.13±3.2**	29.24±3.6**	31.01±3.9**	21.69±3.6**	14.68±3.6**
DMH	42.06±3.6	19.96±1.4**	18.17±1.7**	17.70±2.0**	17.32±1.1**	14.54±0.5**
BH	42.06±3.6	17.86±1.7**	18.96±1.2**	17.53±1.2**	15.59±1.6**	17.39±2.6**
BC	42.06±3.6	32.46±5.0*	25.20±2.0**	36.08±1.8	22.44±2.7**	23.50±2.0**
BBR	42.06±3.6	16.27±0.8**	16.79±0.9**	16.89±0.9**	16.13±0.7**	16.74±0.6**
SG	42.06±3.6	21.04±2.9**	25.60±0.9**	23.12±1.3**	22.91±2.8**	21.79±0.8**
SY	42.06±3.6	28.31±1.5**	17.72±1.7**	14.98±1.9**	14.44±2.0**	27.26±3.5**
NS	42.06±3.6	25.69±1.7**	27.30±2.1**	20.02±1.3**	19.03±0.7**	21.82±0.7**
JP	42.06±3.6	23.99±0.8**	18.39±0.7**	17.64±1.2**	18.89±0.5**	22.01±1.9**

all values are mean(S.D).
* : p<.05, ** : p<.01

③ Hypoxia 조건의 MTT Assay

甘草 등 星香正氣散에 포함된 11개 單味가 neuroblastoma 2a 세포주의 hypoxia에 의한 세포 환원활성 감소에 미치는 효과를 연구하기 위하여 3-(4,5-dimethyltiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 투여하여 세포에 축적된 formazan의 흡광도를 조사하였다. 각 약물은 최소 50 μg/ml 에서 1,000 μg/ml 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 약물이 투여되지 않았을 때를 포함하여 그 결과를 Table 7.과 Fig. 6에 보였다. Fig. 6의 각 약물 0μg/ml 에 보이듯이 정상적인 조건에 비해 hypoxia를 유발한 경우 세포 환원활성도가 약 0. 18 ~ 0.35 감소된다. hypoxic 조건에 의한 세포환원활성 감소에 대해 실험에 사용한 모든 약재는 대체로 경미하거나 부정적인 효과를 보이고 있으나, 그 양태는 매우 다양한 양태를 보이고 있다.

약물 투여 후의 활성도가 약물 투여 전에 비해 향상된 것은 甘草와 陳皮 뿐 이다. 대부분의 약물이 투여 후 활성도가 투여 전에 비해 개선되지 못하였는데, 약물의 농도증가에 따른 활성도 감소를 보인 것은 木香 半夏 白朮 茯笭, 生薑이었다. 이 가운데 半夏, 生薑, 茯笭은 약물의 농도가 증가함에 따라 활성도가 꾸준하게 저하되는 양상을 보여 이들 약물이 세포환원활성에 부정적으로 작용함을 나타내었다. 그러나 木香은 특이하게 500μg/ml 에서만 활성도 증가를 보였다. 이 외에 藿香, 大腹皮, 牛膽南星, 蘇葉, 白朮은 약물 농도 변화와는 무관한 활성도의 변화를 보였으며, 약물 투여 후의 활성도가 투여 전에 비해 개선되지 못하였다.

부정적으로 작용한 약물 운데 木香, 藿香은 500μg/ml 에서, 牛膽南星은 200μg/ml, 蘇葉은 500μg/ml 에서 다른 농도에 비해 활성도의 현저한 상승이 보였다. 특히 藿香와 牛膽南星은 비록 약물 투여이전 보다 낮은 활성이지만 藿香은 100-500μg/ml 에서, 牛膽南星은 50-200μg/ml에서 지속적인 활성도 상승을 보였다. 大腹皮, 白朮은 약물의 농도 증가에 따라 활성도가 점차 감소하였으나 大腹皮는 500μg/ml 이후 에서, 白朮은 1000μg/ml 에서 약간 상승하였다. 藿香, 牛膽南星, 大腹皮, 白朮은 일부 농도에서 활성도가 약간 증가하므로 적정 농도에서 활성도 증가효과를 내는 약효성분이 내재하리라 추정된다. 半夏 茯笭 生薑은 농도 증가에 따라 활성도가 계속 하강하였는데 半夏는 50-100μg/ml 에서, 生薑은200-500 μg/ml 에서 약간의 활성도 상승이 있었으나 미미하였고 茯笭은 한번도 활성도 상승을 보이지 않

고 계속 하강하는 양상을 보여 부정적인 경향이 가장 뚜렷하였다.

지속적인 활성도 증가경향을 보였는데, 이는 甘草의 유효성분이 완만한 potency를 가지고 있음을 의미한다. 甘草의 경우 0-50μg/ml 의 농도 구간과, 200-1000μg/ml 의 농도 구간에서 효과가 나뉘어 상승하는 현상을 보였다. 이는 甘草에 활성도를 향상시키는 서로 다른 두 가지 유효물질이 있음을 짐작케 한다. 陳皮는 200μg/ml 까지는 활성도 증가를 보이고, 농도가 200μg/ml 을 초과해서는 약물 투여 이전 정도로 활성도가 감소하는 현상을 보였다. 이러한 현상은 陳皮의 상반되는 약효성분을 가진 물질이 200μg/ml 를 기점으로 효과의 우열을 달리 한다고 판단된다. 甘草가 1000μg/ml 에서 0.95±0.1 를 기록하여 가장 높은 활성도를 보였고, 陳皮도 200μg/ml 에서 0.92±0.2 를 기록하였다.

陳皮, 甘草는 농도에 증가에 따라 활성도 증가를 보였다, 甘草는 약물의 농도가 증가함에 따라

본 실험에서 보인 바와 같이 hypoxia에 의한 세포손상 모델의 세포환원활성도는 약물 투여 후 대부분 저하되는 경향을 보였고, 陳皮와 甘草가 두드러진 활성도 상승효과를 보였다.

Table 7. Effect of Herbs on Cellular Viability of Hypoxia Injured N2a Cell

(unit: μg/ml)

herb \ dose	0	50	100	200	500	1000
GC	0.65 ±0.1	0.71±0.1	0.79±0.0	0.71±0.1	0.78±0.0	0.95±0.1**
KH	0.73 ±0.1	0.67±0.1	0.63±0.1	0.67±0.1	0.72±0.0	0.69±0.1
DBP	0.65 ±0.0	0.48±0.0**	0.44±0.0**	0.41±0.1**	0.47±0.0**	0.46±0.1**
DMH	0.81±0.1	0.67±0.1	0.66±0.0	0.63±0.1	0.74±0.2	0.60±0.1
BH	0.67 ±0.1	0.56±0.0	0.58±0.0	0.55±0.1	0.52±0.1	0.46±0.0**
BC	0.69 ±0.1	0.64±0.1	0.64±0.0	0.62±0.0	0.61±0.1	0.62±0.1
BBR	0.68 ±0.1	0.66±0.1	0.64±0.0	0.63±0.0	0.56±0.0*	0.50±0.0**
SG	0.69 ±0.1	0.49±0.0**	0.48±0.0**	0.45±0.1**	0.46±0.0**	0.42±0.0**
SY	0.88 ±0.1	0.73±0.1	0.71±0.1	0.70±0.1	0.77±0.1	0.71±0.1
NS	0.64 ±0.0	0.58±0.0	0.60±0.1	0.62±0.1	0.60±0.0	0.57±0.1
JP	0.75±0.1	0.76±0.2	0.80±0.1	0.92±0.2	0.83±0.1	0.74±0.2

all values are mean(S.D).
* : p<.05, ** : p<.01

④ Reoxygenation 조건의 MTT assay

甘草 등 星香正氣散에 포함된 11개 單味가 neuroblastoma 2a 세포주의 reoxygenation에 의한 세포환원활성 감소에 미치는 효과를 연구하기 위하여3-(4,5-dimethyltiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 투여하여 세포에 축적된 formazan의 흡광도를 조사하였다. 각 약물은 최소 50μg/ml에서 1,000μg/ml 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 그 결과는 Table 8.과 Fig. 7에 보여졌다. Fig. 7의 각 약물 0μg/ml 에 보이듯이 reoxygenation을 유발한 경우 hypoxia 조건의 세포에 비하여 세포 환원활성도가 약 0.38 감소된다. reoxygenation 조건에 의한 세포환원활성 감소에 대해 실험에 사용한 약재는 매우 다양한 양태의 반응을 보이고 있다. 약물 투여 이후 환원활성도가 감소하여 투여 이전 수준이하로 유지되는 경우는 大腹皮, 白朮, 生薑, 茯苓, 牛膽南星으로 이들 약물은 부분적으로 활성도 상승을 보

이기는 하지만, 모두 약물 투여 이전 이하 수준이기 때문에 부정적인 결과를 보인다고 결론지을 수 있다. 藿香, 木香은 저농도에서만 (50μg/ml 부근에서만) 유효한 활성도 증가를 보였고, 甘草, 蘇葉, 半夏, 陳皮는 약물 투여 이후 환원활성도가 증가하여 투여 이전 수준 이상으로 유지되었다.

부정적인 결과를 보인 약물 중에 大腹皮, 白朮, 牛膽南星는 500-1000μg/ml 의 고농도 구간에서, 生薑, 茯笭은 200-500μg/ml 의 구간에서 활성도가 상승되는 경향을 보인다. 이 가운데 大腹皮는 50μg/ml 부터 0.35±0.03까지 급격히 활성도가 저하되어 부정적인 약효가 강한 potency를 갖고 있음을 보여주었으며, 200μg/ml 에서는 0.28±0.011까지 저하되어 모든 약물 가운데 가장 부정적인 결과를 보였다.

유효한 반응을 보인 약물 중에 藿香은 50-100 μg/ml 에서 투여 전에 비해 활성도가 증가하였고, 木香는 50μg/ml 저 농도에서만 활성도가 증가하였다. 이들 약물은 다른 농도에서는 약물 투여 이전보다 활성도가 감소되어 있어, 이 농도에서의 작용하는 유효성분에 대한 검색이 필요하다. 투여 이전 수준 이상으로 유지되는 약물 가운데 甘草와 蘇葉은 0-50μg/ml 과 100-1000μg/ml 의 두 구간으로 나뉘어 효과를 보여 두 가지 서로 다른 두 가지 유효성분이 다른 구간에서 효과를 보인 것으로 추정할 수 있으며, 甘草와 蘇葉의 약물 농도 증가에 따라 지속적인 활성도 상승을 보여, 유효성분이 완만한 potency를 지님을 나타내었다. 그러나 甘草의 경우는 1000μg/ml 에서는 0.80±0.088에서 1.04±0.157로 급격한 증가를 보였다. 이러한 결과는 상이한 두 가지 유효성분이 甘草 내에 존재한다는 추정과 두 가지 유효성분이 서로 상승효과를 낼 수 있는 최적의 농도조건에 대한 연구의 필요성을 제기한다. 半夏, 陳皮는 50μg/ml 에서 이미 최고의 효과를 보여 유효성분이 매우 강한 potency가 있던지 혹은 유효성분의 함량이 매우 높음을 의미하였고 200-500μg/ml 에서는 활성도가 감소하는 경향을 보였다.

본 실험에서 보인 바와 같이 reoxygenation에 의한 세포손상 모델의 세포환원활성도는 약물 투여 후 藿香, 木香은 부분적인 상승을 보였으나, 대부분 저하되는 경향을 보였다. 그러나 甘草, 蘇葉, 半夏, 陳皮는 두드러진 활성도 상승효과를 보였다.

Table 8. Effect of Herbs on Cellular Viability of Reoxygenation Injured N2a Cell.

(unit: μg/ml)

herb \ dose	0	50	100	200	500	1000
GC	0.62±0.1	0.69±0.1	0.66±0.1	0.77±0.1	0.80±0.1	1.04±0.2**
KH	0.62±0.1	0.66±0.0	0.63±0.1	0.61±0.1	0.57±0.0	0.61±0.1
DBP	0.62±0.1	0.35±0.0**	0.29±0.0**	0.28±0.0**	0.34±0.0**	0.38±0.0**
DMH	0.62±0.1	0.64±0.1	0.50±0.0*	0.49±0.0**	0.50±0.1*	0.60±0.0
BH	0.62±0.1	1.02±0.0**	1.00±0.1**	0.88±0.1**	0.84±0.1**	0.94±0.1**
BC	0.62±0.1	0.62±0.1	0.55±0.0	0.46±0.0**	0.46±0.0**	0.55±0.1
BBR	0.62±0.1	0.58±0.1	0.49±0.0**	0.43±0.0**	0.50±0.1*	0.45±0.0**
SG	0.62±0.1	0.60±0.1	0.56±0.1	0.51±0.1	0.55±0.1	0.55±0.1
SY	0.62±0.1	0.64±0.0	0.55±0.0*	0.63±0.0	0.63±0.0	0.72±0.0**
NS	0.62±0.1	0.59±0.0	0.51±0.0*	0.46±0.1**	0.46±0.0**	0.57±0.1
JP	0.62±0.1	0.69±0.0	0.64±0.0	0.58±0.1	0.52±0.1	0.62±0.0

all values are mean(S.D).
* : p<.05, ** : p<.01

4) 結果의 藥物別 槪括

Hypoxia 조건의 LDH assay (LDHH), reoxygenation 조건의 LDH assay(LDHHR), hypoxia 조건의 MTT assay(MTTH), reoxygenation 조건의 MTT assay(MTTHR) 4가지 실험의 약물별 효과를 간략하게 정리하면 아래 표(Table 9)와 같다.

Table 9. The Summary of The Experiments.

實驗 \ 藥材名	LDHH	LDHHR	MTTH	MTTHR
SHJG+P	○	○	X	△
DBP	○	○	X	X
KH	○	○	X	△
SY	○	○	X	○
BC	○	○	X	X
DMH	○	○	X	△
BH	○	○	X	○
BBR	○	○	X	X
JP	○	○	○	○
NS	○	○	X	X
SG	○	○	X	X
GC	○	○	○	○

○ means positive effect.
△ means negative effect.
X means no change or partial effect.

Ⅳ 考 察

痴呆는 기억력 사고력 지남력 이해력 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등 지적기능의 전체적 장애를 포함하는 뇌질환에 의한 임상 증후군이다[31]. 痴呆는 가장 대표적인 노인성 질환으로, 우리나라도 급속히 노인층 인구가 증가함에 따라 질환의 발병율이 더 증가할 가능성이 있고, 노인성 질환이라는 관점에서 경제적, 사회적 자원의 손실이 클 것으로 예상된다.

痴呆의 類型에는 알츠하이머형 痴呆, 血管性 痴呆, 中毒性 痴呆 등이 있으며 이 중에서 알츠하이머형 치매는 50% 이상을 차지하고 있고, 血管性 痴呆는 20-30% 정도이며, 女性이 男性에 비해서 2-3배정도 더 발병하는 것으로 알려져 있다[31].

알츠하이머형 치매의 病因에 관해서 유전학적 가설, 아세틸 콜린 대사 장애설, 면역기능 장애설, 알루미늄 중독설 등이 주요한 병인으로 받아들여지고 있지만 아직 확실히 밝혀진 바가 없는 가운데, 痴呆의 대부분을 차지하는 알츠하이머형 痴呆와 혈관성 痴呆의 병리에 산소 부족과 산화적 스트레스가 중요한 병리과정의 하나로 주목받고 있다[4]. 혈관성 痴呆는 腦虛血에 의한 괴사와 再灌流시에 나타나는 산화성 손상에 의해 괴사와 자연사가 나타나며, 알츠하이머형 치매는 활성산소 과잉과 항산화능력의 저하에 의한 뇌신경세포의 파괴가 중요한 병리기전으로 제안되고 있다[5]. 병소부위에서 발견되는 병리학적 소견을 중심으로 살펴본 알츠하이머형 치매의 유발원인을 살펴보면 amyloid β protein (이하 Aβ)의 침적으로 생기는 노인반(Senile Plaques, SPs)의 신경독성으로 신경세포사(neuronal cell death)를 일으키는 것과 과인산화 타우 단백질(hyperphosphrylati-on tau protein)의 침적에 의한 신경섬유다발(neurofibrillary tangles; NFTs)의 작용으로 신경퇴행 (neurodegeneration)을 일으키는 것이 대표적인데[32-34], 이러한 병리 과정에 활성산소에 의한 산화성세포손상이 중요한 역할을 하는 것으로 연구 되고 있다. 활성산소종에 의한 세포의 손상과 알츠하이머형 痴呆에 관하여 Anne Ekert[35], John P. Blass[36]의 연구가 있는데, 그 내용은 in vitro 실험에서 Aβ에 의해 산화성 세포 손상이 유발되면, 그 결과로 세포 괴사와 자연사가 모두 일어나며, 이때 응집된 Aβ에 의해 세포 파괴로 염증이 유발되고 IL-1, IL-6 등의 inflammatory mediators가 nitric oxide radicals (NO)을 생성하여 다시 과산화가 일어나며 이에 의한 Aβ 응집반응이 강화되는 악순환이 일어난다는 것이다.

이 과정에서 Aβ에 의해 일어나는 미토콘드리아의 손상에 의해서 두 가지 방향으로 피해가 일

어난다. 첫째는 DNA의 손상이 일어나고 그 결과로 세포의 자연사가 유발된다는 것이고, 둘째는 acetylcholine 부족으로 신경전달이 일어나지 않는다는 것이다. 미토콘드리아는 활성산소를 만들어내는 주요한 source인 동시에 활성산소의 공격을 받는 주요한 대상이 된다. 고농도의 활성 산소종에 의해 세포내의 미토콘드리아가 쉽게 노출되고 손상 받으며, 이러한 기전에 의한 세포사는 신경전달 실조와 뇌신경세포의 자연사 (cell apoptosis), 신경퇴화를 유발하여 알츠하이머형 치매를 야기한다. 미토콘드리아 내 ATP 생성과정에서 cytochrome이 전자 이동에 관여하는데 cytochrome이 변질되면 이 위를 지나는 산소가 전자 하나를 잃어버리면서 유해산소로 변하고 에너지는 생성되지 않게 된다. 이 유해산소가 미토콘드리아내 단백질을 변질시키면 신경세포의 자연사가 유발되고 미토콘드리아의 에너지 생성이 현저히 저하되어 신경세포는 절대적 에너지 결핍 상태에 놓이게 되며, 에너지가 부족하면 acetylcholine도 만들어지지 않게 된다[37].

血管性 痴呆의 경우 腦血管의 病變으로 腦의 器質性 障碍에 의해서 일단 유발된 知的機能이 지속적으로 저하된 상태를 말하는 것으로 대다수는 腦卒中 後에 나타난다. 腦卒中에 의한 腦神經細胞의 損傷은 虛血로 야기되는 산소부족에 의한 것과 再灌流시에 나타나는 활성산소에 의한 것이 있는데, 대부분의 腦虛血은 일시적이며 腦虛血 당시보다는 再灌流시에 산소가 조직으로 재공급될 때 활성산소가 생성되어 조직 손상이 더욱 강하게 일어난다. 뇌의 虛血상태에 기인하는 산소부족은 산화적 인산화과정을 방해하며 ATP 생성을 저해한다. 그 결과 세포의 이온 펌프 능력이 감소되고 칼륨이 세포외로 흘러나와 탈분극화 현상이 일어나며 신경세포내로 칼슘이 유입되며, 칼슘의 유입은 미토콘드리아 기능에 장애를 가져오고 ATP합성은 더욱 저하되면서 단백질, 핵산, 인지질을 가수분해하는 효소들을 활성화한다. 특히 인지질의 분해는 신경손상을 야기시키는 생성물, 즉 유리 라디칼을 생성하고 지질의 과산화가 腦虛血 발생시 조직손상과 신경세포 괴사에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[38,39]. 再灌流시에 나타나는 세포손상은 산화성 손상에 의한다. 虛血 상태시 세포내에 축적된 hypoxanthine이 xanthine oxidase에 의하여 xanthine과 uric acid로 전환되면서 매우 독성이 강한 superoxide anion radical을 생성하고 연쇄적으로 활성산소들을 생성함으로서 세포막의 인지질에 작용하여 과산화시켜 막의 구조변형과 기능 상실을 유발하므로 조직손상을 일으킨다[40,41].

현재까지의 서양의학에서의 痴呆에 대한 치료방법으로는, 우선 비약물적 처치로서 행동지지방법이 있고, 신경이완제, 진정제, 항불안제 등을 사용하여 행동 증상을 막는 방법과 기억력과 인지능력을 유지시키는 약물을 병행하는 요법 등이 있다. 痴呆 증상에 대한 근본적인 치료인 인지기능을 개선시킬 목적으로 많은 약물이 開發되었으나, 실제 임상적 효과는 기대에 미치지 못하는 실정으로 痴呆환자에서 나타나는 이차적인 정신증상인 불안, 망상, 초조, 불면, 행동장애를 개선하는 약물치료가 주종을 이루고 있다[42].

현재까지 알츠하이머형 치매의 병인론적인 규명이 명확치 않기 때문에 치료목표도 더 연구되어야 하는데, 알츠하이머형 치매치료에 사용되는 약물들의 계열에는 cholinergics and cholinominetics, 뇌기능 개선제(Nootropics), 뇌혈관 확장제, 정신계 약물(항우울제, 신경안정제), 마약 길항제(narcotic antaonists), 항염증제, 항산화제, 비타민, 산소증가제, 칼슘길항제, 알미늄해독제, 에스트로겐, 신경성장인자 등이 있으며, Acetylcholine deficiency 가설에 따른 acetylcholine esterase inhibitors가 사용된다. 또 알츠하이머형 치매에서는 학습과 기억에서 중심적인 역할을 하는 cholinergic system에 많은 기능 실조와 신경세포의 손실이 일어난다는 사실에 기인하여 Cognex/tacrine hydrochloride(Parke-Davis), Arizept/ donepezil(Pfizer)가 cholinesterase enzyme inhibitor로서 치료에 사용되고 있다. 그리고 알츠하이머형 치매에서는 대량의 synaptic loss neuronal degeneration가 있으므로 신경세포의 성장과 활성을 촉진하는 NGF(neuro growth factor)가 치료의 의미있는 대상이 된다.

이 외에 알츠하이머형 치매에 관한 가장 많은 연구가 진행되어 온 방향은 AβPP(Aβ precursor protein)의 대사과정으로 Aβ의 생성을 막는 것이 그 목표이다. 그러나 많은 연구에도 불구하고 중

심 역할을 하는 효소를 아직까지 확실히 밝히지 못하여서 이 과정에 특이적으로 작용하는 약물을 발명하는 것이 아직은 불가능하다. 한편, 비타민 E(α-tocoperol), the pineal hormone melatonin, the lazaroids(21-aminost-eroid) or mifepristone(RU486)와 같은 수많은 항산화제들이 알츠하이머형 치매를 치료하기 위하여 실험되고 있으나 대부분 아직은 임상에서 입증되지는 못하고 연구단계에 있다. 단 비타민 E는 6개월간에 투여로 알츠하이머형 치매의 발병율을 낮추는 성공적인 임상례를 나타내었다[35]. 또한 비스테로드성 항염증약(Non-steroidal anti inflammatory drugs; NASIDs)이 알츠하이머형 치매의 발병을 감소시키거나, 병의 진행을 지연시킨다는 사실이 확인되었다[42]. NASIDs의 가장 두드러진 역할은 COX(Cyclooxygenases)와 lipooxygenases를 차단하여 prostaglandin 합성을 막고 ROS 형성을 차단하는 것이다.(Breitner, 1996) 이외에도 여러 소염제들이 임상에서 알츠하이머형 치매 환자들에게 시험되고 있는데, 이 가운데에 glucocorticoid, anti-malaria drugs, colchicine 이 알츠하이머형 치매 치료 약물로서 유력하게 주목받고 있다[35]. 알츠하이머형 치매 치료제로서 FDA에서 승인받은 약물 가운데 tactrine과 donepezil이 가장 먼저 사용되어 왔으나, 효과가 탁월하지는 못하며 부작용 문제가 있어 투약에 신중을 기하고 있는 현실이고[42], 이보다 발전된 약물로 2000년 이후에 rivastigmine, galatamine, 2004년 memantine이 痴呆치료재로서 FDA의 승인을 받아 사용되고 있다.

한의학에서 痴呆에 관해서는 明代 張[43]이 [景岳全書·雜證謨]의 癲狂篇에 '痴獃'라는 病名을 따로 설명하였고, 內經과 歷代醫書에서도 健忘 등으로 유사한 내용을 언급하였다[44,45]. [景岳全書] 이후로 [石室秘錄][46],[辨證奇聞全書][47]에서 찾아볼 수 있는데, [石室秘錄]에서는 祛痰爲主의 治法을 강조하여 二陳湯. 逐呆仙丹을 處方으로 提示하였고, [景岳全書]에서는 補心脾 위주의 治法을 강조하며 七福飮, 大補元煎을 활용하였고, [辨證奇聞]에서는 開鬱逐痰하고 健胃通氣하여 祛痰시켜야 한다 하여 處方으로 洗心湯을, [丹溪心法][48]에서는 健忘에 歸脾湯, 定志丸을 處方으로 提示하였다.

최근 中醫學에서 痴呆를 辨證施治하여 治療하는데, 그 原因은 痰飮, 稟賦不足, 肝腎不足, 心腎不交, 七情傷 등으로 요약되며, 症狀은 善忘善恐, 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不言, 不飮不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이며[49-51] 腦血管性 痴呆의 症狀은 一般的 痴呆症狀과 함께 半身不遂, 言語蹇澁, 口眼喎斜[52]등의 中風症狀이 나타난다. 中醫學의 痴呆 治法은 老人性과 血管性 痴呆 모두에 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등의 방법을 적용하는데, 李[53]는 疎肝養血, 活血健腦, 淸熱利濕, 理氣活血, 平肝息風, 淸熱化痰, 滋補肝腎, 活血養腦등의 방법을 提示했고, 許[54]는 補益腎精, 補陽心身, 平肝潛陽, 滌痰開竅法을 提示하였다. 특히 血管性 痴呆의 경우에는 痰飮과 瘀血[55-56]에 대하여 심층적으로 辨證施治하였다. 痰飮의 원인은 肝陽痰熱 痰爲濁邪 因風而上 痰有虛致 固本杜源 등으로 平肝息風 淸熱化痰 瀉火安神 化痰息風 塡髓通竅 등의 치법을 활용하였고, 瘀血의 원인은 氣虛血瘀 陰虛氣滯 등으로 益氣化痰 健腦去風 養陰生津 疏肝理氣 등의 치법을 활용하였다. 國內에서는 辨證施治에 따른 治療 外에 四象醫學의 處方으로 調胃升淸湯과 荊防地黃湯이 사용되고 있다[59].

최근의 韓醫學의 痴呆연구를 보면, 加減固本丸[10], 天王補心丹[9], 石菖蒲[6], 日黃連[7], 香附子[8]이 PC-12 cell에서 AchE, NOsⅡmRNA, APP, PS-1 PS-2의 발현과 AchE의 활성을 억제하고, Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 백서의 혈청 glucose 증가, uric acid의 감소, AcheE 활성도 감소 및 Morris water maze에서 기억력 개선 효과가 있음이 보고 되었고, 채 등[60]은 山査肉이 PC-12 cell에서 AchE, IL-1β, IL-6, APP, GFAP mRNA의 발현과 AChE의 활성을 억제하고, CT105로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델 흰쥐의 기억력을 개선하고 Micoglial cell에서 IL-1β, TNF-α의 발현과 ROS, NO의 생산을 억제하였으며 뇌조직의 허혈상태를 개선하고 허혈로 인한 뇌조직 손상을 억제하는 효과가 있음을 보고하였고, 박[61]은 老化로 인해 유발된 痴呆動物들을 대상으로 調胃升淸湯과 荊防地黃湯을 投與實驗하여 韓藥物이 作業記憶 혹은 短期記憶이

損傷된 痴呆患者에게 임상적으로 적용될 수 있는 지지증거를 확보 하였다. 임상실험에서는 조[13]와 김[14]이 초기 DAT환자에게 6개월과 9개월간 調胃升淸湯을 투여하고 치료전과 치료후에 K-DRS, ERP를 측정한 연구에서 調胃升淸湯의 유효성이 입증하였다.

星香正氣散은 한국에서 急性期 中風에 가장 많이 사용되고 있는 처방 중에 하나로서 중풍의 진행을 억제하고 운동기능을 회복시켜주는 효과가 있는 것으로 알려져 있다[16]. 본 논문은 星香正氣散加蒲公英과 처방을 구성하는 일부 單味들을 각기 실험하였다. 蒲公英은 中樞神經系에 抗炎症 作用을 하여[62], 星香正氣散加蒲公英을 腦의 神經變性 疾患에 사용하고 있는데, 星香正氣散加蒲公英은 알츠하이머형 치매의 병리과정에 있어 응집된 Aβ에 의해 세포 파괴로 염증이 유발되고 IL-1, IL-6 등의 염증 매개물질들이 nitric oxide radicals(NO)을 생성하여 다시 과산화가 일어나며 이에 의한 Aβ 응집반응이 강화되는 악순환을 억제한다는 연구보고가 있다[17]. 星香正氣散은 星香散과 藿香正氣散을 합방한 처방으로서 卒中風으로 人事不省이 되었다가 覺醒한 후, 이 藥을 服用시켜 氣를 調理한다. 星香散은 牛膽南星, 木香을 粉末한 처방으로 中風의 痰盛으로 滯痞하고 不渴한 것을 다스린다. 藿香正氣散은 外感과 內傷을 다스리며, 肥人 痰涎壅盛을 다스리는 처방으로 肥人이 中風이 많은 것은 氣가 外盛內虛한 까닭이요, 氣는 肺가 主하니 氣急하면 반드시 肺盛하여 肝木을 剋하게 되고, 膽은 肝之腑이니 痰涎이 甚盛해지기 때문에 반드시 利氣를 먼저 해야 하고, 利氣하려면 藿香正氣散을 써야 한다. 까닭에 本方은 中風에 氣味盡順하고 痰未盡絳하였을때 調理之劑로 쓰는 것이다[63].

星香正氣散의 個別 藥劑에 대한 本草學的 效能[64]을 살펴보면 다음과 같다. 藿香은 脾, 胃, 肺經에 들어가 芳香化濕, 化中止嘔, 發表解暑하여 兼治表裏하며, 白芷는 肺, 胃, 大腸經에 들어가 散風除濕, 通竅止痛, 消腫排膿하며, 紫蘇葉은 肺, 脾經에 들어가 解表散寒, 解肌寬中하여, 藿香, 白芷, 紫蘇葉은 寒邪를 溫散하고 利膈表邪發散하며, 芳香으로써 濁氣를 化한다. 桔梗은 肺經에 들어가 宣肺利咽, 祛痰排膿하고, 脾,胃,肺,大腸經에 들어가 行氣燥濕, 絳逆平喘하고, 大腹皮는 脾, 胃, 大腸, 小腸經에 들어가 下氣貫中, 行水消腫하여 桔梗, 厚朴, 大腹皮는 氣를 조절하고, 消脹除滿行水한다. 半夏는 脾, 胃, 肺經에 들어가 燥濕化痰, 絳逆止嘔하고, 陳皮는 脾, 肺經에 들어가 理氣, 調中, 燥濕, 化痰하고, 生薑은 肺, 脾, 胃經에 들어가 解表散寒, 溫中止嘔, 化痰止咳하여 半夏, 陳皮 生薑은 降逆하여 除濕化痰하고, 裏滯疏通한다. 茯苓 白朮 甘草 大棗는 健脾祛濕하고 精氣를 補한다. 牛膽南星은 南星에 牛膽汁을 加하여 製造한 것으로 肺, 肝, 脾經에 들어가 淸熱化痰, 祛風止痙하고, 木香은 肺, 肝, 脾經에 들어가 行氣止痛, 溫中化胃한다. 살펴본 바와 같이 星香正氣散과 星香正氣散을 구성하는 單味들의 효능은 利氣, 去痰하는 痴呆治法에 부합하는 것으로 판단된다.

한편, 星香正氣散에 대하여는 이[18]가 배양된 血管 內皮細胞에서 산화성 세포 손상에 미치는 星香正氣散의 보호 효과를, 박[17]이 신생 흰쥐의 뇌 성상세포와 소교세포를 분리 배양하여 腦虛血 성상세포에서 星香正氣散加蒲公英에 의해 알츠하이머형 치매의 신경병리와 밀접한 관련이 있는 TNF-α와 IL-1 및 Aβ와 IL-1β 유도성 TNF-α의 생성을 억제하는 뚜렷한 효과가 있음을 보고하였다. 또한 예[21]가 星香正氣散이 腦 虛血을 유발시킨 白鼠의 神經傳達物質에 미치는 영향을, 이[19]가 星香正氣散이 白鼠의 血壓, 局所腦血流量 및 腦軟膜動脈에 미치는 영향에 대하여, 박[20]이 星香正氣散이 NOS Inhibitor 투여에 의한 쥐의 學習 및 記憶力障碍에 미치는 영향에 대하여 보고하였다. 임상연구로는 배[65]가 閉鎖性 腦卒中에 대한 임상적 연구에서 星香正氣散의 效能을, 임[66]이 星香正氣散이 腦浮腫에 미치는 임상적 연구를 제시하였고, 최[67]는 急性期 中風患者 94례에 星香正氣散을 2주간 투여하여 中風進行을 抑制시키는 效果와 有意한 水準의 運動機能好轉을 確認하였다. 이상의 연구 결과들은 星香正氣散이 腦의 血流 및 學習能力에 향상을 가져오며, 血管 및 神經細胞의 酸化性 損傷에 양호한 효능이 있으므로, 痴呆 治療에 양호한 효능이 있을 것으로 판단된다.

Hypoxia-reoxygenation에 의한 腦神經細胞의 損傷過程은 生體에서 腦虛血과 虛血後의 再灌流에 의한 損傷을 세포실험으로 재현한 것이다. 腦

虛血에 의한 細胞損傷은 산소 공급이 역치 이하로 감소되면 기능상실과 더불어 세포괴사(necrosis)가 나타난다[1]. 그러나 대부분의 腦虛血은 일시적이며 腦虛血 당시보다는 再灌流시에 산소가 조직으로 재공급될 때 급속히 활성산소가 생성이 증가되므로 조직 손상이 더욱 강하게 일어난다[2]. 활성산소에 의한 세포의 피해는 괴사(necrosis)와 자연사(apoptosis)라는 두 가지 형태로 나타난다[68]. 활성산소에 의한 괴사는 speroxide anion radical이 연쇄적으로 활성산소들을 생성함으로서 세포막의 인지질에 작용하여 일어난다[32,33]. Apoptosis는 특징적으로 세포핵의 변화, 크로마틴의 생화학적 변화를 동반하며, 암, 뇌질환 등 여러 질병에 영향을 미치는데, apoptosis가 유발되는 과정에 있어 미토콘드리아가 중요한 역할을 한다. 미토콘드리아는 활성산소를 만들어내는 주요한 원인인 동시에 활성산소의 공격을 받는 주요한 대상으로, 고농도의 활성산소종에 의해 세포내의 미토콘드리아가 쉽게 노출되고 손상 받아 미토콘드리아의 막전위가 감소되면 early apoptosis가 유발된다. 이러한 기전의 세포사는 신경전달 실조와 신경퇴화를 유발하여 알츠하이머형 치매를 포함한 신경퇴행성 뇌질환을 야기한다[35].

활성산소를 생성시키는 대표적인 인자로 xanthine oxidase가 보고되어 있는데 xanthine oxidase는 생체 대부분의 조직세포에 분포하고 있으며 주로 산화반응을 촉매하는 것으로 알려져 있다. 이 효소에 의해서 산화반응이 진행되는 동안 분자상의 산소로부터 superoxide anion radical이나 hydroxyl radical 같은 활성산소들이 생성되어진다. 再灌流시에는 虛血 상태시 세포내에 축적된 hypoxanthine이 xanthine oxidase에 의하여 xanthnie과 uric acid로 전환되면서 매우 독성이 강한 superoxide anion radical을 생성하고 연쇄적으로 활성산소들을 생성함으로서 세포막의 인지질에 작용하여 과산화시켜 막의 구조변형과 기능상실을 유발하므로 조직손상을 일으킨다[39,40].

Hypoxia-reoxygenation에 의한 腦神經細胞의 損傷에 한약물이 미치는 영향을 평가하기 위하여 LDH assay와 MTT assay를 사용하였다. LDH(lactate dehydrogenase)는 세포질에 존재하는 효소로서 정상의 경우 세포막을 투과하지 않지만, 세포막이 손상을 입을 경우 세포 밖으로 분비되므로 LDH의 활성이 줄어들었다면 산소에 의한 세포막 손상을 보호한 효과가 있다고 결론지을 수 있다. 즉 세포막 파괴로 결론지어지는 세포의 괴사를 막는 효과가 있다고 볼 수 있다[30]. MTT assay는 MTT가 세포내로 들어가 효소들에 의해 환원되어 formazan이라는 물질을 만드는데 이것의 용해도가 아주 좋지 않기 때문에 세포내에 축적된다. 이 축적된 물질의 량은 세포가 얼마나 잘 환원시킬 수 있는지를 보여주는 것으로 미토콘드리아와 소포체의 능력을 이용하는 검사법이다. 이러한 점에 근거하여 본 실험에서 LDH assay는 hypoxia-reoxygenation에 의한 뇌신경세포의 괴사 정도를 측정하는 방법으로 사용되었으며, MTT assay는 주로 산화성 손상을 입은 세포의 항산화능력을 평가하는데 사용되었다. MTT assay상의 수치의 증가는 세포의 산화성손상의 감소와 산화성 손상과정에서 주로 미토콘드리아를 매개로하여 야기되는 apoptosis의 발현을 억제한다고 해석할 수 있다. 전에는 이 결과를 세포가 증식했다는 식으로 해석하기도 했는데[69] 이유는 formazan의 형성이 주로 미토콘드리아에 있는 환원효소에 의한 것이라고 가정했기 때문이다. 미토콘드리아에는 일정량의 효소가 있을 것이고 이 효소량이 증가했다는 것은 미토콘드리아의 수가 많다 즉 세포수가 많다는 의미를 가진다. 그래서 한약물을 조사할 때 한약물의 투여시 MTT 값이 높게 나오면 세포수가 상대적으로 높다 즉 세포를 보호했다는 뜻이 되는 것이다. 하지만 최근 논문에 큰 변화가 생겼는데 이 환원반응이 미토콘드리아에서 일어나는 것은 일부분이고 lysosome 등 다른 소포체에 의한 것들도 상당량 있다는 것이다[70]. 이러한 이유로 MTT의 증가가 세포보호로 해석되지 않고 세포의 환원활성 증가로 해석된다.

星香正氣散과 관련된 기존의 연구에는 痴呆의 腦神經細胞損傷 중 괴사와 자연사에 대한 星香正氣散加蒲公英의 효과를 비교 연구한 것은 없었다. 따라서 본 연구에서는 痴呆의 대부분을 차지하는 알츠하이머형 치매와 血管性 痴呆에서 산소

부족과 활성산소에 의한 세포손상이 있다는 점에 근거하여, 이들 한약물이 산소 공급 차단에 의한 세포사와 차후의 산소 재공급에 의한 세포사 및 세포환원활성의 저하에 미치는 효과를 검토하여 임상적 효과를 설명할 수 있는 기전을 제공하고자 본 실험을 실시하였다. 아울러 星香正氣散을 구성하는 일부 單味에 대하여도 같은 효과를 검토하므로써 한약물의 기전에 관한 연구방향을 제시할 뿐 아니라, 임상에 適用頻度가 높은 處方인 星香正氣散을 구성하는 약물을 검색함으로써 개별 약물의 효능 검색을 효과적으로 할 수 있으며, 유효성이 높은 약물을 선별하여 차후 신약개발에 기초 자료를 제공할 수 있을 것이다.

이에 저자는 사전 실험으로서, Mouse neuroblastoma 2a 세포를 대상으로 한약물이 정상세포에 미치는 효과를 조사하였고 hypoxia-reoxygenation이 세포생존과 세포사에 미치는 영향을 조사하였으며, 본 실험으로서 한약물이 hypoxia와 reoxygenation의 조건에 의해 나타난 세포손상에 미치는 효과를 조사하였다. 실험의 hypoxia 처리된 경우와 reoxygenation 처리된 경우 모두 세포의 환원활성 (MTT assay)과 세포손상(LDH assay) 정도를 측정하였다.

첫 번째 사전실험에서 정상 N2a세포에 미치는 한약물의 효과는 거의 모든 單味들이 세포증식이나 세포손상에 관여하고 있지 않다는 결과를 보여주었다. 단, 半夏의 경우 in vitro와 높은 농도(1mg/ml)에서 세포손상을 나타내었다. 이것은 半夏가 가지는 saponin 계열의 화합물이 과량일 경우 일종의 세척제로 작용하여 세포막에 손상을 가하고 이로 인하여 세포질에 있는 LDH가 배양액으로 유출된 것으로 판단된다.

두 번째 사전실험인 세포의 생존과 사멸에 미치는 산소의 영향을 조사하기 위한 실험에서는 48시간의 산소공급차단은 세포내 환원 효소의 활성과 세포막의 손상에 큰 영향을 주지만 추가적인 산소의 재공급은 환원효소의 활성에는 큰 영향을 주지 않고 세포막의 손상만 유발하는 결과를 보였다. 결과를 자세히 살펴보면 산소의 차단 후 재공급시 약물이 없을 경우 LDH가 다시 증가한 것을 알수 있다. 이는 세포가 죽어간다는 것을 의미하는데 즉 생존해 있는 세포의 수는 줄어들었고 이때 MTT는 별 변화가 없었다. 실험상 죽은 세포는 제거하고 assay를 한 것이기 때문에 실제 수가 줄어든 세포가 줄어들기 전의 formazan 형성능력과 유사한 능력을 가지고 있음을 말하고 있고 이는 각 세포당 formazan형성능력이 증가된 것을 의미한다. 즉 생존한 세포의 환원능력이 향상된 것을 의미한다. 이는 산화성 손상이 세포에 손상을 줄 뿐 아니라 세포의 항산화 능력을 유발한다는 연구결과와 일치한다[35]. 사전실험의 48시간 산소차단에서 세포의 유의한 변화가 나타난 결과에 따라 본 실험에서는 48시간 산소차단 조건을 부여하였다.

본 실험의 결과를 살펴보면, hypoxia조건의 MTT assay에서 전반적으로 수치상 별다른 상승을 보이지 않았는데, 이 것은 星香正氣散加蒲公英과 單味들이 괴사한 세포에는 별다른 작용을 할 수 없었고, 생존한 세포에도 역시 별다른 작용을 하지 않았다는 것이다. hypoxia조건에서 생존한 세포들이 미토콘드리아의 기능이 저하되는 피해를 입어 정상세포에 비해 환원활성이 감소되었을 상태에서, 한약물들이 대체로 환원활성 증가에 별다른 효과가 없다는 것이다. 다만, 陳皮와 甘草에서는 유의한 효과가 관찰되어 추가적인 확인과 연구가 필요하다.

Hypoxia 조건의 LDH assay에서 星香正氣散加蒲公英과 모든 單味들이 유의한 효과를 나타내었다. 이 것은 산소부족에 의한 세포괴사방지에 효과가 있다는 것이며, 星香正氣散이 中風 急性期의 치료처방인 점과 일치하는 결과이다. 또한 알츠하이머형 치매의 경우 Aβ가 혈관벽에 침착되어 뇌의 국소부위에 저산소증 소견을 보이며, 혈관성 痴呆의 경우 중풍 후에 유발되는 경우가 많으므로 星香正氣散加蒲公英과 單味들이 알츠하이머형 치매와 혈관성痴呆의 腦虛血로 인한 세포괴사 방지에 임상적으로 활용될 수 있으리라 판단된다.

Reoxygenation 조건의 MTT assay에서도 약물들의 반응 경향은 수치상 별다른 상승을 보이지 않은 경우가 많았다. 약물을 투여하지 않은 reoxygenation에서는 실제적으로 생존한 세포의 환원활성이 hypoxia때보다 약간 상승하였는데 약물 투여가 대체로 반응 없다는 것은 약물들이 효

과가 부정적이거나 긍정적인 효과가 없다는 것을 의미한다. 그러나 藿香, 木香은 일부 농도에서 수치상승을 보였고, 甘草, 蘇葉, 半夏, 陳皮는 투여 후 두드러진 수치 상승을 보여 산화성 손상에 의한 세포환원활성감소를 개선하는 효과가 뚜렷하므로, 활성산소에 의한 뇌세포의 변성 및 자연사 방지에 효과적일 것이며 신약개발에 있어서 중요한 연구 대상이 되리라 판단된다.

Reoxygenation 조건의 LDH assay에서 星香正氣散加蒲公英와 모든 單味들이 유의한 효과를 나타내었다. 이 것은 실험에 사용된 한약물들이 산소재공급시 활성산소에 의한 산화성 세포괴사를 방지하는데 효과가 있다는 것을 의미한다. 뇌졸중시의 세포손상은 腦虛血보다는 再灌流시 활성산소에 의한 것이 더 많으므로 이러한 실험 결과는 星香正氣散이 중풍 치료 처방이라는 점과 일치하며, 星香正氣散加蒲公英이 산화성 손상에 의한 세포괴사로 痴呆의 병증이 진행되는 것을 억제하는데 임상적으로 적용될 수 있는 지지증거가 되리라 판단된다. 單味들 가운데 藿香, 半夏, 茯笭, 木香은 특히 두드러진 효과를 보여 임상연구 및 신약 개발에 중요한 연구대상이 되리라 판단된다.

실험에 사용된 약물들의 농도와 효과의 상관성에 관해 살펴보면 星香正氣散加蒲公英과 大腹皮, 牛膽南星, 甘草, 陳皮, 蘇葉은 두 가지 약물 농도 구간에서 효과가 대별되어 보이므로, 이들 약물에 다른 농도에서 작용하는 유효성분이 두 가지 이상 있는지 연구 필요성이 제기된다.

각 單味들의 실험결과와 처방 구성과의 상관성을 비교해보면 藿香과 牛膽南星는 세포막보호효과가 뚜렷하여 星香正氣散加蒲公英이 전반적으로 세포막 보효효과에서 뚜렷한 결과를 보인 것과 일치하는데 이 것은 藿香과 牛膽南星의 약성이 星香正氣散의 처방 구성에서 君藥과 臣藥에 해당하는 것과도 일치한다. 木香, 蘇葉, 茯笭, 白朮, 生薑에서도 세포막 보호효과가 뚜렷하게 나타나 역시 이들 약물이 星香正氣散의 臣藥, 佐藥에 해당하는 것과도 일치한다.

실험에 사용된 單味들을 유사한 效能으로 분류해 보면, 寒邪를 溫散하고 利膈表邪發散하는 藿香, , 蘇葉, 行氣하는 木香, 大腹皮, 健脾祛濕하고 精氣를 補하는 茯笭 白朮 甘草, 祛痰하는 陳皮, 半夏로 나누어 볼 수 있다. 이러한 유사한 효능을 가진 약재들 간의 실험결과를 비교해 보면 藿香과 蘇葉이 hypoxia 조건의 LDH assay에서 두드러진 효과를 보였고, 半夏와 陳皮가 reoxygenation 조건의 MTT assay에서 두드러진 효과를 보여 寒邪를 溫散하고 利膈表邪發散하는 韓藥物과 祛痰하는 韓藥物에 대하여 세포막 보호효과와 세포환원활성증가효과에 대한 연구가 의미 있을 것으로 판단된다.

이 외에 半夏, 陳皮, 蘇葉, 甘草는 hypoxia, reoxygenaton 두 가지 경우 모두 세포막파괴에 대하여 보효효과를 가지며 reoxygenation 조건의 세포환원활성에 대하여도 양호한 효과가 있어, 실험에 사용된 다른 약물에 비하여 많은 경우의 산소에 의한 腦神經損傷에 적용될 수 있으므로 痴呆치료 약물로서의 연구가치가 높다고 생각된다. 藿香은 특히 세포막 보호효과가 다른 약물에 비하여 강력하였고 세포환원활성에 대하여는 부정적인 결과를 보였다. 그러나 세포환원활성에 있어서도 일부 농도에서 부정적인 효과가 현저히 감소하거나, 긍정적인 효과를 보여 농도에 따른 세포환원활성 유효 물질을 검색한다면 실험에 사용된 다른 약물에 비하여 많은 경우의 산소에 의한 腦神經損傷에 적용될 수 있으리라 생각된다.

한편, 최[71]는 痰濁, 瘀血과 Aβ, NFTs 등이 유사하므로 痴呆의 治療에 있어서 西洋醫學的인 治療法과 함께 韓醫學的인 治療原理로 補身, 去痰祛瘀등의 방법을 병행할 것을 제안하였는데, 본 실험의 결과에서 祛痰하는 작용을 가진 陳皮, 半夏의 효과가 다른 약물들에 비해 양호하게 나타났으므로, 추가적인 연구로 이들 약물이 Aβ, NFTs의 제거 효능이 있는지 확인해 볼 필요가 있다.

본 연구와 관련된 한약물의 기존 연구로는 김[72]은 방사선 조사 mouse에서 소장 움세포의 apoptosis 발생에 미치는 생약의 효과에 관한 논문에서 元肉, 酸棗仁, 遠志, 人蔘, 川芎, 白芍藥, 升麻, 柴胡, 茯笭, 木香이 apoptosis 유발을 억제한다고 하였다. 그러나 본 연구결과에서 茯笭과 木香은 apoptosis와 관련 있는 MTT assay에서 두드러진 결과를 보이지 않고 있어 상반되는 실

험결과를 보였다. 이것은 실험 방법과 재료의 차이로 인한 것일 수도 있으나, 보다 많은 연구로 확인되어야 할 것이다. 박[17]은 腦虛血성상세포에서 星香正氣散加蒲公英에 의해 알츠하이머형 치매의 신경병리와 밀접한 관련이 있는 TNF-α와 IL-1 및 Aβ와 IL-1β 유도성 TNF -α의 생성을 억제하는 뚜렷한 효과가 있음을 보고하였다. 이는 알츠하이머형 치매의 병리과정에 있어 응집된 Aβ에 의해 세포 파괴로 염증이 유발되고 IL-1, IL-6 등의 염증 매개물질들이 nitric oxide radicals (NO)을 생성하여 다시 과산화가 일어나며 이에 의한 Aβ 응집반응이 강화되는 악순환을 星香正氣散加蒲公英이 억제한다는 것이다. 본 실험에서 星香正氣散加蒲公英이 우수한 세포막보호효과를 보인 결과는 이러한 박[17]의 실험 결과와도 일치할뿐 아니라, 다른 측면의 작용 기전을 밝힌 것으로 볼 수 있다. 즉 星香正氣散加蒲公英이 세포막보호효과에 의하여 세포괴사를 막고 세포괴사로 인한 염증유발이 억제되어 Aβ 응집반응이 강화되는 악순환을 억제한다는 것이다.

V 結 論

인체에서 虛血과 再灌流에 의해 발생한 뇌신경세포의 손상에 星香正氣散加蒲公英 및 單味들이 미치는 영향을 연구하기 위하여 Mouse neuroblastoma 2a 세포를 대상으로, 한약물이 hypoxia-reoxygenation 조건을 부여한 세포의 세포활성과 세포손상정도에 미치는 효과를, MTT assay, LDH assay를 사용, 각기 조사하여 의미있는 결과를 얻었다.

1. 韓藥物이 正常的인 狀態의 細胞에 미치는 효과를 조사한 실험에서는 대부분의 單味들이 정상 상태의 세포에는 세포증식과 세포손상에 관여하지 않았다.

2. Hypoxia조건의 MTT assay를 이용한 세포환원활성도 측정에서 星香正氣散加蒲公英과 單味들은 별다른 효과가 보이지 않았으나, 陳皮와 甘草에서는 유의한 효과가 관찰되어 추가적인 확인과 연구가 필요하다.

3. Hypoxia 조건의 LDH assay를 이용한 세포손상정도 측정에서 星香正氣散加蒲公英과 모든 單味들이 유의한 효과를 나타내었다. 藿香, 白朮, 蘇葉, 牛膽南星은 우수한 효과를 보였다.

4. Reoxygenation 조건의 MTT assay를 이용한 세포환원활성도 측정에서 星香正氣散加蒲公英과 대부분 單味들은 별다른 효과가 보이지 않았다. 그러나 藿香, 木香은 일부 농도에서 수치상승을 보였고, 甘草, 蘇葉, 半夏, 陳皮는 우수한 효과를 보였다.

5. Reoxygenation 조건의 LDH assay를 이용한 세포손상정도 측정에서 星香正氣散加蒲公英과 모든 單味들이 유의한 효과를 나타내었다. 藿香, 半夏, 茯苓, 木香은 우수한 효과를 보였다.

上記한 결과, LDH assay에서 星香正氣散加蒲公英과 모든 單味들이 유의한 효과를 나타낸 것은 실험에 사용된 單味들이 알츠하이머형 치매와 血管性 痴呆의 세포괴사 방지에 임상적으로 활용될 수 있으리라는 판단을 가능케한다.

Reoxygenation 조건의 MTT assay에서 甘草, 蘇葉, 半夏, 陳皮가 유의한 효과를 나타낸 것은 이들 약물이 활성산소에 의한 뇌세포의 변성 및 자연사 방지에 효과적일 것이며 신약개발에 있어서 중요한 연구 대상이 되리라 판단된다.

參 考 文 獻

1. Skarphedinesson, JO., Stage, L. and Thoren, P. Cerebral function during hypotensive haemorrhage in spontaneously hypertensive rats and wistar Kyoto rats. Acta. Physiol. Scand. 1989;128:446~452,
2. McCord, JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N. Engl. J. Med., 1985;312(3)159~163,
3. Weiner MF. The dementias, diagnosis and management. Washington, American Psychiatric

Press. 1991; pp 77-166, 227-248,
4. Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen D, Waeg G, Mattson MP : Evidence that 4-hydroxynoneral mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. J. Neuroscience. 1997;17;5089-5100,
5. Da Cruz E, Silva OAB, Iverfeldt K, Oltersdorf T, Sinha S, Greenbard P. Regulatid cleavage of Alzheimer β-amyloid precursor protein in the absence of the cytoplamic tail. Neuroscience. 1993;57:873-877,
6. 康永祿 : 원지와 석창포의 단독 및 혼합투여가 백서의 뇌손상에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 석사학위논문, 1997.
7. 박지운, 정인철, 이상룡 : 日黃連이 치매병태 모델에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지 2004;15(1):87-99,
8. 윤상학, 정인철, 이상룡 : 香附子가 치매병태 모델에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지 , 2003; 14(1):59-74
9. 이준영, 정인철, 이상룡 : 天王補心丹이 치매병태 모델에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지 ,2002;13(2):149-171
10. 하수영, 정인철, 이상룡 : 加減固本丸이 치매병태 모델에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지, 2002;13(1):53-77
11. 우주영, 김종우, 황의완, 김현택, 박순권 : 調胃升淸湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 1997;8(1):69-79
12. 이웅석, 황의완, 김현택, 박순권 : 調胃升淸湯이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 影響, 경희한의대논문집, 1998;21(1):479-501
13. 조성훈, 김종우, 김현택, 정경천, 황의완 : 調胃升淸湯이 초기 Dmentia of Alzheimer type 환자의 인지기능 변화에 미치는 효과, 동의신경정신과학회지, 2003;14(1):17-26
14. 김보균, 김종우, 김현택, 정견천, 황의완 : 알츠하이머형 치매환자에 대한 조위승청탕의 효능-청각 ERP 및 K-DRS 의성적 변화를 통하여, 동의신경정신과학회지 , 2003;14(2):36-43
15. 김영석, 문상관, 고창남, 조기호, 배형섭, 이경섭. A comparison Between Stroke Patients admitted to Oriental Hospital in the years 1987 and 1994. , 제9회 국제동양의학학술대회발표논문집(9th ICOM), 1998; 418-55
16. 권도익, 고창남, 조기호, 김영석, 배형섭, 이경섭. 한방병원 심계내과 입원환자에 대한 임상연구. 경희의학, 1996; 12(2):200-213
17. 박진성, 강형원, 유영수 : 생체외 알츠하이머병 실험 모델에서 星香正氣散加蒲公英의 효과에 관한 연구. 동의신경정신과 학회지 2001;12(2):151-171
18. 이동언, 김영균. 배양된 혈관 내피세포에서 산화성 세포 손상에 미치는 星香正氣散의 보호 효과. 방제학회지, 2000;8(1):147-67.31
19. 김영균. 星香正氣散이 가토의 경동맥 평활근 긴장도 조절에 미치는 영향. 한의학회지 , 1998; 19(2):228-43.
20. 박정현. 星香正氣散이 NOS inhibitor투여에 의한 흰쥐의 학습 및 기억력장애에 미치는 영향. 석사학위논문. 경희대학교 대학원. 1999.
21. 예경욱, 박치상, 이은주, 송지혜, 김미려, 조정숙. 星香正氣散이 腦虛血을 유발시킨 백서의 신경전달물질에 미치는 영향. 한방내과학회지, 2000 ;21(1):116-25
22. 한원주. 遠志와 石菖蒲의 단독 및 혼합추출액이 CT105로 유도된 신경세포암 세포주에 미치는 영향. 석사학위논문. 원광대학교 대학 2003.
23. 김 혁. Significant Role of Nitric Oxide Synthase (NOS) in Differentiation of Human Neuroblast Cell Line. 석사학위논문. 경희대학교. 2000.
24. 유영민.Protective effect of Melatonin against Nitric Oxide-Mediated Apoptosis in PGT-β Pineal Gland Tumor Cells 박사학위논문. 강원대학교. 2001.
25. Ruscher, K., Isaev, N., Trendelenburg, G. Weih, M., Iurato, L., Meisel, A., and Dirnagl, U. Induction of hypoxia indecible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. Neuros. Lett, 1998; 254: 117-120
26. Wang, J., Shum, A. Y., and Wang, J. Hypoxia/reoxygenation induces cell injury via

diferent mechanisms in cultured rat cortical neurons and glial cells. Neuros. Lett, , 2002;322: 187-191

27. 慶熙醫療院 韓方病院 製劑解說集. 서울, 慶熙醫療院韓方病院, 1988;p. 102
28. Sladowski, D., Steer, S. L., Clothier, R. H., and Balls M. An improved MTT assay. J. Immunol. Methods, 1993;157: 203-207
29. Marshall, N. J., Goodwin, C. J., and Holt, S. L. A critical assessment of the use of microculture tetazolium assays to measure cell growth and function. Growth regul. , 1995;5: 69-84
30. Koh JY, Choi DW. Quantitative determination og glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J of Neuros. Methods, 1987;20:83-90
31. 곽동일 : 노인성 痴呆, 노인정신의학 1(1):3-15, 1997.
32. Baddeley A.D., Bressi S., Sala S, D., LogieR., and Sonnler H. The decline of working memory in Alzheimer's disease. Brain. ,1991;114:2521~2542
33. Borchelt DR, Thinnakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Para C-M, Kim G, Seekins S, Yanger D, Slunt HH, Wang R, Younkin SG, Sisodia SS, Familar Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Aβ1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. Neuron. ,1996;17:1005-1013
34. Buxbaum JD, Greengard P. Regulation of APP processing by intra-and intercelluar signals. Ann NY Acad Sce. ,1966;777:3270-331
35. Anne E, Uta K, Celio A. Marques, Astrid B, Claudia F, Kartin Sch, Walter E. Muller : Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. Biochem, Parm , 2003;28:1627-1634
36. John P. Blass. Brain Metabolism and Brain Disease. J of Neuroscience Research , 2001;66:851-856
37. Adrienne M. Gorman Sandra Ceccatelli Sten Orrenius : Role of Mitochondria in Neuronal Apoptosis. Develop. Neuroscience, 2000;22:348-358
38. Schmidley JW: Free radicals in central nervous system ischemia. Stroke , 1990;25: 7-12
39. Yoslida S. Brin injury after ischemia and trauma. Ann NY Acad Sci , 1989;570:219-236
40. Milan, L. Jozef, R., Vilian, K., Peter, P. and Ladislav V. : Free radicals in chemistry and biology, CRC Press, 1989.;29~31,283~284
41. Larry, W. O and Terry, B. O : Free radicals, aging and degenerative disease. Alan R. Liss. Inc. ,1986; 325~371
42. 박명숙. 치매치료제의 개발에 관한 고찰. 덕성여대 논문, 1997;제 28집: 6-14
43. 張介賓. 景岳全書. 서울. 일중사. 1992;p 846
44. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울: 동양의학연구소. , 1985;pp 217--218,229
45. 孫思邈, 備急千金要方. 서울:杏林出版社. , 1982;pp 129-135,534,545,550.
46. 陳士澤: 石室秘錄(下) , 서울, 書苑堂., 1984; pp 316-317
47. 錢鏡湖. 辨證奇文全書. 台北:甘地出版社., 1990; pp 222-225,233-235
48. 朱震亨 : 丹溪心法, 北京, 中國書店,, 1996; pp 258, 259~262
49. 楊思澎외. 中醫臨床大全. 北京: 北京科學技術出版社, , 1991;pp 224-230
50. 陳煇외. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. ,1993;pp 242-251.784-791
51. 黃大東 외. 實用中醫內科學. 上海: 上海科學技術出版社. , 1989;pp 378-381
52. Selkoe DJ., N. Engl. J.Med. , 1989;320:1484~1487
53. 李曉玲: 老人性 痴呆從肝論治, 俠西中醫, , 1995;16(9):431-4432
54. 許曉蓉 : 淺痰老年痴呆症的症治. 浙江中醫學院學報., 1995;19(3):2
55. 李貫徹, 孟祥福, 李光 : 中醫治療老年腦血栓形成後痴呆, 上海中醫藥雜志 , 1994;4:9
56. 李中南, 王正雨, 王健平 : 滌痰化瘀湯治療腦血管

性痴呆15例, 安徽中醫學院學報 , 1996;15(1):35-36
57. 鄭功澤, 周鶯歌 : 中風痴呆 從痰瘀論治, 上海中醫藥雜志, 1996;1:14
58. 黃志雄 : 多發性梗塞性痴呆的中醫分型與治療, 上海中醫藥雜志 1994;3:18-19,
59. 金賢兒, 鄭智天, 李源哲 : 老人性痴呆에 對한 文獻的 考察, 대한한방내과학회지 1992;16(2):57-69,
60. 채종걸, 정인철, 이상룡 : 山査肉이 CT105로 유도된 Alzheimer's Disease 병태 모델에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지 , 2002;13(1):79-115
61. 박순권, 이홍재, 김현택 황의완. 한약물의 치매치료에 관한 실험적 연구. 동의신경정신과 학회지, 1998;9(2):19-36
62. 고재왕, 김태헌, 김준한, 류영수. 중추신경계에서 蒲公英의 항염증작용에 관한 연구. 동의신경정신과학회지., 2000;11(2):11-21
63. 이재석. 星香正氣散이 백서의 혈압, 국소뇌혈류량 및 뇌연막동맥에 미치는 영향. 석사학위논문. 경희대학교 대학원. 2000
64. 康秉秀, 高雲彩 金先熙 盧昇鉉, 宋昇埈, 辛民敎, 安德均, 李尙仁, 李暎鍾, 李 棣熙, 朱榮丞 本草學. 永林社 서울. 1988;136, 292, 302, 347, 353, 365, 448, 451, 483, 536, 540.
65. 배철환, 이경섭, 폐쇄성 뇌졸중에 대한 임상적 연구. 경희대학교. 석사학위논문. 1987.
66. 임준규, 변덕시, 노석선. 星香正氣散이 뇌부종에 미치는 임상적 연구. 한의학회지,1990 ;11(1): 208-15.
67. 최동준, 구본수, 고창남, 조기호, 김영석, 배형섭. 급성기 중풍 환자에 대한 星香正氣散의 임상적 효능. 경희대학교 한의과대학. 석사학위논문. 2000.
68. Christian Bhel. Alzheimer's disease and Oxdative stress. Progress in Neurobiology , 1999;57: 301-323
69. Sladowski, D., S. J. Steer., R. H. Clothier., M. Balls : An improved MTT assay. J. of Immune. Methods, 1993;157, 203-207
70. Bernas, T., and Dobrucki, J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO Mitochondrial fluorescent probes. Cytometry, ,2002;47, 236-242,
71. 崔用德, 李光撰, 姜亨沅, 柳泳秀. 痴呆의 病理에 대한 東.西醫學的 考察. 대한동의병리학회지. , 2002;13(1)36-46
72. 김성호, 안미라, 나승렬, 이종환, 김재하, 조성기, 장종식, 신동호 : 방사선 조사 마우스에서 소장 움세포의 Apoptosis 발생에 미치는 생약의 효과. J. Korean Asso. Radiat. Prot. , 2001;26(1): 27-33