

溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯의 microglia 보호, 항산화 및 acetylcholinesterase 억제 효과

정명희 · 정인철*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Effects of OnDam-TanghapChongMyoung-Tang and DoDam-TanghapChongMyoung-Tang on Protecting Microglia and Inhibiting Acetylcholinesterase and Oxidants

Myong Hee Cheong, In Chul Jung*

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

This experiment was designed to investigate the effect of the ODTCTM and DDTCMT extract on protecting microglia and inhibiting acetylcholinesterase and oxidants. The effects of the ODTCTM and DDTCMT extract on cell death of BV2 microglial cell line treated by IFN- γ ; expression of NO, ROS in BV2 microglial cell line treated by lipopolysaccharide (LPS); AChE activity in PC-12 cell treated by NGF were investigated, respectively. The ODTCTM and DDTCMT extract significantly increased cell viability in BV2 microglial cell line treated with IFN- γ . The ODTCTM and DDTCMT extract suppressed the NO and ROS production in BV2 microglial cell line treated by LPS. The ODTCTM and DDTCMT extract groups also showed inhibition of AChE activity in PC-12 cell line. According to the above result, it is suggested that the ODTCTM and DDTCMT extract might be usefully applied for prevention and treatment of Alzheimer's disease. OnDam-TanghapChongMyoung-Tang (ODTCTM), DoDam-TanghapChongMyoung-Tang (DDTCMT), Microglia, acetylcholinesterase, ROS

Key words : Eight Principle Pattern Identification, Sasang typology, Greater-Lesser-Yin-Yang

서 론

치매는 뇌의 만성적 진행성 변성질환에 의해 흔히 기억장애 및 기타 지적기능의 상실이 일어나는 임상증후군으로, 원인 질환 중 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD)이 가장 흔하여 전체 원인질환의 약 50~60%를 차지하고 있다^{1,2)}.

AD는 신경세포 소실에 따른 전반적인 뇌위축과 노인반 (senile plaques), 신경섬유다발 (neurofibrillary tangle) 등의 특징적인 병리조직학적 소견을 보이며³⁾, 증상으로 기억, 언어, 시·공간 파악 능력, 실행능력 및 판단력 등 인지능력의 퇴화와 망상, 의심, 환각, 우울증 및 인격의 변화 등 행동장애가 나타난다⁴⁾.

한의학에서痴呆는 《景岳全書》⁵⁾에서 “癡默”로, 《石室秘錄》⁶⁾,

《辨證奇門》⁷⁾에 “呆病”으로 언급되어 왔고 대표적인 病機는 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀 등이다¹⁾.

聰明湯은 《東醫寶鑑·內景篇》⁸⁾에 “治多忘, 久服能日誦千言”이라 하여 健忘을 치료하는데 사용한다고 기술된 이래, 健忘 및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있다⁹⁾.

溫膽湯은 孫¹⁰⁾의 《千金要方》에 처음으로 收錄된 處方으로, 二陳湯에 行氣消積하는 枳實¹¹⁾과, 清熱, 化痰, 止嘔하는 竹茹¹¹⁾를 加味한 것으로, 心膽虛怯으로 인해 痰熱이 上搖하여 發生¹²⁾하는 觸事而驚^{12,13)}, 夢寐不祥^{12,14)}, 虛煩不得眠^{10,14)} 등의 症狀에 使用된다. 《實用中醫腦病學》¹⁵⁾에서는 痰濁壅盛 阻蔽腦竅型의 腦萎縮에서 나타나는 “神精淡漠呆滯 … 健忘 … 甚至完全痴呆”에 溫膽湯을 活用하고 있다. 또한 導痰湯은 宋代 嚴¹⁶⁾의 濟生方에 처음 수록된 處方으로 中風과 一切의 痰飲을 치료하는 處方^{5,17,18)}으로 기록되어 왔으며 痰濁이 心竅를 막아버린 痰迷心竅의 증상인 神志錯亂, 意識不明, 神呆目滯, 昏倒於地 등에도 사용한다¹⁹⁾.

* 교신저자 : 정인철, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학

· E-mail : npjeong@dju.ac.kr, · Tel : 043-229-3727

· 접수 : 2008/08/21 · 수정 : 2008/09/11 · 채택 : 2008/09/22

최근 聰明湯 및 여러 가지 聰明湯加味方의 痴呆 치료와 예방에 관한 연구²⁰⁻²³⁾가 진행되고 있고 溫膽湯의 항산화작용에 대한 연구결과²⁴⁾가 發表된 바 있다. 그러나 溫膽湯 및 導痰湯과 聰明湯을 合方한 處方들의 痴呆와 관련된 實驗的 研究는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 상기 처방들이 AD의 병리에서 중요한 acetylcholinesterase (AChE)나 oxidants의 증가 등에도 일정한 효과가 있을 수 있다고 판단하여 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯이 AD 병태 모델에 대한 세포보호, 항산화 및 AChE 억제 효과를 실험적으로 규명하고자 각 처방 추출물을 시료로 BV2 microglial cell line에서 세포 생존율, nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS)의 생성을 관찰하고 PC12 cell line에서의 AChE의 생성을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약은 AChE assay kit (EQM Research, USA), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), penicillin, streptomycin, DNase type I (이상 Sigma, USA), Taq. polymerase, Deoxynucleotide triphosphate(TaKaRa, Japan), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal bovine serum(FBS, Hyclone, USA), collagenase A (BM, USA), Agarose (FMC, USA) 등이고, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 rotary vaccum evaporator (Büchi, B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), centrifuge (sigma, USA), bio-freezer (sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system (MWG Biotech., Germany), plate shaker (Lab-Line, USA), ice-maker (비전과학, Korea), ELISA reader (molecular devices, USA), homogenizer (OMNI, USA), VIDEOTRACK (Animal and human being behaviour analysis system, Viewpoint, France), phage contrast microscopy (Nikon, Japan), flow cytometer (Becton Dickinson, Co., USA) 등이다.

2) 세포

BV2 microglial cell line은 Tong H. Joh (Burke Institute, Cornell University, USA)으로부터 공급 받아 37°C, 5 % CO₂ 상태의 배양기에서 10 % FBS DMEM으로 배양하여 사용하였고, PC-12 cell line은 rat의 adrenal pheochromocytoma로 DMEM에 10 % horse serum과 5 % FBS, penicillin(100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), gentamycin (10 µg/ml)의 이 함유된 배양액을 넣고 배양시켰다.

3) 약제

溫膽湯合聰明湯(OnDam-TanghapChongMyoung-Tang, ODTcMT)과 導痰湯合聰明湯 (DoDam-TanghapChongMyoung-Tang, DDTcMT)은 처방구성은 《東醫寶鑑》⁸⁾을 기준으로 하였고, 사용한 약제는 대전대학교 부속 대전한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of OnDam-TanghapChongMyoung-Tang (ODTcMT)

Herb	Scientific Name	Dose(g)
半夏	<i>Pinelliae ternata Breitenbach</i>	8
陳皮	<i>Citrus unshiu L.</i>	8
白茯苓	<i>Poria cocos Wolf</i>	8
枳實	<i>Poncirus trifoliata Refinesque</i>	8
竹茹	<i>Phyllostachys nigra var.henonis</i>	4
白茯苓	<i>Poria cocos Wolf</i>	4
遠志	<i>Polygala tenuifolia</i>	4
石菖蒲	<i>Acori Gramineus Soland</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis Fisch.</i>	2
Total amount		50

Table 2. Prescription of DoDam-TanghapChongMyoung-Tang (DDTcMT)

Herb	Scientific Name	Dose(g)
半夏	<i>Pinelliae ternata Breitenbach</i>	8
南星	<i>Arisaema amurense var. serratum</i>	4
橘紅	<i>Citrus unshiu Markovich</i>	4
枳殼	<i>Citrus aurantium L.</i>	4
赤茯苓	<i>Poria cocos Wolf</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis Fisch.</i>	4
白茯苓	<i>Poria cocos Wolf</i>	4
遠志	<i>Polygala tenuifolia</i>	4
石菖蒲	<i>Acori Gramineus Soland</i>	4
Total amount		40

4) 검액의 조제

溫膽湯合聰明湯 1첩 분량 (50 g), 導痰湯合聰明湯 1첩 분량 (40 g)에 각각 증류수 1,300 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 얻은 溫膽湯合聰明湯 추출물(7.25 g), 導痰湯合聰明湯 추출물 (5.25 g)을 냉동 (-84°C) 보관하면서 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포독성 측정

(1) 세포배양

mLFC는 BALB/c 생쥐의 정상 폐 조직을 작은 조각으로 절단한 후 conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 수세하였다. Tube에 DMEM를 넣고 37 °C CO₂ 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양 후 PBS로 2 회 수세하고 DMEM-10 % FBS에 1 주일 동안 배양하였다.

(2) 세포독성 및 세포 생존율 측정

세포독성측정방법은 SRB assay법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFC 세포는 37°C, 5 % CO₂ 배양기에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어내고, 2.0×10⁴ 개의 세포를 96 wells plate에 분주하고 배양기 (37°C, 5 % CO₂)에서 2시간 배양한 후 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 추출물 (최종 농도 200, 100, 50, 10, 1 µg/ml)을 각각 48시간 동안 처리하였다. BV2 microglial cell (1×10⁵ cells/24 wells plate)에 IFN-γ (20 U/ml)과, 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 추출물 (100, 50, 10 µg/ml)을 각각 처리하고 48 시간 동안 동시 배양하였다. 배양

종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2 회 세척하였다. 각 well에 50 % TCA 50 μ l를 가하고 1 시간 동안 4 $^{\circ}$ C에 방치한 후 증류수로 5 회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB (0.4 % SRB/1 % acetic acid) 용액을 100 μ l/well로 가하고 실온에서 30 분간 염색하였고 0.1 % acetic acid 용액으로 약 4~5 회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

(3) BV2 microglial cell의 형태학적인 변화 측정

BV2 microglial cell 의 형태학적인 변화는 BV2 microglial cell (1×10^5 cells/24 wells plate)에 IFN- γ (20 U/ml)과, 溫膽湯合聰明湯, 導痰湯合聰明湯 추출물 (100 μ g/ml, 50 μ g/ml)을 각각 처리하여, 48시간 동안 배양하여 위상차현미경으로 관찰하였다.

3) BV2 microglial cell 배양액 내 NO 생성량 측정

BV2 microglial cell을 96 wells plate에 2×10^4 cells로 분주하였다. 여기에 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 추출물 (100, 50, 10 μ g/ml)을 처리하고 1 시간 후 LPS (0.1 μ g/ml)를 각각의 well에 첨가하여 48 시간 배양하였다. 배양 종료 후 배양액을 2,000 rpm에서 5 분간 원심분리 하여 상층액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A (0.2 % naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B (2 % sulfonamide in 5 % H₃PO₄)를 1:1로 혼합하여 처리하였다. 다시 배양 상층액 100 μ l를 96 wells plate에 분주하고 혼합 용액 100 μ l를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) BV2 microglial cell 내 ROS의 분석

BV2 microglial cell 내 ROS를 측정하기 위하여 24 wells plate의 각 well에 5×10^5 cells씩 첨가하고, 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 추출물 (100, 50 μ g/ml)을 처리하고 1시간 후 LPS (1 μ g/ml)를 처리한 후 37 $^{\circ}$ C에서 48 시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA 50 μ M을 처리하고 5 분간 배양하고 2 회 수세한 후 flow cytometer로 세포내 형광 ROS를 측정하였다. 이 때 Cyclosporine A를 처리한 군을 만들어 양성대조군으로 사용하였다.

5) PC12 cell 에서 AChE activity 측정

PC-12 cell에 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 추출물 (100, 50, 10 μ g/ml)과 NGF를 처리하여 24 시간 배양한 후 50 μ l의 cell lysate lysis buffer (Tris-HCl (200 mM; pH 8.0), 200 mM NaCl, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 0.1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0.1 mM DTT, 10 μ g/ml leupetin)을 혼합하여 얼음에서 30 분간 반응하였다. 그리고 5 분간 원심분리하여 cell lysate를 얻었다.

Cell lysate를 labeling한 후 sodium chloride solution 0.2 ml과 혼합하였고 각 tube에 3.0 ml water, nitrophenol solution 2 ml, acetylcholine chloride solution 0.2 ml을 첨가하였다. 다시 5 분 후 acetylcholine chloride solution을 첨가하고 시간을 정확히 기록하여 25 $^{\circ}$ C water bath에서 30 분간 배양시킨 후 ELISA reader로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 mean \pm standard deviation으로 기록하였다. 각 항목의 유의성은 일원배치분산분석 (ANOVA test)로 평가하였고, p<0.05 수준에서 Duncan's method로 사후 검정하였다.

성 적

1. 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 추출물의 세포독성

mLFC의 생존율은 溫膽湯合聰明湯 1, 10, 50, 100, 200 μ g/ml 실험군에서 각각 103.2 \pm 4.8, 98.0 \pm 1.2, 96.1 \pm 1.3, 89.6 \pm 0.5, 86.9 \pm 1.6, 導痰湯合聰明湯 1, 10, 50, 100, 200 μ g/ml 실험군에서 각각 97.8 \pm 0.8, 94.8 \pm 1.2, 90.6 \pm 1.4, 84.8 \pm 1.7, 75.8 \pm 2.5 (%)로 導痰湯合聰明湯 200 μ g/ml 이외에는 모두에서 80% 이상의 생존율을 나타냈다(Fig. 1).

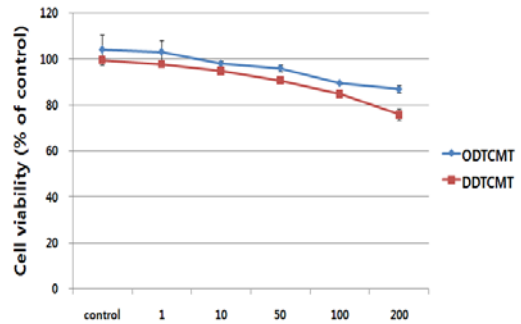


Fig. 1. Cytotoxicity of ODTcMT & DDTcMT extract on mLFCs. mLFCs were treated with various concentrations of ODTcMT & DDTcMT extract. The results are expressed the mean \pm S.D.

2. BV2 microglial cell line의 세포생존율과 형태학적 변화

BV2 microglial cell line에서 생존율을 측정한 결과, 대조군은 20.5 \pm 2.5, 溫膽湯合聰明湯 100, 50, 10 μ g/ml 실험군은 97.3 \pm 0.7, 85.5 \pm 1.7, 70.3 \pm 7.8이었고, 導痰湯合聰明湯 100, 50, 10 μ g/ml 실험군은 95.8 \pm 1.5, 85.5 \pm 3.0, 64.1 \pm 2.1 (%)로 나타나 대조군에 비해 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 실험군 모두 농도의존적으로 유의성 있는 생존율의 상승을 보였고 같은 농도에서 처방 간 생존율의 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

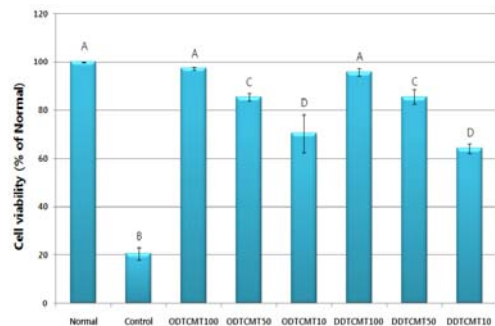


Fig. 2. The effect of ODTcMT & DDTcMT extract on cell viability in IFN- γ -treated BV2 microglial cell line. A,B,C,D,E : Statistical difference between groups were tested by oneway ANOVA and Duncan's method is used for multiple comparisons. The different character indicates that a statistical difference is found under a significance level less than 0.05.

BV2 microglial cell line에 IFN- γ 를 처리하고 48 시간 경과 후 대조군은 정상군에 비하여 세포의 사멸과 형태의 변화를 나타낸 것에 비해 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 실험군은 세포의 형태학적 구조가 비교적 양호하게 유지되었음을 볼 수 있다(Fig. 3).

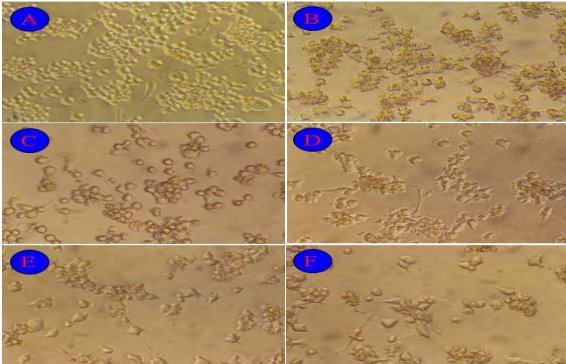


Fig. 3. The effect of ODTcMT & DDTcMT extract on cell morphology in IFN- γ -treated BV2 microglial cell line. A: Normal B: Control C: 100 $\mu\text{g/ml}$ ODTcMT D: 500 $\mu\text{g/ml}$ ODTcMT E: 100 $\mu\text{g/ml}$ DDTcMT F: 50 $\mu\text{g/ml}$ DDTcMT Cell morphology was observed using phase contrast microscopy.

3. BV2 microglial cell line 배양 상층액에서 NO 생성량에 미치는 영향

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 NO 생성량은 정상군은 19.6 \pm 4.5, 대조군은 466.3 \pm 56.0, 溫膽湯合聰明湯 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 실험군은 각각 56.7 \pm 26.0, 125.5 \pm 41.9, 307.2 \pm 97.7, 導痰湯合聰明湯 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 실험군은 각각 70.4 \pm 30.7, 111.6 \pm 34.7, 247.0 \pm 63.9 (mM)로 나타나 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 실험군 모두 농도의존적으로 유의성 있는 감소를 보였고 같은 농도의 처방 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 4).

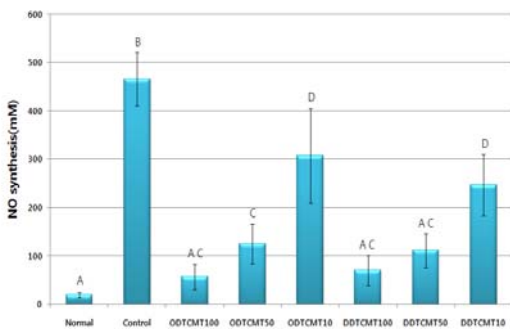


Fig. 4. Inhibitory effect of ODTcMT & DDTcMT extract on the NO production BV2 microglial cell line. A,B,C,D,E,F : Statistical difference between groups were tested by oneway ANOVA and Duncan's method is used for multiple comparisons. The different character indicates that a statistical difference is found under a significance level less than 0.05.

4. BV2 microglial cell 배양 상층액에서 ROS 생성에 미치는 영향

Microglial cell의 ROS 생성을 관찰한 결과, 대조군에서 비해 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 실험군에서는 농도 의존적으로 ROS의 생산이 억제되었다(Fig. 5).

5. PC-12 cell line에서 AChE activity 억제 효과

PC-12 cell line에서 AChE activity를 측정된 결과, 정상군은 6.4 \pm 1.7, 대조군은 46.2 \pm 2.4, 溫膽湯合聰明湯 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 실험군은 각각 22.9 \pm 5.6, 31.4 \pm 4.4, 33.0 \pm 10.3, 導痰湯合聰明湯 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 실험군은 각각 16.0 \pm 6.2, 26.4 \pm 11.1, 33.0 \pm 4.7 (nM/mg/min)로 나타나 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 실험군 모두 농도의존적으로 유의성 있는 감소를 보였고 같은 농도의 처방 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 6).

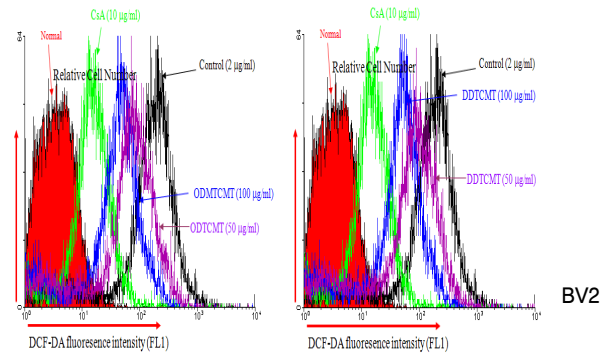


Fig. 5. Inhibitory effect of ODTcMT & DDTcMT extract on the ROS production in BV2 microglial cell line.

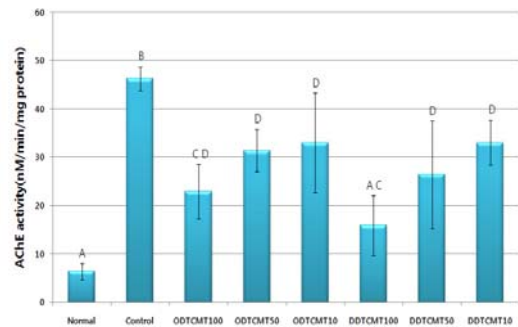


Fig. 6. Inhibitory effect of ODTcMT & DDTcMT extract on AChE activity in PC12 cell line. A,B,C,D : Statistical difference between groups were tested by oneway ANOVA and Duncan's method is used for multiple comparisons. The different character indicates that a statistical difference is found under a significance level less than 0.05.

고찰

치매란 만성 또는 진행성 뇌질환에 의해서 발생되며 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능장애로 이루어진 증후군으로 성격변화, 불면, 행동장애 등의 증상도 동반된다. 치매의 임상유형 중 AD가 50% 이상을, vascular dementia (VD)가 20% 정도를 차지하고 있는데, 그 중 AD는 증상이 서서히 나타나고 경과가 점진적으로 진행되며, 초기부터 뚜렷한 기명장애, 기억장애, 방향상실을 보인다.^{1,2)}

AD 유발에는 microglial cell과 astrocyte에서 분비되는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 proinflammatory cytokine²⁵⁾, AChE²⁶⁾, free radicals²⁷⁾, A β ²⁸⁾ 등의 많은 인자가 관여하는 것으로 알려져 있다.

AD의 주증상인 기억력 저하는 choline성 신경계와 밀접한

관계가 있는데²⁹⁾, 특히 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine 분해효소인 AChE의 증가로 인해 심화된다고 한다³⁰⁾.

비록 원인요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해 주고 개선해 줄 수 있는 galanthamine³¹⁾과 같은 AChE의 억제제가 현재까지는 가장 효과적인 AD의 치료제로 사용되고 있다³²⁾.

또한 신경세포의 산화적 손상은 AD를 유발하는 주요한 원인이 되는데, 이러한 산화적 손상을 유발하는 대표적인 물질로 NO와 ROS가 있다. NO는 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 보고되었다³³⁾.

ROS는 세포막의 지질, 조직 단백질 또는 효소, DNA에 산화를 유발시켜 세포막의 손상, 단백질의 변형, DNA의 손상을 유발한다. 이들 산화적 손상은 노화와 파킨슨병, AD 등의 퇴행성 신경질환을 포함하여 다양한 질병을 유발한다³⁴⁾.

韓醫學의으로 痴呆는 ‘呆病^{5,6)}’, ‘健忘^{35,36)}’ 등의 범주와 유사하며, 《景岳全書·癡狂癡獸》⁵⁾에는 痴呆와 유사한 개념으로 ‘癡獸’가 언급되었는데, “癡獸症, 言辭顛倒, 舉動不經, 或多汗, 或善愁, 其症則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常.....”이라 하였다.

痴呆의 病因은 年老體虛, 情志失調, 飲食失調, 中毒外傷, 痰濁 등이고 辨證類型은 精氣不足, 脾腎虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 熱毒熾盛, 氣血虛弱 등이며, 補益精氣, 補腎健脾, 割痰化濁, 開竅醒神, 行氣活血, 通竅醒腦, 清熱解毒, 益氣養血, 健腦益腎 등의 治法을 응용하고 있다¹⁾.

溫膽湯은 孫 의 《千金要方》에 처음으로 收錄된 處方으로 “治大病後 虛煩不得眠, 此膽寒故也. 宜服溫膽湯方”이라 하여 和胃, 消積, 清熱, 安神하는 效能¹⁵⁾으로 心膽虛怯^{10,12-14)}, 觸事而驚^{12,13)}, 夢寐不祥¹³⁾, 虛煩不得眠^{10,12,13)} 등의 症狀에 使用하며, 燥濕化痰, 利氣和中하는 效能이 있어 惡心嘔吐, 頭眩心悸, 舌苔白潤, 脈滑한 症狀을 治療하는 二陳湯¹²⁾에 行氣消積하는 枳實¹¹⁾과, 清熱化痰, 止嘔하는 竹茹¹¹⁾를 加味한 處方이다¹²⁾. 특히《實用中醫腦病學》¹⁵⁾에서는 痰濁壅盛 阻蔽腦竅型的 腦萎縮에서 나타나는 “神精淡漠呆滯 … 不言不語 … 健忘 … 善怒無常, 欲哭欲笑, 妄聞妄見 … 漸至理解, 判斷, 記憶, 計算, 定向等知能全面減退 … 出現失語 甚至完全痴呆 … 舌苔白膩, 脈滑.”에 開鬱除痰, 化濁醒神的 治法으로 溫膽湯을 活用하고 있다.

또한 導痰湯은 宋代 嚴¹⁶⁾의 濟生方에 “一切痰厥, 頭目眩暈, 痰飲留積不散, 胸膈痞塞, 脇肋脹滿, 頭痛吐逆, 喘急痰嗽, 坐臥不安, 飲食不思”라 처음 수록되었고 明代 薛³⁷⁾은 “痰涎壅盛, 胸膈痞塞, 或咳嗽惡心, 飲食少思를 다스린다”라고 한 것을 비롯해 歷代 의서에 中風과 一切의 痰飲을 治療하는 處方^{5,17,18)}으로 기록되어 왔다. 導痰湯은 二陳湯에 南星과 枳殼을 加味한 處方으로 薑半夏, 牛膽南星, 枳殼, 赤茯苓, 陳皮, 甘草, 生薑으로 구성되어 있고, 健脾化痰, 除濕養心, 行氣豁痰^{14,38-41)}하는 效能을 갖고 있기 때문에 痰涎壅盛할 때나 痰飲吐瀉하고 頭目眩暈하며 혹은 胸膈留飲하여 痰飲不通者에게 先用하며⁴²⁾, 痰濁이 心竅를 막아버린 痰迷心竅의 증상인 神志錯亂, 意識不明, 神呆目滯, 昏倒於地 등에 도 사용한다¹⁹⁾.

따라서 痴呆의 증상개선에 溫膽湯, 導痰湯 등이 응용될 수 있을 것으로 사료되어 溫膽湯 및 導痰湯에 健忘의 代表的 處方인 聰明湯을 合方한 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯을 본 실험약물로 선택하여 본 研究를 시행하였다. 이에 저자는 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯이 BV2 microglial cell line에 대한 세포보호, 항산화 및 AChE 억제 효과를 실험적으로 규명하고자 각 처방 추출물을 시료로 BV2 microglial cell line에서 세포 생존율, ROS의 생성과 배양 상층액에서 NO를 관찰하고 PC12 cell line에서의 AChE의 생성을 측정하였다.

먼저, mLFC의 생존율은 溫膽湯合聰明湯 1, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군에서 각각 103.2 \pm 4.8, 98.0 \pm 1.2, 96.1 \pm 1.3, 89.6 \pm 0.5, 86.9 \pm 1.6, 導痰湯合聰明湯 1, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군에서 각각 97.8 \pm 0.8, 94.8 \pm 1.2, 90.6 \pm 1.4, 84.8 \pm 1.7, 75.8 \pm 2.5 (%)로 導痰湯合聰明湯 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이외에는 모두에서 80% 이상의 생존율을 나타내(Fig. 1), 이후 실험에서 두 약물 모두 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도를 사용하였다.

IFN- γ 는 식세포작용의 활성화와 염증반응의 조절 cytokine으로 βA 축적에 관여하고 microglial cell에서 NO, iNOS을 유도한다고 알려져 있다^{43,44)}.

IFN- γ 를 처리한 BV2 microglial cell line에서 생존율을 측정한 결과, 대조군은 20.5 \pm 2.5, 溫膽湯合聰明湯 100, 50, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군은 97.3 \pm 0.7, 85.5 \pm 1.7, 70.3 \pm 7.8이었고, 導痰湯合聰明湯 100, 50, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군은 95.8 \pm 1.5, 85.5 \pm 3.0, 64.1 \pm 2.1 (%)로 나타나 대조군에 비해 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 실험군 모두 농도의존적으로 유의성 있는 생존율의 상승을 보였고 같은 농도에서 처방 간 생존율의 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

BV2 microglial cell line에 IFN- γ 를 처리하고 48 시간 경과 후 대조군은 정상군에 비하여 세포의 사멸과 형태의 변화를 나타낸 것에 비해 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 실험군은 세포의 형태학적 구조가 비교적 양호하게 유지되었음을 볼 수 있다(Fig. 3).

이러한 결과로 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯은 상기의 농도에서 IFN- γ 로 인해 나타나는 세포 사멸을 억제하는 효과가 있다고 할 수 있다.

BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 NO생성량을 관찰한 결과, 정상군은 19.6 \pm 4.5, 대조군은 466.3 \pm 56.0, 溫膽湯合聰明湯 100, 50, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군은 각각 56.7 \pm 26.0, 125.5 \pm 41.9, 307.2 \pm 97.7, 導痰湯合聰明湯 100, 50, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 실험군은 각각 70.4 \pm 30.7, 111.6 \pm 34.7, 247.0 \pm 63.9 (mM)로 나타나 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 실험군 모두 농도의존적으로 유의성 있는 감소를 보였고 같은 농도의 처방 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 4).

또한 BV2 microglial cell에서 ROS 생성을 관찰한 결과, 대조군에서 비해 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 실험군에서는 농도 의존적으로 ROS의 생산이 억제되었다(Fig. 5).

이 결과로 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯은 산화적 손상을 유발하는 NO, ROS의 생성을 억제함으로써 AD의 예방에 활용될 수 있음을 알 수 있다.

또한 PC-12 cell line에서 AChE activity를 측정한 결과, 정

상군은 6.4±1.7, 대조군은 46.2±2.4, 溫膽湯合聰明湯 100, 50, 10 μg/ml 실험군은 각각 22.9±5.6, 31.4±4.4, 33.0±10.3, 導痰湯合聰明湯 100, 50, 10 μg/ml 실험군은 각각 16.0±6.2, 26.4±11.1, 33.0±4.7 (nM/mg/min)로 나타나 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 실험군 모두 농도의존적으로 유의성 있는 감소를 보였고 같은 농도의 처방 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 6). 따라서 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯의 투여가 AChE activity를 억제함으로써 acetylcholine을 증가시켜 기억력의 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

이상의 내용을 총괄해 보면 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯은 IFN-γ를 처리한 BV2 microglial cell line에서 세포생존율을 농도의존적으로 유의하게 상승시켰고 BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 NO와 ROS의 생성을 억제하였으며 PC-12 cell line에서 AChE activity를 억제하였다. 그러나 각 실험항목에서 처방간 유의한 효과의 차이는 없었다.

결과적으로 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯은 산화적 스트레스와 choline성 신경세포의 퇴화에 의한 기억력 저하에 대한 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 본 처방의 기전 탐구와 임상연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론

溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯 추출물의 AD 병태 모델에 대한 세포보호, 항산화 및 AChE 억제 효과를 실험적으로 연구한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯은 IFN-γ를 처리한 BV2 microglial cell line에서 세포생존율을 유의하게 상승시켰고 BV2 microglial cell line의 배양 상층액에서 NO와 ROS의 생성을 억제하였으며 PC-12 cell line에서 AChE activity를 억제하였다.

이상의 결과로 溫膽湯合聰明湯과 導痰湯合聰明湯은 AD의 치료에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. 대한한방신경정신과학회편. 한방신경정신의학. 서울, 집문당, pp 311-316, 2005.
2. 조추용, 최현자 역. 치매 예방과 케어. 서울, 창지사, p 49, 2002.
3. 이광우. 임상신경학. 서울, 고려의학, pp 203-208, 2002.
4. National Institute on Aging : National Institute on Health, Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999.
5. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울, 翰成社, pp 610-611, 1978.
6. 陳士鐸. 石室秘錄. 北京, 中國中醫藥出版社, p 125, 1991.
7. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北, 甘地出版社, pp 222-225, 233-235, 1990.
8. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 南山堂, p 116, 129, 366, 1994.
9. 李尙仁 외. 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp 151-153, 308-313, 419-420, 426-428, 1990.
10. 孫思邈. 千金要方, 서울, 大星文化社, p 217, 1984.

11. 李尙仁 외. 本草學. 서울, 영림사, pp 58-60, 61-63, 101-103, 137, 281-284, 303, 344-347, 348-349, 351, 354-356, 369-372, 401-403, 430-431, 440-441, 448, 459-460, 467, 541-542. 1990.
12. 李尙仁 외 編. 方劑學. 서울, 永林社, pp 528, 531-532, 1990.
13. 李載熙. 圖說 韓方診療要方. 光州, 醫學硏究社, p 538, 1987.
14. 尹吉榮. 東醫臨床方劑學. 서울, 明寶出版社, p 99, 106, 1987.
15. 陳 輝 외. 實用中醫腦病學. 北京, 學苑出版社, pp 242-243, 791-797, 1993.
16. 嚴用和. 嚴氏濟生方. 北京, 人民衛生出版社, p 79, 1980.
17. 李中梓. 醫宗必讀. 臺北, 大方出版社, p 343, 1978.
18. 康命吉. 濟衆新篇. 서울, 杏林書院, p 83, 1971.
19. 金完熙, 崔達永. 臟腑辨證論治. 서울, 成輔社, pp 191-192, 1985.
20. 박지운, 정인철, 이상룡. 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 CT105와 βA로 유도된 Alzheimer's Disease病態 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지 17(1):37-57, 2006.
21. 하수영, 정인철, 이상룡. 聰明湯과 山查聰明湯이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지 17(1):59-78, 2006.
22. 최강욱, 이상룡, 정인철. 聰明湯과 木槿皮聰明湯 열수추출물, 초미세분말제형이 microglia 및 기억력 감퇴 병태모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 20(5):1200-1210, 2006.
23. 徐承浩, 鄭仁哲, 李相龍. 聰明湯和山查聰明湯熱水提取物. 超微細粉末劑型對microglia及記憶力減退病態模型的影響, 第5會天津國際中醫藥學術研討會議論文集, pp 325-327, 2006.
24. 정인철, 이상룡. 溫膽湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지 8(2):51-62, 1997.
25. Cacquevel, M., Lebeurrier, N., Cheenne, S., Vivien, D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. Current Drug Targets, 5(6):529-534, 2004.
26. Kuh, D.E., Koeppe, R.A., Minoshima, S., Snyder, S.E., Ficaró, E.P., Foster, N.L., Frey, K.A., Kilbourn, M.R. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. Neurology, 52(4):691-699, 1999.
27. Mhatre, M., Floyd, R.A., Hensley, K. Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis : common links and potential therapeutic targets. Journal of Alzheimers disease, 6(2):147-157, 2004.
28. 안준익, 이용성. Beta-amyloid의 분자생물학. 한양의대학술지 21(1):11-16, 2001.
29. Trabace, L., Cassano, T., Steardo, L., Pietra, C., Villetti, G., Kendrick, K.M., Cuomo, V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 294(1): 187-194, 2000.
30. Kasa, P., Papp, H., Torok, I. Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in

- the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinergic enzyme-positive structures in the human and rat brain. *Neuroscience*, 101(1):89-100, 2000.
31. Villarroya, M., García, A.G., Marco-Contelles, J., López, M.G. An update on the pharmacology of galantamine. *Expert Opin Investig Drugs*. 16(12):1987-1998, 2007.
 32. Winstein, C.J., Bentzen, K.R., Boyd, L., Schneider, L.S. Does the cholinesterase inhibitor, donepezil, benefit both declarative and non-declarative processes in mild to moderate Alzheimer's disease?. *Curr Alzheimer Res*, 4(3):273-276, 2007.
 33. Yen, G.C. et al. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. *Food Chemistry*, 74: 471-478, 2001.
 34. Mates, J.M. et al. Antioxidant enzymes and human disease. *Clinical Biochemistry*, 32: 595, 1999.
 35. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울, 東洋醫學研究院, pp 217-218, 229, 1985.
 36. 朱震亨. 金匱鉤玄. 서울, 鼎談出版社, pp 306-307, 1992.
 37. 薛己. 校注婦人良方(卷三). 서울, 金泳出版社, pp 1-13, 1962.
 38. 實用中醫學編輯組. 臨床各科疾病療法. 香港, 時代圖書有限公司, pp 59-61, 1980.
 39. 中醫研究院. 中醫症狀鑑別診斷學. 北京, 人民衛生出版社, p 81, 1987.
 40. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울, 醫聖堂, pp 247-248, 1998.
 41. 成都中醫學院方劑教研組. 中醫治法與方劑. 北京, 人民衛生出版社, pp 208-212, 1985.
 42. 朴義洙. 論證實驗醫訣. 서울, 日文社, pp 75, 77, 83-85, 1979.
 43. Masaru Yamamoto, Tomomi Kiyota, Masahide Horiba, James, L., Buescher Shannon, M. Walsh Howard, E. Gendelman and Tsuneya Ikezu. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Regulate Amyloid- β Plaque Deposition and β -Secretase Expression in Swedish Mutant APP Transgenic Mice. *American Journal of Pathology*, 170: 680-692, 2007.
 44. Kim, Y.J., Hwang, S.Y., Hwang, J.S., Lee, J.W., Oh, E.S., Han, I.O. C6 glioma cell insoluble matrix components enhance IFN-gamma-stimulated INOS/no production in BV2 microglial cells. *J Biol Chem*, Nov 2, 2007.