동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 16. No. 2, 2005

淸肺瀉肝湯과 單味들이 Hypoxia-Reoxygenation에 의해 손상받은 Mouse Neuroblastoma 2a Cells에 미치는 影響

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

The effects of Chungpesagan-Tang and herbs on Mouse neuroblastoma 2a cells damaged by hypoxia-reoxygenation.

Ha Kyoung Moon, 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 assess effect of Chungpesagan-Tang 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 Chungpesagan-Tang and herbs.

Result :

1. In MTT assay of hypoxia all of herbs were almost ineffective and Hubak was a little effecctive.
2. In MTT assay of reoxygenation most of herbs were not effective. But Hubak was some effective.
3. In LDH assay of hypoxia all of herbs were effective. Especially Chungpesagan-Tang were equally effective on all of concentration.

◆ 투고:10/21, 채택:11/7
교신저자 : 황의완, 서울특별시 동대문구 회기동 경희의료원 한방병원 신경정신과학교실
Tel. 02-958-9188, Fax. 02-958-9104, E-mail: aromaqi@khu.ac.kr

4. In LDH assay of reoxygenation all of herbs were generally effective. Especially Chungpesagan-Tang and Baekji were highly effective and Kilkyung was also effective on low concentration.
5, The herbs were generally effective on LDH assay of hypoxia and reoxygenation.

Conclusion : The results suggest that Chungpesagan-Tang and all of berbs may have protective effect on condition of oxidative stress and can be applied on the development of a new medicine for neurodegenerative disease like dementia.

Key Words : Chungpesagan-Tang, Herb, hypoxia-reoxygenation, Dementia

Ⅰ. 緖 論

치매란 정상적인 지적 수준을 갖춘 사람의 뇌에 생긴 기질적 병변으로 인해 전반적인 인지기능의 장애를 나타내는 질환[1,2]으로 의식이 맑은 상태에서도 기억이나 사고력, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어 및 판단력 등을 포함하는 다수의 高位 대뇌기능에 장애를 보이는 후천적 임상증후군을 말한다[3-5]. 원인별 유병률을 보면 알츠하이머형 치매와 혈관성 치매 및 그 혼합형이 전체의 80-90%를 차지한다[6,7]. 그 중 혈관성 치매는 뇌혈관이 변성되어 뇌세포 기능이 저하됨으로써 발생하는 치매로[2,8], 뇌혈관 질환이 우리 나라에서 발병률이 높기 때문에 중요한 질환이며[9] 다른 치매와 달리 예방과 치료에 가능성이 많은데도 불구하고 상대적으로 많은 연구가 이루어지지 않고 있다[4,10].

혈관성 치매의 주원인인 뇌허혈[11]에 대한 연구는 근래까지는 주로 혈류차단 후 신경세포가 괴사(necrosis)하는 기전에 대한 것이 대부분이었으나, 혈액의 재관류 후에 조직손상이 가중된다는 사실이 알려진 이후로 apoptosis에 의한 지연성 세포사(Delayed Neuronal Death) 연구가 활발하게 이루어지고 있다[12,13]. 특히 최근 항산화 연구와 연관된 oxidative stress 說에서는 재관류 시에 급격한 산소와 영양 성분의 공급으로 발생하는 활성산소의 작용으로 신경세포의 apoptosis가 일어난다고 했다[14-17]. 따라서 뇌허혈-재관류 손상에서 뇌신경세포를 보호하기 위해 세포괴사의 방지뿐 아니라 활성산소를 제거하는 항산화제의 처치에 더욱 관심이 쏠리고 있다[18].

허혈-재관류 상황에서 한약물의 항산화력을 측정한 연구로는 白芷[14], 蠐螬[19] 등의 單味로 실험한 경우가 있고, 淸肺瀉肝湯[12,15], 加味六味地黃湯[20], 防風當歸飮[21] 등의 複合處方을 쓴 경우가 있다. 본 연구는 뇌질환에 임상적으로 유효했고, 허혈 유발 실험동물에서도 유효했던 한약물 중 淸肺瀉肝湯 및 구성약물을 이용해 허혈-재관류시 뇌조직 손상을 보호하는 기전을 더 상세히 연구하기 위해 제안되었다.

淸肺瀉肝湯은 1894년 四象醫學 이론을 수립한 東武 李濟馬[22]의 東醫壽世保元에서 太陰人 肝受熱 裏熱病論에 기재된 熱多寒少湯에 大黃을 가미한 처방이다. 東醫四象新編[23]에서 처음 소개된 후 여러 문헌에서 太陰人 肝燥熱證의 각종 병증에 응용한다고 하였다[24-26]. 淸肺瀉肝湯을 뇌졸중에 적용한 연구보고는 홍[15,27]의 허혈-재관류 세포 손상에서 淸肺瀉肝湯의 보호효과, 그리고 허혈-재관류 환경하에서 淸肺瀉肝湯의 염증 관련반응 억제 효과 연구가 있으며, 오[12]의 淸肺瀉肝湯이 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류에 미치는 영향 등이 있다.

淸肺瀉肝湯의 구성약물 중 하나인 白芷는 뇌졸중 초기에 多用되는 처방들의 주된 약재[14]로서, 散風除濕, 通竅止痛, 消腫排膿하는 효능이 있어 陽明經의 風熱 · 濕熱을 제거하는 主藥으로 사용되어 왔다[14,28]. 白芷에 대한 연구는 항균효과 및 혈관계 개선효과 등에 대한 연구[29,30]가 있었고, 이[14]는 허혈-재관류 시 신경세포 보호효과에 대한 보고를 한 바 있다. 桔梗 역시 淸肺瀉肝湯의 구성약물이며, 鎭咳, 祛痰, 排膿, 開胸膈滯氣하는 효능이 있다[31-33]. 桔梗에 대해서는 주로 saponin 성분에 대한 연구[34,35]와 그 외 精油成分에 관한 연구[36]가 있었으나 單味로 허혈-재관류 및 항산화 연구에 이용된 적은 없었다. 厚朴은 溫中下氣 · 去濕 · 祛痰 하는 효능이 있어 消化障碍, 嘔吐, 腹脹, 泄瀉, 咳嗽, 喘息등에 사용된다[28,37]. 厚朴은 淸肺瀉肝湯의 구성약물은 아니지만, 천[38]의 허혈시 신경세포손상에 대한 보호효과에 관한 논문 이후로 허혈-재관류 및 항산화와 연관된 연구가 없었고 이번 연구의 의의가 여러 單味 약물의 효과 검색도 있기에 실험에 포함시켰다.

위에서 언급했듯이, 淸肺瀉肝湯 및 구성약물은 이미 허혈-재관류 時 뇌세포 보호효과에 대한 보고가 있었다[12,14,15,27]. 이들 연구에서 in vivo 실험은 in vivo의 특성 때문에 약물의 효과가 혈류대사를 개선하기 때문인지 혹은 신경세포의 세포사를 직접적으로 억제하기 때문인지는 명확히 검토할 수 없고 in vitro 실험들도 이 점에 대해 분명한 논의가 없었기에, 본 연구에서는 이들 한약물이 산소공급 차단에 의한 세포사와 차후의 산소 재공급에 의한 세포사에 미치는 효과를 검토하여 임상효과를 설명할 기전을 제공하기 위해 in vitro에서 MTT assay[14]와 LDH assay[39] 방식으로 세포활성과 독성을 측정하는 기반연구를 실시했다. 이번 연구는 한약물 중 특이적으로 효과를 보이는 화합물에 관한 용량별 검색방법도 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

본 실험에 사용된 neuroblastoma는 약물의 抗치매효과 연구[40]와, 산화성 신경손상 연구[41,42]에 이용되고 있고, 세포에 hypoxia를 유발할 경우 조직의 hypoxia와 유사한 생화학적 반응이 예상되며[43], reoxygenation을 유발할 경우 free radical에 의한 손상이 야기되어[44] 동물실험에서의 虛血後 再灌流의 손상과 공통점이 있다. 따라서 hypoxia-reoxygenaion에서의 neuroblastoma 세포주를 이용한 세포손상모델은 虛血 및 再灌流에 의한 손상에 약물이 미치는 효과의 세포연구 모델로 적합하다고 판단된다.

이에 저자는 허혈-재관류 상태를 in vitro에서 mouse neuroblastoma 2a를 대상으로 재현하여, 淸肺瀉肝湯 및 구성약물의 추출물을 상태노출 시간에 따라 농도를 달리하여 투여한 뒤 MTT assay와 LDH assay를 통해 세포활성도(Cell Viability)와 세포독성(Cytotoxicity)을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

① 藥材의 構成

본 실험에 사용된 한약물은 太陰人 熱多寒少湯의 變方인 淸肺瀉肝湯과 이 처방과 연관된 單味로 구성되어 있고 본 연구에 사용된 單味는 白芷, 桔梗, 厚朴들이며 이들의 學名과 生藥名은 다음과 같다.(Table 1.)

Table 1. Prescription of Chungpesagan-Tang and Names of Herbs Used in the Experiment.

Name of Herb		Botanical Name	dose (g)
淸肺瀉肝湯	葛根	Puerariae Radix	12
	黃芩	Scutellariae Radix	8
	藁本	Angelicae Tenuissimae Radix	8
	蘿葍子	Raphani Semen	4
	升麻	Cimicifugae Rhizoma	4
	大黃	Rhei Rhizoma	4
	白芷	Angelicae dahuricae Radix	4
	桔梗	Platycodi Radix	4
厚朴		Magnoliae Cortex	

② 藥材의 抽出

각 약물을 경희의료원 약재과로부터 획득하여 각 50g을 70% 메탄올 수용액에 4℃에서 냉침하여 추출하였다. 추출액은 매 3시간마다 분광기로 400nm에서 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. 한약물이 미치는 효과는 배양액에서의 농도를 기준으로 최소 50㎍/㎖에서 최고 1mg/㎖를 포함하여 5개의 농도에서 실시하였다.

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 neurolastoma 2a 세포의 배양액은 DMEM + FBS 10%(v/v) + PS 1%(v/v)을 사용 하였으며 직경 100mm 둥근 플레이트를 사용하여 세포를 증식하였다. Confluence가 80% 가 되었을 때 trypsin(0.5g/100㎖, 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 상

태에서 적당한 시간동안 세포가 배양되었고 reoxygenation 조건은 hypoxia 조건에서 배양된 세포를 일정시간 후 정상적인 조건의 배양기로 옮겨 배양하였다.

3) 세포활성도 측정(MTT assay)

MTT assay는 Sladowski의 방법을 따라 행하였다[45]. 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[46].

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/㎖ 로 PBS 용액에 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 측정하였다. 세포활성도(Cell Viability, %)는 다음과 같이 정의하였다.

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

Cell Viability = (실험치÷control 군)

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

4) 세포독성측정(LDH assay)

Roche Applied Science사에서 제공된 LDH assay kit를 사용하여 측정하였다. LDH(lactate dehydrogenase)는 세포질에 존재하는 효소로서 정상의 경우 세포막을 투과하지 않지만, 세포막이 손상을 입을 경우 세포밖으로 분비되어 배지내로 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 있다[95]. 여기서 LDH의 활성이 줄어들었다면 세포 밖으로 분비된 LDH의 양이 감소했다는 의미가 되므로 산소의 의한 세포막 손상을 보호한 효과가 있다고 결론지을 수 있고, 따라서 세포막 파괴로 결론지어지는 세포의 괴사를 막는 효과가 있다고 볼 수 있다. 480nm 에서 이의 量을 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(100㎕)은 새로운 96 웰플레이트로 옮기고 100㎕의 제공된 반응용액을 더하여 잘 섞은 후 30분간 상온에서 보관하여 반응을 시켰다. 그 후 50㎕의 1N HCl을 더하여 반응을 중단시킨 후 ELISA reader (Emax, U.S.A)로 490 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이때 (+)control 군의 값은 세포에 100 ㎕, 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 50㎍/㎖에서 최고 1,000㎍/㎖를 포함하여 5개의 다른 농도에서 실시하였다.

5) 통계처리

실험에서 얻어진 모든 자료는 윈도우용 SPSS(버전 11.0)를 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. 한약물의 수득율

한약 추출물은 4℃에서 70% 메탄올 수용액으로 냉침을 한 결과 50g의 비교적 적은 양의 약재를 사용했음에도 불구하고 실험에 충분한 양이 얻어졌으며 다음의 표에 보이는 결과를 얻었다. 이 중 厚朴의 경우 가장 낮은 1.48%의 수득율을 보였으며 白芷, 桔梗의 경우 8.82%, 29.38%의 높은 수득율을 보였다. 이는 약재가 유기용매 등에 녹는 성분의 함량을 의미할 뿐 약효에 관한 특정한 유의성을 보이는 결과라고 생각되지는 않았다. 단 淸肺瀉肝湯의 경우는 수득율이 확보되지 않았으나 실험결과에 영향이 없을 것으로 사료되어 未定으로 두었다.

Table 2. The Rate of Extraction from Herbs

Name of Herb	Angelicae dahuricae Radix	Platycodi Radix	Magnolia e Cortex	Chungpe sagan -Tang
Rate of Extraction(%)	8.82	29.38	1.48	N. D.

(N.D. : not determined)

2. 성적

1) 사전 실험

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 hypoxia-reoxygenation이 細胞 生存과 細胞死 정도를 파악하기 위한 실험을 실시하였다.

① 한약물이 정상의 N2a 세포에 미치는 효과

한약물이 hypoxia와 reoxygenation에 미치는 효과를 조사하기 전에 이들 한약물이 정상적인 상태에서의 세포에 미치는 효과를 조사하기 위하여 1mg/㎖의 농도에서 세포증식(MTT assay)과 세포손상(LDH assay)에 미치는 효과를 조사하여 각기 Fig. 1(A).와 Fig. 1(B).로 나타내었다. Fig. 1(A).에 나타난 바와 같이 정상군에 비해 약물이 투여된 경우 세포 환원활성도는 더 낮아졌으며 길경은 50% 이상 감소했다. Fig. 1(B).에서도 桔梗을 제외하고 모든 한약물들이 정상군에 비해 약간 높거나 유사한 값을 나타내었다. 따라서 본 연구에 사용된 單味들이 桔梗을 제외하고는 정상적인 세포의 세포증식이나 세포손상에 무관하거나 부정적으로 작용할 수 있다는 것을 의미하고 있다. 桔梗의 경우 in vitro와 높은 농도(1mg/㎖)에서 세포손상이 일어날 수 있기 때문에 hypoxia 상태에서도 세포에 약물자체가 심각한 손상을 야기할 것으로 예상되었다. 이런 현상은 桔梗이 가지고 있는 saponin 계열의 화합물이 과량일 경우 일종의 세척제로 작용하여 세포막에 손상을

가하고 세포질에 있는 LDH가 배양액으로 유출된 것으로 생각되었다.

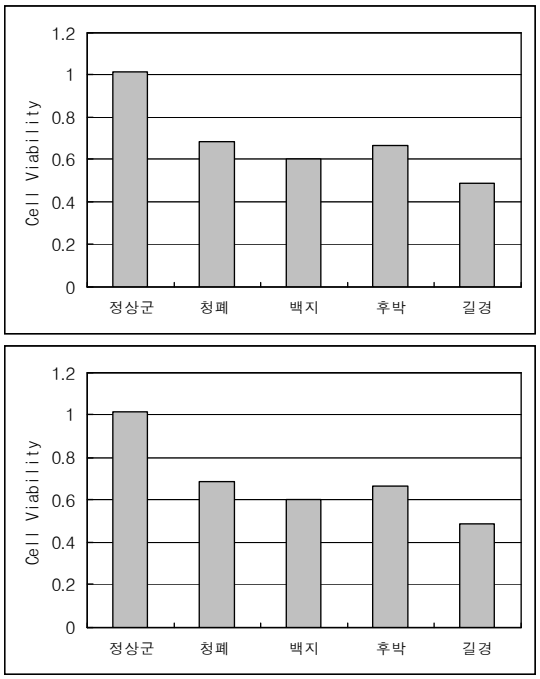


Fig. 1(A). Cell viability of Mouse neuroblastoma 2a cell influenced by herbs

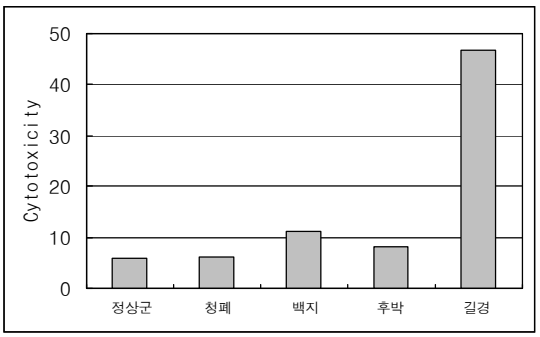


Fig. 1(B). Cytotoxicity of Mouse neuroblastoma 2a cell influenced by herbs

② Hypoxia와 Reoxygenation이 세포생존과 세포사에 미치는 효과

세포의 생존과 사멸에 미치는 산소의 영향을 조사하기 위하여 여러 배양조건에서 실험을 실시하여 아래의 Fig. 2(A).와 Fig. 2(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. 2(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 재공급時 N2a 세포에 일정정도 세포사가 진행되었지만, 즉 세포수가 감소되었지만 전체 환원력의 변화는 없었다는 것이다.

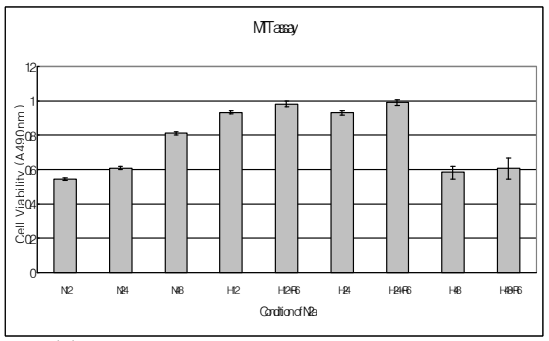
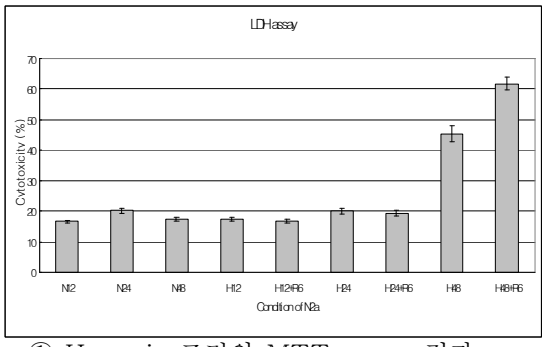


Fig. 2(A). MTT assay of hypoxia-reoxygenation injured Mouse neuroblastoma 2a cell (N: normal condition, H: hypoxia condition, R: reoxygenation condition)

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

2) 淸肺瀉肝湯 및 白芷, 桔梗, 厚朴이 세포손상과 보호에 미치는 효과



① Hypoxia 조건의 MTT assay 결과

淸肺瀉肝湯 및 3가지 單味가 neuroblastoma 2a 세포주의 hypoxia에 의한 세포환원활성 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㎍/㎖ 에서 1,000㎍/㎖ 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 약물이 투여되지 않았을 때를 포함하여 그 결과를 Table 3.에 보였다. Hypoxia 상태에서 세포환원활성 정도에 대해 실험에 사용한 모든 약재는 대체로 경미하거나 부정적인 효과를 보이고 있으나, 그 양태는 각기 다르다.

淸肺瀉肝湯은 전체적으로 거의 차이를 보이지 않아 농도와 무관한 양상을 보이고 있으며, 白芷는 200㎍/㎖까지 별 효과가 없다가 이후 다시 세포활성이 급격히 감소한다. 桔梗은 100㎍/㎖까지는 양호한 보호효과를 보이다가 이후로 역시 급속하게 세포활성을 감소시키고 있다. 厚朴은 100㎍/㎖까지와 200㎍/㎖~500㎍/㎖까지의 두 지점에서 세포보호력을 보이고 이 외의 지점에서는 세포활성의 감소를 보이고 있다. 이로 보아 hypoxia 상태에서의 세포손상 모델의 세포환원활성도는 두드러진 효과가 있다고 하기는 어려우나, 약물별 · 농도별로 독특한 양상을 띠고 있음을 관찰할 수 있다.

Table 3. Effect of Herbs on Cell Viability of Hypoxia Injured N2a Cell.(㎍/㎖)

Herb \ Dose	0	50	100	200	500	1000
Chungpesagan-Tang	0.7042 ±0.091	0.6696 ±0.082	0.6810 ±0.127	0.6346 ±0.093	0.6796 ±0.135	0.6434 ±0.165
Angelicae dahuricae Radix	0.7632 ±0.037	0.6442 ±0.074	0.6880 ±0.110	0.7674 ±0.159	0.5788 ±0.058	0.4356 ±0.080 **
Platycodi Radix	0.7152 ±0.026	0.7478 ±0.037	0.8722 ±0.050	0.7544 ±0.089	0.6928 ±0.082	0.4108 ±0.021 **
Magnoliae Cortex	0.6658 ±0.046	0.7114 ±0.055	0.7962 ±0.111	0.6880 ±0.054	0.8498 ±0.136	0.7986 ±0.058

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

② Reoxygenation 조건의 MTT assay 결과

淸肺瀉肝湯 및 白芷, 桔梗 厚朴의 3가지 單味가 neuroblastoma 2a 세포주의 hypoxia 이후 reoxygenation에 의한 세포환원활성의 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㎍/㎖에서 1,000㎍/㎖ 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 그 결과는 Table 4.에 보여졌다. Reoxygenation 조건에 의한 세포환원활성 감소에 대해 실험에 사용한 약재는 매우 다양한 양태의 반응을 보이고 있다.

淸肺瀉肝湯은 50㎍/㎖까지는 경미한 효과가 있다가 그 이상에서는 활성이 다소 억제되었으나 전반적으로는 큰 영향을 미치지 않았다. 白芷는 50㎍/㎖까지 활성의 증가가 관측되다가 500㎍/㎖이후 1000㎍/㎖에서 다시 증가하는 양상을 보였으나 이 역시 큰 변화는 없었다. 桔梗의 경우 hypoxia 상태와 유사하게 나타나서 50㎍/㎖까지는 수치가 0.62에서 0.84로 활성이 크게 증가하다가 이후 급격한

활성의 악화를 나타내어 1000㎍/㎖에서는 0.28까지 큰 폭으로 감소했다.

厚朴도 50㎍/㎖까지 0.62에서 0.88로 가장 우수한 활성을 관측할 수 있었으나 이후 다소 활성이 떨어지면서 부정적인 영향을 미치다가, 다시 500㎍/㎖ 이상에서 긍정적인 활성증가의 효과를 보여 1000㎍/㎖에서 0.86까지 회복을 보였다. Reoxygenation에 의한 세포손상 모델의 세포환원활성도에서도 약물 투여에 따른 고른 활성의 증가나 감소가 관찰되기보다는 용량별로 다른 결과를 나타내는 양상이 지속되고 있다.

Table 4. Effect of Herbs on Cell Viability of Reoxygenation Injured N2a Cell(㎍/㎖)

Herb \ Dose	0	50	100	200	500	1000
Chungpesagan-Tang	0.6230 ±0.052	0.7482 ±0.085	0.6822 ±0.125	0.5854 ±0.160	0.5276 ±0.185	0.6006 ±0.118
Angelicae dahuricae Radix	0.6230 ±0.052	0.7010 ±0.118	0.6020 ±0.095	0.5988 ±0.040	0.6216 ±0.073	0.7330 ±0,121
Platycodi Radix	0.6230 ±0.052	0.8412 ±0.051	0.5432 ±0.023	0.5514 ±0.029	0.3818 ±0.047	0.2808 ±0.048 **
Magnoliae Cortex	0.6230 ±0.052 **	0.8828 ±0.020	0.6858 ±0.040	0.7438 ±0.043	0.7180 ±0.037	0.8632 ±0.041 **

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

③ Hypoxia 조건의 LDH assay 결과

Neuroblastoma 2a 세포주에 가해진 hypoxia에 의한 손상에 淸肺瀉肝湯 및 3가지 單味가 미치는 효과를 연구하기 위하여 hypoxic 조건의 세포배양액에 유출된 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성을 조사하였다. 각 한약물은 최소 50㎍/㎖ 에서 1,000㎍/㎖ 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 한약물이 투여되지 않았을 때를 포함하여 그 결과는 Table 5.에 요약되었다. Hypoxic 조건에 의해 유발된 세포손상에 대해 실험에 사용한 네 가지 경우에서 淸肺瀉肝湯, 白芷, 厚朴은 비교적 안정적으로 LDH 활성감소, 즉 세포보호효과를 보이고 있는데 반해 桔梗은 약물의 투여 용량에 따라 큰 폭의 변화를 보임을 관찰할 수 있다.

먼저 淸肺瀉肝湯은 50㎍/㎖이상에서 1mg/㎖까지 약간의 세포보호효과가 있으며 전체적으로는 완만한 세포독성의 감소를 보이고 있다. 白芷는 50㎍/㎖~100㎍/㎖에서 약간의 효과를 보이고 난 뒤 세포독성이 증가하다가 약 200-1000㎍/㎖에서 다시 추가적인 효과를 보이는데 전반적인 결과가 거의 20%에 가까워 큰 효과는 없는 것으로 보인다. 桔梗은 50㎍/㎖에서는 무려 25.01%에서 13.86%로 거의 절반 가까이 세포독성을 감소시키는 등 200㎍/㎖까지 비교적 양호한 보호효과를 보이다가, 이후 1mg/㎖까지 급속히 세포사를 유발하고 있다.

厚朴은 MTT assay의 경향과 일치하는 효과를 보이는데, 즉 용량대가 50㎍/㎖~100㎍/㎖일때와 200㎍/㎖~500㎍/㎖일때 각기 보효효과를 나타냈다. 이처럼 hypoxia에 의한 세포손상모델에서도 약물들은 농도별로 다양한 양상을 보이고 있다고 할 수 있는데, 淸肺瀉肝湯과 厚朴은 비교적 완만한 효과를 보였으며, 白芷는 매우 경미한 효과가 있었고, 桔梗은 일정 농도에서는 큰 효과를 보였으나 역시 고농도에서는 saponin등의 함유성분이 문제가 될 수 있음을 볼 수 있다.

Table 5. Effect of Herbs on Cytotoxicity of Hypoxia Injured N2a Cell(㎍/㎖)
all values are mean(S.D).

Herb \ Dose	0	50	100	200	500	1000
Chungpesagan-Tang	25.01 ±2.893	18.43 ±1.757**	18.77 ±2.153*	18.46 ±1.330*	14.97 ±2.793*	16.63 ±0.982**
Angelicae dahuricae Radix	25.01 ±2.892	20.08 ±1.056	24.13 ±1.577	19.32 ±2.029*	19.94 ±1.718*	18.53 ±1.114**
Platycodi Radix	25.01 ±2.893	13.86 ±1.020**	18.26 ±2.239*	16.21 ±1.498**	21.05 ±1.550	36.36 ±3.180**
Magnoliae Cortex	25.01 ±2.892	22.38 ±3.889	19.29 ±1.011	22.08 ±5.321	17.83 ±0.964*	17.68 ±0.546*

* : p<.05, ** : p<.01

④ Reoxygenation 조건의 LDH assay 결과

淸肺瀉肝湯 및 3가지 單味가 neuroblastoma 2a 세포주의 reoxygenation에 의한 손상에 미치는 효과를 연구하기 위하여 세포배양액에 유출된 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성을 조사하였다. 각 약물은 최소 50㎍/㎖에서 1,000㎍/㎖ 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 약물이 투여되지 않았을 때를 포함하여 그 결과를 Table 6.에 보였다. Reoxygenation 조건에 의한 세포손상에 대해 실험에 사용한 모든 한 약물은 일정정도의 세포보호효과를 보이고 있지만 그 양상은 hypoxia 조건과는 또 다른 것을 관찰할 수 있다.

淸肺瀉肝湯은 100㎍/㎖까지는 별 영향을 주지 않다가 그 이상에서는 오히려 급격히 보호효과가 증가하여 500㎍/㎖에서 가장 낮은 세포독성을 보인다. 白芷는 전 범위에 걸쳐 보호효과가 있으며 그 보호정도도 상당히 높은 편으로 500㎍/㎖~1000㎍/㎖대에서는 0㎍/㎖일때에 비해 세포독성이 50%이하로 낮아지는 양상을 보였다.

桔梗은 hypoxia와 마찬가지로 이중의 효과가 보이는데, 즉 200㎍/㎖까지는 0㎍/㎖에서보다 거의 절반 이상으로 세포독성을 저하시키는 등 세포 보호효과를 보이다가 이후 급속히 독성이 증가되어 500㎍/㎖에서는 0㎍/㎖때와 비슷한 수치를 보인다.

厚朴은 50㎍/㎖까지 약간의 보호효과를 보이다 이후 200㎍/㎖~500㎍/㎖대에서 추가적으로 경미한 보호효과를 보여 전체적으로는 여타 세 약물에 비해 두드러진 수치의 감소는 없었다. Reoxygenation에 의한 세포손상모델 역시 앞에서의 결과들과 유사하게 농도별로 增減이 불일정한 모습을 보이고 있으나 이전의 경우들에 비해 상당히 유의한 세포보호 효과를 나타내고 있음을 관찰할 수 있다.

Table 6. Effect of Herbs on Cytotoxicity of Reoxygenation Injured N2a Cell(㎍/㎖)

Herb \ Dose	0	50	100	200	500	1000
Chungpesagan-Tang	35.07 ±3.550	36.55 ±7.751	32.85 ±6.645	19.81 ±1.469**	17.19 ±2.708*	22.24 ±1.770**
Angelicae dahuricae Radix	35.07 ±3.551	22.30 ±2.928**	19.99 ±0.820*	22.21 ±2.239*	14.23 ±1.322*	15.23 ±2.493*
Platycodi Radix	35.07 ±3.550	17.50 ±1.195**	18.95 ±1.306*	20.72 ±1.243*	34.56 ±3.178*	30.90 ±3.963**
Magnoliae Cortex	35.07 ±3.550	24.27 ±2.486**	26.82 ±2.381*	27.19 ±1.457*	22.82 ±0.437*	23.99 ±2.214*

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

3) 결과의 약물별 개괄

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

각 약물을 총체적으로 살펴보면, 淸肺瀉肝湯은 50㎍/㎖과 200㎍/㎖에서의 두 가지 유효활성이 관측되며, 50㎍/㎖의 활성은 reoxygenation 상황의 MTT assay에서와 hypoxia 상황의 LDH assay에서, 고농도에서는 reoxygenation 상황의 LDH assay에서만 약간의 활성이 보이고 있다. 그리고 세포 환원활성효과보다 세포 보호효과가 뛰어난 것으로 보인다.

白芷는 50㎍/㎖ 근처와 200㎍/㎖ 이후 두 지점의 용량별 활성이 있는데, 저농도에서 보이는 활성은 reoygenation의 MTT assay와 hypoxia의 LDH assay에서 효과가 있었고, 고농도에서 보이는 활성은 reoxygenation 상황의 MTT assay와 LDH assay 모두에서 좋은 결과를 보였다. 白芷 역시 세포 환원활성효과보다는 세포 보호효과가 더 나은 것으로 판단된다.

桔梗은 대체적으로 100㎍/㎖까지 저농도에서는 세포 환원활성과 세포보호 면에서 모두 상당한 효과를 보이다가 이후 급속히 나빠지며 細胞死를 촉진하는 등 전체 경우에서 농도에 따라 변동이 극심한 편인데 이는 桔梗이 대량으로 함유하고 있는 saponin 성분에 의한 세포의 necrosis에 의한 결과라고 생각된다.

厚朴은 대체적으로 낮은 농도에서는 hypoxia와 reoxygenation 상황 모두에서 세포보호효과를 보였고, 고농도에서는 일시적으로 약간의 효과를 보이기도 하였으나 저농도에 비해 미미한 정도였다. 전체적으로는 네 약물 중에서 비교적 가장 고르게 효과가 나타난 반면 크게 두드러진 효과를 보이지도 않았다.

그리고 각 상황 별로 약물의 성과를 아래 표를 통해 살펴보면, 桔梗처럼 농도별 효과 차이가 큰 약물이 있기는 하지만, 대체로 MTT assay 결과보다는 LDH assay에서 약물의 효과가 좋게 나타났으며, 아래 표에서는 나타나지 않지만 구체적인 수치로 볼 때, MTT assay와 LDH assay 모두 hypoxia 보다는 reoxygenation 상황에서 효과가 두드러졌다.

Table 7. The Summary of The Experiments

	Experiment	MTTH	MTTHR	LDHH	LDHHR
Name of Herb	Chungpesagan-Tang	×	×	○	○
	Angelicae dahuricae Radix	×	×	○	○
	Platycodi Radix	※	※	※	※
	Magnoliae Cortex	○	○	○	○

(○ : positive, × : negative, ※ : varied with concentration of herb)

Ⅳ. 考 察

치매는 라틴어의 demens에서 유래된 말로서 "out of mind", 즉 황폐화된 정신상태의 의미를 가지는 것으로 프랑스 의학자인 Pinel이 처음으로 사용하였다[48]. 현재는 정상적인 지적 수준을 갖춘 사람이 뇌에 생긴 기질적 병변으로 인해 전반적인 인지기능의 장애를 나타내는 질환으로[1,2,49] 대개 만성 · 진행성으로 발생 · 진행되며, 의식이 맑은 상태에서도 기억이나 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 다수의 高位 大腦機能에 장애를 보이는 후천적 임상증후군의 포괄적 개념을 뜻한다[3-5].

통계청 인구추계(2002)에 의하면 우리나라는 2000년에 65세 이상 노인이 전체인구의 7%를 넘어 고령화사회(Aging Society)로 진입한 데 이어 2020년에서 15.1%를 넘는 고령사회(Aged Society)가 될 것으로 전망하였다[50]. 이런 급속한 사회의 고령화를 증명하듯 65세 이상 노인의 약 87%가 각종 만성 퇴행성 질환을 앓고 있고 특히 치매의 경우 환자 본인뿐 아니라 주변가족의 고통이 심화되어 전반적

인 사회적 삶의 질을 위협하고 세대간 갈등을 낳을 만큼 심각한 질환으로 받아들여지고 있다[51].

치매의 원인을 크게 나누어 보면 뇌의 일차 변성질환과 뇌혈관질환, 그 외 원인질환으로 분류할 수 있다[52]. 또, 치료 가능성에 따라 원인치료가 가능한 우울성 가성치매, 수두증, 신경매독, 대사성 및 내분비질환에 의한 치매가 있고, 치료가 불가능한 알츠하이머형 치매, Pick's Disease, 파킨슨 양상을 동반한 퇴행성 치매가 있으며 혈관성 치매는 초기 예방이 가능한 경우이므로 중간형태로 볼 수 있다[53].

원인별 유병률을 보면 알츠하이머형 치매와 혈관성 치매가 대표적으로 두 형태 및 혼합형이 전체의 80-90%를 차지한다[6,7]. 지역적 · 인종적 차이도 존재하여 서양권에서는 알츠하이머형 치매의 유병율이 혈관성 치매보다 확연히 높은 편이고[54] 동양권, 특히 일본과 중국에서는 혈관성 치매가 알츠하이머형 치매보다 유병율이 높은 편으로 알려져 있으나 표본 선정 방법, 대상 인구의 연령별 성별 인구구조 차이, 진단도구 및 기준, 연구 방법상 차이등에 의해 다르게 나타날 수 있다. 하지만 알츠하이머형 치매의 일부 아형에서 위험요인으로 받아들여지고 있는 ApoE4 대립유전자의 빈도가 동양인에서 서양인에 비해 낮다는 연구, 알츠하이머형 치매의 특징적인 부검소견인 노인반(senile plaque)과 신경섬유조직(neurofibrillary tangle)을 정상인에서 비교하였을 때 동양인이 서양인에 비해 낮다는 소견 등에서 알츠하이머형 치매의 유병율이 실제로 서구에 비해 낮을 가능성도 배제할 수 없다[55-57]. 한국에서는 박[58]과 우[59]의 연구에서 일부 지역의 치매 유병율에 대한 보고가 있었으나 아직 전체적으로는 확실한 통계가 없어 같은 동양권 국가들처럼 혈관성 치매 유병율이 높으리라는 추측도 있고[60], 국가간 차이가 별로 없을 것이라는 보고도 있다[61].

혈관성 치매는 뇌혈관이 변성되어 뇌세포 기능이 저하됨으로써 발생하는 치매로[2,8], 일반적으로 뇌졸중의 중복 재발 경력이 있었던 환자가 관련 뇌 부위에 따라 하나 또는 그 이상의 인지기능의 결손을 보이며, 그 외에 기능저하와 보행장애, 무력, 실어증, 대소변실금, 감정변화 및 성격변화 등을 동반하는 증세를 나타낸다. 발병은 돌연하며 다소 호전되다가 갑자기 악화되기를 반복하는 등 계단식 경과의 임상양상을 나타낸다[4,9,53,62]. 많은 경우 뇌졸중으로 인해 급격히 발생하고 서서히 악화되는 다발성 경색 치매(multi-infarct dementia)에 속하며, 이외에 고혈압이 있으면서 뇌영상 검사상 광범위한 백질 병변을 보이는 피질하 치매인 Binswnager 's encephalopathy가 있으며 기타 Amyloid dementia, Vasculitis, Specific vascular syndrome, Diffuse hypoxic/ischemic injury, CADASIL(cerebral autosomal-dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy), Mitochondrial disease에 의해서도 혈관성 치매가 발생할 수 있다[63,64].

최근 多用되는 혈관성 치매의 진단기준인 ADDTC의 진단기준[11,65]에서는 출혈 · 무산소증 · 허혈 등이 모두 치매를 유발할 수 있다고 하면서 그 중 허혈성 혈관성 치매(ischemic vascular dementia)에 대해 중점적으로 기술하여 뇌허혈을 주요 병리로 강조했다. 대부분의 뇌허혈은 일시적이기 때문에 뇌허혈 당시보다는 재관류시 산소가 조직으로 재공급될 때 생성되는 활성산소로 인한 조직의 손상이 더 크다[66]. 일반적으로 뇌허혈 상태의 조직에서는 glycolysis로 인해 젖산이 증가하고, 세포내 ATP 농도가 낮아지면서 세포의 이온 펌프 능력이 감소되어 세포외로는 K+이 흘러나와 탈분극화 현상이 일어나며 세포내로는 Ca2+이 유입되어 결과적으로 미토콘드리아 기능에 장애를 가져와 ATP 합성을 더욱 저하시킨다. 또한 AMP의 분해가 과도하게 증가되므로 hypoxanthine의 축적이 발생하는데, 이때 세포내 증가된 Ca2+이온은 Ca2+의존성

protease를 활성화시키고 결국 xanthine oxidase를 활성화함으로써 산화반응이 진행되고 활성산소를 증가시키게 된다. 허혈 상태에서는 산소공급이 되지 않으므로 이런 활성산소도 제한적인 독성만을 나타내다가, 재관류가 이루어지면 이미 활성화된 xanthine oxidase 및 대사체계에 의해 虛血때 세포내에 축적된 hypoxanthine이 xanthine과 uric acid로 전환되면서 superoxide anion radical 등을 생성한다. 이들 superoxide anion radical이나 hydroxyl radical은 그 독성이 매우 강하며 다른 활성산소의 연쇄적인 생성을 초래함으로써 세포막 인지질을 과산화시켜 막의 변형과 기능상실을 가져오고 종국에서 細胞死로 인한 조직손상에 이르게 한다[15,67].

지금까지의 치매 치료는 주로 藥物的 방법으로, 신경이완제 · 진정제 · 항불안제 등을 사용하여 행동 증상을 막거나 기억력 및 인지능력을 유지시키는 약물을 병행하는 식이며 그 외 非藥物的 처치로 행동지지 방법 등이 이용되었다. 치매에 대한 근본적 치료라 할 수 있는 인지기능의 개선을 목적으로 많은 약물이 개발되었으나, 실제 임상 효과는 기대에 미치지 못하는 실정으로 치매환자가 겪는 부차적인 증상에 대한 對症치료가 대부분이다[68,69].

한의학 文獻에서 치매에 대한 정확한 언급은 없고, [黃帝內經·靈樞·千年篇]70)을 보면 우울·비애의 정서 및 언어능력의 퇴보 등을 자연스런 노화의 生理로 간주했다고 해석할 수 있다. "癡呆"와 유사한 개념의 서술은 明代의 張景岳이 [景岳全書·雜證謨][71]에서 "痴獃"라는 병명을 쓰면서 처음 등장했는데, 감정의 異常기복을 보이고 말이 顚倒되며 거동이 비정상적이고 우울해 하는 등 그 변화가 극심하다고 하여 현대의 노인성 치매 증상과 매우 유사함을 알 수 있다. 이후 陳士澤과 錢鏡湖가 각기 비슷한 증상을 "呆病"으로 표현했는데, 淸의 陳士澤의 [石室秘錄][72]에서 언급된 呆의 증상에서는 실어증, 우울증, 주변에 완전히 무관심을 보이는 등의 인격변화, 異食症 등을 볼 수 있고, 錢鏡湖의 [辨證奇聞全書][73]에서도 역시 언어장애, 식욕감퇴, 심한 감정의 기복, 衣服기피 등 이해 불가한 행동들을 나열하고 있다. 病因과 治療에 있어서는 [景岳全書]는 크게 놀라거나 두려워하여 心膽이 손상되어 생기므로 心脾를 補하고, [石室秘錄]은 痰이 원인이니 祛痰하고, [辨證奇聞全書]는 肝氣鬱滯로 생긴 痰이 心을 압박해 발생하므로 開鬱逐痰하고 健胃通氣하여 祛痰하라고 하였다.

기억력 상실이 치매의 주증상 중 하나이므로 "健忘"에 대한 설명에서도 유사점과 병인에 대한 견해를 찾아볼 수 있다. [內經·素問·調經論][74]과 [靈樞·大惑論][74], 그리고 [素問·五常政大論][74]에서는 대체로 氣血의 上下紊亂이 생겨 善忘한다고 하였고, [內經·靈樞·本神篇][74]에서는 腎盛하여 怒가 그치지 않으면 志를 상하고 志가 상하면 앞말을 잘 잊는다고 하였다. [千金要方][75]은 특이하게 천성적으로 잘 잊는 사람은 五臟이 모두 크고 일이 느리다 했고, [三因方][76]은 脾가 意와 思를 主管하는데 脾가 병을 얻으면 意思不淸하고 心腎이 편하지 못하여 健忘에 이른다고 하였다. [聖濟總錄][77]은 心虛로 인한다 하였고, [普濟方][78]은 [聖濟總錄]과 유사하게 心脾의 손상을 이유로 들었다. [東醫寶鑑][79]은 [古今醫鑑][80] [丹溪心法附餘][81] [醫學入門][82] [萬病回春][83]등 많은 의서의 내용을 망라하여 精神短少者가 痰이 盛해진 것, 思慮過度로 心脾二經을 損傷시킨 것, 痰이 心竅를 迷惑한 것, 오래된 怔忡이 健忘으로 된 것, 천성적인 陰魄의 부족, 老年의 精神衰弱 등의 다양한 원인을 언급했으며, 處方 중에는 加減固本丸을 "中風後健忘"에 쓴다는 구절이 있어 오늘날의 뇌졸중 후 유발되는 혈관성 치매를 당시에도 원인과 증상을 유사하게 인식하고 있었음을 추측할 수 있다. [辨證錄][84]은 壯年의 健忘은 傷寒大病後나 酒色過度거나 肝氣鬱滯하여 不舒한 것이 원인이라 하였고, [醫宗損益][85]은 역시 오래된 怔忡과 心脾損傷을 원

인으로 들었고, [醫學心悟]86)는 대개 心腎의 不交라고 하였다. [濟衆新編][87]은 [東醫寶鑑]과 비슷하게 설명했으며, [醫林改錯][88]은 精神思惟활동이 腦에 의해 이루어짐을 인식하고 先天不足이나 老年虛衰로 인해 腦髓가 空虛하면 치매에 걸린다는 것을 설명했고, [類證治裁][89]에서도 노년의 건망은 腦가 점차 空虛해져서 오는 것이라고 하여 후대로 갈수록 뇌에 대한 비중이 커지는 등 인식의 변화가 있음을 볼 수 있다.

이들 개념은 원인 및 病機上으로는 현대의학에서의 치매와 일치한다고 할 수는 없으나, 遲鈍, 健忘, 終日不語, 神志淡漠, 閉戶獨處, 口中喃喃自語, 言辭顚倒, 擧動不經, 忽笑忽哭 등의 증상에 있어서는 매우 흡사하며[1] 후대로 갈수록 노년의 건망에 대한 인식이 커지고 점차 현대의 개념에 접근해 가는 것을 볼 수 있다.

혈관성 치매는 따로 분류된 것 자체가 최근의 일이므로 현대 中醫學에 와서야 언급되기 시작했다. 최근에는 혈관성 치매를 中風痴呆라 하여 中風 치료에 기준한 치료도 하지만, 그 외에 痰과 瘀血을 기본 병리로 인식하고 이에 대해 각기 변증을 달리하여 여러 치법을 구사하고 있다. 痰과 瘀血에 초점을 맞추고 있다는 점에서는 앞서 나온 呆病 및 健忘의 원인과도 유사성을 찾을 수 있다[62].

국내 한의학계에서도 치매 치료에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 그러나 혈관성 치매의 경우 다른 퇴행성 치매와 달리 예방과 치료에 가능성이 많고[62], 또 뇌혈관 질환이 국내에서 발병률이 높고 증가추세에 있기 때문에 중요한 질환[9]인데도 불구하고 상대적으로 많은 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다[4,10]. 현재 혈관성 치매에 대한 한의학 논문으로는 실제 환자를 대상으로 한 김[9]과 현[62]의 임상연구가 있고, 辨證論治 고찰을 한 박[4]의 논문과 東西醫學的 考察을 한 안[10]의 논문, 그리고 침구치료를 통한 연구결과를 보고한 김[90]의 논문 등을 찾아볼 수 있다.

淸肺瀉肝湯은 1894년 四象醫學 이론을 수립한 東武 李濟馬[22]의 東醫壽世保元에서 太陰人 肝受熱 裏熱病論에 기재된 熱多寒少湯(葛根 藁本 黃芩 升麻 桔梗 白芷 蘿菖子로 구성)에 大黃을 가미한 처방이다. 東醫四象新編[23]에서 처음 소개된 후 여러 문헌에서 太陰人 肝燥熱證, 즉 陽明經病과 陽明腑病의 증후와 傷寒陽毒이나 熱性溫病, 燥澁便閉, 飮一溲二한 消渴病, 虛勞夢泄病, 手指焦黑瘡瘡病 등에 응용한다고 하였다[24-27]. 淸肺瀉肝湯을 뇌질환 연구에 적용한 연구보고는 홍[15,27]의 허혈-재관류 세포 손상에서 淸肺瀉肝湯의 보호효과 및 허혈/재관류 환경하에서 淸肺瀉肝湯의 염증 관련반응 억제 효과 연구가 있고, 오[12]의 淸肺瀉肝湯이 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류에 미치는 영향 등이 있다.

淸肺瀉肝湯의 구성약물 중 하나인 白芷는 뇌졸중 초기에 多用되는 처방[14]들의 주된 약재로서, 味辛·性溫하고 肺經, 胃經, 大腸經으로 歸經하여, 散風除濕, 通竅止痛, 消腫排膿하는 효능이 있어 陽明經의 風熱 · 濕熱을 제거하는 主藥으로 사용되어 왔다[14,28]. 白芷에 대한 연구는 항균효과 및 혈관계 개선효과 등에 대한 연구[29,30]가 있었고, 이[14]는 허혈-재관류 시 신경세포 보호효과에 대한 보고를 한 바 있다.

桔梗 역시 淸肺瀉肝湯의 구성약물이며, 藥性은 微溫·有小毒하고 味는 辛苦甘하며 肺經, 心經, 腎經, 胃經으로 歸經하여, 鎭咳, 祛痰, 排膿, 開胸膈滯氣하는 효능이 있다[31-33]. 桔梗에 대해서는 주로 saponin 성분에 대한 연구[34,35]와 그 외 精油成分에 관한 기존의 연구[36]가 있었으나 單味로 허혈-재관류 및 항산화 연구에 이용된 적은 없었다.

厚朴은 味辛苦·性溫하며 脾胃經에 작용하여 溫中下氣 · 去濕 · 祛痰하여 消化障碍, 嘔吐, 腹脹, 泄瀉, 咳嗽, 喘息등에 사용된다[28,37]. 厚朴은 淸肺瀉肝湯의 구성약물은 아니지만, 천[38]의 허혈시 신경세포손상에 대한 보호효과에 대한

논문 이후로 허혈-재관류 및 항산화와 연관된 연구가 없었고 이번 연구의 의의가 여러 單味 약물의 효과 검색도 있기에 실험에 포함시켰다.

위에서 언급했듯이, 淸肺瀉肝湯 및 구성약물은 이미 허혈-재관류 시 뇌세포 보호효과에 대한 보고가 있었다[12,14,15,27]. 오[12]는 in vivo로 淸肺瀉肝湯을 투여한 동물모델을 병태조직학적으로 연구 · 보고하였고, 이[14]와 천[38]은 in vivo에서 각각 白芷와 厚朴의 효능을 보였고, 홍[15,27]은 in vitro 상에서 淸肺瀉肝湯의 세포보호 효과를 여러 수치를 통해 증명했다. 이들 연구에서 입증한 것처럼, 淸肺瀉肝湯 및 연관된 單味들은 허혈-재관류 상황에서 신경세포를 보호하는 효과가 있으므로 뇌허혈로 유발되는 혈관성 치매에도 효능을 보일 것으로 판단된다.

본 연구에서 hypoxia-reoxygenation에 의한 뇌신경세포의 손상과정은 생체에서 일어나는 뇌허혈 이후 재관류에 의한 손상을 세포실험으로 재현한 것이다. 뇌허혈에 대한 연구는 크게 두 관점에서 이루어지고 있다. 허혈시 혈관폐쇄로 인해 산소와 혈당 공급이 소실되어 신경세포가 괴사(necrosis)하는 기전과 재관류 후 세포막의 붕괴와 에너지 생산과정의 와해로 세포대사의 변화가 일어나 허혈 상태보다 더욱 조직손상을 가중시키는 apoptosis, 즉 지연성 세포사(Delayed Neuronal Death)의 기전이 그것인데, 근래까지는 주로 前者에 대한 연구가 대부분이었으나 현재는 후자에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[12,13]. Necrosis와 apoptosis에 의한 뇌신경세포 사망의 주원인을 설명하는데 있어서도 exitotoxicity 說과 oxidative stress 說로 대별된다[20].

Exitotoxicity 說은 뇌허혈시 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 분비되어 NMDA(N-methyl-D-aspartate), kainate 수용체를 활성시킴으로써 세포내에 Ca2+와 Na2+등 양이온들의 과도유입을 유도하여 비가역적 세포 손상을 가져오고 신경세포 사멸을 초래하는 것으로 glutamate neurotoxicity라고도 한다. 이제까지 많은 연구들에서 exitotoxicity에 의한 세포 사멸을 necrosis와 연관지어 왔으나, 일부에서는 그 형태학적 특징을 apoptosis의 증거로 보고한 바 있고, glutamate 수용체의 과활성이 신경세포의 necrosis 뿐 아니라 apoptosis도 일으킬 수 있다는 보고도 있었던 점에서 아직 논란의 여지가 많은 문제이다[91-93].

Oxidative stress 說은 최근 항산화 연구와 더불어 부각된 것으로 생체 독성을 나타낼 수 있는 산소의 중간 대사물인 활성산소가 뇌허혈 후 재관류 상태에서 공급되는 산소에 의해 그 생성이 급격히 증가되어 결과적으로 lipid peroxidation의 악순환을 초래하여 궁극적인 세포 손상을 일으킨다고 하였다[14-17]. 게다가 중추신경계는 세포막에 쉽게 산화되는 불포화지방산(PUFA)을 다량 포함하고 있고, BBB(Blood Brain Barrier)로 인해 항산화효소의 양도 적으며, free radical을 형성하는 iron이 풍부하여 활성산소에 의한 손상도가 높다[17]. 그래서 근래 각종 퇴행성 신경계 질환과 활성산소 간의 연관성에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있다[14]. Glutamate의 신경독성에 의한 세포손상이 necrosis와 apoptosis를 두고 논란이 많은 것과는 달리, free radical에 의한 세포 손상은 apoptosis를 통한 것으로 알려져 있다[16].

세포괴사(necrosis)의 특징적 형태는 세포질의 팽창, 핵막보다 앞선 세포막의 파괴, 핵염색질의 분산 응축 및 세포 붕괴가 함께 일어나는 것이다. 특히 세포막이 파괴되기 때문에 핵을 포함한 세포 내용물이 세포 외 공간으로 빠져나가기 때문에 핵과 세포질이 사라질 수 있으며, 이 때문에 감염에 의한 상해가 괴사소견과 함께 나타나는 경우가 많다. 이와는 달리 apoptosis는 염색질의 농축으로 apoptotic body를 형성하며, 세포질은 수축하여 밀도가

높아지고, 평활하고 비투과성인 세포 표면 등 구조적 보전성은 유지되며, 핵막은 파괴되고 핵 염색질은 응고되는 등 특징적인 형태를 나타낸다[12,94]. 이런 apoptosis 과정에서 미토콘드리아의 역할이 매우 중요하다고 알려져 있는데, 이는 미토콘드리아가 활성산소 생성의 주원인이 되는 동시에 활성산소로 인한 손상에도 매우 민감하기 때문이다. 즉 apoptosis는 미토콘드리아의 내외막의 소공(permeability transition pore)의 개방으로 인해 전자전달계에 관여하는 cytochrome c의 세포질 내로의 유리에 따른 caspase family의 활성화에 의해 유도된다고 보고되고 있다. 대개 ROS(reactive oxygen species)로 지칭되는 활성산소와 유리된 Ca2+은 세포막의 인지질을 가수분해하여 ceramide를 형성할 뿐 아니라, 직접적으로 미토콘드리아의 소공을 개방하여 cytochrome c와 apoptosis inducing factor(AIF)를 방출하여 caspase-3과 caspase-9를 활성화시켜 apoptosis를 유발하며, 삼투압 불균형에 의한 세포 팽창을 초래하여 ROS의 생성을 가속화시키고, ATP의 생성과 막전위차를 감소시켜 세포막의 파열과 괴사 혹은 apoptosis를 유발하는 것으로 기전이 설명되고 있다. 이러한 기전은 치매로 대표되는 신경퇴행성 질환과 癌 같은 질환과 연관되는 것으로 여겨져 주목받고 있다[95,96].

Hypoxia-reoxygenation에 의한 腦神經細胞의 損傷에 한약물이 미치는 영향을 평가하기 위하여 LDH assay와 MTT assay를 사용하였다. 腦虛血에 의한 뇌손상 정도를 측정하는 방식은 대략 세 가지로 나눠볼 수 있는데, 첫째는 腦 병변범위의 크기에 기준하여 측정하는 방법이고, 둘째는 생화학적 방법으로 항산화 작용을 측정하는 법이며, 셋째는 광학 현미경이나 전자 현미경적 소견을 기초로 뇌세포 미세 구조물의 변화 및 파괴 정도를 병리학적 소견으로 가늠하는 방법이다[97]. 이 중 MTT assay와 LDH assay 방식은 두 번째에 해당된다.

먼저 MTT assay는 세포의 생존효과를 측정하기 위한 방법으로 이용되었다. 즉 MTT 시약이 tetrazolium salt로써 세포내로 흡수되면 미토콘드리아의 기능이 정상적일 때는 대사적 환원이 일어나 푸른 색의 formazan이 형성되는데 그 용해도가 매우 낮아 침전물을 형성하게 되고, 이 축적된 침전물 양이 많을수록 곧 세포의 환원력이 좋은 것이므로 미토콘드리아와 소포체의 능력을 이런 원리를 이용해 간접적으로 측정할 수 있다[14]. LDH assay는 세포의 괴사 정도를 평가하는 것으로, LDH(lactate dehydrogenase)는 세포질에 존재하는 효소로서 정상시엔 세포막을 투과하지 않지만 세포막이 손상을 입을 경우 세포외로 분비되어 배지내로 방출되므로[39] LDH의 활성의 감소는 곧 활성산소에 의한 세포막 손상으로부터의 보호 효과, 즉 결론적으로 세포 괴사로부터의 방지 효과로 해석할 수 있다. 따라서 본 실험에서 MTT assay는 주로 산화성 손상을 입은 세포의 항산화능력을 평가하는데 사용되었으며 LDH assay는 신경세포의 괴사 정도를 측정하는 방법으로 사용되었다. MTT assay의 경우 이전에는 그 수치상 증가를 세포의 증식으로 해석하기도 했는데[45], 이는 formazan 침전이 주로 미토콘드리아에 있는 환원효소에 의한 것이라는 가정 때문이었으나 최근 이 환원반응이 미토콘드리아보다는 lysosome 등 다른 소포체에 의한 것들이 상당부분을 차지한다[98]는 연구보고가 나오면서 MTT assay상의 수치의 증가는 세포보호가 아닌 세포의 환원활성 증가로 해석되고 있다.

뇌허혈-재관류 손상에서 free radical에 의한 apoptosis가 중요하게 부각되는 만큼, 뇌신경세포를 보호하기 위해서는 혈류 개선을 통한 세포괴사의 방지는 물론이고 세포막 붕괴를 막고 활성산소를 제거하고 항산화효소를 촉진할 수 있는 항산화제의 역할이 중요하므로 그 개발과 이용에 더욱 관심이 쏠리고 있다[18]. 한의학계에서도 항산화 이론에 입각하여 老化와의 연관을 고찰한 논문[99], glutamate neurotoxicity에 대한 한약재의 효능에 대한 논문[39]등이 있었고, 한약물의 單味劑[100,101] 및

複合處方들[102,103], 藥針製劑[104,105]등을 활용하여 한약물의 항산화 효과를 증명한 논문들, 그리고 이들 항산화 관련논문들을 검색하여 고찰한 논문도 있었다[106]. 허혈-재관류 상황에서 한약물의 항산화력을 측정한 연구로는 白芷[14], 蠐螬[19] 등의 單味로 실험한 경우가 있고, 淸肺瀉肝湯[12,15], 加味六味地黃湯[20], 防風當歸飮[21] 蘇合香元[107]등의 複合處方을 쓴 경우가 있다. 이 중 淸肺瀉肝湯과 연관된 기존 연구[12,15]를 보면 necrosis와 apoptosis의 차이를 인식하고 앞으로 해결해 나가야 할 문제로 보고 있되, necrosis와 apoptosis에 대한 淸肺瀉肝湯의 효과를 비교 연구한 것은 없었다. 따라서 본 연구에서는 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 淸肺瀉肝湯을 구성하는 일부 單味에 대하여도 같은 효과를 검토하므로써 한약물의 기전에 관한 연구방향을 제시할 뿐 아니라, 개별 약물의 효능 검색에 대한 효율적인 방식을 고안함으로써 유효성이 높은 약물을 선별할 수 있게 하여 차후 신약 개발에 기초 자료를 제공할 수 있으리라 생각한다.

이에 저자는 사전 실험으로 Mouse neurolastoma 2a 세포를 대상으로 한약물이 정상세포에 미치는 효과와 hypoxia-reoxygenation이 세포생존과 세포사에 미치는 영향을 조사한 뒤, 본 실험으로서 한약물이 hypoxia와 reoxygenation의 조건에 의해 나타난 세포손상에 미치는 효과를 조사하였다. Hypoxia 상황과 reoxygenation 상황 모두에서 cell viability(MTT assay)와 cytotoxicity(LDH assay)를 측정하였다.

사전 실험에서 정상상태의 N2a세포에는 모든 한약물들이 대체로 정상군과 큰 차이가 없어 세포증식 및 손상에 무관하게 보인다. 단 桔梗의 경우 in vitro와 높은 농도(1mg/㎖)에서 세포손상이 보였는데, 이는 saponin 계열의 화합물이 과량일 경우 일종에 세척제로 작용하여 세포막에 손상을 가하고 세포질에 있는 LDH가 배양액으로 유출된 것으로 추측된다. 이차로 hypoxia와 reoxygenation이 정상세포에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 48시간의 hypoxia는 세포 환원활성도와 세포 손상도에 큰 영향을 미치지만 reoxygenation의 경우는 환원 활성도에는 별 영향이 없고 세포 손상도만 크게 증가시키는 결과를 보였다. 더 자세히 살펴보면 hypoxia이후 reoxygenation 時에 약물이 없는 경우는 LDH가 다시 증가하는데, 이는 세포의 사멸이 진행됨을 의미한다. 따라서 생존해 있는 세포의 수가 줄어든다는 것인데 이때 MTT는 오히려 별 변화를 보이지 않고 있다. 실험상 죽은 세포는 제거하고 assay를 한 것이므로 세포수가 줄어들었음에도 불구하고 이전의 formazan 형성능력을 거의 그대로 유지한다는 것은 각 세포당 formazan 형성 능력은 증가되었다는 의미로 해석된다. 즉 생존한 세포는 환원능력이 향상된 것이다. 이는 oxidative stress 상황이 세포에 손상을 주는 동시에 세포의 항산화 능력을 유발한다는 연구결과와 일치하는 바이다[82]. 앞의 두 실험에서 hypoxia후 48시간 경과시 세포에 유의한 변화가 있었기에 본 실험에서는 48시간 hypoxia 조건을 부여했다.

本 實驗의 결과를 살펴보면, hypoxia 조건의 MTT assay에서는 큰 영향을 미치지 못한 것으로 보이는데, 이는 약물이 이미 괴사한 세포 및 생존 세포에 거의 작용하지 않았음을 의미한다. Hypoxia 조건에서 생존했더라도 미토콘드리아의 환원활성이 저하되어 있는 상태에서는 약물들이 환원활성을 증가시키는 효과가 없다는 것이다. 白芷와 桔梗은 일정 농도까지는 비교적 양호한 보호효과를 보이다가 이후 급속하게 세포활성을 감소시키는데, 이런 결과는 저농도에서 유효성분이 이미 포화에 이르렀

기 때문일 수도 있고, 桔梗의 경우 saponin과 같은 함유성분의 특정효과로 인해 세포에 부정적인 영향을 미쳤기 때문으로 볼 수도 있다. 厚朴은 저농도와 고농도 두 지점에서 세포보호력을 보이고 이 외의 지점에서는 세포활성의 감소를 보이고 있어 농도별로 각기 다른 두 가지 유효성분이 존재할 가능성이 있다.

반면 hypoxia 조건의 LDH assay에서는 전반적으로 약물들이 유의한 효과를 보여 hypoxia에 의한 세포괴사 방지에 이용될 수 있음을 입증했다. 淸肺瀉肝湯과 厚朴은 전체적으로 완만한 세포독성의 감소를 보이는데, 이는 세포막을 보호하는 유효성분의 potency가 강하지는 않은 것으로 해석된다. 桔梗은 일정 농도에서는 큰 효과를 보였으나 역시 고농도에서는 saponin등의 함유성분이 문제가 될 수 있음을 볼 수 있다.

Reoxygenation 조건의 MTT assay에서는 hypoxia 상황과 크게 차이가 없이 나타났다. 약물 비투여 時에도 reoxygenation 상황에서는 생존 세포의 환원활성이 hypoxia 때보다는 다소 증가하였기 때문에, 약물을 투여한 경우에도 큰 차이가 없다는 것은 약물의 효과가 거의 없거나 오히려 부정적으로 작용했음을 말한다. 厚朴과 桔梗은 저농도에서 유효성분이 가장 활성화되어 뚜렷한 효과를 보였는데, 桔梗의 경우 앞서 언급했듯이 saponin 성분이 문제가 되고 있으며 厚朴은 전반적인 수치의 증가를 보여 네 약물 중 가장 긍정적인 결과를 보였으나 유효성분이 하나 이상일 가능성에 대해서는 추후의 연구에서 다뤄져야 할 것이다.

Reoxygenation 조건의 LDH assay에서는 전반적으로 약물에 대한 긍정적인 반응이 크게 나타났다. 淸肺瀉肝湯과 白芷는 적정 농도는 다르지만 세포독성을 거의 절반 이상 감소시키며 상당한 세포 보호효과를 보였고, 桔梗의 경우도 saponin 등에 의한 고농도에서의 세포사만 제외한다면 저농도에서의 세포 보호효과는 역시 뛰어나다. 이런 결과는 한약물들이 산소 차단 後 재공급 상황에서 세포괴사를 방지하는 효과가 있음을 의미한다. 뇌허혈 상태보다 이후의 재관류 상황에서 세포사가 더 심각한 문제이기 때문에 이런 결과는 이제까지 한약물들이 뇌졸중에 이용되어왔던 것, 그리고 앞으로 치매에 임상적으로 활용될 수 있다는 것에 대한 근거가 될 수 있으리라 생각한다. 그리고 농도 구간별로 효과가 변동이 생기는 현상은 약물들 모두에서 나타난 것이었는데, 앞에서 언급했듯이 이는 각기 다른 농도에서 작용하는 유효성분의 가능성을 짐작하게 하는 점으로 유효성분이 두 가지 이상 있는지에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

약물별로 결과를 살펴보면, 淸肺瀉肝湯의 경우 저농도 일부 구역에서 세포 환원활성력과 세포막 보호력을 보이고 고농도에서 일시적으로 세포막 보호력을 보여 세포보호에 있어서는 유의성이 있었으나, 세포 환원활성에 있어서는 유효하다고 할 수 없었는데, 이는 이전의 홍[15]의 연구에서도 淸肺瀉肝湯이 MTT assay 상에서 대표적 수용성 항산화제인 ascorbic acid에 비해 낮은 환원활성을 보였고 따라서 淸肺瀉肝湯의 항산화력이 환원활성에 의존한 것이 아니라고 했던 것과 일맥상통하는 바이다. 홍은 淸肺瀉肝湯의 xanthine oxidase의 활성을 억제하는 능력이 ascorbic acid보다 높은 것을 들어 淸肺瀉肝湯의 항산화력이 직접적이라기보다는 활성산소 발생을 억제하기 때문일 것이라고 했는데, 이로 미루어 淸肺瀉肝湯의 경우는 앞으로 in vitro 실험뿐 아니라 in vivo 실험을 거쳐 항산화력의 정확한 기전을 밝힐 필요가 있을 것으로 사료된다.

白芷는 저농도에서 재관류 상황에서 세포 환원활성을 증가시키고, 허혈시 세포를 보호하는 효과가 다소 있었으며, 고농도에서는 재관류 상황에서 세포 환원활성과 세포보호에 모두 효과가 있었는데, 결과상 탁월한 정도라고는 할 수 없었다. 이는 이14)의 논문에서 白芷가 세포생존에 미치는 MTT assay 상의 효과가 모두 높게 나타난 것과는 차이가 있는데, 이는 白芷의 투여농도의 차이 때문이다. 본 실험이

최소 50㎍/㎖를 투여한 데 반해 이의 논문에서는 0.2㎍/㎖, 2㎍/㎖, 20㎍/㎖의 세 농도로 처리하여 그 양의 차이가 컸고, 그 결과에서도 0.2㎍/㎖일 때가 세포생존에 가장 높은 효능을 보이고 고농도로 갈수록 효능이 떨어졌다고 하였다. 따라서 추후의 실험에서는 농도를 훨씬 낮게 혹은 높게 투여하여 여러 약물을 검색한다면 본 실험에서 명확히 드러나지 않은 효과를 발견할 수도 있으리라 사료된다.

厚朴은 MTT assay와 LDH assay 모두에서 효과가 고르게 있었던 편이었으나 다른 약물들이 세포 보호효과가 세포 환원활성효과에 비해 탁월했던 데 비해 양쪽이 비슷하면서 특별히 두드러지게 뛰어난 효능을 보이지는 않았다. 천[38]의 연구는 in vivo에서 이루어졌기 때문에 주로 항산화효소의 활성도를 통해 세포보호효과를 측정했으므로 본 실험과 비교하기에는 무리가 있으나 연구 결과상 厚朴이 항산화효소의 활성을 높이는 데는 유의한 효과가 있었으므로, 厚朴 역시 이 실험에서 측정된 부분 이외에 다른 방식으로 세포의 산화성 손상을 방지할 가능성을 고려해야 할 것이다.

桔梗의 경우 이 때까지의 연구들이 주로 saponin 성분에 대해서만 치중한 경우가 많아 허혈-재관류 손상에 미치는 영향을 연구한 논문은 없었다. 실험결과에 있어서도 saponin 성분 때문에 농도가 높아질수록 세포에 악영향을 미쳤으나, 일부 저농도 구간에서는 MTT assay와 LDH assay 모두에서 기타 약물에 뒤지지 않는 효과를 보였으므로 향후 saponin 성분의 배제 및 적정 농도에 관한 연구를 통해 성과를 얻는다면 허혈-재관류 손상에 유용한 약물로 증명될 수도 있을 것이다.

Ⅴ. 結 論

腦 조직에서 虛血 이후 再灌流 時 신경세포의 손상에 淸肺瀉肝湯 및 單味 3가지가 미치는 영향을 연구하고자, mouse neurolastoma 2a 세포를 대상으로 허혈-재관류 상황을 hypoxia-reoxygenation으로 재현하여 한약물이 세포의 환원활성과 세포손상에 미치는 효과를 MTT assay와 LDH assay의 방법을 통해 실험 및 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 한약물이 정상 상태의 N2a 세포에 미치는 효과를 조사한 첫 실험에서는 약물들이 대체적으로 세포 환원활성 및 세포손상에 큰 영향을 주지 않았다.

2. Hypoxia 조건의 MTT assay에서도 淸肺瀉肝湯과 單味들은 긍정적인 효과가 거의 없거나 부정적으로 작용했고, 厚朴만 약간의 유의한 효과를 보였다.

3. Reoxygenation 조건의 MTT assay에서 淸肺瀉肝湯과 單味들은 큰 효과는 없었으나, 厚朴은 전반적으로 완만한 긍정적 효과를 보였다.

4. Hypoxia 조건의 LDH assay에서 淸肺瀉肝湯과 單味들은 전반적으로 유의한 효과를 보였으며, 특히 淸肺瀉肝湯이 모든 농도에서 비교적 고르게 효과가 있었다.

5. Reoxygenation 조건의 LDH assay에서 淸肺瀉肝湯과 單味들이 대체로 유효한 작용을 보였는데, 淸肺瀉肝湯, 白芷, 厚朴은 전체적으로 좋은 효과가 있었고, 桔梗도 低농도에서는 높은 효과를 보였다.

이상의 결과를 종합해볼 때, 이번 연구의 의미는 다음과 같이 정리할 수 있다. 실험에 사용된 한약물들이 대체로 Reoxygenation 조건의 LDH assay에서 유의한 세포막 보호효과를 보였는데, 이는 뇌허혈 이후 재관류로 인해 발생할 수 있는 뇌신경세포의 활성산소로 인한 손상으로부터 세포를 보호하여 세포사를 억제하고 腦조직을 보존하는데 유용한 효능으로서 血管性 痴呆를 포함한 각종 퇴행성 신경질환에 관한 신약개발 및 임상치료에도 기여할 수 있

으리라 사료된다.

參 考 文 獻

1. 황의완, 김종우, 이조희, 엄효진, 이승기. 치매에 대한 한의학적 임상연구, 동의신경정신과 학회지. 1996;7(1):1-13.
2. 황의완 외. 동의정신의학. 서울:현대의학서적사. 1992:256-271, 327-330.
3. 민성길. 최신정신의학. 서울:일조각. 1995:160-162.
4. 박두병, 박세기, 김동우, 한양희, 전찬용, 박종형. 혈관성치매의 변증론치 고찰-중풍후유증으로 나타나는 치매의 변증론치에 관한 근대중의서적 13종에 대한 문헌분석-경원한의학연구소논문집. 1997;1:5-30.
5. Hamdy RC, Tumbull JM, Clark W, Lancaster MM. Alzheimer's disease : A handbook for caregivers 2nd edition, Activities. 1995:19(3):65~66.
6. 김현아. 노인성치매에 관한 동서의학적 비교 고찰. 대한한방내과학회지 1992;13(2):58-62, 66-67.
7. Weiner MF. The dementias, diagnosis and management. Washington:American Psychiatric Press. 1991:77-166, 227-248.
8. Motel KF, Wood S, Pavol MA, Meyer JS, Rexer JL. Analysis of familial and individual risk factors aming patients with ischemic vascular dementia and Alzheimer's disease, Angiology. 1993;44(8):599-605 ed. Mosby, 1994:102-116.
9. 김원찬, 김영석, 문상관, 고창남, 조기호, 배영섭, 이경섭, 박정미. 중풍환자의 혈관성치매에 대한 임상적 관찰. 대한한방내과학회지. 1998;19(2):50-59.
10. 안탁원, 홍석, 김희철. 뇌혈관성 치매에 대한 동서의학적 고찰. 한국한의학연구원논문집. 1996;2(1):40-70.
11. Chui HC, Victoroff JI, Margolin D, Jagust W, Shankle R, Katzman R. Criteria for Diagnosis of ischemic vascular dementia proposed by the State of California Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centers. Neurology. 1992;42:473-480.
12. 오연환, 정승현, 박인식, 신길조, 이원철. 淸肺瀉肝湯이 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(2):161-174.
13. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. Progress in Brain Res. 1985;63:39-58
14. 이영효, 정승형, 신길조, 문일수, 이원철. PC12 손상세포 및 전뇌허혈 유발 Gerbil에 대한 白芷의 세포보호효과. 대한한의학회지. 2003:24(1):110-121.
15. 홍성길, 강봉주, 김윤진, 강상모, 조동욱. 허혈/재관류 세포손상에서 淸肺瀉肝湯의 보호 효과. 한국한의학연구원논문집. 2000;5(1):111-117.
16. Islekel H, Islekel S, Guner G, Ozdmar N. Evaluation of lipid peroxidation, cathepsin L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia reperfusion. Brain Res. 1999;843:18-24.
17. Russel J. Reiter. Oxidative damage in the central nervous system-Protection by melatonin. Progress in Neurobiology. 1998;56:359-384
18. Bulkey, GB. The role of oxygen radicals on human disease process. Surgey. 1993;94(3):407-411.
19. 정지천, 박태훈, 윤철호, 서운교, 신억섭, 강정준, 서종은 . 蠐螬가 허혈/재관류에 의한 뇌손상에 미치는 영향. 대한한방내과학

회지. 1999; 20(2):196-209.
20. 김진형, 김윤식, 설인찬, 김동희. 가미육미지황탕이 뇌신경세포 손상 및 뇌허혈 병태모델에 미치는 영향, 동의생리병리학회지. 2003;17(2):467-475.
21. 홍천표, 정승현, 박인식, 신길조, 이원철 . 防風當歸飮이 중대뇌동맥 폐쇄후 재관류 모델에 미치는 영향, 대한한방내과학회지. 2000;21(2):319-327.
22. 李濟馬 . 東醫壽世保元, 서울:신일문화사. 1972:75-76, 83.
23. 元持常 . 東醫四象處方集, 서울:금강출판사. 1981:114.
24. 권도익, 조기호, 문상관, 고창남, 김영석, 배형섭, 이경섭. 태음인 淸肺瀉肝湯의 응용예를 통한 증후분석. 대한한의학회지. 1999;20(2):37-42.
25. 윤병수. 태음인 淸肺瀉肝湯의 효능에 대한 실험적 연구. 사상의학회지.1990; 2(1):135-147
26. 朴寅商 . 東醫四象要訣, 서울:소나무. 1995:160.
27. 홍성길, 강봉주, 조동욱. 허혈/재관류 환경하에서 淸肺瀉肝湯의 염증 관련반응 억제 효과, 한국한의학연구원 논문집. 2000;6(1).81-87.
28. 한의학대사전 편찬위원회 편. 한의학대사전: 서울:정담 1998:522-523.
29. 권용수 . 구릿대뿌리(白芷)의 항균활성 성분에 관한 연구. 강원대학교 대학원. 1997.
30. Kim CM, Heo MY, Kim HP, Sin KS, P. Pachaly . Pharmacological Activities of Water Extracts of Mitotic Poisons. Arch. Pharm. Res. 1991;14:87-92.
31. 이상인 . 本草學. 서울:修書院. 1981;329-330..
32. 陳兆桓 . 神農本草經 臺北:文光圖書有限公司(臺北). 1977:212.
33. 黃宮綉 . 本草求眞. 北京:人民衛生出版社. 1987:71-72.
34. 신정식, 강병수 . 길경(桔梗)의 종류별 Saponin 함량 차이에 관한 연구. 방제학회지. 1992:3(1):163-196.
35. 이태희, 이상인 . 桔梗의 규격화와 Platycodin D의 약효에 관한 연구. 경희한의대논문집. 1992;15:91-112.
36. 김성배, 강병수 . 桔梗의 精油성분에 관한 연구. 대한본초학회지. 1996;11(1):127-140.
37. 이성로, 이상인 . 厚朴의 약효에 관한 연구. 생약학회지. 1986;17(3):199-205.
38. 천병태 . 厚朴이 흰쥐의 전뇌허혈에 의한 신경세포손상에 미치는 효과. 경희대 한의학과 대학원 본초학교실 박사학위논문. 1999.
39. 이미영, 강봉주, 윤유식, 홍성길, 곽병주, 조동욱. 대뇌피질 신경세포에 미치는 glutamate 독성에 대한 한약재 효능연구. 한국한의학연구원논문집. 1998;4(1):99-114.
40. 김혁, 한원주 . 遠志와 石菖蒲의 단독 및 혼합추출액이 CT105로 유도된 신경세포암 세포주에 미치는 영향. 석사학위논문. 원광대학교. 2003.
41. 유영민 . Significant Role of Nitric Oxide Synthase (NOS) in Differentiation of Human Neuroblast Cell Line. 석사학위논문. 경희대학교. 2000.
42. 유영민 . Protective Effect of Melatonin against Nitric Oxide-Mediated Apoptosis in PGT-β Pineal Gland Tumor Cells 박사학위논문. 강원대학교. 2001.
43. Ruscher, K., Isaev, N., Trendelenburg, G. Weih, M., Iurato, L., Meisel, A., and Dirnagl, U . Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. Neurosceince Letters. 1998;254: 117-120.
44. Wang, J., Shum, A. Y., and Wang, J. Hypoxia/reoxygenation induces cell injury via diferent mechanisms in cultured rat cortical neurons and glial cells. Neuroscience Letters. 2002;322:

187-191.
45. Sladowski, D., S. J. Steer., R. H. Clothier., M. Balls . An improved MTT assay. J. of Immune. Methods. 1993;157, 203-207.
46. Marshall NJ, Goodwin CJ, and Holt SL . A critical assessment of the use of microculture tetazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation. 1995;5(2): 69-84.
47. Koh JY, Choi DW . Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. Journal of Neuroscience Methods. 1987;20:83-90.
48. 이홍식, 김진학 . 치매의 진단과 치료. 대한의학협회지. 1992;35(9):1126-1133.
49. 김명호 . 치매(Dementia)의 정의와 분류. 대한신경과학회지. 1985;3(1):1-4.
50. 임춘식 . 고령화 사회의 노인인력 활용정책에 관한 연구. 한국노인복지학회. 2003;22:55-77.
51. 최경구 . 복지국가의 장기요양보호와 치매정책. 한국사회복지정책학회. 2003;17:55-75.
52. 장대일 . 치매. 경희의학. 1997;13(1):20-23.
53. 나덕렬 . 치매의 접근방법. 가정의학회지. 1997;18(3):236-248.
54. Coons DH . Specialized Dementia Care Units. Johns Hopkins. 1991:7-82.
55. 조맹제 . 한국노인 정신질환의 현황. 신경정신의학. 2002;41(5):758-766.
56. 홍대성, 김종우, 황의완 . 麝香蘇合元이 정서반응성과 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 1999;10(1):17-38.
57. Kua EH, Ko SM . Prevalence of dementia among elderly Chinese and Malay residence of Singapore. Int Psychogeriater. 1995;7(3):439-446.
58. 박종한, 고효진 . 경북 영일군 어느 면지역 노인들에서의 치매의 원인적 분포 및 주요 치매의 상대적 유병율. 신경정신의학. 1991;30(5):885-891.
59. 우종인, 유근형, 홍진표, 이정희 . 한국 노인 인구의 치매의 역학적 특성에 관한 연구. 서울대학교 대형 공동과제 연구보고서. 1994:1-9.
60. 진복수, 전미연 . 알츠하이머성 치매노인과 혈관성 치매노인의 우울과 불안 비교. 한국노년학. 1999;19(2):47-57.
61. Breteler MMB, Claus JJ, van Duijn CM, Lauder LJ, Hofman A . Epidemiology of Alzheimer's disease. Epidemiol Rev. 1992;14:59-82.
62. 현경철, 김종우, 황의완 . Vascular Dementia에 관한 한의학적 임상연구. 동의신경정신과 학회지. 1999;10(1):147-157.
63. 김희태, 김명호 . 치매의 감별진단. 한양의대 학술지. 2001;21(1):25-34.
64. 정영조, 이승환 . 치매의 예방과 관리. 인제의학. 2000;21(1):11-19.
65. Amar K, Wilcock G . Vascular dementia, British Medical Journal. 1996;312(1):227-231.
66. McCord JM . Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N. Engl. J. Med. 1985;312(3):159-163.
67. Schmidley JW . Free radicals in central nervous system ischemia. Stroke. 1990;25: 7-12.
68. 박순권, 이홍재, 김현택, 황의완 . 한약물의 치매치료에 관한 실험적 연구-조위승청탕과 형방지황탕의 노화동물에 대한 치매치료 효과연구. 동의신경정신과 학회지. 1998;9(2):19-32.
69. 박명숙 . 치매치료제의 개발에 관한 고찰. 덕성여대 논문집. 1997;28:6-14.

70. 홍원식 編 . 精校黃帝內經. 서울. 동양의학 연구원출판부. 1981:301.
71. 張介賓 . 景岳全書. 서울:一中社. 1992: 846.
72. 陳士澤 . 國譯石室秘錄(下). 서울. 書苑堂. 1984:316-317.
73. 錢鏡湖 . 辨證奇文全書. 臺北. 甘地出版社. 1980:233-235.
74. 馬元臺, 張隱庵 . 黃帝內經素問靈樞合編. 臺北:臺聯國風出版社. 1986:59,411, 464, 532.
75. 孫思邈 . 千金要方. 서울:대성문화사 . 1984:265-266.
76. 陳無擇 . 三因方. 서울: 翰成社. 1977:310-312.
77. 徽宗勅 . 聖濟總錄. 서울: 여강출판사. 1977:339-340.
78. 朱 橚 . 普濟方. 서울: 翰成社. 1976:425-432.
79. 許 浚 . 東醫寶鑑. 서울: 南山堂. 1976:98.
80. 龔 信 . 古今醫鑑. 南昌:江西科學技術出版社. 1990:198-199.
81. 走震亨 . 丹溪心法附餘. 서울: 대성문화사. 1993:358-359.
82. 李 梴 . 醫學入門. 서울: 대성문화사. 1980:514.
83. 龔廷賢 . 增補萬病回春. 서울: 一中社. 1994:229-230.
84. 陣士鐸 . 辨證錄. 서울: 醫聖堂. 1989:223-227.
85. 黃度淵 . 醫宗損益. 서울: 醫藥社. 1976:58-62.
86. 程國彭 . 醫學心悟. 香港: 友聯出版社. 1961:209-210.
87. 康命吉 . 濟衆新編. 서울: 杏林書院. 1975:69.
88. 王淸任 著, 王勳臣 編著 . 醫林改錯. 서울: 臺灣東方書店. 中華民國49年pp.22-25. .
89. 林珮琴 . 類證治裁. 臺北:旋風出版社. 1978:255-257.
90. 김수용, 박우순, 이태영, 이창현, 이상룡, 육상원, 이광규 . 신맥 조해의 전침자극이 치매환자의 뇌파에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001;18(2):67-78.
91. Du C, Hu R, Csernansky CA, Liu XZ, Hsu CY and Choi DW . Additive neuroprotective effects of dextrophan and cycloheximide in rats subjected to transient focal cerebral ischemia, Brain Res.. 1996;718:233-236.
92. Gwag BJ, Koh JY, Demaro J, Ying HS, Jacquin MF and Chio DW . Slowly-triggered exitotoxicity occurs by necrosis in cortical cultures. Neurosci.. 1997;77:393-401..
93. The Merk manual 편집위 . The Merk manual(17th edition). 서울. 도서출판 한우리. 2002;1465-1466.
94. 한치동, 조창호, 서인수 . 간세포 Apoptosis에 대한 형태학적 연구. 경북의대지. 1995;36(4):523-543.
95. Adrienne MG, Sandra Ceccatelli, Sten Orrenius . Role of mitochondria in neuronal apoptosis. Developmental Neuroscience. 2000;22:348-358.
96. Anne Eckert, Uta Keli, Celio A. Marques, Astrd Bonert, Claudia Frey, Katrin Sch□ssel, Walter E. M□ller . Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. Biochemical Pharmacology. 2003;66:1627-1634.
97. 류성진 . 한약재로부터 뇌세포 산화억제와 항허혈 치매 물질 탐색. 인제대학교 대학원 석사학위논문. 2003:총 42p.
98. 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.

99. 김정상, 나창수, 김영곤 . 노화에 미치는 산소 유리라디칼에 관한 연구동향. 한국한의학연구원논문집. 1997;3(1):229-239.
100. 김희준, 윤철호, 정지천 . 흰쥐의 뇌 astrocyte에서 amyloid-β25-35로 유발된 지질의 과산화와 항산화 효소계 및 NO 생성에 미치는 백강잠의 효과. 대한한방내과학회지. 2001;22(3):331-339.
101. 박용기 . 갈화와 울금 및 고삼의 항산화 작용에 관한 비교연구. 대한본초학회지. 2001;16(1):41-53.
102. 김인재, 이상용 . 가미귀비총명탕이 노화 백서의 혈액변화 및 혈청과 뇌조직의 항산화물 활성에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 1998;9(2):53-70.
103. 박선동, 박현준, 주왕석 . 귀비탕 및 그 구성약물군이 항산화효과에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001;16(1):11-27.
104. 김영해, 김갑성 . 호도약침액의 항산화 효과에 대한 연구. 대한한의학회지. 1996;17(1):9-20.
105. 윤철호, 정지천, 신억섭 . 녹용 약침 제제가 흰쥐 신장 조직의 항산화 작용에 미치는 영향. 한국한의학연구원논문집. 1996;2(1):192-204.
106. 안상원, 이철완 . 국내문헌에 나타난 항노화 및 항산화의 실험적 연구에 대한 검색. 대한한의학회지. 1998;19(2):373-390.
107. 최은정, 신길조, 이원철 . 소합향원이 실험적 뇌경색 흰쥐의 局所뇌혈류량 및 경색면적에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1997;18(1):456-469.