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

健腦湯과 單味들이 Hypoxia-Reoxygenation에 의해 손상받은 Mouse Neuroblastoma 2a Cells에 미치는 影響

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

The EffectsKunnuetang and Herbs on Mouse Neuroblastoma 2a Cells Damaged by Hypoxia-reoxygenation.

Chang Sub Yeum, 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 Kunnuetang 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 Kunnuetang, Duchang and Daejo.

Result :

1. Kunnuetang, waseffective on LDH assay of hypoxia and reoxygenation.
2. Duchang and Daejo were generally effective on LDH assay of hypoxia and reoxygenation.
3. In MTT assay of hypoxiaKunnuetangwas not effecctive. Duchung and Daejo were notgenerally effective on MTT assay, but in certain condition Herbs were effective.
4. In MTT assay of reoxygenation Kunnuetang and Daejo were not effective. But Duchung was effective in certain condition.

Conclusion : The results suggest that Kunnuetang, Duchang and Daejo may have protective effect on vascular dementia andad patient.

Key Words : Kunnuetang, Duchang, Daejo, hypoxia-reoxygenation, Dementia

◆ 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

Ⅰ. 緖 論

痴呆는 여러 가지 원인 질환에 의해 의식장애 없이 자기 유지 및 사회생활이나 직업 생활에 심한 장애를 초래할 정도로 記憶力, 思考力, 指南力, 理解力, 計算能力, 學習能力, 記憶 및 判斷力 등 전체적이고 복합적인 지적 기능의 저하가 후천적으로 일어난 기질성 뇌증후군으로[1-7], 크게 알츠하이머형 痴呆와 혈관성 痴呆, 기타 중독성 및 여러 가지 종류로 나눌 수 있으나, 알츠하이머형과 혈관성이 대다수 비율을 차지하고 임상에서 흔히 접할 수 있다[7].

알츠하이머형 痴呆는 노인반(senile plague), 신경섬유덩어리(neutrofibrilla tangles(NFTs)), 아밀로이드혈관 등의 소견이 보이며, 그 원인은 아직 확실히 밝혀진 바 없이 감염, 면역계의 이상, aluminium 및 기타 금속물질을 포함한 독성물질의 영향과 유전적 영향 등의 가설들이 받아들여지고 있다8).혈관성 痴呆는 하나 이상의 뇌졸중의 결과로 인한 인지기능의 이상을 나타내는 치매로9-11) 전형적으로 병력, 국소 신경학적인 증상과 증후, 영상진단으로 확인되어지는 뇌혈관 질환의 과정에서 나타나고, 돌연한 발병, 계단식 경과의 특징적인 임상양상을 갖는다9,12).

알츠하이머형 痴呆나 혈관성 痴呆를 지속적인 산화 스트레스(산화과정)로 인해 시냅스 전달 부전이나, 신경퇴행을 일으켜 나타나는 것으로 보는 경향이 최근 두드러진다. 또한 항산화 체계의 결핍이나 만성적인 혈관의 저관류로 야기되는 산화 스트레스와 미토콘드리아의 기능부전은 치매 등의 뇌손상병리에 중요하고, 저산소증은 치매와 같은 신경퇴행질환에 있어서 발병과 진행의 주된 기인자로 여겨지고 있다[13-18].

치매에 대한 최근의 한약에 대한 연구는 단미로는 石菖蒲[19], 日黃連[20], 香附子[21] 등과 복합처방으로 天王補心丹[22], 加減固本丸[23] 등이 치매에 유효한 효과가 있다는 보고들이 있다.

健腦湯은 치매 등 뇌질환에 임상적 효과를 보인 調胃升淸湯의 구성 약물 중 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과를 통해 검증된 遠志, 石菖蒲와 위장장애 극복을 위해 神麴을 주원료로 하여 개발한 한방 치료제로 동물실험결과와 임상에서 알츠하이머형 치매와 기억력, 학습력 장애에 효과가 있음이 보고되었다[24-25].

뇌질환 효과에 대한 지금까지의 연구는 주로 뇌조직의 손상에 보호효과가 있다고 제안된 약물을 이용하였는데, 調胃升淸湯과 荊防地黃湯의 방사형 미로와 Morris수중미로 과제를 이용한 치매치료 효과[6]와, 박[26]의 경우처럼 성향정기산에 대하여 동물 실험에서 SOD, Glutathione 등의 항산화 효소계를 측정하는 방법이 주를 이루고 있으나 산소의 차단과 재공급에 의해 야기되는 뇌신경세포손상에 대한 효과를 비교 연구한 내용은 없었다.

본 연구에서는 치매의 대부분을 차지하는 알츠하이머형 치매와 혈관성치매의 병리기전으로 새롭게 제시되고 있는 산소의 부족과 활성산소에 의한 세포손상이 야기될 수 있다는 점에 근거하여, 한약물의 산소공급차단에 의한 세포의 활동저하 및 산소재공급에 의한 세포사와 세포활동저하에 미치는 효과를 검토하고자 mouse neuroblastoma 2a 세포를 대상으로, 健腦湯과 杜冲, 大棗를 이용하여 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 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

(1) 약재의 구성

본 실험에 사용된 약재는경희대학교 한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 실험에 사용된 한약물은健腦湯과 杜冲, 大棗이다. 健腦湯은 遠志, 石菖蒲, 神麴으로 이루어진 처방으로 각각 6g 사용하였으며, 각 韓藥材의 學名과 生藥名은 다음과 같다.(Table 1.)

Table 1. Names of Herbs used in the experiment

Herb Name		Scientific Name	dose (g)
健腦蕩	遠志 (Wonji)	Polygalae Radix	6
	石菖蒲 (Sukchangpo)	Acori Graminei Rhizoma	6
	神麴 (Sinkok)	Massa Medicata Fermentata	6
	杜冲 (Duchung)	Eucommiae Cortex	
	大棗 (Daejo)	Jujubae Frucutus	

(2) 약재의 추출

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.

2) 세포

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

3) 시약

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)은 JBI (대구, 한국), 96−well plate는 SPL(포천, 한국)에서 각기 구입하였다.

2. 방법

1) 세포의 배양

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/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) 세포활성도측정(MTT assay)

MTT assay는 Sladowski의 방법을 따라 행하였다[27]. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색의 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[28].

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 PBS 용액에 녹이고 0.4㎛ 실린지로 여과하여 얻음)을 더하고 2시간 더 배양하고 배양액은 제거되었다.각 웰 내에 형성된포마쟌(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, 나머지군의 측정한 O.D. 값을 상대치로 환산하면

Cell Viability = (실험치÷control 군)

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

4) 세포독성 측정 (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 세포 밖으로 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[27]. 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(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㎍/ml에서 최고 1,000㎍/ml를 포함하여 5개의 다른 농도에서 실시하였다.

5) 통계처리

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. 한약물의 수득율

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 大棗의 경우 12.9% 의 수득율을 보였으며 杜冲의 경우 4.64%의 수득율을 보였다. 이는 약재가 유기용매 등에 녹는 성분의 함량을 의미할 뿐 약효에 관한 특정한 유의성을 보이는 결과라고 생각되지는 않았다. 健腦湯의 경우는 수득율이 확보되지 않았으나 실험결과에 영향이 없을 것으로 사료되어 未定으로 두었다.

Table 2. The Rate of Extraction from Herbs

Name	Extrative Rate(%)
Kunnuetang	N. D.
Eucommiae Cortex	4.64
Jujubae Frucutus	12.9

N.D. means 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

韓藥物이 正常的인 狀態에서의 細胞에 미치는 효과를 조사하기 위하여 각기 1mg/ml의 농도에서 MTT assay와 LDH assay를 실시하여 그 결과를 각기 Fig. 1 (A).와 (B).로 나타내었다. Fig. 1(A)에 나타난 바와 같이 정상군에 비해 약간의 낮은 수치를 나타내어 한약재 투여만으론 세포보호효과가 나타나지 않는다고 결론지었다. Fig. 1(B)에서는 健腦湯을 제외하고 다른 한약물들이 정상군에 비해 약간 낮거나 유사한 값을 나타내었다. 따라서 본 연구에 사용된 거의 모든 한약물들이 정상적인 세포에는 세포증식이나 세포손상에 크게 관여하고 있지 않다는 것을 의미하고 있다. 단 健腦湯의 경우 in vitro와 높은 농도(1mg/ml)에서 세포손상이 일어날 수 있기 때문에 hypoxia 상태에서도 세포에 약물자체가 심각한 손상을 야기할 것으로 예상되었다. 健腦湯의 경우 환의 구성에 사용된 단미 중 일부가 세포막에 손상을 가하고 세포질에 있는 LDH가 배양액으로 유출된 것으로 생각되었다.

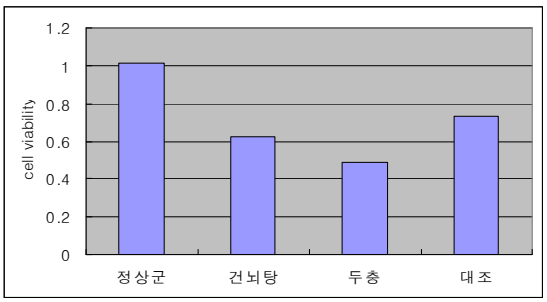


Fig. 1(A). Cell Viability of Mouse neuroblastoma 2a cell influenced by herb

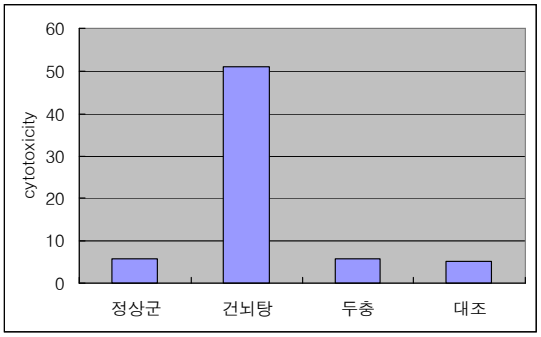


Fig. 1(B). Cytotoxicity of Mouse neuroblastoma 2a cell influenced by herbs

② Hypoxia와 reoxygenation이 세포생존과 세포사에 미치는 효과

세포의 생존과 사멸에 미치는 산소의 영향을 조사하기 위하여 여러 배양조건에서 실험을 실시하여 아래의 Fig. 2 (A)와 (B)와 같은 결과를 얻었다. MTT assay로 확인한 결과 N2a 세포는 약 24 시간 동안 산소를 차단하였을 경우 세포의 증식속도에 아무런 영향을 주지 않았음이 관측되었으며 이 때 산소의 재공급에 의한 효과도 관측되지 않았다. 하지만 산소의 차단이 48시간(H48)에 이르면 세포의 증식은 매우 억제되어 이 조건에서 세포가 심각한 스트레스를 받고 있음을 보여주고 있다. 이 조건에서 산소의 재공급은 MTT assay에는 영향을 주지 않음을 보여주고 있으며 이는 Fig. 2 (B)의 결과와는 다른 양상이다.

Fig. 2 (B)는 세포막의 손상을 의미하는 지표인 배양액 상의 LDH 효소의 활성을 측정한 값인데 (A)와 마찬가지로 48시간의 산소공급차단은 세포막에 심각한 손상을 입힘을 알 수 있었지만 추가적인 6시간의 산소재공급은 MTT assay에는 영향을 주지 않았음에도 불구하고 LDH assay 상에서는 추가적인 세포막 손상을 보여주었다. 앞의 MTT assay 결과 (Fig. 2 (A))와 더불어 이 결과는 48시간의 산소공급차단은 세포내 환원 효소의 활성과 세포막의 손상에 큰 영향을 주지만 추가적인 산소의 재공급은 환원효소의 활성에는 영향을 주지 않고 세포막의 손상만 유발하는 것을 알 수 있었다.

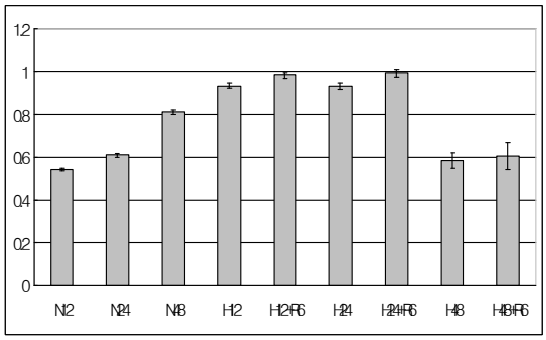


Fig. 2(A). MTT assay of hypoxia-reoxygenation injured Mouse neuroblastoma 2a cell
N: normal condition, H: hypoxia condition,R: reoxygenation condition

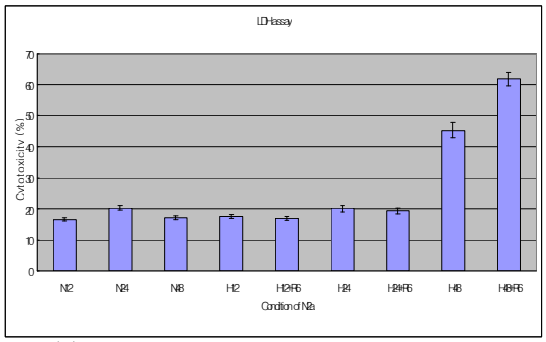


Fig. 2(B). LDH assay of hypoxia-reoxygenation injured Mouse neuroblastoma 2a cell
N: normal condition, H: hypoxia condition,R: reoxygenation condition

2)健腦湯과 杜冲, 大棗가 세포손상과 보호에 미치는 효과

① 健腦湯이 세포손상과 보호에 미치는 효과

健腦湯은 hypoxia조건의 MTT assay에는 별다른 차이가 없이 농도에 따라 약간의 대사효소 억제효과가 관측되었고, reoxygenation 조건의 MTT assay에는 농도에 따라 약간의 대사효소억제효과가 관측되었다, 농도가 1000㎍/ml에서는 오히려 약간의 보호효과가 있었다.

LDH assay에는 hypoxia 상태에서는 50㎍

g/ml까지는 강력한 효과를 나타내다가 약 1000㎍/ml에서는 세포사를 촉진하는 현상이 관측되었다. 이는 높은 농도에서 saponin 등에 의한 세포괴사로 생각된다. reoxygenation 상태에서는 500㎍/ml까지는 별 영향을 주지 않다가 1000㎍/ml에서는 오히려 보호효과가 보인다.

Table 3. Effect of Kunnuetang on Cellular Viabilityand Cytotoxicity of Hypoxia-Reoxigenation Injured Mouse Neuroblastoma 2a Cell(㎍/㎖)

dose / assay	0	50	100	200	500	1000
MTTH	0.73±0.1	0.59±0.1	0.64±0.1*	0.54±0.1	0.57±0.1	0.60±0.0
MTTHR	0.62±0.1	0.64±0.0	0.57±0.0	0.60±0.1	0.50±0.1	0.64±0.0
LDHH	25.00±2.9**	5.44±1.0**	5.26±1.1**	8.06±0.6**	7.69±0.7**	14.08±3.4**
LDHHR	42.06±3.6**	21.26±2.9**	19.04±2.8**	22.89±6.0**	26.51±1.7**	69.42±4.4**

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

② 杜冲이 세포손상과 보호에 미치는 효과

杜冲은 hypoxia조건의 MTT assay에는 100㎍/ml까지 세포의 활성이 증가됨을 확인할 수 있으나 이후는 다시 감소하고, reoxygenation 조건의 MTT assay에는 전 범위에서 세포활성을 감소시키는 효과가 보인다.

LDH assay에는 hypoxia 상태에서는 50㎍/ml에서 효과를 보이고 약 200-1000㎍/ml에서 추가적인 효과가 나타나는 것으로 보인다. reoxygenation상태에서는 전 범위에 걸쳐 보호효과가 있는 것으로 보이고, hypoxia에 나타난 이중적인 현상은 보이지 않고 있다.

杜冲의 낮은 농도에서 나타난 세포환원효소활성에 대한 보호효과는 매우 고무적인 것으로 보인다. 이 범위의 활성은 LDH, hypoxia상황에서도 보호효과를 보이고 있다. 단 reoxygenation상황에서는 MTT에서 부정적인 효과를 보이며 다른 한약물과 이는 다른 특이점이라 할 수 있다.

Table 4. Effect of Duchung on Cellular Viabilityand Cytotoxicity of Hypoxia-Reoxigenation Injured Mouse Neuroblastoma 2a Cell(㎍/㎖)

dose / assay	0	50	100	200	500	1000
MTTH	0.52±0.0**	0.62±0.1	0.72±0.1	0.63±0.1	0.59±0.1	0.42±0.0
MTTHR	0.62±0.1**	0.37±0.1*	0.43±0.0*	0.40±0.1	0.44±0.0	0.44±0.1
LDHH	25.00±2.9**	15.29±1.0**	17.76±1.2**	16.41±1.8**	14.40±2.0**	7.61±2.8**
LDHHR	42.06±3.6**	16.50±1.0**	16.60±1.6**	18.29±1.3**	16.91±0.9**	16.21±1.0**

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

③ 大棗가 세포손상과 보호에 미치는 효과

大棗는hypoxia조건의 MTT assay에는 별다른 효과가 없다가 약 1000㎍/ml에서 약간의 호전효과가 보이고 reoxygenation 조건의 MTT assay에서도 hypoxia와 유사한 효과를 보이고 있다.

LDH assay에는 hypoxia 상태에서는 50㎍/ml에서부터 1000㎍/ml까지 점차적인 single phase의 보호효과가 보이고 reoxygenation상태에서는 500㎍/ml까지는 별다른 효과를 보이지 않다가 100㎍/ml에서 약간의 보호효과를 보이고 있다. 결과적으로 大棗는 hypoxia에서 LDH에서만 보호효과를 보이는 것으로 나타났다.

Table 5. Effect of Daejo on Cellular Viabilityand Cytotoxicity of Hypoxia-reoxigenation injured Mouse Neuroblastoma 2a Cell(μg/㎖)

dose / assay	0	50	100	200	500	1000
MTTH	0.66±0.1	0.65±0.1	0.64±0.0	0.58±0.1	0.57±0.0	0.67±0.0
MTTHR	0.62±0.1	0.64±0.0	0.56±0.1	0.57±0.1	0.60±0.1	0.71±0.1
LDHH	25.01±2.9**	18.23±1.1**	16.25±1.1**	14.98±1.4**	14.42±0.9**	15.63±1.3**
LDHHR	42.06±3.6**	30.27±1.8**	31.75±2.1**	33.97±2.5**	34.72±2.0**	27.07±3.4**

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 유효와 무효로 간략하게 정리하면 아래 표(Table 9)와 같다.

Table 6 The Summary of The Experiments.

Name/실험	MTTH	MTTHR	LDHH	LDHHR
Kunnuetang	X	X	○	○
Duchung	X	○	○	○
Daejo	X	X	○	○

○: positive X: negative

Ⅳ. 考 察

痴呆란 가장 대표적인 노인성 질환으로 여러 원인 질환에 의해만성적으로 의식장애 없이 자기 유지 및 사회생활이나 직업 생활에 심한 장애를 초래할 정도로 記憶力, 思考力, 指南力, 理解力, 計算能力, 學習能力, 記憶 및 判斷力 등 전체적이고 복합적인 지적 기능의 저하가 후천적으로 일어난 기질성 뇌증후군을 의미한다[1-7].

치매의 유형에는 알츠하이머형 치매, 혈관성 치매, 중독성 치매, 이외에도 여러 분류가 있으며 그 중 알츠하이머형이 전체의 약 50% 이상을 차지하고 있고, 혈관성 치매가 20%이상을 차지하고 있는바 치매의 분류에 있어서는 알츠하이머형과 혈관성 치매가 차지하는 비중이 높다 할 수 있다[7].

또한 임상에서는 알츠하이머나 혈관성 치매가 단독으로 나타나는 경우도 있지만, 보통 알츠하이머형 질환이 혈관계질환과 병합되어, 치매의 가장 흔한 유형이 되는 신경정신 질환으로 주로 대뇌피질손상과 뇌기저핵, 또는 시상 등에 손상을 일으켜 사회적 기능이나 일상생활 기능에 장애를 초래하는 경우가 많이 보이고 있다[7].

Azheimer's disease(이하 AD)는 1907년 Alois Alzheimer에 의해 기억력 장애, 지남력 상실, 그리고 고등 기능의 전반적인 와해를 보이는 질환으로 사망한 여성 환자에게서 노인반(senile plague(Aβ)) 과 신경섬유덩어리(neutrofibrillary tangles(NFTs)), 아밀로이드혈관이 발견됨에 의해 처음으로 보고되었고, 초기에는 주로 65세 이전에 발생하는 경우만을 AD라 하고 그 이후에 발생하는 경우는 노인성 치매(senile dementia of Alzheimer type)라 하여 이를 구별하였으나 발병 연령 이외에는 임상양상이나 병리소견의 차이가 없어 최근에는 이를 하나의 질환으로 간주하고, 알츠하이머형 치매라 부르게 되었다[5-6],

AD의 병인론에 대하여는 아직 확실히 밝혀진 바 없이 이전의 임상연구 및 동물실험에서 보면 감염, 면역계의 이상, aluminium 및 기타 금속물질을 포함한 독성물질의 영향과 유전적 영향 등의 가설들이 받아들여지는 실정이다[8].

최근 AD는 지속적인 산화 스트레스(산화과정)로 인해 시냅스 전달 부전이나 신경퇴행을

일으켜 나타나는 것으로 보는 경향이 두드러진다[15-18]. 또한 항산화 체계의 결핍이나 만성적인 혈관의 저관류로 야기되는 산화 스트레스와 미토콘드리아의 기능부전은 AD에 중요하고, 저산소증은 AD의 신경퇴행에 있어서 발병과 진행의 주된 기인자로 여겨지고 있다[13-14].

혈관성 치매(Vascular dementia, 이하 VaD)는 하나 또는 그 이상의 뇌졸중의 결과로 인한 인지기능의 이상을 나타내는 치매로[10-11,30] 전형적으로 병력, 국소 신경학적인 증상과 증후 또는 영상진단으로 확인되어지는 뇌혈관 질환의 과정에서 나타나고, 돌연한 발병, 계단식 경과의 특징적인 임상양상을 갖는다[9,12].

병리기전 및 임상양상에 의하여 여러 가지의 분류가 가능하지만, 주로 심장성의 색전에 기인한 대혈관 경색에 의한 다발성 경색성(multi-infarct) 치매; 시상, frontal white matter, angular gyrus 등을 침범하는 중요한 부위의 단일경색(strategic-single infarct)에 의한 치매; 백질허혈 및 피질하의 소혈관 질환들에 의한 감정둔마, 사고흐름의 지연, 정신운동의 지체, 운동완서, 지남력 저하, 기억 및 주의력 손상, 보속증 등의 증상이 나타나는 다발성 미소경색(subcortical lacunar infarct) 및 의지결여증, 실금, 사지강직을 특징으로 하는 Binswanger's disease에 의한 치매; 저관류에 의한 치매; 뇌출혈에 의한 치매와 기타 기전에 의한 치매 등으로 세분화될 수 있다[31].

이러한 치매에 대한 현재까지의 치료방법이나 관리에 있어서는 많은 연구와 발전이 있어 왔으나 한계가 있는 것이 사실이다,

현재까지 알츠하이머형 치매에 대한 치료방법으로는 비약물적 처치로 행동지지방법과 기억력과 인지능력을 유지시키는 약물을 병행하는 요법, 신경이완제, 진정제, 항불안제의 복합요법 등이 시행되어 왔으나 병인론적 규명이 명확치 않기 때문에 치료 목표 설정에 있어 모호한 측면이 있다,현재 사용되는 약물 요법의 방향은 acetylcholin esterase inhibitor(tacrine, aricept)가 주되게 사용되고 그 외에 임상적으로 항소염제, 여성호르몬 제제, 비타민, 셀레늄 등의 항산화제 등이 사용되고 있다[32]. 혈관성 치매의 치료에 있어서도 위험인자들에 대한 통제가 예방과 치료의 측면에서 중요하게 여겨지며 고령, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 심방세동, 울혈성 심부전, 관상동맥질환, 경동맥 잡음, 흡연과 알코올의 남용 등의 혈관성 위험인자 및 뇌졸중 병력에 대한 조사와 그에 대한 효과적인 조치가 가장 중요하게 여긴다, 임상적으로 사용하는 약물치료로는 항응고제, 항혈전제, 항염증제, 항산화제, 항아밀로이드제, 신경보호제, 뇌혈류개선제, 칼슘채널차단제, 면역억제제 등이 사용되고 있다[12,33,34].

이처럼 치매에 대한 많은 연구와 발전이 있어왔으나 그 원인규명이 불완전하므로 아직까지 임상적으로 탁월한 치료효과를 이룬 방법은 거의 없으며, FDA에서 승인 받은 가장 광범위한 콜린계 유지 약물들도 그 효과가 실상 미비하고 부작용 문제가 대두됨에 따라 더욱더 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다[35].

韓醫學에서는 痴呆를 呆病, 健忘, 癲狂을 근거로 하여 접근하고 있으며, 그 연원을 살펴보면 內經과 歷代醫書에서도 健忘 등으로 유사한 내용을 언급하다가[36-37] 明代 張이 [景岳全書·雜證謨]의 癲狂篇에 '痴獃' 라는 病名을 따로 설명하면서 補心脾 위주의 治法을 강조하며 七福飮, 大補元煎을 활용하였고[38] [景岳全書] 이후로 [石室秘錄][39], [辨證奇聞全書][40]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, [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 제시하였다, 이후 [丹溪心法]에서도 언급되는데[41] 健忘에 歸脾湯, 定志丸을 處方으로 提示하였다.

현대 中醫學에서는 痴呆를 辨證施治하여 治療하는 것을 근간으로 삼는데, 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 治法은 크게消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등의 방법을 적용하고 있다[42-44].

국내 한의학에서는 변증시치 방법 외에 四象醫學적 치료도 응용을 하고 있는데 處方으로 거론되는 것은 調胃升淸湯과 荊防地黃湯 등이 있다[45].

치매에 대한 최근의 한약에 대한 연구는 단미로는 石菖蒲[19], 日黃連[20], 香附子[21] 등과 복합처방으로 天王補心丹[22], 加減固本丸[23] 등이 치매에 유효한 효과가 있다는 보고들이 있고, 박[46]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 확보하고, 임상실험에서는 조[47]와 김[48]이 초기 AD환자에게 6개월과 9개월간 調胃升淸湯을 투여하고 치료 전과 치료 후에 K-DRS, ERP를 측정한 연구에서 調胃升淸湯의 유효성을 입증하고 있다.

健腦湯은 遠志, 石菖蒲, 神麴으로 구성된 처방으로 그 方義는 이제마의 東醫壽世保元에 수록된 調胃升淸湯에서 비롯되었다. 調胃升淸湯은 수세보원의 太陰人 胃脘受寒表寒病에서 食後痞滿, 腿脚無力에 사용되는 처방으로 실제로 太陰人의 脈緩, 胸悶, 下肢沈重, 易疲勞, 多眠, 短氣, 不思飮食, 內傷食滯, 虛勞, 健忘, 自汗, 小便不禁 등의 증상에 포괄적으로 응용하여 왔으며, 실험연구를 통해 김[49]은 항스트레스 효과를, 우[50]는 방사형 미로학습에 있어 흰쥐의 학습과 기억에 대한 효과를, 이[51]는 AD모델 흰쥐에게 학습과 기억을 증진시키는 효과가 있음을 보고하였다. 이후 개별약재의 치매를 지지하는 활성을 조사하기 위해서 각 단미제 추출물을 대상으로 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과, 신경줄기세포의 분화 및 세포생존에 대한 보호 효과를 검토한 결과 遠志 추출물에서 산화스트레스에 대한 보호효과가 일관되게 관찰되고, 세포의 생존 및 분화에 대한 촉진효과가 명확하게 관찰되었다[24].

이후 遠志와 四象醫學적으로 흔히 相須역할을 하는 石菖蒲를 배합하여[52] 遠志石菖蒲散을 만든 후에, 치매에 대한 효과를 입증하기 위하여 동물실험을 실행하였다. Immunotoxin 192 IgG-saporin을 내측 중격 (medial septum: MS)에 주입하여 해마의 콜린성 뉴런이 손상된 192Sap-MS AD모델의 쥐에게 매일 일정한 시간에 전탕추출후 동결건조시킨 遠志石菖蒲를 생리식염수에 녹여(100mg/kg, p.o.) 3주 동안 경구 투여 또는 복강 투여(100mg/kg/day)하고 통제동물에게는 saline을 동량 투여한 후 행동검사 및 전기생리학적 검사를 실시하였다.

행동 실험과 신경활동 기록 실험이 모두 끝난 직후 실험동물의 뇌를 적출하여, 뇌 조직을 배측(dorsal)과 복측(ventral)의 해마, 내측 중격 부위에서 30㎛의 두께로 coronal 절편으로 잘랐다. ChAT(choline acetyl Transferase) 유전자 발현 연구에 가장 널리 사용되고 있는 primary sheep polyclonal ChAT antibody(Cambridge Research Biochemicals, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 내측 중격과 해마에서 ChAT-immunoreactive 신경세포의 수를 측정하였다. 그 결과 행동실험 중 대표적인 해마-의존적 학습인 Morris water maze learning에서 遠志石菖蒲가 치매동물의 공간학습 습득 능력저하를 방지하는 유의미한 효과를 나타냈으며, 파지검사에서도 파지결함을 방지하는 효과를 나타내었고, 뇌조직 검사에서 해마 CA3 부위에서 遠志石菖蒲 투여집단의 ChAT 발현의 손상정도가 유의하게 회복되었다[8,24].

이상 동물실험에서의 유효성에 간손상지표등 독성반응과 임상에서의 위장장애 부작용을 제거하기 위해 神麴을 동일 비율로 하는 처방을 구성한 이후 독성실험을 한 결과 안전성이 입증되었다[24]. 따라서 AD환자뿐 아니라 기억력

이나 학습능력에 장애를 보이는 경우에 치료할 수 있는 한약으로 규명되었다.

처방을 구성하는 개별 약재를 살펴보면 遠志는 性이 微溫無毒하고 味는 苦辛하며 寧心安身, 祛痰利竅, 消散癰腫하는 효능으로 健忘驚悸를 치료하고, 石菖蒲는 性이 溫 無毒하고, 味는 辛苦하며 開竅祛痰, 醒神益智 하는 효능으로 神昏癲癎, 健忘耳聾을 치료하며, 神麴은 性이 溫 無毒하고, 味는 甘辛하여 健脾和胃, 消食調中하여, 飮食停滯, 胸痞腹脹증상을 다스린다[53].

본 실험에 같이 사용된 단미 약재를 살펴보면 大棗는 性이 溫 無毒하고 味는 甘 하며 脾胃를 補하고 榮血을 조절하며 解毒작용을 가지며, 杜冲은 性은 溫 無毒하고 味는 甘微辛 하며 强筋骨하고 肝腎을 補하는 작용을 가진다[53].

한약물의 뇌질환 효과에 관한 지금까지의 연구는 주로 뇌조직의 손상에 보호효과가 있다고 제안된 약물을 동물실험을 통하여 진행 된 것들로 調胃升淸湯과 荊防地黃湯의 노화동물에 대하여 방사형 미로와 Morris수중미로 과제를 이용한 치매치료 효과를 밝힌 연구[6]이거나, 박[26]의 경우처럼 성향정기산데 대한 SOD, Glutathione 등의 항산화 효소계를 측정하는 방법이 주를 이루고 있다.

최근 치매를 비롯한 뇌손상질환에 대해 항산화이론에 대한 연구가 상당히 활발히 이루어지고 있다, 그 중 hypoxia-reoxygenation에 의한 세포손상, 특히 뇌세포 파괴에 관한 내용은 지금까지 알츠하이머형 치매나 혈관성 치매, 기타 세포손상 질환에서의 병리과정을 설명하는데 이론적 근거가 될 수 있다.

腦虛血에 의한 細胞損傷은 산소 공급이 역치 이하로 감소되면 기능상실과 더불어 세포괴사(necrosis)가 나타난다[54]. 그러나 대부분의 腦虛血은 일시적이며 腦虛血 당시보다는 再灌流시에 산소가 조직으로 재공급될 경우 급속한 활성산소의 생성이 증가되므로 조직 손상이 더욱 강하게 일어난다[55].

활성산소에 의한 세포의 피해는 괴사(necrosis)와 자연사(apoptosis)라는 두 가지 형태로 나타나는데[15], 괴사는 superoxide anion radical이 연쇄적으로 활성산소들을 생성함으로서 세포막의 인지질에 작용하여 일어나고, apoptosis는 특징적으로 세포핵의 변화, 크로마틴의 생화학적 변화를 동반하며, 암, 뇌질환 등 여러 질병에 영향을 미치는데, 이러한 apoptosis가 유발되는 과정에 있어 미토콘드리아가 중요한 역할을 한다[56].

미토콘드리아는 활성산소를 만들어내는 주요한 원인인 동시에 활성산소의 공격을 받는 주요한 대상으로, 고농도의 활성 산소종에 의해 세포내의 미토콘드리아가 쉽게 노출되고 손상받아 미토콘드리아의 막전위가 감소되면 early apoptosis가 유발된다. 이러한 기전의 세포사는 신경전달 실조와 신경퇴화를 유발하여 알츠하이머형 치매를 포함한 여러 가지 신경퇴행성 뇌질환을 야기한다[14].

Xanthine oxidase는 활성산소를 생성시키는 대표적인 인자로서 생체 대부분의 조직세포에 분포하며 주로 산화반응을 촉매하는 것으로 알려져 있다. 이 효소에 의해서 산화반응이 진행되는 동안 분자상의 산소로부터 superoxide anion radical이나 hydroxyl radical 같은 활성산소들이 생성되어 再灌流시에는 虛血 상태시 세포내에 축적된 hypoxanthine이 xanthine oxidase에 의하여 xanthnie과 uric acid로 전환되면서 매우 독성이 강한superoxide anion radical을생성하고 연쇄적으로 활성산소들을 생성함으로서 세포막의 인지질에 작용하여 과산화시켜 막의 구조변형과 기능상실을 유발하므로 조직손상을 일으킨다[57].

본 연구에서는 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 세포막이 손상을 입을 경우 세포 밖으로 분비되므로 LDH의

활성이 줄어들면 산소에 의한 세포막 손상, 즉 세포막 파괴로 결론지어지는 세포의 괴사를 막는 효과가 있다고 볼 수 있다[29]. 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 assay는hypoxia-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.

첫 번째 사전실험에서 정상 N2a세포에 미치는 한약물의 효과는 거의 모든 한약물들이 세포증식이나 세포손상에는 크게 관여하고 있지 않다는 결과를 보여주었다. 단, 健腦湯의 경우 in vitro와 높은 농도(1mg/ml)에서 세포손상을 나타내었다. 이는 健腦湯 처방의 구성에 사용된 일부 단미가 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 알 수 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 formazan형성 능력이 증가된 것을 의미한다. 즉 생존한 세포의 환원능력이 향상된 것을 의미한다. 이는 산화성 손상이 세포에 손상을 줄 뿐 아니라 세포의 항산화 능력을 유발한다는 연구결과와 일치한다[14]. 사전실험의 48시간 산소차단에서 세포의 유의한 변화가 나타난 결과에 따라본 실험에서는 48시간 산소차단 조건을 부여하였다.

본 실험의 결과를 보면 hypoxia조건의 MTT assay에서 전반적으로 수치상 별다른 상승을 보이지 않았는데, 이것은 健腦湯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, 杜冲과 大棗에서는 일부 농도에서 유의한 효과가 관찰되어 추가적인 확인과 연구가 필요하다.

Hypoxia 조건의 LDH assay에서 健腦湯과 杜冲, 大棗에서 모두 유의한 효과를 나타내었다. 이것은 산소부족에 의한 세포괴사방지에 효과가 있다는 것이며, 健腦湯과 單味들이 뇌허혈로 인한 중풍이나 알츠하이머형, 혈관성 치매와 같은 뇌의 국소 저산소증 소견과 그로 인한 세포괴사가 보이는 질환에 사용 가능한 근거를 제시해 줄 수 있다. 단 健腦湯은 높은 농도에서는 오히려 健腦湯으로 인한 세포괴사 소견이 나타나므로 이는 추후 확인과 연구가 필요하다.

Reoxygenation 조건의 MTT assay에서도 健腦湯의 고농도에서의 약간의 상승 반응을 제외하곤 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 효과가 부정적이거나 긍정적인 효과가 없다는 것을 의미한다.

Reoxygenation 조건의 LDH assay에서 杜冲, 大棗는 모두 유의한 효과를 나타내었다. 이것은 실험에 사용된 한약물들이 산소재공급시 활성산소에 의한 산화성 세포괴사를 방지하는데 효과가 있다는 것을 의미한다. 특이하게도 健腦湯은 hypoxia조건에서만 세포막보호(LDH)를 나타내고 reoxygenation상태에서는 아주 높은 농도(1mg/ml)에서만 보호효과를 보이는 물질이 존재하는 것으로 보인다. 健腦湯이 1mg/ml에서 LDH assay상에서 세포사를 유발한다는 점을 감안하면 높은 농도의 보호효과는 세포괴사에 의한 것을 상쇄하고 나타난 효과라고 보인다. 최근 연구동향에 의하면 알츠하이머형 치매나 혈관성 치매와 같은 뇌손상 질환에서 세포손상은 腦虛血보다는 再灌流시 활성산소에 의한 것이 더 많으므로 이러한 실험 결과는 健腦湯과 같은 처방이 산화성 손상에 의한 세포괴사로 痴呆의 병증이 진행되는 것을 억제하는데 임상적으로 적용될 수 있는 지지증거가 되리라 판단된다. 특이적으로 健腦湯은 고농도에서만 세포막보호효과를 보이는 물질이 존재함을 나타내므로 추후 연구 조사할 필요가 있음이 사료된다.

본 실험결과는 in vitro 실험으로의 한계와 MTT assay에서의 결과상 어느 정도 한계점을 나타내고 있지만, 허혈-재관류에 관한 세포손상과 한약물이 세포막 보호 효과를 보인다는 결과를 도출해 낼 수 있었고, 향후 한약제제를 이용한 신약개발에 기틀을 마련할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

인체에서 虛血과 再灌流에 의해 발생한 뇌신경세포의 손상에 健腦湯 및 杜冲, 大棗가 미치는영향을 연구하기 위하여 mouse neurolastoma 2a 세포를 대상으로, 한약물이 hypoxia-reoxygenation 조건을 부여한 세포의 세포활성과 세포손상정도에 미치는 효과를, MTT assay, LDH assay를 사용, 각기 조사하여 의미 있는 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 assay에서 健腦湯은수치상 별다른 상승을 보이지 않았으나, 杜冲과 大棗에서는 일부 농도에서 유의한 효과가 관찰되어 추가적인 확인과 연구가 필요하다.

3. Hypoxia 조건의 LDH assay에서 健腦湯과 杜冲, 大棗 모두 유의한 효과를 나타내었다. 그러나 健腦湯은 높은 농도에서는 오히려 세포괴사효과가 관찰되었다. .

4. Reoxygenation 조건의 LDH assay에서 健腦湯과 杜冲, 大棗는 모두 유의한 효과를 나타내었다. 특히 健腦湯은 높은 농도에서 보호효과를 나타내었다.

5. Reoxygenation 조건의 MTT assay에서 健腦湯과 大棗는 별다른 상승을 보이지 않았으나 杜冲은 어느 정도 유의한 효과를 보여주었다.

上記한 결과가 의미하는 것은 다음과 같다. LDH assay에서 健腦湯과 杜冲, 大棗가유의한 효과를 나타낸 것은 실험에 사용된 單味들이 알츠하이머형 치매와 血管性 痴呆의 세포괴사 방지에 임상적으로 활용될 수 있으리라는 판단을 가능케 하고,Reoxygenation 조건의 MTT assay에서의 일부 농도에서의 유의한 효과는 이들 약물이 활성산소에 의한 뇌세포의 변성 및 자연사 방지에 효과적일 것이며 향후 신약개발에 있어서 중요한 연구 대상이 되리라 판단된다.

參 考 文 獻

1. 황의완, 김지혁.동의정신의학. 서울. 현대의학서적사. 1989;134-135,255-271,
2. 황의완, 김종우, 이조희, 엄효진, 이승기.치매에 대한 한의학적 임상연구. 동의신경정신과 학회지. 1996;7(1):1-11.
3. 대한신경정신의학회.신경정신과학. 서울:하나의학사. , 1998;194,211,246,479.
4. 민성길.최신정신의학. 서울: 일조각. 1996;115,160,163,409,532.
5. 김명호.치매의 정의와 분류. 대한신경과학회지. 1985;3(1):1-4.
6. 조윤숙 외 3인.형방지황탕이 Alzheimer's disease모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향. 동의신경정신과 학회지. 1998;9(1):1-22.
7. 곽동일.노인성 痴呆. 노인정신의학. 1997;1(1):3-15.
8. Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen D, Waeg G, Mattson MP .Evidence that 4-hydroxynoneral mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. J. Neurosci. 1997;17:5089-5100,
9. 오병훈.노인성 치매-원인 및 감별진단. 대한의학협회지. 1994;37(7):785- 790.
10. 이부영 역.ICD-10(정신 및 형태장애). 서울:일조각. 1994:63-71
11. American Psychiatric Association.Practice Guideline for the Treat ment of Patient of Patients With Azheimer's disease and Other Demnentias of Late Life. Am J Psychiatyr. 1997;154(5) supplement.
12. 현경철, 김종우, 황의완.Vascular dementia에 관한 한의학적 임상연구. 동의신경정신과 학회지. 1999;10(1):147-157.
13. Adriennne M. Gorman, Sandra Ceccatelli, Sten Orrenius.Role of Mitochondria in Neuronal Apoptosis, Der Neurosci. 2000;22:348-358.
14. Anne Ecket, Utr Keil, Celio, Marques, Astrid Bonert, Claudia Frey, Katrin Schussel, Walter E. Muller.Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. Biochemical Pharmacology. 2003;66:1627-1634.
15. Christian behl.alzheimer' disease and oxidative stress; implications for novel therapeutic approaches. Progress in Neurobiology.1999;57:301-323.
16. Kartik Prabhakrren, B.s.Neuroblastoma Survival and Death; An In Vitro Model of Hypoxia and Metabolic Stress. Jur of Surgical Research. 2004;116:288-296.
17. Katsumi Ikeda, Hiroko Negishi, Yukio Yamori.Antioxidant nutrients and hypoxia/ischemia injury in rodents. Toxicology. 2003;189:55-61.
18. Russel J. Reiter.Oxidative damage in the central nervous system.Protection by melatonin. Progress in Neurobiology. 1998;56:359-384.
19. 康永祿.원지와 석창포의 단독 및 혼합투여가 백서의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 석사학위논문. 1997.
20. 박지운, 정인철, 이상룡.日黃連이 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지 2004;15(1):87-99.
21. 윤상학, 정인철, 이상룡.香附子가 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지 2003;14(1):59-74.
22. 이준영, 정인철, 이상룡.天王補心丹이 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과

학회지2002;13(2):149-171.
23. 하수영, 정인철, 이상룡.加減固本丸이 치매 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과 학회지 2002;13(1):53-77.
24. 황의완.치매에 대한 한약제제 개발; 한방치료기술연구개발사업 최종보고서. 보건복지부.
25. 김형태 譯.김형태 도해 동의수세보원. 서울:도서출판 정담. 1999:181.
26.. 박선동 외3인.귀비탕 및 그 구성약물군이 항노화효소에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001;16(1):11-25.
27. Sladowski, D., Steer, S. L., Clothier, R. H., and Balls M..An improved MTT assay. J. Immunol. Methods 1993;157.203-207.
28. 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.
29. Koh JY, Choi DW.Quantitative determination og glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. Journal of Neuroscience Methods. 1987;20:83-90.
30. 나덕렬.치매의 접근 방법. 가정의학학회지. 1997. 1997;18(3).236-248.
31. 장대일.치매. 경희의학. 1997;13(1):20-23.
32. 김보균. 현경철, 김종우, 황의완.Dementia of Alzheimer Type에 관한 한의학적 임상연구. 동의신경정신과 학회지. 1998;9(1):25-43.
33. Hachinski V.Vascular dementia.the need for a new approach. Jurnal of Internal Medcine. 1997;242:277-279.
34. Kommo S, Meyer JS, Terayama Y, Margishvili GM, Mortel KF.Classification, diagnosis and treatment of vascular dementia. Drugs&aging. 1997;11(5):361-373.
35. 박명숙.치매치료제의 개발에 관한 고찰. 덕성여대 논문. 1997;28:6-14.
36. 孫思邈.備急千金要方. 서울:杏林出版社. 1982:129-135,534,545,550.
37. 洪元植.精校黃帝內經素問. 서울:동양의학연구소. , 1985:217-218,229
38. 張介賓.景岳全書. 서울:일중사 1992:846.
39. 陳士澤.石室秘錄(下). 서울: 書苑堂. 1984:316-317.
40. 錢鏡湖.辨證奇文全書. 台北: 甘地出版社. 1990:222-225,233-235.
41. 朱震亨.丹溪心法. 北京: 中國書店. 1996:258,259~262.
42. 楊思澎외.中醫臨床大全. 北京: 北京科學技術出版社. 1991.224-230.
43. 陳煇외.實用中醫腦病學. 北京: 學苑出版社. 1993.242-251.784-791.
44. 黃大東 외.實用中醫內科學. 上海: 上海科學技術出版社. 1989:378-381.
45. 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.
46. 박순권, 이홍재 김현택 황의완.한약물의 치매치료에 관한 실험적 연구. 동의신경정신과 학회지, 1998;9(2):19-36.
47. 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.
48. 김보균, 김종우, 김현택, 정견천, 황의완.알츠하이머형 치매환자에 대한 조위승청탕의 효능-청각 ERP 및 K-DRS 의 성적 변화를 통하여. 동의신경정신과학회지. 2003;14(2):36-43.

49. 김용문.조위승청탕의 항 스트레스에 관한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 1988.
50. 우주영, 김종우, 황의완, 김현택, 박순권.조위승청탕이 흰쥐의 방사형 미로학습과 기억에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지.1997;8(1):69-79.
51. 이상수, 김민걸, 이영호, 이상경, 안동성, 김정익, 정청, 심주철, 김용관, 김영훈.한도시 지역의 알츠하이머형 치매 환자군과 정상 대조군간이 정신병리에 대한 비교 연구. 신경정신의학. 1998;37(6):1306-1316.
52.. 辛民敎 編著: 임상본초학. 서울. 행림사. 2000:646-647,604-606.
53. 전국한의과대학 본초학교실.본초학. 영림사.1994:294,496,523,542,556.
54. Skarphedinesson, J. O., 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.
55. McCord, J. M.:Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N. Engl. J. Med.. 1985;312(3):159~163.
56. 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.
57. Milan, L., Jozef, R., Vilian, K., Peter, P. and Ladislav V..Free radicals in chemistry and biology, CRC Press. 1989: 29~31, 283~284.