동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 17. No. 1, 2006

黃連淸心飮의 항산화 및 AChE 억제 효과에 관한 연구

김헌일, 유종호, 이상택, 한윤승, 김근우, 구병수
동국대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Antioxidant Property and Inhibitory Effects of an Water Extract of Hwang-Ryun-Chung-Sim-Um on the Acetylcholinesterase

Hun-Il Kim, Jong-Ho Yoo, Sang-Taek Lee,
Yun-Seung Han, Geun-Woo Kim, Byung-Soo Koo
Dept. of Graduate School, Oriental Medicine, Dongguk University

Abstract

Objective: An water extract of the Hwang-Ryun-Chung-Sim-Um (HRC) was assessed to determine the mechanisms of its antioxidant activity. In addition, the HRC was examined in vitro for the inhibitory effect on the acetylcholinesterse (AChE).

Methods: The HRC exhibited a concentration-treatment; scavenging α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) radical, linoleic acid oxidation in a thiocyanate assay system, hydroxyl radical-induced DNA nicking. We investigated mRNA levels such as catalase activity, superoxide-dismutase and glutathione peroxidase. The water extract of HRC showed inhibitory effect on AChE activity.

Result: The HRC extract showed dose-dependent free radical scavenging activity, including DPPH radicals and hydroxyl radicals, using different system. The HRC was also found to be effective in protecting plasmid DNA against the strand breakage induced by Hydroxyl radicals in Fenton's reaction mixture. Futhermore, catalase mRNA expression levels increased, but SOD1 and MnSOD was not expressed. HRC in a various concentration-dependent decreased AChE mRNA levels and inhibitory effect showed AChE.

Conclusion: According to the above results, it is supposed that HRC is applicable to the Dementia-type of Alzheimer clinically.

Key Word: HRC, AChE, Antioxidant Activity

◆ 투고 : 2/10, 수정 : 3/7, 채택 : 3/7
교신저자: 김헌일, 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2 동국대학교 분당한방병원 신경정신과학교실
Tel: 031-710-3737, Fax: 031-710-3780, E-mail: bloodmess@hanmail.net

Ⅰ. 緖 論

김[1]의 보고에 따르면 우리나라는 2000년도에 65세 이상 노인의 인구 구성비가 7%를 상회하여 고령화 사회 초기 단계에 접어들었고, 2022년에는 노인의 인구비가14%를 넘을 것으로 예상되어 본격적인 고령사회로 진입 할 것으로 전망 된다. 이와 같은 인구구조의 노령화는 노화에 대한 문제와 치매와 같은 퇴행성 질환에 많은 관심을 기울이게 하고 있다.

최근 부각되는 노화에 대한 이론은 자유 유리기이론(free radical theory)이 유력하다. 프리래디컬(free radical)은 세포 구성성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA등을 비선택적, 비가역적으로 파괴함으로써 암을 비롯하여 뇌졸중, 동맥경화 같은 심혈관 질환, 류마티스 같은 만성염증 질환 등 각종 질병을 유발하고, 대표적인 뇌퇴행성질환인 알쯔하이머병의 경우도 프리래디컬이 병인으로서 중요시 되고 있어 노화와의 연관성이 있을 것으로 판단되고 있다[3-4].

알쯔하이머병의 1차적 증상인 기억력, 인지력 감퇴현상은 acetylcholine을 만들어내는 신경세포의 퇴화와 함께 AChE (acetylcholinesterase)의 증가로 더욱 심화됨을 제시하고 있고[7-8], 현재 알쯔하이머병에 대한 치료제로 아세틸콜린 분해효소(AChE)를 억제시켜 아세틸콜린의 양을 증가시키는 약제들이 가장 좋은 효과를 나타내고 있다[9]. 한편, 산화적 손상으로 인해 알쯔하이머병이 유발된다는 다양한 증거들이 여러 가지로 제시되고 있다[10-12].

黃連淸心飮은 『醫學入門』에서 처음 나온 처방으로, "治心有所慕而遺者"[13]라 하여 '마음에 사모하는 바가 있어서 遺精하는 바를 치료한다' 하였다. 처방구성 약물은 黃連 生地黃 當歸 甘草 茯神 酸棗仁 遠志 人蔘 蓮肉으로, 이 처방의 主藥인 黃連은 항산화활성을 높이고[14], 치매의 원인인 AChE의 저해활성이 높다는 것[15-16]이 실험으로 검증되었고, 白茯神, 遠志, 蓮子肉, 酸棗仁등의 약은 모두 寧神安神의 효능[17]으로 노화나 치매에서 나타나는 인지기능장애, 健忘, 失眠, 성격변화 등에 널리 쓰이는 약이다. 그러므로 黃連淸心飮이 遺精뿐만 아니라 노화나 치매 등에서 나타나는 여러 정신적인 문제에 응용가능하리라고 생각된다.

최근 한의학에서의 항산화연구를 살펴보면 개별한약재와 처방의 노화방지나 세포 독성 방지 효과 등에 대해 활발히 이루어지고 있고[18-21], 치매의 AChE 저해활성연구에 있어서도 치매병태모델과 생화학적 변화에 대한 여러 실험적 연구가 있었지만[15,22-24], 黃連淸心飮에 대한 본격적인 연구는 발표된 바 없고, 특히 본 처방으로 항산화에 관련된 연구와 AChE 억제효과를 함께 증명한 보고는 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 노화나 치매 방지에 효과가 있을 것으로 생각되는 黃連淸心飮을 이용하여 DPPH free radical의 소거능과 지질과산화 저해 정도를 관찰하고, CAT(catalase), SOD(superoxide dismutase)의 발현양상을 분석하여 항산화 효과를 증명하고자 하였다. 그리고 AChE의 활성 정도를 측정한 후 이를 분자생물학적으로 증명하고자 한다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 黃連淸心飮 시료제조

본 실험에서 사용한 黃連淸心飮 (Hwang-Ryun-Chung-Sim-Um, HRC)은 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다 (Table 1). Voucher specimen은 동국대학교 분당병원 신경정신과 교실에 보관되어 있다.

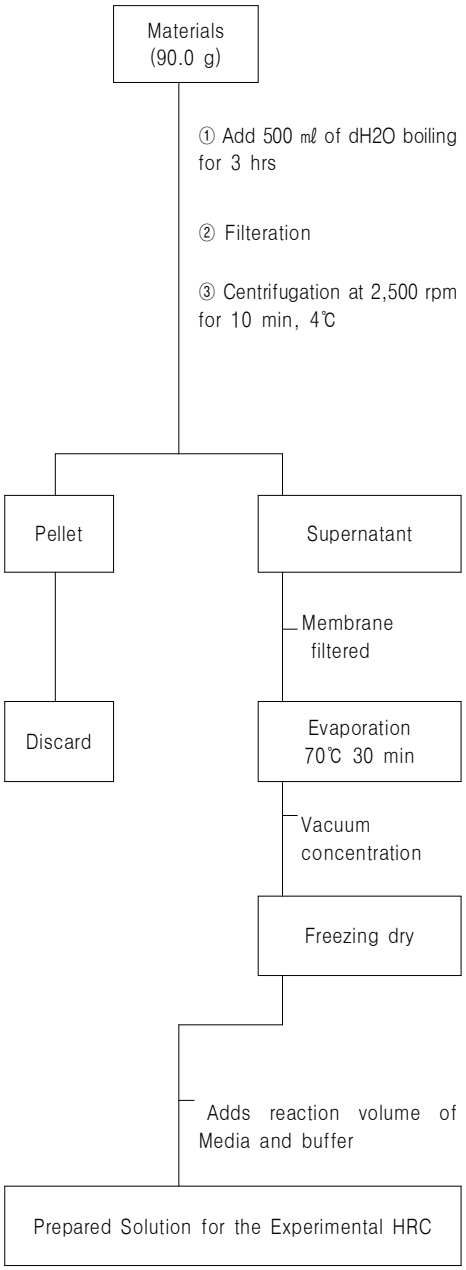
Table1. Composition of HRC

생약명	Medicinal herb name	Dose amount (g)
黃連	Coptis chinensis	10.0 g
生地黃	Rehmannia glutinosa	10.0 g
當歸	Angelica gigas	10.0 g
甘草	Glycyrrhiza uralensis	10.0 g
白茯神	Hoelen Cum Radix	10.0 g
酸棗仁	Zizyphi Semen	10.0 g
遠志	Poly galae Radix	10.0 g
人蔘	Ginseng Radix	10.0 g
蓮肉	Nelumbinis	10.0 g
	Total amounts	90.0 g

黃連淸心飮은 黃連, 生地黃, 當歸, 甘草, 白茯神, 酸棗仁, 遠志, 人蔘 그리고 蓮肉이 각 등분되어 조제된 처방으로, 생약 90 g에 증류수 500 ㎖을 가한 뒤 한류냉각관이 부착된 전탕기 (heating mantle, HMI-F300, HANA INS.)에서 3시간 끓이고 여과한 후 4℃, 2,500 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 상층액을 rotary evaporator (EYELA N-1000, Japan)에서 70℃, 30 분 동안 감압농축하여 pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22㎛, Whatman. Germany)로 여과하였다.

여과된 黃連淸心飮의 건조중량을 측정하기 위하여 freezer dryer (LABCONCO 77530, USA)에서 완전 건조시킨 후 (회수율 : 13%) 각 실험 조건의 농도에 알맞게 세포배양용 특급 배지 및 멸균된 3차 증류수 그리고 완충용액 등에 희석시켜 실험에 사용하였다 (Table 2).

Table 2. Preparation of the HRC water extracted solution



2. 시약

NaCl, KCl, K_2HPO_4, KH_2PO_4, NaH_2PO_4, Tris-HCl, α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH), linoleic acid, ammonium thiocyanate, diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI-1640 media, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), isopropanol, ethidium bromide (EtBr), magnesium chloride ($MgCl_2$), acetylcholinesterase (AChE), 5,5'-dithio bis-2-nitrobenzonic acid (DTNB), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)는 Sigma사 (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였고, ethyl alcohol anhydrous (EtOH), mthyl alcohol anhydrous (MeOH) 는 Merck사 (Merck KGaA, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 필요한 fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone (Hyclone, U.S.A) 제품을, 그리고 horse serum은 JBI (웰진, 대구, 한국)에서 구입하여 세포 배양을 하였다. agarose, 0.5% trypsin-0.2% EDTA 및 antibiotic-antimycotic은 Gibco사 (Invitrogen Corp. U.S.A)에서 구입하였고, recombinant rat IL-1β는 R & D 사 (R&D Systems, Inc.)로부터 구입하였다. RNA isolation과 cDNA 합성을 위한 Kit (Trizol reagent, ImProm-II Reverse Transcription System)는 Promega 사 (U.S.A) 제품을 사용하였고, ferrous chloride ($FeCl_2$) 포함한 기타 시약은 항산화 활성 및 분자생물학 실험에 쓰이는 특급 시약을 사용하였다.

3. 세포배양

실험에 사용된 갈색세포종 PC-12 cell line 및 rat hepatoma H4IIE 세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양 받았으며, 세포는 각 각 RPMI-1640 배지와 DMEM에서 키웠다. 즉 rat의 adrenal pheochromocytoma인 PC-12 cell은 RPMI-1640, 10% horse serum과 5% fetal bovine serum (FBS)에 penicillin (100 U/㎖), streptomysin (100 ㎍/㎖)을 함유하여 배양하였으며, H4IIE 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% FBS를 함유하여 실험에 사용하였다. 세포의 계대 유지는 tissue culture flask의 70~80% 밀도로 자랐을 때 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 처리하여 1:5 비율로 조정한 뒤 5% CO_2, 37℃ 조건에서 배양하였다.

4. DPPH free radical 소거능 측정

黃連淸心飮의 DPPH radical에 대한 소거활성 (scavenger activity)을 알아보기 위하여 Gyamfi *et al.*[25] 의 방법을 일부 수정하여 본 실험에 사용하였다. 즉 3차 증류수에 녹인 50 ㎕의 농도별 黃連淸心飮 (1, 5, 10, 50, 100, 200, 500 그리고 1,000 ㎍/㎖)을 0.1 mM DPPH-ethanol 용액 1 ㎖과 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 450 ㎕ 첨가하여 교반시킨 후 실온에서 30 분간 반응 시켰다. 黃連淸心飮의 농도별 처리에 따른 DPPH free radical의 환원능력 (reduction)을 구하기 위하여 흡광도 517 nm에서 측정 (UV/VIS spectrophotometer, OPTIZEN II, Korea)하였으며, 본 실험의 양성 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다. 계산 방법은 다음과 같다.

$$\% \text{ inhibition} = [(\text{absorbance of control} - \text{absorbance of test sample}) / \text{absorbance of control}] \times 100$$

5. 지질과산화 반응에 대한 억제

黃連淸心飮이 lipid peroxidation (LPO)에 대한 억제 효과를 알아보기 위하여, ammonium thiocyanate assay[26]를 참고하여 실험하였다. 먼저 기질 용액인 농도별 黃連淸心飮 (0.01 to 2 ㎎/㎖, distilled water) 400 ㎕에 200 ㎕의 linoleic acid (25 ㎎/㎖ 99% EtOH)을 첨가하고, 다시 400 ㎕의 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)을 섞은 후 40℃ 에서 30 분간 반응 시켰다. 반응물 100 ㎕를 3 ㎖의 70 % ethanol이 들어있는 시험관에 분주하고, ammonium thiocyanate (300 ㎎/㎖, distilled water)와 ferrous chloride (2.45 ㎎/㎖, 3.5% HCl)를 각 각 100 ㎕ 씩 첨가하여 발색 반응을 유도하였다. 그리고 실온에서 3 분이 경과한 후 흡광도 500 nm 에서 지질과산화 반응에 대한 黃連淸心飮의 억제 효과를 측정하였다.

6. Hydroxyl radical에 의한 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응 억제

간조직에서의 지질과산화물 함량을 측정하기 위한 실험동물은 체중 140 ± 20 g의 웅성 Sprague Dawley계 흰쥐를 사용하였으며, 실험 시작 전 1 주일간 동물사육 항온항습기 (LS-2105, LS TECH, Korea)에서 일정한 조건 (온도 : 24 ± 2℃, 습도 : 60%)에서 적응 시킨 후 간을 적출하여 실험에 사용하였다. 먼저 적출된 흰쥐의 간 조직에 1.15% KCl 완충용액을 이용하여 perfusion하여 조직 중 혈액을 제거하고, 여러 번 세척 후, 흡습지로 수분을 완전히 제거시켰다. 수분이 제거된 간은 마쇄 (099C-K44, Glas-Col, U.S.A.)한 후, 1.15% KCl 완충용액을 첨가하여 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄 균질액을 7,000×g에서 10분간 원심분리한 후, 침전물을 제외한 상층액을 다시 0.1 M $CaCl_2$ in 0.25 M sucrose에 적당한 용량으로 희석시키고 77,000×g에서 60분간 초원심분리 하였다. 여기에서 형성된 침전물은 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 재현탁하여 microsome 분획으로 보존하고, 상등액은 cytosol 분획으로 분리하여 실험에 사용하였다. 이상의 모든 과정은 과정 중 효소 활성이 일어나는 것을 방지하기 위하여 4℃에서 실시하였다. 지질과산화물의 함량은 Ohkawa의 TBA법[27]에 의하여 측정하였다. 즉 간조직 균질액 7.5 ㎎/㎖과 1 mM $FeCl_2$, 3 mM H_2O_2 그리고 농도별 黃連淸心飮 시료를 혼합하여 최종 부피가 1 ㎖이 되도록 조정한 다음, 37℃에서 10분간 반응시키고 90 ℃ 항온 수조에서 발색반응을 유도시킨 후 500 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

7. Fenton's reagent에 의한 super-coil DNA 분절 억제

Supercoiled pBR322를 이용하여 plasmid DNA를 추출하여 super-coil DNA의 분절 억제 현상을 살펴보았다[28]. 먼저 추출된 0.5 ㎍의 DNA에 Fenton's reagents (30 mM H_2O_2, 0.05 mM ascorbic acid, and 0.08 mM $FeCl_3$)를 첨가하고, 여기에 각 농도별 黃連淸心飮을 처리하여 최종 부피기 20 ㎕가 되도록 조정 하였다. 그리고 혼합물을 37℃에서 30 분 동안 정치시키고 ethidium bromide 염색법에 의하여 1% agarose gel에서 분석하였다.

8. RT-PCR을 이용한 항산화 활성의 측정

역전사 (reverse transcription, RT)에 의한 중합연쇄반응 (polymer chain reaction , PCR)을 이용하여 H4IIE 세포에서 黃連淸心飮의 항산화 활성을 측정하였고 PCR은 ASTEC

(PC 320, Japan)을 사용하였다. 실험에 사용한 total RNA는 Trizol-Reagent를 이용하여 추출하였으며, 6 well plate (Falcon, Becton Dickinson and Company, U.S.A)에 4×10^4 농도로 세포를 seeding 하여 24 hr 이 경과한 후 각기 다른 농도의 黃連淸心飮을 세포에 처리하고, 시료가 세포에 미치는 독성을 평가 (MTT assay[29], data not shown)하여 안정된 범위를 선정하였다. 그리고 농도가 선정 (0.01 to 1.0 ㎎/㎖)된 黃連淸心飮을 H4IIE 세포에 처리하여 catalase activity, rat SOD-1 (superoxide dismutase-1), Mn SOD 그리고 GPx(glutathione peroxidase) 발현 양상을 비교 실험하였다. 각 PCR 생산물 (cDNA)의 분석을 위하여 1.2% agarose gel에 loading 하였고, ethidium bromide staining 방법을 사용하여 분석하였다. 각 실험군의 primer는 다음과 같이 제작하였다.

	sense oligonucleotide 5'-3'	antisense oligonucleotide 5'-3'
① GAPDH	GCCTTCCGTGTTCCTACC	ACTCCTTGGAGGCCATGT
② Catalase	GACTGACCAGGGCATCAA	GCGGTGAGTGTCTGGGTA
③ SOD-1	GGCGTCATTCACTTCGAG	GTACGGCCAATGATGGAA
④ MnSOD	CTGAACGTCACCGAGGAG	CAGGCGGCAATCTGTAAG
⑤ GPx	CCAACGTGGCCTCG	AACTTGGTAAAGTTCCA

9. RT-PCR을 이용한 acetylcholinesterase의 mRNA 발현 분석

6 well plate에 PC-12 세포를 5×10^6의 양으로 분주하고, 24 hr 동안 배양한 후 黃連淸心飮을 각 0.1, 0.5, 그리고 1 ㎎/㎖ 농도로 처리하였다. 1 hr 후 PMA와 rIL-1β (100 ng/㎖)을 가하여 24 시간 동안 배양하였다. 그리고 상등액을 제거한 후 Trizol Reagent을 이용하여 세포막을 터뜨리고, RNA를 회수 하였다. 추출한 mRNA는 20 ㎕의 증류수 (RNase free water)에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

cDNA의 합성에는 ImProm-II Reverse Transcription System Kit를 이용하였으며, 합성된 3 ㎕의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer로 AChE와 G3PDH (glyceraldehyde-3-phophate dehydrogenase)를 제작하였다. PCR은 pre-denaturation, denaturation, annealing 그리고 elongation의 과정을 30 cycle 수행하였으며, 생성된 products은 20 ㎕씩 1.2% agarose gel electrophoresis을 실시하였다.

① rat AChE
sense oligonucleotide : 5'-TCTTTGCTCAGCGACTTA-3'
antisense oligonucleotide : 5'-GTCACAGGTCTGAGCATCT-3'
② rat G3PDH
sense oligonucleotide : 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
antisense oligonucleotide : 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

10. Acetylcholinesterase 효소 활성의 저해 실험

효소활성 저해에 관한 실험은 Ellman's coupled assay[30] 방법을 참조하여 측정하였다. 효소의 반응은 25±0.1℃의 항온수조 (SM01, JEIO Tech., Korea)에서 실행하였으며, 1 ㎖ 용량의 cuvette을 반응조로 사용하였다. 즉, coupling agent (0.2 mM DTNB)

및 黃連淸心飮을 농도별로 섞은 후 항온수조에서 4 분간 반응시키고, 기질 (AChE, 10 unit/10 ㎕)를 즉시 첨가하여 60 초간 정치하여 흡광도 412 nm에서 측정하였다.

11. 실험 결과의 통계 처리

모든 실험은 3 번 실행하고 이를 평균 하였으며, 실험 결과에 대한 통계적 처리 및 분석은 통계 처리 프로그램인 Sigma plot (SigmaPlot 8.0)을 이용하여 student t-test로 구하였다. 모든 data는 평균값과 오차 (meams ± SD)로 나타내었다.

Ⅲ. 實驗結果

1. DPPH free radical 의 소거능 측정

黃連淸心飮의 DPPH radical에 대한 소거활성 (scavenger activity)을 알아보기 위하여 黃連淸心飮 (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200, 500 그리고 1,000 ㎍/㎖)을 처리한 결과, 저농도 (0.1 to 0.5 ㎍/㎖)에서는 억제 효과를 관찰할 수 없었다 (data not shown). 그러나 비교적 높은 농도 (1 to 1000 ㎍/㎖)에서는 농도의 변화에 따른 소거 활성을 관찰할 수 있었으며, 200 ㎍/㎖에서 44.6% 억제를 보였고 이후의 고농도에서는 억제 한계를 나타내어 비슷한 수준 혹은 저하되는 양상을 보였다 (Figure 1.). 양성 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid의 경우에는 1000 ㎍/㎖에서 74%의 높은 DPPH 소거 활성을 나타내었다.

2. 지질과산화 반응에 대한 억제 효과

Lipid peroxidation (LPO)을 저해하는 黃連淸心飮의 효과를 알아보기 위하여, 농도별 黃連淸心飮 (0.01 to 1 ㎎/㎖) 처리하였을 때, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 그리고 1 ㎎/㎖의 농도에서 각 각 9, 10, 13, 23, 31 그리고 33 %의 억제 효율을 구할 수 있었다 (Figure 2).

3. H2O2-Fe^{2+}계에 의한 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응 억제 효과

黃連淸心飮이 간조직 유도한 H_2O_2-Fe^{2+} system 지질과산화 반응을 억제하는 효과를 관찰한 결과 HRC 무처리군을 대조하여 간조직에서의 지질과산화물 함량이 억제 되는 경향을 관찰하였다. 즉, 黃連淸心飮 0.01 에서 1 ㎎/㎖ 농도까지 각 5, 8, 25, 45 그리고 88%의 지질과산화물 생성 억제 효과를 나타내었다 (Figure 3.)

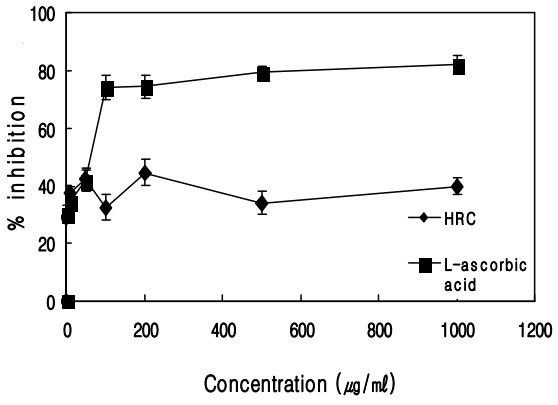


Figure 1. Free radical scavenging activity of HRC water extract measured using the DPPH assay. The direct scavenging activity of HRC extract and ascorbic acid on DPPH radicals is expressed as the % inhibition. The concentrations tested ranged from 1 to 1000 ㎍/㎖. The results are the means of three separate experiments.

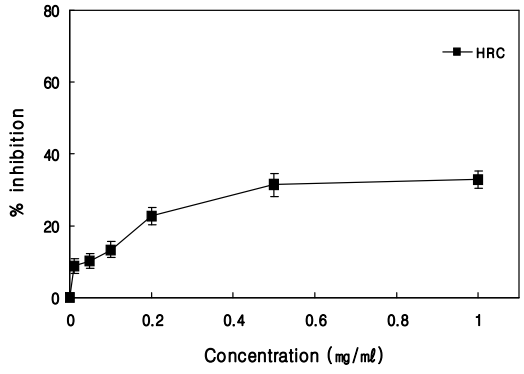


Figure 2. Inhibitory effects of HRC water extract on hydroxyl radical-mediated linoleic acid oxidation. Hydro radicals were generated by Fenton's reaction using an ammonium thiocynate assay system, and the scavenging of hydroxyl radical by HRC extract is expressed as the % inhibition. The concentration of HRC extract tested ranged from 0.01 to 1 ㎎/㎖. The results are the means of three separate experiments.

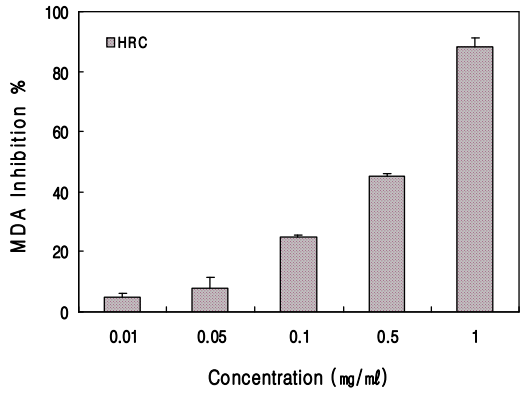


Figure 3. Inhibitory effects of HRC water extract on H2O2-FeCl2+ system -mediated lipid peroxidation. Hydroxyl radicals were generated by Fenton's reaction using a H2O2-FeCl2+ assay system and the scavenging of hydroxyl radical by HRC extract is expressed as the % inhibition. The concentration of HRC samples tested ranged from 0.01 to 1 0.01 to 1 ㎎/㎖. The results are the means of three separate experiments.

4. Fenton's reagent에 의한 super-coil DNA 분절 억제 효과

Supercoiled pBR322를 이용하여 plasmid DNA를 추출하고, 여기에 黃連淸心飮을 농도별 (5 to 20 ㎍)로 처리하여 DNA의 분절을 억제하는 효과를 관찰하였다 (Figure 4.). 먼저 Fenton's reagent에 의한 시간 의존적 (time-dependent) 분절 양상을 관찰한 결과 30 분이 경과하였을 때, 분절 양상이 활발하게 진행 (Form III 형성)되고 있음을 알 수 있었다. 그리고 1 시간을 반응한 경우에는 supercoiled DNA가 완전한 분절을 진행시켜 전체적으로 완전한 form II를 형성하였다 (A). 이러한 결과를 근거로 본 실험에서는 반응 시간을 30 분으로 결정하고, 각 농도별 黃連淸心飮을 처리하여 분절 억제 효과를 관찰한 결과 (B) 정상군은 form I이 형성 (B lane 1)되었고, 대조군 (control)인 Fenton's reagent 처리군은 form II 그리고 III가 대체적으로 높게 발현 되었으며, 시료가 처리된 경우 (B lane 2, 3 and 4)는 form II과 III가 점차로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

5. RT-PCR을 이용한 항산화 활성의 측정

RT-PCR을 이용하여 黃連淸心飮이 catalase activity, rat SOD-1, Mn SOD 그리고 GPx(glutathione peroxidase) 발현 양상을 비교한 결과 (Figure 5.) catalase 활성은 HRC 처리군의 농도에 따라 점차 증가하는 양상이 관찰 되었으며, rat SOD-1와 Mn SOD 경우에는 농도에 비의존적으로 발현을 유지하는 모습을 나타내었다. GPx는 黃連淸心飮을 처리한 농도에 따라 발현이 조금씩 증가되는 추세를 보였다. 활성 대조군으로 사용한 G3PDH는 黃連淸心飮의 처리 농도에 관계없이 일정한 수준으로 발현을 유지하는 것이 관찰되었다.

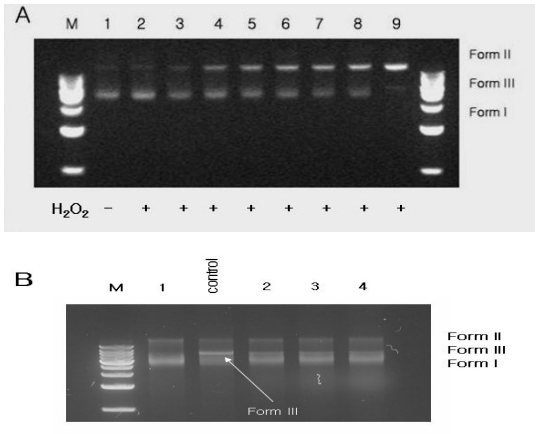


Figure 4. Inhibitory effects of HRC water extract on DNA nicking caused by hydroxyl radicals. The DNA nicking reaction was initiated by the addition of 0.5 mg of pBR322 plasmid DNA. The reaction mixture was then incubated at 37℃.
(A) Lanes 2 through 9 represent the results from the mixture incubated for 0, 5, 10, 20, 30, 45, 50 and 60 min, respectively. Lanes M and 1 show the size maker and native plasmid DNA, respectively.
(B) Lanes M and 1 show the size maker and native plasmid DNA, respectively. Lanes 2, 3 and 4 show the HRC samples treated range from 0.01 to 1 ㎎/㎖.

Form I : Supercoiled DNA
Form II : Single strand nicking form
Form III : Double strand nicking form

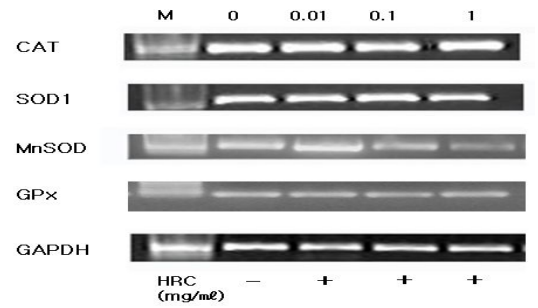


Figure 5. Catalase (CAT), superoxide dismutase-1 (SOD1), manganese superoxide dismutase (MnSOD) and glutathion peroxidase (GPx) mRNA expression in H4IIE cells after HRC exposure. A PCR blot of CAT, SOD1, MnSOD, G3PDH mRNAs obtained by RT-PCR after exposure of H4IIE cells to indicated concentrations of HRC for 24 hrs.

6. RT-PCR을 이용한 acetylcholinesterase의 mRNA 발현 저해 효과

AChe mRNA의 발현에 있어서 AChE 유도제를 처리하지 않은 정상군 (media)에서는 발현양이 거의 관찰되지 않았다. 그러나 유도제를 처리한 대조군 (rIL-1β+PMA)에서는 많은 양의 AChE 발현이 일어났으며, 黃連淸心飮에 의한 mRNA 발현 저해 효과를 관찰하기 위하여 농도별 HRC (0.1 to 1 ㎎/㎖)를 처리한 결과 점차로 AChE의 mRNA 양이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 6.) G3PDH는 정상적인 발현을 유지 하였다.

7. Acetylcholinesterase 효소 활성의 저해 효과

Ellman's coupled assay 방법을 이용하여 AChE 효소의 활성 저해 효과를 관찰해 보았다. 전기뱀장어에서 추출 정제된 acetylcholinesterase을 기질로 사용하여 저해 효과를 측정한 결과, 黃連淸心飮을 농도별 (0.025 to 0.4 ㎎/㎖)로 처리하였을 때 활성 대조군에 비하여 50, 51, 80, 97, 97, 92 그리고 83%의 결과를 얻을 수 있었다 (Figure 7.). 즉, 1 ㎎/㎖의 농도에서 최고 97%의 억제를 기록하였으므로 매우 높은 저해 활성을 검증할 수 있었다.

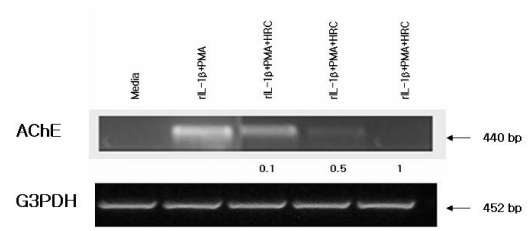


Figure 6. Inhibitory effects of HRC water extract on AChE mRNA expression in PC-12 cells cultures after treatment with PMA and IL-1β. PC-12 cells were pretreated with various concentration of HRC water extract in the presence or absence rIL-1β and PMA (100 ng/㎖) for 24 hrs.

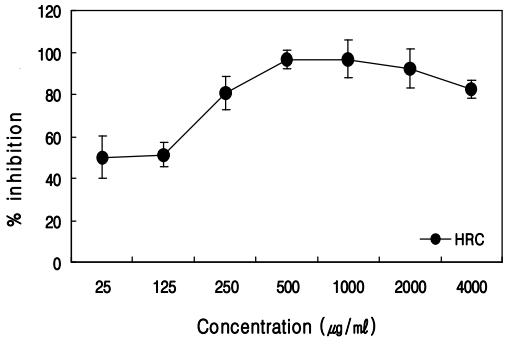


Figure 7. Inhibitory effects of HRC water extract on acetylcholinesterase- mediated AChE activity. The concentration of HRC samples tested ranged from 0.025 to 0.4 ㎎/㎖. Values are expressed as the percentage of controls (means ± S.D). The results are the means of three separate experiments.

Ⅳ. 考 察

치매에 대한 최초의 한의학적 記載는 張景岳의『景岳全書』에서 “痴呆症, 凡平素無痰, 而或以鬱結, 或以不遂, 或以思慮, 或以疑貳, 或以驚恐, 以漸致痴呆 ...” [31]라 하여 “痴呆”로 나왔으며, 陳士澤은 『石室秘錄』에서 “呆病如癲而默默不言, 如餓而悠悠若失, 意欲癲而不能, 心欲狂而不敢...” [32]라 하여 현대의학의 치매의 개념과 유사한 개념으로 “呆病”에 대해 상세히 서술하고 있다. 또한 黃帝內經을 비롯하여 많은 歷代醫書에서도 “痴呆”나 “呆病”의 명칭은 없으나 “健忘” 등의 언급에서 유사한 증상을 제시하고 있으며, 그 주요증상은 神志淡漠, 寡言少語, 遲鈍, 健忘, 終日不語, 閉戶獨處, 言辭顚倒, 忽笑忽哭등이다[33]. 현재 치매는 呆病과 健忘을 근거로 辨證되며, 원인으로 肝腎不足 心腎不交 痰飮 瘀血 七情傷 등을 들어, 補益肝腎 滋陰養血 健脾養心 活血化瘀通竅 開竅割痰의 방법으로 치료하고 있다[34]. 치매의 기억을 포함하는 인지기능의 관점에서 특히 神이 중요한 위치를 차지 하고 있는데, 內經에서는 기본적으로 心을 중심으로 한 五臟이 정신활동의 원천이며 “心者 君主之官 神明出焉”, “心者 神之舍也 心者五臟六腑之大主也 精神之所舍也” [35]라 하여 인간의 정신, 의식, 사유활동을 의미하는 神이 心에서 나오는 것으로 보았으며, 치매에서 인지기능의 장애뿐만 아니라 자주 화를 내거나, 불안, 초조, 우울감, 망상, 수면장애 등 정서적 문제가 나타난다는 점에서[36] 心으로 歸經하는 寧神安神하는 약들이 중요하리라 생각된다.

黃連淸心飮은 『醫學入門』에서 처음 나온 처방으로, “治心有所慕而遺者.” [13]라 하여 ‘마음에 사모하는 바가 있어서 遺精하는 바를 치료한다’ 하였다. 처방구성 약물은 黃連 生地黃 當歸 甘草 茯神 酸棗仁 遠志 人蔘 蓮肉으로, 이 처방의 主藥인 黃連은 항산화활성을 높이고[14], 치매의 원인인 AChE의 저해활성이 높다는 것[15-16]이 실험으로 검증되었고, 白茯神은 心虛로 인한 驚悸健忘과 不眠驚癎을 치료하며 開心益智하여 精神을 養하는데 응용하고, 遠志는 寧神安神, 祛痰利竅하여 心腎을 交通케 하는 효능이 있으며, 痰濕이 去하게 되므로 心腎이 交通되어 安神益智의 효능이 있고, 蓮子肉은 腎經에 들어가 益腎固精시키며, 心經에 들어가 養神安神시키는 효능이 있어 心悸失眠을 치료하며, 酸棗仁은 寧神安神하여 心神을 失養하게 되고 虛火가 妄動하여 陰液이 外泄하므로 나타나는 虛煩失眠과 心季汗多의 증에 상용하는 要藥이 된다[17]. 위의 약은 모두 心經으로 歸經하여 寧神安神의 효능으로 노화나 치매에서 나타나는 인지기능장애, 健忘, 失眠, 성격변화등에 널리 쓰이는 약이다. 그러므로 黃連淸心飮이 遺精뿐만 아니라 노화나 치매 등에서 나타나는 여러 정신적, 인지기능의 문제에 응용가능하리라고 생각되며, 이는 특히 현재 양의학의 약물요법이 인지적 증상과 정서적 증상에 따로 사용되고, 서로 부작용이 발생할 수

있다는 점에서 중요하다고 할 수 있다[36].

노화란 생명체의 성장과 동시에 진행되는 일련의 반응으로서 생명체의 발육, 성장, 성숙과 쇠퇴의 생물학적 과정에서 행태적 기능적 퇴축, 예비력과 적응력의 저하로 사망에 귀착되는 보편적인 생리현상을 말한다. 노화의 원인설로는 생물학적, 생화학적, 생리학적 및 형태학적 원인설 등이 있는데, 이 중 생화학적 원인설의 하나인 free radical theory가 유력시되고 있다[37-38].

활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 혹은 프리래디컬 (free radicals)은 생체의 정상적 대사과정에서 생성되며, 또한 자외선, 방사선, 흡연, 각 종 약물, 그리고 음주 등 외부환경적 요인에 의하여 발생한다[39]. 체내에서 발생되는 활성산소종(ROS)에는 superoxide radical (O_2^-), hydroxyl radical (HO^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) 등이 잘 알려져 있는데, 이들 활성 산소종 (ROS)은 주위에 전자를 하나 잃거나 전자를 하나 더 얻어 안정한 상태로 가려는 성질을 가지므로 높은 반응성을 갖는다. 이러한 활성산소는 주로 세포막의 불포화지방산들과 결합하여 지질과산화 (lipid peroxidation) 반응을 일으키며, 세포 내의 거대분자들과 반응하여 세포의 산화적 손상 (oxidative damage)을 야기함과 동시에 노화의 주요 원인이 된다고 알려져 있다[40]. 또한 이러한 과산화물의 연속반응에 의하여 DNA를 손상시키거나 암을 유발하는 경우도 있으며, 세포막 형성의 불능이나 파괴를 일으켜 뇌졸중, 동맥경화 같은 심혈관 질환, 류마티스 같은 만성염증 질환, 호흡기 질환, 자가면역 질환 등 여러 가지 질병을 유발하고, 노화와 치매에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[3-4]. 따라서 유지의 산화 속도를 억제하는 물질인 항산화제의 개발은 인간을 질병으로부터 벗어나는데 기여할 수 있으리라 보고 있다. 특히 이러한 항산화제에 관한 연구가 최근 급속도로 이루어지고 있으나, 화학적 복합물로 조합된 경우 각 종 부작용이 잇따르고 있다. 따라서 경구 투여 시 다른 부작용이 발생하지 않고, 항산화 효과가 우수한 식물자원 및 한약에서 이러한 물질을 연구하고자 하는 움직임이 다양하게 전개 되고 있다. 이러한 연구의 일환으로 본 논문에서는 黃連淸心飮이 항산화 활성에 미치는 영향을 검토한 결과 세포내 프리래디컬인 DPPH를 소거 하였다(Fig. 1). 또한, 지질과산화 반응을 억제하는 효과를 알아보기 위하여 농도별 시료를 처리한 결과 1mg/ml의 농도에서 33%의 억제 효과를 나타내었고, 자동산화계의 반응에 의한 흰쥐의 간조직에서 黃連淸心飮은 농도에 의존적인 지질과산화를 억제하는 경향을 나타내었다(Fig. 2,3). Super-coil DNA인 pBR322는 외부로부터의 산화적 stress에 의하여 nickng (분절)되는 양상을 나타낸다. 즉 Fenton's reagent에 의하여 강제 분절을 유도하였을 때 Form II 및 III가 강력하게 발현되었으나, 黃連淸心飮을 처리하였을 경우 DNA nicking 현상이 점차로 방어되는 양상 (Form I 형성)을 관찰할 수 있었다. 이는 黃連淸心飮이 산화적 stress로부터 DNA의 분절을 강력하게 억제하는 것으로 판단된다(Fig. 4). 그리고 유해한 프리래디컬을 소거 혹은 무해한 환경으로 바꾸어주는 역할을 하는 CAT의 활성을 증가시키는 양상이 mRNA 수준에서 측정 되었다. 이는 이미 黃連이 항산화 활성을 가지고 있다고 연구 된 바 있는 김[14]의 보고와도 일치하는 결과이며, Rat SOD-1와 MnSOD 경우에는 농도에 비의존적으로 발현을 유지하는 모습을 나타내었으므로 catalase와는 다른 기작에 의한 항상화 능력을 보유하고 있다고 생각된다. GPx는 黃連淸心飮을 처리한 농도에 따라 발현이 조금씩 증가되는 추세를 보였다(Fig. 5). 이러한 결과를 통하여 黃連淸心飮은 활성산소와 지질과산화를 억제하는 것을 알 수 있었으며, 더욱 명확한 기전을 알기 위하여 다양한 분자생물학적 연구수행을 병행해야 한다고 생각된다.

알쯔하이머병은 치매를 유발하는 가장 중요

한 원인 질환가운데 하나로서 전체 노인성 치매환자의 약 절반 이상을 차지한다. 이는 노인에서 흔히 관찰되는 진행성의 퇴행성 뇌질환으로서 신피질 위축, 신경세포와 시냅스의 소실, 세포밖에 침착되는 노인반 및 세포 내에 축적되는 신경섬유 덩어리 등의 신경병리소견이 특징적으로 관찰된다. 이에 동반되는 가장 두드러진 임상양상은 현저한 치매증상인데 서서히 진행되는 기억장애, 언어장애, 수행기능 저하, 집중력 감퇴, 시공간 지각능력 및 구성능력 소실 등 다발성 인지기능 장애와 다양한 정도의 행동양상이 복합적으로 나타나는 전형적인 임상경과를 취하며 말기에는 독립적인 일상생활을 유지하기가 어렵게 된다[41]. 알쯔하이머병 환자의 기억력이나 계산능력 등의 인지기능을 개선시키기 위하여 현재까지 여러 치료제가 연구, 개발되고 있는데 대부분은 원인 치료제가 아닌 병의 진행을 느리게 하고 증상을 호전시키는 약제들이다. 알쯔하이머병이 진행되면 뇌 속에서 여러 가지 신경전달물질의 변화가 일어나는데, 그 중에서도 인지기능과 가장 관계가 깊은 물질은 아세틸콜린이다. 알쯔하이머병에서 아세틸콜린 기능이 떨어진 여러 증거들이 있는데, 뇌 속의 아세틸콜린의 양이 정상인에 비해서 많이 떨어져 있고, 콜린성 신경세포의 숫자가 감소하고, 신경세포 표면의 니코틴 수용체의 기능도 떨어진다. 한편 콜린성 신경세포의 콜린 흡수와 아세틸콜린의 분비 능력도 떨어진다고 한다. 콜린성 신경세포 수의 감소 정도와 아세틸콜린의 감소가 환자의 인지기능 저하 정도와 관계 깊은 것으로 알려져 있고, 정상인에서도 항콜린성 약제를 투여하면 부작용으로 집중력, 기억력이 떨어진다고 밝혀져 아세틸콜린의 인지기능에 중요한 역할을 함을 알 수 있다[9]. 한편, 산화적 손상에 의해서도 알쯔하이머병이 유발된다는 다양한 증거들도 제시되고 있다[10-12]. 이러한 알쯔하이머병의 1차적 증상인 기억력, 인지력 감퇴현상은 acetylcholine을 만들어내는 신경세포의 퇴화와 함께 AChE의 증가로 더욱 심화된다고 알려져 있는데[7-8], 이에 대한 처치 방법으로 가장 유력한 것이 아세틸콜린 분해효소(AChE)를 억제시키는 것이다. 따라서 黃連淸心飮이 아세틸콜린의 양을 증가시키거나 혹은 AChE를 감퇴시키는 경향을 분석하기 위하여 먼저 갈색세포종 신경세포인 PC-12 cell line 에서 다양한 유도물질 (PMA, rat recombinant IL-1β)을 처리하고 이들의 total RNA를 확보하여, 이중 AChE mRNA의 발현 양상을 측정하였더니 많은 양의 전사체가 유도 되었다. 그러나 黃連淸心飮을 농도별로 처리하여 AChE의 발현 양상을 관찰한 결과 농도 의존적으로 메신져 리보핵산 (mRNA)의 발현을 억제하는 것이 발견 되었다(Fig. 6,7). 따라서 黃連淸心飮은 치매 및 알츠하이머 병을 유도한다고 알려져 있는 AChE의 억제를 강력하게 나타낸 다고 확신 할 수 있었다. 이러한 결과를 얻기에 앞서 黃連淸心飮이 갈색세포종에 대한 독성 실험을 수행한 결과에서도 黃連淸心飮은 미약한 수준의 세포 손상을 나타내었으므로 (data not shown) AChE의 활성을 저해하는 우수한 약물임이 검증 되었다. 또한 세포 내 RNA 활성에 관한 내용을 *in vitro*에서 검증하기 위하여 Ellman's coupled assay[30]을 참고하여 연구를 수행한 결과 이를 뒷받침 해줄 AChE 활성 저해가 관찰되었다. 이는 김[16]의 연구 등에서 다양한 생약 추출물 중 黃連이 77%의 높은 AChE 억제를 나타내었다는 결과를 근거하였을 때 복합 처방인 黃連淸心飮 또한 AChE를 강력하게 억제한다는 것이 증명된 결과 이다. 한편 이러한 黃連 단일 물질을 활성유도분획법에 따라 그 활성 성분을 추적 분석한 결과에서는 黃連의 alkaloid 성분인 berberine, coptisine 등의 protoberberine계 성분들이 AChE에 대하여 강력한 저해 효과를 나타낸다고 보고[42] 된바 있다. 이러한 protoberberine계 alkaloid는 muscarin 성 ACh 수용체 M1 subtype에 대하여 강력한 친

화력을 가진바 AChE에 대하여도 강한 저해 효과를 보여 준다는 사실에 관점을 두었을 때, ACh와 AChE는 긴밀한 상호 구조적 관련성을 나타낸다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서 사용된 黃連淸心飮의 경우에도 위와 같은 黃連의 우수한 약리작용과 첨가 복합물의 상호 작용에 의하여 AChE 저해 활성을 높이는 결과를 발견하였다.

본 연구를 통하여 黃連淸心飮이 항산화 활성에 미치는 영향이 우수하고, 매우 높은 AChE 저해 효과가 발견된 것을 근거로 향후 알쯔하이머형 치매질환에 대한 치료 효능에 가치가 있을 것으로 생각된다. 특히 이러한 생약물을 통한 항산화 및 AChE 의존성 치매 약물 개발은 전세계적으로 가장 많이 시도되고 있는 방법인 만큼 차후 southern 및 northern blot 과 면역반응 방법 등을 동원하여 黃連淸心飮의 항산화 활성 및 AChE 억제에 의한 치매 예방 및 방지 효과의 기전을 보다 명확하게 증명하여야 한다고 생각된다.

V. 結 論

黃連淸心飮을 열수추출으로 탕을 만든 후 이를 완전 건조하여 항산화 및 AChE 저해 효과를 관찰하여 보았다. 항산화에 관련된 실험은 DPPH radical의 소거능을 측정하고, 지질과산화 및 흰쥐의 간조직에서 H_2O_2-$FeCl^{2+}$계에 의한 hydroxyl radical 억제 효과를 검증하였으며, 또한 supercoiled DNA의 nicking을 저해하고 항산화 효소 발현 변화 기작을 분자생물학적 수준에서 살펴보았다. 그리고 黃連淸心飮이 치매를 유발하는 것에 관련된 AChE의 저해 활성을 mRNA 수준을 통하여 분석하였으며, 뱀장어에서 정제된 AChE 기질을 이용하여 효소저해 활성을 관찰하였다.

1. 黃連淸心飮을 농도별로 처리하여 DPPH free radical의 저해 활성을 검토한 결과 무처리군에 비하여 농도의존적으로 자유기 소거능을 보였다. 그러나 일반적으로 DPPH 저해 활성에 널리 쓰이는 L-ascorbic acid에 비하여 높은 소거능은 나타내지 않았다.

2. 黃連淸心飮이 지질과산화 반응을 억제하는 효과를 알아보기 위하여 농도별 시료를 처리한 결과 1 ㎎/㎖의 농도에서 33 %의 억제 효율을 나타내었다.

3. H_2O_2-Fe^{2+}계에 의한 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응을 억제하기 위하여 黃連淸心飮을 처리한 결과, 대조군에 비하여 간조직에서의 지질과산화물 함량이 억제 되었음을 알 수 있었다. 특히 黃連淸心飮은 처리 농도에 의존적으로 높은 반응 억제를 나타내었다.

4. Fenton's reagent에 의하여 Super-coil DNA의 강제 분절을 유도하였을 때 Form II 및 III가 강력하게 발현되었으나, 黃連淸心飮을 처리하였을 경우 DNA nicking 현상이 점차로 방어되는 양상 (Form I 형성)을 관찰할 수 있었다.

5. RT-PCR (reverse transcription - polymer chain reaction)을 이용한 항산화 활성의 측정의 방법 중 catalase activity, rat SOD-1, MnSOD 그리고 glutathione peroxidase (GPx) 발현 양상을 비교한 결과 黃連淸心飮은 catalase 활성을 점차로 증가 시켰으며, Rat SOD-1와 MnSOD 경우에는 농도에 비의존적으로 발현을 유지하는 모습을 나타내었고, GPx는 黃連淸心飮을 처리한 농도에 따라 발현이 조금씩 증가되는 추세를 보였다.

6. Acetylcholinesterase의 mRNA 발현은 黃連淸心飮에 의하여 저해 되는 것을 관찰할 수가 있었다. 특히 시료의 농도에 의존하여 AChE 발현이 강력하게 억제되었다.

7. 전기뱀장어에서 추출 정제된 acetylcholinesterase을 기질로 사용하여 Ellman's coupled assay를 통한 AChE 효소의 활성 저해 효과를 관찰한 결과 黃連淸心飮은 AChE를 강력하게 저해하는 효과를 나타내었다.

이상으로 黃連淸心飮은 항산화 효과에 있어 자유기 소거 능력이 있고, 또한 지질과산화를 억제하는 것을 관찰되었다. 특히 AChE 저해 활성을 통하여 黃連淸心飮의 약리 효과를 살펴본 결과 알쯔하이머형 치매 유발의 위험성을 저해하는 효과가 높을 것으로 기대된다.

參 考 文 獻

1. 김민경. 통계로 보는 한국의 모습. 통계청. 2000, pp. 33-34.
2. 김미정. 노인의 항산화 영양상태와 만성질환 및 면역기능과의 관련성 연구. 서울여자대학교 박사학위논문. 2003.
3. 김문일. 상지의 성분 및 항산화 효과. 충남대학교 박사학위논문. 2002.
4. 金永坤, 金永杓. 프리라디칼. 서울:麗文閣. 1997, pp. 240-320.
5. 오병훈. 치매(Dementia). 서울:무지개사. 2002, pp. 22-23.
6. 민성길. 최신정신의학. 서울:일조각. 2001, pp. 191-192.
7. Kuhl D. E., Koeppe R. A., Minoshima S., Snyder S. E., Ficaro E.P., Foster N. L., Frey K. A., and Kilbourn M. R. In vivo mapping of cerebral acetylcholi-nesterase activity in aging and Alzheimer's disease. Neurology. 1999, 52, 691-99.
8. Costagli C., and Galli A. Inhibition of cholinesterase-associated aryl acylamidase activity by anticholinesterase agents; focus on drugs potentially effective in Alzheimer's disease. Biochem Pharmacol. 1998, 55, 1733-7.
9. 양동원. 알쯔하이머병의 치료약제. 대한의사협회지. 2002, 45, 401-408.
10. Casadesus G., Smith M. A., Zhu X., Aliev G., Cash A. D., Honda K., Petersen R. B., and Perry G. Alzheimer disease: evidence for a central pathogenic role of iron-mediated reactive oxygen species. J. Alzheimers Dis. 2004, 6, 165-9.
11. Vina J., Lloret A., Orti R., and Alonso D. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. Mol Aspects Med. 2004, 25, 117-23.
12. Veurink G., Fuller S. J., Atwood C. S., and Martins R. N. Genetics, lifestyle and the roles of amyloid beta and oxidative stress in Alzheimer's disease. Ann Hum Biol. 2003, 30, 639-67.
13. 李梴. 國譯 篇註醫學入門 Ⅳ. 서울:남산당. 1988, pp 755-756.
14. Kim Y. J., Lee M. J., Park J. W., Kim J. K., Choi D. Y., and Kim C. H Antioxidant Activity of Water-Extract from Coptis chinensis Franch. Kor. J.

of Life Sci. 2000, 3, 241-246.
15. 朴智雲, 鄭仁哲, 李相龍. 日黃連이 痴呆病態모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2004, 15, 87-99.
16. 김정섭, 김영섭, 김성기, 허정희, 이봉호, 최병욱, 유건식, 박은경, 지옥표, 유시용. 생약추출물의 acetylcholinesterase (AChE) 저해활성검색. 생약학회지. 2002, 33, 211-218.
17. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사. 1995, p303, p494, p496, p624.
18. 문성식, 김병수, 강정수. 六味地黃湯의 항산화작용에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2003, 17, 436-442.
19. 정용준, 장재호, 이대용, 이민구, 전인철, 정대영, 이인, 신선호, 문병순. 혈관내피세포의 산화적 손상에 대한 地黃飮子의 방어기전 연구. 대한한의학회지. 2004, 25, 173-183
20. 김도환, 김승모, 조한국, 차용석, 허윤, 문병순, 조광호. Nitric Oxide에 의해 유발된 C6 glial 細胞毒性에 대한 四物湯의 防禦效果. 대한한방내과학회지. 2000, 21, 535-542.
21. 안성훈, 구성태, 김선영, 김경식, 손인철. H2O2로 유발된 뇌신경세포 상해에 대한 구진의 보호효과. 대한침구학회지. 2004, 21, 29-41.
22. 이상룡, 김보경. 安神淸腦湯이 Alzheimer's Disease 병태 모델의 생화학적 변화 및 기억에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001, 15, 718-722.
23. 김현수, 정인철, 이상룡. 巴戟天이 痴呆病態모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2003, 14, 45-58.
24. 문성수, 이상룡. 加減補陽還五湯이 생쥐의 學習과 記憶의 減退 및 Acetylcholinesterase의 抑制에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2000, 11, 19-36.
25. Gyamfi M. A., Yonamine M., and Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: Thonningia sanguinea on experimentally- induced liver injuries. Gen. Pharmacol. 1999, 32, 661-667.
26. Takao T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A., and Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1994, 58, 1780-1783.
27. Ohkawa H., Ohishi N., and Yagi K. Assay for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochem. 1978, 95, 351-358.
28. Lee J. C., Kim H. R., Kim J., and Jang Y. S. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of Opuntia ficus-indica var. Saboten. J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 6490-6496.
29. Sladowski D., Steer S. J., Clothier R. H., and Balls M. An improved MTT assay. J. Immun. Methods. 1993, 157, 203-207.
30. Ellman G. L., Coutney K. D., Andres V., and Featherstone R. M. A new and rapid colorimetric determination acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 1961, 7, 88-95.
31. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978, pp. 610-611.
32. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984,

p102.
33. 정인철, 이상룡. 痴呆에 대한 文獻的 考察. 동의신경정신과학회지. 1996, 7, 77-94.
34. 이동원, 신길조, 이원철. 痴呆의 치료에 관한 동서의학적 고찰. 동국대학교 한의학연구소 논문집. 1995, 5, 67-80.
35. 楊維傑編. 黃帝內經譯解(素問,靈樞). 서울: 成輔社. 1980, p76, p488.
36. 한경희 外 9명. 노인성 치매 연구. 서울: 敎文社. 2002, p34, p44.
37. 최진호. 노화의 메카니즘과 연구방향. 생화학뉴스. 한국생화학회. 1997, 5, 39-53.
38. 김숙희, 김화영. 노화. 서울:민음사. 1995, pp. 83-85.
39. Ames B. N., Cahcart R., Schwiers E., and Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer. A Hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 1981, 78, 6858-6862.
40. Aruoma O. I., Kaur H., and Halliwell B. Oxygen free radicals and human diease. J. Roy. Soc. Health. 1991, 111, 172-177.
41. 한설희. 알쯔하이머병의 분자유전학적 병인. 대한의사협회지. 2002, 45, 378-384.
42. Kim J. S., Choi B. W., Lee B. H., Kim S. K., Heor J. H., Kim Y. S., Zee O. P., and Ryu S. Y. Inhibitory effect of protoberberine alkaloids from Coptisis Rizoma upon acetylcholinesterase (AchE). Kor. Phama. Soc. 50 th Conv. 2001.