동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 17. No. 2, 2006

天王補心丹과 單味들이 Hypoxia-Reoxygenation에 의해 손상받은 Mouse Neuroblastoma 2a Cells에미치는 影響

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

The effects of Chenwangbosim-Dan and herbs on Mouse neuroblastoma 2a cells damaged by hypoxia-reoxygenation

Sang Ho Kim, 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*

Absrtact

Objective : This study was designed to assess effect of and Chenwangbosim-Dan(CWBSD) 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 CWBSD and herbs.

Result :

1. In MTT assay of hypoxia CWBSD and BJI, SJH , IS, CHR, HS among all of herbs were effective. Especially CWBSD and IS were highly effective.
2. In MTT assay of reoxygenation SJI, SJH, YJ, IS, BJI were effective. Especially SJI, SJH, YJ were highly effective.
3. In LDH assay of hypoxia CWBSD, DS, DG, SJH, OMZ were effective. Especially CWBSD, DG were highly effective.
4. In LDH assay of reoxygenation all of herbs except CWBSD and BJI were generally effective. Especially CHR, SJH, YJ, OMZ, HS were highly effective.

Conclusion : The results suggest that CWBSD, and it's ingradient(especially SJH, CHR and SJI) may have protective effect on condition of oxidative stress.

Key Words : Chenwangbosim-Dan, oxidative stress, hypoxia-reoxygenation

◆투고일: 6/28, 수정일: 7/13, 채택일: 7/14
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

노인인구의 급격한 증가[1]와 이에 따른 치매환자의 급증[2]으로 인해 노인질환을 예방할 수 있는 노화의 치료 및 예방 방법에 대한 관심이 집중되고 있다. 최근에는 산화적 손상의 축적으로 인해 노화현상으로 나타난다는 '활성산소설'이 많은 관심을 얻고 있다. 활성산소설은 또한 치매의 대표적인 질환인 알츠하이머병을 일으키는 원인으로도 주목받고 있으며 이에 따른 많은 연구가 이뤄지고 있다[3].

이러한 활성산소설에 근거하여 노화의 방지 및 치매치료에 사용될 항산화제 개발을 위한 다양한 연구가 이루어지고 있다. 그러나 현재까지의 진행된 노화방지를 위한 다양한 항산화제 실험은 항노화효과를 밝히는데 실패하였고 실험결과는 재현성이 떨어진다[4]. 또한 치매치료제 개발을 위해 항산화제의 많은 임상실험이 진행중인데 Vit. E(α-tocopherol)는 동물실험에서 해마신경의 퇴화를 줄이고 사람에서는 알츠하이머병의 진행 속도를 줄여준다고 하지만 임상시험에서는 아직 그 효과가 증명되지 못했다[5,6]. 그리고 다른 항산화제인 ginkgo biloba, Vit C, selegiline, nicergoline의 효과는 별무효과에서부터 알츠하이머병의 진행속도를 줄여준다고까지 보고하여 일치하지 않는 결과를 보인다[5,7-8].

한편 한약을 이용한 항산화관련연구가 활발하게 이뤄졌다. 복합처방에 관한 연구로는 左歸飮과 右歸飮[9], 六味地黃湯[10], 補中益氣湯[11] 補脾湯[12], 淸肺瀉肝湯[13], 健腦湯[14], 聰明湯[15], 烏藥順氣散[16], 加味地黃丸[17], 淸心蓮子湯[18], 荊防地黃湯[19], 加味六味地黃湯[20], 防風當歸飮[21], 蘇合香元[22], 小續命湯[23], 五子地黃飮子[24] 등이 유효한 효과가 있다는 보고가 있다. 단미로는 白殭蠶[25], 葛花[26], 鬱金[26], 苦蔘[26], 白芷[13], 厚朴[13], 桔梗[13], 杜冲[14], 大棗[14], 蟾蜍[27] 의 항산화효과에 대한 보고가 있다. 또한 藥針製劑[28,29]등을 활용하여 한약물의 항산화 효과를 증명한 연구들, 그리고 이들 항산화 관련논문들을 검색하여 고찰한 연구도 있다[30].

본 실험에 사용된 天王補心丹은 神氣를 補하여 잊어버리지 않게 하며 마음을 편안하게 하고 怔忡症을 없애고 驚悸症을 멎게 하며 心身을 좋게 하는 대표적인 처방이다[31]. 天王補心丹에 대하여 정상 생쥐의 mLFC와 PC-12 cell에 대한 실험결과, 항콜린작용과 PS-1, PS-2 및 APP 과도발현 억제능력을 보이는 것으로 나타나 알츠하이머병 치료의 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 보인다고 보고되었으며[32], 동물실험을 통한 약리작용으로는 중추신경억제, 혈관확장, 혈압강하, 이뇨작용이 보고되었다[33].

본 실험에서는 한약물의 항산화능력을 확인하기 위한 세포주로서 Neuroblastoma를 사용하였다. Neuroblastoma는 산화적 스트레스에 의한 신경세포손상에 대한 연구[38,39]와 치매에 대한 약물의 효과연구[34]에 이용되고 있으며, 세포에 hypoxia를 유발할 경우 조직의 hypoxia와 유사한 생화학적 반응이 예상되며[35], reoxygenation을 유발할 경우 free radical에 의한 손상이 야기되어[36] 동물실험에서의 虛血後 再灌流의 손상과 공통점이 있다. 이런 이유로 hypoxia-reoxygenaion에서의 neuroblastoma 세포주를 이용한 세포손상모델은 虛血 및 再灌流에 의한 손상에 약물이 미치는 효과의 세포연구에 적합한 모델이다.

기존 天王補心丹 관련 연구에는 항산화효과 및 산소의 차단과 재공급에 의해 야기되는 뇌신경세포손상에 대한 효과를 neuroblastoma 세포손상모델을 이용하여 비교 연구한 것은 없었다. 그러므로 본 실험에서 저자는 mouse Neuroblastoma 2a 세포를 대상으로, 한약물이 정상세포와 hypoxia - reoxygenation 조건을 부여한 세포의 세포활성과 세포손상정도에 미치는 효과를 각기 조사하였고, hypoxia 처리된

경우와 reoxygenation 처리된 경우 모두 세포의 활성 (MTT assay)과 세포손상(LDH assay) 정도를 측정, 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 材料.

1) 藥材

(1) 藥材의 構成

본 실험에 사용된 약재는 경희대학교 한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 실험에 사용된 한약물은 天王補心丹과 天王補心丹을 구성하는 單味들이다. 天王補心丹의 조성 및 각 한약물의 용량은 동의보감[31]을 근거로 하였다.

각 韓藥材의 生藥名과 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.(Table 1. 2.).

(2) 藥材의 抽出

각 약물을 경희의료원 약재과로부터 획득하여 각 50g 을 70% 메탄올 수용액에 4℃에서 냉침 하여 추출하였다. 추출액은 매 3시간마다 분광기로 400nm 에서 흡광도를 측정하여 추출과정을 추적하였으며 변화량이 3시간에 5% 미만으로 둔화되었을 때 추출이 완료된 것으로 간주하였고 대개 24시간에서 48시간이 소요되었다. 각 약물을 여과지로 걸러 침전물을 제거하여 얻어진 추출액을 둥근바닥플라스크로 옮기고 용매를 감압 하에서 회전식 증발기로 제거하였다. 완전히 용매가 제거되기 전에 물을 더하여 얼리고 동결건조기로 분말을 얻었고 실험에 사용할 때까지 -80℃ 냉동고에 보관하였다. 동결건조기에 말린 분말을 media에 녹여 보관용액을 만들고 사용하기 직전에 0.4㎛ 실린지로 여과하여 가능한 침전물을 제거하여 사용하였다.

Table 1. Names of Herbs Used in the Experiment.

Herb Name	Botanical Nme
天王補心丹	
生地黃	Rhemanniae Radix
川黃連(炒)	Coptis chinensis
人蔘	Panax ginseng
當歸	Angelica gigas Nakai
五味子	Schizandra chinensis Baill.
柏子仁	Thuja orientalis Linne
酸棗仁(炒)	Zizyphus jujuba Miller
玄蔘	Scrophularia buergeriana
丹蔘	Salvia miltiorrhiza
遠志	Polygala tenuifolia

Abbreviation of herb

Herb name	Abbreviation
天王補心丹	CWBSD
生地黃	SJH
川黃連(炒)	CHR
人蔘	IS
當歸	DG
五味子	OMZ
柏子仁	BJI
酸棗仁(炒)	SJI
玄蔘	HS
丹蔘	DS
遠志	YJ

Abbreviation

DMSO	Dimethylsulfoxide
MTT	3-(4,5-dimethyltiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
LDH	lactate dehydrogenase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PS	Penicillin/streptomycin
FBS	Fetal serum albumin
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
PBS	phosphate buffered saline

Table 2. Prescription of Chenwangbosimdan

Herb Name	Botanical Nme	Dose(g)
生地黃	Rhemanniae Radix	8
川黃連	Coptis chinensis	4
石菖蒲	Acorus gramineus	2
人蔘	Panax ginseng	2
當歸	Angelica gigas Nakai	2
五味子	Schizandra chinensis Baill.	2
天門冬	Asparagus cochinchinensis	2
麥門冬	Liriope platyphylla Wang et Tang	2
柏子仁	Thuja orientalis Linne	2
酸棗仁炒	Zizyphus jujuba Miller	2
玄蔘	Scrophularia buergeriana	2
白茯神	Poria cocos Wolf	2
丹蔘	Salvia miltiorrhiza	2
遠志	Polygala tenuifolia	2
桔梗	Platycodon grandiflorum	1
Total amount		37

2) 細胞

Mouse neuroblastoma 2a (N2a) cells은 American-type culture collection (ATCC)사(Manassas, VA, USA)에서 구입된 것을 강인숙교수(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/100ml, 최종농도)으로 세포를 회수한 후 플레이트 당 1 × 106 개씩 배양하였다. 세포배양조건이 37℃, 5% 의 CO2 조건에서 대개 2-3일 정도씩 소요되었다.

2) Hypoxia와 Reoxygenation

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

3) 細胞活性度 測定(MTT assay)

MTT assay는 Sladowski의 방법을 따라 행하였다[34]. 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[35].

N2a 세포를 96 웰플레이트에 웰당 100㎕ 의 배양액과 함께 1×104개로 준비하여 약 24시간 동안 산소의 공급 하에서 37℃로 배양하고 한약물 추출액을 각 농도로 처리하였다. 각 실험조건에 hypoxia condition을 준 후 10㎕ 의

MTT solution을 첨가한 후 2시간 배양한다. 약 3시간 후 10㎕ 의 준비된 MTT 용액 (회사에서 제공한 시약을 5mg/ml 로 PBS용액에 녹이고 0.4㎛ 실린지로 여과하여 얻음)을 더하고 2시간 더 배양하고 배양액은 제거되었다. 각 웰 내에 형성된 포마잔(formazan)을 100 ㎕의 DMSO로 녹이고 ELISA reader(Emax, U.S.A)를 사용하여 490nm 에서 흡광도를 특정하였다. 세포활성도(Cell 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 50μg/ml에서 최고 1,000μg/ml를 포함하여 5개의 농도에서 실시하였다.

4) 細胞毒性 測定 (LDH assay)

Roche Applied Science사에서 제공된 LDH assay kit를 사용하여 측정하였다. LDH (lactate dehydrogenase)는 세포질에 존재하는 효소로서 정상의 경우 세포막을 투과하지 않지만, 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[36].

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

Cytotoxicity (%) =

{[실험치 - (-)control군의 값]÷[(+) control 군의 값 - (-)control군의 값]}×100

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

5) 統計處理

실험에서 얻어진 모든 자료는 윈도우용 SPSS(버전 11.0)을 이용해 통계 분석하였다. 각 수치는 각 dose 별로 sample 숫자가 5로 30미만이어서 base line에 대하여 각 dose 별로 Mann-Whitney U 검증을 시행하였고, 결과의 통계적 유의성 여부는 정확한 유의확률 $p<0.05$ 수준에서 판단하였다.

Ⅲ. 結 果

1. 韓藥物의 收得率

4℃에서 70% 메탄올 수용액으로 냉침을 한 결과 37g의 비교적 적은 량의 약재를 사용했음에도 불구하고 실험에 충분한 량이 얻어졌으며 다음의 표(Table 3.)에 보이는 결과를 얻었다.

이 중 柏子仁의 경우 가장 낮은 4%의 수득율을 보였으며 玄蔘의 경우 가장 높은 48%의 수득율을 보였다. 天王補心丹은 23%의 높은 수득율을 보였으며 黃連, 人蔘을 제외한 나머지 약재도 20%이상의 높은 수득율을 보였다. 그러나 이는 약재가 유기용매 등에 녹는 성분의 함량을 의미할 뿐 약효에 관한 특정한 유의성을 보이는 결과라고 생각되지는 않았다.

Table 3. The Rate of Extraction from Herbs.

Herb Botanical Name	Rate of Extraction(%)
Chenwangbosimdan	23
Rhemanniae Radix	11.62
Coptis chinensis	7.85
Panax ginseng	7
Angelica gigas Nakai	21
Schizandra chinensis Baill.	27.5
Thuja orientalis Linne	4
Zizyphus jujuba Miller	10.03
Scrophularia buergeriana	48
Salvia miltiorrhiza	27.5
Platycodon grandiflorum	29.38

2. 成績

1)事前 實驗

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

① 韓藥物이 正常의 N2a 細胞에 미치는 效果

Fig. 1(A).에 나타난 바와 같이 MTT assay에는 정상군보다 天王補心丹은 약31%, 川黃連은 약38%, 生地黃은 약10%의 세포활성도감소가 나타났다. 나머지 대부분 약물의 정상군에 비해 세포환원활성도는 더 높아졌다.

Fig. 1(B). LDH assay에서도 遠志를 제외하고 모든 한약물들이 정상군에 비해 약간 높거나 유사한 값을 나타내었다.

五味子의 경우는 오히려 정상군에 비해 낮은 값을 나타내었다. 따라서 본 연구에 사용된 거의 모든 單味들이 정상적인 세포에는 세포증식이나 세포손상에 관여하고 있지 않다는 것을 의미하고 있다.

遠志의 경우 1mg/ml 의 농도에서 LDH assay의 결과는 그 자체로 세포사를 유발하기 때문에 차후의 실험에서 이의 효과가 감안되었다.

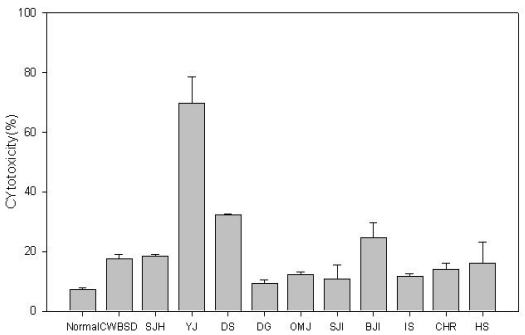


Fig 1(A). Cell viability of mouse neuroblastoma 2a cell influenced by herbal extracts in normoxic condition

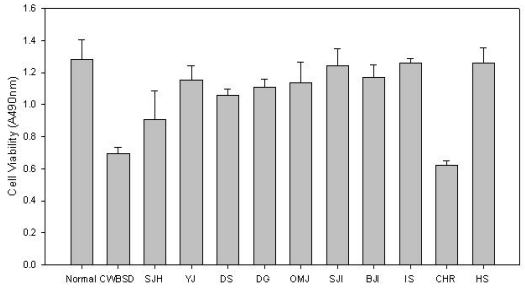


Fig. 1(B). Cytotoxicity of mouse neuroblastoma 2a cell influenced by herbal extracts

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

세포의 생존과 사멸에 미치는 산소공급의 영향을 조사하기 위하여 여러 배양조건에서 실험을 실시하여 아래의 Fig. 2 (A)와 (B)와 같은 결과를 얻었다. Hypoxia 조건에서 MTT assay로 확인한 결과 N2a 세포는 약 24 시간 동안 산소를 차단하였을 경우(H24), 세포의 증식속도에 아무런 영향을 주지 않았음이 관측되었으며, 산소의 차단이 48시간(H48)에 이르면 세포의 증식은 억제되어 같은 조건의 정상상태(N48)에 비해 세포가 25% 이상 감소되었음을 보여주고 있다. Hypoxia 조건에서 LDH assay로 확인한 결과는 Fig. (B)와 같이 48시간 산소차단시에 정상군에 비해 2.3배 이상 LDH활성이 증가되어 세포막의 심각한 손상이 일어났음을 보여준다.

한편 reoxygenation 조건에서 MTT assay의 결과는 24시간 산소차단 후 산소재공급은 아무런 영향을 주지 않았으며, 48시간 산소차단 후 산소재공급도 산소차단시의 결과에 별다른 추가적인 영향이 없었다. 하지만 같은 조건의 LDH assay는 48시간의 산소공급차단 후 추가적으로 6시간 산소재공급이 되었을 때 세포손상을 보여주었다. 이는 48시간의 산소공급차단 후 추가적인 산소의 재공급은 N2a 세포에 일정정도 세포사가 진행되었지만, 즉 세포수가 감소되었지만 전체 환원력의 변화는 없었다.

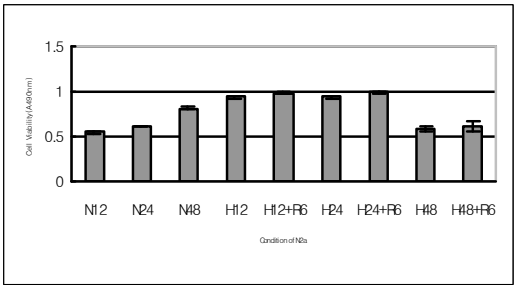


Fig. 2(A). MTT assay of hypoxia-reoxygenation injured mouse neurolastoma 2a cell.
N: normal condition, H: hypoxia condition, R: reoxygenation condition

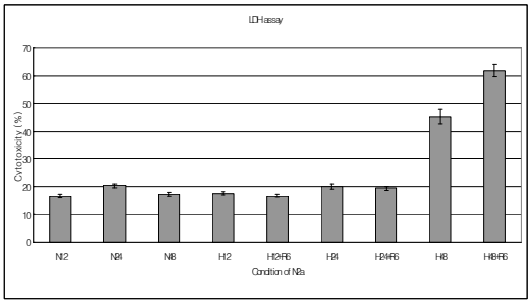


Fig. 2(B). LDH assay of hypoxia-reoxygenation injured mouse neurolastoma 2a cell.
N: normal condition, H: hypoxia condition, R: reoxygenation condition

2) 天王補心丹이 細胞損傷과 保護에 미치는 效果

天王補心丹의 경우 LDH assay에서는 hypoxia와 reoxygenation 조건 모두에서 세포보호효과가 나타난다.

각 실험결과는 Table 4.에 요약되었다. hypoxia 조건의 LDH assay에는 200과 500μg/ml 사이에서는 매우 급격하게 보호효과가 증가하며 1000μg/ml까지 유지된다. reoxygenation 조건의 LDH assay에서도 hypoxia조건과 비슷한 효과증대를 보인다.

Hypoxia조건의 MTT assay에서는 500에서 1000μg/ml사이 농도에서 매우 급격히 세포활성도가 증가한다. 주로 고농도에서 효과를 보이는 양상이 LDH assay에서와 비슷하다. Reoxygenation 조건의 MTT assay에는 별다른 효과가 관찰되지 않았다.

Table 4. Effect of Chenwangbosimdan on Cellular Viability and Cytotoxicity of Hypoxia- Reoxigenation Injured Mouse Neurolastoma 2a cell

(unit: μg/ml)

assay \ dose	0	50	100	200	500	1000
LDHH	49.43± 10.50	44.91± 1.77	46.88± 1.76	43.06± 1.44	23.89± 0.54**	23.65± 1.24**
LDHHR	49.92± 4.02	47.59± 4.19	49.99± 3.33	44.48± 3.46	26.41± 0.97**	18.16± 0.78**
MTTH	0.49± 0.04	0.43± 0.03*	0.46± 0.02	0.50± 0.03	0.56± 0.02**	0.72± 0.07**
MTTHR	0.60± 0.15	0.49± 0.03	0.49± 0.04	0.51± 0.03	0.58± 0.04	0.65± 0.04

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

3) 天王補心丹의 單味들이 細胞損傷과 保護에 미치는 效果

① Hypoxia 조건의 N2a 세포에 미치는 한약물의 효과: LDH Assay

Neuroblastoma 2a 세포주에 가해진 hypoxia에 의한 손상에 天王補心丹에 포함된 10개 單味가 미치는 효과를 연구하기 위하여 hypoxic 조건의 세포배양액에 유출된 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성을 조사하였다. 각 한약물은 최소 50 μg/ml 에서 1,000 μg/ml 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 한약물이 투여되지 않았을 때를 포함하여 그 결과는 Table 5에 요약되었다.

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

(unit: μg/ml)

herbs \ dose	0	50	100	200	500	1000
BJI	42.16± 8.23	46.73± 6.62	44.79± 3.53	46.44± 6.20	45.47± 3.84	47.45± 8.25
CHR	42.16± 8.23	28.88± 7.37	28.19± 7.07**	17.59± 7.93**	39.91± 4.54	36.34± 7.19
DG	49.43± 10.50	31.77± 4.08**	30.73± 4.87**	31.42± 7.61**	15.48± 1.90**	28.14± 10.25
DS	52.49± 3.19	55.89± 1.16*	54.56± 3.58	55.83± 1.00*	52.94± 1.70	49.01± 2.98
HS	42.16± 8.23	33.83± 8.10	39.66± 11.70	51.89± 12.47	41.33± 10.48	48.21± 6.28
IS	42.16± 8.23	42.84± 2.97	38.93± 4.41	59.70± 9.57	69.07± 11.08**	66.14± 3.74**
OMZ	49.43± 10.50	47.59± 8.44	37.09± 2.78*	36.54± 3.35*	37.51± 2.68*	38.53± 1.16**
SJH	25.01± 2.89	17.58± 0.58**	17.83± 1.27**	15.29± 0.71**	15.52± 1.67**	14.82± 0.97**
SJI	23.26± 5.25	28.19± 5.62**	29.23± 5.44**	29.99± 4.68**	24.05± 4.61**	19.15± 3.41**
YJ	52.49± 3.19	47.45± 1.93	54.44± 2.91	38.92± 1.63**	46.34± 1.81**	60.65± 5.23*

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

② Reoxygenation 조건의 LDH Assay

天王補心丹에 포함된 10개 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 μg/ml에서 1,000 μg/ml 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 약물이 투여되지 않았을 때를 포함하여 그 결과를 Table 6에 보였다.

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

(unit: μg/ml)

dose / herbs	0	50	100	200	500	1000
BJI	53.83± 1.13	78.79± 8.68**	79.82± 6.15**	74.18± 9.30*	63.75± 6.25	53.81± 10.38
CHR	53.83± 1.13	33.07± 6.26**	21.45± 4.32**	15.83± 2.15**	22.59± 6.08**	51.87± 8.33
DG	49.92± 4.02	61.76± 3.64**	48.71± 4.70	49.36± 2.91	38.48± 3.56**	39.15± 2.13**
DS	72.47± 9.13	58.53± 2.00**	60.10± 2.66**	60.25± 2.52**	57.89± 1.42**	70.36± 2.70
HS	53.83± 1.13	53.25± 5.39	54.79± 7.17	51.23± 8.15	40.40± 4.41**	35.67± 4.11**
IS	53.83± 1.13	62.88± 9.89	60.57± 8.01	63.02± 8.30	46.18± 4.95**	45.04± 5.13**
OMZ	49.92± 4.02	55.86± 2.33*	50.31± 2.50	46.94± 4.46	45.71± 4.46	36.07± 3.59**
SJH	35.07± 3.98	17.91± 0.65**	23.51± 1.05**	24.04± 1.73**	19.89± 0.45**	18.84± 2.40**
SJI	49.92± 4.02	55.42± 10.09	45.84± 2.28	49.06± 3.91	47.44± 4.37	39.79± 2.70**
YJ	72.47± 9.13	47.31± 2.23**	51.49± 1.69**	44.92± 2.03**	49.64± 1.52**	50.65± 3.28**

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

③ Hypoxia 조건의 MTT Assay

天王補心丹에 포함된 10개 單味가 neuroblastoma 2a 세포주의 hypoxia에 의한 세포환원활성 감소에 미치는 효과를 연구하기 위하여3-(4,5-dimethyltiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 투여하여 세포에 축적된 formazan의 흡광도를 조사하였다.

각 약물은 최소 50 μg/ml 에서 1,000 μg/ml 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 약물이 투여되지 않았을 때를 포함하여 그 결과를 Table 7.에 보였다.

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

(unit: μg/ml)

dose / herbs	0	50	100	200	500	1000
BJI	0.52± 0.05	0.53± 0.02	0.62± 0.03	0.56± 0.04	0.56± 0.02	0.66± 0.04*
CHR	0.44± 0.07	0.57± 0.03**	0.57± 0.02**	0.55± 0.03**	0.52± 0.03	0.41± 0.04
DG	0.55± 0.10	0.48± 0.10	0.43± 0.04*	0.41± 0.04	0.51± 0.03	0.48± 0.04
DS	0.59± 0.08	0.39± 0.05**	0.40± 0.14*	0.51± 0.06	0.56± 0.03	0.69± 0.10
HS	0.44± 0.10	0.51± 0.09*	0.53± 0.05*	0.49± 0.06	0.53± 0.05**	0.53± 0.14*
IS	0.49± 0.08	0.67± 0.03**	0.69± 0.04**	0.69± 0.06**	0.68± 0.01**	0.74± 0.03**
OMZ	0.49± 0.04	0.36± 0.10*	0.35± 0.06**	0.36± 0.06**	0.49± 0.05	0.50± 0.08
SJH	0.73± 0.05	0.63± 0.03*	0.64± 0.02*	0.68± 0.05	0.64± 0.04	0.86± 0.02**
SJI	0.51± 0.11	0.44± 0.05	0.44± 0.05	0.49± 0.01	0.54± 0.04	0.56± 0.03
YJ	0.52± 0.02	0.62± 0.05	0.71± 0.10	0.63± 0.07	0.59± 0.07	0.42± 0.02**

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

④ Reoxygenation 조건의 MTT assay

天王補心丹에 포함된 10개 單味가 neuroblastoma 2a 세포주의 reoxygenation에 의한 세포환원활성 감소에 미치는 효과를 연구하기 위하여3-(4,5-dimethyltiazol-2- yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 투여하여 세포에 축적된 formazan의 흡광도를 조

사하였다.

각 약물은 최소 50μg/ml에서 1,000μg/ml 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 그 결과는 Table 8.에 보여졌다.

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

(unit: μg/ml)

dose / herbs	0	50	100	200	500	1000
BJI	0.66± 0.05	0.63± 0.02	0.70± 0.03	0.77± 0.04*	0.75± 0.02	0.75± 0.04*
CHR	0.69± 0.07	0.51± 0.03**	0.52± 0.02**	0.50± 0.03**	0.53± 0.03**	0.55± 0.04**
DG	0.60± 0.15	0.53± 0.02	0.57± 0.02	0.63± 0.06	0.55± 0.09	0.53± 0.08
DS	0.56± 0.09	0.42± 0.07*	0.45± 0.06	0.47± 0.03	0.48± 0.05	0.54± 0.05
HS	0.59± 0.10	0.48± 0.09**	0.49± 0.05**	0.47± 0.06**	0.49± 0.05**	0.50± 0.14**
IS	0.59± 0.08	0.57± 0.03	0.65± 0.04	0.64± 0.06	0.61± 0.01	0.66± 0.03
OMZ	0.57± 0.08	0.53± 0.04	0.52± 0.06	0.50± 0.09	0.51± 0.05	0.56± 0.05
SJH	0.62± 0.05	0.80± 0.01**	0.77± 0.03**	0.56± 0.03	0.54± 0.05	0.72± 0.09
SJI	0.45± 0.18	0.56± 0.01	0.57± 0.02	0.66± 0.07	0.41± 0.06	0.49± 0.05
YJ	0.57± 0.05	0.57± 0.05	0.61± 0.08	0.56± 0.05	0.69± 0.13	0.42± 0.04**

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

4) 結果의 藥物別 槪括

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

Table 9. The Summary of The Experiments.

藥材名 \ 실험	LDHH	LDHHR	MTTH	MTTHR
CWBSD	+	+	+	-
DS	-	+	-	+
DG	+	+	-	-
BJI	X	-	+	+
SJI	+	+	X	X
SJH	+	+	+	+
OMZ	+	+	-	X
YJ	+	+	-	-
IS	-	+	+	X
CHR	+	+	+	-
HS	X	+	+	-

+ means positive effect.
- means negative effect.
X means no change or partial effect.

Ⅳ. 考 察

최근 산화적 손상의 축적으로 인해 노화현상이 나타난다는 '활성산소설'이 많은 관심을 얻고 있다[3]. 활성산소설과 연관되는 대표적인 노인성 질환으로 치매가 있다. 치매는 전반적으로 지능, 학습, 언어 등의 인지기능과 고등정신기능이 감퇴하는 복합적인 임상증후군이다[37].

대표적인 치매의 원인질환으로 알츠하이머형 치매(Alzheimer type dementia)가 있다. 특히 AD의 병인으로서 산화적 스트레스와 AD와의 관련성을 지지하는 여러 가지 증거들이 있다[38]. Oxidative stress 테스트의 일반적 방법으로 DNA 손상을 측정한 결과 산화된 DNA의 측정인 8-Hydroxy-2′-deoxyguanosine (8OHdG)이 대조군보다 AD환자의 lymphocytes에서 더 높았다[39]. AD환자들의 peripheral lymphocytes의 nuclear DNA에서 산화된 purines이 대조군보다 높았다. AD환자들은 또한 H2O2-induced oxidized

purines의 감소된 회복을 보인다[40]. 또한 Oxidative stress의 makers가 AD환자의 소변에서 증가했다[41]. 이러한 다양한 연구는 산화적 스트레스가 AD의 주요발병원인임을 시사하고 있다.

최근 多用되는 혈관성 치매의 진단기준인 ADDTC의 진단기준[42,43]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[44]. 그 기전을 자세히 살펴보면 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 허혈때 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 세포사로 인한 조직손상에 이르게 한다[45,46].

한의학에서의 老化는 타고난 腎氣의 盛衰에 따른 先天不足과 精神形體의 調攝, 精氣의 培養, 飮食起居의 按配, 四時의 攝生 등의 後天失調에 기인하며[47], 治方으로는 滋陰補腎하는 六味地黃湯과 升陽益氣, 調補脾胃하는 補中益氣湯이 대표적이다[48].

한의학 文獻에서 치매에 대한 정확한 언급은 없고, "癡呆"와 유사한 개념의 서술은 明代의 張景岳이 [景岳全書 · 雜證謨][49]에서 "痴獃"라는 병명을 쓰면서 처음 등장했다. 여러 문헌을 종합하면, 감정적 원인으로 인해 痰이 생겨나타난 心 및 肝膽의 臟腑生理의 이상을 呆病의 유발요인으로 보았으며, 여기에 胃氣 元氣의 强弱이 病의 進退을 결정하는 것으로 보았다. 症狀은 우울, 수면, 언어 및 부적절한 정동 등 정신병적 행동장애를 나타내며 治法으로는 去痰, 補心脾, 開鬱逐水, 健胃通氣 등을 제시하고 있다[50-52].

기억력 상실이 치매의 주증상 중 하나이므로 "健忘"에 대하여 여러 문헌을 종합하여 살펴보면 健忘은 思慮過度, 心腎不交, 心虛, 痰이 원인으로, 常常喜忘 所過之事轉盼遺忘, 事有始無終, 言談不知首尾 등의 증상을 유발한다 하였으니 이는 기억장애가 주증이며 치료에 있어서는 養血理脾, 氣血大補, 心腎交通의 治法을 제시하였다. 이들 개념은 원인 및 病機上으로는 현대의학에서의 치매와 일치한다고 할 수는 없으나, 치매의 임상증상이 기억장애를 주증으로 한다는 점에서 健忘과 치매와의 상관성을 유추해 낼 수 있으며 후대로 갈수록 노년의 건망에 대한 인식이 커지고 점차 현대의 개념에 접근해 가는 것을 볼 수 있다.

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[53].

뇌허혈-재관류 손상에서 free radical에 의한 apoptosis가 중요하게 부각되는 만큼, 뇌신경세포를 보호하기 위해서는 혈류 개선을 통한 세

포괴사의 방지는 물론이고 세포막 붕괴를 막고 활성산소를 제거하고 항산화효소를 촉진할 수 있는 항산화제의 역할이 중요하므로 그 개발과 이용에 더욱 관심이 쏠리고 있다[54].

이에 따라 항노화와 치매치료제 개발과 관련된 기반연구로서 한약을 이용한 많은 항산화 관련연구가 이뤄졌다. 노화관련 항산화효능에 대한 실험적 연구로는 左歸飮과 右歸飮의 肝, 腎, 腦에서 과산화지질 감소와 free radical 생성 효소인 xathine oxidase와 aldehyde oxidase 활성 억제효과가 보고되었으며[13], 윤[14]은 六味地黃湯이 노화 쥐의 간장내 SOD, catalase 등의 항산화효소의 활성을 증가시킨다고 하였고, 박[15]은 補中益氣湯이 노화촉진생쥐의 간세포에서 간장내 지질과산화를 억제하고 항산화효소의 활성을 증가시킨다고 보고하였고, 이[16]는 補脾湯이 노화 쥐의 비장내 과산화지질을 감소시키고 SOD, catalase, glutathione peroxidase 등의 활성 증가에 대하여 보고한 바 있다.

다음으로 항산화효과에 대한 한약물의 연구에 대해 살펴보면 淸肺瀉肝湯[17], 健腦湯[18]의 세포독성감소와 세포활성도 증가효과가 최근에 보고된 바 있다. 또, 聰明湯[19], 烏藥順氣散[20]은 베타 아밀로이드에 의해 생성된 H2O2에 의한 산화적 손상으로부터 신경아종세포를 보호하는 효과를 나타냈다. 加味地黃丸[21]은 허혈에 의하여 유발되는 신경세포손상에 세포 생존율의 감소가 억제되는 결과를 보였고, H2O2를 이용하여 산소유리기를 처리한 후에도 생존율 감소를 억제하는 효과를 보이는 등 신경세포 보호효과가 나타났다. 사상처방으로는 淸心蓮子湯[22]과 荊防地黃湯[23]이 해마신경세포의 XO/HX의 산화적 손상에 대하여 유의한 방어적 작용 효과가 나타났다. 加味六味地黃湯[24], 防風當歸飮[25], 蘇合香元[26]은 허혈-재관류 상황에서 항산화능력이 확인되었다. 小續命湯[27]추출물은 저산소증 상태에서 유발된 신경독의 방어에 매우 효과적으로 나타났다. 五子地黃飮子[28]가 쥐의 혈청내의 항산화효소의 활성도를 유의성있게 증가시켰다. 그리고 白殭蠶[29], 葛花[30], 鬱金[30], 苦蔘[30], 白芷[17], 厚朴[17], 桔梗[17], 杜冲[18], 大棗[18], 蟾蜍[31] 등 다양한 單味의 항산화효과에 대한 보고가 있다. 또한 藥針製劑[32,33]등을 활용하여 한약물의 항산화 효과를 증명한 연구들, 그리고 이들 항산화 관련논문들을 검색하여 고찰한 연구도 있다[34]. 특히 허혈-재관류상태에서 항산화능력이 보고된 健腦湯의 경우 최근 엄[55]에 의해 초기 AD환자에게 12개월간 健腦湯을 투여하고 치료 전·후에 K-DRS, ERP를 측정한 임상연구에서 健腦湯의 인지기능 개선효과가 보고되었다.

한편 본 실험에 사용된 天王補心丹은 思慮過度하여 心血을 耗損하여서 오는 怔忡健忘과 多汗 및 大便秘燥, 口舌生瘡 등의 證에 心血을 補하여 주는 방제이다. 本方은 歸脾湯과 같이 養陰시키고 安身시키는 약물로 배합되었는데 歸脾湯은 健脾益氣를 주로 하였다면 本方은 養陰淸熱을 주로 하여 陰虛血弱者들에게 많이 用하는 방제이다[56]. 구성약물들의 효능을 각각 살펴보면 心 肝膽에 入하여 凉血瀉火하는 生地黃으로 君을 삼아서 아래쪽 足少陰의 水를 滋養함으로서 火를 制防하도록 하고, 入心하여 養心潤腎하는 滋潤之品인 柏子仁을 사용하여 氣를 淸하도록 하며, 入心肺하여 補益元氣하는 人蔘과 入肺腎健胃하여 補利兼優之品인 茯苓의 甘味로써 心氣를 補益하고, 肺腎에 入하여 收斂滋潤하는 五味子의 酸味로서 心氣를 收斂하며, 肺腎에 入하여 除虛熱하고 潤燥痰하는 天門冬은 苦하여 心에 入하고 寒하여 火를 瀉하면서, 心肺胃에 入하여 淸潤하는 麥門冬과 같이 滋水潤燥하는 劑가 되어 氣分의 火를 淸하고, 心肝脾에 入하여 養血潤燥 收斂滋潤하는 當歸의 甘味로서 心血을 補하며, 心肝腎에 入하여 去痰生新하는 丹蔘의 寒함으로서 心中의 陰血을 생성하게 하고, 入腎하여 壯水除火하는 玄蔘의 鹹味로 血中의 火를 淸하게 하고, 心腎에 入하여 安神益智하는 遠志와 酸棗仁과 柏子

仁은 心腎을 배양하는 바 酸棗仁, 五味子는 酸味로 이를 수렴하고, 또 心氣의 耗散을 수렴한다. 入肺心胃하여 開發和解하는 桔梗은 淸肺利隔하니 戴藥上浮하여 心으로 歸함을 취하는 故로 使로 삼는다. 이에 天王補心丹은 心으로 入하여 腎을 安하므로 火는 淸해지고 血을 足하여져 補心함으로서 神明이 充暢하여 모든 症勢가 스스로 제거되는 것이라 하였다[57].

天王補心丹은 국내연구에서 mouse lung fibroblast cell(mLFC)와 pheochromocytoma (PC-12 cell)에 대한 세포독성을 측정결과와 PC-12 cell에서의 아세틴콜린, NOsⅡ의 유전자 발현 및 아세틸콜린의 활성, PS-1, PS-2 및 APP의 발현의 관찰결과, 그리고 scopolamine을 주사한 白鼠에서 아세틸콜린의 활성 및 glucose, uric acid를 측정하고 행동관찰한 결과 항콜린작용과 PS-1, PS-2 및 APP의 유전자 과도발현 억제능력, 그리고 생쥐모델에서 기억력개선효과를 보이는 것으로 보고되었으며[32], 동물실험을 통한 약리작용으로는 중추신경억제, 혈관확장, 혈압강하, 이뇨작용이 보고되었다[33].

그러나 기존 天王補心丹 관련 연구에는 항산화효과 및 산소의 차단과 재공급에 의해 야기되는 뇌신경세포손상에 대한 효과를 비교 연구한 것은 없었다. 따라서 본 연구에서는 치매의 대부분을 차지하는 혈관성 치매와 알츠하이머형 치매가 산소의 부족과 활성산소에 의한 세포손상에 야기될 수 있다는 점에 근거하여, 이들 한약물이 산소 공급 차단에 의한 세포사와 세포활성저하, 그 이후의 산소 재공급에 의한 세포사와 세포활성저하에 미치는 효과를 검토하여 임상적 효과를 설명할 수 있는 기전을 제공하기 위한 기반연구를 실시하였다.

Hypoxia-reoxygenation에 의한 뇌신경세포의 손상과정은 생체에서 뇌허혈과 허혈후의 재관류에 의한 손상을 세포실험으로 재현한 것이다. 뇌허혈에 의한 세포손상은 산소 공급이 역치 이하로 감소되면 기능상실과 더불어 세포괴사(necrosis)가 나타난다. 그러나 대부분의 뇌허혈은 일시적이며 뇌허혈 당시보다는 재관류시에 산소가 조직으로 재공급될 때 급속히 활성산소가 생성이 증가되므로 조직 손상이 더욱 강하게 일어난다. 활성산소에 의한 세포의 피해는 괴사(necrosis)와 자연사(apoptosis)라는 두 가지 형태로 나타난다. 활성산소에 의한 괴사는 superoxide anion radical이 연쇄적으로 활성산소들을 생성함으로서 세포막의 인지질에 작용하여 일어난다. Apoptosis는 특징적으로 세포핵의 변화, 크로마틴의 생화학적 변화를 동반하며, 암, 뇌질환 등 여러 질병에 영향을 미치는데, apoptosis가 유발되는 과정에 있어 미토콘드리아가 중요한 역할을 한다. 미토콘드리아는 활성산소를 만들어내는 주요한 원인인 동시에 활성산소의 공격을 받는 주요한 대상으로, 고농도의 활성 산소종에 의해 세포내의 미토콘드리아가 쉽게 노출되고 손상 받아 미토콘드리아의 막전위가 감소되면 early apoptosis가 유발된다. 이러한 기전의 세포사는 신경전달실조와 신경퇴화를 유발하여 알츠하이머형 치매를 포함한 신경퇴행성 뇌질환을 야기한다[58].

최근 연구는 미토콘드리아의 산화적 스트레스가 세포노화의 결과가 아니라 원인이라는 것을 확실하게 해준다. 특히, 미토콘드리아의 ROS 생성은 두 가지 다른 경로를 통해 수명을 결정할 수 있다. 첫 번째는 산화적 스트레스에 민감한 신호전달 경로에 의해 촉진되는 것이고, 두 번째는 산화적 스트레스가 미토콘드리아의 DNA, 단백질, 지질에 일으키는 손상과 관련된 것이다. 전자는 발병초기에 관련되며 종의 평균수명을 제한하는 노화관련 퇴행성 질환의 진행과 연관된다. 반면에 후자는 종의 최대 수명을 결정한다. 한편, 미토콘드리아에 대한 산화적 스트레스와 종의 최대수명이 역상관관계를 가진다는 증거도 있다[59].

활성산소를 생성시키는 대표적인 인자로 xanthine oxidase가 보고되어 있는데 이 효소에 의해서 산화반응이 진행되는 동안 분자상의

산소로부터 superoxide anion radical이나 hydroxyl radical 같은 활성산소들이 생성되어진다. 재관류시에는 허혈 상태시 세포내에 축적된 hypoxanthine이 xanthine oxidase에 의하여 xanthnie과 uric acid로 전환되면서 매우 독성이 강한 speroxide anion radical을 생성하고 연쇄적으로 활성산소들을 생성함으로서 세포막의 인지질에 작용하여 과산화시켜 막의 구조변형과 기능상실을 유발하므로 조직손상을 일으킨다[60,61].

Hypoxia-reoxygenation에 의한 뇌신경세포의 손상에 한약물이 미치는 영향을 평가하기 위하여 LDH assay와 MTT assay를 사용하였다. LDH(lactate dehydrogenase)는 세포질에 존재하는 효소로서 정상의 경우 세포막을 투과하지 않지만, 세포막이 손상을 입을 경우 세포밖으로 분비되므로 LDH의 활성이 줄어들었다면 산소에 의한 세포막 손상을 보호한 효과가 있다고 결론지을 수 있다. 즉 세포막 파괴로 결론지어지는 세포의 괴사를 막는 효과가 있다고 볼 수 있다[62]. MTT assay는 MTT가 세포내로 들어가 효소들에 의해 환원되어 formazan이라는 물질을 만드는데 이것의 용해도가 아주 좋지 않기 때문에 세포내에 축적된다. 이 축적된 물질의 량은 세포가 얼마나 잘 환원시킬 수 있는지를 보여주는 것으로 미토콘드리아와 소포체의 능력을 이용하는 검사법이다. 이러한 점에 근거하여 본 실험에서 LDH assay는 hypoxia-reoxygenation에 의한 뇌신경세포의 괴사 정도를 측정하는 방법으로 사용되었으며, MTT assay는 주로 산화성 손상을 입은 세포의 항산화능력을 평가하는데 사용되었다. MTT assay상의 수치의 증가는 세포의 산화성손상의 감소와 산화성 손상과정에서 주로 미토콘드리아를 매개로하여 야기되는 apoptosis의 발현을 억제한다고 해석할 수 있다. 전에는 이 결과를 세포가 증식했다는 식으로 해석하기도 했는데[63] 이유는 formazan의 형성이 주로 미토콘드리아에 있는 환원효소에 의한 것이라고 가정했기 때문이다. 미토콘드리아에는 일정량의 효소가 있을 것이고 이 효소량이 증가했다는 것은 미토콘드리아의 수가 많다 즉 세포수가 많다는 의미를 가진다. 그래서 한약물을 조사할 때 한약물의 투여시 MTT 값이 높게 나오면 세포수가 상대적으로 높다 즉 세포를 보호했다는 뜻이 되는 것이다. 하지만 최근 논문에 큰 변화가 생겼는데 이 환원반응이 미토콘드리아에서 일어나는 것은 일부분이고 lysosome 등 다른 소포체에 의한 것들도 상당량 있다는 것이다[64]. 이러한 이유로 MTT의 증가가 세포보호로 해석되지 않고 세포의 환원활성 증가로 해석된다.

天王補心丹과 관련된 기존의 연구에는 치매의 腦神經細胞損傷 중 괴사와 자연사에 대한 天王補心丹의 효과를 비교 연구한 것은 없었다. 따라서 본 연구에서는 치매의 대부분을 차지하는 알츠하이머형 치매와 혈관성 치매에서 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 天王補心丹을 구성하는 일부 單味에 대하여도 같은 효과를 검토하므로써 한약물의 기전에 관한 연구방향을 제시할 뿐 아니라, 임상에 適用頻度가 높은 處方인 天王補心丹을 구성하는 약물을 검색함으로써 개별 약물의 효능검색을 효과적으로 할 수 있으며, 유효성이 높은 약물을 선별하여 차후 신약 개발에 기초 자료를 제공할 수 있을 것이다.

이에 저자는 사전 실험으로서, Mouse neurolastoma 2a 세포를 대상으로 한약물이 정상세포에 미치는 효과를 조사하였고 hypoxia-reoxygenation이 세포생존과 세포사에 미치는 영향을 조사하였으며, 본 실험으로서 한약물이 hypoxia와 reoxygenation의 조건에 의해 나타난 세포손상에 미치는 효과를 조

사하였다. 실험의 hypoxia 처리된 경우와 reoxygenation 처리된 경우 모두 세포의 환원활성 (MTT assay)과 세포손상(LDH assay) 정도를 측정하였다.

첫 번째 사전실험에서 정상 N2a세포에 미치는 한약물의 효과를 관찰했을때 遠志의 경우 in vitro 상 높은 농도(1mg/ml)에서 세포손상을 나타내었고, 天王補心丹은 약31%, 川黃連은 약38%의 세포활성도감소가 관찰되었다. 이러한 사전실험결과는 나중의 약물결과에 대한 해석시에 고려하였다.

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[65]. 사전실험의 48시간 산소차단에서 세포의 유의한 변화가 나타난 결과에 따라 본 실험에서는 48시간 산소차단 조건을 부여하였다.

본 실험의 결과를 먼저 각각의 실험조건별로 고찰해보겠다.

Hypoxia조건의 MTT assay에서는 天王補心丹 외 柏子仁, 生地黃, 人蔘, 川黃連, 玄蔘 등 5개의 단미가 수치상 상승을 보였다. 특히, 天王補心丹과 人蔘은 실험 약물들 중 매우 뚜렷한 효과를 보였다. 이는 위의 약물들이 hypoxia조건에서 생존한 세포들이 미토콘드리아의 기능이 저하되는 피해를 입어 정상세포에 비해 환원활성이 감소되었을 상태에서, 한약물들이 대체로 환원활성 증가에 효과를 보이며 이는 이들 약물의 항산화력을 시사하는 것이다.

Hypoxia 조건의 LDH assay에서 세포보호효과를 보인 약물은 天王補心丹, 丹蔘, 當歸, 生地黃, 五味子이다. 이 가운데에서 天王補心丹과 當歸는 두드러진 세포보호효과를 나타냈다. 이는 산소부족에 의한 세포괴사방지에 효과가 있다는 것이다. 또한 알츠하이머형 치매의 경우 Aβ가 혈관벽에 침착되어 뇌의 국소부위에 저산소증 소견을 보이며, 혈관성 치매의 경우 중풍 후에 유발되는 경우가 많으므로 天王補心丹과 해당 單味들이 알츠하이머형 치매와 혈관성치매의 뇌허혈로 인한 세포괴사 방지에 임상적으로 활용될 수 있으리라 판단된다.

酸棗仁, 遠志, 玄蔘, 川黃連의 경우 cytotoxicity가 농도에 따라 그 효과가 일정하지 않은데 이에 대한 이유는 각각의 약물들이 보호효과를 보이는 성분과 세포독성을 보이는 다른 성분도 가지고 있고 이 성분들이 농도에 따라 어느 한쪽이 우세하게 작용하기 때문으로 생각된다.

그리고 柏子仁은 투여농도에 따라 LDH 활성의 변화를 나타내지 않는다. 柏子仁은 사전실험에서 정상상태세포에 고용량투여시 약간의 세포독성을 보인다. 하지만 柏子仁이 hypoxic 조건의 세포에서는 고용량을 투여해도 LDH 활성의 변화를 보이지 않는 것은 약간의 세포보호효과를 가지고 있다고 볼 수 있다.

Reoxygenation 조건의 MTT assay에서 天王補心丹은 4가지 실험조건 가운데 유일하게 부정적인 효과를 나타냈었고 단미 중에서는 酸棗仁, 生地黃, 遠志, 人蔘, 柏子仁은 증가하였으며 특히 酸棗仁, 生地黃, 遠志는 두드러진 활성도 상승효과를 보였다. 약물을 투여하지 않은

reoxygenation에서는 실제적으로 생존한 세포의 환원활성이 hypoxia때보다 약간 상승하였음에도 위의 약물들은 산화성 손상에 의한 세포환원활성감소를 개선하는 효과가 뚜렷하므로, 활성산소에 의한 뇌세포의 변성 및 자연사 방지에 효과적일 것이며 신약개발에 있어서 중요한 연구 대상이 되리라 판단된다.

reoxygenation 조건에 의한 세포환원활성 감소에 대해 실험에 사용한 약재는 매우 다양한 양태의 반응을 보이고 있다. 약물 투여 이후 환원활성도가 감소하여 투여 이전 수준이하로 유지되는 경우는 丹蔘, 當歸, 五味子, 川黃連, 玄蔘으로 이들 약물은 부분적으로 활성도 상승을 보이기는 하지만, 모두 약물 투여 이전 이하 수준이기 때문에 부정적인 결과를 보인다고 결론지을 수 있다.

酸棗仁, 生地黃은 농도에 증가함에 따라 활성도 상승을 보이다가 다시 떨어지는 양상을 보인다. 酸棗仁은 농도 200μg/ml까지 농도의존적으로 활성도상승을 보이다가 농도 500μg/ml에서 급격히 활성도감소를 보인다. 이는 유효성분이 특정농도에서만 potency를 지님을 나타내는 결과라고 생각된다. 生地黃은 초기 50μg/ml에서 최고효과를 보이다가 농도 200μg/ml부터 활성도가 감소하여 부정적인 효과를 보이며 최고농도인 1000μg/ml에서 약간의 활성도 증가를 보이나 유의한 결과치는 아니었다. 生地黃은 초기농도 50μg/ml에서 이미 최고의 효과를 보이는데, 이는 유효성분이 매우 강한 potency가 있던지 혹은 유효성분의 함량이 매우 높음을 의미한다. 遠志는 초기에는 별다른 변화없이 활성도가 유지되다가 농도 500μg/ml에서 급격한 활성도 증가를 보이며 최고효과를 나타내고 이후 농도 1000μg/ml에서는 다시 급격한 활성도 감소를 보인다. 이는 유효성분이 특정농도에서만 potency를 지님을 나타내는 결과라고 생각된다. 柏子仁의 경우 초기에 약간 활성도가 감소했다가 다시 농도 500μg/ml에서 증가하는 양상을 보이는데 이는 유효성분이 완만한 potency를 지님을 나타낸다.

Reoxygenation 조건의 LDH assay에서는 天王補心丹과 柏子仁을 제외한 모든 單味들이 유의한 효과를 나타내었다. 이것은 실험에 사용된 한약물들이 산소재공급시 활성산소에 의한 산화성 세포괴사를 방지하는데 효과가 있다는 것을 의미한다. 뇌졸중시의 세포손상은 뇌허혈보다는 재관류시 활성산소에 의한 것이 더 많으므로 이러한 실험 결과는 天王補心丹이 산화성 손상에 의한 세포괴사로 치매의 병증이 진행되는 것을 억제하는데 임상적으로 적용될 수 있는 지지증거가 되리라 판단된다. 單味들 가운데 天王補心丹과 川黃連, 生地黃, 遠志, 五味子, 玄蔘의 단미들은 특히 두드러진 효과를 보여 임상연구 및 신약 개발에 중요한 연구대상이 되리라 판단된다.

이상의 실험결과를 종합해 볼 때 세포보호효과와 세포활성도증가효과에서 비교적 일관성있는 좋은 효과를 나타낸 약물로는 처방인 天王補心丹과 單味 가운데 生地黃, 川黃連, 酸棗仁이 있다. 그러므로 이상의 약물 각각에 대해 고찰해보겠다.

天王補心丹의 경우 LDH assay의 hypoxia와 reoxygenation 조건 모두에서 500μg/ml이상의 고농도에서 양호한 세포보호효과가 나타난다. Hypoxia조건의 MTT assay에서는 500에서 1000μg/ml사이 고농도에서 매우 급격히 세포활성도가 증가한다. 하지만 天王補心丹은 Reoxygenation 조건의 MTT assay에서는 저농도에서 통계적으로 유의한 결과치는 아니지만 활성도가 감소하며 나머지 농도에서는 별다른 효과가 관찰되지 않았다. 이 결과를 고찰해 볼 때 먼저, 天王補心丹이 허혈-재관류 상황에서 충분한 용량의 투여(고농도)상태에서 세포의 괴사를 막고 세포활성도를 증가시킴으로써 항산화효과를 나타낸다고 볼 수 있다. 하지만 Reoxygenation 조건의 MTT assay에서의 결과를 참고할 때 세포활성도를 나타내는 환원력은 다소 떨어진다고 볼 수 있다. 이는 정상상

태의 사전실험에서 天王補心丹이 약 31%의 세포활성도감소를 나타내는 사실과도 연관성이 있다. 이런 실험결과는 天王補心丹이 허혈-재관류 상태에서 세포막의 파괴를 막는 능력은 뛰어나지만 상대적으로 세포자체의 활성도를 증가시키는 능력은 다소 떨어진다는 것을 시사한다.

生地黃은 모든 실험 조건에서 비교적 일관성있는 세포막보호효과와 세포환원활성도 증가효과를 보인다. 자세히 살펴보면, LDH assay에서는 모든 농도에서 세포막보호효과를 보이고 MTT assay에서도 세포환원활성도증가를 나타내지만 특정농도에서는 효과과 없다. 즉 生地黃은 MTT assay보다 LDH assay에서 전반적으로 좋은 효과를 보이는데 이는 세포괴사를 방어하는 효과가 세포활성도를 증가시키는 효과보다 뛰어나다는 것을 뜻한다. 기존의 연구를 보면 손상된 신장조직세포에 대한 熟地黃의 항산화력에 대한 연구가 있는데 이 연구에서 손상된 세포에 熟地黃을 투여하면 항산화제인 GSH의 농도를 증가키시고 LDH유출을 막고, 지질과산화를 억제시킨다고 보고되고 있다[66]. 이는 본 실험의 결과와도 상관성이 있다.

川黃連은 일부 농도에서 허혈시 세포환원활성을 증가시키는 효과를 보였지만, 재관류 상태에서는 오히려 세포환원활성능력을 감소시키는 결과를 보여서 상황에 따라 상반된 효능을 보였다. 川黃連의 주성분인 berberine은 아드레날린성 α-수용체를 경쟁적으로 차단하여 심장박동과 말초혈관의 저항력을 낮추어 혈압강하작용을 하는데[67], 이런 작용으로 혈류량이 증가하여 산소공급을 증가시키면 세포파괴가 감소될 수 있으므로 이러한 약리작용에 대해 in vivo실험에서 연구해 볼 필요가 있을 것이다. 그리고 세포막 보호효과에 있어서는 저농도에서 허혈 및 재관류 상태 모두에서 효과가 있었는데, 향후 적정 농도와 상황에 따른 효과를 더 연구한다면 허혈-재관류 손상에 유용한 약물로 사용될 수도 있을 것이다.

酸棗仁에 대한 기존의 연구를 살펴보면 최근 정 등[68]은 CT105 신경세포주를 이용한 실험에서 酸棗仁의 항산화효과를 보고했다. 酸棗仁은 허혈과 재관류상태 모두에서 고농도에서만 세포막보호효과를 보이고 허혈상태에서는 약간의 세포활성도증가를 보이며 재관류상태에서는 특정농도(200μg/ml)에서 뛰어난 세포활성도증가효과를 나타낸다. 즉 酸棗仁은 충분한 용량을 투여할 때 세포막효과를 나타내며 세포활성도증가효과는 재관류상태에서 뚜렷하게 나타난다. 酸棗仁의 주성분인 saponin이 in vitro에서 산소결핍, 영양결핍 등으로 인한 심근손상을 뚜렷하게 억제한다고 한다[67]는 기존연구를 참고할때 본 실험에서 산조인의 효과는 saponin으로 인한 것으로 추정할 수 있다. 특히 재관류상태에서 세포는 활성산소에 의한 피해가 더욱 심하므로 酸棗仁이 허혈-재관류 손상에 유용한 약물로 사용될 수 있으며 항노화제 혹은 치매치료제로의 개발을 위한 근거를 제시해 줄 수 있다. 하지만 농도에 따라 다른 효과를 보이므로 최대효과를 나타내는 적정농도를 확인하는 것이 필요하다고 볼 수 있다.

실험에 사용된 약물들의 농도와 효과의 상관성에 관해 살펴보면 天王補心丹과 酸棗仁, 遠志, 玄蔘, 川黃連, 當歸, 五味子, 人蔘, 丹蔘, 生地黃 등 柏子仁을 제외한 대부분의 단미들이 두 가지 약물 농도 구간에서 효과가 대별되어 보인다. 이들 약물에 대해서 다른 농도에서 작용하는 유효성분이 두 가지 이상 있는지 연구필요성이 제기된다.

각 單味들의 실험결과와 처방 구성(君臣佐使)과의 상관성은 흥미로운 결과를 보였다. 生地黃은 세포보호효과 및 세포활성도증가효과가 모든 실험에서 뚜렷하다. 이는 天王補心丹이 세포막 보호효과 및 허혈시 세포활성도증가에서 좋은 결과를 보인 것과도 일치하는데 이는 生地黃의 약성이 天王補心丹의 처방구성에서 君藥에 해당하는 것과 일치한다. 丹蔘, 當歸, 遠志, 五味子, 川黃連, 玄蔘에서도 세포막 보호

효과가 뚜렷하게 나타나는데 이는 약물이 天王補心丹의 臣藥, 佐藥에 해당하는 것과도 일치한다.

실험에 사용된 單味들을 유사한 效能으로 분류해 보면, 血中의 火를 淸하는 生地黃, 玄蔘과 血을 補하는 當歸, 丹蔘, 그리고 酸味로 수렴하는 酸棗仁, 五味子와 心腎에 入하여 安神益智하는 遠志, 酸棗仁, 柏子仁이 있다. 이러한 유사한 효능을 가진 약재들 간의 실험결과를 비교해 보면 丹蔘과 當歸가 hypoxia조건의 LDH assay에서 두드러진 효과를 보였고, 生地黃과 玄蔘이 reoxygenation 조건의 LDH assay에서 두드러진 효과를 보였고, 酸棗仁, 遠志가 reoxygenation 조건의 MTT assay에서 두드러진 효과를 보여 서로 연관성을 확인할 수 있다. 이로보아 血中의 火를 淸하는 韓藥物, 補血 韓藥物, 安神益智하는 韓藥物에 대하여 세포막 보호효과와 세포환원활성증가효과에 대한 연구가 의미 있을 것으로 판단된다.

Ⅴ. 結 論

腦조직에서 虛血 이후 再灌流 時 신경세포의 손상에 天王補心丹 및 天王補心丹의 主要單味 10가지가 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 실험에서 세포독성실험에서는 遠志가 뚜렷한 세포독성을 나타내었고, 세포활성도실험에서는 天王補心丹, 川黃連이 뚜렷한 세포활성도감소를 나타내었다.
2. 실험약물 가운데 비교적 일관성있는 양호한 세포보호효과와 세포활성도증가를 나타낸 약물로는 처방인 天王補心丹과 單味 가운데 生地黃, 川黃連, 酸棗仁이 있다.
3. 天王補心丹은 허혈-재관류 상황에서 충분한 용량(고농도)를 투여했을때 세포의 괴사를 막고 세포활성도를 증가시킴으로써 항산화 효과를 나타낸다. 하지만 재관류상태의 MTT assay에서는 부정적인 결과를 보여 세포괴사를 방어하는 효과에 비해 세포활성도를 증가시키는 효과가 떨어진다는 것을 알 수 있다.
4. 生地黃은 모든 실험 조건에서 세포막보호효과와 세포환원활성도 증가효과를 보인다. 生地黃은 MTT assay보다 LDH assay에서 전반적으로 좋은 효과를 보여 세포괴사를 방어하는 효과가 세포활성도를 증가시키는 효과보다 뛰어나다는 것을 알 수 있다.
5. 川黃連은 세포막 보호효과에 있어서는 저농도에서 허혈 및 재관류 상태 모두에서 효과가 있었다. 그리고 일부 농도에서 허혈시 세포환원활성을 증가시키는 효과를 보였지만, 재관류 상태에서는 오히려 세포환원활성능력을 감소시키는 결과를 보였다.
6. 酸棗仁은 충분한 용량의 투여상태에서 세포막효과를 나타내며 세포활성도증가효과는 재관류상태에서 뚜렷하게 나타난다.

위와 같은 결과는 天王補心丹과 특정 單味들이 뇌허혈 이후 재관류로 인해 발생할 수 있는 뇌신경세포의 활성산소로 인한 손상으로부터 세포를 보호하여 세포사를 억제하고 腦조직을 보존하는데 유용한 효능을 가지고 있다는 것을 나타낸다.

參 考 文 獻

1. 보건복지부통계. 연도별 노인인구 현황. 2003.
2. 한국보건사회연구원. 치매관리 Mapping 개발연구. 1997.
3. 한복기 : 화학세계. 1998;38(2):48.
4. K.B. Beckman, B.N. Ames : The free radical theory of aging matures, Physiol. Rev., 1998;78(2):547 - 581
5. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, et al. : A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. NEJM 1997;336:1216-22
6. Brodaty H, Ames D, Boundy KL, et al. Pharmacological treatment of cognitive dificits in Alzheimer's disease. Med J Aust 2001;175:324-9.
7. Morris MC, Beckett LA, Scherr PA, et al. Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of incident Alzheimer disease. Alzheimer Dis Assoc Disord 1998;12:121-6
8. Fioravanti M, Flicker L. Efficacy of nicergoline in dementia and other age associated forms of cognitive impairment. Cochrane Database syst Rev 2001;(4)
9. 윤철호. 左歸飮과 右歸飮이 老化 Rat의 過酸化 脂質 생성 및 活性酸素 生成系 酵素活性에 미치는 影響, 동국대학교대학원. 1994.
10. 윤일지. 六味地黃湯이 노화 Rat의 간내 과산화지질 및 대사효소계에 미치는 영향, 대전대학교대학원. 1997.
11. 박성민 임명현 이준희 박재현. 補中益氣湯과 六味地黃湯이 노화촉진생쥐(SAM)의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18(4):175-191.
12. 이동찬. 노화과정의 흰쥐에서 補脾湯이 비장의 대사효소계에 미치는 영향. 대전대학교대학원. 1999
13. 문하경. 淸肺瀉肝湯과 單味들이 Hypoxia-Reoxygenation에 의해 손상받은 Mouse Neuroblastoma 2a Cells에 미치는 影響. 경희대학교 대학원. 2005.
14. 염창섭. 健腦湯과 單味들이 Hypoxia-Reoxygenation에 의해 손상받은 Mouse Neuroblastoma 2a Cells에 미치는 影響. 석사학위논문. 경희대학교 대학원. 2005.
15. 국윤재. 베타 아밀로이드 유도성 Neuro 2A 세포독성에 대한 聰明湯의 효과, 석사학위논문. 원광대학교 대학원. 2004.
16. 차용석. Neuro 2A 세포의 산화적 손상에 대한 烏藥順氣散의 방어 효과. 박사학위논문. 원광대학교 대학원, 2004.
17. 백은경. 加味地黃丸이 저산소성 신경세포 손상에 미치는 영향. 석사학위논문. 원광대학교 대학원. 2003.
18. 황승연. 淸心蓮子湯 수추출물이 XO/HX에 의해 손상된 배양 해마신경세포에 미치는 영향. 석사학위논문. 원광대학교 대학원, 2003.
19. 최용석. 荊防地黃湯 전탕액이 산소자유기로 손상된 배양 해마신경세포에 미치는 영향.석사학위논문. 원광대학교 대학원. 2003.
20. 김진형, 김윤식, 설인찬, 김동희. 加味六味地黃湯이 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. 최은정, 신길조, 이원철. 蘇合香元이 실험적

뇌경색 흰쥐의 局所뇌혈류량 및 경색면적에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1997;18(1):456-469.

23. 임창용. 小續命湯이 저산소증으로 유발된 대뇌신경세포의 손상에 미치는 영향. 박사학위논문. 원광대학교 대학원. 2003.
24. 서경석, 이상룡. 五子地黃飮子가 老化白鼠의 血液 變化와 血淸 ·腦組織의 抗酸化活性에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 1999;10(1):19-34.
25. 김희준, 윤철호, 정지천. 흰쥐의 뇌 astrocyte에서 amyloid-β25-35로 유발된 지질의 과산화와 항산화 효소계 및 NO 생성에 미치는 白殭蠶의 효과. 대한한방내과학회지. 2001;22(3):331-339.
26. 박용기. 葛花와 鬱金 및 苦蔘의 항산화작용에 관한 비교연구. 대한본초학회지. 2001;16(1):41-53.
27. 정지천, 박태훈, 윤철호, 서운교, 신억섭, 강정준, 서종은. 蠐螬가 허혈/재관류에 의한 뇌손상에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1999;20(2):196-209.
28. 김영해, 김갑성. 호도약침액의 항산화 효과에 대한 연구. 대한한의학회지. 1996;17(1):9-20.
29. 윤철호, 정지천, 신억섭. 녹용 약침 제제가 흰쥐 신장 조직의 항산화 작용에 미치는 영향. 한국한의학연구원논문집. 1996;2(1):192-204.
30. 안상원, 이철완. 국내문헌에 나타난 항노화 및 항산화의 실험적 연구에 대한 검색. 대한한의학회지. 1998;19(2):373-390.
31. 허준. 동의보감. 서울: 법인문화사. 1999:205.
32. 이준영, 정인철, 이상룡. 天王補心丹이 치매 병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2002;13(2):149-171.
33. 김남재 , 공수윤 , 장순욱. 天王補心丹이 중추신경계 및 순환기계에 미치는 영향. 생약학회지. 1998;19(3):208-215.
34. Sladowski, D., Steer, S. L., Clothier, R. H., and Balls M. An improved MTT assay. J. Immunol. Methods 1993;157:203-207
35. 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
36. Koh JY, Choi DW. Quantitative determination og glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J of Neuros. Methods 1987;20:83-90
37. 대한신경정신의학회 편. 신경정신과학. 서울:하나의학사. 1997:211.
38. Gibson GE, Huang HM. Oxidative stress in Alzheimer's disease, Neurobiol Aging. 2005 May 26(5):575-8
39. Moroez M, Kalman J, Juhasz A, Sinko I, McGlynn Ap, Downes CS et al. Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2002;23:47-53
40. Pratico D, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ, Rokach J, FitzGerald GA. LIncreased 8, 12-iso-iPF2alpha- VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. Ann Neurol. 2000;48:809-12
41. Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, Latorraca S, Naomias B, Bagnoli S, et al. Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients, Free Radio Biol Med. 2002;33:1372-9

42. 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
43. Amar K., Wilcock G. Vascular dementia, British Medical Journal, 312(1):227-231, 1996
44. McCord, JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. NEJM. 1985;312(3)159~163
45. 홍성길, 강봉주, 김윤진, 강상모, 조동욱 : 허혈/재관류 세포손상에서 淸肺瀉肝湯의 보호 효과, 한국한의학연구원논문집,2000;5(1):111-117.
46. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. Stroke. 1990; 25:7-12
47. 전국한의과대학간계내과학교수공저. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원. 1989:504.
48. 강순수. 방제학. 서울:계축문화사, 1984:38-40, 41-43.
49. 張介賓. 景岳全書, 서울:一中社, 1992:846.
50. 陳士澤. 國譯石室秘錄(下). 서울:書苑堂, 1984:316-317.
51. 錢鏡湖. 辨證奇文全書. 臺北:甘地出版社, 1980;233-235.
52. 대한한방신경정신과학회 편. 한방신경정신의학. 서울: 집문당. 2005:312-313.
53. 金賢兒, 鄭智天, 李源哲. 老人性치매에 對한 文獻的 考察. 대한한방내과학회지. 1992;16(2):57-69.
54. Bulkey, GB. The role of oxygen radicals on human disease process. Surgey. 1993;94(3):407-411
55. 엄효진, 김종우, 박은혜, 김현택, 황의완. 초기 알츠하이머형 치매환자에 대한 健腦湯의 효능-12개월 임상연구-. 동의신경정신과학회지. 2005;16(1):43-67.
56. 이상인. 방제학. 서울:을축문화사. 1984: 48, 49.
57. 이상인. 본초학. 서울:의약사. 1985: 50, 94, 100, 107, 120, 122, 123, 171, 174, 278, 325, 343, 415, 419, 510.
58. Anne E, Uta K, Celio A. Marques, Astrid B, Claudia F, Kartin Sch, Walter E. Muller. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. Biochem, Parm 2003;28:1627-1634
59. Juan S., Federico V. Pallardo´, and Jose´ V. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. Free Rad Bio & Med. 2003;35(1):7
60. Yoslida S. Brin. injury after ischemia and trauma. Ann NY Acad Sci 570:219-236, 1989.
61. Milan, L. Jozef, R., Vilian, K., Peter, P. and Ladislav V. Free radicals in chemistry and biology, CRC Press. 1989;29~31,283~284.
62. Koh JY, Choi DW. : Quantitative determination og glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J of Neuros. Methods 1987;20:83-90
63. Sladowski, D., S. J. Steer., R. H. Clothier., M. Balls. An improved MTT assay. J. of Immune. Methods, 1993;157, 203-207
64. 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

65. Anne E, Uta K, Celio A. Marques, Astrid B, Claudia F, Kartin Sch, Walter E. Muller. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. Biochem, Parm 2003;28: 1627-1634
66. 조수인. 흰쥐 신장 조직 손상에 대한 숙지황의 항산화 효과. 대한본초학회지. 2003; 18(4):119-126.
67. 김호철. 한약약리학. 서울: 집문당. 2001: 128, 377.
68. 정정욱, 박창국, 박치상, 이소연, 윤현덕, 신오철. 산조인(酸棗仁)이 CT105에 의한 신경세포 상해 및 백서의 기억에 미치는 영향, 대한본초학회지, 2005;20(1):19-33.