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

黃連解毒湯이 Hypoxia-reoxygenation에 의해 손상 받은 Mouse Neuroblastoma 2a Cells에 미치는 影響

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

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

Sang Hoon Ahn, 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

Objective : This study was designed to asses the effect of Hwangryunhaedoktang 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 Hwangryunhaedoktang and herbs.

Result :

1. Hwangryunhaedoktang was effective on LDH assay of hypoxia and reoxygenation.
2. All of herbs were generally effective on LDH assay of hypoxia and reoxygenation.
   In LDH assay of hypoxia, the effects of herbs depended on concentration.
   In MTT assay of hypoxia, Coptidis Rhizoma and Gardeniae Fructus were effective.
   In MTT assay of reoxygenation most of herbs were not effective. But Phellodendri Cortex was effective in high concentration.

Conclusion : The results imply that Hwangryunhaedoktang and all herbs of it may have protective effect on dementia and aging.

Key Words : Hwangryunhaedoktang, MTT assay, LDH assay, 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

활성산소(reactive oxygen species, ROS)란 일반적으로 superoxide (· O_2^-), 과산화수소(H_2O_2), hydroxyl radical (· OH^-) 등의 산소종을 말하는데[1], 낮은 농도의 활성산소는 세포 내외의 생리적 신호전달자로 작용하기도 하지만[2] 지질, 단백질, DNA 등 세포내 구성체를 산화적으로 손상시키는 것으로 알려져 있다[3]. 활성산소는 정상적인 인체의 대사 중에 소량으로 만들어지지만 catalse나 superoxide dismutase(SOD)와 같은 항산화효소에 의해 곧바로 분해되어 세포에 손상을 주지 않는다. 그러나 腦虛血이나 근위축성축삭경화증과 같은 병변에서는 활성산소가 과량으로 만들어져 뇌세포에 심각한 영향을 미치거나 사멸시킨다[4]. 활성산소로 야기되는 질환은 癌, 腦卒中, 虛血, 심장질환 등 여러 가지가 있지만[5] 그 중 대표적인 것이 痴呆와 老化이다.

痴呆의 병리에 있어 산소 부족[6]과 함께 산화적 스트레스[7]가 중요한 과정으로 인식되고 있다. 알츠하이머형 痴呆는 활성산소 과잉과 항산화능력의 저하에 의한 腦神經細胞 파괴가 중요한 병리기전으로 인식되고[8], 혈관성 痴呆도 虛血에 의한 산소부족보다 再灌流시에 나타나는 활성산소에 의한 손상이 더 크다[9].

痴呆에 대한 한약 연구는 單味로서 세포실험에서 日黃連[10], 香附子[11], 忍冬藤[12], 天花粉[12], 赤芍藥[12], 玄參[12], 魚腥草[12], 大腹皮[12], 桑寄生[12]이 AChe효소활성을 억제하는 효과가 있다는 보고와, 合歡皮와 細辛의 성분 중에 항산화 효과가 있다는 보고가 있었으며[13], 동물실험에서 石菖蒲[14,15], 日黃連[10], 香附子[11] 등이 학습과 기억을 증진시키는 효과를 보였다는 보고가 있었다. 복합처방으로는 세포실험에서 天王補心丹[16], 加減固本丸[17]이 AChE의 발현 및 활성을 억제했다는 보고와, 동물실험에서 天王補心丹[16], 加減固本丸[17], 調胃升淸湯[18,19]과 荊防地黃湯[20]이 학습과 기억을 증진시키는 효과를 나타냈다는 보고가 있었으며, 임상실험에서는 조[21]와 김[22]이 調胃升淸湯의 초기 알츠하이머형 痴呆 환자에 대한 인지기능 개선을 보고하였다.

老化 과정의 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았으나, 크게 유전학설(genomic theory)[23]과 에러설(error theory)[24], 그리고 자유유리기설(free radical theory)이 있다[25]. Harman은 老化 과정이란 산화성 손상이 세포와 조직에 축적되기 때문이라는 老化의 활성산소설을 주장하였다[83].

老化에 대한 한약 연구는 單味로서 SOD의 활성유도를 촉진시키고 자유기를 제거하는 항산화기능을 보인 人蔘[27]과, DPPH 자유기 소거활성을 보인 黃芩 외 30종 등이 확인되었다[28]. 복합처방으로는 延年益壽不老丹, 補中益氣湯, 六味地黃湯 외에 五子地黃飮子[29]가 활성산소의 생성과 老化물질의 축적을 감소시켰다는 보고와, 二精丸[30]이 흰쥐의 생체 내 SMP-30이 저발현되는 것을 억제했다는 보고 등이 있었다.

활성산소에 관한 실험 방법으로는, 동물실험에서 활성산소인 과산화수소를 만들어내는 효소체계인 Glucose/Glucose oxidase(G/GO)를 처치하거나, 또는 AAPH(2,2′-azobis (2-amidinopropane)dihydrochloride)를 이용하여 산화시키거나, H_2O_2(Hydrogen peroxide)를 산화제로 이용하는 방법 등이 있지만, 본 실험에 사용된 Neuroblastoma는 약물의 항 痴呆효과 연구[31]와, 산화성 신경손상 연구[32,33]에 이용되고 있고, 세포에 hypoxia를 유발할 경우 조직의 hypoxia와 유사한 생화학적 반응이 예상되며[34], reoxygenation을 유발할 경우 산소자유기에 의한 손상이 야기되어[35] 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.

이번 실험에 사용되는 黃連解毒湯은 동물실험에서 학습과 기억력을 증진시킨 黃連과, DPPH 자유기 소거활성을 보인 黃芩, 그리고 黃柏, 梔子로 이루어진 처방이다. 이에 관한 연구로는 차[36]가 실험적 중성지질 축적 HepG2세포에 黃連解毒湯이 효과가 있음을 보고하였고, 黃連解毒湯이 자유유리기로 인한 지질의 과산화를 억제한다는 보고와[37], rat를 이용한 동물실험에서 liver microsome의 효소지질 산화반응을 억제한다는 보고가 있었다[38].

이와 같이 黃連解毒湯은 세포를 보호하는 효과가 뛰어난 것으로 보고되어 왔으나, 산소의 차단과 재공급에 의해 야기되는 뇌신경세포 손상에 대한 효과를 비교 연구한 것은 없었다. 따라서 본 연구에서는 痴呆와 老化가 산소의 부족과 활성산소에 의한 세포손상으로 인해 야기될 수 있다는 점에 근거하여, 이들 韓藥物이 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.

이에 저자는 mouse Neuroblastoma 2a 세포를 대상으로, 韓藥物이 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. 材料

1) 藥材

① 藥材의 構成

본 실험에 사용된 약재는 경희대학교 한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 실험에 사용된 韓藥物은 黃連解毒湯과 黃連解毒湯을 구성하는 單味들이다. 黃連解毒湯은 慶熙醫療院 韓方製劑解說集[39]을 근거로 하였다.

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

Table 1. Names of Herbs Used in the Experiment

Herb Name	Botanical Name
黃連解毒湯	Hwangryunhaedoktang
黃連	Coptidis Rhizoma
梔子	Gardeniae Fructus
黃柏	Phellodendri Cortex
黃芩	Scuteliariae Radix

Table 2. Prescription of Hwangryunhaedoktang

Herb Name	Botanical Name	Dose(g)
黃連	Coptidis Rhizoma	15
梔子	Gardeniae Fructus	15
黃柏	Phellodendri Cortex	15
黃芩	Scuteliariae Radix	15
Total amount		60

② 藥材의 抽出

각 약물을 경희의료원 약재과로부터 획득하여 각 50g 에 300ml의 3차 증류수를 더한 후 2시간 동안 중탕기에서 끓인다. 추출액을 상온에 방치하여 냉각시킨 후 여과지를 통과시켜 여과액을 구하였다. 얻어진 여과액을 둥근바닥 플라스크로 옮기고 감압 하에서 회전식 증발기로 50ml 정도가 되도록 물을 제거하였다. 이것을 -80℃로 냉각시켜 얼린 후 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) 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 neuroblastoma 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 1×10^6 개씩 배양하였다. 세포배양조건이 37℃, 5% 의 CO_2 조건에서 대개 2-3일 정도씩 소요되었다.

2) Hypoxia와 Reoxygenation

Hypoxia 조건은 hypoxic chamber(CO_2 5% N_2 95%)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[40]. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT formazan(3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 세포의 능력을 이용하는 검사법이다. MTT formazan의 흡광도는 540nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 산화환원력을 반영한다.[41]

96 웰플레이트에 웰당 100㎕ 의 배양액과 함께 N2a 세포 1×10^4개를 준비하여 약 24시간 동안 산소의 공급 하에서 37℃로 배양하고 韓藥物 추출액을 각 농도로 처리하였다. 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. 세포 내에 형성된 포마잔(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) 韓藥物이 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 않지

만, 세포막이 손상을 입을 경우 세포 밖으로 분비되어 배지내로 방출된다. 방출된 LDH는 젖산과 NAD^+ 로부터 피루빈산과 NADH를 생성시키며, 이때 Nad+가 산화됨에 따라 340nm에서 흡광도가 변화하는 것으로부터 세포밖에 방출된 LDH의 활성도를 측정할 수 있다[42]. 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 nm에서 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

韓藥物이 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 sample의 개수가 5로서 30미만이므로 base line에 대하여 각 dose 별로 Mann-Whitney U test를 시행하였고, 결과의 통계적 유의성 여부는 $p<0.05$ 수준에서 판단하였다.

Ⅲ. 結 果

1. 韓藥物의 收得率

각 약재로부터 동결건조에 의해 얻어진 최종 분말의 수득율을 구하여 다음의 표(Table 3.)에 나타내었다. 黃連解毒湯의 경우는 수득율이 확보되지 않았으나 실험결과에 영향이 없을 것으로 사료되어 未定으로 두었다. 梔子의 경우 수득율이 37.7%로 가장 높게 나타났으며 黃柏의 경우 4.65%로 가장 낮게 나타났다. 이들 차이는 약재마다 함유되어 있는 전분 등의 함유성분이 달라 발생하는 것으로 추정되나 약재 간 성분의 차이는 확인하지 않고 추후 실험을 진행하였다.

Table 3. The Yield of Extraction from Herbs

Herb Name	Rate of Extraction(%)
黃連解毒湯	N. D.
黃連	15.6
梔子	37.7
黃柏	4.65
黃芩	15.3

N.D. means not determined.

2. 成績

1)事前 實驗

Hypoxia 상태에 있는 세포에 韓藥物을 투여할 경우 세포에 미치는 약물의 효과가 매우 복잡한 양태로 진행될 수 있다. 이런 경우 韓藥物은 복합혼합물이기 때문에 한 함유물질에 의해서는 hypoxia의 세포에 대한 보호효과를 보여주기도 하지만 한편 다른 화합물에 의해서는 세포독성 등도 동시에 보여줄 수 있기 때문이라고 생각된다. 따라서 hypoxia 상태의 세포에 미치는 약재의 보호효과를 평가하기 위해 정상세포에 미치는 약재 자체에 의한 독성효과를 감안하여 보호효과를 고려하는 것이 좀 더 나은 실험방법이라 생각된다. 이를 위해 韓藥物이 正常상태의 N2a 細胞에 미치는 효과를 파악하기 위한 사전 실험을 실시하였다.

① 韓藥物이 正常의 N2a 細胞에 미치는 效果

韓藥物이 正常的인 狀態에서의 細胞에 미치는 효과를 조사하기 위하여 추후 실험조건에서의 가장 높은 농도인 1mg/ml의 농도를 사용하였다. 각 韓藥物 마다 1mg/ml 의 농도에서 MTT assay와 LDH assay를 실시하여 그 결과를 각기 Fig. 1(A)와 (B)로 나타내었다. Fig. 1(A)에 나타난 바와 같이 MTT assay에서의 세포 환원활성도는 梔子를 제외하고 모두 정상군에 비하여 낮아졌으며, 이들로 구성된 黃連解毒湯은 정상치보다는 낮지만 다른 약물들에 비해 높은 수치를 보여준다. 이는 黃連解毒湯을 구성할 때 각 약재의 농도가 1mg/ml가 아니라 각기 1/4로 희석되는 측면이 있기 때문에 나타난 희석효과일 수도 있다. 혹은 黃連解毒湯의 효과는 黃芩, 黃柏, 黃連 등의 감소효과가 梔子의 증가효과에 의해 상쇄되었기 때문일 수도 있다. 이 점은 현재의 연구에서 명확하지는 않으나 흥미로운 점이다. Fig. 1(B)에서도 이와 비슷하게 黃連解毒湯의 LDH assay 값보다 黃芩과 黃柏의 수치가 높았으나 黃連과 梔子는 낮은 수치를 보였다.

Fig. 1(A)와 (B)에 보이는 수치들은 각 약재들이 1mg/ml의 농도에서 얻어진 값들이며 이 결과는 hypoxia와 hypoxia- reoxygenation에 미치는 韓藥物의 용량의존도 결과를 분석할 때 사용하고자 한다. 즉 黃芩의 경우 1mg/ml에서의 효과를 논할 때 각기 실제 약효는 MTT assay에서는 관측치보다 약간 높은 것으로 평가되어야 하고 LDH assay에서는 실제 값이 약간 낮은 것으로 평가되어야 한다.

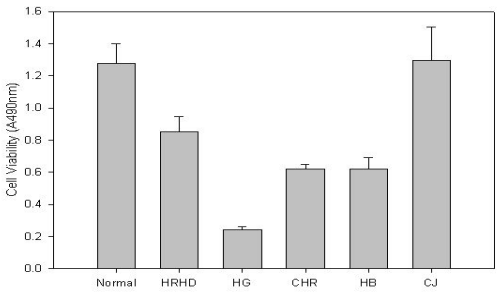


Fig. 1(A). Cell viability of mouse neuroblastoma 2a cell influenced by herbal extracts in normoxic condition
Note. HRHD: 黃連解毒湯, HG: 黃芩, CHR: 黃連, HB: 黃柏, CJ: 梔子

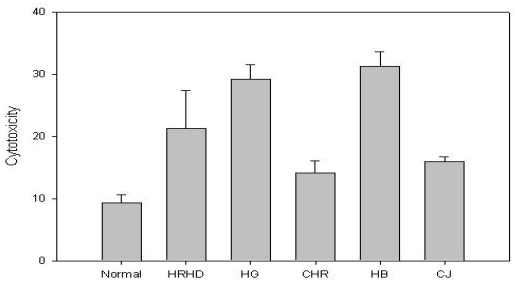


Fig. 1(B). Cytotoxicity of mouse neuroblastoma 2a cell influenced by herbal extracts
Note. HRHD: 黃連解毒湯, HG: 黃芩, CHR: 黃連, HB: 黃柏, CJ: 梔子

② Hypoxia, 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 24시간 동안 산소를 차단하였을 경우(H24), 세포의 증식속도에 아무런 영향을 주지 않았음이 관측되었으며, 산소의 차단이 48시간(H48)에 이르면 세포의 증식은 억제되어 같은 조건의 정상상태(N48)에 비해 세포가 25% 이상 감소되었음을 보여주고 있다. Hypoxia 조건에서 LDH assay로 확인한 결과는 Fig. 2(B)와 같이 48시간 산소차단 시에 정상군에 비해 2.3배 이상 LDH활성이 증가되어 세포막의 심각한 손상이 일어났음을 보여준다.

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

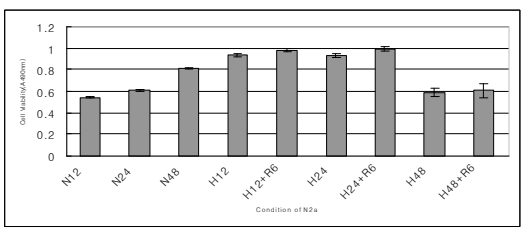


Fig. 2(A). MTT assay of hypoxia-reoxygenation injured mouse neuroblastoma 2a Cell.
N: normal condition, H: hypoxia condition, R: reoxygenation condition

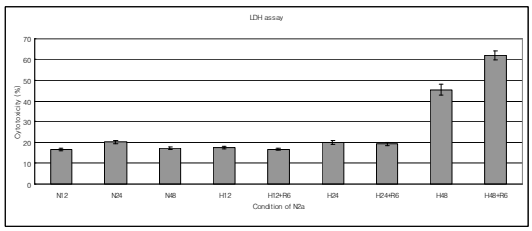


Fig. 2(B). LDH assay of hypoxia-reoxygenation injured mouse neuroblastoma 2a Cell.
N: normal condition, H: hypoxia condition, R: reoxygenation condition

2) 黃連解毒湯이 細胞損傷과 保護에 미치는 效果

黃連解毒湯은 hypoxia조건의 LDH assay에는 0에서 200μg/ml 사이에서는 별다른 변화가 없었으나, 200과 500, 1,000μg/ml 에서 유의한 효과증대가 관찰되었으며, reoxygenation 조건의 LDH assay에는 0-500μg/ml까지는 효과를 나타내지 않다가 500, 1000μg/ml 에서 뚜렷한 효과가 있었다.Reoxygenation 조건의 MTT assay에는 별다른 차이가 없었으며, hypoxia조건의 MTT assay에서는 50μg/ml부터 유의한 효과를 나타내어 이후 농도가 높아질수록 비례하여 세포환원 활성도가 증가하였다.

Table 4. Effect of Hwangryunhaedoktang on Cellular Viability and Cytotoxicity of Hypoxia- Reoxygenation Injured Mouse Neuroblastoma 2a Cell

(unit: μg/ml)

dose / assay	0	50	100	200	500	1000
LDHH	42.16±8.23	32.82±6.82	34.12±5.07	30.36±4.84 *	29.06±4.64 **	21.07±3.39 **
LDHHR	53.83±0.36	59.85±10.13	52.88±10.21	54.82±3.82	40.01±6.11 **	30.61±7.37 **
MTTH	0.44±0.07	0.53±0.03 *	0.58±0.06 **	0.61±0.06 **	0.70±0.06 **	0.74±0.08 **
MTTHR	0.59±0.07	0.61±0.03	0.62±0.06	0.62±0.06	0.62±0.06	0.56±0.08

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

3) 黃連解毒湯의 單味들이 細胞損傷과 保護에 미치는 效果

① Hypoxia 조건의 N2a 세포에 미치는 韓藥物의 효과: LDH Assay

Neuroblastoma 2a 세포주에 가해진 hypoxia에 의한 손상에 黃連 등 黃連解毒湯에 포함된 4개 單味가 미치는 효과를 연구하기 위하여 hypoxic 조건의 세포배양액에 유출된 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성을 조사하였다. 각 韓藥物은 최소 50μg/ml 에서 1,000μg/ml 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 韓藥物이 투여되지 않았을 때를 포함하여 그 결과는 Table 5에 요약되었다.

각 약물 0μg/ml 에 보이듯이 정상적인 조건에 비해 hypoxia를 유발한 경우 세포의 약 42%가 세포막 손상으로 인해 손상된다. Hypoxic 조건에 의해 유발된 세포손상에 대해 실험에 사용한 모든 약재는 어느 정도 LDH의 활성감소, 즉 세포보호효과를 나타내고 있다.

韓藥物의 농도의존 양태는 매우 다양하다. 黃連, 黃芩은 낮은 농도에서 세포보호효과를 보인 반면, 梔子는 오히려 낮은 농도에서 세포독성을 보이다가 200μg/ml 이상부터 세포보호효과를 보였다.

黃柏은 500μg/ml 이상의 높은 농도에서만 뚜렷한 세포보호효과를 보였고, 黃芩은 오히려 500μg/ml 이상에서 세포독성을 나타내었다. 특히 梔子는 200μg/ml 이상부터 농도에 비례하여 세포보호효과를 나타냈는데, 1000μg/ml에서 9.28±2.41%로 본 실험에 사용된 처방 및 單味 중 가장 우수한 효과를 보였다.

농도에 비례하는 경향을 뚜렷이 보였으므로 농도를 더 상승시켰을 때 세포보호효과가 어떻게 나타나는지 추가적으로 연구할 만한 가치가 있다고 보인다.

그 외 黃連과 黃芩도 농도에 따라 효과가 달라지기는 하지만 최대보호효과만을 고려하면 각기 17.59±7.93%, 16.61± 1.37%로 우수한 보호효과를 보였다.

黃芩은 낮은 농도에서는 보호효과를 보였지만 농도가 높아짐에 따라 효과가 오히려 감소하여 세포독성을 나타내었는데 사전실험에서도 1000μg/ml에서 높은 세포독성을 보였다는 것을 감안하면, 낮은 농도에서는 보호효과를 보이는 성분이 주로 작용하지만 높은 농도에서는 세포독성을 보이는 다른 성분의 효과가 상승함으로써 세포독성이 나타난 것으로 생각된다.

그런데 높은 농도에서 虛血 상태의 세포에서는 독성을 보이지만 再灌流 상태에서는 세포보호효과를 나타낸다는 것은 흥미로운 결과이다.

본 실험에서 보인 바와 같이 hypoxia에 의한 세포손상모델에서는 모든 약물이 농도에 따라 어느 정도 유의한 보호효과를 보였다. 하지만 실험에서 다루어진 모든 농도에서 효과를 보인 약물은 없었다.

Table 5. Effect of Herbs on Cytotoxicity of Hypoxia Injured N2a Cell(LDHH)

(unit: μg/ml)

dose / herbs	0	50	100	200	500	1000
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
CJ	23.26 ±5.25	28.00 ±6.71 **	26.51 ±4.34 **	19.80 ±6.90 **	13.18± 7.14**	9.28±2. 41**
HB	52.49 ±3.19	54.10 ±2.18	53.57 ±1.58	46.58 ±3.54	30.09± 4.22**	19.59± 1.37**
HG	25.01 ±2.89	16.61 ±1.37 **	17.96 ±1.16 **	20.02 ±1.42 **	30.25± 1.19*	41.57± 1.01**

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

Note. CHR: 黃連, CJ: 梔子, HB: 黃柏, HG: 黃芩

② Hypoxia 조건의 MTT Assay

黃連 등 黃連解毒湯에 포함된 4개 單味가 neuroblastoma 2a 세포주의 hypoxia에 의한

세포환원활성 감소에 미치는 효과를 연구하기 위하여 3-(4,5-dimethyltiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 투여하여 세포에 축적된 formazan의 흡광도를 조사하였다.

각 약물은 최소 50㎍/ml 에서 1,000㎍/ml 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 약물이 투여되지 않았을 때를 포함하여 그 결과를 Table 6과 Fig. 5에 보였다.

약물 투여 후의 활성도가 약물 투여 전에 비해 향상된 것은 黃連과 梔子 뿐이다. 黃柏은 변화가 없었고, 黃芩은 오히려 모든 농도에서 부정적인 효과가 나타났다.

黃連은 낮은 농도에서는 좋은 세포환원 활성효과를 보였으나 농도가 높아지면서 효과가 점차 감소하는 경향을 보였다.

이와 반대로 梔子는 낮은 농도에서는 효과가 없지만 대체로 약물의 농도가 증가함에 따라 지속적인 활성도 증가경향을 보였으며, 500, 1000㎍/ml의 높은 농도에서는 유의한 효과를 나타내었다. 黃連은 100㎍/ml 까지는 활성도 증가를 보이고, 농도가 100㎍/ml 을 초과해서는 약물 농도에 비례하여 활성도가 감소하는 현상을 보였다.

이러한 현상은 黃連의 상반되는 약효성분을 가진 물질이 100㎍/ml를 기점으로 효과의 우열을 달리하거나, 사전실험에서 나타난 독성이 농도가 높아짐에 따라 나타나기 때문으로 추정된다. 梔子가 1000㎍/ml 에서 0.59±0.08를 기록하여 가장 높은 활성도를 보였고, 黃連도 50㎍/ml 에서 0.57±0.03를 기록하였다.

본 실험에서 hypoxia에 의한 세포손상 모델의 세포환원활성도는 黃連과 梔子가 농도에 따라 효과를 나타냈으나, 黃柏은 변화가 없었고, 黃芩은 모든 농도에서 부정적인 효과를 보였다.

Table 6. Effect of Herbs on Cellular Viability of Hypoxia Injured N2a Cell(MTTH)

(unit: ㎍/ml)

herbs \ dose	0	50	100	200	500	1000
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
CJ	0.49± 0.04	0.52± 0.04	0.51± 0.04	0.54± 0.09	0.57± 0.05*	0.59± 0.08*
HB	0.50± 0.07	0.46± 0.07	0.42± 0.07	0.41± 0.04	0.51± 0.07	0.48± 0.15
HG	0.73± 0.05	0.49± 0.01**	0.62± 0.05*	0.60± 0.06*	0.41± 0.06**	0.45± 0.02**

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

Note. CHR: 黃連, CJ: 梔子, HB: 黃柏, HG: 黃芩

③ Hypoxia-Reoxygenation 조건의 LDH Assay

黃連 등 黃連解毒湯에 포함된 4개 單味가 neuroblastoma 2a 세포주의 reoxygenation에 의한 손상에 미치는 효과를 연구하기 위하여 세포배양액에 유출된 lactate dehydrogenase (LDH)의 활성을 조사하였다. 각 약물은 최소 50μg/ml에서 1,000μg/ml 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 약물이 투여되지 않았을 때를 포함하여 그 결과를 Table 7과 Fig. 6에 보였다. Fig. 3의 dose 0에서 보이듯이 reoxygenation을 유발한 경우 hypoxia 조건의 세포에 비하여 약 54%의 세포가 세포막 손상으로 인해 사멸한다.

Reoxygenation 조건에 의한 세포손상에 대해 실험에 사용한 모든 약재는 대부분 세포보호효과를 보이고 있으며 그 양태는 hypoxia 조건에 비해서 일관성이 있다. 黃柏은 모든 농도에서, 黃芩과 梔子는 각각 500, 200μg/ml의 농도만 제외하고는 모두 좋은 효과를 보였다. 黃連은 1000μg/ml를 제외한 모든 농도에서 뛰어난 효과를 보였는데, 200부터 500, 1000μg/ml으로 농도가 높아지면서 점차 세포보호효과와는 반비례하는 양상을 보였다. 이것은 사전실험에서 나타난 것처럼 고농도에서 높은 세

포독성을 나타내기 때문인지, 아니면 黃連의 세포보호효과를 일으키는 성분이 낮은 농도에서 보다 뛰어난 작용을 하기 때문인지는 추가 실험이 필요할 것으로 보인다.

보호효과를 보인 약물 중에 黃柏과 梔子는 실험에 사용한 전 범위의 농도에서 같은 정도의 효과만 보이며 농도의존적인 양태를 보이지 않았는데, 이는 이들 약물의 유효성분이 매우 potency가 강해 50μg/ml에서 이미 최고의 효과를 보였기 때문으로 보인다. 즉 이들 약물은 낮은 농도에서도 보호효과를 보이는 성분이 있던지 혹은 유효성분의 함량이 매우 높음을 의미하여 약학적인 관점에서도 고려해 볼만한 약물이다. 이 중 黃連, 黃芩은 우수한 보호효과를 보이며 黃連은 15.83±0.94%(200μg/ml)로 가장 뛰어난 효과를 보였고, 黃芩도 17.92±1.82%(50μg/ml)의 좋은 효과를 보였다.

본 실험에서 보인 바와 같이 reoxygenation에 의한 세포손상모델에서는 黃連解毒湯을 구성하는 모든 약물이 우수한 보호효과를 보였다. 특히 모든 농도에서 좋은 효과를 보인 약물은 黃柏이었다.

Table 7. Effect of Herbs on Cytotoxicity of Reoxygenation Injured N2a Cell(LDHHR)

(unit: μg/ml)

dose / herbs	0	50	100	200	500	1000
CHR	53.83 ±0.36	33.07± 4.68**	21.45± 2.69**	15.83± 0.94**	22.59± 4.49**	51.87± 7.20
CJ	49.92 ±2.41	44.11± 1.05*	31.10± 0.27**	44.52± 0.87	37.71± 2.62*	39.64± 1.81*
HB	72.47 ±8.25	60.00± 0.65**	59.34± 0.35**	62.65± 0.53**	40.87± 1.38**	50.80± 2.91**
HG	35.07 ±2.37	17.92± 1.82**	18.55± 0.84**	21.20± 0.48**	25.08± 0.40	24.54± 0.31*

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

Note. CHR: 黃連, CJ: 梔子, HB: 黃柏, HG: 黃芩

④ Hypoxia-Reoxygenation 조건의 MTT assay

黃連 등 黃連解毒湯에 포함된 4개 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 조사하였다. 각 약물은 최소 50μg/ml에서 1,000μg/ml 사이의 5개의 농도로 투여되었으며 그 결과는 Table 8과 Fig. 7에 보여졌다.

reoxygenation 조건에 의한 세포환원활성 감소에 대해 실험에 사용한 약재는 매우 다양한 양태의 반응을 보인다. 黃連은 약물 투여 이후 환원활성도가 감소하여 모든 농도에서 투여이전의 수준보다 명확히 낮게 나타났다. 黃芩은 200μg/ml 이상의 농도에서 역시 투여이전 보다도 낮게 나타났는데, 농도에 비례하는 경향을 보이진 않았다. 黃柏은 100μg/ml 이상부터 농도에 따라 환원활성도가 비례하였으며 1000μg/ml에서 유효한 반응을 보였다. 梔子 역시 100μg/ml 이상부터 농도에 따라 환원활성도가 비례하였으나 본 실험에서 측정한 농도에서는 유효한 반응을 보이지는 않았다. 黃柏과 梔子는 약물 농도 증가에 따라 지속적인 활성도 상승을 보여, 유효성분이 완만한 potency를 지님을 나타내었다. 黃連은 50μg/ml 에서 이미 부정적인 효과를 보여 이후 농도에 무관하게 비슷한 정도의 환원활성 억제의 효과를 보였다. 이것은 환원활성을 억제하는 성분이 매우 강한 potency가 있거나, 혹은 해당 성분의 함량이 매우 높음을 의미한다.

본 실험에서 보인 바와 같이 reoxygenation에 의한 세포손상 모델의 세포환원활성도는 약물 투여 후 고농도의 黃柏을 제외하고는 대부분 효과가 없거나 또는 저하되는 경향을 보였다.

Table 8. Effect of Herbs on Cellular Viability of Reoxygenation Injured N2a Cell(MTTHR)

(unit:㎍/ml)

dose / assay	0	50	100	200	500	1000
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**
CJ	0.57± 0.08	0.52± 0.05	0.51± 0.06	0.53± 0.04	0.55± 0.04	0.57± 0.10
HB	0.48± 0.05	0.42± 0.07	0.45± 0.03	0.45± 0.05	0.52± 0.06	0.58± 0.07*
HG	0.62± 0.05	0.56± 0.05	0.59± 0.10	0.49± 0.03**	0.21± 0.01**	0.23± 0.05**

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

Note. CHR: 黃連, CJ: 梔子, HB: 黃柏, HG: 黃芩

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
HRHD	○	△	○	△
CHR	△	○	○	X
HG	○	△	X	X
HB	△	○	△	△
CJ	△	○	△	△

Note. CHR: 黃連, CJ: 梔子, HB: 黃柏, HG: 黃芩
○ means positive effect.
△ means no change or partial effect.
X means negative effect.

Ⅳ. 考 察

痴呆는 의식이 명료한 상태에서 전반적인 인지기능의 장애를 나타내는 질환으로 보통 만성, 또는 진행성 뇌질환에 의해 발생되며, 기억, 사고, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능에 장애가 나타나는 증후군이다[43]. 최근에는 痴呆의 대부분을 차지하는 알츠하이머형 痴呆와 혈관성 痴呆의 병리에 산소 부족과 산화적 스트레스가 중요한 병리과정으로 대두되고 있다[48]. 혈관성 痴呆는 腦虛血에 의한 괴사와 再灌流시에 나타나는 산화성 손상에 의해 뇌세포가 파괴되며, 알츠하이머형 痴呆는 활성산소 과잉과 항산화능력의 저하에 의한 뇌세포의 파괴가 중요한 병리기전으로 제안되고 있다[44].

병소부위에서 발견되는 병리학적 소견을 중심으로 살펴본 알츠하이머형 痴呆의 유발원인을 살펴보면 amyloid β protein (이하 Aβ)의 침착[45]과 과인산화 타우 단백질(hyperphosphrylation tau protein)의 침착에 의한 것이 대표적인데[46,47], 모두 활성산소에 의한 산화성세포손상이 중요한 역할을 하는 것으로 연구되고 있다.

血管性 痴呆는 腦血管의 病變으로 腦의 器質的 障碍가 발생하고 그로 인해 초래된 知的機能 저하가 지속되는 상태를 말하는데 대부분 腦卒中 後에 나타난다. 腦卒中에 의한 腦神經細胞의 損傷은 虛血로 인한 산소부족과 再灌流시에 나타나는 활성산소로 나눌 수 있다. 뇌의 虛血상태로 인해 야기된 산소 부족은 산화적 인산화과정을 방해하며 ATP 생성을 저해한다. 그 결과 세포의 이온 펌프 능력이 감소되고 칼륨이 세포외로 유출되어 탈분극화가 일어나고 신경세포내로 칼슘이 유입되며, 칼슘의 유입은 미토콘드리아 기능에 장애를 가져오고 그로 인해 ATP합성은 더욱 저하되면서 결국 단백질, 핵산, 인지질을 가수분해하는 효소들을 활성화한다. 특히 인지질이 분해되면서 자유기가 생성되고, 지질의 과산화는 腦虛血 발생시 조직손상과 신경세포 괴사를 유발하는 중요한 원인이 된다고 알려져 있다[48,49]. 再灌流시의 손상은 산소가 조직으로 재공급될 때 발생하는 활성산

소로 인한 산화성 손상 때문인데 腦虛血로 인한 손상보다 더욱 강하게 일어난다[50,51].

韓醫學에서는 痴呆에 대하여陳[52]과 錢[53]은 呆病, 張[54]은 [景岳全書]에서 痴獃라고 표현하고 補心脾 위주의 治法을 강조하며 七福飮, 大補元煎을 활용하였고, 內經과 歷代醫書에서도 健忘 등으로 유사한 내용을 언급하였다[55,56]. [石室秘錄][52] 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][53]에서는 開鬱逐痰하고 健胃通氣하여 祛痰시켜는 處方으로 洗心湯을, [丹溪心法][57]에서는 健忘에 歸脾湯, 定志丸을 處方으로 提示하였다. [東醫寶鑑 · 健忘門][58]의 加減固本丸의 條文에 中風後健忘이라고 하여 風門의 二蔘丹을 處方으로 提示하였는데 이것은 혈관성 痴呆의 처방으로 볼 수 있으며, 그 밖에 體質이나 辨證에 따라 다양한 處方이 사용되어지고 있다.

최근 中醫學에서 痴呆를 辨證施治하여 治療하는데, 그 原因은 痰飮, 稟賦不足, 肝腎不足, 心腎不交, 七情傷 등으로 요약되며[59], 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 등이다[60]. 治法으로는 老人性과 血管性 痴呆 모두에 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등의 방법을 적용하기도 하고, 本虛表實로서 血瘀, 痰濁, 內風, 邪熱 등의 원인을 제시하고 呆病과 健忘을 근거로 하여 치료하고 있으며, 노인성 痴呆와 혈관성痴呆로 구분하여 노인성 痴呆에는 補腎塡髓, 益智淸腦, 補益肝腎의 治法을, 혈관성 痴呆에는 化痰活血, 淸熱解毒의 治法을 응용하기도 한다[60].

최근 韓醫學의 痴呆연구를 보면, 加減固本丸[17], 天王補心丹[16], 石菖蒲[14], 日黃連[10], 香附子[11] 등이 PC-12 cell에서 AchE, NOsⅡmRNA, APP, PS-1 PS-2의 발현과 AChE의 활성을 억제하고, Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 백서의 혈청 glucose 증가, uric acid의 감소, AcheE 활성도 감소 및 Morris water maze에서 기억력 개선 효과가 있음을 보고하였고, 이[80]는 遠志와 石菖蒲의 혼합추출액이 APP의 pCT105로 유도된 SK-N-SH 세포주인 neuroblastoma세포에서 痴呆와 동일한 신경세포의 細胞死 유도에 대한 억제효과를 보고하였다. 채 등[81]은 山査肉이 PC-12 cell에서 AchE, IL-1β, IL-6, APP, GFAP mRNA의 발현과 AChE의 활성을 억제하고, CT105로 유도된 Alzheimer's Disease 병태모델 흰쥐의 기억력을 개선하고 Micoglial cell에서 IL-1β, TNF-α의 발현과 ROS, NO의 생산을 억제하였으며 뇌조직의 虛血상태를 개선하고 虛血로 인한 뇌조직 손상을 억제하는 효과가 있음을 보고하였다. 임상실험에서는 조[21]와 김[22]이 초기 DAT 환자에게 6개월과 9개월간 調胃升淸湯을 투여하고 치료전후의 K-DRS, ERP를 측정한 연구에서 調胃升淸湯의 유효성을 보고하였고, 류[15]는 동물실험에서 흰쥐의 뇌혈관을 폐쇄 후 再灌流 시켰을 때 石菖蒲를 투여한 경우가 그렇지 않은 경우보다 뇌세포의 사멸이 현저히 억제되었다고 보고하였다.

한편, 이[13]는 抗痴呆 약효를 나타내는 천연물 연구에서 吳茱萸에서 분리된 성분 DHED는 AChE 저해 활성을 가지며, 인지 기능 손상의 개선과, CBF(cerebral blood flow)활성을 증대시키는 효능으로 인해 알츠하이머 痴呆와 혈관성 痴呆에 있어서 주목할 만한 물질이라 하였고, 玄胡索으로부터 얻은 알칼로이드인 Propine 1은 AChe 저해 효능이 tacrine 유도체인 velnacrine과 거의 대등한 것으로 나타나 痴呆 치료제로서의 연구 가능성을 보인다고 하였다. 그리고 AChe 저해 활성을 보이는 것으로 蘇木, 黃連, 枇杷, 金銀花, 牧丹皮, 竹茹, 釣鉤藤, 夏枯草, 蘇木, 陳皮, 麥芽, 黑豆, 乾地黃, 熟地黃 등을 보고하였으며, Aβ 독성을 차단하는 것으로 藿香, 茵蔯蒿, 楡根皮, 車前子, 當歸를 보고하였고, Aβ 저해 활성을 보인 것으로 天麻, 厚朴, 丹參, 玄胡索, 天南星을 보고하였다.

老化란 인간의 생성과 성장 및 성숙 과정 후 시간의 흐름에 따라 나타나는 형태적, 기능적인 쇠퇴로 사망에 귀착되는 생리적인 현상을 말하는데, 老化 과정의 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았으나, 크게 유전학설(genomic theory)[23]과 에러설(error theory)[24], 그리고 최근에 주목을 받고 있는 자유유리기설(free radical theory)이 있다[25]. Harman은 老化 과정이란 산화성 손상이 세포와 조직에 축적되기 때문이라는 老化의 활성산소설을 주장하였는데, 산소를 소비하는 모든 생물체는 산소에서 유래된 자유유리기에 의하여 세포내 산화성 손상이 축적되어 질병과 老化가 초래된다는 것이다[61].

老化에 대한 한의학적 원인은 陰陽學說, 形神說, 氣血學說 및 腎氣說 등이 있는데, 인체의 쇠퇴를 陰陽, 臟腑, 氣血, 經絡 및 精神의 변화로 보고 있다[62].

老化에 대한 최근의 한약에 대한 연구는 單味로서 Nitric Oxide(NO) synthase활성을 유도하여 NO생성, SOD와 Catalase 등의 활성유도를 촉진시키며 또한 세포내 자유기를 제거하는 항산화기능을 보인 人蔘[27]과, 50μg/mL 농도에서 90%이상 강한 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거활성을 보인 訶子, 黃芩, 百合, 蘇木, 檳榔, 皁角子, 五倍子, 栗皮, 枝具子, 玄之草, 草豆寇, 大黃, 地楡, 楡白皮 및 苦練皮 등 15종, 80% 이상의 높은 소거활성을 보인 釣鉤藤, 蓮子肉, 補骨脂, 續斷, 厚朴, 丹參, 蜀椒, 肉桂, 大薊, 狗脊, 良薑 및 赤灼藥, 樺皮, 營實 등 14종, 그리고 10 μg/mL 농도에서 80%이상 소거활성을 보인 訶子, 檳榔, 蘇木, 栗皮, 蓮子肉, 五倍子, 地楡 및 樺皮 등 8종과 60% 이상 소거활성을 보인 楡白皮, 肉桂, 大薊 및 良薑 등 4종이 확인되었다[28]. 복합처방으로는 延年益壽不老丹이 老化촉진 흰쥐에서 항산화 증진 효과가 있었고[63], 補中益氣湯과 六味地黃湯이 老化촉진 흰쥐에서 간장 내 지질과 산화를 억제하고, 항산화효소의 활성을 증가시킨다는 보고가 있었으며[64], 五子地黃飮子가 활성산소의 생성과 老化물질의 축적을 막아 抗老化의 효과가 있을 것이라는 보고가 있었고[29], 二精丸이 흰쥐의 생체 내 산화 스트레스를 조절하여 老化과정에서 SMP-30이 저발현되는 것을 억제했다는 보고가 있었고[30], 地黃飮子와 加味地黃飮子가 배양 해마신경세포에 대해 산소자유기의 산화성 손상에 대한 방어 작용이 있어 腦細胞의 老化 예방 및 치료에 대해 효과적으로 활용할 수 있을 것이라는 보고가 있었으며[65], 鎭肝熄風湯 및 加味鎭肝熄風湯 추출물은 XO/HX의 산화성 손상을 효과적으로 방어하여 산소자유기에 의한 老化촉진을 예방할 수 있을 것이라는 보고도 있었다[66].

黃連解毒湯은 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子로 구성된 淸熱瀉火解毒의 대표적인 處方으로, 傷寒의 大熱과 煩燥로 인하여 잠자지 못하고, 혹은 나은 뒤에 술을 마셔 다시 심해진 증과 一切의 熱毒을 다스린다[67]. 黃連解毒湯을 구성하는 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子 각각의 효능을 보면, 黃連은 君藥이 되어 心火를 瀉하고 겸하여 中焦의 火를 瀉하며, 黃芩은 肺熱을 瀉하고 上焦의 火를 瀉하여 黃連의 작용을 협조하고, 黃柏은 下焦의 火를 瀉하며 君藥인 黃連의 효과를 도와 臣藥이 되며, 佐藥인 梔子는 三焦의 火를 通瀉하고 熱을 이끌어 아래로 향한다[68]. 또, 黃連은 性味가 苦寒하며, 心, 肝, 肺, 胃經에 入하고, 火를 풀고 濕을 제거하며 解毒하여, 流行性熱病, 장티푸스, 煩悶, 痞滿嘔逆, 細菌性 痢疾, 熱性泄瀉, 肺結核, 嘔吐, 鼻出血, 下血, 消渴, 疳積, 百日咳, 咽喉의 浮腫 및 疼痛, 火眼, 口瘡, 癰疽 瘡毒, 濕疹, 火傷 등을 치료하며 抗菌, 抗原蟲, 抗眞菌, 降壓作用, 利膽作用, 平滑筋弛緩作用 등의 약리작용이 있고, 黃芩은 性味가 苦寒하며, 心, 肺, 膽, 大腸, 小腸經에 入하고, 實火를 瀉下하고 濕熱을 제거하며 止血하고 胎를 안정시켜서, 심한 熱로 인한 煩渴, 肺가 熱하여 나는 기침, 濕熱로 생긴 泄瀉와 痢疾, 黃疸, 熱淋, 崩漏, 目赤腫痛, 胎動不安, 癰腫을 치료하

고, 抗炎, 抗菌, 抗眞菌, 解熱, 降壓, 對血脂血糖作用, 利膽作用, 解痙作用, 鎭靜作用 등의 약리작용이 있고, 黃柏은 性味가 苦寒하며, 腎 , 膀胱, 大腸經으로 入하고, 熱을 내리고 濕한 것을 燥하게 하며 火를 瀉下하고 解毒하는 효능이 있어서, 더위에 의한 下痢, 糖尿, 黃疸, 夢精, 淋濁, 痔疾, 便血, 赤白 帶下, 骨蒸勞熱, 目赤腫痛, 瘡瘍腫毒을 치료하고, 抗菌, 抗眞菌, 收斂 消炎, 血壓, 血糖降下作用, 血小板凝集抑制作用 등의 약리작용이 있고, 梔子는 大苦大寒하며, 心, 肝, 肺, 胃經에 入하고, 熱을 제거하고, 火를 내리며 凉血하는 효능이 있어서, 熱病, 虛煩, 不眠症, 黃疸, 淋病, 消渴, 吐血, 鼻出血, 血痢, 血尿, 熱毒, 瘡瘍, 捻挫의 痛症을 치료하고, 解熱, 黃疸消退, 止血, 抗菌, 抗眞菌, 鎭靜, 降壓 등의 약리작용이 있다[69-72].

그동안 黃連解毒湯을 이용한 실험이나 임상연구들을 보면, 김[73]은 진통, 소염, 해열작용을 보고하였고, 김[74]은 고혈압, 고지혈증에 효과가 있다고 보고하였으며, 류[75]는 중풍환자의 불면증에 대한 효과를 보고하였고, 이[76]는 접촉성 피부염에서 黃連解毒湯이 림프구 활성효과가 있음을 보고하였으며, 국[77]은 黃連解毒湯이 자발적 고혈압 흰쥐의 혈압 및 신장기능에 대한 효과가 있음을 보고하였고, 송[78]은 黃連解毒湯이 緬羊赤血球에 대한 면역반응에 효과가 있음을 보고하였으며, 차[36]는 사람의 간 배양 HepG2세포 내 중성지질 합성을 저하시켜서 축적을 억제함으로써 지방간 개선에 효과가 있음을 보고하였고, 정[79]은 體溫 및 血壓降下作用이 있음을, 김[80]은 血栓症 및 高粘度血症에 경구투여에 의해 효과가 있음을 보고하였다.

특히 본 실험과 관련하여서 黃連解毒湯이 당뇨환자의 多發性小梗塞에 뇌혈류량을 증가시킨다는 연구가 있었고[81], 黃連解毒湯이 자유유리기로 인한 지질의 과산화를 억제한다는 연구도 있었으며[37], rat를 이용한 동물실험에서 liver microsome의 효소지질 산화반응을 억제한다는 연구도 있었고[38], 4염화탄소를 rat의 간에 투여한 후 유발된 활성산소 대사 장애를 억제했다는 보고도 있었다[82].

Hypoxia-reoxygenation에 의한 腦神經細胞의 損傷過程은 生體에서 腦虛血과 虛血後의 再灌流에 의한 損傷을 세포실험으로 재현한 모델이다. 腦虛血에 의한 細胞損傷은 산소 공급이 역치 이하로 감소되면 기능상실과 더불어 세포괴사(necrosis)가 나타난다[83]. 대부분 腦 虛血 자체 보다 再灌流시에 산소가 조직으로 재공급되면서 활성산소가 생성되어 조직 손상이 더욱 강하게 일어난다[9]. 활성산소에 의한 腦神經細胞의 손상은 腦 虛血 이후 산소 재공급, 염증, 산화제 사용 등으로 인하여 야기되는데[9], 활성산소에 의한 세포의 피해는 괴사(necrosis)와 자연사(apoptosis)라는 두 가지 형태로 나타난다[84]. 활성산소에 의한 세포괴사(necrosis)는 superoxide anion radical이 연쇄적으로 활성산소들을 생성함으로서 세포막의 인지질에 작용하여 일어난다[51]. 세포괴사(apoptosis)는 특징적으로 세포핵의 변화, 크로마틴의 생화학적 변화를 동반하며, 癌, 腦疾患 등 여러 질병에 영향을 미치는데, apoptosis가 유발되는 과정에 있어 미토콘드리아가 중요한 역할을 한다. 미토콘드리아의 손상 정도에 따라 세포괴사(necrosis)와 세포괴사(apoptosis)가 각각 일어나게 되는데[85], 그 예로 심한 중추 虛血이 유도되면 미토콘드리아가 ATP 생산을 못하게 되어 세포괴사적 세포사멸을 일으키게 되는 반면에, 그 이하의 중추 虛血에서는 미토콘드리아, 사멸막 수용체, 그리고 DNA 효소를 포함하는 산화환원 신호전달의 가능한 표적과 그 신호전달 과정들을 통한 세포괴사적 세포사멸이 유도된다고 알려져 있다[86]. 세포괴사는 세포수축, 단백질 가수분해, 염색질 응축, DNA 분절현상 등과 같은 형태학적 특징들에 의해 확인되는데, 최근에는 미토콘드리아가 세포괴사의 조절자 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다[87,88]. 미토콘드리아는 활성산소를 만들어내는 주요한 원인인 동시에 활성산소의 공격을

받는 주요한 대상으로, 고농도의 활성산소종에 미토콘드리아는 쉽게 노출되고 손상 받게 된다. 손상된 미토콘드리아의 막전위가 감소되면 early apoptosis가 유발되는데, 이러한 기전에 의한 apoptosis는 신경전달 실조와 신경퇴화를 유발하여 알츠하이머형 痴呆를 포함한 신경퇴행성 뇌질환을 초래한다[89].

활성산소를 생성시키는 대표적인 인자로 xanthine oxidase가 보고되고 있는데 xanthine oxidase는 생체 대부분의 조직세포에 분포하고 있으며 세포의 가용성 분획에 주로 존재한다. 이 효소는 중심금속 이온으로서 몰리브덴을 함유하고 있으며 생체 내에서는 주로 산화반응을 촉매하는 것으로 알려져 있다[90,91]. 이 효소들에 의해서 酸化反應이 진행되는 동안 분자상의 효소로부터 superoxide anion이나 hydroxyl radical 같은 활성산소들이 생성된다고 보고되고 있다[89].

再灌流 될 때는 虛血상태에서 세포내에 축적된 hypoxanthine이 xanthine oxidase에 의하여 xanthine과 uric acid로 전환되면서 매우 독성이 강한 superoxide anion radical을 생성하고 연쇄적으로 활성산소들을 생성함으로서 세포막의 인지질을 과산화시켜 막의 구조변형과 기능상실을 유발하므로 결국 조직이 손상된다[49,50].

Hypoxia-reoxygenation에 의한 腦神經細胞의 損傷에 韓藥物이 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 세포 밖으로 분비되므로 LDH의 활성이 줄어들었다면 산화 스트레스로부터 세포막을 보호한 효과, 즉 세포막 파괴로 인한 세포의 괴사를 막는 효과가 있다고 볼 수 있다. MTT assay는 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)가 세포내로 들어가 효소들에 의해 formazan crystal로 환원되는데 이것은 거의 용해되지 않기 때문에 세포내에 축적된다. 이 축적된 양은 세포의 환원능력을 보여주는 것으로 미토콘드리아와 소포체의 능력을 이용하는 검사법이다. 이러한 점에 근거하여 본 실험에서 LDH assay는 hypoxia-reoxygenation에 의한 뇌신경세포의 괴사 정도를 측정하는 방법으로 사용되었고, MTT assay는 산화성 손상을 입은 세포의 항산화능력을 평가하기 위해 사용되었다. MTT assay상의 수치의 증가는 세포의 산화성 손상의 감소와 산화성 손상과정에서 주로 미토콘드리아를 매개로하여 야기되는 apoptosis의 발현을 억제한다고 해석할 수 있다. 전에는 이 결과를 세포가 증식했다는 식으로 해석하기도 했는데[40] 이유는 formazan crystal의 형성이 주로 미토콘드리아에 있는 환원효소에 의한 것이라고 가정했기 때문이다. 미토콘드리아에는 일정량의 효소가 있을 것이고 이 효소양이 증가했다는 것은 미토콘드리아의 수, 즉 세포수가 많다는 의미를 가질 것이고, 따라서 韓藥物의 투여 시 MTT 값이 높게나오면 세포수가 상대적으로 많다, 즉 세포를 보호했다는 뜻으로 해석되는 것이다. 하지만 최근 논문에 큰 변화가 생겼는데 이 환원반응이 미토콘드리아 뿐 아니라 lysosome 등 다른 소포체에 의한 것들도 상당량 있다는 것이다[92]. 이러한 이유로 최근에는 MTT의 증가가 세포보호로 해석되지 않고 세포의 환원활성 능력의 증가로 해석된다. 최근 유[93]는 星香正氣散 加 蒲公英과 그 單味들이 hypoxia와 reoxygenation상태에 미치는 효과에 관해 MTT assay와 LDH assay를 이용하여 연구하였는데, hypoxia와 reoxygenation 조건 모두에서 LDH 값의 감소를 보여 세포보호효과가 있다는 보고를 한 바 있다.

黃連解毒湯과 관련된 기존의 연구에는 老化나 痴呆의 腦神經細胞 손상 중 괴사와 자연사에 대한 黃連解毒湯의 효과를 비교 연구한 것은 없었다. 따라서 본 연구에서는 痴呆의 대부

분을 차지하는 알츠하이머형 痴呆와 血管性 痴呆, 그리고 老化에서 산소 부족과 활성산소에 의한 세포손상이 있다는 점에 근거하여, 이들 韓藥物이 hypoxia에 의한 세포사와 차후의 reoxygenation에 의한 세포사 및 세포환원활성의 저하에 미치는 효과를 검토하여 임상적 효과를 설명할 수 있는 기전을 제공하고자 본 실험을 실시하였다. 아울러 黃連解毒湯을 구성하는 일부 單味에 대하여도 같은 효과를 검토함으로써 韓藥物의 기전에 관한 연구방향을 제시할 뿐 아니라, 임상에 많이 활용되는 處方인 黃連解毒湯을 구성하는 약물을 검색함으로써 개별 약물의 효능 검색을 효과적으로 할 수 있으며, 유효성이 높은 약물을 선별하여 차후 신약 개발에 기초 자료를 제공할 수 있을 것이다.

이에 저자는 사전 실험으로서, Mouse neuroblastoma 2a 세포를 대상으로 韓藥物이 정상세포에 미치는 효과를 조사하였고 hypoxia-reoxygenation이 세포생존과 세포사에 미치는 영향을 조사하였으며, 본 실험으로서 韓藥物이 hypoxia와 reoxygenation의 조건에 의해 나타난 세포손상에 미치는 효과를 조사하였다. 실험의 hypoxia 처리된 경우와 reoxygenation 처리된 경우 모두 세포의 환원활성 (MTT assay)과 세포손상(LDH assay) 정도를 측정하였다.

Hypoxia와 reoxygenation이 세포의 생존과 사멸에 미치는 영향을 조사하기 위한 사전 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 hypoxia 이후 reoxygenation이 이루어질 때 약물처치가 없을 경우 LDH가 다시 증가한 것을 알 수 있다. 이는 생존해 있는 세포의 수가 줄어들었다는 것, 즉 세포가 죽어간다는 것인데 이때 MTT는 별 변화가 없었다. 실험상 죽은 세포는 제거하고 assay를 한 것이기 때문에 세포의 실제 수가 감소했음에도 불구하고 감소하기 전의 formazan 형성능력과 유사한 능력을 가지고 있다는 것은 각 세포당 formazan형성 능력의 증가, 즉 생존한 세포의 환원능력이 향상된 것을 의미한다. 이는 산화성 손상이 세포에 손상을 줄 뿐 아니라 세포의 항산화 능력을 유발한다는 연구결과와 일치한다[89]. 사전실험의 48시간 산소차단에서 세포의 유의한 변화가 나타난 결과에 따라 본 실험에서는 48시간 산소차단 조건을 부여하였다.

본 실험의 결과를 살펴보면, hypoxia조건의 MTT assay에서 黃連解毒湯은 모든 농도에서 양호한 효과가 있는 것으로 나타났는데, 이것은 黃連解毒湯이 hypoxia조건에서 생존한 세포의 환원활성 증가에 효과가 있다는 것이다. 한편 梔子는 일정 농도 이상에서 유의한 효과가 관찰되었는데 일정 농도 이상에서만 효과를 나타내는 유효성분이 존재할 가능성이 있고, 黃連은 일정 농도까지만 양호한 효과를 보이는데 이런 결과는 저농도에서 이미 유효성분이 포화에 이르렀는데 농도가 높아짐에 따라 세포의 환원활성효과를 억제하는 다른 성분의 효과가 나타났기 때문일 수 있다.

Hypoxia 조건의 LDH assay에서는 黃連解毒湯과 梔子가 200μg/ml 이상의 농도에서, 黃柏이 500μg/ml 이상의 농도에서 양호한 효과를 나타냈는데, 이것은 산소부족에 의한 세포괴사방지에 효과가 있다는 것이다. 알츠하이머형 痴呆의 경우 Aβ가 혈관벽에 침착되어 뇌의 국소부위에 저산소증 소견을 보이며, 혈관성 痴呆의 경우 중풍 후에 유발되는 경우가 많으므로 黃連解毒湯과 梔子, 黃柏이 알츠하이머형 痴呆와 혈관성痴呆의 腦虛血로 인한 세포괴사방지에 임상적으로 활용될 수 있으리라 판단된다. 한편, 黃芩은 저농도에서는 좋은 효과를 보이다가 고농도에서는 오히려 부정적인 효과를 보였고, 梔子는 반대로 저농도에서 부정적인 효과를 보이다가 고농도에서 좋은 효과를 보였

는데, 농도별로 각기 다른 두 가지 유효성분이 존재할 가능성이 있으므로, 농도에 따른 효과에 대해서는 추가적인 확인과 연구가 필요할 것으로 보인다.

Reoxygenation 조건의 MTT assay에서는 黃連解毒湯 및 單味들이 긍정적인 효과를 보이지 않았다. 오히려 黃連은 모든 농도에서 고르게 부정적인 효과를 나타냈으며, 黃芩도 일정 농도 이상에서 부정적인 효과가 나타났다. 그러나 1000μg/ml의 고농도에서 黃柏이 세포환원활성도를 높이는 효과를 보였고, 梔子는 일정 농도이상부터는 농도에 비례하여 계속 수치가 상승하는 경향을 보였으므로 본 실험보다 더 높은 농도에서의 추가적인 확인과 연구가 필요할 것으로 보인다.

Reoxygenation 조건의 LDH assay에서 黃芩, 黃柏, 梔子가 모두 좋은 효과를 나타내었다. 이것은 실험에 사용된 韓藥物들이 산소 재공급시 활성산소에 의한 산화성 세포괴사를 방지하는데 효과가 있다는 것을 의미한다. 단순 虛血보다는 再灌流시 발생하는 활성산소에 의해 痴呆 및 老化가 진행된다는 것을 볼 때, 이러한 실험 결과는 黃連解毒湯이 산화성 손상에 의한 세포괴사로 痴呆의 병증이 진행되거나 老化가 진행되는 것을 억제하는데 임상적으로 적용될 수 있는 좋은 결과라 판단된다. 한편, 黃連解毒湯은 500μg/ml이상의 농도에서는 좋은 효과를 나타냈으므로 본 실험보다 더 높은 농도에서의 추가적인 확인과 연구가 필요할 것으로 보이며, 黃連은 1000μg/ml를 제외한 나머지 농도에서 모두 좋은 효과를 나타냈는데 이것은 특정 농도 이상에서 세포막 보호를 억제하는 특정성분이 발현되기 때문일 수 있으므로 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. 梔子는 모든 농도에서 고르게 좋은 효과를 보였는데, 중간 농도에 해당하는 200μg/ml에서만 유효한 효과가 나타나지 않았다. 이것은 실험이 정확하지 않았을 가능성과 함께 저농도와 고농도에서 각기 다른 성분에 의해 산화성 세포괴사가 방지되었을 가능성이 있다. 특히 黃柏은 모든 농도에서 특히 두드러진 효과를 보였는데 임상연구 및 신약 개발에 중요한 연구대상이 될 수 있을 것으로 보인다.

黃連解毒湯의 경우 虛血상태에서의 세포 환원활성력을 증가시키고, 고농도에서 虛血 상태 및 再灌流 상태에서의 세포막 보호력을 높여 세포보호와 세포 환원활성에 있어서 유효하다고 할 수 있었다. 특히 黃連解毒湯이 세포보호의 효능이 있다는 것은 세포막의 보호력이 증가되었다는 것, 즉 虛血 및 再灌流 상태에서의 산화적 스트레스가 지질을 손상시키는 기전을 억제했다는 것으로서, 이는 黃連解毒湯이 자유유리기로 인한 지질의 과산화를 억제했다는 보고[37]나, liver microsome의 효소지질 산화반응을 억제했다는 보고[38], 그리고 4염화탄소로부터 유발된 활성산소 대사 장애를 억제했다는 보고[113]와 일맥상통한다고 볼 수 있다.

약물별로 결과를 살펴보면, 黃連은 일부 농도에서 虛血시 세포환원활성을 증가시키는 효과를 보였지만, 再灌流 상태에서는 오히려 세포환원활성능력을 감소시키는 결과를 보여서 상황에 따라 상반된 효능을 보였다. 그리고 세포막 보호효과에 있어서는 저농도에서 虛血 및 再灌流 상태 모두에서 효과가 있었는데, 黃連은 지금까지 虛血-再灌流 손상에 미치는 영향에 관한 연구가 거의 없었으므로 향후 적정 농도와 상황에 따른 효과를 더 연구한다면 虛血-再灌流 손상에 유용한 약물로 사용될 수도 있을 것이다.

黃芩은 虛血상태에서 세포환원활성력을 오히려 감소시키는 결과를 보였고, 고농도에서는 再灌流상태에서 세포환원활성력을 감소시켰다. 그러나 세포막 보호효과는 再灌流상태에서 고르게 좋은 효과가 있었고, 虛血상태에서도 낮은 농도에서는 좋은 효과가 나타났다. 이[94]는 黃芩의 抗酸化作用을 관찰하기 위해서 黃芩추출물을 10μg/ml, 25μg/ml, 50μg/ml, 100μg/ml의 네 농도로 3시간동안 전처리하고 0.5mM

H_2O_2로 24시간동안 손상을 준 다음 MTT assay를 시행한 결과 黃芩추출물 25μg/ml, 50μg/ml 및 100μg/ml 투여군에서 유의한 효과가 나타났고, LDH assay에서는 변화가 없었다고 하였다. 본 실험에서는 黃芩이 LDH assay에서 좋은 효과를, MTT assay에서는 부정적인 효과를 나타냈는데, 이와 같은 상반된 결과가 세포에 손상을 주는 방법의 차이에 따른 것인지, 그 밖의 이유가 있는지에 대해서는 후속적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

黃柏은 높은 농도에서 再灌流 상태의 세포 환원활성도를 증가시켰고, 특히 再灌流 상태에서의 세포막 보호에는 모든 농도에 걸쳐 탁월한 효과가 있었다. 이[95]는 黃柏이 前腦虛血동물모델에서 신경보호효능이 있다고 하였는데, 본 실험에서도 높은 농도에서 虛血상태의 세포막 보호에 좋은 효과를 보였다. 黃柏의 berberine은 아드레날린성 α-수용체를 경쟁적으로 차단하여 심장박동과 말초혈관의 저항력을 낮추어 혈압강하 작용[96]을 하는데, 혈압이 강하되면 虛血 후 再灌流시 활성산소에 의한 세포파괴가 감소될 수 있으므로 이러한 약리작용도 in vivo실험에서 연구해 볼 필요가 있을 것이다.

梔子는 고농도에서 虛血상태의 세포 환원활성과 세포막 보호에 모두 효과가 있었고, 再灌流시 세포막 보호에는 대부분의 농도에서 유의한 효과를 보였다. 특히 虛血상태에서는 저농도에서 부정적인 효과가 나타나지만, 농도가 일정 수치 이상으로 높아질수록 세포막 손상을 억제하는 뛰어난 효과가 나타났다. 梔子는 지금까지 虛血-再灌流 손상에 미치는 영향에 관한 연구가 거의 없었으므로 향후 적정 농도와 상황에 따른 효과를 더 연구한다면 虛血-再灌流 손상에 유용한 약물로 사용될 수도 있을 것이다.

Ⅴ. 結 論

Mouse neuroblastoma 2a 세포를 대상으로, 韓藥物이 hypoxia와 hypoxia - reoxygenation 조건을 부여한 세포의 세포활성과 세포손상정도에 미치는 효과에 대해 MTT assay, LDH assay를 사용, 각기 조사하여 의미 있는 결과를 얻었다.

1. Hypoxia조건의 MTT assay를 이용한 세포환원활성도 측정에서 黃連解毒湯은 모든 농도에서 유의한 효과를 나타냈고, 黃連과 梔子는 농도에 따라 유의한 효과가 관찰되었다.
2. Hypoxia 조건의 LDH assay를 이용한 세포손상정도 측정에서 黃連解毒湯과 모든 單味들이 유의한 효과를 나타냈다.
3. Reoxygenation 조건의 MTT assay를 이용한 세포환원활성도 측정에서 黃連解毒湯과 대부분 單味들은 별다른 효과를 보이지 않았다. 그러나 黃柏의 일부 농도에서 수치상승을 보였고, 梔子는 유의한 효과를 보이지는 않았으나 농도에 비례하여 수치가 상승하는 경향을 뚜렷이 보였다.
4. Reoxygenation 조건의 LDH assay를 이용한 세포손상정도 측정에서 黃連解毒湯과 모든 單味들이 유의한 효과를 나타내었다. 특히 黃柏은 모든 농도에서, 黃連, 梔子, 黃芩은 대부분의 농도에서 우수한 효과를 보였다.
5. 각 조건의 실험에서 일부 약재는 농도에 따라 다른 효과가 관찰되었으므로 추가적인 확인과 연구가 필요하다.上記한 결과, LDH assay에서 黃連解毒湯과 모든 單味들이 유의한 효과를 나타냈으며, 특히 Reoxygenation 조건의 LDH assay에서 黃連解毒湯과 모든 單味들이 유의한 효과를 나타낸 것을 통해

이들 약물이 활성산소에 의한 뇌세포의 변성 및 세포의 老化 방지에 효과적일 수 있는 가능성을 보여주었으며 신약개발에 있어서 중요한 연구 대상이 되리라 판단된다.

參 考 文 獻

1. Chung HY. Aging and Carcinogenic Mechanism Induced by Free Radicals. Kor J Gerontol. 1992. 2:1-11.
2. Lander HM . An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. FASEB J. 1997.11:118-124.
3. Stadtman ER .Protein oxidation and aging, Science, 1992.257(5074):120-1224
4. Warner BB, Wispe JR. Free radical-mediated diseases in pediatrics. Semin Perinatol. 1992.16(1):47-57.
5. Gutteridge JM, Halliwell B. Comments on review of free radicals in biology and medicine. Free Radic Biol Med. 1992.12(1):93-95.
6. 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.
7. Gary EG, Huang HM. Oxidative stress in Alzheimer's disease. Neurobio Aging. 2005;26:575-578.
8. Da Cruz E, Silva OA, Iverfeldt K, Oltersdorf T, Sinha S, Lieberburg I, Ramabhadran TV, Suzuki T, Sisodia SS, Gandy S, Greenbard P. Regulatid cleavage of Alzheimer β-amyloid precursor protein in the absence of the cytoplamic tail.Neurosci. 1993;57:873-877.
9. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med. 1985;312(3):159-163.
10. 박지운, 정인철, 이상룡. 日黃連이 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2004;15(1):87-99.
11. 윤상학, 정인철, 이상룡. 香附子가 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2003;14(1):59-74.
12. 최재환, 김미영, 김현미, 최훈, 전훈, 김대근, 임종필, 임강현. 수 종 한약의 아세틸콜린에스터레이즈 효소활성에 대한 효과. 대한본초학회지. 2002;17(1):131.
13. 이정희. 항치매 약효를 나타내는 천연물의 의약 화학적 연구. 연세대학교 교육대학원. 2000.
14. 康永祿. 遠志와 石菖蒲의 단독 및 혼합투여가 白鼠의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1997.
15. 류성진. 한약재로부터 뇌세포 산화억제와 항허혈 치매 물질 탐색. 인제대학교 대학원. 2003.
16. 이준영, 정인철, 이상룡. 天王補心丹이 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2002;13(2):149-171.
17. 하수영, 정인철, 이상룡. 加減固本丸이 치매병태 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지.2002;13(1):53-77.
18. 우주영, 김종우, 황의완, 김현택, 박순권. 調胃升淸湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지.1997;8(1):69-79.
19. 이웅석, 황의완, 김현택, 박순권. 調胃升淸湯이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 학습과 기억에 미치는 影響. 경희한의대논문집. 1998; 21(1):479-501.
20. 박순권, 이홍재, 김현택, 황의완. 韓藥物의 痴呆治療에 관한 실험적 연구. 동의신경정

신과학회지. 1998;9(2):19-35.
21. 조성훈, 김종우, 김현택, 정경천, 황의완. 調胃升淸湯이 초기 Dementia of Alzheimer type 환자의 인지기능 변화에 미치는 효과. 동의신경정신과학회지. 2003;14(1):17-26.
22. 김보균, 김종우, 김현택, 정견천, 황의완. 알츠하이머형 치매환자에 대한 調胃升淸湯의 효능-청각 ERP 및 K-DRS의 성적 변화를 통하여. 동의신경정신과학회지. 2003;14(2):36-43.
23. Knight JA. The biochemistry of aging. Adv Clin Chem. 2000;35:1-62.
24. Patricia E, Jonathan G. On the translational error theory of aging Department of Genetics. Proc Natl Acad Sci USA. 1977;74(8):3396 - 3398.
25. Melov S. Mitochondrial oxidative stress. Physiology consequences and potential for a role in aging. Ann NY Acad Sci.2000;908:219-225.
26. Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, Deucher GP. Aging and oxidative stress. Mol Aspects Med. 2004;25(1-2):5-16.
27. 박영철, 이선동, 정해원. 人蔘의 항노화효과와 미래의 연구 방향. 대한보건협회학술지. 1999;25(2):65-76.
28. 김민산. 207종 한약 메타놀 추출물과 활성 한약이 포함된 19종 한약방제의 1,1-Dipheny1-2-Picry1hydrazy1 라디칼 소거작용. 순천대학교 대학원. 2004.
29. 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. 동의신경정신과 학회지. 1999;10(1):79.
30. 박순재. 二精丸이 老化 흰쥐에서 항산화 효소. SMP-30 및 세포 사멸에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2004.
31. 이성률. 遠志와 石菖蒲의 단독 및 혼합추출액이 CT105로 유도된 신경세포암 세포주에 미치는 영향. 동의병리학회지. 2003;17(4):1037-1049.
32. 김 혁. Significant Role of Nitric Oxide Synthase (NOS) in Differentiation of Human Neuroblast Cell Line. 경희대학교 대학원. 2000.
33. 유영민. Protective effect of Melatonin against Nitric Oxide-Mediated Apoptosis in PGT-β Pineal Gland Tumor Cells. 강원대학교 대학원. 2001.
34. Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, Weih M, Iurato L, Meisel A, Dirnagl U. Induction of hypoxia indecible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. Neuros Lett. 1998;254:117-120.
35. Wang J, Shum AY, Wang J. Hypoxia/reoxygenation induces cell injury via different mechanisms in cultured rat cortical neurons and glial cells. Neuros Lett. 2002;322:187-191.
36. 차재영, 김대진, 김석환, 김영길, 조영수. 실험적 중성지질 축적 HepG2세포에 미치는 黃連解毒湯의 약리적 효과. 한국식품영양학회지. 2003;32(4):586-590.
37. 林高弘, 永田稔, 太田好次, 石黑伊三雄. フリーラジカル惹起脂質過酸化反応に對する黃連解毒湯エキスの抑制作用. The general meeting of Medical and Pharmaceutical Society for Wakan-yaku abstracts 1995;12:50.
38. 林高弘, 永田稔, 西田圭志, 太田好次, 石黑伊三雄. ラット肝ミクロゾームの鐵關与の酵素的脂質過酸化反応に對する黃連解毒湯エキスの影響. The general meeting of Medical and Pharmaceutical Society for Wakan-yaku abstracts. 1994;11:69.
39. 慶熙醫療院 韓方病院 製劑解說集. 서울. 慶

熙醫療院韓方病院. 1988p. 102.
40. Sladowski D, Steer SL, Clothier RH, and Balls M. An improved MTT assay. J Immunol Methods. 1993; 157:203-207.
41. Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SL. A critical assessment of the use of microculture tetazolium assays to measure cell growth and function. Growth regul. 1995;5:69-84.
42. Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J Neuros Methods.1987; 20:83-90.
43. 배영철. 老人醫學. 서울. 高麗醫學. 1996; 193-209.
44. 김진수. Alzheimer's disease의 신경화학적 변화에 대한 고찰. 대한신경과학회지. 1985;3(1):10-16.
45. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzhimer's disease. Trends phamachol sci. 1991;12:383-388.
46. Borchelt DR, Thinnakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yanger D, Slunt HH, Wang R, Younkin SG, Sisodia SS. Familar Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Aβ1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. Neuron. 1996; 17:1005-1013.
47. Buxbaum JD, Greengard P. Regulation of APP processing by intra-and intercelluar signals. Ann NY Acad Sce. 1966;777: 3270-331.
48. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. Stroke. 1990;25:7-12.
49. Yoslida S. Brain injury after ischemia and trauma. Ann NY Acad Sci. 1989;570:219-236.
50. Milan L, Jozef R, Vilian K, Peter P, Ladislav V. Free radicals in chemistry and biology. CRC Press. 1989;29-31, 283-284.
51. Larry WO, Terry BO. Free radicals, aging and degenerative disease. Alan R Liss Inc. 1986;325-371.
52. 陳士澤. 石室秘錄(下). 서울. 書苑堂. 1984; 316-317.
53. 錢鏡湖. 辨證奇聞全書, 甘地出版社. 1980; 233-235.
54. 張介賓. 景岳全書. 서울. 一中社. 1992;846.
55. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울. 동양의학 연구소. 1985;217-218, 229.
56. 孫思邈. 備急千金要方. 서울. 杏林出版社. 1982;129-135, 534, 545, 550.
57. 朱震亨. 丹溪心法. 北京. 中國書店. 1996;258, 259-262.
58. 許俊. 原本東醫寶鑑. 서울. 남산당.1981; 81, 98.
59. 楊思澎. 中醫臨床大全. 北京. 北京科學技術出版社. 1991;224-230.
60. 黃志雄. 多發性梗塞性痴呆的中醫分型與治療. 上海中醫藥雜志. 1994;3:18-19
61. Harman D. Free radical theory of aging(the free radical disease). 1984;Age (7):111-131.
62. 김광호. 동의예방의학. 서울. 경희대학교 한의과대학 예방의학교실. 1995;57-60, 139-146, 240-244.
63. 길호식. 延年益壽不老丹이 老化誘發 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2003.
64. 박성민, 임명현, 이준희, 박재현. 補中益氣湯과 六味地黃湯이 노화촉진생쥐(SAM)의 간장 내 항산화작용에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003; 18(4):175-191.

65. 이용근. 地黃飮子와 加味地黃飮子 推出液이 XO/HX로 損傷된 培養 海馬神經細胞에 미치는 效果. 동의병리학회지. 2002;16(5):989-1000.
66. 서영석. 鎭肝熄風湯 및 加味鎭肝熄風湯 抽出物이 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響 . 동의병리학회지. 2003;17(2):374-379.
67. 劉東亮. 中醫常用方劑手冊. 北京. 人民軍醫出版社. 1996; 69-70.
68. 金相贊. 방제학. 서울. 永林社. 1999;180-181.
69. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 중약대사전. 서울. 도서출판 정담. 1999;4360-4367, 5001-5009, 5024-5042, 5052-5063.
70. 윤길영. 동의방제학. 서울. 고문사. 1971; 81.
71. 李尙仁. 本草學. 서울. 修書院. 1981;495-496, 501-509.
72. 이영종. 한방제재의 歸經 · 八綱. 서울. 일중사. 1981;33.
73. 김광호, 김성수. 황련해독탕과 온성오혈방의 수침 및 경구투여가 진통, 소염, 해열작용에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1994; 15(1):9-25.
74. 김은선, 박치상, 박창국. 黃連解毒湯과 溫淸飮이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1999;20(1):185-196.
75. 류순현, 양대진, 조기호, 김영석. 黃連解毒湯加味方으로 호전시킨 중풍환자 불면증 3예. 대한한의학회지.2001; 22(2):120-127.
76. 이정현. 접촉성 피부염에서 黃連, 黃連解毒湯, 金銀花가 림프구 활성에 미치는 영향. 동아대학교 대학원. 2000.
77. 국윤범. 黃連解毒湯이 自發的 高血壓 白鼠의 血壓 및 腎臟機能에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 2001.
78. 송대준. 黃連解毒湯이 綿羊赤血球에 대한 免疫反應에 미치는 影響. 원광대학교 논문집. 1984;(2):195-206.
79. 鄭遇悅. 黃連解毒湯 엑기스가 家免의 體溫 및 血壓에 미치는 影響. 대한동의병리학회지. 1988;3(1):5-8.
80. 김영석. 血栓症 및 高粘度血症에 대한 當歸飮과 黃連解毒湯의 실험적 비교연구. 경희의학. 1991;8(3):322-331.
81. 鐵谷多美子, 山口多慶子, 葛野公明. 腦血流に對するツムラ黃連解毒湯の臨床的檢討, The general meeting of Medical and Pharmaceutical Society for Wakan- yaku abstract. 1993;10:96.
82. 太田好次, 金剛むつみ. 四塩化炭素投与ラット肝の活性酸素代謝障害に及ぼす黃連解毒湯エキスの影響. J trad med. 2000;17:89.
83. Skarphedinesson JO, Stage L, Thoren P. Cerebral function during hypotensive haemorrhage in spontaneously hypertensive rats and wistar Kyoto rats. Acta Physiol Scand. 1989;128:446-452.
84. Christian Bhel. Alzheimer's disease and Oxdative stress. Progress in Neurobiology. 1999;57:301-323.
85. Ferrer I, Planas AM. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia : Life and death struggle in the penumbra. J Neuropathol Exp Neurol. 2003;62:329-339.
86. Benchoua A, Guegan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, Onteniente B . Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. J Neurosci. 2001;21:7127-7134.
87. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death : alive and well in the new millennium. Trends Cell Biol. 2001;11:526-534.
88. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM,

Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature. 1996; 397(6718):441-446.

89. Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schussel K, Muller WE. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. Biochem Parm. 2003;66(8):1627-1634.
90. Rajagopalan KV, Fridovich I, Handler P. Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. J Biol Chem. 1962;237:922-928.
91. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase : biochemistry, distribution and hysiology. Acta Physiol Scand Suppl. 1986;548:87-99.
92. Bernas T, 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.
93. 유진석. 星香正氣散 加 蒲公英과 單味들이 Hypoxia-reoxygenation 에 의해 손상 받은 Mouse Neuroblastoma 2a Cells에 미치는 影響. 경희대학교 대학원. 2004.
94. 이병철. 흰쥐의 前腦虛血모델에 對한 黃芩의 神經防禦效果. 경희대학교 대학원. 2000.
95. 이미란. 黃栢의 흰쥐 4-Vessel Occlusion 前腦虛血에 對한 神經防禦效果, 동국대학교 대학원. 2002.
96. 김호철. 한약약리학. 서울. 집문당.2001;138-140.