

七福飲加味方이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 신경정신과 교실

최공한 · 강형원 · 류영수

I. 縮 論

韓醫學에서 腦는 《靈樞·海論篇》에 “腦爲髓之海”라 하여 단순한 腎의 生理作用의 發現 場所로 認識되어 왔다. 以後 後世에 이르러 “腦爲元神之府”²⁾, “人之記性 皆屬腦中”³⁾ 이라 하여 腦의 精神 및 記憶作用을 말하였으며, 張⁴⁾은 腦와 心에 대한 進一步된 見解로 “腦爲元神, 心爲識神, 腦中之神, 體也; 心中之神, 用也”라 하여 心腦共主神明說을 주창하여 臨床에서도 이를 적극적으로 活用하여 왔다⁵⁾.

《靈樞·海論篇》¹⁾에서는 “髓海有餘 輕徑多力……髓海不足 腦轉耳鳴 脛痠眩暈……”라 하여 腦의 病理를 말하였고, 柳 등⁶⁻¹²⁾은 腦髓의 機能이 失調되거나 減退되면 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘, 知能低下, 痴呆 등의 臨床症狀이 나타난다 하였다.

西洋醫學에서 腦의 病理變化로는 甚한 彌滿性 腦萎縮과 腦神經細胞의 消失 등 器質的 變성과 腦의 各種 神經傳達物質의 減少 등 生化學的 變化를 招來함으로써 記憶力과 知能低下 등 高等精神活動에 障礙를 일으키는데 이는 人間의 老化로 인한 腦의 退行性 疾患과 不可分의 關係를 가지고 있다¹³⁻¹⁶⁾.

일반적으로 老化란 한 개체에서 시간의 진행에 비례하여 일어나는 漸進의이고 不可逆의인 退行性 變化로서, 構造的·機能的 變化가 초래되어 外部環境에 대해 反應하는 能力이 떨어지는 現象이다¹⁷⁻²⁰⁾.

老化의 原因은 아직 明確하게 밝혀지지 않아 다양한

假說들이 발표되어 왔는데, 最近에는 연령의 增加에 따라 自由基가 生체에 축적되어 각 세포 성분 of 機能을 低下시키고 老化를 가져온다는 自由基說(free radical theory)에 관련된 研究가 多樣하게 進行되고 있다¹⁹⁻²²⁾.

특히 代謝過程中 生成되는 毒性物質의 一種인 酸素自由基(oxygen radical)는 中樞神經系를 비롯하여 末梢神經系에 影響을 미침으로써 파킨슨씨병, 알츠하이머병 등과 같은 神經疾患을 誘發하는 病因으로 밝혀지면서 酸素自由基의 神經毒性에 대한 病理的 機轉糾明과 關聯 疾患에 대한 治療의 接近이 활발하게 研究되어지고 있다^{21,23-25)}.

七福飲은 明代 張景岳의 著書인 《景岳全書》²⁶⁾에 최초로 收載되었으며, 그 後 歷代醫書 및 臨床에서 五臟氣血 虛損으로 인한 不眠, 癡狂 등의 精神活動障礙의 症狀이 나타나는 疾患에 活用하며²⁷⁻³⁴⁾, 또한 心脾陽虛, 稟受不足으로 인한 痴呆에 포괄적으로 應用되어 왔다^{8,11,24,35)}.

最近 腦에 關한 實驗的 研究로는, 黃³⁶⁾은 遠志가 腦神經膠細胞로부터 分泌된 炎症性 腦細胞活性物質에 대한 抑制效果가 있음을, 崔³⁷⁾는 定志丸이 老化된 腦機能을 改善시키고 神經細胞毒性에 防禦效果가 있음을, 趙³⁸⁾는 荊防地黃湯이 알츠하이머형 치매 모델 백서에 投與하여 學習과 記憶을 增進시키는 效果가 있음을 보고하였고, 이외에도 다수의 연구보고가 發表된 바 있다³⁹⁻⁴⁵⁾.

또한 七福飲에 關한 研究로는 孫⁴⁶⁾이 七福飲投與가 老化白鼠 腦組織에서 noradrenalin 增加로 인해 腦組織을 개선시켰다는 보고는 있으나, 酸素自由基에 의해 손상된 大腦의 變化에 關한 研究는 아직 보고된 바가 없었다.

따라서 酸素自由基의 神經毒性에 대한 七福飲加味方の 影響을 究明하기 위하여 新生 생쥐에서 순수 분리한 大腦 神經細胞를 培養하여 glucose oxidase(GO)에 노출시킨 후 이의 毒性效果를 測定하였으며, 또한 七福飲, 七福飲加石菖蒲, 石菖蒲 煎湯液을 投與한 後 GO에 의하여 誘發된 毒性에 대한 防禦 效果를 比較 調査하여 유의성 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

本 實驗에 使用한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강 상태가 양호한 생쥐를 使用하였다.

2) 藥材

本 實驗에 사용한 七福飲의 處方內容은 《景岳全書》²⁸⁾에 依據하였으며, 藥材는 圓光大學校 附屬益山韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였고, 七福飲, 七福飲加石菖蒲 및 石菖蒲 각각의 內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription of Chilbokyumga(CBY)

韓藥名	生藥名	重量(g) (한첩량×4.5첩)
人 蔘	Radix Ginseng	8×4.5=36
熟地黃	Rhizoma Rehmanniae	8×4.5=36
當 歸	Radix Angelicae Gigantis	8×4.5=36
白 朮	Rhizoma Atractylodis Macrocephalae	6×4.5=27
灸甘草	Radix Glycyrrhizae	4×4.5=18
遠 志	Radix Polygalae	8×4.5=36
酸棗仁	Semen Ziziphi Spinosae	2×4.5=9
總 計		198

Prescription of Chilbokyumga Acori Rhizoma(CAR)

韓藥名	生藥名	重量(g) (한첩량×4첩)
人 蔘	Radix Ginseng	8×4=32
熟地黃	Rhizoma Rehmanniae	8×4=32
當 歸	Radix Angelicae Gigantis	8×4=32
白 朮	Rhizoma Atractylodis Macrocephalae	6×4=24
灸甘草	Radix Glycyrrhizae	4×4=16
遠 志	Radix Polygalae	8×4=32
酸棗仁	Semen Ziziphi Spinosae	2×4=8
石菖蒲	Acori Rhizoma	8×4=32
總 計		208

Prescription of Acori Rhizoma(AR)

韓藥名	生藥名	重量(g)
石菖蒲	Acori Rhizoma	200

2. 實驗方法

1) 檢液의 調劑

七福飲 4貼半 分量인 198g, 七福飲加石菖蒲 4貼 分量인 208g, 石菖蒲 200g을 각각 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 2시간동안 電熱器로 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 凍結乾燥器에서 24시간 凍結乾燥하여 각각 60.23g, 53.89g, 20.7g의 분말 시료를 얻었다.

2) 藥劑 製造

本 實驗에 사용한 약제로는 glucose oxidase(GO, Sigma)로서 각각 100mU/ml, 10mU/ml, 1mU/ml의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 實驗 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 培養液에 첨가하여 사용하였다.

3) 細胞培養

大腦神經細胞의 분리는 Michikawa 등⁴⁷⁾의 方法에 따라 施行하였다. 즉 生후 1-3일된 생쥐에서 적출한 뇌조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 處理한 후 36°C, 5% CO₂/95%air로 조절된 항온기 내에서 培養하였다. 培養完了後 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)으로 3회 세척 후 Pasteur 피펫으로 세포를 분리시켰다. 분리된 세포들은 Poly-L-lysine (Sigma)으로 전처리된 96-multiwell에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 培養液으로 교환하여 주었으며 7일동안 培養後 本實驗에 사용하였다.

4) 酸素自由基 處理

酸素自由基가 생쥐의 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 일정시간 培養한 神經細胞를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 1-30mU/ml glucose oxidase(GO)가 포함된 培養液에서 2-12시간 동안 處理後 分析하였다.

5) 細胞毒性 및 防禦效果 檢定

(1) 細胞生存率 分析

① NR定量

Neutral red(NR, Sigma)의 定量은 Borenfreund와 Puerner (1984)⁴⁸⁾의 方法에 따랐다. 즉 여러 濃度의 GO를 處理한 培養 神經細胞를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5mg/ml의 NR을 well당 최종濃度로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료後 PBS로 3회 세척후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 處理한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다.

② MTT定量

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma) 定量은 Mosmann⁴⁹⁾의 方法에 의하였다.

酸素自由基나 항산화제를 處理한 培養 神經細胞를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50mg/ml의 MTT를 well당 最終濃度로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 完了後 dimethylsulfoxide(DMSO, Merk)를 處理한 다음 spectrophotometer로 503nm에서 흡광도를 測定後 對照群과 比較 調査하였다.

③ Neurofilament enzymeimmuno assay(EIA)

培養중인 神經細胞를 PBS로 3회 세척하여 알콜로 고정시킨 다음 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료後 NE14(1:100, Sigma)로 1시간 동안 반응시킨후 0.04% O-phenylenediamine(OPD, Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide로 處理한 다음 Dynatech Microelisa reader로 490nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다.

④ SRB 定量

酸素自由基나 七福飲으로 일정시간 동안 處理한 大腦 神經細胞에 0.4% sulforhodamine B를 200μl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음 1.0% acetic acid로 3회 세척하였다. 세척 완료後 10mM Tris base를 이용하여 SRB-bound protein을 녹인후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다.

⑤ LDH 定量

LDH활성의 測定은 변형된 Takahashi 등(1987)⁵⁰⁾의 方法에 의하여 행하였다. 즉, LDH kit(Atron lab, Japan)의 효소기질액 1.0ml를 직경 10cm인 튜브에 넣은후 여기에 검체인 培養液을 넣어 잘 혼합한 다음 37도에서 10분간 반응시켰다. 10분후 희석반응 정지액 3.0ml를 넣어 혼합한 후 570nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다.

⑥ Lipid peroxidation 定量

Lipid peroxidation은 GO나 七福飲抽出物을 일정시간 동안 處理한 大腦神經細胞의 상층액과 세포용해액내의 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)를 測定

한 것으로, 위액에 12N H₂SO₄와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0ml와 0.3ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응 완료후 TBA 를 1.0ml를 가한 후 90도에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각후 n-butanol로 處理하였다. n-butanol 處理 완료 후 원침하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 測定하였다.

6) 統計 處理

實驗 結果에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

III. 實驗成績

1. 酸素自由基의 毒性效果

1) 細胞 生存率 分析

(1) MTT 定量

酸素自由基가 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 glucose oxidase(GO)가 1mU/ml에서 30 mU/ml 까지의 濃度로 포함된 培養液에서 6시간 동안 培養한 후 GO의 毒性效果를 MTT assay법에 의하여 調査한 結果 1mU/ml GO 處理에서는 세포의 생존율이 對照群(100%)에 비하여 86.3%로 나타났다. 그러나 10mU/ml의 處理에서는 74.4%로 이보다 다소 낮게 나타났다. 또한 25mU/ml와 30mU/ml GO를 處理한 경우 이의 생존율은 각각 52.9%(p<0.05)와 36.9%(p<0.01)%로 對照群에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났다(Table I, Fig. 1). GO가 시간에 따라 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 25mU/ml GO가 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 각각 2~12시간 동안 培養한 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 對照群과 比較 調査한 結果 2시간 培養에서는 對照群(100%)에 비하여 76.8%의 細胞生存率을 보였다. 또한 4시간 培養에 있어서는 59.5%로 對照群에 비하여 다소 낮은 생존율을 나타냈으며 6시간 培養에서는 對照群에 비하여 51.1%(p<0.05)의 생존율을, 12시간 培養에 있어서는 37.6%(p<0.01)의 생존율을 각각 나타

냈다(Table II, Fig. 2).

Table I. Absorbance (% of control) at 570nm wavelength for the MTT assay on glucose oxidase(GO) in cultured mouse cerebral neurons

GO(mU/ml)	MTT absorbance(570nm)	Decrease of cell viability(%)
0	1.68±0.13	-
1	1.45±0.10	13.7
10	1.25±0.15	25.6
25	0.89±0.08*	47.1
30	0.62±0.06**	63.1

Cultured mouse cerebral neurons were treated with various concentrations of glucose oxidase(GO) for 6 hours. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

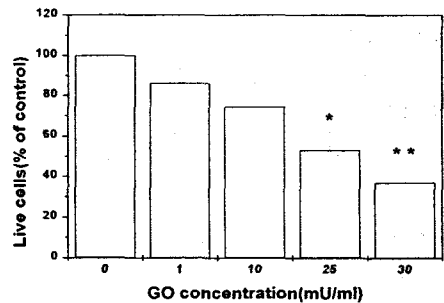


Fig. 1. Dose-dependency of glucose oxidase(GO). GO-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to 1, 10, 25 and 30 mU/ml GO for 6 hours, respectively. The results indicate the mean ±SE(n=6). **p<0.01

Table II. Time-response relationship of glucose oxidase(GO) by MTT assay in cultured mouse cerebral neurons

GO concentration (mU/ml)	MTT absorbance(570nm)			
	2hr	4hr	6hr	12hr
0	1.73±0.15	1.63±0.12	1.76±0.16	1.57±0.14
25	1.33±0.09	0.97±0.06	0.90±0.04*	0.59±0.05**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with 25mU/ml GO for various time intervals. The values are the mean ±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are made with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

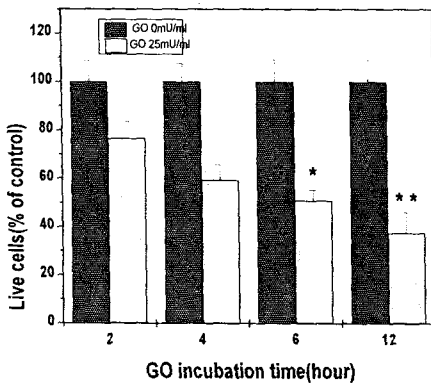


Fig. 2. Time-dependancy of glucose oxidase(GO) in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to 25 mU/ml GO for 2, 4, 6 and 12 hours, respectively. Cell viability was measured by MTT assay. The results represent the mean±SE(n=6). *p<0.05; **p<0.01

(2) NR 定量

培養中인 大腦神經細胞를 Ca²⁺, Mg²⁺ free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 GO가 1mU/ml에서 20mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 6시간 培養한 다음 이의 影響을 調査한 結果 1mU/ml의 處理에서 細胞의 生存率은 對照群(100%)에 비하여 73.5%로 나타났으며 5mU/ml와 10mU/ml에서는 각

각 64.0%와 47.1%(p<0.05)로 나타났다. 또한 20mU/ml GO에서는 21.3%(p<0.01)로 나타났다(Table III, Fig. 3). GO가 培養時間에 따라 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 MCV(midpoint cytotoxicity value)값인 10mU/ml GO濃度에서 2~12시간 동안 培養한 후 각 시간 별로 세포의 생존율을 調査한 結果 2시간 培養에서는 對照群(100%)에 비하여 68.3%로 나타났으며 4시간과 6시간 및 12시간에서는 각각 56.3%(p<0.05), 50.0%(p<0.05), 및 25.9%(p<0.01)로 나타났다(Table IV, Fig. 4).

Table III. Absorbance (% of control) at 540nm wavelength for the NR assay on glucose oxidase(GO) in cultured mouse cerebral neurons

GO(mU/ml)	NR absorbance(540nm)	Decrease of cell viability(%)
0	1.36±0.16	-
1	1.00±0.12	26.5
5	0.87±0.11	36.0
10	0.64±0.09*	52.9
20	0.29±0.07**	78.7

Cultured mouse cerebral neurons were grown in media containig various concentrations of glucose oxidase(GO) for 6 hours. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

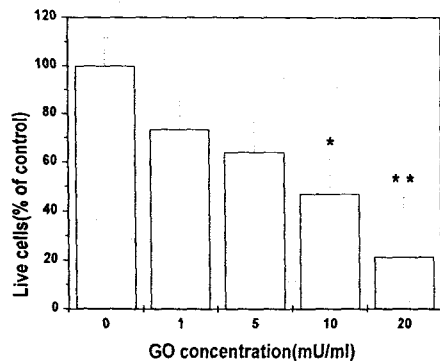


Fig. 3. Dose-response relationship of glucose oxidase(GO) in cultured mouse cerebral neurons. Cytotoxicity was measured by NR assay. Cultures were exposed to 1, 5, 10 and 20 mU/ml GO for 6 hours, respectively. The results indicate the mean±SE(n=6). *p<0.05; **p<0.01

Table IV. Time-response relationship of glucose oxidase (GO) by NR assay in cultured mouse cerebral neurons

GO concentration (mU/ml)	NR absorbance(570nm)			
	2hr	4hr	6hr	12hr
0	1.42±0.17	1.51±0.15	1.48±0.13	1.54±0.11
25	0.97±0.08	0.85±0.05*	0.74±0.05*	0.40±0.02**

Cultured mouse cerebral neurons were incubated with 10 mU/ml GO for various time intervals. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

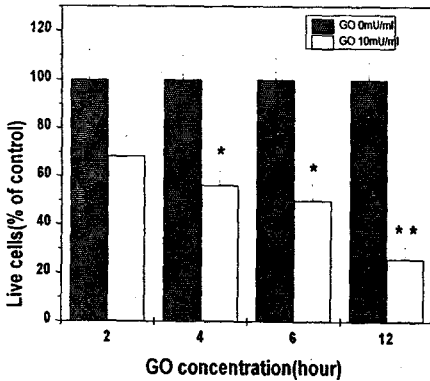


Fig. 4. Time-dependancy of glucose oxidase(GO) in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to 10mU/ml GO for 2, 4, 6 and 12 hours, respectively. Cell viability was measured by NR assay. The results represent the mean±SE(n=6). p<0.05; **p<0.01

2. 韓藥抽出物の 效果

1) neurofilament 定量

(1) GO의 影響

GO濃度에 따른 neurofilament의 量的 測定을 위한 neurofilament EIA에 있어서 GO가 10-30mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 6시간 동안 處理한 후 細胞의 生存率을 對照群과 比較 調査하였다. 그 結果 10mU/ml GO 處理에서는 세포의 생존율은 對照群(100%)에 비하여 71.3%로 나타났으며, 15mU/ml 處理에서는 63.1%로 나타났다. 또한 20mU/ml의 경우는 48.4% (p<0.05)의 생존율을 보여 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈으며, 25mU/ml와 30mU/ml GO의 處理에서는 각각 34.4%(p<0.01)와 21.7%(p<0.01)의 생존율을 나타냈다(Table V, Fig. 5).

Table V. Dose-response relationship of glucose oxidase (GO) by neurofilament enzymeimmuno assay (EIA) in cultured mouse cerebral neurons.

GO(mU/ml)	EIA absorbance(490nm)	Decrease of neurofilament(%)
0	1.57±0.18	-
10	1.12±0.15	28.7
15	0.99±0.13	36.9
20	0.76±0.16*	51.6
25	0.54±0.09**	65.6
30	0.34±0.06**	78.3

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to various concentrations of glucose oxidase(GO) for 6 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

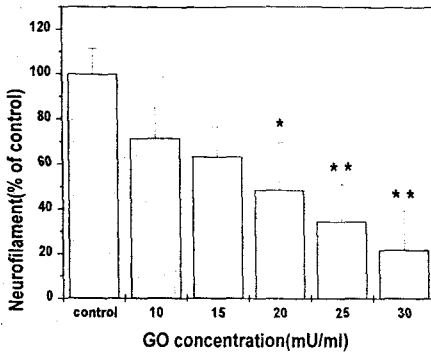


Fig. 5. Dose-dependency of glucose oxidase(GO) in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to 10, 15, 20 and 30 mU/ml GO for 6 hours, respectively. Amount of neurofilament was measured at wavelength of 490nm. The results indicate the mean \pm SE (n=6). *p<0.05; **p<0.01

(2) 七福飲(*chilbokyeum*, *CBY*)의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 GO의 酸化的 損傷에 있어서 七福飲(CBY)의 效果를 neurofilament의 量的變化側面에서 調査하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 20mU/ml GO濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10-150 μ g/ml CBY가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어效果를 neurofilament EIA법으로 調査하였다. 그 結果 20mU/ml GO만을 處理한 경우 세포의 neurofilament의 量的變化는 對照群(100%)에 비하여 47.7%로 나타났다. 그러나 10 μ g/ml CBY의 處理에서는 對照群에 비하여 61.3%로 나타났다. 또한 50 μ g/ml와 100 μ g/ml CBY處理에서는 각각 80.5%(p<0.01)와 91.6% (p<0.01)로 나타났으며 특히 150 μ g/ml CBY의 경우 92.9%(p<0.01)로 나타남으로서 이들은 20mU/ml GO만의 處理에 비하여 매우 높게 나타났다(Table VI, Fig. 6).

Table VI. Dose-response relationship of *Chilbokyeum* for its neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in neurofilament.

concentration of <i>Chilbokyeum</i> (μ g/ml)	EIA absorbance(490nm)	
	GO 0 mU/ml	GO 20 mU/ml
0	1.58 \pm 0.18	0.75 \pm 0.03
10	1.60 \pm 0.16	0.98 \pm 0.06
50	1.64 \pm 0.14	1.32 \pm 0.08*
100	1.67 \pm 0.17	1.53 \pm 0.12**
150	1.68 \pm 0.19	1.56 \pm 0.10**

Cultured mouse cerebral neurons were preincubated with various concentrations of *Chilbokyeum* for 3 hours, and then exposed to 20mU/ml glucose oxidase(GO) for 6 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values represent the mean \pm SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. *p<0.05; **p<0.01

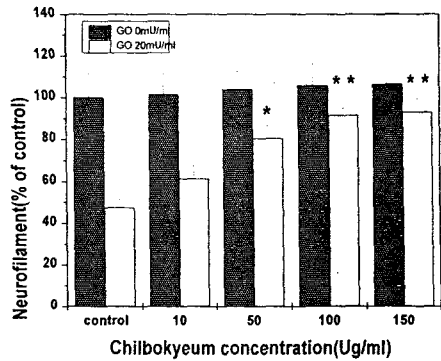


Fig. 6. Dose-dependency of *Chilbokyeum* for its protective effect on glucose oxidase(GO) in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were preincubated with 10, 50, 100 and 150 μ g/ml *Chilbokyeum* for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 20mU/ml GO for 6 hours. Amount of neurofilament was measured at wavelength of 490nm. The results indicate the mean \pm SE(n=6). *p<0.05; **p<0.01

(3) 七福飲加石菖蒲와 石菖蒲의 效果

培養 大脳神經細胞에 대한 GO의 산화적 손상에 있어서 七福飲抽出物의 效果를 neurofilament의 量的變化側面에서 調査하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 20mU/ml GO濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각의 抽出物인 七福飲加石菖蒲(*Chilbokyeyunga Acori Rhizoma, CAR*) 및 石菖蒲(*Acori Rhizoma, AR*)가 25-150 μ g/ml가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 防禦 效果를 neurofilament EIA법으로 調査하였다. 七福飲加石菖蒲(CAR)의 경우 20mU/ml GO만을 處理하였을 때 neurofilament의 양적변화는 對照群 1.25에 비하여 0.62로 나타났다. 또한 25 μ g/ml CAR處理에서는 對照群 1.23에 비하여 0.76으로 나타났다. 그러나 50 μ g/ml 및 100 μ g/ml CAR處理의 경우에 있어서 각각 對照群 1.24에 비하여 0.92(p<0.05)로, 對照群 1.26에 대하여 1.12(p<0.01)로 GO만의 處理에 비하여 다소 높게 나타났다. 특히, 150 μ g/ml CAR 處理의 경우 對照群 1.27에 비하여 1.21(p<0.01)로 나타나 이는 GO만의 處理에 비하여 매우 유의하게 增加하였다. 石菖蒲 (AR)의 경우에 있어서는 20mU/ml GO만을 處理하였을 때 neurofilament의 양적변화는 對照群 1.37에 비하여 0.73으로 나타났다. 그러나 25 μ g/ml AR處理에서는 對照群 1.35에 비하여 0.83으로 나타났다. 또한 50 μ g/ml의 處理에서는 對照群 1.39에 비하여 1.11(p<0.05)로 다소 높게 나타났다. 그러나 100 μ g/ml 및 150 μ g/ml AR處理의 경우에 있어서 각각 對照群 1.41에 대하여 1.22(p<0.01)로, 對照群 1.42에 대하여 1.28(p<0.01)로 GO만의 處理에 비하여 매우 높게 나타났다(Table VII).

Table VII. Dose-response relationship of *Chilbokyeyunga Acori Rhizoma*(CAR), *Acori Rhizoma*(AR) extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in neurofilament

concentration of extract (μ g/ml)	EIA absorbance			
	CAR		AR	
	GO 0mU/ml	GO 20mU/ml	GO 0mU/ml	GO 20mU/ml
control	1.25 \pm 0.11	0.62 \pm 0.05	1.37 \pm 0.13	0.73 \pm 0.01

25	1.23 \pm 0.13	0.76 \pm 0.07	1.35 \pm 0.11	0.83 \pm 0.05
50	1.24 \pm 0.15	0.92 \pm 0.09*	1.39 \pm 0.15	1.11 \pm 0.12*
100	1.26 \pm 0.17	1.12 \pm 0.11**	1.41 \pm 0.16	1.22 \pm 0.14**
150	1.27 \pm 0.18	1.21 \pm 0.13**	1.42 \pm 0.19	1.28 \pm 0.18**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with 25, 50, 100 and 150 μ g/ml *Gamichilbokyeyum* extract. Cultures were preincubated with *Chilbokyeyunga Acori Rhizoma*(CAR) and *Acori Rhizoma*(AR) for 3 hours respectively. After then cultures were exposed to 20mU/ml glucose oxidase(GO) for 6 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay (EIA). The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. *p<0.05; **p<0.01

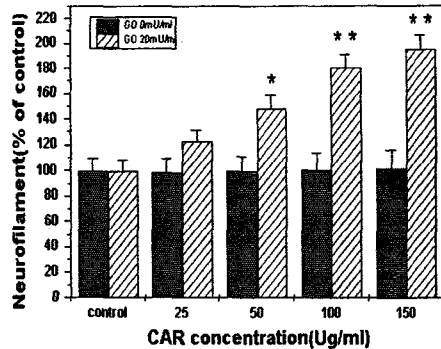


Fig. 7-a. Dose-response relationship of *Chilbokyeyunga Acori Rhizoma*(CAR), extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in neurofilament. Cultures were preincubated with *Chilbokyeyunga Acori Rhizoma*(CAR) and *Acori Rhizoma*(AR) for 3 hours respectively. After then cultures were exposed to 20mU/ml glucose oxidase(GO) for 6 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. *p<0.05; **p<0.01

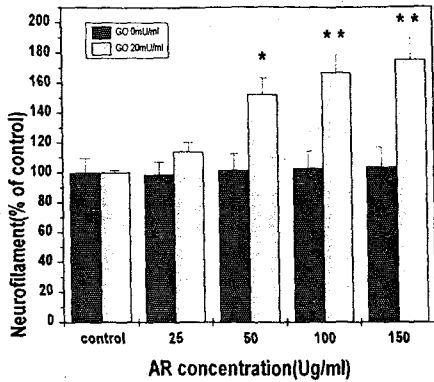


Fig. 7-b. Dose-response relationship of *Acori Rhizoma* (AR) extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in neurofilament. Other legend are same as the Fig. 7-a.

2) SRB 定量

(1) GO의 影響

酸素自由基가 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 총 단백질질의 측면에서 調査하기 위하여 glucose oxidase (GO)가 5mU/ml에서 60mU/ml 까지의 각각의 濃度로 포함된 培養液에서 6시간 동안 培養한 후 GO에 의한 단백질 합성의 변화에 대해 調査한 結果 1mU/ml GO 處理에서는 단백질의 합성이 對照群(100%)에 비하여 76.4%로 나타났다. 또한 15mU/ml의 處理에서는 對照群에 비하여 56.3%($p<0.05$)로 다소 낮게 나타났다. 또한 30mU/ml와 60mU/ml GO를 處理한 경우 단백질 합성은 각각 48.2% ($p<0.01$)와 21.5%($p<0.01$)로 나타나 對照群에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났으며, MCV값은 30mU/ml에서 나타났다(Table VIII).

Table VIII. Dose-response relationship of glucose oxidase (GO) on total protein synthesis in cultured mouse cerebral neurons.

GO concentration(mU/ml)	Total protein(% of control)
0	100±3.6
5	76.4±5.1
15	56.3±4.8*
30	48.2±3.9**
60	21.5±3.2**

Cultures mouse cerebral neurons were exposed to 5, 15, 30 and 60mU/ml glucose oxidase(GO) for 6 hours, respectively. Amount of total protein was measured by SRB assay(540nm), and shown as % of control. The results indicate the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

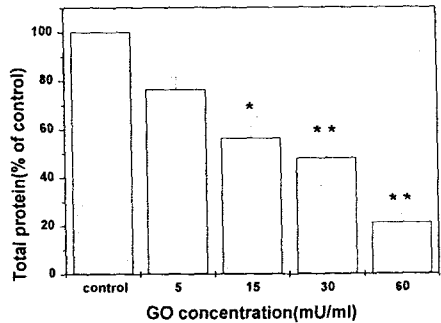


Fig. 8. Dose-response relationship of glucose oxidase (GO) on total protein synthesis in cultured mouse cerebral neurons. Other legend are same as the Table VIII.

(2) 七福飲(chilbokyeum, CBY)의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 GO의 산화적 손상에 있어서 七福飲(CBY)의 效果를 총단백질의 量的變化 측면에서 調査하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 30mU/ml GO濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 25-150μ g/ml CBY가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 防禦效果를 調査하였다. 그 結果 20mU/ml GO만

을 處理한 경우 총단백질의 量的變化는 對照群(100%)에 비하여 65.3%로 나타났다. 그러나 25 μ g/ml CBY의 處理에서는 對照群에 비하여 70.8%로 나타났으며, 50 μ g/ml 處理에서는 79.6%로 나타났다. 또한 100 μ g/ml CBY 處理에서는 85.4%(p<0.05)로 다소 높게 나타났으며, 특히 150 μ g/ml의 處理에서는 91.7%(p<0.01)로 GO만의 處理에 비하여 높게 나타났다(Table IX).

Table IX. Dose-response relationship of *Chilbokyuum*(CBY) for its neuroprotective effect on glucose oxidase (GO) in total protein synthesis

GO (mU/ml)	Total protein(% of control)				
	concentration of <i>chilbokyuum</i> (μ g/ml)				
	0	25	50	100	150
0	100 \pm 3.8	100 \pm 4.3	100 \pm 5.1	100 \pm 3.5	100 \pm 5.6
30	65.3 \pm 4.8	70.8 \pm 5.2	79.6 \pm 5.8	85.4 \pm 6.1*	91.7 \pm 6.4**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with *Chilbokyuum*. Cultures were preincubated with 25, 50, 100 and 150 μ g/ml *Chilbokyuum* for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 30mU/ml GO for 6 hours. Amount of total protein was measured at wavelength of 540nm, and shown as % of control. The results indicate the mean \pm SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. *p<0.05; **p<0.01

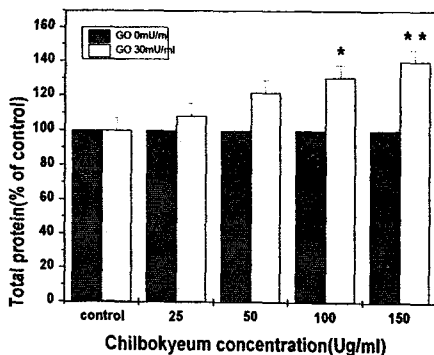


Fig. 9. Dose-response relationship of *Chilbokyuum*(CBY) for its neuroprotective effect on glucose oxidase (GO) in total protein synthesis. Other legend are same as the Table IX.

(3) 七福飲加石菖蒲와 石菖蒲의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 GO의 산화적 손상에 있어서 七福飲抽出物의 效果를 Total protein의 量的變化 측면에서 調査하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 30mU/ml GO濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각의 抽出物인 七福飲加石菖蒲(*Chilbokyuumga Acori Rhizoma, CAR*) 및 石菖蒲(*Acori Rhizoma, AR*)가 20-160 μ g/ml가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 防禦效果를 調査하였다. 七福飲加石菖蒲(CAR)의 경우 20mU/ml GO만을 處理하였을 때 총단백질의 量的變化는 對照群(100%)에 비하여 62.1%로 나타났다. 또한 20 μ g/ml CAR 處理에서는 74.6%(p<0.05)로 GO만의 處理에 비하여 다소 높게 나타났다. 그러나 40 μ g/ml 및 80 μ g/ml CAR 處理의 경우에 있어서 각각 82.4%(p<0.01)와 86.2% (p< 0.01)로 다소 높게 나타났으며, 특히, 150 μ g/ml CAR 處理의 경우 94.3%(p<0.01)로 나타나 이는 GO만의 處理에 비하여 매우 유의하게 增加하였다. 石菖蒲(AR)의 경우에 있어서는 30mU/ml GO만을 處理하였을 때 총단백질의 量的變化는 對照群(100%)에 비하여 58.3%로 나타났다. 그러나 20 μ g/ml AR 處理에서는 對照群에 비하여 67.2%로 나타났다. 또한 40 μ g/ml와 80 μ g/ml의 處理에서는 對照群에 비하여 각각 70.6%(p<0.05)와 72.5% (p<0.05)로 GO만의 處理에 비하여 다소 높게 나타났다. 그러나 160 μ g/ml AR 處理의 경우에 있어서 79.8%(p<0.01)로 GO만의 處理에 비하여 매우 높게 나타났다(Table X).

Table X. Dose-response relationship of *Chilbokyuum* (CBY) extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in total protein

concentration of CBY extract (μ g/ml)	Total protein(% of control)			
	CAR		AR	
	Go 0mU/ml	Go 30mU/ml	Go 0mU/ml	Go 30mU/ml
control	100 \pm 4.2	62.1 \pm 3.8	100 \pm 3.6	58.3 \pm 4.3
20	100 \pm 4.6	74.6 \pm 4.3*	100 \pm 5.3	62.7 \pm 6.2
40	100 \pm 5.7	82.4 \pm 5.2**	100 \pm 4.2	70.6 \pm 5.7*
80	100 \pm 4.9	86.2 \pm 5.8**	100 \pm 5.5	72.5 \pm 5.1**
160	100 \pm 4.5	94.3 \pm 5.4**	100 \pm 4.1	79.8 \pm 6.7**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with 20, 40, 80 and 160 μ g/ml *Chilbokyrum*(CBY) extract. Cultures were preincubated with *Chilbokyunga Acori Rhizoma*(CAR) and *Acori Rhizoma*(AR) for 3 hours respectively. After then, cultures were exposed to 30mU/ml glucose oxidase(GO) for 6 hours. Amount of total protein was measured by SRB assay at wavelength of 540nm. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. *p<0.05; **p<0.01

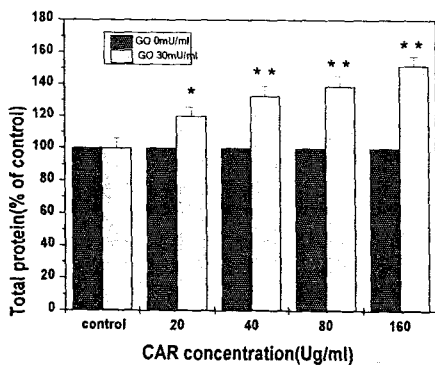


Fig. 10-a. Dose-response relationship of *Chilbokyunga Acori Rhizoma*(CAR) extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in total protein. Other legend are same as the Table X.

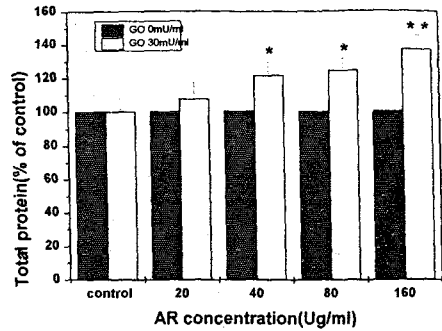


Fig. 10-b. Dose-response relationship of *Acori Rhizoma* (AR) extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in total protein. Other legend are same as the Fig. 10-a.

3) Lipid peroxidation 定量

(1) GO의 影響

GO濃度에 따른 lipid peroxidation의 測定하기 위하여 GO가 15-120mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 6시간 동안 處理한 후 細胞의 生存率을 對照群과 比較 調査하였다. 그 結果 15mU/ml GO 處理에서는 TBARS가 25.7로 나타났다. 그러나 30mU/ml GO 를 處理한 경우 TBARS가 28.9로 나타나 細胞 生存率 減少는 對照群에 비하여 12.5%로 나타났다. 또한 30mU/ml, 60mU/ml 및 120mU/ml GO 處理의 경우 TBARS가 각각 39.5(p<0.01), 50.2(p<0.01), 58.1(p<0.01)로 나타났다. 이에 대한 細胞 生存率 減少는 53.7%, 95.3%, 126.1%로 각각 나타났으며 細胞 生存率 減少의 MCV값은 30mU/ml GO 處理에서 나타났다(Table XI, Fig. 7).

Table XI. Dose-response relationship of glucose oxidase (GO) on lipid peroxidation in cultured mouse cerebral neurons.

GO(mU/ml)	TBARS(pmol/10 ⁶ cell)	Decrease rate of cell viability(%)
0	25.7 \pm 3.2	-
15	28.9 \pm 3.7	12.5

GO(mU/ml)	TBARS(pmol/10 ⁶ cell)	Decrease rate of cell viability(%)
30	39.5±4.6**	53.7
60	50.2±5.1**	95.3
120	58.1±5.8**	126.1

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to various concentrations of glucose oxidase(GO) for 6 hours. Thiobarbituric acid(TBA) fluorometric assay was adopted to analyse lipid peroxidation and TBA reactive substance(TBARS) were represent as pmol/10⁶ cells. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. **p<0.01

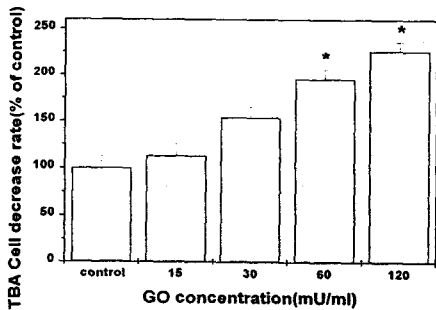


Fig. 11. Dose-response relationship of glucose oxidase(GO) on lipid peroxidation in cultured mouse cerebral neurons. Cultured neurons were exposed to 15, 30, 60 and 120 mU/ml GO for 6 hours, respectively. Cell viability was determined as % of control. The results represent the the mean±SE. **p<0.01

(2) 七福飲(chilbokyeyum, CBY)의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 GO의 산화적 손상에 있어 七福飲(CBY)의 效果를 lipid peroxidation측면에서 調査하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 30mU/ml GO濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 5-60μ g/ml CBY가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어效果를 調査하였다. 그 結果 30mU/ml GO만을

處理한 경우 TBARS는 對照群 28.1에 비하여 86.1로 나타났다. 그러나 5μ g/ml CBY의 處理에서는 對照群 27.9에 비하여 59.4%로 나타났으며 15μ g/ml CBY處理에서는 對照群 26.3에 비하여 51.9로 나타났다. 또한 30mU/ml와 60mU/ml GO處理에 있어서는 각각 對照群 25.1에 비하여 42.9(p<0.01)와, 對照群 25.6에 비하여 38.4(p<0.01)로 나타나 이는 GO만의 處理에 비하여 매우 유의하게 減少하였다(Table XII).

Table XII. Dose-response relationship of *Chilbokyeyum* for its neuroprotective effect on glucose oxidase (GO) in lipid peroxidation.

GO (mU/ml)	TBARS(pmol/10 ⁶ cell)				
	concentration of <i>chilbokyeyum</i> (μ g/ml)				
	0	5	15	30	60
0	28.1±4.6	27.9±4.7	26.3±4.5	25.1±4.2	25.6±4.3
30	86.1±5.8	59.4±5.1	51.9±4.4	42.9±3.6**	38.4±3.1**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with *Chilbokyeyum*. Cultures were preincubated with 5, 15, 30 and 60μ g/ml *Chilbokyeyum* for hours, respectively. After then, cultures were exposed to 30mU/ml GO for 6 hours. TBA reactive substance(TBARS) were represent as pmol/10⁶ cells. The results represent the mean±SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. **p<0.01

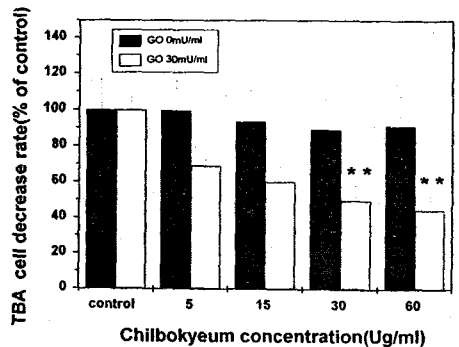


Fig. 12. Dose-response relationship of *Chilbokyeyum* for its neuroprotective effect on glucose oxidase (GO) in lipid peroxidation. Other legend are same as the Table

(3) 七福飲加石菖蒲와 石菖蒲의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 GO의 산화적 손상에 있어서 七福飲抽出물의 效果를 lipid peroxidation측면에서 調査하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 30mU/ml GO濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각의 抽出物인 七福飲加石菖蒲(*Chilbokyueumga Acori Rhizoma*, CAR) 및 石菖蒲(*Acori Rhizoma*, AR)가 15-90 μ g/ml가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 防禦 效果를 調査하였다. 七福飲加石菖蒲(CAR)의 경우 30mU/ml GO만을 處理하였을 때 TBARS는 對照群 28.9에 비하여 90.8로 나타났다. 그러나 15 μ g/ml CAR處理에서는 對照群 28.7에 비하여 79.1로 나타났으며 30 μ g/ml CAR處理의 경우에 있어서는 對照群 27.6에 비하여 62.5로 나타났다. 또한 60 μ g/ml와 90.2 μ g/ml CAR의 處理에 있어서는 각각 對照群 27.4에 비하여 45.5(p<0.01)로, 對照群 26.2에 비하여 38.3(p<0.01)으로 나타나 이는 GO만의 處理에 비하여 매우 높게 나타났다. 石菖蒲(AR)의 경우에 있어서는 30mU/ml GO만을 處理하였을 때 TBARS는 對照群 32.3에 비하여 84.7로 나타났다. 그러나 15 μ g/ml AR處理에서는 對照群 32.1에 비하여 71.5로 나타났으며 30 μ g/ml과 60 μ g/ml의 AR處理에서는 각각 對照群 31.7에 비하여 67.3과, 對照群 31.5에 비하여 57.0으로 나타났다. 또한 90 μ g/ml AR處理의 경우에 있어서는 對照群 31.1에 대하여 53.9로 나타났다(Table XIII).

Table XIII. Dose-response relationship of *Chilbokyueumga Acori Rhizoma*(CAR) and *Acori Rhizoma*(AR) extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase (GO) in lipid peroxidation

concentration of extract (μ g/ml)	TBARS(pmol/10 ⁶ cell)			
	CAR		AR	
	GO 0mU/ml	GO 30mU/ml	GO 0mU/ml	GO 30mU/ml
control	28.9 \pm 5.7	90.8 \pm 6.1	32.3 \pm 4.4	84.7 \pm 5.4
15	28.7 \pm 5.4	79.1 \pm 6.3	32.1 \pm 4.1	71.5 \pm 5.1
30	27.6 \pm 5.2	62.5 \pm 5.7	31.7 \pm 4.3	67.3 \pm 4.7
60	27.4 \pm 5.5	45.5 \pm 5.1**	31.5 \pm 4.2	57.0 \pm 4.5
90	26.2 \pm 5.1	38.3 \pm 4.6**	31.1 \pm 4.1	53.9 \pm 4.1

Cultured mouse cerebral neurons were treated with 15, 30, 60 and 90 μ g/ml *Chilbokyueum*(*CBY*) extract. Cultures were preincubated with *Chilbokyueumga Acori Rhizoma*(*CAR*) and *Acori Rhizoma*(*AR*) for 3 hours respectively. After then, cultures were exposed to 30 mU/ml glucose oxidase(GO) for 6 hours. TBA reactive substance(TBARS) were represent as pmol/10⁶ cell cells. Asterisks indicate the significant differences between groups. **p<0.01

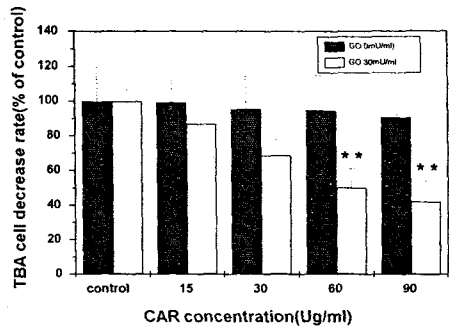


Fig. 13-a. Dose-response relationship of *Chilbokyueumga Acori Rhizoma*(*CAR*) extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase (GO) in lipid peroxidation. Other legend are same as the Table X III .

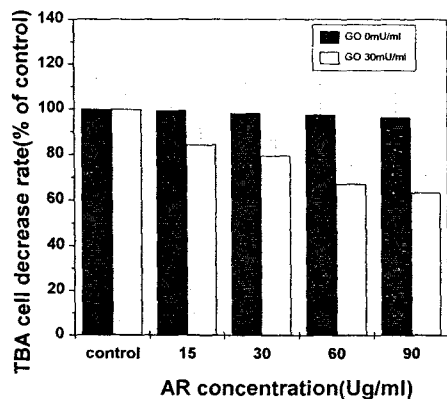


Fig. 13-b. Dose-response relationship of *Acori Rhizoma*(*AR*) extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in lipid peroxidation. Other legend are same as the Fig. 13-a.

4) LDH 定量

(1) GO의 影響

GO濃도에 따른 LDH 활성도를 測定하기 위하여 GO가 10-80mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 6시간 동안 處理한 후 세포培養液내로 유출된 LDH양을 對照群과 比較 調查하였다. 그 結果 10mU/ml GO 處理에서는 對照群100%(18.2±1.3)에 比하여 108.8%(19.8±1.8)로 나타났다. 또한 20mU/ml GO를 處理한 경우 127.0%(23.1±2.4)(p<0.05)로 나타났으며 40mU/ml와 80mU/ml GO 處理에서는 각각 對照群에 比하여 152.2%(27.7±2.6)(p<0.01)와 188.5%(34.3±3.8)(p<0.01)로 나타났다. LDH활성도의 MCV값은 40mU/ml GO의 處理에서 나타났다 (Table XIV).

Table XIV. Dose-response relationship of glucose oxidase (GO) on lipid peroxidation in cultured mouse cerebral neurons

GO mU/ml	0	10	20	40	80
LDH Release	18.2±1.3	19.8±1.8	23.1±2.4*	27.7±2.6**	34.3±3.8**

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to various concentrations of glucose oxidase(GO) for 6 hours. LDH activity was measured at wavelength of 570nm. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

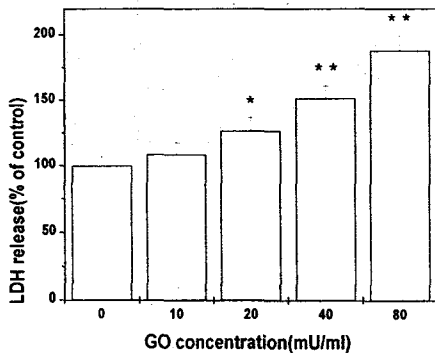


Fig. 14. Dose-response relationship of glucose oxidase (GO) on lipid peroxidation in cultured mouse cerebral neurons. Other legend are same as the Table XIV .

(2)七福飲(chilbokyeum, CBY)의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 GO의 산화적 손상에 있어 七福飲(CBY)의 效果를 LDH활성도측면에서 調查하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 40mU/ml GO濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 5-100μ g/ml CBY가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 防禦效果를 調查하였다. 그 結果 5mU/ml GO만을 處理한 경우 對照群 15.6에 比하여 39.5로 나타났다. 그러나 5μ g/ml CBY의 處理에서는 對照群 15.8에 比하여 31.4로 나타났으며 25μ g/ml CBY處理에서는 對照群 14.7에 比하여 26.9로 나타났다. 또한 50μ g/ml CBY處理에 있어서는 對照群 14.3에 比하여 23.1로 나타났으며, 특히 100μ g/ml CBY의 處理에서는 對照群 13.9에 比하여 21.1(p<0.05)로 나타나 GO만의 處理에 比하여 유의하게 減少하였다 (Table XV).

Table XV. Dose-response relationship of *Chilbokyeum* for its neuroprotective effect on glucose oxidase (GO) in LDH release

GO (mU/ml)	LDH Release				
	concentration of chilbokyeum(μ g/ml)				
	0	5	25	50	100
0	15.6±1.7	15.8±1.5	14.7±1.9	14.3±1.8	13.9±1.5
40	39.5±3.8	31.4±3.1	26.9±2.9	23.1±3.2	21.1±2.6*

Cultured mouse cerebral neurons were treated with *Chilbokyeum*. Cultures were preincubated with 5, 25, 50 and 100μg/ml *Chilbokyeum* for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 40mU/ml GO for 6 hours. LDH release was measured at wavelength of 570nm. The values represent, the mean±SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. *p<0.05

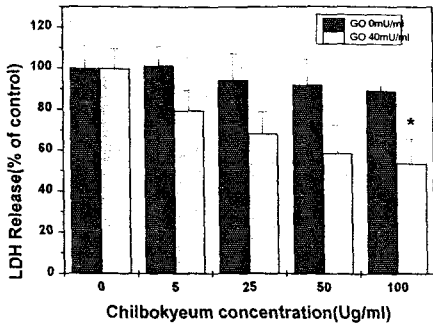


Fig. 15. Dose-response relationship of *Chilbokyueum* for its neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in LDH release. Other legend are same as the Table XV.

(3) 七福飲加石菖蒲(CAR)와 石菖蒲(AR)의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 GO의 산화적 손상에 있어서 七福飲抽出物の 效果를 LDH활성도측면에서 調査하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 40mU/ml GO濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각의 抽出物인 七福飲加石菖蒲(*Chilbokyueumga Acori Rhizoma*, CAR) 및 石菖蒲(*Acori Rhizoma*, AR)가 5-100 μ g/ml가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 調査하였다. 七福飲加石菖蒲(CAR)의 경우 40mU/ml GO만을 處理하였을 때 LDH 활성도는 對照群 14.3에 비하여 44.5로 나타났다. 그러나 5 μ g/ml CAR處理에서는 對照群 14.1에 비하여 34.3으로 나타났다. 또한 25 μ g/ml CAR處理의 경우에 있어서는 對照群 13.7에 비하여 24.1(p<0.05)로 나타나 GO만의 處理에 비하여 유의하게 낮게 나타났다. 또한 50 μ g/ml와 100 μ g/ml CAR의 處理에 있어서는 각각 對照群 12.6에 비하여 16.2(p<0.01)로, 對照群 12.4에 비하여 17.4(p<0.01)로 나타나 이는 GO만의 處理에 비하여 매우 높게 나타났다. 石菖蒲(AR)의 경우에 있어서는 40mU/ml GO만을 處理하였을 때 LDH활성도는 對照群 17.0에 비하여 39.5로 나타났다. 그러나 5 μ g/ml AR處理에서는 對照群 17.4에 비하여 36.7로 나타났으며 25 μ g/ml 과 50 μ g/ml의 AR處理에서는 각각 對照群 17.2에 비하여 32.9와, 對照群 17.1에 비하여 32.5로 나타났다. 또한 100

μ g/ml AR處理의 경우에 있어서는 對照群 16.9에 대하여 27.8로 나타났다(Table XVI).

Table XVI. Dose-response relationship of *Chilbokyueumga Acori Rhizoma*(CAR) and *Acori Rhizoma*(AR) extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in LDH release

concentration of extract (μ g/ml)	Releasing rate of LDH			
	CAR		AR	
	GO 0mU/ml	GO 40mU/ml	GO 0mU/ml	GO 40mU/ml
control	14.3 \pm 1.4	44.5 \pm 3.5	17.0 \pm 1.4	39.5 \pm 2.6
5	14.1 \pm 1.7	34.1 \pm 3.1	17.4 \pm 1.2	36.7 \pm 2.1
25	13.7 \pm 1.5	24.1 \pm 2.8*	17.2 \pm 0.8	32.9 \pm 1.9
50	12.6 \pm 1.0	16.2 \pm 1.9**	17.1 \pm 1.4	32.5 \pm 1.4
100	12.4 \pm 0.9	17.4 \pm 1.5**	16.9 \pm 1.1	27.8 \pm 1.2

Cultured mouse cerebral neurons were treated with 5, 25, 50 and 100 μ g/ml *Chilbokyueum*(CBY) extract. Cultures were preincubated with *Chilbokyueumga Acori Rhizoma*(CAR) and *Acori Rhizoma*(AR) for 3 hours respectively. After then, cultures were exposed to 40mU/ml glucose oxidase(GO) for 6 hours. LDH activity was mwasured at wavelength of 570nm. The values represent the mean \pm SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. *p<0.05; **p<0.01

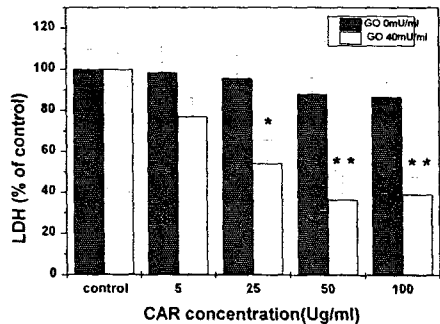


Fig. 16-a. Dose-response relationship of *Chilbokyueumga Acori Rhizoma*(CAR) extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase (GO) in LDH release. Other legend are same as the Table 16.

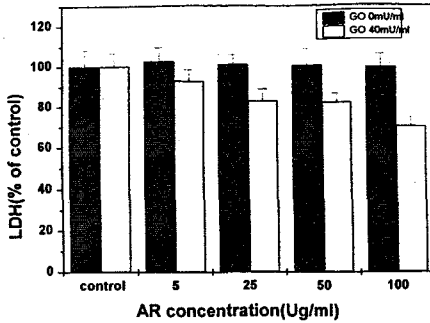


Fig. 16-b. Dose-response relationship of *Acori Rhizoma* (AR) extract for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in LDH release. Other legend are same as the Fig. 16-b.

IV. 考 察

최근들어 平均壽命의 延長과 老人 人口의 增加로 老化에 併發하는 慢性 退行性 疾病들이 急増하고 있고 사회적 문제로 대두되고 있다¹⁸⁾.

韓醫學에서 腦에 관한 記錄은 《素問·五臟別論篇》⁵¹⁾에 “或而腦髓爲臟 或而爲腑……故藏而不瀉, 名曰奇恒之府”라고 하여 奇恒之府 중의 하나로 보았으며, 또한 《素問·陰陽應象大論篇》⁵¹⁾에서는 “腎生骨髓”, 《靈樞·海論篇》¹⁾에서는 “腦爲髓之海”라 하여 腦를 腎과 관련된 단순한 生理器管의 하나로 認識하였다⁵²⁻⁵⁶⁾. 以後 後世에 이르러 “腦爲元神之府”, “人之記性 皆屬腦中”이라 하여 腦의 精神 및 記憶作用을 언급하여 오늘날 西洋醫學의 腦와 類似한 概念으로 認識하였다^{2,4,6,53,57,58)}.

특히, 張⁴⁾은 腦와 心에 대한 進一步된 見解로 “腦爲元神, 心爲識神, 腦中之神, 體也; 心中之神, 用也”라 하여 人間의 高位精神機能인 ‘神明’을 元神과 識神으로 區別하여 腦·心 모두가 精神機能을 主管한다는 心腦共主神明說을 주창하여 臨床에서도 이를 적극적으로 活用하여 왔다^{5,57,59)}.

따라서 腦의 病理로는 《靈樞·海論篇》¹⁾에 “髓海有餘 輕徑多力……髓海不足 腦轉耳鳴 脛痠眩冒……”라고 하여 腦髓의 充足與否에 따라 精神 및 身體 活動의 盛衰도 關

係됨을 말하였으며^{6,53,54,57)}, 腦髓의 機能이 失調되거나 減退되면 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘, 知能低下, 痴呆 등의 臨床症狀이⁷⁻¹⁰⁾ 나타나고, 그 主要原因에 對해서는 肝腎虛弱, 稟受不足, 心脾陽虛, 痰瘀라고 하였다^{11,12)}.

西洋醫學에서 人間의 高位精神機能은 大腦皮質의 神經細胞活動으로 나온다고 認識하는데, 즉 腦가 人間活動의 全領域을 統括하는 control center로서 認識, 思考, 判斷 등의 力動的인 意識活動과 다양한 感情, 行動 그리고 더 나아가 高次元의 精神世界까지도 담당하는 것으로 알려져 있다^{8,60-62)}.

腦의 病理變化로는 甚한 彌滿性 腦萎縮과 腦神經細胞의 消失 등 器質的 變成과 腦의 各種 神經傳達物質의 減少 등 生化學的 變化를 招來함으로써 記憶力과 知能低下 등 高等精神活動에 障礙를 일으키는데 이는 人間의 老化로 인한 腦의 退行性 疾患과 不可分의 關係를 가지고 있다¹³⁻¹⁶⁾.

韓醫學에서는 人間의 壽命을 대략 100에서 120歲로 보고 있으며, 內經《靈樞·天年篇》¹⁾을 보면 “……六十歲 心氣始衰故憂悲 血氣懈惰 故好臥 七十歲 脾氣虛 皮膚枯 ……八十歲 肺氣虛 魄離 故言善誤 九十歲 腎氣焦 四臟經脈空虛 百歲 五臟皆虛 神氣皆去 形骸獨居而終矣”라고 老化의 過程을 記述하고 있는데, 六十歲의 心氣始衰하여 憂悲하고 八十歲에 魄離하여 言善誤라 하여 老化에 따른 精神의 變화를 說明하였고, 또한 《素問·上古天眞論》⁵¹⁾에 “女子 七歲, 腎氣盛 ……六七三陽脈衰于上, 面皆焦, 髮始白, 七七任脈衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形壞而無子也, 丈夫 八歲, 腎氣實 ……六八陽氣衰于上, 面焦, 髮鬢頰去, 七八肝氣衰, 筋不能動, 天癸竭, 精少, 腎臟衰, 形體皆極, 八八則髮去”라고 하여 男·女의 年齡에 따른 腎氣의 盛衰與否가 人體의 生殖·生長發育·老衰에 密接하게 關係하고 있음을 말하였으며, 虞⁶³⁾는 “腎元盛即壽延, 腎元衰即壽夭”라고 하여 長壽하는 것이 腎氣에 의하여 決定된다고 하였다.

西洋醫學의 老化의 정의는 學說에 따라 다소 다르게 설명되나 정리해 보면 다음과 같이 2가지로 구분된다. 즉 하나는 老化가 受精에서 죽음까지의 生體의 變化를 말한다는 것이고, 다른 하나는 成熟期 이후의 生體의 變化를

말한다는 것이다. 전자는 加齡現象(aging)이라고 불리워지고 있으며, 후자는 협의의 老衰(senescence)라고 불리운다¹⁹⁾. 즉 老化란 한 개체에서 時間의 進行에 비례하여 일어나는 漸進적이고 不可逆적인 退行性 變化로서, 構造的·機能的 變化가 초래되어 外部環境에 대해 反應하는 能力이 떨어지는 自然現象이다¹⁷⁻²⁰⁾. 老化的 原因은 다양한 가설들이 존재하는데 이는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았기 때문이다. 현재까지 알려진 老化에 對한 加齡理論(theory)로는 크게 消耗說(waste and tear theory)과 遺傳子說로 대별된다. 消耗說은 다시 직접적인 원인으로 생각되는 有毒代謝產物 蓄積과 free radical 理論, DNA 유전정보의 error로 발생하는 error 破滅說(error-catastrophe theory)과 생리과정 중 발생하는 post-translation modifications 등으로 나누며 유전자설은 豫定說, DNA복제상에 나타나는 체세포 돌연변이설(somatic mutation theory)과 프로그램설(programmed aging theory) 등이 있다^{20,22)}.

이중 가장 알려진 學說은 自由基說(free-radical theory)로 최근 이를 뒷받침하는 證據들이 많이 나오고 있어 이에 대한 연구가 활발히 進行되고 있는 實情이다⁶⁴⁻⁶⁷⁾.

自由基說(free radical theory)은 세포내의 酸化酵素가 촉매로 작용하는 O₂의 환원반응에서 自由基로 hydroxyl radical(OH·), hydrogen peroxide (H₂O₂) 등이 생기며 이것이 세포성분과 임의로 반응하여 산화체 혹은 과산화체를 만들게 되면 단백질, 효소, DNA 등 각 세포성분 본래의 기능을 상실하게 되는데, 연령의 증가에 따라 이 自由基가 蓄積되면 생체에 유해하게 작용하여 老化的 原因이 된다는 가설이다¹⁷⁻²²⁾.

老化는 生體內 모든 臟器에서 점차적으로 機能을 低下시키는 自然現象으로 그 중 腦의 老化는 腦神經細胞의 減數 및 萎縮을 비롯하여 神經原纖維의 엉킴, 老人性 神經斑, 顆粒空胞變性, Lewy小體 등이 出現하는 組織病理學的 變化 以外에도 cholinergic系, noradrenergic系, dopamin과 같은 神經傳達物質의 減少 등 生化學的 變化를 誘發시키는 것으로 알려져 있다²²⁾. 특히, 大腦皮質을 侵犯하는 代表的인 退行性 疾患으로는 알츠하이머병과 파킨슨병이 있는데, 이들은 包括적으로 痴呆라고 부른다^{67,18)}.

52,68-70)

痴呆는 意識이 淸明한 狀態에서 全般적인 認知機能의 障礙를 나타내는 疾患으로 보통 慢性, 또는 進行性 腦疾患에 의해 發生되며 記憶, 思考, 指南力, 理解, 計算, 學習, 言語, 判斷 등 多數의 高位大腦機能에 障礙가 나타나는 症候群이다⁷¹⁾. 痴呆는 여러 原因에 의해 發病할 수 있는데 痴呆를 惹起하는 原因疾患으로는 腦의 萎縮性 變化, 腦血管障礙, 梅毒이나 流行性 腦炎과 같은 腦의 炎症性障礙, korsakoff 症候群과 같은 代謝性 內分泌疾患, 腫瘍, 外傷, 中毒 등이며 이중 腦萎縮性變化에 의한 老年性 痴呆와 腦血管性 痴呆가 많은 比率를 차지하고 있다⁷²⁾.

韓醫學에서 痴呆라는 病名은 張景岳의 《景岳全書·雜病謨》^{26,73)}의 癡狂篇에서 痴狀이라고 처음 言及된 이후, 呆病⁷⁴⁻⁷⁶⁾, 癡狂⁷⁷⁾, 健忘⁷⁷⁻⁷⁹⁾, 虛勞⁸⁰⁾ 등의 범주에 속하며⁸¹⁻⁸⁸⁾, 主要原因으로는 鄭 등⁸²⁾이 痰飲, 七情傷, 稟賦不足, 肝腎不足으로 크게 나누었고, 郭 등¹⁰⁾은 年老氣衰, 久病, 或은 內風卒中, 外傷頭腦, 或은 邪毒內竄 등으로 腦絡이 痰瘀로 凝結되면 善忘, 痴呆 등의 症狀를 發한다고 하였다. 陳⁷⁵⁾은 呆病의 主要原因을 痰으로 보았고, 최근 張⁸³⁾도 呆從痰治로 治療하는 藥物을 使用하여 痴呆를 治療하였다고 報告하였다. 이와 같이 人間의 老化와 腦의 退行性 病變과 관련되어 있는 痴呆의 病因病機는 臟腑의 肝腎不足, 心脾陽虛가 重要하게 作用하고 痰·瘀血·七情 등으로 腦竅가 阻滯되어 各種 症狀가 나타나는 것임을 알 수 있다^{11,12,90-94)}.

七福飲은 明代 張景岳의 著書인 《景岳全書》²⁶⁾에 최초로 收載되었으며, 그 後 歷代醫書 및 臨床에서 五臟氣血 虛損으로 인한 不眠, 癡狂 등의 精神活動障礙의 症狀가 나타나는 疾患에 活用되어온 處方이다²⁷⁻³⁴⁾.

本 實驗에 使用한 七福飲의 構成藥物의 效能을 本草學的으로 考察하면, 人參은 甘·微溫하여 大補元氣·安神·健脾益氣의 效能이 있고, 熟地黃은 甘·微溫하여 補血·滋陰·補五臟하고, 當歸는 甘·辛·溫하여 補血和血하며, 白朮은 甘·苦·微溫하여 補脾益氣·燥濕利水하고 甘草는 甘·平(灸後微溫)하여 補脾益氣·調和諸藥하는데 특히 補中을 目的으로 할 때는 灸用한다고 하였다. 遠志는 苦·辛·溫하여 安神益智·鎮心·祛痰利竅시키는 效能이 있으며 酸棗仁은 甘·酸·平하여 補肝膽·寧心安神한다

95-101)

따라서 本方은 五臟氣血虛損으로 인한 不眠, 癡狂 等の 精神活動障礙의 症狀이 나타나는 疾患에 活用될 뿐아 니라, 近來에는 虛勞에 의한 諸般 疾患, 특히 心脾陽虛, 稟受不足으로 인한 痴呆에 대표적으로 應用되고 있다^{8,11, 34)}

七福飲에 加味한 石菖蒲는 天南星科에 속한 多年生草 本인 石菖蒲의 根莖으로 辛·微溫·無毒하고 心·肝·脾 의 三經에 歸經하며 開竅安神·化痰濕·和中辟濁등의 효 능으로 임상에서 神昏, 癡狂, 痴呆, 健忘, 耳鳴 등의 病證 을 治하는데 多用하는 韓藥材이다⁹⁵⁻¹⁰¹⁾

韓醫學에서 腦에 關한 研究로는, 黃³⁶⁾과 姜³⁹⁾은 遠志 및 天門冬이 腦神經膠細胞로부터 分泌된 炎症性 腦細胞 活性物質에 대한 抑制效果가 있음을, 李 등⁴¹⁾은 麝香이 損傷된 생쥐 腦組織에 對한 保護作用을, 崔³⁷⁾는 定志丸이 老化된 腦機能을 改善시키고 神經細胞毒성에 防禦效果를, 우⁴⁰⁾와 趙³⁸⁾는 調胃升清湯 및 荊防地黃湯이 알츠하이머형 치매 모델백서에 投與하여 學習과 記憶을 增進시키는 효 과가 있음을, 金⁴²⁾과 鄭⁴³⁾은 洗心湯 및 溫膽湯이 腦組織의 抗酸化作用이 있음을 報告하였고, 이외에도 다수의 研究 報告^{44,45)}가 發表된 바 있다.

七福飲에 關한 研究로는 孫⁴⁶⁾이 老化白鼠 腦組織에서 noradrenalin 增加 등의 生化學的인 變化를 관찰하여 腦組 織을 改善시켰다는 報告는 있으나 酸素自由基를 통한 구 체적인 大腦皮質의 變化에 關한 實驗은 아직 報告된 바가 없다.

人間의 腦에 酸素와 葡萄糖의 공급이 제한 받게 되면 腦組織에서의 에너지 消失이 招來되고, 神經細胞膜의 투 과성의 변화로 인한 細胞內의 이온들의 動的平衡의 破壞, 神經組織의 酸化性, 腦浮腫의 形成, 神經傳達物質의 過多 生産으로 인한 腦組織의 損傷, 細胞內의 Ca²⁺의 增加로 인 한 여러 가지 代謝物質의 生成 및 腦組織 生産物質의 增加, 神經細胞內 phospholipid 代謝의 變化, free radical 形 成 등으로 인하여 腦組織은 不可逆的 損傷을 입게 된다. 이를 治療하는데, 神經組織의 酸素 및 포도당 요구량을 減少시켜 自由基의 生成을 차단하거나 自由基를 제거하는 藥物에 대한 研究가 進行 中이다¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾

自由基는 최의각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것으로서 이러한 특수구조 때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러 가지 병태 생리적인 반응에 관여하고 있으며^{105,106)}, 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시키는데^{107,108)}, 특히 代謝過程中 生成되는 毒性物質의 일종인 酸素自由基는 흥분성아미노산(excitatory amino acids, EAAs)의 分泌를 促進시키고, 세포내 Ca²⁺의 濃度를 增加시켜 결국 세포의 死滅을 招來하며^{108,110)}, 中樞나 末梢神經系를 구성하고 있는 神經細胞에 酸化的 損傷을 誘發함으로써 老人性 痴呆나 파킨슨씨병을 비롯하여^{21,23, 111-113)}, 腦虛血이나 腦卒中 등과 같은 각종 神經疾患을 誘發하는 病因으로 밝혀지면서^{108,114-119)} 酸素自由基의 神經毒 性에 대한 病理的 機轉明과 關聯 疾患에 대한 治療의 接近이 活潑하게 연구되어지고 있다^{24,25,120-122)}

酸素自由基와 中樞神經損傷과의 關係에 대한 最近의 研究 報告는 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)에 酸素自由基의 제거 효소유전자인 superoxide dismutase(SOD)-1에 돌연변이가 일어남으로써 患者의 腦 속에 酸素自由基가 과다히 축적되어 결국 神經細胞에 酸化的 損傷을 주는 것으로 밝혀지면서^{117,123,124)} 酸素自由基 가 많은 神經病變에 관여하고 있음이 증명되어 酸素自由 基의 毒性現象에 대한 機轉明과 酸素自由基에 의하여 誘發되는 疾患에 대한 治療의 접근을 위하여 國內外 많은 學者들이 動物을 대상으로 꾸준히 研究를 進行하여 왔다^{24,25)}. 특히 酸素自由基는 세포막의 지질과산화반응을 촉진 시킬 뿐만아니라^{114,125)}, 질소자유기의 하나인 nitric oxide(NO) 와 상호 작용함으로써 毒性이 강한 物質인 peroxynitrite을 生成하여 병변을 더욱 가속화 시킨다고 한다¹²⁶⁾. 또한 酸素自由基는 protein kinase C(PKC)나 cyclic AMP와 같은 이차 전달자에 影響을 미침으로서 세포독성을 초래한다고 한다. 최근에 酸素自由基의 酸化的 損傷에 대하여 한약재의 抽出物이나 동식물에서 정제한 天然抽出物들이 강력한 항 산화작용을 나타낸다는 實驗結果들이 報告되어 지고 있다^{120,121)}. 더우기 近來에 細胞培養技術이 널리 보급되면서 實驗 目的에 적합한 세포종을 培養하여 病變의 모델을 만든 다음 각종 治療제, 韓藥抽出物이나 天然抽出物들을 處理

함으로서 病變의 治療에 새로운 접근을 시도하고 있다. 따라서 培養細胞를 이용한 시험관내 實驗은 培養細胞가 생체에서와 같이 형태학적 특징은 물론 生理나 生化學的 性質을 그대로 가지고 있어 각종 약제의 效能이나 毒性物質의 안전성 검색 등에 매우 적합한 實驗方法으로 되고 있다. 최근에는 면역세포화학염색법이 발달하게 되자 이를 이용하여 순수한 세포종의 판별과 이의 순수 培養이 가능하게 되면서 培養細胞를 재료로 한 實驗은 시험관내의 매우 적합한 분석도구로 되었다.

本 實驗에서 GO를 생쥐의 培養 大腦神經細胞에 노출시킨 후 NR assay와 MTT assay법으로 分析한 結果, GO는 處理 濃度와 時間에 비례하여 細胞의 生存率을 현저하게 減少시켰다. 이같은 結果는 酸素自由基가 培養 생쥐의 척수신경질세포에, 소의 배양 회소돌기아교세포에 각각 毒性을 나타냈다는 實驗 結果와 일치하였다^{47,127}. 이러한 현상은 酸素自由基가 中樞나 末梢神經細胞에 모두 細胞毒性을 가지고 있음을 證明해 주고 있다. 本 實驗에 있어서 酸素自由基가 생쥐의 培養 大腦神經細胞에 독성을 나타낸 것은 GO가 항산화계에 손상을 줌으로서 항산화효소의 活性減少를 초래했거나 또는 酸素自由基중 superoxide와 같은 환원제가 세포내 Fe⁺⁺와 상호작용하여 毒性을 나타냈을 가능성도 배제할 수는 없지만^{124,128}, 本 實驗의 NR assay와 MTT assay를 비롯하여 lipid peroxidation 定量分析이나 neurofilament ELA, SRB 및 LDH활성도 分析의 結果를 볼 때 GO는 세포막의 지질과산화반응을 촉진을 비롯하여 neurofilament의 손상, 세포막의 손상 및 단백질합성의 억제에 의한 것으로 생각된다¹¹⁴.

GO의 酸化의 損傷에 대한 神經毒性을 調査하기 위하여 1-30mU/ml의 GO가 각각 여러 濃度로 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 시간별로 培養한 후 MTT assay에 의한 細胞生存率을 測定하였다. 그 結果 GO의 處理濃도에 비례하여 유의하게 細胞의 生存率이 減少하였으며 25 mU/ml GO處理에서 MCV값(midcytotoxicity value)이 나왔다(Table I, Fig. 1). 또한 GO의 處理 時間에 의한 影響을 調査하기 위하여 GO의 MCV인 25mU/ml에서 2-12 시간 동안 각각 培養 大腦神經細胞를 培養한 結果 GO의 處理 時間에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 減少시

켰으며 6시간 培養에서 MCV를 나타냈다(Table II, Fig. 2). GO의 독성에 대한 影響을 調査하기 위하여 1-20mU/ml의 GO가 각각 여러 濃度로 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 시간별로 培養한 후 NR assay에 의한 細胞生存率을 測定하였다. 그 結果 GO의 處理濃도에 비례하여 유의하게 細胞의 生存率이 減少하였으며 10mU/ml GO處理에서 MCV값(midcytotoxicity value)이 나왔다(Table III, Fig. 3). 또한 GO의 處理 時間에 의한 影響을 調査하기 위하여 GO의 MCV인 10mU/ml에서 2-12시간 동안 각각 培養 大腦神經細胞를 培養한 結果 GO의 處理 時間에 비례하여 細胞의 生存率을 유의하게 減少시켰으며 6시간 培養에서 MCV를 나타냈다(Table IV, Fig. 4). 最近에는 韓藥抽出物을 비롯한 天然抽出物들이 항산화효과나 세포성장인자등의 약리적 활성을 가지고 있어 뇌나 척수의 神經病變을 비롯하여 中風이나 암과 같은 각종 난치성질환의 治療에 매우 效果가 뛰어나다는 研究들이 報告되고 있다. 本 實驗에서는 여러 腦病變의 原因이라고 밝혀진 酸素自由基에 대하여 이의 酸化의 損傷에 의한 韓藥抽出物의 效果를 調査하기 위하여 생쥐에서 순수분리하여 培養한 大腦神經細胞에 酸素自由基의 하나인 GO를 處理한 후 七福飲抽出物의 效果를 neurofilament 定量을 비롯하여 lipid peroxidation 測定, LDH 活性度 測定 및 총단백질량 測定 등에 의하여 調査하였다.

七福飲에 대한 neurofilament의 測定을 위한 neurofilament enzymeimmuno assay (ELA)에 있어서 GO는 培養 大腦神經細胞에 處理한 濃도에 비례하여 neurofilament의 양적 減少를 보였으며 20mU/ml GO處理에서 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다(Table V, Fig. 5). 그러나 20mU/ml GO를 6시간 동안 神經細胞에 處理하기 전 10-150 μ g/ml의 七福飲이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리한 경우 處理한 濃도에 비례하여 neurofilament의 유의한 量的 增加를 보였으며 특히 50-150 μ g/ml의 七福飲 處理에서는 對照群에 비하여 80-92% 이상으로 나타나 이는 20mU/ml GO만을 處理한 경우(47.5%)에 비하여 매우 유의한 增加를 나타냈다. 또한 七福飲加石菖蒲(CAR)의 경우 CAR의 處理 濃도에 비례하여 增加양상을 보였으며 특히 150 μ g/ml 處理에서는 對照群(1.27 \pm 0.18)에 비하여

1.21±0.18로 나타나 GO만의 處理(0.62±0.05)에 비하여 매우 현저한 增加를 보였다. 石菖蒲(AR)의 處理에서도 處理濃도에 비례하여 增加함을 보여주었으며 150 μ g/ml의 處理에서는 對照群(1.42±0.19)에 비해 1.28±0.18로 나타나 이는 GO만의 處理(0.73±0.01)에 비하여 매우 유의한 增加를 보였다(Table VII, Fig. 7-a, b).

총단백질 調査를 위한 SRB 分析에 있어서 GO가 5-60 mU/ml의 濃도로 각각 포함된 培養液에서 培養 大腦神經細胞를 6시간 동안 培養한 다음 총단백질량은 處理 濃도에 비례하여 減少하였으며 MCV는 30mU/ml GO 處理에서 나타났다(Table VIII, Fig. 8). 그러나 30mU/ml GO를 6時間 동안 神經細胞에 處理하기 전 25-150 μ g/ml의 七福飲이 각각 포함된 培養液에서 3時間 동안 전처리 한 경우 處理한 濃도에 비례하여 단백질량의 增加를 보였으며 특히 100-150 μ g/ml의 七福飲 處理에서는 對照群에 비하여 85-90% 이상으로 나타나 이는 30mU/ml GO만을 處理한 경우(65.3%)에 비하여 매우 유의한 增加를 나타냈다(Table IX, Fig. 9). 또한 七福飲加石菖蒲(CAR)의 경우 CAR의 處理濃도에 비례하여 增加된 현상을 보였으며 특히 80-160 μ g/ml 處理에서는 對照群(100%)에 비하여 86-94% 이상으로 나타나 GO만의 處理(62.1%)에 비하여 매우 유의하게 현저한 增加를 보였다($p < 0.01$). 石菖蒲(AR)의 處理에서도 處理濃도에 비례하여 增加함을 보여주었으며 160 μ g/ml의 處理에서는 對照群(100%)에 비해 79.8%로 나타나 이는 GO만의 處理(58.3%)에 비하여 다소 높은 增加를 보였다(Table X, Fig. 10-a, b).

GO가 지질과산화반응에 미치는 影響을 調査하기 위하여 15-120 μ g/ml의 여러 濃도가 각각 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 6시간 동안 培養후 lipid peroxidation의 調査를 하였다. 七福飲에 대한 lipid peroxidation에 있어서 GO는 培養 大腦神經細胞에 處理한 濃도에 비례하여 TBARS의 濃도를 增加시켰으며 30mU/ml GO處理에서 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다(Table VII, Fig. 7). 그러나 30mU/ml GO를 6시간 동안 神經細胞에 處理하기 전 5-60 μ g/ml의 七福飲이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리 한 경우 處理한 濃도에 비례하여 TBARS 濃도의 增加를 보였으며 특히 60 μ g/ml의 七福

飲 處理에서는 對照群(25.6±3.1)에 비하여 38.4±3.1로 나타나 이는 30mU/ml GO만을 處理한 경우(86.1±5.8)에 비하여 절반으로 增加하였다(Table XI, Fig. 12). 또한 七福飲加石菖蒲(CAR)의 경우 CAR의 處理濃도에 비례하여 減少함을 보였으며 특히 60-90 μ g/ml 處理에서는 45.5±5.1($p < 0.01$)과 38.3±4.6($p < 0.01$)으로 나타나 GO만의 處理(90.8±6.1)에 비하여 매우 현저한 減少를 보였다. 石菖蒲(AR)의 處理에서도 處理濃도에 비례하여 減少함을 보여주었으며 90 μ g/ml의 處理에서는 對照群(31.1±4.1)에 비해 53.9±4.1로 나타나 이는 GO만의 處理(84.7±5.4)에 비하여 다소 減少함을 보여주었다(Table XIII, Fig. 13-a, b).

GO가 大腦神經細胞에 미치는 影響에 대한 LDH활성 調査를 위하여 10-80 μ g/ml의 七福飲이 각각 포함된 培養液에서 6시간 동안 培養한 다음 LDH활성도를 調査하였다. GO는 培養 大腦神經細胞에 處理한 濃도에 비례하여 LDH의 量的 增加를 보였으며 40mU/ml GO處理에서 對照群 100%(18.2±1.3)에 비하여 152.2%(27.7±2.6)로 나타나 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다(Table XIV, Fig. 14). 그러나 40mU/ml GO를 6시간 동안 神經細胞에 處理하기 전 5-100 μ g/ml의 七福飲이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리 한 경우 處理한 濃도에 비례하여 LDH의 유의한 量的 減少를 보였으며 특히 100 μ g/ml의 七福飲 處理에서는 對照群(13.9±1.5)에 비하여 21.1±2.6($p < 0.05$)으로 나타나 이는 40mU/ml GO만을 處理한 경우(39.5±3.8)에 비하여 유의한 減少를 나타냈다(Table XV, Fig. 15). 또한 七福飲加石菖蒲(CAR)의 경우 CAR의 處理濃도에 비례하여 減少樣相을 보였으며 특히 50 μ g/ml과 100 μ g/ml 處理에서는 16.2±1.9($p < 0.01$)와 17.4±1.5($p < 0.01$)로 나타나 이는 GO만의 處理(44.5±3.5)에 비하여 매우 현저한 減少를 보였다. 石菖蒲(AR)의 處理에서도 處理濃도에 비례하여 減少함을 보여주었으며 100 μ g/ml의 處理에서는 對照群(16.9±1.1)에 비해 27.8±1.2로 나타나 이는 GO만의 處理(39.5±2.6)에 비하여 약간의 減少를 보였다(Table XVI, Fig. 16-a, b).

이와같은 實驗 結果를 綜合해보면, GO와 같은 酸素自由基는 酸化的 損傷에 의해 細胞 生存率을 減少시키고 神經細胞에 대하여 毒性을 나타내며, 이에 대한 七福飲加味

方的 投與가 neurofilament의 量的 增加, 총단백질量的 增加, lipid peroxidation의 減少 및 LDH量的 減少를 보여 老化抑制 및 痴呆治療에 일정한 藥理的 效果가 있는 것으로 나타났다.

V. 結 論

本 研究에서는 glucose oxidase(GO)의 酸化的 損傷에 의한 毒性 效果를 糾明하고 이 毒性 效果에 대한 七福飲 및 七福飲加石菖蒲와 石菖蒲 抽出物의 效果를 確認하기 위해 新生 생쥐에서 분리 培養한 大腦 神經細胞를 對象으로 實驗한 結果는 다음과 같다.

1. 酸素自由基인 GO는 NR assay와 MTT assay에서의 細胞生存率을 減少시켰고 神經細絲와 총단백질량을 減少시켰으며, lipid peroxidation과 LDH량을 增加시켜 생쥐의 培養 大腦神經細胞에 毒性을 나타내었다.
2. 七福飲(CBY)은 神經細絲와 총단백질량을 유의하게 증가시켰고, lipid peroxidation과 LDH量的 유의한 減少를 나타냈다.
3. 七福飲加石菖蒲(CAR)는 神經細絲와 총단백질량을 유의하게 증가시켰고, lipid peroxidation과 LDH量的 유의한 減少를 나타냈다.
4. 石菖蒲(AR)는 神經細絲와 총단백질量的 유의한 增加를 나타냈다.

이상의 實驗結果에 따르면 七福飲加味方은 GO와 같은 酸素自由基의 酸化的 損傷에 대한 防禦作用이 있어 腦細胞의 老化 豫防 및 痴呆 治療에 대해 效果의으로 活用할 수 있으며, 向後 이에 대한 臨床的인 研究가 보완되어져야 할 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 楊維傑編 : 黃帝內經譯解(靈樞), 서울, 成輔社, pp.84-89, 104-145, 280-283, 1980.
2. 李時珍 : 本草綱目, 서울, 高文社, pp.603-604, 1973.
3. 王清任 : 醫林改錯, 臺聯, 國風出版社, pp.22-25, 1975.
4. 程如海 : 略論張錫純心腦共主神明說, 北京, 北京中醫藥大學學報, 19(6): 12, 1996
5. 董蓮榮等編著 : 中醫形神病學, 北京, 光明日報出版社, pp.22-23, 1991.
6. 柳道坤 : 東醫生理學講義, 益山, 圓光大學校出版局, pp.267-270, 365-377, 413-415, 506-507, 1996.
7. 李京燮外 : 東醫心系內科學(上), 서울, 書苑堂, pp.36-37, 43-44, 1995.
8. 黃義完外 : 東醫神經醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp.256-257, 262-264, 269-271, p.266, 920, 1987.
9. 王乃石 : 益氣聰明湯治療腦血管神經性病變의 体会, 湖北中醫雜誌, 18 (124): 41, 1996
10. 郭宇鵬外 : 謝海洲治療腦萎縮經驗, 北京, 中醫雜誌, 38 (10):586-587, 1997.
11. 張明淮外 : 心-腦-神志病辨證論治, 黑龍江科學技術出版社出版, pp.5-10, 100-112, 1988.
12. 金利和外 : 痴呆治療의 最近 研究動向에 關한 考察, 大韓鍼灸學會誌 14 (2): 115-126, 1997
13. 지계근 : 치매(Dementia)의 병리, 大韓神經科學會誌, 3 (1):5-9, 1985.
14. 이근후 : 精神科 영역에서의 痴呆, 大韓神經科學會誌, 3(1):25-27, 1985.
15. 김진수 : Alzheimer's disease의 신경화학적 변화에 관한 고찰, 大韓神經科學會誌, 3(1):10-15, 1985.
16. 李文鎬外 : 內科學(상), 서울, 醫林社, pp.256-259, 1986.
17. 大韓皮膚科學會刊行委員會 : 皮膚科學, 서울, 麗文閣, p.23, 1994.
18. 의학교육연수원 편저 : 노인의학, 서울, 서울대학교출판부, p.3, 7, 9, 10, 14, 22, 27, 595, pp.29-31, 1997.
19. 조유향 : 노인보건, 서울, 현문사, pp.43-49, 1995.
20. 이철완 : 이철완교수의 노인병 연구, 서울, 일중사, pp.

- 130-150.1997.
21. 김승업 : 치매, 알츠하이머병, 서울, 삶과 꿈, pp.53-54, 57-62, 87-94, 1997.
 22. 徐舜圭 : 成人病 老人病學, 서울, 高麗醫學, pp.10-13, 225-228, 1992.
 23. Difazio MC. Hollingsworth Z. Young AB. Penny JB : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. *Neurology.*, 42:402, 1992.
 24. Floyd RA : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.*, 4:2587- 2597, 1990.
 25. Park ST, Mun YJ, Oh JM, Kim JJ, Choi MK, Shim JH, Lim KT, Chung YT : Effect of iron-chelator on by oxygen radicals in culture oligodendrocytes. *Korean J Phys Anthropol.*, 9:189-195, 1996.
 26. 張介賓 : 景岳全書, 上海, 上海科學技術出版社, p.576, 981, 1984.
 27. 彭怀仁 主編 : 中華名醫方劑大全, 北京, 金盾出版社出版總發行, pp.56- 57, 1995.
 28. 江克明·包明惠 編著 : 簡明方劑辭典, 上海, 上海科學技術出版社, p.29, 1989.
 29. 楊思澍 外 : 中醫臨床大全(上卷), 北京, 北京科學技術出版社, 大成文化社影印, p.227, 1991.
 30. 彭 仁 : 中醫名醫方劑大全, 北京, 金盾出版社, p.22, 1990.
 31. 王云凱 : 中國名醫著名方, 河北, 河北科學技術出版社, p.1083, 1993.
 32. 東醫學研究所 : 東醫處方學, 서울, 麗江出版社, p.109, 1993.
 33. 彭怀仁編著 : 中醫處方大辭典(原名:中醫方劑大辭典) 1冊 : 익산, 泳信文化社, p.262, 1988.
 34. 程紹思·夏洪生 : 中醫證候診斷治療學, 北京, 北京科學技術出版社, pp.395- 409, 1993.
 35. 董黎明 : 實用中醫內科學, 서울, 一中社, pp.378-380, p.408, 1986.
 36. 黃始榮 : 遠志에 의한 腦 星狀細胞로부터 炎症性 細胞 活性物質 分泌의 抑制 效果에 關한 研究, 圓光大學校 大學院 博士論文, 1997.
 37. 崔龍竣 : 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗的 研究, 圓光大學校 大學院 博士論文, 1996.
 38. 趙潤淑 : 荊防地黃湯이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 博士論文, 1997.
 39. 강형원 : 天門冬에 의한 腦神經膠細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制效果, 圓光大學校 大學院 碩士論文, 1997.
 40. 우주영 : 調胃升清湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 影響, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 8(1):69-79, 1997.
 41. 李保英·姜錫峯 : 麝香이 생쥐이 腦損傷에 미치는 影響, 서울, 大韓韓醫學會誌, 16(2):299-311, 1995.
 42. 金聖賢·李相龍 : 洗心湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2): 39-50, 1997.
 43. 鄭仁哲·李相龍 : 溫膽湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2): 51-62, 1997.
 44. 鄭智天 : 左歸飲과 右歸飲에 의한 活性 酸素類의 消去作用과 抗氧化 酵素系의 活性 增加 效果에 대한 研究, 大韓韓醫學會誌, 17(1):21-36, 1996.
 45. 尹哲浩外 : 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 腦 過酸化 脂質 生成 및 活性酸素 生成系 酵素 活性에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 16(2):348- 364, 1995.
 46. 손경석外 : 七福飲이 老化 白鼠 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2): 25-38, 1997.
 47. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res.*, 37:62-70, 1994.
 48. Borenfreund E, Puerner JA : A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J. Tiss cult Mett* 9:1-9, 1984.
 49. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods.*, 65:55-63, 1983.

50. Takahashi K, Fujita T, Mayum T, Kish T : Effect of Adramycin on cultured mouse embryo myocardial cells. Chem Pharm 35(1) : 326-334, 1987.
51. 楊維傑編 : 黃帝內經譯解(素問), 서울, 成輔社, pp.1-12, 42-61, 100- 103, 131-145, 206-211, 455-468, 701-704, 1980.
52. 金完熙外編著 : 東醫生理學, 서울, 慶熙大學校 出版局, p.384, 1993.
53. 成彊慶 : 腦의 機能에 對한 臟象論의 考察, 서울, 大韓韓醫學會誌, 16 (1):468-474, 1995.
54. 許美晶外 : 內經의 腦學說에 對한 文獻의 考察, 惠和醫學, 6(1):175 -200, 1997.
55. 이원철外 : 內經에 나타난 腦의 考察, 서울, 大韓韓醫學會誌, 4(2):73- 77, 1983.
56. 李清福·劉渡舟 編著 : 中醫精神醫學, 天津, 天津科學技術出版社, pp.211- 212, 1988.
57. 王彩霞 : 論腦爲元神之府, 中醫函授通訊, 16(2):11-12, 1997.
58. 張德祥 : 試論腦爲君主之官神明出焉, 甘肅中醫學院學報, 13(2):3-4, 1996.
59. 鄭彝倫 : 從腦神與五臟神相關學說探討郁症的治原則, 북경, 중의학연구, 14 (7):3-4, 1998.
60. 金基錫譯, Richard F. Thompson著 : 腦, 서울, 星苑社, p.28, 35, 1989.
61. 丁彰炫 : 神에 대한 研究-《黃帝內經》을 中心으로-, 慶熙大學校 大學院 博士論文, 1997.
62. 서유현 : 논문 “뇌연구동향” <과학과철학> 제5집, 서울, 과학사상연구회, 통나무, p.307, 1994.
63. 虞搏 : 醫學正傳, 서울, 成輔社, p.9, 1986.
64. Agarwal, S. DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies. Proceeding of the National of the National Academy of Science., 91(25):12332-12335, 1994.
65. Ames, B. N. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of National Academy of sciences., 90(17):7915-7922, 1993.
66. Harman, D. The aging process: Major risk factor for disease and death. Proceeding of the Science., 88: 5360-5363, 1991.
67. Smith, C. D. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. Proceeding of the National Academy of Sciences., December 1; 88(23):10540-10543, 1991.
68. 柳泳秀外 : 記憶障礙에 關한 東·西醫學의 比較, 研究, 東醫神經精神科學會誌, 7(1):155-166, 1996.
69. 의학교육연구원 : 노인의학, 서울, 서울대학교출판부, p.595, 1997.
70. Andrea Eggert, M. Lynn Crismon, Larry Ereshefsky. Alzheimer's Disease. In Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach. Dipro JT et al. Ed, New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1325-1344, 1996.
71. 배영철外 : 老人醫學, 서울, 高麗醫學, pp.193-209, 1996.
72. 이근후 : 최심임상정신의학, 서울, 하나의학사, p.138, pp.216-228, 1988.
73. 張介賓 : 國譯 景岳全書 第三冊, 서울, pp.841-849, 1992.
74. 錢鏡湖 : 辨證奇門全書, 서울, 甘地出版社, pp.233-235, 1990.
75. 陳士鐸 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, p.102, 1984.
76. 陳士鐸 : 辨證錄, 서울, 醫聖堂, pp.241-246, 1989.
77. 李挺 : 編註醫學入門(卷二), 서울, 大成文化社, pp.180-182, 1984.
78. 龔廷賢 : 增補萬病回春, 서울, 一中社, pp.229-230, 1994.
79. 李中梓 : 醫宗必讀, 서울, 一中社, pp.323-324, 1991.
80. 孫思邈 : 備急千急要方(卷四十), 서울, 杏林出版社, pp. 12-13, 1976.
81. 金保罔外 : Alzheimer型 痴呆患者 2例에 對한 臨床的 考察, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 8(2):97-106, 1997.
82. 鄭仁哲外 : 痴呆에 對한 文獻의 考察, 東醫神經精神科學會誌, 7(1): 77- 94, 1996.
83. 黃義完外 : 치매에 대한 한의학적 임상연구, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 7(1):1-13, 1996.
84. 김영근外 : 痴呆에 대한 文獻의 考察, 서울, 대한한방내과학회지 18(2): 177-194, 1997.

85. 裴時星 : 老人性 痴呆에 關한 體質醫學의 研究, 大韓 韓醫學會誌, 13(2): 101-106, 1992.
86. 徐政烈外 : 痴呆에 對한 東西醫學의 文獻的 考察, 서울, 大韓鍼灸學會誌, 14(1):226-238, 1997.
87. 李東垣外 : 痴呆에 關한 東西醫學의 比較 考察, 大韓 韓方內科學會誌, 16(1): 2-5, 11, 14, 1995.
88. 鄭仁哲外 : 痴呆患者 17例에 對한 臨床的 考察, 대 전, 惠和醫學, 7(1): 70-84, 1998.
89. 張覺人 : 呆從痰治, 上海, 上海中醫藥雜誌, 3:20-21, 1995.
90. 傅仁杰外 : 老人性 腦病의 中醫診斷治療, 中醫雜誌, 35(3):79-84, 1994.
91. 楊思澎外 : 中醫臨床大全, 北京, 北京科學技術出版社, pp.224-230, 814- 816, 1991.
92. 徐恒旺 : 補腎活血化痰法治療老年性痴呆 32例, 廣州市, 《新中醫》編輯部, 29(5):55, 1997.
93. 劉昌群 : 中醫腦髓理論基礎乃辨證分析, 黑龍江中醫藥, 第3期, 1996.
94. 袁立人外 : 中醫老年病學, 上海, 上海中醫院出版社, pp.317-320, 1992.
95. 辛民教 : 原色 臨床本草學, 서울, 三光印刷社, pp .166-167, 172-173, 175-177, 221-223, 368-369, 374-375, 370-371, 1996.
96. 申佶求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp.1-8, 13-20, 80-84, 88-95, 1973.
97. 金晟壽 : 標準本草學, 서울, 進明出版社, pp.58-62, 108-113, 209- 210, 281-283, 298-303, 343-346, 1982.
98. 北韓 科學百科辭典出版社 : 實用東醫藥學, 서울, 日月書閣, pp.63-67, 73-74, 77-80, 119-122, 470-472, 473-474, 1990.
99. 金昌謙 : 本草從新, 서울, 杏林書院, p.6, 16, 29, pp. 1-2, 8-9, 48-49, 131-132, 1982.
100. 李尙仁 : 本草學, 서울, 修書院, pp.51-54, 56-60, 101- 103, 106- 110, 174-175, 347-348, 1981.
101. 江蘇新醫學院編 : 中藥大辭典(上·下冊), 上海, 上海科學技術出版社, p.29, 567, 623, 670, 876, 2534, 2626, 1994.
102. 醫學教材研究院 : 藥物療法, 서울, 서울대학교출판부, pp.399-403, 1996.
103. 대한신경외과학회 : 신경외과학, 서울, 중앙문화사, pp.276-279, 284- 285, p.299, 1997.
104. 이광우外 : 임상 신경학, 서울, 고려의학, pp.394-399, 1997.
105. 대한병리학회 편저 : 병리학, 서울, 고문사, pp. 36-40, 1990.
106. Lehninger · Nelson · Cox 著, 蔡範錫 譯 : Lehninger 생화학 제2판, 서울, 서울외국서적, p.37, 324, 1996.
107. Pellegrini-Giampietro D E, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. J. Neurochem., 51:1960-1963, 1988.
108. Pellegrini-Giampietro D E, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Morroni F : Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. J. Neurosci., 10:1035-1041, 1990.
109. Mayer M L, Westbrook G L : Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. J. Physiol., 394:501-527, 1987.
110. Zeman S, Lloyd C, Meldrum B, Leigh P N : Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 20: 219-231, 1994.
111. Bracco F, Scarpa M, Rio A, Battistin L : Determination of superoxide dismutase activity by the polarographic method of catalytic currents on the cerebrospinal fluid of aging brain neurologic degenerative disease. Proc. So. Exp. Biol. Med., 196:36-41, 1991.
112. Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J : NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neuros. Nature (London), 336:68-70, 1988.

113. Mattson M P, Cheng B, Smith-Swintosky V L : Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium and free radical mediated excitotoxic injury : Implications for treating neurodegenerative disorders. *J. Exp. Neurol.*, 124:89-95, 1993.
114. Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T : A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpatocopherol administration. *Stroke.*, 14:977-982, 1983.
115. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.*, 59:1609-1623, 1992.
116. Vannucci R C, Vannucci S J : Cerebral metabolic response of hyperglycemic immature rats to hypoxia-ischemia. *Pediatr. Res.*, 21: 524-529, 1987.
117. Tsai S Y, Tchen P H, Chen J D : The relation between motor evoked potentia and clinical motor status in stroke patients. *Electromyogr. Clin. Neurophysiol.*, 32:615-620, 1992
118. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F : Excitatory amino acid and free radicals formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci.*, 10:1035-1041, 1990.
119. Jesberger JA, Richardson JS : Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int J Neurosci.*, 57:1-17, 1991.
120. 백봉숙 외 : 녹차로 부터 분리된 Epicatechin 3-O-Gallate의 抗酸化作用 機轉에 관한 研究, 釜山大學校 藥學研究誌, 29(2):49-56, 1995.
121. 成日煥 : 抗酸化作用에 대한 杜沖藥藥鍼의 實驗的 研究, 大田大學校 大學院, 1997.
122. Conradi S, Ronnevi L, Norris F : A myotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP (ed) : *Human Motor Neuron Diseases*. New York Raven Press pp.35-56, 1982.
123. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Gotó O, Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial a myotrophic lateral sclerosis. *Nature (London)*, 362:59-62, 1993.
124. Halliwell B : Oxidants and human disease : Some new concepts. *FASEB J.*, 1:358-364, 1987.
125. Hall E. and Braughler J M : Role of lipid peroxidation in posttraumatic spinal cord degeneration. *CNS Trauma.*, 3:281-294, 1986.
126. Zhang Y, Tatsuno T, Carney JM, Mattson MP : Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against ironinduced degeneration. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 13:378-388, 1993.
127. Kim YS and Kim SU : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci. Res.*, 29:100-106, 1991.
128. Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton JW : Ironcatalyzed hydroxyl radical formation : Stringent requirement for free iron coordination site. *J Biochem.*, 59:3620-3624, 1984.

=Abstract=

Effects of
Chilbokyeumgamibang(七福飲加味方)
on the Cerebral Cortex Neuron
injured by Glucose Oxidase

Kong-Han Choi
Yeung-Su Lyu

Dept. of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental
Medicine, Won Kwang University, Iksan, Korea

As the average life span have been lengthened and

the rate of senile population have been raised, chronic degenerative diseases incident to aging has been increased rapidly and become a social problem.

With this social background, recently, the facts that oxygen radicals(OR) have toxic effects on Central Nervous System and Peripheral Nervous System and cause neuropathy such as Parkinson's Disease, Alzheimer Disease have been turned out, and accordingly lots of studies on the mechanism of the toxic effects of OR on nerves, the diseases caused by OR and the approaches to curing the diseases have been made.

The purpose of this study is to examine the toxic effects caused by Glucose Oxidase(GO) and the effects of herbal extracts such as Chilbokyueum(CBY), Chilbokyueunga Acori Rhizoma(CAR), Acori Rhizoma(AR) on the treatment of the toxic effects. For this purpose, experiments with the cultured cell from the cerebrums of new born mice were done.

The results of these experiments were as follows.

1. GO, a oxygen radical, decreased the survival rate of the cultured cells on NR assay, MTT assay and amount of neurofilaments and increased the amount of total protein, lipid peroxidation and the amount of LDH.

2. CBY have efficacy of increasing the amount of neurofilaments and total protein and decreasing lipid peroxidation and the amount of LDH.

3. CAR have efficacy of increasing the amount of neurofilaments and total protein and decreasing lipid peroxidation and the amount of LDH.

4. AR have efficacy of increasing the amount of neurofilaments and total protein.

From the above results, It is concluded that Chilbokyueungamibang has marked efficacy as a treatment for the damages caused in the GO-mediated oxidative process. And Chilbokyueungamibang is thought to have certain pharmacological effects on controlling over aging and treating Dementia. Further clinical study of this pharmacological effects of Chilbokyueungamibang should be complemented.

Key Word : glucose oxidase(GO), Chilbokyueum(CBY), Chilbokyueunga Acori Rhizoma(CAR), Acori Rhizoma(AR), oxygen radicals(OR).