

太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 손상된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響

金鍾寬* · 柳道坤** · 金敬堯*

Effects of Taeumjoweeatang against Glucose Oxidase-induced Neurotoxicity in the Cultured Mouse Cerebral Cortical Neurons

Kim Jong-kwan, Ryu Do-gon**, Kim Kyung-yo**

* Department of Sasang Constitutional Medicine

** Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea

1. Purpose :

The purpose of this study was to determine the effects of Taeumjoweeatang on the cerebral neurons injured by glucose oxidase(GO).

2. Methods :

I observed cell viability in mouse cerebral neurons exposed to glucose oxidase by NR assay and MTT assay and determined lipid peroxidation in mouse cerebral neurons exposed to glucose oxidase.

After administration of Taeumjoweeatang water extracts, I observed significant changes of cell viability, lipid peroxidation in mouse cerebral neurons exposed to glucose oxidase.

* 圓光大學校 韓醫科大學 四象醫學教室

** 圓光大學校 韓醫科大學 生理學教室

3. Results :

GO induced cell degeneration such as the decrease of cell viability was measured by MTT and NR assay in the cultured mouse cerebral cortical neurons.

Taeyumjoweetang was effective in the increase of total protein of neurons inhibited by GO.

Taeyumjoweetang was effective in the decrease of lipid peroxidation of neurons produced by GO.

Keywords : Taeyumjoweetang, glucose oxidase, cell viability

초 록

1. 연구목적

본 실험은 태음조위탕이 대뇌신경세포의 산화적 손상에 대한 효능을 밝히기 위한 것이다.

2. 연구방법

신생생쥐에서 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 GO에 의하여 誘導된 毒性에 대한 太陰調胃湯의 效果를 調査하였다.

3. 결과 및 결론

酸素自由基인 GO는 MTT assay에 의한 細胞生存率의 유의한 減少를 보였다. 酸素自由基인 GO는 NR assay에 의한 細胞生存率의 유의한 減少를 보였다. GO의 酸化的 損傷에 의한 神經毒性에 대하여 太陰調胃湯 투여로 總蛋白質量의 유의한 增加를 보였다. GO의 酸化的 損傷에 의한 神經毒性에 대하여 太陰調胃湯 투여로 lipid peroxidation의 유의한 減少를 보였다.

以上の 實驗結果는 太陰調胃湯이 大腦神經細胞의 酸化的 損傷에 대하여 有意性 있는 防禦의 作用을 나타낸 것으로, 이와 관련된 老化抑制나 腦虛血, 多發性硬化證, 痴呆 등 腦機能損傷이나 低下로 유발되는 疾患에 대한 臨床應用에 대해서도 持續的인 研究가 必要하다고 思料된다.

I. 緒 論

韓醫學에서 腦에 관해 언급한 문헌을 보면 『黃帝內經·靈樞』 「海論」¹⁾에 '腦爲髓之海'라 하였으며, 「經脈篇」¹⁾에서는 '人始生 先成精 精成而腦髓生'이라 하였다. 이는 腦의 生理的인 機能과 治療에 있어서 心·肝·腎의 臟腑와 밀접한 연관이 있다는 말이다.²⁾ 『黃帝內經·素門』 「五藏生成篇」³⁾에서는 '腎之合骨也'라고 한 바와 같이 뼈는 腎에 屬하고, 모든 髓는 腦에 屬하는데 髓는 精에서 기인하며 精은 다시 腎에서 기인하므로 治療에 있어서도 骨病, 髓病, 腦病 모두 治腎과 補腎을 한다고 할 수 있다. 이외에 腦의 病證으로는 腦髓不足, 腦血虧虛, 腦絡瘀阻 등이 있다⁴⁾.

한편 李濟馬(1837-1900)는 「東醫壽世保元」 「臟腑論」⁵⁾에서 '肺部位 在頤下背上 胃脘部位 在頤下胸上故 背上胸上以上 謂之上焦'라 하고, '胃脘與 舌 耳 頭腦 皮毛 皆肺之黨也.'라 하여 頭腦를 肺之黨에 소속시켰다.

本 實驗에서 使用된 太陰調胃湯⁶⁾은 李濟馬가 創案한 處方으로 肝大肺小한 太陰人의 胃脘受寒表寒病에 쓰이며^{6,7)}, 肺의 呼散之氣 不足으로 발생하는 燥病證에서 發汗과 潤燥시키는 작용이 있다⁸⁾. 洪⁷⁾은 食後痞滿, 腿脚無力, 泄瀉, 咳嗽에 太陰調胃湯을 사용하였다. 또한 陰血耗竭, 稟賦素弱, 咳嗽 등의 病證에서는 拱辰黑元丹, 鹿茸大補湯, 調胃升清湯과 함께 사용되었으므로⁵⁾ 肺의 呼散之力을 極大化시켜 肺之黨에 해당하는 頭腦의 작용에도 긍정적인 효과가 있을 것으로 사려된다.

本 實驗의 주제로 삼은 酸素自由基는 中樞神經系를 비롯하여 末梢神經系에 影響을 미쳐 파킨스씨병이나 근위축성측삭경화증과 같은 神經疾患을 유발하는 病因으로 밝혀지고 있다^{9,10,11)}. 그러나 아직도

이의 精確한 病理的 機轉에 대해서는 精確하게 糾明되어 있지 않으나 최근에 운동신경원질환의 病因으로서 Superoxide Dismutase(SOD)-1 遺傳子의 突然變異에 의한다는 것이 밝혀지면서 酸素自由基가 많은 神經病變에 관여하고 있음이 證明되어 酸素自由基의 毒性현상에 대한 기전규명과 酸素自由基에 의하여 유발되는 疾患에 대한 治療的 접근을 위하여 국내외 많은 학자들이 동물을 대상으로 꾸준히 研究를 진행하여 오고 있다^{12,13)}.

그간 太陰人 表病에 사용되는 太陰調胃湯에 대하여 潰瘍抑制效能¹⁴⁾이나 肥滿¹⁵⁾ 등에 관한 實驗的 研究報告는 있었으나 肺之黨에 속하는 頭腦와 관련된 實驗的 研究報告는 아직 없었다.

이에 著者는 太陰調胃湯이 上焦의 肺之黨에 所屬되는 頭腦에 일정한 機能을 향상시키는 효과가 있리라 思慮되어, 酸素自由基의 神經毒性에 대한 太陰調胃湯의 影響을 究明하기 위하여 신생생쥐에서 순수 분리한 大腦神經細胞를 배양하여 Glucose Oxidase(GO)에 노출시킨 후 이의 毒性效果를 測定하였으며, 또한 太陰調胃湯 處理 후 Glucose Oxidase에 의하여 誘發된 毒性에 대한 防禦 效果를 調查하여 有意한 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 3일 된 건강상태가 양호한 생쥐를 使用하였다.

2) 藥 材

本 實驗에 使用한 太陰調胃湯의 處方內容은 「東

醫壽世保元⁶⁾에 依據하였으며, 藥材는 圓光大學校 韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였고, 太陰 調胃湯 內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription Contents of Taeyejumjowee tang (TJT) Per Pack

韓藥名	生藥名	重量 (g)
薏苡仁	Semen Coicis	12
乾 栗	Semen Castaneae	12
羅 蔔子	Semen Raphani	8
五味子	Fructus Schizandrae	4
麥門冬	Tuber Liriopis	4
石菖蒲	Rhizoma Acori	4
桔 梗	Radix Platycodi	4
麻 黃	Herba Ephedrae	4
Total Amount		52

2. 方 法

1) 檢液의 調劑

太陰調胃湯 4貼 分量인 208g을 증류수와 함께 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 2시간동안 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회 전진공 농축기로 감압농축한 후 凍結乾燥器에서 凍結乾燥하여 각각 49.04g의 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 등¹⁶⁾의 방법 에 따라 시행하였다. 즉 생후 1-3일된 생쥐에서 적 출한 뇌조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한후 36℃, 5% CO₂/95%air로 조절된 항온기 내에서 培養하였다. 培養완료후 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)으로 3회 세 척후 Pasteur 피펫으로 세포를 분리시켰다. 분리된 세포들은 Poly-L-lysine (Sigma)으로 전처리된 96-multiwell에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포 를 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 처리

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 포함 된 培養液에서 2-12시간 동안 처리후 分析하였다.

5) 細胞毒性 및 防禦效果 檢定

(1) 細胞生存率 分析

① MTT 定量

MTT-3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diph enyltetrazolium bromide(Sigma) 定量은 Mosmann¹⁷⁾의 방법에 의하였다. 酸素自由基나 항 산화제를 처리한 培養 神經細胞를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50mg/ml의 MTT를 well당 최종濃 度로 희석하여 넣어 37℃, 5% CO₂로 조절된 정온 기에서 培養하였다. 培養 완료 후 dimethyl-

sulfoxide(DMSO, Merk)를 처리한 다음 spectrophotometer로 503nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 比較 調査하였다.

② NR 定量

Neutral red(NR, Sinma)의 定量은 Borenfreud와 Puerner¹⁸⁾의 방법에 따랐다. 즉 여러 濃度の GO를 처리한 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% CO₂로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료 후 PBS로 3회 세척 후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 比較 調査하였다.

③ SRB 定量

酸素自由基나 太陰調胃湯으로 일정시간 동안 처리한 大腦神經細胞에 0.4% sulforhodamine β 를 200 μ l 씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음 1.0% acetic acid로 3회 세척하였다. 세척 완료 후 10mM Tris base를 이용하여 SRB-bound protein을 녹인 후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 比較 調査하였다.

④ Lipid peroxidation 定量

Lipid peroxidation은 GO나 太陰調胃湯 抽出物을 일정시간 동안 처리한 大腦神經細胞의 상층액과 세포용해액내의 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)를 측정하는 것으로, 위액에 12N H₂SO₄와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0ml와 0.3ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 TBA를 1.0ml를 가한 후 90도에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각 후 n-butanol로 처리하였다. n-butanol 처리완료 후 원침하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 측정하였다.

6) 統計 處理

實驗 結果에 대한 유의성의 검정은 ANOVA 한 후에 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 5에서 60mU/ml까지의 각각의 濃度로 포함된 培養液에서 4시간 동안 培養한 후 GO의 毒性效果를 MTT assay법에 의하여 調査한 結果 5mU/ml GO 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 69.3%로 나타났다. 그러나 15mU/ml의 처리에서는 60.3%로 이보다 다소 낮게 나타났다. 또한 30과 60mU/ml GO를 처리한 경우 이의 생존율은 각각 50.8(p<0.05)과 37.4%(p<0.01)로 대조군에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났다.(Table 1)

GO가 시간에 따라 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 30mU/ml GO가 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 각각 1에서 6시간 동안 培養한 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 대조군과 比較 調査한 結果 1시간 培養에서는 대조군(100%)에 비하여 72.6%의 細胞生存率을 보였다. 또한 2시간 培養에 있어서는 67.8%로 대조군에 비하여 다소 낮은 생존율을 나타냈으며 4시간 培養에서는 대조군에 비하여 51.6%(P<0.05)의

Table 1. 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	1.79 ± 0.17	-
5	1.24 ± 0.14	30.7
15	1.08 ± 0.11	39.7
30	0.91 ± 0.08 *	49.2
60	0.67 ± 0.04 **	62.6

Cultured mouse cerebral neurons were treated with various concentrations of glucose oxidase(GO) for 4 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

Table 2. Time-response relationship of glucose oxidase(GO) by MTT assay in cultured mouse motor neurons.

GO (mU/ml)	MTT absorbance(570nm)			
	1hr	2hr	4hr	6hr
0	1.46 ± 0.18	1.49 ± 0.15	1.53 ± 0.12	1.47 ± 0.14
30	1.06 ± 0.07	1.01 ± 0.05	0.79 ± 0.03*	0.48 ± 0.01**

Cultured mouse motor neurons were treated with 30mU/ml GO for various time intervals. The values are the mean ± SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

생존율을, 6시간 배양에 있어서는 32.7%(p<0.01)의 생존율을 각각 나타냈다.(Table 2)

(2) NR 定量

배양 중인 大腦神經細胞를 Ca²⁺, Mg²⁺ free인

Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 GO가 5 에서 40mU/ml 까지의 濃度로 포함된 培養液에서 4시간 배양한 다음 이의 影響을 調査한 結果 5mU/ml의 처리에서 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 78.3%로 나타났다으며 10mU/ml 에서는 71.0%로 나타났다. 또한 20과 40mU/ml 에서는 각각 53.7(p<0.05), 49.4%(p<0.01)로 나타났다.(Table 3)

Table 3. Absorbance (% of control) at 540nm wavelength for the NR assay on glucose oxidase(GO) in cultured mouse motor neurons.

GO(mU/ml)	NR absorbance(540nm)	Decrease of cell viability(%)
0	1.62 ± 0.16	-
5	1.27 ± 0.18	21.7
10	1.15 ± 0.13	29.0
20	0.87 ± 0.06 *	46.3
40	0.80 ± 0.02 **	50.6

Cultured mouse motor neurons were grown in media containing various concentrations of glucose oxidase(GO) for 4 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

GO가 배양時間에 따라 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 MCV(midpoint cytotoxicity value)값인 20mU/ml GO濃度에서 1~6시간 동안 배양한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 調査한 結果 1시간, 2시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 각각 80.7, 75.5%로 나타났으며 4시간과 6시간 각각 56.4(p<0.05), 40.2%(p<0.01)로 나타났다.(Table 4)

Table 4. Time-response relationship of glucose oxidase(GO) by NR assay in cultured mouse motor neurons.

GO (mU/ml)	NR absorbance(540nm)			
	1hr	2hr	4hr	6hr
0	1.35 ± 0.15	1.43 ± 0.11	1.49 ± 0.13	1.32 ± 0.16
40	1.09 ± 0.10	1.08 ± 0.07	0.84 ± 0.05*	0.53 ± 0.02**

Cultured mouse motor neurons were incubated with 40mU/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

2. 韓藥抽出物の 效果

1) 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 총단백질양의 측면에서 調査하기 위하여 Glucose Oxidase(GO)가 10에서 80mU/ml 까지의 각각의 濃度로 포함된 培養液에서 4시간 동안 培養한 후 GO에 의한 단백질 합성의 변화에 대해 調査한 結果 10mU/ml GO 처리에서는 단백질의 합성이 대조군(100%)에 비하여 79.2%로 나타났다. 또한 20mU/ml의 처리에서는 대조군에 비하여 71.43%로 다소 낮게 나타났다. 또한 40 과 80mU/ml GO를 처리한 경우 단백질 합성은 각각 51.6 (p<0.05)과 31.4%(p<0.01)%로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났으며, MCV값은 40mU/ml에서 나타났다.(Table 5)

(2) 태음조위탕의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 GO의 산화적 손상에 있어서 太陰調胃湯의 效果를 총단백질의 양적변화

Table 5. 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 ± 5.6
10	79.2 ± 6.2
20	71.4 ± 5.7
40	51.6 ± 4.6*
80	31.4 ± 4.9**

Cultures mouse cerebral neurons were exposed to 10, 20, 40 and 80mU/ml glucose oxidase(GO) for 4 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

Table 6. Dose-response relationship of Taeyeumjoweetang for its neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in total protein synthesis.

GO (mU/ml)	Total protein(% of control)				
	concentration of Taeyeumjoweetang(μg/ml)				
	0	25	45	90	180
0	100 ± 5.4	100 ± 3.6	100 ± 6.4	100 ± 4.7	100 ± 5.5
40	48.7 ± 4.1	61.8 ± 4.8	70.5 ± 4.3	84.6 ± 5.2*	93.7 ± 5.9**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with Taeyeumjoweetang. Cultures were preincubated with 25, 45, 90 and 180 μg/ml Taeyeumjoweetang for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 40mU/ml GO for 4 hours. Amount of total protein was measured at wavelength of 540nm. The results indicate the mean ± SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. *p<0.05; **p<0.01

측면에서 調査하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 40mU/ml GO濃度에서 4시간 동안 노출시키기 3시간 전에 25에서 180 μ g/ml 太陰調胃湯이 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 防禦效果를 調査하였다. 그 結果 25 μ g/ml GO만을 처리한 경우 총단백질의 양적변화는 대조군(100%)에 비하여 61.8%로 나타났으며, 또한 45 μ g/ml 太陰調胃湯의 처리에서는 대조군에 비하여 70.5%로 나타났다. 그리고 90, 180 μ g/ml 처리에서는 각각 84.6(p<0.05), 93.7%(p<0.01)로 GO만의 처리에 비하여 높게 나타났다.(Table 6)

2) Lipid peroxidation 定量

(1) GO의 影響

GO濃度에 따른 lipid peroxidation의 측정하기 위하여 GO가 15에서 140mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 4시간 동안 처리한 후 세포의 생존율을 대조군과 比較 調査하였다. 그 結果 15mU/ml GO 처리에서는 TBARS가 24.8 \pm 5.7(pmol/10⁶ cells)로 나타났다. 또한 35, 70 및 140mU/ml GO 처리의 경우 TBARS가 각각 35.5 \pm 5.7(p<0.01), 47.8 \pm 6.2(p<0.01), 58.9 \pm 5.9(pmol/10⁶ cells)(p<0.01)로 나타났다. 이에 대한 細胞生存率 減少는 57.1, 111.5, 160.6%로 각각 나타났으며 細胞生存率 減少의 MCV값은 35mU/ml GO처리에서 나타났다.(Table 7)

(2) 太陰調胃湯의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 GO의 산화적 손상에 있어서 太陰調胃湯의 效果를 lipid peroxidation측면에서 調査하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 35mU/ml GO濃度에서 4시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15에서 120 μ g/ml 太陰調胃湯이 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후

Table 7. Dose-response relationship of glucose oxidase(GO) on lipid peroxidation in cultured mouse cerebral neurons.

GO concentration (mU/ml)	TBARS (pmol/10 ⁶ cells)	Decrease of cell viability(%)
0	22.6 \pm 4.2	-
15	24.8 \pm 5.3	9.7
35	35.5 \pm 5.7**	57.1
70	47.8 \pm 6.2**	111.5
140	58.9 \pm 5.9**	160.6

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to various concentrations of glucose oxidase(GO) for 4 hours. Thiobarbituric acid(TBA) fluorometric assay was adopted to analyse lipid peroxidation and TBA reactive substance(TBARS) were represented as pmol/10⁶ cells. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

이의 防禦效果를 調査하였다. 그 結果 35mU/ml GO만을 처리한 경우 TBARS는 대조군 32.6 \pm 5.2(pmol/10⁶cells)에 비하여 98.4 \pm 7.1(pmol/10⁶cells)로 나타났다. 그러나 15 μ g/ml 太陰調胃湯의 처리에서는 대조군 31.5 \pm 4.7(pmol/10⁶cells)에 비하여 85.5 \pm 6.9(pmol/10⁶cells)로 나타났으며 30 μ g/ml 太陰調胃湯의 처리에서는 대조군 32.8 \pm 5.1(pmol/10⁶cells)에 비하여 83.6 \pm 6.3(pmol/10⁶cells)로 나타났다. 또한 60 과 120 μ g/ml 太陰調胃湯처리에 있어서는 각각 대조군 34.7 \pm 5.7과 38.6 \pm 4.6(pmol/10⁶cells)에 비하여 68.2 \pm 5.7(p<0.05)과 55.5 \pm 5.1(pmol/10⁶cells)(p<0.01)로 나타나 이는 GO만의 처리에 비하여 매우 유의하게 減少하였다.(Table 8)

Table 8. Dose-response relationship of Taeyeumjoweeatang for its neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in lipid peroxidation.

GO (mU/ml)	TBARS(pmol/10 ⁶ cells)				
	concentration of Taeyeumjoweeatang(μg/ml)				
	0	15	30	60	120
0	32.6±5.2	31.5±4.7	32.8±5.1	34.7±5.7	38.6±4.6
35	98.4±7.1	85.5±6.9	83.6±6.3	68.2±5.7*	55.5±5.1**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with Taeyeumjoweeatang. Cultures were preincubated with 15, 30, 60 and 120 μg/ml Taeyeumjoweeatang for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 30mU/ml GO for 4 hours. TBA reactive substance(TBARS) were represent as pmol/10⁶ cells. The results represent the mean±SsE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. **p<0.01

IV. 考 察

『東醫壽世保元』 「臟腑論」⁵⁾에서는 우리 몸의 臟腑를 部位的인 概念에 의해 四焦 즉 上焦, 中上焦, 中下焦, 下焦로 나누어 肺·胃脘部位, 脾·胃部, 肝·小腸部位, 腎·大腸部位로 설명하였다. 臟腑의 形成過程은 水穀으로부터 비롯되는데 水穀은 各腑의 形態의 要因에 의해 停蓄과 消導, 上升과 下降의 氣運을 갖게 되어 각각 熱氣와 涼氣, 溫氣와 冷氣를 지니게된다. 이 溫·熱·涼·寒의 氣運은 各腑로부터 前四海와 後四海로 變化하게 되는데, 이때 四海의 清濁·內外·出入을 통해 各臟의 黨을 形成하게 된다.

頭腦는 肺之黨에 屬하며 이를 살펴보면, '水穀의

溫氣는 胃脘에서 津으로 化하여 絳 밑으로 들어가 津海가 되니 津海란 津이 모여 있는 곳이다. 津海의 清氣는 귀로 나와서 神이 되고 그 神이 頭腦로 들어가 腦海가 되니 腦海란 神이 모여 있는 곳이다. 腦海의 清汁은 안으로는 肺로 돌아가고, 濁津는 밖으로 皮毛로 돌아가므로 胃脘, 舌, 耳, 頭腦, 皮毛는 모두 肺의 무리이다.'라고 하였다.⁶⁾

太陰人의 '肝大肺小' 한 臟腑形局이 成立되는 機轉에 대해서 李濟馬는 『東醫壽世保元』 「四端論」⁵⁾에서 '太陰人은 喜性은 廣張하고 樂情은 促急하니, 喜性이 廣張한즉 氣注肝而 肝益盛이요, 樂情이 促急한즉 氣激肺而 肺益削 하게 되니 결국 太陰之臟局이 肝大肺小로 形成되게 된다'고 하였다. 또한 '頭腦之 腦海는 肺의 根本이다'라고 하였으니, 肝大肺小한 體質을 가진 太陰人은 頭腦之腦海가 充足되어야 할 것이다. 따라서 肺의 根本 즉 肺元을 補強할 수 있는 處方이나 藥物은 곧 頭腦之腦海를 補強할 수 있게 되는 것이다.

太陰調胃湯은 肺元을 補強하거나 調理할 수 있는 藥材를 두루 包含하고 있으며 食後痞滿, 腿脚無力病, 咳嗽病에 사용되었다. 반면에 太陰人이 陰血耗竭되어 耳聾, 目暗, 脚弱, 腰痛 등의 증상이 나타나거나, 稟賦素弱에 滋益之方으로 사용하는 鹿茸大補湯, 調胃升清湯이나 拱辰黑元丹과도 같이 사용되었으므로 肺의 根本을 강하게 補強하는 效能이 있다고 생각된다. 그런데 太陰調胃湯은 본래 食後痞滿, 腿脚無力, 泄瀉, 咳嗽 등⁶⁾의 症狀에 應用되었으며 後世에 이르러서도 洪⁷⁾은 腹痛, 黃疸, 喘息, 癩疫, 婦人帶下, 下血 등에 사용하였으며 朴¹⁹⁾과, 朝醫學²⁰⁾에서는 黃疸, 傷寒時氣頭痛, 身痛, 無汗, 食滯痞滿, 腿脚無力, 脫陰에 應用할 수 있다고 하였으며 金²¹⁾은 氣管支炎, 過敏性大腸症候群, 消化不良, 腎臟炎, 十二指腸潰瘍, 胃潰瘍 등에 擴張應用하였으나 頭腦

에 대한 認識과 實驗의 研究는 未備하였다.

또한 본 實驗에 使用된 太陰調胃湯의 각 構成藥物의 本草學的인 效能을 살펴보면²²⁻²⁸⁾ 薏苡仁은 微寒無毒, 味甘淡, 利水滲濕, 清熱, 除痺, 健脾止瀉, 排膿으로 開肺之胃氣, 消食進食하며, 乾栗은 溫無毒, 味鹹, 益氣厚腸, 補腎氣로 開肺之胃氣, 消食進食하고, 蘿蔔子는 平無毒, 味辛甘, 消食化痰, 下氣定喘, 健胃, 祛痰, 利大小便하며, 麥門冬은 微寒無毒, 味甘, 微苦, 潤燥生津, 化痰止咳, 清心潤肺, 治虛勞客熱, 潤腸通便, 益胃生津으로 補肺和肺하고, 桔梗은 微溫無毒, 味辛苦, 清肺提氣, 去痰排膿, 表散寒邪, 開胸膈滯氣 清頭目하여 壯肺而有外攘之力하며, 麻黃은 溫無毒, 味辛苦, 發汗解表, 平喘利水, 治傷寒痛, 惡寒無汗하여 解肺之表邪하고, 五味子는 溫無毒, 味酸, 斂肺滋腎, 生津斂汗, 澀精止瀉 明目하여 健肺直肺하며, 石菖蒲는 微溫無毒, 味辛, 芳香開竅, 逐痰祛濁, 通九竅, 明耳目, 治胸煩脹悶한다.

따라서 本方은 전체적으로 볼 때 太陰人의 胃氣를 補強하고 痰濁을 제거하여 升清할 基盤을 만들고 肺의 氣運을 튼튼하게 해서 밖으로 떨쳐나옴과 함께, 肺의 表邪를 풀고 肺의 氣運을 均調시키며 肺를 補和, 健直시키는 處方으로 肺小한 太陰人의 胃脘에서 水穀之氣를 上升시켜 水穀溫氣가 舌下에서 津海로, 頭腦에서 髓海로 充足되게 해 주는 處方이다.^{7, 20, 28)} 그러므로 太陰調胃湯이 上焦에 있는 肺之黨인 頭腦의 髓海를 충족시키며, 神이 머무를 여건을 마련하여 주므로써 실제 頭腦의 疾患에 使用할때 유용하게 응용할수 있는 處方이 될수있다고 생각된다.

이에 著者는 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 GO에 의하여 誘導된 毒性에 대한 韓藥抽出物인 太陰調胃湯의 效果를 調査하여 이에 有意性있는 結果를 얻었다.

특히 酸素自由基는 細胞膜의 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 질소자유기의 하나인 Nitric Oxide(NO)와 相互作用함으로써 毒性이 강한 물질인 Peroxynitrite을 생성하여 병변을 더욱 가속화시킨다고 한다. 또한 배양 해마신경세포에서 흥분성 아미노산(EAAs)을 분비케 유도한다는 것이 밝혀졌으며 분비된 EAAs는 N-methyl-D aspartase (NMDA) 수용체를 과활성화시킴으로서 세포내 Ca²⁺의 恒常性を 깨뜨리며 그 결과 神經細胞를 損傷시킬 뿐만 아니라 나아가서는 細胞의 死滅을 초래한다고 한다.²⁹⁻³²⁾ 그 밖에도 酸素自由基는 protein kinase C(PKC)나 cyclic AMP와 같은 이차전달자에 영향을 미침으로서 細胞毒性을 초래한다고 한다. 최근에 酸素自由基의 산화적 損傷에 대하여 韓藥劑의 抽出物이나 動植物에서 정제한 天然抽出物들이 강력한 항산화작용을 나타낸다는 실험결과들이 보고되고 있다. 세포배양기술이 널리 보급되면서 실험 목적에 적합한 세포종을 배양하여 病變의 모델을 만든 다음 각종 治療劑나 韓藥抽出物이나 天然抽出物들을 처리함으로써 病變의 治療에 새로운 접근을 시도하고 있다. 따라서 배양세포를 이용한 시험관내 실험은 배양세포가 생체에서와 같이 形態學的 특징은 물론 生理나 生化學的 性質을 그대로 가지고 있어 각종 藥劑의 效能이나 毒性物質의 안전성 검색 등에 매우 적합한 실험방법으로 인정받고 있다. 더욱이 면역세포화학염색법이 발달하게 되자 이를 이용하여 순수한 세포종의 판별과 이의 순수배양이 가능하게 되면서 배양세포를 재료로한 실험은 시험관내의 매우 적합한 분석도구가 되었다.

산소자유기는 또한 腦虛血이나 多發性硬化證의 병인으로 밝혀지면서 酸素自由基의 神經毒性에 대한 病理的 機轉糾明에 대하여 많은 研究가 이루어져 왔다.^{30, 33-34)} 본 實驗에서 GO를 생쥐의 배양 大腦神

經細胞에 노출시킨 후 NR assay와 MTT assay법으로 分析한 結果 GO는 처리 농도와 시간에 비례하여 細胞의 生存率을 현저하게 減少시켰다. 이같은 結果는 酸素自由基가 배양 생쥐의 척수신경절세포와 소의 배양 회소돌기아교세포에 각각 毒性을 나타냈다는 實驗 結果와 일치하였다.^{16,35)} 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. 본 實驗에 있어서 酸素自由基가 생쥐의 배양 大腦神經細胞에 毒性을 나타낸 것은 GO가 항산화계에 損傷을 줌으로서 항산화효소의 活性減少를 초래했거나 또는 酸素自由基중 superoxide와 같은 환원제가 세포내 Fe^{3+} 와 상호작용하여 毒性을 나타냈을 가능성도 배제할 수는 없지만,³⁶⁻³⁷⁾ 본 실험의 NR assay와 MTT assay를 비롯하여 lipid peroxidation 정량 분석이나 SRB 분석의 결과를 볼 때 GO는 細胞膜의 지질과산화반응 촉진과 단백질합성의 억제에 의한 것으로 생각된다.³⁰⁾

이에 GO의 산화적 손상에 대한 神經毒性을 조사하기 위하여 5-60mU/ml의 GO가 각각 여러 농도로 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 시간별로 배양한후 MTT assay 에 의한 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 GO의 처리농도에 비례하여 유의하게 세포의 生存率이 減少하였다.(Table 1) 또한 GO의 처리 시간에 의한 영향을 조사하기 위하여 GO 30mU/ml에서 1- 6시간 동안 각각 배양 대뇌신경세포를 배양한 결과 GO의 처리 시간에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 감소시켰다.(Table 2)

GO의 독성에 대한 영향을 NR assay에 의하여 조사하기 위하여 5-40mU/ml 의 GO가 각각 여러 농도로 포함된 배양액에서 大腦神經細胞를 시간별로 배양한 후 NR assay에 의한 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 GO의 처리농도에 비례하여 유의 하

게 細胞의 生存率이 減少하였다.(Table 3) 또한 GO의 처리 시간에 의한 영향을 조사하기 위하여 GO의 MCV인 40mU/ml에서 1-6시간 동안 각각 배양 대뇌신경세포를 배양한 결과 GO의 처리 시간에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 감소시켰다.(Table 4)

그런데 최근에는 한약추출물을 비롯한 천연추출물들이 항산화효과나 세포성장인자 등의 약리적 활성을 가지고있어 腦나 脊髓의 神經病變을 비롯하여 中風이나 癌과 같은 각종 難治性疾患의 治療에 매우 효과가 뛰어나다는 研究들이 보고되고 있다. 그러므로 본 실험에서는 여러 腦病變의 原因이라고 밝혀진 酸素自由基에 대하여 이의 산화적 손상에 의한 太陰調胃湯의 效果를 조사하기 위하여 생쥐에서 순수분리하여 배양한 대뇌신경세포에 酸素自由基의 하나인 GO를 처리한 후 太陰調胃湯의 效果를 lipid peroxidation측정 및 총단백질량측정 등에 의하여 조사하였다.

총단백질 조사를 위한 SRB 분석에 있어서 GO가 10-80mU/ml 의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양 대뇌신경세포를 4시간동안 배양한 다음 총단백질량은 처리 농도에 비례하여 감소하였으며 MCV는 40mU/ml GO처리에서 나타났다.(Table 5) 그러나 40mU/ml GO를 6시간 동안 신경세포에 처리하기 전 25-180 μ g/ml의 太陰調胃湯을 각각 포함된 배양액에서 3시간 동안 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 단백질량의 증가를 보였으며, 특히 90-180 μ g/ml의 太陰調胃湯 처리에서는 對照群에 비하여 84-93% 以上으로 나타나 이는 40mU/ml GO만을 처리한 경우(51.6%)에 비하여 매우 유의한 增加를 나타냈다.(Table 6)

또한 GO가 지질과산화반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 15-140mU/ml의 여러 농도가 각각

포함된 배양액에서 대뇌신경세포를 6시간 동안 배양 후 lipid peroxidation의 조사를 하였다. 太陰調胃湯에 대한 lipid peroxidation에 있어서 GO는 배양 대뇌신경세포에 처리한 농도에 비례하여 TBARS의 濃度を 減少시켰으며 35mU/ml GO처리에서 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다.(Table7) 그러나 35mU/ml GO를 4시간 동안 신경세포에 처리하기 전 15-120 μ g/ml의 太陰調胃湯이 각각 포함된 배양액에서 3시간동안 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 TBARS 농도의 감소를 보였다.(Table 8)

최근에 韓醫學에서는 痴呆에 대하여 四象醫學의 治療와 研究가 활발히 이루어지고 있는데, 痴呆에 대한 臨床研究에서 배³⁸⁾는 노인성痴呆에 관한 四象體質醫學的 研究를 통해 痴呆의 四象醫學的 접근을 하였고, 황³⁹⁾ 등은 痴呆에 관한 韓醫學的 臨床研究를 통해, 김⁴⁰⁾ 등은 알츠하이머형 痴呆에 四象體質別 藥物治療 및 針治療를 시행하였는데 太陰人에게는 調胃升清湯을 少陽人에게는 荊防地黃湯을 少陰人에게는 香附子八物湯을 각각 투여한 결과 그 유의성을 각각 보고하여 四象醫學的 治療와 證治醫學的 治療가 痴呆 治療에 有效함을 밝혔다. 또한 實驗研究에서 우⁴¹⁾ 등은 방사형 미로장치를 사용하여 調胃升清湯이 흰쥐의 學習과 記憶을 증진시키는 효과가 있음을, 이⁴²⁾는 調胃升清湯이 뇌손상으로 유발시킨 Alzheimer's disease 모델 백서의 學習과 記憶을 증진시키는 효과가 있음을, 이⁴³⁾는 Morris 수중미로 실험결과를 분석한 결과 荊防地黃湯이 記憶의 增進 作用이 있음을, 조⁴⁴⁾ 등은 荊防地黃湯이 Alzheimer's disease 모델 백서의 學習과 作業記憶의 결함을 改善시키는 효과가 있음을 報告하였다.

痴呆는 고등신경중추를 파괴시키는 병이며, 大腦皮質은 고등의 지적기능을 수행하는 곳으로, 나이가

들어가면 어느 정도 퇴화를 하게된다. 그러나 痴呆 증상이 있을때는 보다 심각한 퇴화가 발생한다고 할 수 있다. 알츠하이머 병의 병리학적 소견은 腦 전체가 위축되고 뇌실이 확대되어 있으며, 신경원섬유 변화와 노인반과 같은 특징적인 구조가 나타난다.^{40,44)} 따라서 김 등⁴⁰⁻⁴²⁾의 報告를 注目해 볼때, 太陰調胃湯은 痴呆의 分類⁴⁵⁾중 病理的인 면에서 大腦皮質에 현저한 病理的 變化를 나타내는 皮質性 痴呆중 알츠하이머 병에도 그 有意성을 보일것으로 생각된다.

以上의 實驗을 考察한 結果 산소자유기인 GO는 MTT·NR assay에 의해 細胞生存率의 有意한 감소를 보였고, 太陰調胃湯의 투여로 GO의 酸化의 損傷에 의한 神經毒性에 有意한 總 단백질량의 증가와 Lipid peroxidation의 감소를 나타냈으므로 太陰調胃湯은 大腦皮質 神經細胞의 損傷에 대해 有意성 있는 防禦效果가 있으며, 또한 大腦皮質 神經細胞의 損傷에 대한 防禦效果로 皮質性 痴呆에 대한 豫防 및 治療 뿐 아니라 老化防止, 腦機能損傷에 대하여 有意한 效果가 있을것으로 생각되며, 이에 대한 向後 持續的인 研究가 必要하리라 思料된다.

V. 結 論

glucose oxidase(GO)의 酸化的 損傷에 의한 毒性效果를 究明하기 위하여 新生생쥐에서 분리 배양한 大腦神經細胞에 여러 濃度の GO가 포함된 培養液에서 1-6時間 동안 처리한 다음 GO가 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 조사하였으며 또한 GO의 毒性效果에 대한 韓藥抽出物인 太陰調胃湯의 影響을 調査한 結果는 다음과 같다.

1. 酸素自由基인 GO는 MTT assay에 의한 細

1. 胞生存率의 有意한 減少를 보였다.
2. 酸素自由基인 GO는 NR assay에 의한 細胞生存率의 有意한 減少를 보였다.
3. GO의 酸化的 損傷에 의한 神經毒性에 대하여 太陰調胃湯 투여로 총단백질양의 有意한 增加를 보였다.
4. GO의 酸化的 損傷에 의한 神經毒性에 대하여 太陰調胃湯 투여로 lipid peroxidation의 有意한 減少를 보였다.

以上の 實驗結果는 太陰調胃湯이 大腦神經細胞의 酸化的損傷에 대하여 有意性 있는 防禦的 作用을 나타낸 것으로, 이와 관련된 老化抑制나 腦虛血, 多發性硬化證, 痴呆 등 腦機能損傷이나 低下로 유발되는 疾患에 대한 臨床應用에 대해서도 持續的인 研究가 必要하다고 思料된다.

參 考 文 獻

1. 楊維傑: 黃帝內經譯解(靈樞), 서울, 成輔社, p.104, 281, 1980.
2. 金賢濟·洪元植: 韓醫學辭典, 서울, 成輔社 p.113, 1983.
3. 楊維傑: 黃帝內經譯解(素問), 서울, 成輔社, p.94, 100, 1980.
4. 金完熙·崔達永: 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, pp.47-48, 443-444, 1988.
5. 전국 한의과대학 사상의학교실역음: 四象醫學, 서울, 集文堂, pp.440-442, 483-484, 1997.
6. 李濟馬: 東醫壽世保元, 서울, 杏林出版社, pp.7, 107-111, 123, 1986.
7. 洪淳用·李乙浩: 四象醫學原論, 서울, 杏林出版社, pp.343-344, 1992.
8. 宋炳: 알기쉬운 四象醫學, 서울, 하나미디어, pp.248-251, 1993.
9. Conradi, S., Ronnevi, L., Norris, F. : Amyotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP(ed) : Human Motor Neuron Diseases. New York Raven Press. pp. 35-56, 1982.
10. Difazio, M. C., Hollingsworth, Z., Young, A. B., Penny, J.B : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. Neurology. 42:402 (1992).
11. Rosen, D., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J. O., Regan, J., Deng, H., Rahamni, Z., Krizus, A. : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature(London). 362:59(1993).
12. Floyd, R. A : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J. 4:2587-2597, 1990.
13. Park, S. T., Lim, K. T., Chung, Y. T., Kim, S. U. : Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. Neurotoxicol. 17:37-46, 1996.
14. 朴東彦 外: 太陰調胃湯의 潰瘍抑制效能에 관한 研究, 四象醫學會誌 9(2) : pp. 227-239, 1997.
15. 李基珠 外: 太陰調胃湯이 白鼠의 肥滿症 및 誘導 肥滿細胞에 미치는 效果, 四象醫學會誌 8(2) :

- 219-235, 1996.
16. Michikawa, M., Lim, K. T., McLarnon, J. G., Kim, S. U. : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J. Neurosci. Res.* 37:62-70, 1994.
 17. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol Methods.* 65:55-63, 1983.
 18. Borenfreund, E., Puerner, J. A.: A Simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J. Tiss. Cult. Meth.* 9:7-9, 1984.
 19. 朴寅商: 東醫四象要訣, 서울, 소나무, p.61, 149, 1997.
 20. 民族醫學研究所: 朝醫學, 延邊, 朝鮮族自治州民族醫學研究所, p.64, 65, 74, 75, 1985.
 21. 金洲: 四象醫藥性理臨床論, 서울, 大星文化社, pp.298-299, 1998.
 22. 申載鏞: 方藥合編解說, 서울, 成輔社, p.532, 552, 554, 597, 1987.
 23. 辛民教: 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, p.232, 241, 374, 392, 420, 516, 578, 1986.
 24. 許浚: 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.684, 710, 1989.
 25. 申佶求: 申氏本草學, 서울, 壽文社, p.183, 221, 456, 352, 515, 691, 1974.
 26. 李尙仁 外: 韓藥臨床應用, 서울, 成輔社, p.36, 161, 371, 387, 426, 472, 491, 1986.
 27. 廉泰煥: 東醫四象處方集, 서울, 金剛出版社, pp.116-117, 1981.
 28. 朴奭彥: 東醫四象大典, 서울, 醫道韓國社, p.330, 1977.
 29. Hall, E. and Braugher, J. M. : Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. *CNS Trauma* 3:281-294, 1986.
 30. 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.
 31. Pellegrini-Giampietro, D. E., Cherici, G., Alesiani, M., Carrla, 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.
 32. Zhang, Y., Tatsuno, T., Carney, J. M., Mattson, M. P. : Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 13:378-388, 1993.
 33. Jesberger, J. A., Richardson, J. S. : Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int. J. Neurosci.* 57:1-17, 1991.
 34. Johnson, D., Toms, R., Weiner, H.: Studies of myelin breakdown in vitro. In Kim, S. U. (ed) : "Myelination and Demyelination". New York: Plenum

- Press. 219(1989).
35. Kim, Y. S. and Kim, S. U. : , Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. J. Neurosci. Res. 29:100-106, 1991.
 36. Gfrat, E., Mahoney, J. R., Bryant, R. G., Eaton, J.W. : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation : Strubgebt reqyurement for free iron coordination site. J. Biochem 259:3620-3624, 1984.
 37. Halliwell, B. : Oxidants and human disease : Some new concepts. FASEB J. 1:358-364, 1987.
 38. 배오성 : 노인성 치매에 대한 體質醫學的 연구, 大韓韓醫學會誌 13(2): 101-106, 1992
 39. 황의완, 김종우, 이조희, 엄효진, 이승기 : 痴呆에 대한 韓醫學的 臨床研究, 東醫神經精神科學會誌, 7(1):1-13, 1996
 40. 김보균 외 : Dementia of Alzheimer Type 에 관한 韓醫學的 臨床研究, 東醫神經精神科學會誌, 9(1):25-43, 1998
 41. 우주영 외 : 調胃升清湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 영향, 東醫神經精神科學會誌, 8(1):69-79, 1997
 42. 이웅석 : 調胃升清湯이 Alzheimer' Disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1998
 43. 이재혁 : 荊防地黃湯이 흰쥐의 Morris 수중 미로 학습과 기억에 미치는 영향, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1997
 44. 조운숙 외: 荊防地黃湯이 Alzheimer' Disease 모델 백서의 學習과 記憶에 미치는 영향, 東醫神經精神科學會誌, 9(1)1-24, 1998
 45. 이대희 : 임상신경학(1), 서울, 대관 출판사, 1996, p174