

원 저

壯元丸이 XO/HX에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響

김영수, 권강범, 민영기, 조현익, 박준배, 이호섭, 류도곤
원광대학교 한의과대학 생리학교실

Abstract

Effects of Jangwon-hwan(Zhuangyuan-wan) Water Extract against Xanthine Oxidase / Hypoxanthine-induced Neurotoxicity in the Cultured Mouse Cerebral Cortical Neurons

Yeong-Su Kim, Kang-Beom Kwon, Yeong-Gi Min, Hyeon-Ik Cho, Jun-Bae Park, Ho-Sub Lee, Do-Gon Ryu

Dept. of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang Univ., Iksan, Korea

In order to elucidate the toxic mechanism of neurotoxic damage and neuroprotective effect of Jangwon-hwan(Zhuangyuan-wan) water extract, this experiment was performed. Neurotoxic effects of xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX) were examined by MTT and NR assay, neuroprotective effects of Jangwon-hwan(Zhuangyuan-wan) water extract were examined by neurofilament enzymeimmuno assay(EIA). XO/HX induced an increase in cell viability, and a decrease in the amount of neurofilament on cultured mouse cerebral cortical neurons in dose-dependent manner. In neuroprotective effect of herb medicine, Jangwon-hwan(Zhuangyuan-wan) water extract increased the amount of neurofilament on cultured mouse cerebral cortical neurons damaged by XO/HX. From the results, it is suggested that XO/HX showed toxic effect in cultured mouse cerebral cortical Neurons and Jangwon-hwan(Zhuangyuan-wan) water extract is very effective in the prevention of neurotoxicity induced by XO/HX. (*J Korean Oriental Med* 2000;20(4):3-10)

Keywords : Jangwon-hwan(Zhuangyuan-wan), xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX), MTT assay, NR assay, Neurofilament enzymeimmuno assay(EI).

緒 論

한의학에서 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^{2,3)}, 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⁴⁻⁷⁾ 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^{8,9)}.

서양의학에서 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 함으로서 記憶力과 知能低下 등 高等精神活動에 障

· 접수 : 2000년 1월 6일 · 수정 : 2월 20일 · 채택 : 3월 2일
· 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신룡동 344-2
원광대학교 한의대 생리학교실 (T. 0653-850-6846)

碍를 일으키는데 이는 人間の 老化로 인한 腦의 退行性 疾患과 不可分の 關係를 가지고 있다^{10,11)}.

老化의 原因이 되는 酸素自由基는 中樞神經系를 비롯하여 末梢神經系에 影響을 미쳐 근위축성측삭경화증이나 파킨스씨병과 같은 神經疾患을 유발하는 것으로 밝혀지고 있다¹²⁻¹⁴⁾. 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 國內의 많은 학자들이 동물을 대상으로 꾸준히 研究를 진행하여 오고 있다^{15,16)}.

최근에 酸素自由基의 酸化的 損傷에 대하여 韓藥材가 효과적인 抗酸化作用을 나타낸다는 研究報告¹⁷⁻¹⁹⁾들이 있으나 壯元丸이 酸素自由基의 酸化的 損傷에 미치는 영향에 대한 實驗的 報告는 接할 수 없었다.

이에 著者는 酸素自由基의 神經毒性에 대한 壯元丸 煎湯液의 影響을 究明하기 위하여 신생생쥐에서 순수 분리한 大腦神經細胞를 培養하여 Xanthine Oxidase/Hypoxanthine(XO/HX)에 노출시킨 후 이의 毒性效果를 測定하였으며, 또한 壯元丸 煎湯液 處理 후 XO/HX에 의하여 誘發된 毒性에 대한 防禦 效果를 調査하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

本 實驗에 使用한 動物은 ICR 계통의 생후 3일된 건강상태가 양호한 생쥐를 使用하였다.

2) 藥材

本 實驗에 使用한 壯元丸의 處方內容은 『漢方臨床學』²⁰⁾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, 壯元丸의 內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription Contents of Jangwon-hwan

韓藥名	生藥名	重 量(g)
遠 志	Radix Polugalae	12
龍 眼 肉	Arillus Longarae	12
乾 地 黃	Rhizoma Rehmaniae	12
玄 麥	Radix Scrophulariae	12
石 菖 蒲	Rhizoma Acori Graminer	12
人 參	Radix Ginseng	24
白 茯 神	Poria	24
當 歸	Radix Angelicae Gigantis	24
酸 棗 仁	Semen Zizyphi Spinosae	24
麥 門 冬	Radix Ophiopogonis	24
栝 子 仁	Semen Biotae	24
總 計		204

2. 實驗方法

1) 檢液의 調劑

壯元丸 204g을 증류수와 함께 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 2시간동안 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 46.64g의 분말 시료를 얻었다.

2) 細胞培養

大腦神經細胞의 분리는 Michikawa 등²¹⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생후 1-3일된 생쥐에서 적출한 뇌조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한후 36℃, 5% CO₂/95% O₂로 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 세척후 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 使用하였다.

3) 酸素自由基 처리

本 實驗에 使用한 약제로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypoxanthine(HX, Sigma)로서 XO는 100 mU/ml, 10 mU/ml, 1 mU/ml의 저장액을, HX는 100 mM, 10 mM, 1 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보

관한 후 實驗 당일 適當한 양으로 희석 使用하거나 필요한 양을 직접 培養液에 첨가하여 使用하였다. 酸素自由基가 생쥐의 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調查하기 위하여 일정시간 培養한 神經細胞를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 여러 농도의 XO/HX가 포함된 培養液에서 1-12시간 동안 처리후 分析하였다.

4) 細胞毒性 및 防禦效果 檢定

① MTT 定量

대조군과 실험군들을 각각 8개의 well을 한 군으로 하였으며, MTT [3 - (4,5 - dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma]정량은 Mosmann²³⁾의 방법에 따랐다. 즉 神經細胞를 培養한 후 상층액을 버리고 사용당일 제조한 500 µg/ml MTT를 培養용기당 1 ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3시간 동안 37℃, 5% CO₂로 유지된 정온기내에서 培養하였다. 培養 완료 후 細胞內的 formazan을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 dimethyl sulfoxide(DMSO, Merck)를 培養용기당 1 ml씩 넣고 15분간 실온에서 방치한 후 흡광광도계로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

② NR 定量

Neutral red(NR, Sinma)의 定量은 Borenfreud와 Puerner²³⁾의 방법에 따랐다. 즉 여러 濃度の xanthine oxidase(XO)와 hypoxathine(HX)을 처리한 培養 神經細胞를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5 mg/ml의 NR을 well당 최종濃度로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37℃, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료후 PBS로 3회 세척 후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 Microelisa Reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 比較 調查하였다.

③ Neurofilament enzymeimmuno assay(EI)

培養중인 神經細胞를 PBS로 3회 세척하여 알콜로 고정시킨 다음 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료후 NE14(1:100, Sigma)로 1시간 동안 반응시킨후 0.04% O-phenylenediamine(OPD, Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide로 처리한

다음 Dynatech Microelisa reader로 490nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 比較 調查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 간주하였다.

實驗 成績

1. 酸素自由基의 毒性效果

1) MTT 定量

酸素自由基가 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調查하기 위하여 xanthine oxidase(XO)가 10mU/ml에서 40mU/ml 까지의 濃度로 포함된 培養液에서 6시간 동안 培養한 후 xanthine oxidase(XO)의 毒性效果를 MTT assay법에 依하여 調查한 結果 10mU/ml XO 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 81.2%로 나타났다. 그러나 20mU/ml의 처리에서는 61.7%로 이보다 다소 낮게 나타났다. 또한 30mU/ml와 40mU/ml xanthine oxidase(XO)를 처리한 경우 이의 생존율은 각각 48.0%(p<0.05)와 31.4%(p<0.01)로 대조군에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났다(Table 1).

Table 1. Absorbance (% of control) at 570nm Wavelength for the MTT Assay on Xanthine Oxidase(XO) in Cultured Mouse Cerebral Cortical Neurons

XO(mU/ml)	MTT absorbance(570nm)	Decreasement of cell viability(%)
control	1.02±0.16	-
10	0.87±0.08	14.8
20	0.67±0.05	34.3
30	0.49±0.07*	52.0
40	0.32±0.04**	68.6

Cultured mouse cerebral cortical neurons were treated with various concentrations of xanthine oxidase(XO) 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

Xanthine oxidase(XO)와 hypoxathine(HX)가 시간 에 따라 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調查하기 위하여 30mU/ml xanthine oxidase(XO)와 0.2mM

hypoxanthine(HX)가 포함된 培養液에서 大脳神經細胞를 각각 1~7시간 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 84.4%의 細胞生存率을 보였다. 또한 3시간 培養에 있어서는 73.4%로 대조군에 비하여 다소 낮은 생존율을 나타냈으며 5시간 培養에서는 대조군에 비하여 45.3%($P<0.05$)의 생존율을, 7시간 培養에 있어서는 32.9%($p<0.01$)의 생존율을 각각 나타냈다(Table 2).

Table 2. Time-Response Relationship of Xanthine Oxidase(XO) and Hypoxanthine(HX) by MTT Assay in Cultured Mouse Cerebral Cortical Neurons

XO/HX (mU/ml)	MTT absorbance(570nm)			
	1hr	2hr	3hr	4hr
0	0.77±0.07	0.64±0.05	0.75±0.06	0.73±0.08
30	0.65±0.05	0.47±0.04	0.34±0.02**	0.24±0.01**

Cultured mouse cerebral cortical neurons were treated with 30 mU/ml XO and 0.2 mM HX for various time intervals. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. ** $p<0.01$

2) NR 定量

培養中인 大脳神經細胞를 Ca^{2+} , Mg^{2+} free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 xanthine oxidase(XO)가 15mU/ml에서 120mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 6시간 培養한 다음 이의 影響을 調査한 結果 15mU/ml의 처리에서 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 87.7%로 나타났으며 15mU/ml에서는 72.6%로 나타났다. 또한 60mU/ml, 120mU/ml xanthine oxidase(XO)에서는 각각 52.7%($p<0.05$), 45.9%($p<0.01$)로 나타났다(Table 3).

Xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)가 培養時間에 따라 大脳神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 MCV(midpoint cytotoxicity value) 값인 60mU/ml/xanthine oxidase(XO)와 0.2mM hypoxanthine(HX)濃度에서 1~12시간 동안 培養한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 調査한 結果 1시간 培養에서는 대조군(100%)에 비하여 89.7%로 나타났으며 3시간

Table 3. Absorbance (% of control) at 540nm Wavelength for the NR Assay on Xanthine Oxidase(XO) in Cultured Mouse Cerebral Cortical Neurons

XO(mU/ml)	NR absorbance(540nm)	Decrease of cell viability(%)
control	1.46±0.15	-
15	1.28±0.13	12.3
30	1.06±0.04	27.4
60	0.77±0.05*	47.3
120	0.67±0.08**	54.1

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

Table 4. Time-Response Relationship of Xanthine Oxidase(XO) and Hypoxanthine(HX) by NR Assay in Cultured Mouse Cerebral Cortical Neurons

XO/HX (mU/ml)	MTT absorbance(540nm)			
	1hr	3hr	5hr	7hr
0	0.97±0.08	0.85±0.06	0.92±0.03	0.95±0.05
60	0.87±0.05	0.69±0.03	0.49±0.01**	0.47±0.04**

Cultured mouse cerebral cortical neurons were incubated with 60 mU/ml XO and 0.2 mM HX for various time intervals. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

배양에서는 81.2%로 나타났다. 또한 5시간 및 7시간 배양에서는 각각 55.7%($p<0.05$), 49.5%($p<0.01$)로 나타났다(Table 4).

2. neurofilament 定量

1) XO/XA의 影響

XO/XA濃度에 따른 neurofilament의 양적 측정을 위한 neurofilament EI에 있어서 XO/XA가 5-50mU/ml/mM까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 大脳神經細胞를 4시간 동안 처리한 후 세포의 생존율을 대조군과 比較 調査하였다. 그 結果 5mU/ml/mM XO/XA 처리에서는 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 86.0%로 나타났으며, 10mU/ml/mM 처리에서는 77.2%로 나타났다. 또한 25mU/ml/mM의 경우는 52.9%($p<0.05$)의 생존율을 보여 MCV 값

(midcytotoxicity value)을 나타냈으며, 50mU/ml/mM XO/XA의 처리에서는 27.2%($p<0.01$)의 생존율을 나타냈다(Fig. 1).

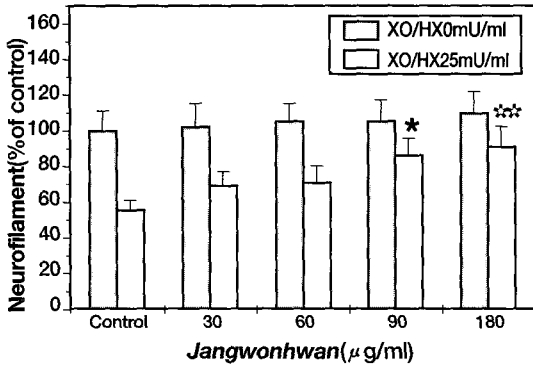


Fig. 1. Dose-dependency of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) in cultured mouse cerebral cortical neurons. Cultures were exposed to 5, 10, 25 and 50 mU/ml XO and 0.2 mM HX for 4 hours, respectively. Amount of neurofilament was measured at wavelength of 490nm. The results indicate the mean \pm SE(n=6). Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

2) 壯元丸 煎湯液(Jangwonhwan water extract)의 防禦效果

培養 大腦神經細胞에 대한 XO/HX의 酸化的 損傷에 있어서 壯元丸 煎湯液의 效果를 neurofilament의 양적변화측면에서 調査하기 위하여 XO/HX의 MCV 값(midcytotoxicity value)인 25mU/ml/mM XO/HX濃度에서 4시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15-120μg/ml 壯元丸 煎湯液이 각각 포함된 培養液에서 전처리 한 후 이의 방어效果를 neurofilament EIA법으로 調査하였다. 그 結果 25mU/ml/mM XO/HX만을 처리한 경우 세포의 neurofilament의 양적변화는 대조군(100%)에 비하여 55.7%로 나타났다. 그러나 30μg/ml 壯元丸 煎湯液의 처리에서는 대조군에 비하여 69.4%로 나타났으며, 60μg/ml의 처리에서는 대조군에 비하여 71.0%로 나타났다. 또한 90μg/ml과 180μg/ml 壯元丸 煎湯液의 처리에서는 각각 86.3%($p<0.01$)

와 90.9%($p<0.01$)로 나타났다(Fig. 2).

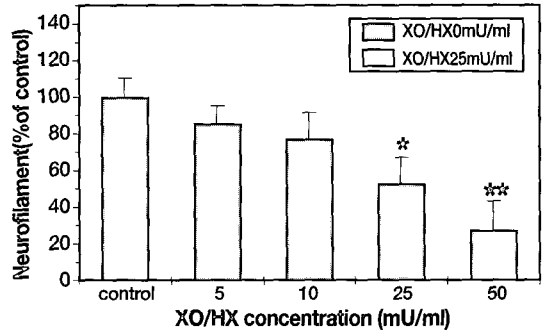


Fig. 2. Dose-dependency of Jangwonhwan water extract for its protective effect on xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) in cultured mouse cerebral cortical neurons. Cultures were preincubated with 30, 60, 90 and 180 μg/ml Jangwonhwan water extract for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 25 mU/ml XO and 0.2 mM HX for 4 hours. Amount of neurofilament was measured at wavelength of 490nm. The results indicate the mean \pm SE(n=6). Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

考 察

韓醫學에서 腦에 관한 記錄은《素問·五臟別論篇》²⁴⁾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》²⁴⁾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하였다^{2,3,25-27)}. 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 類似的한 概念으로 認識하였다²⁸⁻³⁰⁾.

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 高次元的인 精神世界까지도

담당하는 것으로 알려져 있다⁹⁾.

西洋醫學으로 老化는 2가지로 구분되는데, 하나는 老化가 受精에서 죽음까지의 生體의 變化를 말하는 것으로 加齡現象(aging)이라고 불리워지고 있으며, 다른 하나는 成熟期 이후의 生體의 變化를 말하는 것으로 협의의 老衰(senescence)라고 불리운다³¹⁾. 즉 老化란 한 개체에서 時間의 進行에 비례하여 일어나는 漸進的이고 不可逆的인 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이다³¹⁻³⁴⁾. 老化의 原因에 대한 여러가지 가설 중 가장 잘 알려진 假說인 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 增加에 따라 이 自由基가 蓄積되면 생체에 유해하게 작용하여 老化의 原因이 된다는 가설이다³¹⁻³⁴⁾.

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을 깨뜨리며 그 결과 神經細胞를 損傷시킬 뿐만 아니라 나아가서는 細胞의 死滅을 초래한다고 한다³⁵⁻³⁶⁾.

본 실험에 사용한 壯元丸은 遠志, 龍眼肉, 生乾地黃, 玄蔘, 石菖蒲, 人蔘, 白茯苓, 當歸, 酸棗仁, 柏子仁으로 구성된 藥物로 腎水不足證에 사용하는 處方으로 활용되고 있다²⁰⁾.

이에 著者는 신생생쥐에서 순수 분리한 大腦神經細胞를 培養하여 Xanthine Oxidase/Hypoxanthine (XO/HX)에 노출시킨 후 이의 毒性效果를 測定하였으며, 또한 XO/HX에 의하여 誘導된 毒性에 대한 韓藥抽出物인 壯元丸의 效果를 調査하여 이에 有意性

있는 結果를 얻었다.

본 實驗에서 XO/HX를 생쥐의 배양 大腦神經細胞에 노출시킨 후 NR assay와 MTT assay법으로 分析한 結果 XO/HX는 처리 농도와 시간에 비례하여 細胞의 生存率을 현저하게 減少시켰다(Table 1~4). 이 같은 結果는 酸素自由基가 배양 생쥐의 척수신경절 세포와 소의 배양 희소돌기아교세포에 각각 毒性을 나타냈다는 實驗 결과와 일치하였다³⁷⁾. 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 XO/HX가 항산화계에 損傷을 줌으로써 항산화효소의 活性減少를 초래했거나 또는 酸素自由基中 superoxide 와 같은 환원제가 세포내 Fe³⁺와 상호작용하여 毒性을 나타냈을 가능성도 배제할 수는 없다^{38,39)}.

최근에는 한약추출물을 비롯한 천연추출물들이 항산화효과나 세포성장인자 등의 약리적 활성을 가지고 있어 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 效果가 뛰어나다는 研究들이 보고되고 있다¹⁷⁻¹⁹⁾. 그러므로 본 실험에서는 여러 腦病變의 原因이라고 밝혀진 酸素自由基에 대하여 이의 산화적 손상에 의한 壯元丸의 效果를 조사하기 위하여 생쥐에서 순수분리하여 배양한 大腦神經細胞에 酸素自由基의 하나인 XO/HX를 처리한 후 壯元丸 煎湯液의 效果를 neurofilament 측정에 의하여 조사하였다.

XO/HX가 신경세사(neurofilament)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 neurofilament의 測定을 위한 neurofilament enzymeimmuno assay (EIA)에 있어서 XO/HX는 培養 大腦神經細胞에 處理한 濃도에 비례하여 neurofilament의 양적 減少를 보였으며 25 mU/ml/0.2 mM XO/HX處理에서 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다. 그러나 25 mU/ml/0.2 mM XO/HX를 6시간 동안 神經細胞에 處理하기 전 15-120 µg/ml의 壯元丸 煎湯液이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리한 경우 處理한 濃도에 비례하여 neurofilament의 유의한 量的 增加를 보였다.

以上の結果로 보아 壯元丸의 投與로 XO/HX의 神經毒性을 效果的으로 防禦하여 臨床에서의 活用을 實驗的으로 究明하는 계가 되었으며 이의 機轉에 대한 持續的인 研究가 필요하리라 思料된다.

結 論

신생생쥐에서 分離 培養한 大腦神經細胞에 壯元丸 煎湯液을 前處理한 後 XO/HX의 毒性效果에 대한 防禦效果를 觀察한 結果는 다음과 같다.

1. 酸素自由基인 XO/HX는 MTT assay에 의한 細胞 生存率의 유의한 減少를 보였다.
2. 酸素自由基인 XO/HX는 NR assay에 의한 細胞生 存率의 유의한 減少를 보였다.
3. XO/HX의 酸化的 損傷에 의한 神經毒性에 대하 여 壯元丸 煎湯液은 神經세사의 量을 유의하게 增加시켰다.

以上の 實驗結果는 壯元丸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 腦機能損傷이나 低下로 유발되는 疾患에 대한 持續的인 研究가 必要 하다고 思料된다.

參考文獻

1. 楊維傑 編. 黃帝內經譯解(靈樞). 서울: 成輔社. 1980: 84-89, 104-145, 280-283.
2. 成彊慶. 腦의 機能에 對한 臟象論의 考察. 大韓韓醫學會誌. 1995; 16 (1):468-474.
3. 許美晶 外. 內經의 腦學說에 對한 文獻의 考察. 惠和醫學. 1997; 6(1):175-200.
4. 李京燮 外. 東醫心系內科學(上). 서울: 書苑堂. 1995: 36-37, 43-44.
5. 黃義完 外. 東醫神經醫學. 서울: 現代醫學書籍社. 1987: 256-257, 262-264, 269-271, p.266, 920.
6. 王乃石. 益氣聰明湯治療腦血管神經性病變의 體會. 湖北中醫雜誌. 1996; 18 (124): 41.
7. 郭宇鵬 外. 謝海洲治療腦萎縮經驗. 中醫雜誌. 1997;

- 38(10):586-587.
8. 張明准 外. 心-腦-神志病辨證論治. 黑龍江科學技術出版社出版. 1988: 5-10, 100-112.
9. 金利和 外. 痲瘋治療의 最近 研究動向에 關한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1997; 14 (2): 115-126.
10. 지계근. 치매(Dementia)의 병리. 大韓神經科學會誌. 1985; 3(1):5-9.
11. 이근후. 精神科 영역에서의 痲瘋. 大韓神經科學會誌. 1985; 3(1):25-27.
12. Conradi, S., Ronnevi, L., Norris, F. Amyotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP(ed). Human Motor Neuron Diseases. New York Raven Press. 1982: 35-56.
13. Difazio, M. C., Hollingsworth, Z., Young, A. B., Penny, J.B : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. Neurology. 1992; 42:402.
14. 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). 1993; 362,59.
15. Floyd, R. A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J. 1990; 4:2587-2597.
16. 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. 1996; 17:37-46.
17. 金賢奎. 苦麥煎湯液이 培養心筋細胞에 미치는 影響. 益山. 圓光大學校 大學院. 1998.
18. 金鍾寬. 太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響. 益山. 圓光大學校 大學院. 1998.
19. 玉潤榮. 太陰人 清心蓮子湯이 Hydrogen Peroxide에 損傷된 白鼠의 大腦神經細胞에 미치는 影響. 益山. 圓光大學校 大學院. 1998.
20. 蔡仁植. 漢方臨床學. 서울. 大星文化社. 1987; 183.
21. Michikawa, M., Lim, K. T., McLamon, J. G., Kim, S. U. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J. Neurosci. Res. 1994; 37:62-70.
22. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol Methods. 1983; 65:55-63.
23. Borenfreund, E. Puerner J. A. A Simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity

- assay (HTD/NR-90). J. Tiss. Cult. Meth. 1984; 9:7-9.
24. 楊維傑 編: 黃帝內經譯解(素問), 서울, 成輔社, 1980: 1-12, 42-61, 100- 103, 131-145, 206-211, 455-468, 701-704.
 25. 金完熙 外 編著. 東醫生理學. 서울. 慶熙大學校 出版局. 1993: 384.
 26. 이원철 外. 內經에 나타난 腦의 考察, 서울. 大韓韓醫學會誌. 1983; 4(2):73-77.
 27. 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. 1988: 211- 212.
 28. 李時珍. 本草綱目. 서울. 高文社. 1973: 603-604.
 29. 程如海. 略論張錫純心腦共主神明說. 北京. 北京中醫學大學學報. 1996: 19(6): 12.
 30. 柳道坤. 東醫生理學講義. 益山. 圓光大學校出版局. 1996: 267-270, 365- 377, 413-415, 506-507.
 31. 조유향. 노인보건. 서울. 현문사. 1995: 43-49.
 32. 大韓皮膚科學會刊行委員會. 皮膚科學. 서울. 麗文閣. 1994: 23.
 33. 의학교육연수원 편저. 노인의학. 서울. 서울대학교출판부. 1997: 3, 7, 9, 10, 14, 22, 27, 595, 29-31.
 34. 이철완. 이철완교수의 노인병 연구. 서울. 일중사. 1997: 130-150.
 35. 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. 1991: 227.
 36. 彭 仁. 中醫名醫方劑大全. 北京. 金盾出版社. 1990: 22.
 37. 李文鎬 外. 內科學(상). 서울. 醫林社. 1986: 256-259.
 38. 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.
 39. 崔龍垓. 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.