

## 熱多寒少湯 煎湯液이 Hydrogen Peroxide에 의해 損傷된 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향

이재흥\* · 박혜선\* · 김경요\* · 고기덕\* · 김일환\*\*

### Abstract

## Effects of Yuldahansotang water extract on Cultured Primary Hippocampal Cell Culture Damaged by Hydrogen Peroxide

Lee Jae-heung · Park Hye-sun · Kim Kyung-yo ·

Dept. of Sasang Constitutional medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang Univ.

To evaluate the effect of Yuldahansotang(YHT) water extract on cultured hippocampal cell was inhibited by hydrogen peroxide, MTT assay, NR assay, Neurofilament enzymeimmuno assay and DNA synthesis assay were carried out after the cultured hippocampal cells were preincubated with various concentrations of YHT water extract for 3 hours prior to exposure of hydrogen peroxide.

The results obtained were as follows:

1. Hydrogen Peroxide decreased the survival rate of the cultured hippocampal cells on NR assay and MTT assay.
2. YHT water extract have efficacy of increasing a amount of neurofilament decreased by hydrogen peroxide in cultured hippocampal cells.
3. YHT water extract have efficacy of increasing DNA synthesis decreased by hydrogen peroxide in cultured hippocampal cells.

From above the results, It is concluded that YHT has marked efficacy in preventing for the damages by hydrogen peroxide.

Key word : Yuldahansotang(YHT), hydrogen peroxide, Hippocampal cell, MTT, NR, Neurofilament, DNA synthesis

### I. 緒 論

근래 대사과정중 생성되는 독성물질의 일종인 산소자유기에 의한 산화작용이 노화나 암, 심혈관계질환 등의 병리적 상황을 일으킬 뿐

만 아니라<sup>1,2)</sup> 산소자유기가 뇌허혈이나 다발성 경화증<sup>3)</sup> 파킨스씨병<sup>4)</sup> 근위축성축삭경화증과 같은 신경질환을 유발하는 병인으로 밝혀지고 있음으로 인해<sup>5,6)</sup> 산소자유기의 신경독성에 대한 병리적 기전 규명에 대하여 많은 연구가

\* 원광대학교 한의과대학 사상체질의학교실

\*\* 동신대학교 한의과대학 사상체질의학교실

교신저자: 이재흥 주소)경기도 김포시 대곶면 울생리 546 대곶한의원 전화)031-981-8275

이루어져 왔으며<sup>7)</sup> 충추신경계나 말초신경계에도 영향을 미치는 것으로 연구되어지고 있다. 또 운동신경질환의 병인으로 산소자유기가 관여하고 있음이 증명되어 기전 규명에 대한 연구가 꾸준히 진행되어져 왔다<sup>8,9)</sup>.

산소자유기에 대한 방어적인 한약제재의 연구로는, 田<sup>10)</sup>·朴<sup>11)</sup> 등의 培養된 소의 희소돌기 아교세포에 대한 산소자유기의 독성에 人蔘과 羚羊藿이 유의하게 방어하였다는 보고가 있다.

뇌의 중심부 아래에 위치하고 있는 변연계는 본능적 행동과 정서감정을 주재하는 기구로서 행동의 의욕, 학습, 기억과정에도 깊이 관여하는 곳으로 알려져 있다<sup>12)</sup>. 이 구조물 가운데 해마체(hippocampus)는 기억, 특히 짧은 시간 동안의 기억에 관계가 있다고 알려져 있는데, 알츠하이머 치매나 중풍 등의 뇌손상이 후에 발병하는 혈관성 치매에 있어 바로 전의 일을 기억하지 못하는 것은 해마체의 손상과 관련이 있기 때문이다<sup>13)</sup>.

四象醫學은 각 체질의 특수성에 따른 접근을 시도하고 있어서 현대에 이르러 그 가치가 새롭게 평가되고 있으며 특히 여러 난치병의 새로운 치료방법으로 주목을 받고 있다<sup>14)</sup>.

東醫壽世保元<sup>15)</sup>에 그 내용이 소개되어 있는 熱多寒少湯은 太陰人 肝受熱裏熱病을 치료하도록 개발되었는데 임상에서 太陰人의 성인병에 다용되고 있는 처방이다<sup>16-18)</sup>.

李濟馬는 이 熱多寒少湯으로 癩病, 燥熱病, 夢泄病 등을 치료하였는데, 근래에 熱多寒少湯 및 그 가미방들은 太陰人 처방들 중 太陰人의 중풍 초기단계에 가장 사용빈도가 높은 것으로 알려져 있다<sup>19)</sup>.

이에 저자는 熱多寒少湯이 뇌신경세포에 대해 구체적으로 어떠한 작용을 하는지에 대한 실험적 연구의 일환으로 熱多寒少湯이 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma)에 노출되어 손상된 海馬神經細胞에 미치는 영향을 관찰하여 유의한

결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗動物 및 藥材

#### 1) 實驗動物

本 實驗에 使用한 동물은 임신 14-16일의 250-300g의 Sprague-Dawley종을 使用하였다.

#### 2) 藥材

本 實驗에서 使用된 熱多寒少湯은 圓光大學校 韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였으며 1첩의 처방내용은 다음과 같다.

#### Prescription contents of Yuldabansotang

Herbal name	Scientific Name	Weight(g)
葛根	Radix Puerariae	16
黃芩	Radix Scutellariae	8
藁本	Rhizoma Ligustici	8
蘿菔子	Semen Raphani	4
桔梗	Radix Platycodi	4
升麻	Rhizoma Cimicifugae	4
白芷	Radix Angelicae Dahuricae	4
Total amount		48

### 2. 實驗方法

#### 1) 檢液의 調製

熱多寒少湯 192g을 각각 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 3시간동안 電熱器로 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 凍結乾燥器에서 乾燥하여 49.76g의 분말 시료를 얻었다.

#### 2) 藥物 製造

Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)의 제조 및 처리  
본 실험에 사용한 독성약물로는 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma)로서 각각 100 mM 10 mM, 1 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후

실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 培養液에 첨가하여 사용하였다.

### 3) 細胞培養

임신 14-16일의 Sprague-Dawley종 흰쥐의 복강을 70% alcohol로 소독, 절개한 뒤 자궁을 적출하여 태아의 두경부를 절단하여 피부와 두개골을 제거한 뒤 후뇌에서 연수까지의 뇌를 꺼내어서 HBSS(Hank's Balanced salt solution)에 모은 다음 현미경 하에서 뇌조직 주위의 뇌막을 제거 후 해마부위를 분리하였다. 분리된 조직에 0.25% trypsin과 0.01% DNase를 첨가하여 37°C 수조에서 20분간 培養한 다음 HBSS로 수차례 씻어내어 trypsin을 완전히 제거하고 조직 덩어리를 작은 입자덩어리로 만든 후 상층액을 취하여 HBSS를 첨가 후 세포를 분리하였다. 수차례 반복 후 상층액을 버리고 배지에 부유시켰다. 부유시킨 일부 세포를 취하여 trypan blue로 염색한 후 현미경하에서 hemacytometer를 이용하여 세포의 수를 측정한다. 다음  $10^4 \sim 10^5$ 개의 세포수를 B-27, 0.5mM L-glutamine, 25 $\mu$ M glutamine, 25 $\mu$ M 2-mercaptoethanol이 첨가된 Neurobasal media(Boehringer Mannheim, Germany)에 4일간 培養 후 glutamate가 없는 배지로 1/2 교환하고 2주간 培養하여 신경세포가 성숙한 다음 실험에 사용하였다.

### 4) 산소자유기 처리

Hydrogen peroxide가 생쥐의 海馬神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 일정시간 培養한 神經細胞를 0.6%-D glucose가 함유된 modified essential medium(MEM)으로 3회 세척한 다음 여러 농도의 hydrogen peroxide가 포함된 培養액에서 2~6시간 동안 처리후 分析하였다.

### 5) 세포독성 및 방어효과 검정

#### (1) 세포생존을 분석

##### ① MTT 정량

MTT <3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma)> 정량은 Mosmann<sup>20)</sup>의 방법에 따랐다. 산소자유기를 처리한 培養 신경세포를 phosphate buffered saline(PBS)로 3회 세척한 후 전날 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료후 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk)를 처리한 다음 ELISA Reader로 570nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교 조사하였다.

##### ② NR 定量

Neutral red(NR, Sinma)의 정량은 Borenfreund와 Puerner<sup>21)</sup>의 방법에 따랐다. 즉 여러 농도의 hydrogen peroxide를 처리한 培養 신경세포를 PBS로 3회 세척 후 전날 제조한 5 mg/ml의 NR을 well당 최종 농도로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료후 PBS로 3회 세척 후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 ELISA Reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

##### ③ Neurofilament enzymeimmuno assay(EI)

培養중인 海馬神經細胞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 hydrogen peroxide로 처리한 다음 ELISA Reader로 490nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

##### ④ DNA synthesis

일정 시간동안 약제를 처리한 실험군과 약제처리를 하지 않은 대조군을 [<sup>3</sup>H]thymidine이 10uCi/ml 포함된 培養액으로 교환하여 1시간동안 표식하였다. 100ug/ml의 sodium azide로 DNA합성을 억제시켜 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>가 없는 PBS로 3

회 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 부유시켰다. 세포를 Whatman GF/C glass filter paper로 수확한 후 여과지를 건조시켜 scintillation cocktail( PPO 4g, POPOP 0.1g/Toluene 1L)을 넣고 반응시킨 다음 액체섬광계수기로 방사능을 측정하여 이를 대조군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

6) 統計 處理

實驗 結果에 대한 유의성의 검정은 ANOVA 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

Table 1. Dose-dependency of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in cultured hippocampal cells.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	MTT absorbance(570nm)	Decrease rate of cell viability(%)
0	0.57±0.06	-
1	0.43±0.04	24.6
15	0.39±0.02	31.6
25	0.27±0.01*	52.6
50	0.12±0.08**	78.9

Cultured hippocampal cells were treated with various concentrations of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 5 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

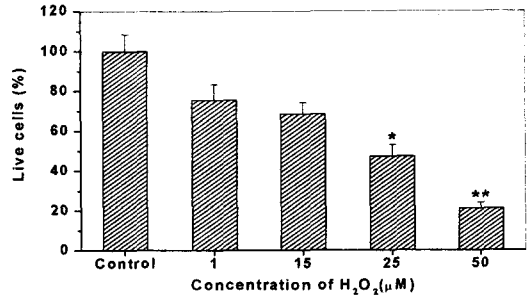


Fig. 1. Dose-dependency of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 1. \*p<0.05; \*\*p<0.01

Table 2. Time-response relationship of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in cultured hippocampal cells.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	NR absorbance(540nm)				
	0 hr	2 hr	4 hr	5 hr	6 hr
0	0.51±0.07	0.47±0.05	0.45±0.04	0.43±0.03	0.41±0.06
40	0.42±0.06	0.32±0.04	0.29±0.02	0.22±0.01*	0.19±0.07**

Cultured hippocampal cells were treated with various time intervals at a concentration of 40μM hydrogen peroxide. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. \*p<0.05; \*\*p<0.01

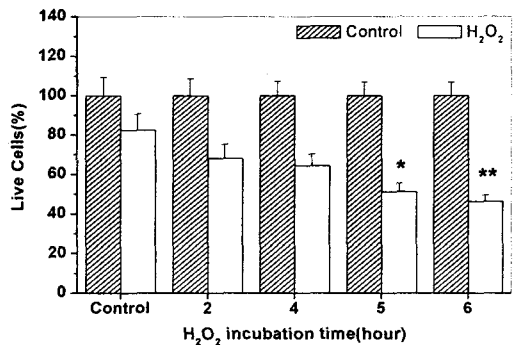


Fig. 2. Time-response relationship of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 2. \*p<0.05; \*\*p<0.01

(2) NR 定量

Table 3. Absorbance (% of control) at 540nm wavelength for the NR assay on hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in cultured hippocampal cells

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	NR absorbance (540nm)	Decrease rate of cell viability(%)
0	0.62±0.07	-
20	0.54±0.04	12.9
30	0.50±0.05	19.4
40	0.34±0.02*	45.2
50	0.26±0.01**	58.1

Cultured hippocampal cells were grown in media containing various concentrations of hydrogen peroxide for 5 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

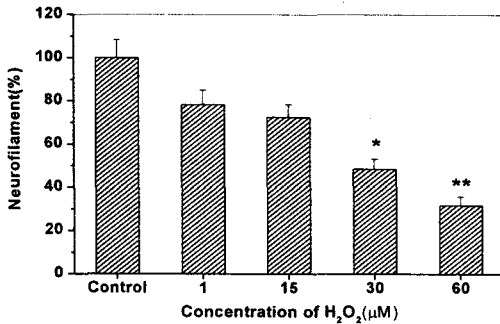


Fig. 3. Dose-response relationship of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 3. \*p<0.05; \*\*p<0.01

Table 4. Time-response relationship of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) by NR assay in cultured hippocampal cells

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	NR absorbance(540nm)				
	0 hr	2 hr	4 hr	5 hr	6 hr
0	0.51±0.07	0.47±0.05	0.45±0.04	0.43±0.03	0.41±0.06
40	0.42±0.06	0.32±0.04	0.29±0.02	0.22±0.01*	0.19±0.07**

Cultured hippocampal cells were incubated with 40 μM hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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

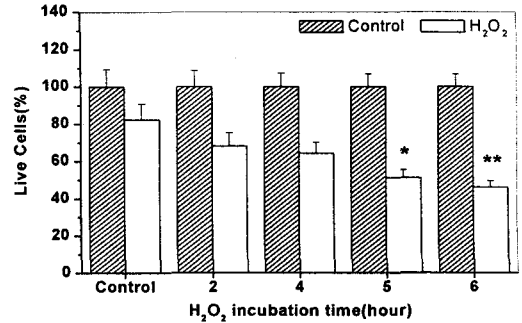


Fig. 4. Time-dependancy of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 4. \*p<0.05; \*\*p<0.01

2. 韓藥抽出物の 效果

1) Neurofilament 定量

(1) Hydrogen Peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)의 영향

Table 5. Dose-response relationship of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) by neurofilament enzyme immuno assay(EIA) in cultured hippocampal cells

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	EI absorbance (490nm)	Decrease rate of neurofilament(%)
0	1.57±0.16	-
1	1.23±0.13	21.7
15	1.14±0.11	27.4
30	0.76±0.05*	51.6
60	0.50±0.03**	68.2

Cultured hippocampal cells were exposed to various concentrations of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 5 hours. Amount of neurofilament was measured by enzyme immuno 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

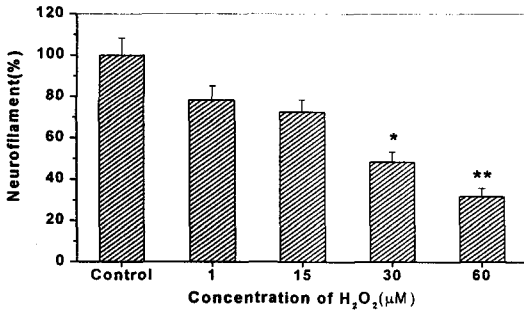


Fig. 5. Dose-dependency of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 5. \*p<0.05; \*\*p<0.01

(2) 熱多寒少湯(Yuldahansotang, YHT) 煎湯液의 효과

Table 6. Dose-response relationship of Yuldahansotang(YHT) for its neuroprotective effect on hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in hippocampal cells

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	EI absorbance(490nm)				
	Concentration of YHT(μg/ml)				
	0	20	40	60	80
0	1.44±0.13	1.46±0.14	1.48±0.12	1.51±0.16	1.53±0.17
30	0.71±0.06	0.92±0.08	1.14±0.09	1.29±0.13*	1.42±0.15**

Cultured hippocampal cells were preincubated with various concentrations of Yuldahansotang(YHT) for 3 hours, and then exposed to 30μM hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 5 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. \*\*p<0.01

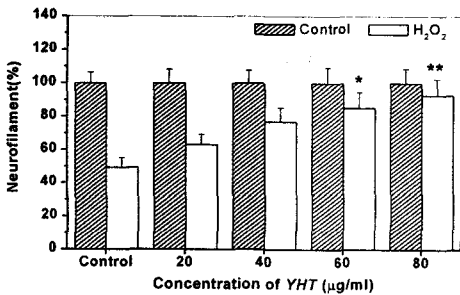


Fig. 6. Dose-dependency of Yuldahansotang(YHT) for its protective effect on hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 5. \*p<0.05; \*\*p<0.01

2) DNA synthesis 정량

(1) Hydrogen Peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)의 영향

Table 7. Dose-response relationship of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on DNA synthesis in cultured hippocampal cells

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	Decrease rate of DNA synthesis (% of control)
0	-
5	11.6
10	26.4
20	48.3*
40	70.4**

Cultured hippocampal cells were treated with various concentrations of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 5 hours. DNA synthesis was measured as "material method". The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks \*p<0.05; \*\*p<0.01

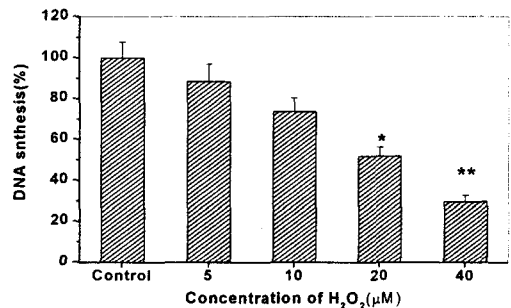


Fig. 7. Dose-dependency of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Other legends are the same as table 7 \*p<0.05; \*\*p<0.01

(2) 熱多寒少湯(Yuldahansotang, YHT) 煎湯液의 효과

Table 8. Dose-response relationship of Yuldahansotang(YHT) for its neuroprotective effect on DNA synthesis in hippocampal cells

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	DNA synthesis (% of control)				
	Concentration of YHT(μg/ml)				
	0	15	30	60	120
0	100±7.8	100±8.4	100±7.3	100±6.4	100±9.2
20	38.6±4.7	54.6±6.3	63.7±7.4	72.6±8.2	80.8±9.6*

Cultured hippocampal cells were treated with 15, 30, 60 and 120  $\mu\text{g/ml}$  concentration of YHT for 3 hours, after then cultures were exposed to 20 $\mu\text{M}$  hydrogen peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) for 5 hours. DNA synthesis was measured as "material method". The values are the mean $\pm$ SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks \* $p < 0.05$

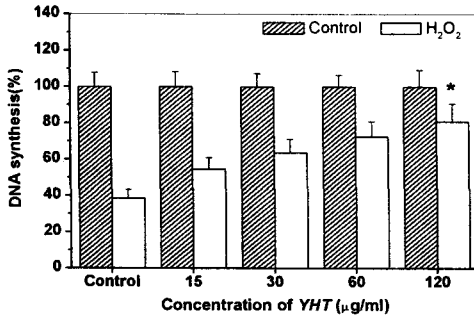


Fig 8. Dose-dependency of Yuldahansotang (YHT) in DNA synthesis. Other legends are the same as Table 8. Significant differences between groups are marked with asterisks \* $p < 0.05$

#### IV. 考 察

『東醫壽世保元』에서는 太陰人의 병리적 상태와 관련하여 肝熱肺燥, 肝熱熱證癩病, 裏熱癩病, 燥熱病, 虛勞病, 夢泄病 등의 용어가 등장하고 있으나<sup>22)</sup>, 근래에는 이를 통칭하여 肝燥熱證과 燥澁便閉證으로 구분하고 있다<sup>23)</sup>.

『東醫壽世保元』 「肝受熱裏熱病論」에서는 “太陰人 병증에 卒中風病이 있다”고 하여 太陰人 체질에 중풍이 발생함을 지적하였고, 송<sup>1)</sup>의 논문에서도 중풍환자 중 太陰人의 비율이 다른 체질에 비해 훨씬 높은 비율을 차지하고 있음을 보여주고 있다.

熱多寒少湯은 東醫壽世保元에 기재되어있는 太陰人 신정24방중의 하나로 처방의 구성은 葛根, 黃芩, 藜本, 蘿菴子, 桔梗, 升麻, 白芷 등

으로 구성되어 있다.

葛根과 黃芩은 肝燥熱을 解消하는 清熱의 기능이 강하고, 藜本·桔梗·升麻·白芷는 肺의 呼散之氣를 길러주는 발산과 상승의 기능이 강함을 알 수 있다<sup>24)</sup>.

熱多寒少湯은 太陰人의 중풍치료에 자주 이용되는 처방이지만 그 정확한 약리학적 기전은 분명하게 밝혀지지 않았다. 최근 熱多寒少湯이 중풍의 치료에 미치는 영향에 대해 다각적인 실험 연구가 이루어지고 있다. 최<sup>24)</sup>는 熱多寒少湯이 국소 뇌혈류량을 증가시키고 뇌연막동맥의 직경을 증가시키며 혈압의 상승을 억제하므로 다양한 뇌의 허혈성 병변을 개선시키는데 기여함을 입증하였다.

이러한 熱多寒少湯은 임상에서 중풍을 비롯한 각종 성인병질환 중 太陰人 간조열증에 해당되는 병증에 많이 응용되고 있는 바, 이 처방에도 산소자유기의 산화적 손상에 대한 방어작용이 있는지 알아 보기로 하였다.

본 실험에서 신경세포에 독성을 유발한 산소 자유기는 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시키는데<sup>25-26)</sup> 특히 대사과정중 생성되는 독성물질의 일종인 산소자유기는 흥분성아미노산(excitatory amino acids, EAAs)의 분비를 촉진시키고, 세포내  $\text{Ca}^{2+}$ 의 농도를 증가시켜 결국 세포의 사멸을 초래<sup>27-28)</sup>하는 것으로 알려져 있다.

이러한 산소자유기의 세포독성에 대하여 한 약재가 방어효과가 있다는 보고를 접하였다<sup>14,29-31)</sup>.

본 연구에서는 산소자유기의 신경독성에 대한 熱多寒少湯의 작용을 규명하기 위하여 쥐에서 순수 분리한 海馬神經細胞를 培養하여 Hydrogen peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ )에 노출시킨 후 이의 독성효과를 측정 하였다. 또한 Hydrogen peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ )에 의하여 유도된 독성에 대한 한약추출물인 熱多寒少湯의 효과를 조사하였다. 이러한 실험을 통해 얻어진 성적을 살펴보면 다

음과 같다.

본 실험에서 Hydrogen peroxide를 생쥐의 培養 海馬神經細胞에 노출시킨 후 MTT assay와 NR assay법으로 분석한 결과 Hydrogen peroxide는 처리 농도와 시간에 비례하여 세포의 생존율을 현저하게 감소시켰다(Table 1-4, Fig. 1-4.) 이 같은 결과는 산소자유기가 培養 생쥐의 척수신경절세포에<sup>32)</sup>, 소의 培養 회소돌기아교세포<sup>33)</sup>에 각각 독성을 나타냈다는 실험결과와 일치하였다.

본 실험에 있어서 산소자유기가 생쥐의 培養 海馬神經細胞에 독성을 나타낸것은 hydrogen peroxide가 항산화효소의 활성감소를 초래했거나 또는 산소자유기 중 superoxide와 같은 환원제가 세포 내  $Fe^{3+}$ 와 상호 작용하여 독성을 나타냈을 가능성도 배제할 수는 없지만<sup>1,34)</sup>, MTT assay와 NR assay를 비롯하여 Neurofilament 정량, DNA synthesis분석의 결과를 볼 때 hydrogen peroxide가 세포막의 지질과산화반응을 촉진시키고 세포막을 손상시켰기 때문인 것으로 생각된다<sup>35)</sup>.

Hydrogen peroxide의 산화적 손상에 대한 신경독성을 조사하기 위하여 1~50 $\mu$ M의 hydrogen peroxide가 각각 여러 농도로 포함된 培養액에서 海馬神經細胞를 培養한 후 MTT assay에 의한 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 hydrogen peroxide의 처리농도에 비례하여 유의하게 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 40 $\mu$ M의 hydrogen peroxide에서 MCV(midcytotoxicity value)값이 나왔다(Table 1, Fig. 1).

또한 hydrogen peroxide의 처리 시간에 의한 영향을 조사하기 위하여 hydrogen peroxide의 MCV인 40 $\mu$ M hydrogen peroxide에서 2-6시간 동안 각각 海馬神經細胞를 培養한 결과 hydrogen peroxide의 처리 시간에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 감소시켰다(Table 2, Fig. 2).

Hydrogen peroxide의 독성에 대한 영향을 NR assay에 의하여 조사하기 위하여 20-50 $\mu$ M hydr

ogen peroxide가 각각 여러 농도로 포함된 培養액에서 海馬神經細胞를 培養한 후 NR assay에 의한 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 hydrogen peroxide의 처리농도에 비례하여 유의하게 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 40 $\mu$ M hydrogen peroxide처리에서 MCV값이 나왔다(Table 3, Fig. 3). 또한 hydrogen peroxide의 처리 시간에 의한 영향을 조사하기 위하여 hydrogen peroxide의 MCV인 40 $\mu$ M에서 2-6시간 동안 각각 海馬神經細胞를 培養한 결과 hydrogen peroxide의 처리 시간에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 감소시켰다(Table 4, Fig. 4).

활성산소종과 항산화작용에 대한 연구가 계속되면서 자유라디칼에 대한 방어 기작으로 superoxide anion radical dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase와 같은 효소체계와 비타민 A, C, E나 glutathione, uric acid 등이 자유 라디칼을 제거할 수 있는 항산화물질로 제시되었다<sup>36)</sup>. 본 실험에서는 여러 뇌병변의 원인이라고 밝혀진 산소자유기에 대하여 이의 산화적 손상에 의한 한약추출물의 효과를 조사하기 위하여 생쥐에서 순수 분리하여 培養한 해마 신경세포에 熱多寒少湯을 전처리한 후 산소자유기의 하나인 hydrogen peroxide를 처리하여 그 효과를 조사하였다.

Hydrogen peroxide가 海馬神經細胞에 미치는 영향에 대한 Neurofilament 정량조사를 위하여 1~60 $\mu$ M의 hydrogen peroxide가 각각 포함된 培養液에서 5시간 동안 培養한 다음 Neurofilament 정량을 조사하였다. Hydrogen peroxide는 培養 海馬神經細胞에 처리한 농도에 비례하여 Neurofilament의 양적 감소를 보였으며 30 $\mu$ M hydrogen peroxide처리에서 대조군 100%에 비하여 51.6%로 나타나 MCV값을 나타냈다(Table 5, Fig. 5). 그러나 30 $\mu$ M hydrogen peroxide를 5시간 처리하기 전 20~80 $\mu$ g/ml 熱多寒少湯이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 Neurofilament의



유의한 양적 증가를 보였으며 특히 60 $\mu$ g/ml와 80 $\mu$ g/ml 熱多寒少湯의 처리에서는 대조군 1.15에 비하여 1.29(p<0.05)로, 대조군 1.53에 비하여 1.42(p<0.01)로 나타나 이는 30 $\mu$ M hydrogen peroxide만을 처리한 경우에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Table 6, Fig. 6).

Hydrogen peroxide가 DNA synthesis에 미치는 영향을 조사하기 위하여 5~40 $\mu$ M의 여러 농도가 각각 포함된 培養액에서 海馬神經細胞를 5시간 동안 培養 후 DNA synthesis의 양을 조사하였다. DNA synthesis에 있어서 hydrogen peroxide는 培養 海馬神經細胞에 처리한 농도에 비례하여 DNA synthesis를 감소시켰으며 20 $\mu$ M hydrogen peroxide 처리에서 MCV값을 나타냈다(Table 7, Fig. 7). 그러나 20 $\mu$ M hydrogen peroxide를 5시간 동안 처리하기 전 15~120 $\mu$ g/ml 熱多寒少湯이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 DNA synthesis가 증가하여 hydrogen peroxide만을 처리한 경우에 비례하여 매우 유의하게 증가하였다(Table 8, Fig. 8).

이상의 연구에서 저자는 熱多寒少湯이 hydrogen peroxide에 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 보호효과에 유의한 결과를 관찰하였다. 앞으로 더욱 상세한 연구가 이루어져야 하겠지만, 저자는 熱多寒少湯이 부분적으로 생체의 생물학적, 생화학적 균형을 정상화시키는 치료효과를 갖고 있다는 것을 예측할 수 있었으며, 이에 대한 다른 효소들의 관찰과 아울러 형태학적인 변화 등의 심도 있는 연구를 통한 그 기전의 규명이 지속되어야 한다고 사료된다.

## V. 結 論

Hydrogen Peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)의 산화적 손상에 의한 독성효과를 규명하기 위하여 쥐에서 분리 培養한 海馬神經細胞에 여러 농도의 hydrogen peroxide가 포함된 培養液에서 5시간 동안 처

리한 다음 hydrogen peroxide가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 hydrogen peroxide의 독성효과에 대한 한약추출물인 熱多寒少湯의 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 산소자유기인 hydrogen peroxide는 MTT assay와 NR assay에 의한 세포생존율을 감소시켰고 Neurofilament의 감소 및 DNA synthesis의 감소에 의하여 생쥐의 培養 海馬神經細胞에 독성을 나타냈다.

2. 熱多寒少湯은 hydrogen peroxide의 산화적 손상에 대한 신경독성에 대하여 Neurofilament의 증가에 유의한 효과를 보였다.

3. 熱多寒少湯은 hydrogen peroxide의 산화적 손상에 대한 신경독성에 대하여 DNA synthesis 양의 증가에 유의한 효과를 보였다.

이상의 결과로 보아 hydrogen peroxide는 쥐에서 분리한 海馬神經細胞에 산화적 손상에 의한 신경독성을 나타냈으며 熱多寒少湯이 hydrogen peroxide와 같은 산소자유기의 산화적 손상에 대한 방어에 효과적인 것으로 사료된다.

## 參 考 文 獻

1. Halliwell, B. : Oxidants and human disease: so me new concept. FASEB J., 1:358-364, 1987.
2. Ames, B. N. : Dietary carcinogens and Anticarcinogens. Science, 221:1256-1264, 1983.
3. Johnson D, Toms R, Weiner H : Studies of myelin breakdown on vitro.  
In Kim SU(ed) : "Myelination and Demyelination". New York, Plenum Press, 219, 1989.
4. Difazio MC. Hollingswroth Z. Young AB. Penn y JB : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. Neurology, 42:402, 1992.

5. Conradi S, Ronnevi L, Norris F : Amyotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP(ed) : Human Motor Neuron Disease. New york, Raven Press, pp.35-6, 1982.
6. Rosen D, Siddique T, Patterson D Figlewicz D, Sapp P Hentati A, Donaldson D, Goto J. O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A : Mutation in Cu/Zu superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature, London, 362:59, 1993.
7. Jesberger JA, Richardson JS : Oxygen free radicals and brain dysfunction. Int. J. Neurosci, 57: 1-17, 1991.
8. Floyd RA : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J., 4:2587-2597, 1990.
9. 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.
10. 田炳薰 : 人蔘의 산소유리기로 손상된 척수신경세포의 손상에 미치는 영향, 대한동의병리학회지 12(1): pp.96-101, 1997.
- 11) Park S T, Jeon B H, Park B R : Effect of Epimedium Koreanum Nakai on oxidant-induced neurotoxicity in cultured bovine oligodendrocytes. Kor. J. Orient. Medic. Pathol., 11:58-62, 1997.
- 12) 노민희 : 인체해부학, 서울, 정담, p.244, 1993.
13. 이대희 : 임상신경학총론, 서울, 고려의학, p.35, 1999.
14. 옥윤영 : 太陰人 清心蓮子湯이 Hydrogen peroxide에 손상된 白鼠의 大腦神經細胞에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1998.
15. 전국 한의과대학 四象醫學교실 : 四象醫學, 서울, 集文堂, pp.410-414, 1997.
16. 洪淳用·李乙浩 : 四象醫學原論. 서울, 행림출판, pp.330-334, 345, 1995.
17. 李太浩 : 東醫四象診療醫典, 서울, 행림출판, pp.37-39, 1984.
18. 김형태 : 新編東醫壽世保元, 서울, 도서출판 정담, pp.74-75, 81, 1999.
19. 宋一炳 : 四象醫學적 중풍관리의 임상적 연구, 四象醫學회지 8(2) : 117-130, 1992.
20. Mosmann T., : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods, 65:55-63, 1983.
21. 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.
22. 李濟馬 : 東醫壽世保元, 서울, 여강출판사, pp.251-262, 272, 1992.
23. 李壽瓊 : 東醫壽世保元의 문헌적 자료에 근거한 太陰人 병증에 대한 고찰, 四象醫學會誌 7(1) : 103-115, 1995.
24. 최용준·김경요 : 熱多寒少湯이 혈압, 국소뇌혈류량 및 뇌연막동맥에 미치는 영향. 四象醫學會誌, 10(1):285-293, 1998.
25. 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.
26. 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.. 1988;51:1960-1963
27. Mayer M L, Westrook G L. Permeation and block of N-methyl -D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. J. Physiol.. 1987; 394:501-527.

28. Zeman S, Lloyd C, Meldrum B, Leigh P N. Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1994; 20:219-231.
29. 金賢奎 : 苦蔘煎湯液이 培養心筋細胞에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1998.
- 30) 김중관 : 太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 손상된 대뇌피질 신경세포에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1998.
31. 이영보 · 송용선 : 加味十全大補湯 煎湯液이 Xanthine Oxidase/Xanthine에 의해 손상된 培養 척수운동신경세포에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지*, 1999; 9(1).
32. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim S U : Oxygen radical induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J. Neurosci Res*, 37:62-70, 1994.
33. Kim YS and Kim SU : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J. Neurosci Res*, 29:100-106, 1991.
- 34) Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton Jw : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation : Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biochem*, 259:3620-3624, 1984.
35. Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T : A possible role of lipid peroxidation in cellular damage caused by cerebral ischemia and protective effect of alpatocopherol administration. *Stroke*, 14:977-982, 1983.
36. Halliwell, B., Gutteridge, and John M. C. : *Free Radicals in Biology and Medicine*; Clarendon press, Oxford, pp.279-313, 1985.