

調胃升清湯 煎湯液이 XO/HX에 의해 損傷된 培養 海馬神經細胞에 미치는 效果.

송승연* · 김형순* · 김경요* · 고기덕* · 김일환**

Abstract

Effects of Jowiseungcheongtang water extract on Cultured Primary Hippocampal Cell Culture Damaged by XO/HX

Song Seung-yun · Kim Hyoung-soon · Kim Kyung-yo

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

Jowiseungcheongtang(JST) has been in Sasang constitution medicine for many years as a therapeutic agent for cerebral disease. But the effect of Jowiseungcheongtang(JST) on neurotoxicity is not known. The purpose of this study was to determine the effects of Jowiseungcheongtang(JST) on the hippocampal cell injured by Xanthine Oxidase/Hypoxanthine.

The results were as follows:

1. XO/HX decreased the survival rate of the cultured hippocampal cells on NR assay and MTT assay.
2. JST water extract have efficacy of decreasing a amount of lipid peroxidation increased by XO/HX in cultured hippocampal cells.
3. JST water extract have efficacy of increasing DNA synthesis decreased by XO/HX in cultured hippocampal cells.

From the above results, It is concluded that JST has marked efficacy in preventing cultured hippocampal cells from the damages by XO/HX.

Key word : Jowiseungcheongtang(JST), XO/HX, hippocampal cell, MTT, NR., Lipid Peroxidation, DNA synthesis

I. 緒論

신경계를 구성하고 있는 신경조직은 물리적, 화학적인 여러 자극에 의하여 쉽게 손상을 받을 수 있으며, 한번 손상을 받은 신경세

포는 대부분의 경우 재생이 불가능하다고 알려져 있다. 뇌의 신경조직은 손상된 부위에 따라 여러 가지 증상이 나타날 수 있는데 그 중에 변연계의 손상은 근래에 평균수명이 고령화 되어감에 따라 점차 그 숫자가 늘고 있

* 원광대학교 한의과대학 사상체질의학교실

** 동신대학교 한의과대학 사상체질의학교실

교신저자: 송승연 (주소) 광주 북구 두암2동 무등파크3차 302-305 전화)062-265-0531

E-mail)na7255@orgio.net

는 치매와도 관련이 깊다¹⁾.

Superoxide나 hydrogen peroxide와 같은 산소자유기는 정상적인 대사과정에서 사립체의 전자전달계에 의한 산화인산화작용에 의하여 형성되며, 이는 superoxide dismutase(SOD)나 catalase에 의하여 물로 변환되어 소실된다. 그러나 저산소증이나 허혈 및 중풍과 같은 이상적인 상태에서는 산소자유기가 비정상적으로 형성되어²⁾, 그 결과 세포막의 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐 아니라 protein kinase C(PKC)나 lipidphosphatase A2와 같은 2차 전달자를 비롯하여 각종 효소나 단백질을 불활성화시킴으로써 세포의 손상 및 조직의 괴사를 초래한다³⁾. 산소자유기는 노인성 치매의 병인을 비롯하여 중풍, 근위축성 측색경화증⁴⁾ 및 뇌허혈과 같은 각종 질환의 병인으로 밝혀지고 있다⁵⁾.

東醫壽世保元에서 太陰人은 肝大肺小한 특징을 가지고 있고⁶⁾, 肺之黨에 속하는 두뇌 역시 肝大肺小한 영향을 받는다⁷⁾. 더욱이 최근 金⁸⁻⁹⁾ 등이 임상 연구 보고에서 太陰人의 중풍 발병율이 가장 높다고 지적한 것처럼 太陰人은 타 체질에 비해 두뇌의 질병에 걸리기 쉬운 체질적 소인을 가지고 있다고 볼 수 있다.

調胃升清湯은 東醫壽世保元에 그 내용이 소개되어 있는데, 임상에서 太陰人의 성인병에 대응되고 있는 처방이다¹⁰⁾. 調胃升清湯의 적응증에 대하여 元¹¹⁾은 食後痞滿, 跟脚無力, 中消喜飢 등을, 洪¹⁰⁾은 食後痞滿, 糖尿病, 腿脚無力, 中風, 口眼喎斜 등을 치료한다고 하였으나, 遠志·石菖蒲등 구성약물의 약성이나 補肺調氣·安神定志 등의 효능으로 보아 치매 등의 뇌신경손상질환에 임상적으로 많이 사용될 수 있다고 생각된다.

또한 調胃升清湯은 痴呆의 분류¹²⁾중 병리적인 면에서 대뇌피질에 현저한 병리적 변화를 나타내는 피질성 치매중 대표적인 알츠하이머 병에도 그 유의성을 보인다고 하는 김 등¹³⁻¹⁵⁾의 연구 결과가 있다.

이에 저자는 調胃升清湯에서 뇌신경조직에 대한 산소자유기의 산화적 손상기전을 방어하는 작용이 있는지 알아보기로 하였다.

본 실험에서는 산소자유기를 유발하기 위하여 XO/HX를 培養한 海馬神經細胞에 처리한 후 세포독성을 MIT 정량, NR 정량 측면에서 조사하였으며, 調胃升清湯의 방어효과를 관찰하기 위하여 調胃升清湯 煎湯液을 培養 海馬神經細胞에 전처리한 후 Lipid peroxidation 정량, DNA synthesis 정량측면에서 측정을 하였는 바, 유의한 결과를 관찰하였기에 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-Dawley종 흰쥐를 使用하였다.

2) 藥材

本 實驗에서 使用된 調胃升清湯은 圓光大學 校 韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였으며 1貼의 처방내용은 다음과 같다.

Prescription contents of Jouseungbeongtang

Herbal Name	Scientific Name	Weight(g)
薏苡仁	Semen Coicis	12
乾 栗	Castaea Mollissima	12
蘿菘子	Semen Raphani	6
麻 黃	Herba Ephedrae	4
桔 梗	Radix Platycodi	4
麥門冬	Radix Ophiopogonis	4
五味子	Fructus Schizandrae	4
石菖蒲	Rhizoma Acori Graminei	4
遠 志	Radix Polygalae	4
天門冬	Radix Asparagi	4
酸棗仁	Semen Zizyphi Spinosae	4
龍眼肉	Arillus Longnae	4
Total amount		66

2. 實驗方法

1) 檢液의 調製

調胃升清湯 198g을 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 55.78g의 분말 시료를 얻었다.

2) 藥劑 製造

본 실험에 사용한 시약으로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypoxanthine (HX, Sigma)으로 XO의 경우 100mU/ml, 10mU/ml, 1mU/ml의 저장액을, HX의 경우 1M, 100mM, 10mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요할 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 μ M glutamine, 25 μ 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) XO/HX의 處理

XO/HX가 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 MEM(modified essential medium)으로 3회 세척한 다음 여러 농도의 XO/HX가 포함된 培養液에서 2~6시간 동안 처리후 分析하였다.

5) 세포독성 및 방어효과 검증

(1) 세포생존을 분석

① MTT 정량

MTT <3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma)> 정량은 Mosmann¹⁶⁾의 방법에 의하였다. XO/HX를 처리한 培養 神經細胞를 PBS(phosphate buffered saline)로 3회 세척한 후 전날 제조한 50mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료후 dimethylsulfoxide(DMSO, Merk)를 처리한 다음 ELISA Reader로 570nm에서 흡광도를 측정후 대조군과 비교 조사하였다.

② NR 定量

Neutral red(NR, Sinma)의 정량은 Borenfreud와 Puerner¹⁷⁾의 방법에 따랐다. 즉 여러 농도의 Xanthine Oxidase(XO)를 처리한 培養 神經세포를 PBS로 3회 세척 후 전날 제조한 5mg/ml의 NR을 well당 최종 농도로 희석하여 넣은 다음 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료후 PBS로 3회 세척후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 ELISA Reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

③ Lipid peroxidation 정량

XO나 XO/HX 및 조위승청탕을 여러 농도로 처리한 후 Lipid peroxidation의 측정은 일정시간 동안 처리한 海馬神經細胞의 상층액과 세포용해액내의 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)를 측정한 것으로, 위의 액에 12N H₂SO₄와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0ml와 0.3ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응완료 후 TBA를 1.0ml를 가하고 다음 90도에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각 후 n-butanol로 처리하였다. n-butanol 처리완료 후 원침하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 측정하였다.

④ DNA synthesis

일정 시간동안 조위승청탕과 산소자유기를 처리한 실험군과 조위승청탕과 산소자유기 처리를 하지 않은 대조군을 [³H]thymidine이 10uCi/ml 포함된 培養液으로 교환하여 1시간 동안 표식하였다. 100μg/ml의 sodium azide로 DNA합성을 억제시켜 Ca²⁺, Mg²⁺가 없는 PBS로 3회 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 XO in cultured hippocampal cells

XO (mU/ml)	MTT absorbance(570nm)	Decrease rate of cell viability(%)
0	0.74±0.08	-
10	0.63±0.05	13.5
20	0.58±0.04	21.6
30	0.34±0.03*	54.1
40	0.25±0.02**	66.2

Cultured hippocampal cells were treated with various concentrations of XO 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

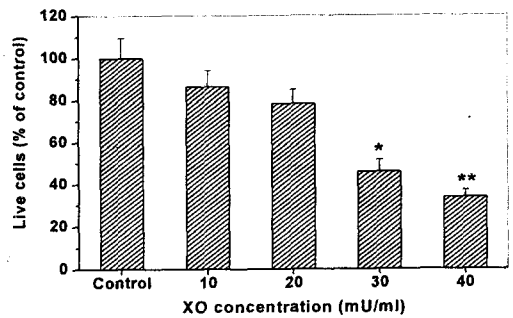


Fig. 1. Dose-dependency of XO in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 1. *p<0.05; **p<0.01

Table 2. Time-response relationship of xanthine XO/HX in cultured hippocampal cells

XO/HX (mU/ml/ mM)	MTT absorbance(570nm)				
	0 hr	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr
0	0.67±0.08	0.64±0.07	0.61±0.05	0.58±0.04	0.53±0.03
30	0.55±0.06	0.50±0.04	0.42±0.03	0.30±0.02*	0.14±0.01**

Cultured hippocampal cells were treated with various time intervals at a concentration of 30 mU/ml XO in 0.1 mM HX. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

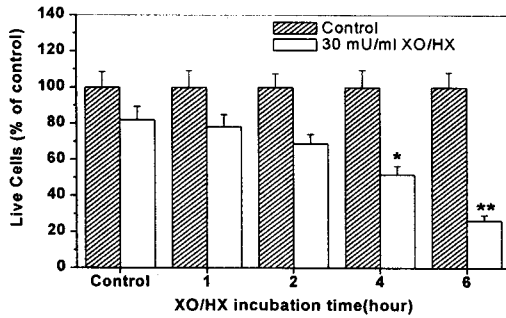


Fig. 2. Time-response relationship of XO /HX in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 2. *p<0.05; **p<0.01

(2) NR 定量

Table 3. Absorbance (% of control) at 540nm wavelength for the NR assay on XO in cultured hippocampal cells

XO (mU/ml)	NR absorbance(540nm)	Decrease rate of cell viability(%)
0	0.67±0.07	-
15	0.51±0.04	23.9
25	0.44±0.03	34.3
50	0.32±0.02*	52.2
100	0.19±0.01**	71.6

Cultured hippocampal cells were grown in media containing various concentrations of XO 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

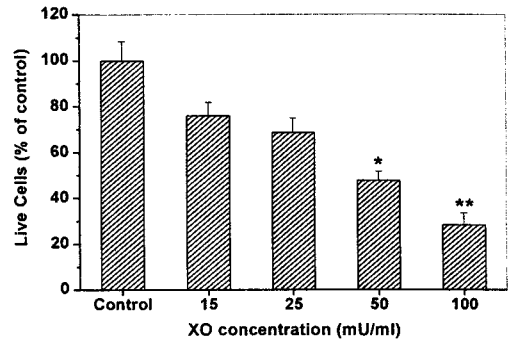


Fig. 3. Dose-response relationship of XO by NR assay in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 3. *p<0.05; **p<0.01

Table 4. Time-response relationship of XO/HX by NR assay in cultured hippocampal cells

XO/HX (mU/ml/mM)	NR absorbance(540nm)				
	0 hr	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr
0	0.68±0.09	0.66±0.08	0.65±0.06	0.64±0.05	0.62±0.03
50	0.60±0.08	0.48±0.05	0.42±0.04	0.35±0.02*	0.26±0.01**

Cultured hippocampal cells were incubated with 50 mU/ml XO in 0.1 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

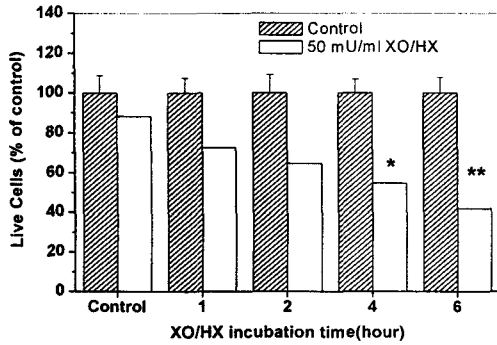


Fig. 4. Time-dependency of XO/HX in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 4. *p<0.05; **p<0.01

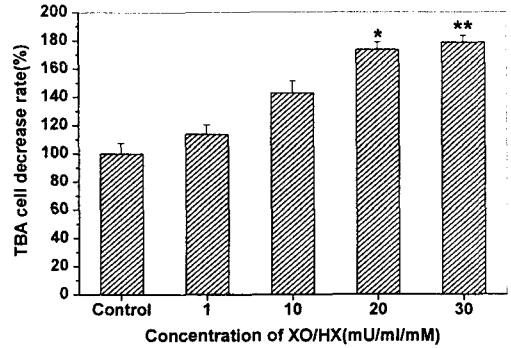


Fig. 5. Dose-dependency of XO/HX on lipid peroxidation by TBARS assay in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 5. *p<0.05; **p<0.01

2. 韓藥抽出物の 效果

1) Lipid peroxidation 定量

(1) XO/HX의 영향

Table 5. Dose-response relationship of xanthine oxidase/hypoxanthine (XO/HX) by TBARS assay in cultured hippocampal cells

XO/HX (mU/ml/mM)	TBARS(pmol/10 ⁶ cells)	Decrease rate of cell viability(%)
0	39.7±5.4	-
1	45.2±4.8	21.4
10	56.7±3.1	26.4
20	68.9±2.9*	49.4
30	70.9±1.6**	64.2

Cultured hippocampal cells were exposed to various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 4 hours. 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<0.05; **p<0.01

(2) 調胃升清湯(Jowiseungcheongtang, JST) 煎湯液의 效果

Table 6. Dose-response relationship of Jowiseungcheongtang(JST) for lipid peroxidation in hippocampal cells treated by XO/HX

XO/HX (mU/ml/mM)	TBARS(pmol/10 ⁶ cells)				
	Concentration of JST(μg/ml)				
	0	5	25	50	100
0	36.7±3.4	36.9±3.6	37.2±3.5	37.6±3.8	37.9±3.9
20	62.4±1.4	60.8±1.8	57.7±2.1	53.7±2.5	46.0±2.7*

Cultured hippocampal cells were treated with 5, 25, 50 and 100 μg/ml JST. Cultures were preincubated with JST for 3 hours respectively. After then cultures were exposed to 20 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 4 hours. TBA reactive substance(TBARS) were represent as pmol/10⁶ cells. Significant differences between groups are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

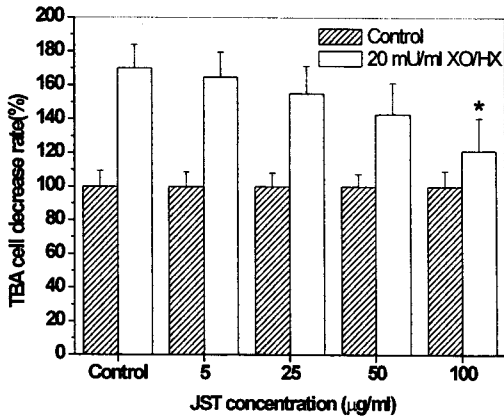


Fig. 6. Dose-dependency of JST for its protective effect on XO/HX by TBARS assay in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 6. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

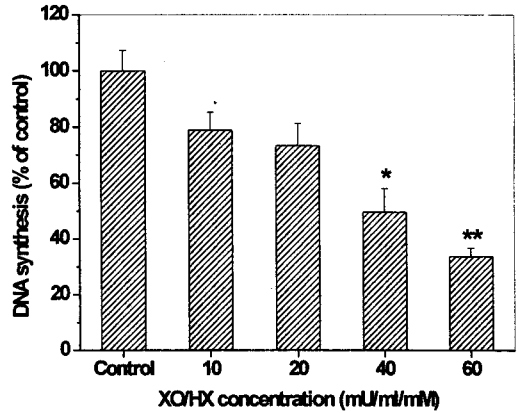


Fig. 7. Dose-dependency of XO/HX on DNA synthesis. Other legends are the same as table 7. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

2) DNA synthesis 정량

(1) XO/HX의 영향

Table 7. Dose-response relationship of XO/HX on DNA synthesis in cultured hippocampal cells

XO/HX (mU/ml/mM)	Decrease rate of DNA synthesis (% of control)
0	-
10	21.1
20	26.6
40	50.4*
60	66.3**

Cultured hippocampal cells were treated with various concentrations of XO/HX for 4 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 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(2) 調胃升清湯(Jowiseungcheongtang JST) 煎湯液의 효과

Table 8. Dose-reponse relationship of Jowiseungcheongtang(JST) for its neuroprotective effect on DNA synthesis in hippocampal cells treated XO/HX

XO/HX (mU/ml/mM)	DNA synthesis(% of control)				
	Concentration of JST(µg/ml)				
	0	20	40	80	160
0	100 \pm 8.1	100 \pm 7.5	100 \pm 6.2	100 \pm 9.3	100 \pm 8.4
40	52.7 \pm 4.8	64.8 \pm 7.2	69.1 \pm 5.3	75.4 \pm 8.1	82.2 \pm 9.3*

Cultured hippocampal cells were treated with 20, 40, 80 and 160 µg/ml concentration of JST for 3 hours, after then cultures were exposed to 40 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 4 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 * $p < 0.05$

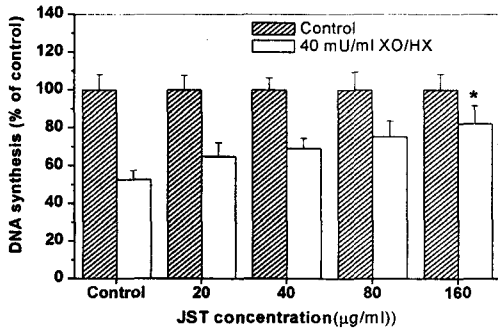


Fig. 8. Dose-dependency of JST in DNA synthesis. Other legends are the same as Table 8. Significant differences between groups are marked with asterisks * $p < 0.05$

IV. 考 察

자유기는 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것으로서 이러한 특수구조 때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러가지 병태생리학적 반응에 관여하고 있으며 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시킨다¹⁸⁻¹⁹. 특히 산소자유기는 중추나 말초신경계를 구성하고 있는 신경세포에 산화적 손상을 유발함으로써 노인성 치매나 파킨슨씨병을 비롯하여²⁰⁻²³ 뇌허혈이나 뇌졸중 등과 같은 신경질환의 병인으로 밝혀지고 있다^{4,24-25}.

본 실험에서 신경세포에 독성을 유발한 산소자유기는 세포막의 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 질소자유기의 하나인 Nitric Oxide(NO)와 상호 작용함으로써 독성이 강한 Peroxynitrite를 생성하여 병변을 더욱 가속화시킨다고 한다. 또한 培養 海馬神經細胞에서 흥분성 아미노산(EAAs)을 분비케 유도한다는 것이 밝혀졌으며 분비된 EAAs는 N-methyl-D aspartate(NMDA) 수용체를 과활성화시킴으로써 세포내 Ca^{2+} 의 항상성을 깨뜨리며 그 결과

신경세포를 손상시킬 뿐만 아니라 나아가서는 세포의 사멸을 초래한다고 한다^{4,26-28}. 그 밖에도 산소자유기는 protein kinase C(PKC)나 cyclic AMP와 같은 이차전달자에 영향을 미침으로써 세포독성을 초래한다고 한다. 최근에 산소자유기의 산화적 손상에 대하여 한약제의 추출물이나 동식물에서 정제한 천연추출물들이 강력한 항산화작용을 나타낸다는 실험결과들이 보고되고 있다. 항산화작용이란 에너지 대사 과정에서 생성된 자유라디칼과 반응성 산소화합물의 산화적 손상을 제거하거나 약화시키는 작용으로 최근에는 이에 대한 연구가 부각되고 있다²⁹⁻³⁰. 산소자유기는 또한 뇌허혈이나 다발성경화증의 병인으로 밝혀지면서 산소자유기의 신경독성에 대한 병리적 기전규명^{4,31-32}과 산화적 손상에 대한 신경병변의 치료적 방법³³⁻³⁶에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔다.

기억력은 복잡한 정신 기능의 하나로 뇌의 여러 영역들이 관여하고 각 영역들에 저장된다고 알려져 있다. 그러나 일반적으로 기억 중추는 측두엽 어느 부위로 추정하지만, 특히 기억 저장에 관여하는 부위는 해마(hippocampus), 배내측시상핵(dorsomedial thalamic nucleus), 유두체(mammillary body) 및 뇌궁(fornix) 등이다. 이러한 부위들이 양측성으로 침범된 경우는 전반적인 기억 상실이 초래된다³⁷. 특히 이 구조물 가운데 해마(hippocampus) 신경세포는 짧은 기억에 관계가 있다고 알려져 있는데, 바로 전의 일들을 기억하지 못하는 알쯔하이머 치매나 뇌손상 이후에 발병하는 혈관성 치매에 있어 이 부위의 손상과 관련이 있다고 볼 수 있다.

調胃升清湯은 薏苡仁, 乾栗, 蘿菔子, 麻黃, 桔梗, 麥門冬, 五味子, 石菖蒲, 遠志, 天門冬, 酸棗仁, 龍眼肉 등으로 이루어져 있으며 太陰人 胃脘受寒表寒病의 肺虛證에 쓰는 처방이다¹⁰.

肝大肺小한 太陰人의 병증은 크게 胃脘受寒表寒病과 肝受熱裏熱病으로 나누어지는데, 胃脘受寒表寒病은 肺小하기 때문에 그의 腑인

胃脘에 陽의 상승력이 부족하여 肺의 呼出力이 부족하면 衛氣가 약해져서 寒邪에 걸리기 쉽고 寒邪에 촉감되면 胃脘受寒表寒病이 되어 營血이 不利하여 발병하는 것이다.

여기에는 背佳頁表病, 太陽寒厥證, 胃脘寒證이 나타나는데 그 치료방법은 發汗시켜 表實之邪를 풀어주거나 潤肺清心시켜 肺의 清陽을 升提시켜야 하고, 調胃升清湯은 그 대표처방 중 하나이다⁶⁾.

本方은 전체적으로 불 때 太陰人의 胃氣를 보강하고 痰濁을 제거하여 升清할 기반을 만들고 肺의 기운을 튼튼하게 해서 肺의 表邪를 풀고 肺小한 太陰人의 胃脘에서 水穀之氣를 상승시켜 水穀溫氣가 舌下에서 津海로 頭腦에서 髓海로 충족되게 해 주는 처방이다^{10,38-39)}.

그러므로 調胃升清湯이 상초에 있는 肺之黨인 頭腦의 髓海를 충족시키며, 神이 머무는 여건을 마련하여 주므로 실제 두뇌의 질환에 사용할 때 유용하게 응용할 수 있는 처방이 될 수 있다고 하였다⁴⁰⁾.

최근 한의학에서는 痴呆에 대하여 사상의학적인 치료와 연구가 활발히 이루어지고 있는데, 痴呆에 대한 임상연구에서 배⁴¹⁾는 노인성 치매에 관한 四象體質醫學的 연구를 통해 痴呆의 四象醫學的 접근법을 제시하였고, 황⁴²⁾ 등은 痴呆에 관한 한의학적 접근을 하였으며, 특히 태음인은 조위승청탕으로 치매치료에 임상적 효과를 얻을 수 있다고 하였다.

이에 調胃升清湯은 임상에서 중풍, 치매등을 비롯한 각종 질환 중 太陰人 胃脘受寒表寒證에 해당되는 병증에 많이 응용되고 있는 바, 이 처방에도 산소자유기의 산화적 손상에 대한 방어작용이 있는지 알아 보기로 하였다.

본 실험에서는 산소자유기를 유발하는 Xanthine Oxidase/Hypoxanthine (XO/HX)를 생쥐의 培養 海馬神經細胞에 처리하여 XO/HX에 유발된 산소자유기가 세포독성을 유발하는지 MTT assay

와 NR assay법을 통하여 관찰하였으며 調胃升清湯이 방어효과를 관찰하기 위하여 調胃升清湯 煎湯液을 培養 海馬神經細胞에 3시간 동안 전처리한 다음 XO/HX에 노출시킨후 Lipid peroxidation, DNA synthesis정량 측정을 통하여 調胃升清湯의 방어효과를 관찰하였다.

세포독성의 유발여부를 관찰하기 위하여 XO가 10mU/ml~40mU/ml까지의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 4시간 동안 培養한 후 XO의 독성효과를 MTT 정량법에 의하여 조사한 결과, 처리한 XO의 농도에 비례하여 세포 생존율이 감소하였다(Table 1, Fig. 1).

Xanthine Oxidase(XO)와 Hypoxanthine (HX)가 시간에 따라 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.1mM HX에 MCV(midcytotoxicity value)값인 30mU /ml XO/HX가 포함된 培養液에서 해마 신경세포를 각각 1~6시간 동안 培養한 후 세포 생존율을 MTT assay법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 시간이 지남에 따라 세포생존율이 감소하였다 (Table 2, Fig. 2).

培養 중인 海馬神經細胞를 XO가 15mU /ml에서 100mU/ml의 농도로 각각 포함된 培養液에서 4시간 培養한 다음 이의 영향을 NR assay법으로 조사한 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 세포생존율이 감소하였다(Table 3, Fig. 3).

XO와 HX가 培養시간에 따라 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MCV(midcytotoxicity value)값인 50mU /ml XO/HX 농도에서 1~6시간 동안 培養한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 조사한 결과 처리한 시간에 비례하여 세포생존율이 감소하였다(Table 4, Fig. 4).

이러한 결과는 산화적 손상이 신경독성에 관여하고 있음을 말해주고 있을 뿐만 아니라, 시간별로 세포 생존율이 감소한 것으로 보아 세포내 항산화계에도 영향을 준다^{43,45)}는 것을

제시하고 있다.

또한 XO/HX의 산화적 손상에 대한 調胃升清湯煎湯液의 효과를 조사하기 위하여 생쥐에서 순수분리하여 培養한 海馬神經細胞에 XO/HX를 처리한후 調胃升清湯煎湯液의 효과를 Lipid peroxidation을 통하여 측정하였다. 그 결과 XO/HX는 培養 海馬神經細胞에 처리한 농도에 비례하여 TBARS가 증가하였으며 20mU/ml XO/0.1mM HX처리에서 MCV값을 나타냈다(Table 5, Fig. 5).

그리고 20mU/ml XO/0.1mM HX를 4시간동안 海馬神經細胞에 처리하기 전 5~100µg/ml의 調胃升清湯煎湯液이 각각 포함된 培養液에서 3시간동안 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 TBARS가 통계적으로 유의하게 감소하였다(Table 6, Fig. 6).

또한 DNA synthesis정량 측면에서 조사한 결과 XO/HX는 培養 海馬神經細胞에 처리한 농도에 비례하여 DNA synthesis가 감소하여 세포에 독성을 나타냈으며 40mU/ml XO/0.1mM HX처리에서 MCV값을 나타냈다(Table 7, Fig. 7).

그리고 40mU/ml XO/0.1mM HX를 4시간 동안 海馬神經細胞에 처리하기 전 20~160µg/ml의 調胃升清湯煎湯液이 각각 포함된 培養液에서 3시간동안 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 DNA synthesis가 증가하였다. 특히 160µg/ml 調胃升清湯煎湯液의 처리에서는 통계적으로 유의한 결과를 나타냈다(Table 8, Fig. 8).

이같은 실험 결과를 종합해보면, XO/HX는 培養海馬神經細胞에 산소자유기를 유발하여 독성을 나타냈으며 調胃升清湯煎湯液은 XO/HX에 의하여 유발된 산소자유기에 대하여 방어효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

따라서 산소자유기는 뇌세포손상에 의한 痴呆 등의 질환에 한 원인이 될 수 있고, 조

위승청탕은 치료효과가 있다고 생각할 수 있다. 앞으로 이에 대한 임상적 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 結論

調胃升清湯이 산소자유기에 의한 신경독성을 방어하는 효과를 규명하기 위하여 흰쥐의 태아에서 분리 培養한 海馬神經細胞를 여러 농도의 Xanthine Oxidase(XO)와 Hypoxanthine (HX)이 포함된 培養液에 調胃升清湯煎湯液을 3시간 동안 전처리한 다음 調胃升清湯이 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. XO/HX는 MTT assay와 NR assay에 의한 세포생존율을 감소시켰고 Lipid peroxidation의 증가 및 DNA synthesis의 감소에 의하여 생쥐의 培養 海馬神經細胞에 독성을 나타냈다.
2. 調胃升清湯煎湯液은 XO/HX에 의하여 유발된 Lipid peroxidation을 유의하게 방어하였다.
3. 調胃升清湯은 XO/HX에 의하여 감소한 DNA synthesis를 유의하게 증가시켰다.

이상의 실험결과는 XO/HX가 흰쥐의 태아에서 분리 培養한 海馬神經細胞에 산화적 손상에 의한 신경독성을 나타냈으며, 調胃升清湯이 培養한 海馬神經細胞의 산화적 손상에 대하여 유의성있는 방어적 작용이 나타낸 것으로, 痴呆 등의 임상적 응용에 대해서도 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

參考文獻

1. 김일환 : 熱多寒少湯이 kainic acid에 의해 유발된 mouse의 해마체 손상에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1999.
2. Jesberger JA, Richardson JS. Oxygen free radicals

- and brain dysfunction. *Int. J. Neurosci* 1991; 57:1-17.
3. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 1990; 4: 2587 -2597.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 전국 한의과대학 사상의학교실 : 四象醫學, 서울, 집문당, pp.342-353, 538, 1997.
 7. 옥윤영 : 太陰人 淸心蓮子湯이 Hydrogen peroxide에 손상된 白鼠의 海馬神經細胞에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1998.
 8. 김경요 : 太陰人の 혈액 변화에 대한 연구, 원광대학교 대학원, 1991.
 9. 송일병 : 四象醫學의 중풍관리의 임상적 연구, 四象醫學會誌, 8(2);117-130, 1996.
 10. 洪淳用 · 李乙浩 : 四象醫學原論, 서울, 행림출판, pp.335-344, 1995.
 11. 원지상 : 東醫四象新編, 서울, 문우사, p.61, 1926.
 12. 이대회 : 임상신경학(1), 서울, 대관출판사, p.174, 1996.
 13. 김보균 · 현경철 · 김종우 · 황의완 : Dementia of Alzheimer Type 에 관한 한의학적 임상연구, 東醫神經精神科學會誌, 9(1): 25-43, 1998.
 14. 우주영 · 김종우 · 황의완 · 김현택 · 박순권 : 調胃升清湯이 흰쥐의 방사형 미로학습과 기억에 미치는 영향, 東醫神經精神科學會誌, 8(1):69-79, 1997.
 15. 이웅석 : 調胃升清湯이 Alzheimer' Disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1998.
 16. Mosmann T., : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63, 1983.
 17. 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.
 18. 姜益鉉 : 天麻鉤藤飲이 뇌조직의 생화학적 변화에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1996.
 19. 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
 20. 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.
 21. Difazio M C, Hollingsworth Z, Young A B, Penny J B : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brain. *Neurology*, 42:402-412, 1992.
 22. Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J : NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature(London)*, 336:68 -70, 1988.
 23. 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.
 24. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.*, 59:1609-

- 1623, 1992.
25. Vannucci R C, Vasta F, Vanucci S J : Cerebral metabolic response of hyperglycemic immature rats to hypoxia-ischemia. *Pediatr. Res.*, 21:524-529, 1987.
 26. Hall, E. and Braugher. J. M. : Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. *CNS Trauma* 3:281-294, 1986.
 27. Pellegrini-Giampietro D E, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J. Neurochem.* 10:1035-1041, 1990.
 28. 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.
 29. 득만 : oxidative stress에 의해 손상된 생쥐의 척추신경절세포에 있어서 항산화제의 영향에 관한 연구, 원광대학교 대학원, 1998.
 30. 이상홍 : 培養생쥐 슈반세포에 있어서 카드뎀의 신경독성에 대한 항산화제의 영향, 원광대학교 대학원, 1997.
 31. 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.
 32. Jesberger JA, Richardson JS : Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int. J. Neurosci.* 57:1-17, 1991.
 33. Borenfreund E, Babichi H, Martin-Alcuacil N : Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red(NR) and Terazolium MTT tests. *Toxic in vitro*, 2:1-6, 1988.
 34. Kontos H, Wei E, Ellis E, Jenkins L, Povlishock J, Rowe G, Hess M : Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cat. *Circ. Res.*, 57:142-151, 1985.
 35. Li W, Zhao Y, Chou I N : Alterations in cytoskeletal protein sulfhydryls and cellular glutathione in cultured cells exposed to cadmium and nickel ions. *Toxicology*, 77: 65-79, 1993.
 36. 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. *Neurotoxicology*, 17:37-46, 1996.
 37. 이대회 : 임상신경학총론, 서울, 고려의학, pp.35-36, 1999.
 38. 민족의학연구소 : 朝醫學 연변, 조선족자치주 민족의학연구소, pp.64-65, 1985.
 39. 朴奭彦 : 東醫四象大典, 서울, 醫道韓國社, p.330, 1977.
 40. 김종관 : 太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 손상된 대뇌피질 신경세포에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1998.
 41. 배오성 : 老人性 痴呆에 대한 體質醫學의 연구. *大韓韓醫學會誌* 13(2): 101-106, 1992.
 42. 황의완 · 김종우 · 이조희 · 엄효진 · 이승기 : 痴呆에 대한 한의학적 임상연구, *東醫神經精神科學會誌*, 7(1):1-13, 1996.
 43. Elion G B, Kovensky A, Hitchings G H, Metz E, Rundles R W : Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, 15:863-880, 1996.
 44. Kim Y S, Osborne D, Kim M W, Spiegelman I, Puil E, Shin D : Long-term culture of human fetal spinal cord neurons : Morphological immunocytochemical and electrophysiological characteristics *Neuroscience*, 25:659-670, 1988.
 45. Suzuki J, Fujimoto S, Oba M : The protective effects of combined administration of antioxidants and perfluorochemicals on cerebral ischemia, *Stroke*, 15:672-678, 1984.