

## 荊防地黃湯 煎湯液이 산소자유기로 손상된 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향

최용석\* · 김경요\* · 배영춘\* · 노현수\* · 김종관\* · 한병삼\* · 권덕윤\*

### Abstract

### Effects of Hyungbangjihwangtang Water Extract on Cultured Primary hippocampal Cell Damaged by Glucose Oxidase

Choi Yong Seok\* · Kim Kyung Yo\* · Bae Young Chun\* · Lo Hyun soo\* · Kim Jong Gwan\* · Han Byung Sam\* · Gwon Duk Yun\*

Dept. of Oriental Medicine Graduate School of Won Kwang University

The purpose of this study is to examine the toxic effects caused by glucose oxidase (GO) and the effects of Hyungbangjihwangtang (HJT) water extracts on the treatment of the toxic effects. For this purpose, experiments with the cultured hippocampal cells from new born mice were done. The results of these experiments were as follows.

1. GO decreased the survival rate of the cultured cells on MTT assay and NR assay.
2. HJT has the efficacy of decreasing the lipid peroxidation.
3. HJT has the efficacy of increasing the amount of neurofilaments.
4. HJT has the efficacy of decreasing the activation of protein kinase C(PKC).

From the above results, it is concluded that HJT has marked efficacy as a treatment for the damages caused by the GO-mediated oxidative stress. Further clinical study of this pharmacological effects of HJT should be completed.

\* 원광대학교 한의과대학 사상체질과  
교신저자 : 최용석 주소) 인천시 계양구 계산3동 1085-2 태평아파트상가 201호 전화) 032) 544-1075  
E-mail : way8819@hanmail.net

## I. 서 론

頭腦와 관련된 많은 질병들은 現代 醫學의 발전에도 불구하고, 여전히 해결되지 못하고 있으며, 새로운 치료방법을 모색하는 시도가 다양하게 이루어지고 있다. 四象醫學 또한 기존의 보편적 生理, 病理와는 달리 각 體質을 구분하고, 頭腦와 관련된 질병에 대해서도 체질별 특수성에 따른 접근을 시도하고 있어, 이를 이용한 연구가 진행되고 있다.

한의학에서 頭腦에 관해 언급한 문헌을 보면, 『黃帝內經·靈樞』 「海論」<sup>1)</sup>에 ‘腦爲髓之海’라 하였으며, 『經脈篇』에서는 ‘人始生先成精 精成而腦髓生’이라 하였다. 이는 腦의 생리적인 기능과 치료에 있어서 腎과 밀접한 관련이 있다는 말이다.<sup>2)</sup> 『黃帝內經·素問』 「五臟生成篇」<sup>3)</sup>에서는 ‘腎之合骨也’라고 한 바와 같이 骨은 腎에 속하고, 髓는 腦에 속하는데 髓는 精에서 기인하며 精은 다시 腎에 기인하므로 치료에 있어서도 骨病, 髓病, 腦病 모두 治腎과 補腎을 한다고 할 수 있다.<sup>4)</sup>

한편, 四象醫學에서 少陽人은 脾大腎小한 특징을 가지고 있는데,<sup>5)</sup> 少陽人 處方 중의 하나인 荊防地黃湯은 李濟馬의 『東醫壽世保元』<sup>6)</sup>에 나오는 少陽人 新定方이며, 脾受寒表寒病에서 亡陰證 身寒腹痛泄瀉에 사용된 處方으로<sup>7-8)</sup> 임상적으로, 少陽人의 頭痛, 偏頭痛, 譫語, 發狂, 中風, 癱瘓, 痴呆, 虛勞, 咳嗽, 小便頻數, 腹痛, 泄瀉를 비롯한 여러가지 두뇌와 관련된 질환이나, 신경손상질환 및 심혈관계 질환에 응용되어 왔다.<sup>9-10, 11)</sup>

荊防地黃湯에 대한 실험적 연구로서 김<sup>12)</sup>은 鎮痛, 抗痙攣, 抗瀉下 등에 대한 연구를, 홍<sup>13)</sup>은 항스트레스 효과에 대한 연구를, 장<sup>14)</sup>은 면역반응의 증강에 대한 연구를, 이<sup>15)</sup>는 荊防地

黃湯이 흰쥐의 Morris 수중미로학습과 기억에 미치는 영향에 관한 연구를 보고한 바 있다.

한편, 산소자유기는 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것인데, 그 특수구조 때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러가지 병태생리학적인 반응에 관여하고 있으며 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시킨다.<sup>16,17)</sup> 특히 산소자유기는 중추나 말초신경계를 구성하고 있는 신경세포에 산화적 손상을 유발함으로써 노인성 치매나 파킨슨씨병을 비롯하여<sup>18-21)</sup> 뇌허혈이나 뇌졸중 등과 같은 신경질환의 병인으로 밝혀지고 있다.<sup>22-24)</sup>

이에 저자는 荊防地黃湯이 실험 및 임상적인 면에서 두뇌 관련 질환치료에 효과를 나타내는 점에 착안하여, 그 효능을 실험적으로 규명하기 위하여, 뇌신경조직에 대한 산소자유기의 산화적 손상기전을 방어하는 작용 즉 항산화작용이 있는지 알아보기로 하였다.

본 실험에서는 산소자유기를 유발하기 위하여 glucose oxidase(GO)를 培養한 海馬神經細胞에 처리한 후 세포독성을 MTT 정량, NR 정량 측면에서 조사하였으며, 荊防地黃湯의 방어효과를 관찰하기 위하여 荊防地黃湯 전탕액을 培養 海馬神經細胞에 전처리한 후 Lipid peroxidation정량, Neurofilament enzymeimmuno assay정량, protein kinase C(PKC)활성도 측정을 통하여 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)량의 변화와 신경세포량의 변화, 그리고 PKC활성도의 변화 측면에서 측정을 하였는 바, 유의한 결과를 관찰하였기에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 약재

#### 1) 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 임신 14-16일의 250-300g의 Spruge-Dawley종의 건강상태가 양호한 생쥐를 사용하였다.

#### 2) 약재

본 실험에서 사용된 荊防地黃湯은 圓光大學 校 韓醫科大學 韓方病院에서 구입한 후 엄선하여 사용하였으며 1첩의 처방내용은 다음과 같다.

#### *Prescription of HJT*

Herbal Name	Scientific Name	Weight(g)
熟地黃	Radix Rehmanniae Preparata	8
山茱萸	Fructus Corni	8
白茯苓	Poria Cocos	8
澤瀉	Rhizoma Alismatis	8
卓前子	Semen Plantaginis	4
羌活	Rhizoma Seu Radix Notopterygii	4
獨活	Radix Aralia Cordatae	4
荊芥	Herba Schizonepetae	4
防風	Radix Saposhnikoviae	4
Total Weight(g)		52

### 2. 실험방법

#### 1) 검액의 조제

荊防地黃湯 2첩 분량인 104g을 각각 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 14.85g의 분말 시료를 얻었다.

#### 2) 약제 제조

본 실험에 사용한 시약으로 Glucose Oxidase (GO, Sigma)는 1M, 100mM, 10mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

#### 3) 세포배양

임신 14-16일의 Spruge-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°C수조에서 20분간 배양한 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 현미경 하에서 hemacytometer를 이용하여 세포의 수를 측정한 다음  $10^4$ - $10^5$ 개의 세포수를 B-27, 25μM glutamine, 25μM 2-mercaptoethanol이 첨가된 Neurobasal media(Boehringer Mannheim, Germany)에 4일간 배양 후 glutamate가 없는 배지로 1/2 교환하고 2주간 배양하여 신경세포가 성숙한 다음 실험에 사용하였다.

#### 4) GO의 처리

산소자유기가 생쥐의 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 척수운동신경세포를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 후 glucose oxidase(GO)를 여러 농도로 조합하여 혼합한 다음 이들 각각의 배양액에서 처리한 후 분석하였다.

#### 5) 세포독성 및 방어효과 검정

##### (1) MTT 정량

MTT <3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma)> 정량은 Mosmann<sup>25)</sup>의 방법에 의하였다. GO를 처리한 배양 신경세포를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료후 dimethylsulfoxide (DMSO,

Merk)를 처리한 다음 ELISA Reader(Molecular Device, USA)로 570nm에서 흡광도를 측정후 대조군과 비교 조사하였다.

#### (2) NR 정량

Neutral red(NR, Sigma)의 정량은 Borenfreud와 Puermer<sup>26)</sup>의 방법에 따랐다. 즉 여러 농도의 GO를 처리한 배양 신경세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 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 배양하였다. 배양 완료후 PBS로 3회 세척후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 ELISA Reader(Molecular Device, USA)로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

#### (3) Lipid peroxidation 정량

GO 및 한약추출물을 여러 농도로 처리한 후 Lipid peroxidation의 측정은 일정시간 동안 처리한 海馬神經細胞의 상층액과 세포용해액 내의 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)를 측정한 것으로, 위의 액에 12N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0ml와 0.3ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응완료 후 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)를 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) Neurofilament enzymeimmuno assay(EIA)

배양중인 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 0.02% hydrogen peroxide로 처리한 다음 ELISA Reader로 490nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

#### (5) PKC 활성 측정

PKC의 정량 측정은 GO나 한약재를 일정시간 동안 처리한 신경세포를 Hu<sup>27)</sup>등의 방법에 따라 시행하였다. 즉 Tris-HCl 완충액(50mM)과 합성 peptide를 포함한 반응액에 효소를 가하여 25°C에서 15분간 반응시킨 다음 50 ul를 취하여 P81종이에 옮겨 건조시켰다. 건조가 완료된 후 75mM 인산용액으로 세척한 다음 섬광계수기에 의하여 측정하였다.

#### 6) 통계 처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA 후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

### III. 실험 성적

#### 1. 산소자유기의 독성효과

##### 1) 세포생존을 분석

##### (1) MTT 정량

GO가 배양 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 glucose oxydase(GO)가 5mU/ml에서 60mU/ml까지의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 5시간 동안 배양한 후 GO의 독성효과를 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 5mU/ml GO 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 75.3%로 나타났으며 15mU/ml의 처리에서는 63.3%로 나타났다. 그러나 30, 60mU/ml GO를 처리한 경우 세포 생존율은 각각 48.7%(p<0.05)와 31.6%(p<0.01)로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났다 (Table 1, Fig. 1).

GO가 시간에 따라 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30mU/ml GO가 포함된 배양액에서 海馬神經細胞를 각각 1~7시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 특히 5시간, 7시간에서는 각각

50.5%( $p<0.05$ ), 40.2%( $p<0.05$ )로 나타나 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Table 2, Fig.2).

Table. 1. Dose-dependency of glucose oxidase (GO) in cultured hippocampal cells

GO(mU/ml)	MTT absorbance (570nm)	Decrease rate of cell viability (% of control)
0	1.58±0.18	-
5	1.19±0.15	24.7
15	1.00±0.09	36.7
30	0.77±0.04*	51.3
60	0.50±0.02**	68.4

Cultured hippocampal cells were treated with various concentrations of GO for 5 hours. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

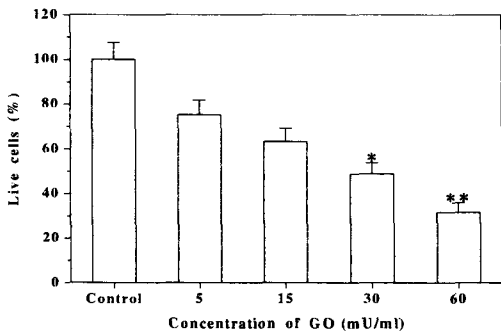


Fig. 1. Dose-dependency of glucose oxidase(GO) in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 1. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

Table 2. Time-response relationship of glucose oxidase(GO) in cultured hippocampal cells

GO(mU/ml)	MTT absorbance (570nm)				
	0 hr	1 hr	3 hr	5 hr	7 hr
0	1.47±0.17	1.43±0.15	1.42±0.13	1.38±0.16	1.36±0.12
30	1.29±0.14	1.12±0.11	1.01±0.09	0.74±0.06*	0.58±0.04**

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

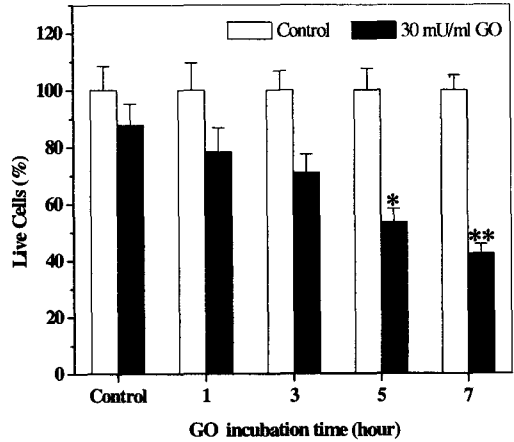


Fig. 2. Time-response relationship of glucose oxidase(GO) in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 2. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

## (2) NR 정량

GO가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 GO가 10mU/ml에서 80mU/ml까지의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 5시간 동안 배양한 후 GO의 독성효과를 NR assay법에 의하여 조사한 결과 10mU/ml GO 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 76.7%로 나타났으며 20mU/ml의 처리에서는 57.7%로 나타났다. 그러나 40, 80mU/ml GO를 처리한 경우 세포 생존율은 각각 51.5%( $p<0.05$ )와 25.8%( $p<0.01$ )로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났다.(Table 3, Fig. 3)

GO가 시간에 따라 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 40mU/ml GO가 포함된 배양액에서 海馬神經細胞를 각각 1~7시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 NR assay법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 특히 5시간( $p<0.05$ ), 7시간( $p<0.01$ )에서는 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다 (Table 4, Fig. 4).

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

GO(mU/ml)	NR absorbance (540nm)	Decrease rate of cell viability (% of control)
0	1.63±0.14	-
10	1.25±0.11	23.3
20	0.94±0.07	42.3
40	0.84±0.06*	48.5
80	0.42±0.01**	74.2

Cultured hippocampal cells were grown in media containig various concentrations of GO 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

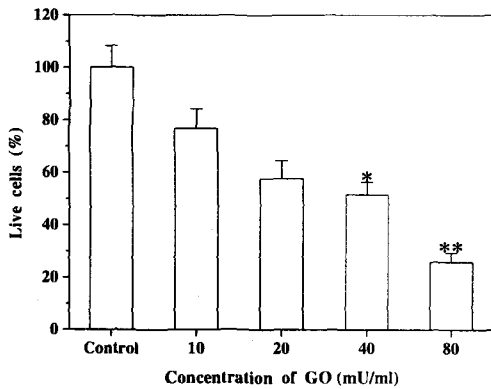


Fig. 3. Dose-response relationship of glucose oxidase (GO) in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 3. \*p<0.05; \*\*p<0.01

Table 4. Time-response relationship of glucose oxidase (GO) by NR assay in cultured hippocampal cells

GO(mU/ml)	NR absorbance (540nm)				
	0 hr	1 hr	3 hr	5 hr	7 hr
0	1.72±0.17	1.70±0.14	1.68±0.16	1.65±0.15	1.60±0.13
40	1.52±0.14	1.39±0.11	1.15±0.10	0.87±0.06*	0.53±0.04**

Cultured hippocampal cells were incubated with 40mU/ml GO 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

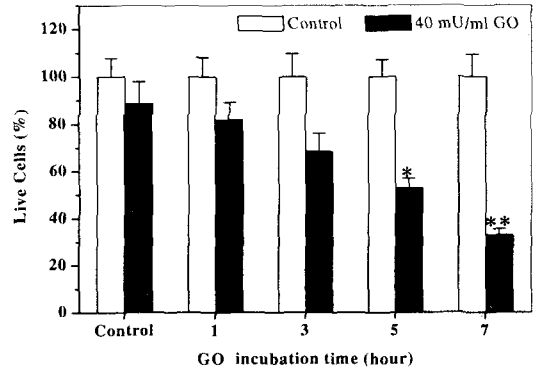


Fig. 4. Time-dependancy of glucose oxidase(GO) in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 4. \*p<0.05; \*\*p<0.01

## 2. 荊防地黃湯 추출물의 효과

### 1) Lipid peroxidation 정량

#### (1) GO의 영향

GO가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 lipid peroxidation의 양적변화 측면에서 조사하기 위하여 GO가 1mU/ml-30mU/ml의 농도까지 5시간 동안 처리한 후 lipid peroxidation의 양을 TBARS assay를 이용하여 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 TBARS의 양이 증가하였으며 특히 20mU/ml, 30mU/ml의 농도에서는 대조군(100%)에 비하여 각각 146%(p<0.05), 171.5%(p<0.01)로 유의하게 증가하였다(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Dose-response relationship of glucose oxidase(GO) on lipid peroxidation in cultured hippocampal cells

GO(mU/ml)	TBARS(pmol/10 <sup>6</sup> cells)	Increase rate of TBARS (% of control)
0	38.6±5.2	-
1	48.4±6.4	25.4
10	51.2±4.8	32.6
20	56.7±7.2*	46.9
30	66.2±8.3**	71.5

Cultured hippocampal cells were exposed to various concentrations of GO for 5 hours. Thiobarbituric acid(TBA) fluorometric assay was adopted to analyse lipid peroxidation and TBA reactive substance(TBARS) were represent as pmol/10<sup>6</sup> 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

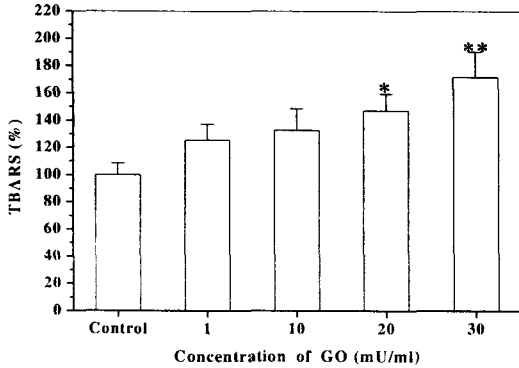


Fig. 5. Dose-response relationship of glucose oxidase(GO) on lipid peroxidation in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 5. Significant differences from the control are marked with asterisks \*p<0.05; \*\*p<0.01

(2) 荊防地黃湯의 방어효과

GO에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 HJT의 효과를 세포생존율의 측면에서 조사하기 위하여 20mU/ml GO의 농도에서 培養 海馬神經細胞를 5시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10~100µg/ml HJT가 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 TBARS assay법으로 조사하였다. 10µg/ml, 40µg/ml, 70µg/ml HJT를 처리한 경우 TBARS의 양은 HJT를 처리하지 않은 대조군(100%)에 비하여 각각 175.3%, 169.7%, 161.4%로 나타나 GO를 단독 처리한 군 186.4%에 비하여 TBARS의 양을 감소시키는 것으로 나타났다. 특히 100µg/ml의 농도에서는 143.6%로(p<0.01) 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Table 6, Fig. 6).

Table 6. Dose-response relationship of Hyungbangjihwangtang (HJT) for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in lipid peroxidation

GO(mU/ml)	TBARS(pmol/10 <sup>6</sup> cells)				
	concentration of HJT (µg/ml)				
	0	10	40	70	100
0	42.6±5.6	41.3±3.8	40.6±4.2	38.3±4.5	37.6±2.4
20	79.4±2	72.4±6.4	68.9±7.6	61.8±5.9	54.0±4.3**

Cultured hippocampal cells were treated with 10, 40, 70 and 100 µg/ml HJT respectively. Cultures were preincubated with HJT for 3 hours and then cultures were exposed to 20mU/ml GO for 5 hours. TBA reactive substance(TBARS) were represent as pmol/10<sup>6</sup> cells. Significant differences from the control are marked with asterisks \*p<0.05; \*\*p<0.01

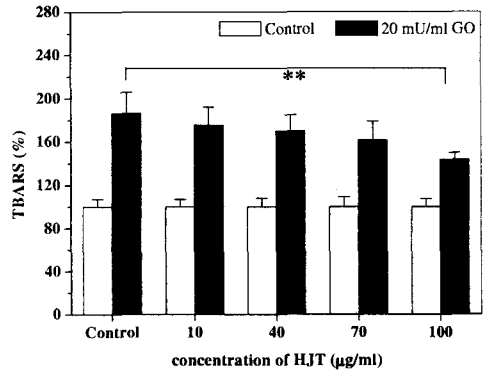


Fig. 6. Dose-response relationship of Hyungbangjihwangtang (HJT) for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in lipid peroxidation Other legends are same as the Table 6. Significant differences from the control are marked with asterisks \*\*p<0.01

2) Neurofilament(신경세사) 정량

(1) GO의 영향

GO가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 신경세사(neurofilament)의 양적변화 측면에서 조사하기 위하여 GO가 1mU/ml-50mU/ml의 농

도까지 5시간 동안 처리한 후 신경세사의 양을 neurofilament enzymeimmuno assay를 이용하여 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 세포의 신경세사의 양이 감소하였으며 특히 25mU/ml, 50mU/ml의 농도에서는 대조군에 비하여 각각 54.0%( $p < 0.05$ )와 32.8% ( $p < 0.01$ )로 유의하게 감소하였다(Table 7, Fig. 7).

Table 7. Dose-response relationship of glucose oxidase(GO) by neurofilament enzymeimmuno assay(EIA) in cultured hippocampal cells

GO (mU/ml)	EI absorbance (490nm)	Decrease rate of Neurofilament (% of control)
0	1.74±0.14	-
1	1.32±0.12	24.1
15	1.10±0.09	36.8
25	0.94±0.06*	46.0
50	0.57±0.04**	67.2

Cultured hippocampal cells were exposed to various concentrations of GO for 5 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. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

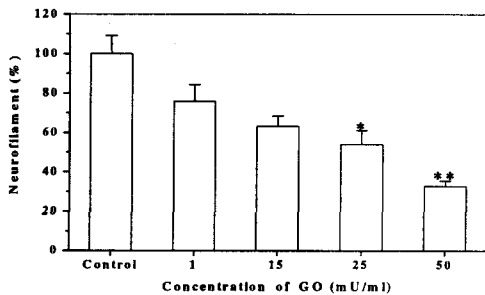
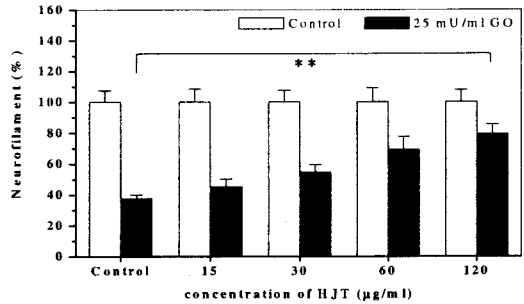


Fig. 7. Dose-dependency of glucose oxidase(GO) in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 7. Significant differences between groups are marked with asterisks \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

(2) 荊防地黃湯(HJT)의 방어효과

GO에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 HJT의 효과를 신경세사(neurofilament)의 양적변화 측면에서 조사하기 위하여 25mU/ml



GO의 농도에서 培養 海馬神經細胞를 5시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15~120µg/ml HJT가 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후의 방어효과를 neurofilament enzymeimmuno assay를 이용하여 조사하였다. 15µg/ml, 30µg/ml, 60µg/ml HJT를 처리한 경우 신경세사의 양은 HJT를 처리하지 않은 대조군(100%)에 비하여 각각 45.3%, 54.7%, 69.4%로 나타나 GO를 단독 처리한 군 37.6%에 비하여 신경세사의 양을 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 120µg/ml의 농도에서는 79.5%( $p < 0.01$ ) 유의한 증가를 나타냈다(Table 8, Fig. 8).

Table 8. Dose-response relationship of Hyungbangjihwangtang (HJT) for their neuroprotective effect on glucose oxydase(GO) in neurofilament

GO(mU/ml)	EI absorbance (490nm)				
	concentration of HJT (µg/ml)				
	0	15	30	60	120
0	1.86±0.17	1.89±0.14	1.92±0.17	1.93±0.16	1.95±0.18
25	0.70±0.06	0.78±0.08	1.05±0.09	1.34±0.11	1.55±0.14**

Cultured hippocampal cells were preincubated with HJT for 3 hours respectively. After then cultures were exposed to 25mU/ml GO for 5 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values are the mean±SE for 6 experiments. \* :significantly different from the value of control group. \*\* $p < 0.01$

Fig. 8. Dose-response relationship of Hyungbangjihwangtang (HJT) for their neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in neurofilament. Other legends are the same as Table 8. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*\* $p < 0.01$



### 3) PKC 활성화 정도

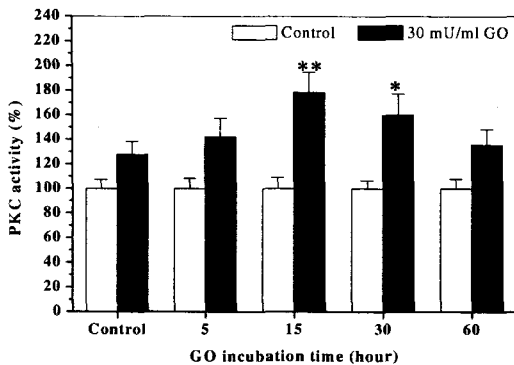
#### (1) GO의 영향

GO가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 PKC 활성화 측면에서 조사하기 위하여 30mU/ml GO를 5분, 15분, 30분, 60분동안 처리한 후 PKC의 활성도를 측정하였다. 그 결과 GO를 15분 동안 처리한 군에서 PKC 활성화도가 대조군에 비하여 178.3%( $p<0.01$ )로 증가하였으며 그 이후에는 서서히 감소하였다(Table 9, Fig. 9).

Table 9. Time-response relationship of glucose oxidase(GO) on PKC activity in cultured hippocampal cells

GO(mU/ml)	PKC activity ( $\times 10^4$ )				
	0 min	5 min	15 min	30 min	60 min
0	0.18±0.07	0.19±0.05	0.23±0.06	0.25±0.08	0.28±0.04
30	0.23±0.05	0.27±0.03	0.41±0.08**	0.40±0.07*	0.38±0.09

Cultured hippocampal cells were incubated for various time intervals with 30mU/ml GO. PKC activity were measured as material and method. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked



with asterisks. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

Fig. 9. Time-response relationship of glucose oxidase(GO) on PKC activity in cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 9. Significant differences from the control are marked with asterisks. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

#### (2) 荊防地黃湯(HJT) 추출물의 방어효과

GO에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 HJT의 방어효과를 PKC 활성화 측면에서 조사하기 위하여 30mU/ml GO의 농도에서 培養 海馬神經細胞를 15분 동안 노출시키기 3시간 전에 60~150 $\mu$ g/ml HJT가 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 60 $\mu$ g/ml, 90 $\mu$ g/ml, 120 $\mu$ g/ml HJT를 처리한 경우 PKC 활성화도는 HJT를 처리하지 않은 대조군(100%)에 비하여 각각 164.3%, 153.3%, 146.2%로 나타나 GO를 단독 처리한 군 168.0%에 비하여 PKC 활성도를 감소시키는 것으로 나타났다. 특히 150 $\mu$ g/ml의 농도에서는 136.4%( $p<0.01$ ) 유의한 감소를 나타냈다(Table 10, Fig. 10).

Table 10. Effects of Hyungbangjihwangtang(HJT) for its neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in PKC activity on cultured hippocampal cells.

GO(mU/ml)	PKC activity ( $\times 10^4$ )				
	concentration of HJT ( $\mu$ g/ml)				
	0	60	90	120	150
0	0.16±0.07	0.14±0.05	0.15±0.03	0.13±0.04	0.11±0.01
30	0.27±0.08	0.23±0.04	0.23±0.06	0.19±0.05	0.15±0.03*

Cultured hippocampal cells were preincubated with 60-150 $\mu$ g/ml concentrations of HJT before exposed to 30mU/ml GO for 15 mins. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. \* $p<0.05$

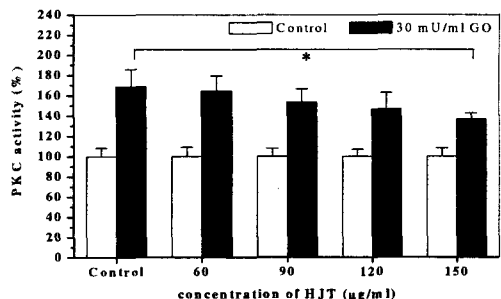


Fig. 10. Effects of Hyungbangjihwangtang(HJT) for its neuroprotective effect on glucose oxidase (GO) in PKC activity on cultured hippocampal cells. Other legends are same as the Table 10. Significant differences from the control are marked with asterisks. \* < 0.05

### IV. 고 찰

荊防地黃湯은 李濟馬의 『東醫壽世保元』<sup>6)</sup> 「少陽人 新定方」에 처음 소개된 처방으로 脾受寒表寒病에서 亡陰證 身寒腹痛泄瀉에 사용되었으며,<sup>7-8)</sup> 六味地黃湯에 荊防敗毒散의 主材를 가한 처방으로 六味에서 太陰人 肺藥인 山藥과 少陽人 裏病證에 해당하는 食滯 痞滿과 血證에 사용하는 牡丹皮를 빼고, 羌活, 獨活, 荊芥, 防風, 車前子를 가하여 陰氣를 下降시키는 表病證의 의미를 강조한 處方이다.<sup>28)</sup> 藥物構成을 보면 熟地黃, 山茱萸, 白茯苓, 澤瀉 各 二錢 車前子, 羌活, 獨活, 荊芥, 防風 各 一錢으로 구성되어 있으며, 荊芥, 防風, 羌活, 獨活은 모두 補陰藥이며, 荊芥, 防風은 大清胸膈散風하고, 羌活, 獨活은 大補膀胱眞陰한다고 하였다.<sup>29)</sup> 『東醫壽世保元』<sup>6)</sup>에서는 ‘身寒腹痛泄瀉者 當用 滑石苦參湯 荊防地黃湯 此病 名謂 亡陰證’이라 하였으며, 少陽人 17歲 女兒의 治驗例에서 ‘頭痛, 寒熱, 食滯, 腹痛, 泄瀉不止, 引飲不眠, 間有譫語證, 變爲發狂, 口齒冰片, 不省人事 爻象’에 사용하였고, 後世 醫家들의 應用을 보면 中風, 口眼喎斜, 癱瘓, 虛勞, 咳嗽, 黃疸, 健忘, 痴呆, 癲癇狂, 不眠, 頭痛, 眼病, 交腸 등 腦血管系 疾患에 多用하였음을 알 수 있다.<sup>9-12,29)</sup>

荊防地黃湯에 대한 실험적 연구로서 김<sup>12)</sup>은 鎮痛, 抗痙攣, 抗瀉下 등에 대한 연구를, 홍<sup>13)</sup>은 항스트레스 효과에 대한 연구를, 장<sup>14)</sup>은 면역반응의 증강에 대한 연구를, 이<sup>15)</sup>는 荊防地黃湯이 흰쥐의 Morris 수중미로학습과 기억에 미치는 영향에 관한 연구를 보고한 바 있으나, 아직 산소자유기와 관련된 연구는 부족하

였다.

산소자유기는 생체내의 여러가지 병태생리학적인 반응에 관여하고 있으며 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시킨다.<sup>16,17)</sup> 또한, 세포막의 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐 만 아니라 질소자유기의 하나인 Nitric Oxide(NO)와 상호 작용함으로써 독성이 강한 Peroxynitrite를 생성하여 병변을 더욱 가속화 시킨다고 한다. 그리고, 培養 海馬神經細胞에서 흥분성 아미노산(EAAs)을 분비케 유도한다는 것이 밝혀졌으며 분비된 흥분성 아미노산(EAAs)은 N-methyl-D aspartase (NMDA) 수용체를 과활성화시킴으로서 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 항상성을 깨뜨리며 그 결과 신경세포를 손상시킬 뿐만 아니라 나아가서는 세포의 사멸을 초래한다고 한다.<sup>22,30-32)</sup> 그 밖에도 산소자유기는 protein kinase C(PKC)나 cyclic AMP와 같은 이차전달자에 영향을 미침으로서 세포독성을 초래한다고 한다.

산소자유기가 중추나 말초신경계를 구성하고 있는 신경세포에 산화적 손상을 유발함으로써 노인성 치매나 파킨슨씨병을 비롯하여<sup>18-21)</sup> 뇌허혈이나 다발성경화증의 병인으로 밝혀지면서 산소자유기의 신경독성에 대한 병리적 기전규명<sup>22,33-34)</sup>과 산화적 손상에 대한 신경병변의 치료적 방법에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있고, 최근에는 한방의 각종 처방들이 가지는 생화학적, 약리학적 작용을 구명하기 위한 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 아울러 산소자유기의 산화적 손상에 대하여 한약제의 추출물이나 동물에서 정제한 천연추출물들이 강력한 항산화작용을 나타낸다는 실험 결과들이 보고되고 있으나, 荊防地黃湯과 산소자유기에 대한 연구는 아직 부족하다.

이에 저자는 荊防地黃湯이 實驗 및 臨床의인 면에서 두뇌 관련 질환치료에 효과를 나타내는 점에 착안하여, 그 효능을 실험적으로 규명하기 위하여, 뇌신경조직에 대한 산소자유기의 산화적 손상기전을 방어하는 작용 즉 항산화작용이 있는지 실험하여 아래와 같은

결과를 얻었다.

산소자유기의 신경독성을 조사하기 위하여 본 실험에서는 순수분리 배양한 생쥐의 海馬神經細胞에 여러 농도의 GO에 노출시킨 후 MTT assay와 NR assay법을 시행한 결과 GO를 배양 신경세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 대조군에 비하여 세포생존율의 유의한 감소를 보였다. 특히, MTT assay에 있어서 30, 60mU/ml GO를 처리한 경우에서 세포 생존율은 각각 48.7%( $p < 0.05$ )와 31.6%( $p < 0.01$ )로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났고(Table 1, Fig. 1), 30mU/ml GO의 세포생존율 분석에서는 대조군과 비교하여 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며, 특히 5시간, 7시간에서는 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Table 2, Fig. 2).

GO의 독성을 NR assay법에 의하여 조사한 결과는 40, 80mU/ml GO를 처리한 경우 세포 생존율은 각각 51.5%( $p < 0.05$ )와 25.8%( $p < 0.01$ )로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났으며(Table 3, Fig. 3), 40mU/ml GO 처리후 대조군과 비교 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며, 특히 5시간( $p < 0.05$ ), 7시간( $p < 0.01$ )에서는 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Table 4, Fig. 4). 본 실험의 이 같은 결과는 GO가 海馬神經細胞에 독성을 가지고 있음을 말하는 것으로, 이는 산소자유기에 의하여 신경세포가 손상되었다는 연구결과와 일치하였다. 따라서 이 같은 연구결과들은 산소자유기의 산화적 손상이 신경독성에 관여하고 있음을 말해 주고 있다.

GO가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 lipid peroxidation의 양적변화 측면을 TBARS assay를 이용하여 조사한 결과에서도 처리한 농도에 비례하여 뚜렷한 TBARS 양의 증가를 보였다(Table 5, Fig. 5). 한편, GO에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 荊防地黃湯(HJT)의 방어효과를 TBARS assay법으로 조사한 결과, HJT를 전처리한 농도에 비례하여 TBARS의 양을 감소시키는

것으로 나타났다(Table 6, Fig. 6).

GO가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 neurofilament의 양적변화를 neurofilament enzymeimmuno assay를 이용하여 분석한 결과, 농도에 비례하여 세포의 신경세사의 양이 감소하였으며, 특히 25mU/ml, 50mU/ml의 농도에서는 대조군에 비하여 각각 54.0%( $p < 0.05$ )와 32.8%( $p < 0.01$ )로 유의하게 감소하였고(Table 7, Fig. 7), GO에 의하여 손상된 培養 海馬神經細胞에 대한 荊防地黃湯(HJT)의 방어효과는 HJT를 전처리한 농도에 비례하여 신경세사의 양이 증가하여 방어효과를 나타냈다. 특히 120 $\mu$ g/ml의 농도에서 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다(Table 8, Fig. 8).

뇌허혈이나 저산소시 산소자유기에 의한 세포고사의 기전으로, 산소자유기는 phosphoinositide-specific phospholipase C(PI-PLC)를 활성화시키고 이러한 결과로 생성된 diacylglycerol(DAG)이 calcium-phospholipid dependent PKC를 활성화시킨다고 밝혀져 있다.<sup>36,37)</sup>

GO가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 PKC 활성도를 이용하여 조사한 결과에서도 30mU/ml GO를 15분 동안 처리한 군에서 PKC 활성도가 증가하였다(Table 9, Fig. 9). 한편, GO에 의하여 증가한 PKC 활성도에 대하여 荊防地黃湯(HJT)의 방어효과를 조사한 결과, HJT를 전처리한 농도에 비례하여 PKC 활성도를 감소시키는 것으로 나타났다(Table 10, Fig. 10).

이와 같은 실험 결과를 종합해보면, GO와 같은 산소자유기는 산화적 손상에 의해 세포 생존율을 감소시키고 신경세포에 대하여 독성을 나타내며, 이에 대한 荊防地黃湯 전처리하는 大脳海馬神經細胞에서 neurofilament의 양적 증가와 lipid peroxidation의 감소를 보여주었으며 이는 GO에 의한 PKC 활성도의 증가 억제 효과일 것으로 추정된다. 앞으로 이에 대한 심도 있는 기전연구가 필요하리라 사료된다.

## V. 결 론

신생 생쥐에서 분리 배양한 海馬神經細胞에 대한 glucose oxidase(GO)의 산화적 손상에 의한 독성을 규명하고 이 독성에 대한 荊防地黃湯 추출액의 방어효과를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 산소자유기인 GO는 MTT assay와 NR assay에서 培養 海馬神經細胞에 독성을 나타내어 세포생존율을 감소시켰다.

2. 荊防地黃湯(HJT)은 GO에 의해 손상된 培養 海馬神經細胞에 대해 지질과산화반응(lipid peroxidation)에 유의성 있는 억제를 보였다.

3. 荊防地黃湯(HJT)은 GO에 의해 손상된 培養 海馬神經細胞에 대해 신경세포사를 유의성 있게 증가시켰다.

4. 荊防地黃湯(HJT)은 GO에 의해 증가한 PKC 활성도를 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 실험결과로 荊防地黃湯은 培養 海馬神經細胞에 대해 GO와 같은 산소자유기의 산화적 손상에 대한 방어작용이 있으며 앞으로 심도있는 기전연구와 임상적인 연구가 보완되어져야 할 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

1. 楊維傑: 黃帝內經譯解(영추), 서울, 정보사, p.104, 281, 1980
2. 김현제, 홍원식: 한의학사전, 서울, 정보사, p. 113, 1983.
3. 楊維傑: 黃帝內經譯解(소문), 서울, 정보사, p.94, 100, 1980.
4. 金完熙, 崔達永: 장부변증논치, 서울, 정보사, pp. 47-48, 443-444, 1988.
5. 전국 한의과대학 사상의학교실 : 四象醫學, 서울, 집문당, pp.102, 100-105,

- 107-108, 157-158, 159-160, 191-216, 342-353, 465-477, 538, 561 1997.
6. 이제마: 동의수세보원(초판본), 서울, 대성문화사, 卷之一 pp.5, 15, 卷之四 pp.15, 29, 33, 1997
7. 김주 : 사상의학성리임상론, p. 236, 서울, 대성출판사, 1997.
8. 윤길영: 사상체질의학론, p.69, 390, 서울, 송일출판사, 1986.
9. 이도경: 사상요람, 원불교출판사, pp.152 1995.
10. 朴爽彦: 동의사상대전, p. 280, 서울, 의도한국사, 1977.
11. 홍순용·이을호: 사상의학원론, 서울, 행림출판사, pp.79-82, 256, 305, 344-345, 349-350, 1973.
12. 김달래: 소양인 荊防地黃湯에 관한 실험적 연구, 서울, 경희대학교 대학원, 1988.
13. 홍영옥 : 荊防地黃湯의 항스트레스 효과에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원, 1992
14. 장현진 : 소양인 荊防地黃湯, 십이미지향탕, 소음인 보중익기탕, 십전대보탕의 면역반응에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원, 1994
15. 이재혁 : 荊防地黃湯이 흰쥐의 Morris 수중 미로 학습과 기억에 미치는 영향, 서울, 경희대학교 대학원, 1997
16. 姜益鉉 : 天麻鉤藤飲이 뇌조직의 생화학적 변화에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1996.
17. 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
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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
22. 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.
23. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. J. Neurochem., 59:1609-1623, 1992.
24. Vannucci R C, Vasta F, Vanucci S J : Cerebral metabolic response of hyperglycemic immature rats to hypoxia-ischemia. Pediatr. Res. 21:524-529, 1987.
25. Mosmann T., : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods, 65:55-63, 1983.
26. 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
27. Hu K. Q., Backer J. M., Sahagian G., Feener E. P., King G. L. : Modulation of the insulin factor II/mannose 6-phosphate receptor in microvascular endothelial cells by phobol ester via protein kinase C. J. Biol. Chem. 265:13864-13872, 1990.
28. 최지숙, 김경요 : 소양인 비수환표한병론의 병증 및 약리에 대한 연구. 사상체질 의학회지 1998;10(2): 61-110
29. 류주열: 동의사상의학강좌, pp. 517-524, 서울, 대성문화사, 1998.
30. Hall, E. and Braughler. J. M. : Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. CNS Trauma 3:281-294, 1986.
31. 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.
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. 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, 1996.32.
34. 김달래 : 태음인 淸心蓮子湯과 청폐사간탕의 면역반응과 항알러지 효과에 관한 실

- 험적 연구, 경희대학교 대학원, 1991.
35. 최공한 · 강형원 · 유영수: 칠복음가미방이 Glucose Oxidase에 의해 손상된 대뇌피질신경세포에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지,10(1):53-78, 1999.
36. 이소라, 오연균, 박승택 : 허혈 유도에 의해 손상된 신생쥐의 배양 대뇌신경세포에 대한 vitamin E와 Desferrioxamine의 보호효과. 소아과학회지 42(10): 1426-1433, 1999.
37. Lynch J. J., Ferro T. J., Blumenstock F. A., Brockenauer A. M., Malik A. M. : Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation. J. Clin. Invest. 85:1991-1998, 1990.