

發陽通陰湯이 살리실산나트륨 이독성에 대한 흰쥐 와우의 형태학적 변화에 미치는 영향

윤희성 · 김윤범 · 남혜정

경희대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Effects of Balyangtongum-Tang on Cochlear Morphologic Change Induced by Sodium Salicylate Ototoxicity

Hui-sung Yoon · Yoon-bum Kim · Hae-jeong Nam

Background and Objectives : Despite of high prevalence, Tinnitus remains obscure because the cause and mechanism is poorly understood. In the absence of a suitable animal model, past investigations took place in humans. Recently, the animal model with sodium salicylate ototoxicity is broadly used because of its reversibility.

Balyangtongum-Tang had been used clinically to treat tinnitus and other hearing problems. We investigated the effects of Balyangtongum-Tang on cochlear morphologic change induced by sodium salicylate ototoxicity and were to find out its therapeutic effects on ototoxicity in rat model.

Materials and Methods : Healthy ten Sprague-Dawley rats were divided into normal(2), control(4) and sample(4) groups. The sample group was given extract of Balyangtongum - Tang(1cc/100g) once a day for 4 days. After 3 hours when last medication were given, the sample and control groups were injected intraperitoneally with sodium salicylate(500mg/kg). We observed the cochlear morphologic changes of rats every 1, 2, 3 and 5 hours after injection.

Results : The electron microscopic finding of outer hair cell shows some changes in the cuticular plate and cytoplasm. Some vacuoles were found in the control and sample groups. Vacuolization in the cuticular plate and cytoplasm of the sample group after 3, 5 hours were similar to the control group. But the cuticular plate of the sample group after 1, 2 hours did not form vacuole. On the other hand the control group after 1, 2 hours formed vacuoles in the cuticular plate. Light microscopic findings of cochlear duct in control and sample groups didn't find any difference.

Conclusion : The results suggest that extract of Balyangtongum-Tang reduces the morphologic changes induced by sodium salicylate ototoxicity and the effects are remarkable in first 2 hours. However the effective times are different with previous studies, it seems to be due to the difference of tolerance and sensitivity of laboratory animals.

Key words : Salicylate ototoxicity, Balyangtongum-Tang, Tinnitus, Hearing problems, Morphologic change, Tinnitus animal model

교신저자: 김윤범, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원
한방병원 3348호 안이비인후피부과 의사실
(Tel: 02-958-9181, E-mail: kyb6838@hanafos.com)

서론

이명 난청질환은 높은 유병률에도 불구하고, 그 기전이 명확히 밝혀져 있지 않아서 치료제 개발을 위한 다양한 동물모델이 연구되어 왔다^{1,2,3,4}. 살리실산나트륨에 의한 이독성 효과는 일정시간이 지나면 회복되는 가역적인 청력 손실의 특징을 갖는다는 점에서 이명 난청질환 동물모델 연구에 많이 이용되었다⁵. 최근까지도 살리실산나트륨의 이독성 기전에 관한 다양한 연구들이 수행되어 왔지만, 아직 정확한 기전은 발견할 수 없었고, 다만 일시적인 미세구조의 변화 및 혈류감소 등의 생리화학적 변화가 중요한 역할을 할 것으로 추측된다⁶.

이명 난청 질환의 치료효과 검증을 위한 동물모델 연구는 동물행동모델 연구³, NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor를 이용한 연구⁷, sodium salicylate⁸⁻¹³, cisplatin^{15,16}, kanamycin¹⁷, gentamicin^{18,19} 등의 약물로 이독성을 유발한 후 효과를 검증하는 연구 등이 있었다. 동물모델의 치료 효과 검정을 위해서 은행잎 추출물^{8,9}, Saponin²⁰, Leukotriene Inhibitor¹⁰, Allopurinol¹¹, Corticosteroid¹², Nimodipine^{13,14}, Osmotic drugs³⁰ 등의 약물이 사용되었다. 그러나 한의학적인 관점에서 이루어진 이명 난청 질환에 관한 실험은 하²¹ 등의 연구 외에는 이루어진 바가 없었다.

黃帝內經素問 脈解篇에서는 “陽氣者萬物盛上而躍故耳鳴”이라 하여, 耳는 腎의 竅이며 腎氣가 不足하고 精血이 缺乏되어 精氣가 上升하지 못하고 相火가 上升하여 耳內에 머물러 있게 되어 耳鳴이 발생한다고 하였다²². 發陽通陰湯은 辨證奇聞²³에 수록된 처방으로 十全大補湯에 柴胡, 白芥子, 荊芥를 加味한 의미를 가지는 처방이다. 이명 및 난청 질환 치료에 多用되는 처방으로 精血을 補하고, 息風平肝하여 少陽相火의 經氣를 소통시키는 효과가 있다.

이에 연구자는 發陽通陰湯 추출액을 경구투여한

후 살리실산나트륨으로 유발한 동물모델에서 시간에 따른 와우의 형태학적 변화를 관찰하여 發陽通陰湯 추출액이 이명 난청 질환에 미치는 효과를 검증하고자 하였다.

실험

1. 材料

1) 실험동물

실험동물은 200g 내외의 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley rat, (주) 샘타코 BIO KOREA)를 정상군 2마리, 대조군 4마리, 실험군 4마리로 나누어 사용하였다. 고형사료와 물은 제한 없이 공급하면서 12시간 낮, 12시간 밤의 생활리듬을 주었으며 실험실내에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약물

실험에 사용한 약물은 경희의료원에서 구입하였다. 처방구성은 다음과 같다.

Table 1. The Amount and Composition of Balyangtongum-Tang Extract

한약명	생약명	증량(g)
人蔘	Ginseng Radix	8.0
茯苓	Poria	12.0
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	8.0
黃芪	Astragali Radix	12.0
桂枝	Cinnamomi Ramulus	2.0
熟地黄	Rehmanniae Radix Preparat	19.0
當歸	Angelicae Sinensis Radix	8.0
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	12.0
柴胡	Bupleuri Radix	4.0
甘草	Glycyrrhizae Radix	2.0
白芥子	Sinapis Semen	8.0
荊芥	Schizonepetae Herba	8.0
Total amount		103.0

2. 方法

1) 검액의 조제

發陽通陰湯 2첩 분량 206g을 유리로 된 추출병에 넣고 물 1500cc를 첨가하여 시료가 충분히 잠기도록 하여 하루 동안 냉침한 후 환류 냉각장치에서 온도 100℃로 세 시간 동안 가열한 후 1차 전탕액을 얻었으며, 물 800cc를 다시 넣고 1차 전탕과 같이 다시 한번 시행하여 2차 전탕액을 얻었다. 1, 2차 전탕액을 혼합하여 여과한 후에 회전식 진공 플라스크에 넣고 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)에서 감압 농축한 후에 용액 80cc를 얻었다.

2) 검액의 투여

정상군과 대조군은 고행사료와 물만 공급하였고, 실험군은 시료 농축 전탕액을 1cc/100g씩 4일간 경구투여기로 매일 한 차례씩 경구 투여하였다.

3) 대조군 및 실험군 약물투입

실험군은 4일간 한약물을 매일 1회씩 투여한 후에 마지막 투여일에는 한약물 투여 후 3시간 경과한 다음 살리실산나트륨(Sigma)을 생리식염수에 녹여 500 mg/kg씩 대조군과 실험군에 복강내 주사하였다. 대조군과 실험군은 살리실산나트륨 복강내 주사 후 1시간, 2시간, 3시간, 5시간이 경과한 후에 각 1마리씩 희생시켜 와우내 구조물의 형태학적 변화를 관찰하였다.

4) 와우의 병리표본 제작 및 염색관찰

살리실산나트륨 복강내 주사 후 1시간, 2시간, 3시간, 5시간 경과된 모든 흰쥐는 zoletil로 전신마취하고 개흉하여 심장을 노출시킨 후 4% paraformaldehyde고정액(0.2M PBS, pH7.2)으로 심장을 통한 관류고정을 시행하여 와우(cochlea)를 적출하여 24시간 같은 고정액에 고정한 후 10%EDTA용액에 4주간 탈회를 시행하였다. 탈회된 조직은 적절한 크기로 삭정하고 전자현미경 관찰을 위하여 osmium

tetroxide에 후고정을 한 후 알코올로 탈수과정을 거치고 Epon 812에 포매하였다. 1 μ m두께의 광학현미경 표본을 얻어 toluidine blue 염색을 시행한 후 광학현미경으로 기저막, 코르티기관, 나선인대, 혈관선조, 라이스너막을 중심으로 대조군과 비교 관찰하였다(Fig. 16, 17, 18, 19, 20).

전자현미경을 이용한 관찰에서는 와우관의 관찰 부위를 선정된 후(Fig. 1의 화살표) 초박절편을 얻어 uranyl acetate와 lead citrate에 이중 염색한 후 세포의 핵, 세포질의 변화, 섬모의 변화를 중심으로 전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 전자현미경하에서의 변화

1) 살리실산나트륨 투여군(대조군)

살리실산나트륨을 투여한 후 1시간이 경과한 군에서의 외유모세포(outer hair cell, 이하 OHC)는 부동모가 나오는 CP 직하부에서 공포(Fig. 1의 화살표)가 관찰되었으며, 일부 이차용해소(Ly)가 관찰되었지만, 다른 세포내 기관의 손상은 관찰되지 않았으며, OHC의 핵아래 부분에서는 정상적인 형태를 나타내었다(Fig. 2). 살리실산나트륨을 투여한 후 2시간 경과군에서는 보다 큰 공포(Fig. 3의 V)가 발견되었으며, OHC의 핵아래 부분에서도 비슷한 소견이 관찰되었다(Fig. 4). 살리실산나트륨을 투여한 후 3시간 경과군도 2시간 경과군과 비슷한 소견을 보였다(Fig. 5, 6).

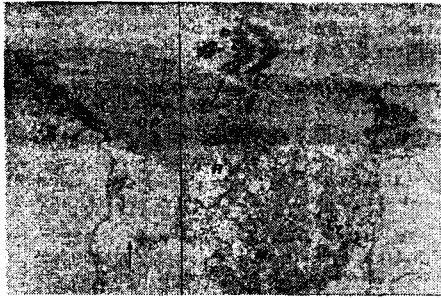


Fig. 1. The electron microscopic finding of outer hair cell in the control group after 1 hour from sodium salicylate injection. The vacuole(arrow) was found in the lower portion of cuticular plate. Few lysosome(Ly) were also observed, but other damaged subcellular organelle was not found. CP : Cuticular Plate, M : Mitochondria, R : Free ribosome.

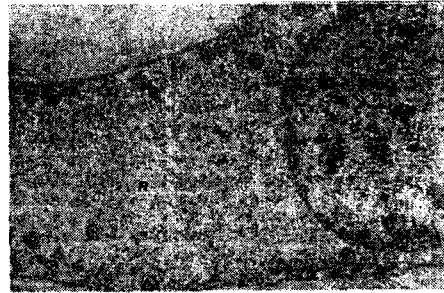


Fig. 2. The electron microscopic finding of outer hair cell in the control group after 1 hour from sodium salicylate injection. The vacuole was not found in the cytoplasm. Other subcellular organelle was normal morphology.

N : Nucleus



Fig. 3. The electron microscopic finding of outer hair cell in the control group after 2 hours from sodium salicylate injection. Some larger vacuole(V) was found in the lower portion of cuticular plate.

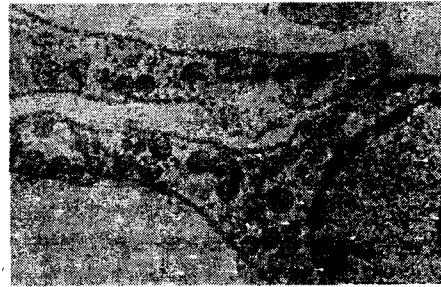


Fig. 4. The electron microscopic finding of outer hair cell in the control group after 2 hours from sodium salicylate injection. The vacuole was not found in the cytoplasm.

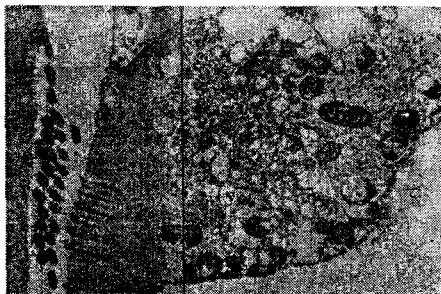


Fig. 5. The electron microscopic finding of outer hair cell in the control group after 3 hours from sodium salicylate injection. The vacuole(V) was found in the cuticular plate.

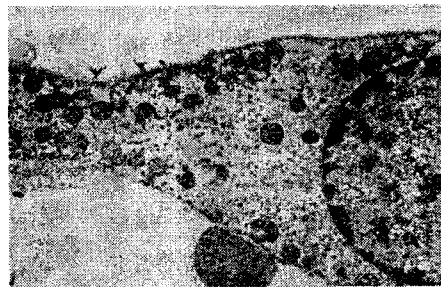


Fig. 6. The electron microscopic finding of outer hair cell in the control group after 3 hours from sodium salicylate injection. The vacuole was not found in the cytoplasm.

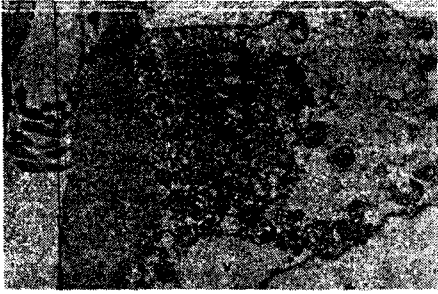


Fig. 7. The electron microscopic finding of outer hair cell in the control group after 5 hours from sodium salicylate injection. The vacuole(V) was found in the cuticular plate.

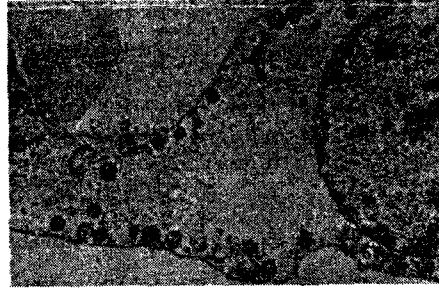


Fig. 8. The electron microscopic finding of outer hair cell in the control group after 5 hours from sodium salicylate injection. The vacuole was found in the cytoplasm.

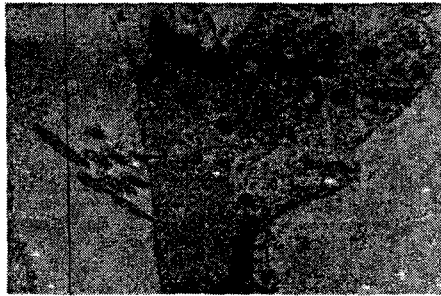


Fig. 9. The electron microscopic finding of outer hair cell in the sample group after 1 hour from sodium salicylate injection. The vacuole was not found in the cuticular plate.



Fig. 10. The electron microscopic finding of outer hair cell in the sample group after 2 hours from sodium salicylate injection. The vacuole was not found in the cuticular plate.

살리실산나트륨을 투여한 후 5시간 경과군에서는 CP에서 공포형성이 관찰되었으며(Fig. 7), OHC의 핵 아래 부분에서도 공포형성이 관찰되었다(Fig. 8).

OHC의 핵아래 부분에서도 공포 형성이 관찰되었다(Fig. 15).

2) 살리실산나트륨 및 한약 병용 투여군(실험군)

실험군에서는 1시간, 2시간 경과군에서 OHC의 CP에서는 정상적인 형태를 나타내었으며 공포 형성이 관찰되지 않았다(Fig. 9, 10). OHC의 핵아래 부분에서도 정상적인 형태를 나타내었다(Fig. 11). 실험군 3시간 경과군에서는 CP 직하부에 공포형성이 관찰되었으나(Fig. 12), OHC의 핵아래 부분에서는 정상적인 형태를 보였다(Fig. 13). 실험군 5시간 경과에서는 CP 직하부에 공포형성이 관찰되었으며(Fig. 14),



Fig. 11. The electron microscopic finding of outer hair cell in the sample group after 1 hour from sodium salicylate injection. The vacuole was not found in the cytoplasm.

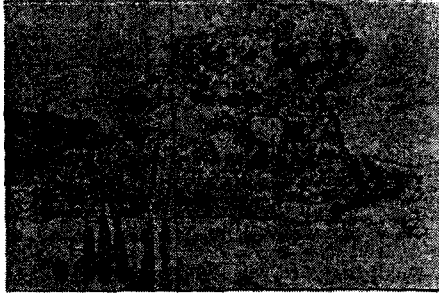


Fig. 12. The electron microscopic finding of outer hair cell in the sample group after 3 hours from sodium salicylate injection. The vacuole was found in the cuticular plate.



Fig. 13. The electron microscopic finding of outer hair cell in the sample group after 3 hours from sodium salicylate injection. The vacuole was found in the cytoplasm.

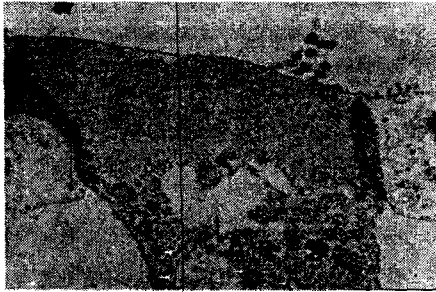


Fig. 14. The electron microscopic finding of outer hair cell in the sample group after 5 hours from sodium salicylate injection. The vacuole was found in the cuticular plate.



Fig. 15. The electron microscopic finding of outer hair cell in the sample group after 5 hours from sodium salicylate injection. The vacuole was found in the cytoplasm.

2. 광학현미경하에서의 변화

대조군의 조직소견상 와우관(cochlear duct)은 기저막(Basilar Membrane)과 전정막(Vestibular Membrane or Reissner Membrane)에 의해서 전정계(Scala Vestibule), 와우관(Scala Media), 고실계(Scala Tympani)의 세 부분으로 나누어진다. 기저막(Basilar Membrane) 상부에 덮개막(Tectorial Membrane)으로 덮여 있는 손상되지 않은 코르티기가 관찰되며, 외유모세포(outer hair cells) 및 내유모세포(inner hair cells)를 관찰할 수 있었다. 전정막(Vestibular Membrane)으로 구분되는 와우관(Scala Media)의 내측으로 내림프액(Endolymph)을 생성하는 혈관선조(Stria

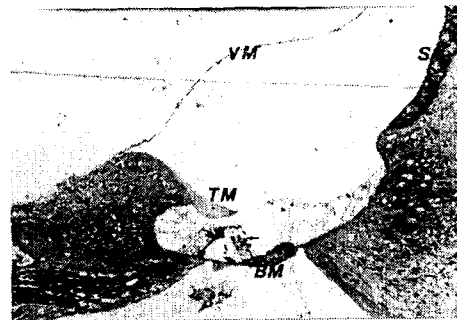


Fig. 16. Light microscopic findings of control cochlear duct. The outer hair cells and inner hair cells were seen beyond the Basilar Membrane(BM). The Tectorial Membrane(TM) covered the organ of Corti. The Vestibular Membrane(VM) was located over the Scala Media which is filled with Endolymph made from the epithelium of the Stria Vascularis(SV).



Fig. 17. Light microscopic findings of cochlear duct in the sample after 1 hour from sodium salicylate injection.



Fig. 18. Light microscopic findings of cochlear duct in the sample after 2 hours from sodium salicylate injection.

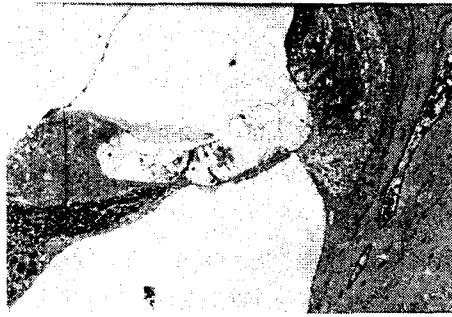


Fig. 19. Light microscopic findings of cochlear duct in the sample after 3 hours from sodium salicylate injection.

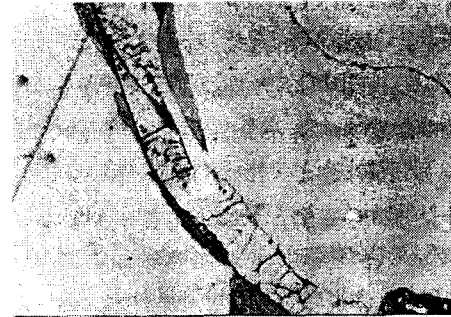


Fig. 20. Light microscopic findings of cochlear duct in the sample after 5 hours from sodium salicylate injection.

Vascularis)가 관찰되었다. 정상군, 대조군, 실험군(1시간, 2시간, 3시간, 5시간) 모두 광학현미경하에서는 형태학적인 차이점이 발견되지 않았다(Fig. 16, 17, 18, 19, 20).

고찰

전 세계 성인인구의 약 30%가 이명을 경험하고, 이중 6%는 일상생활이 불가능할 정도로 견디기 힘든 증상을 호소한다고 알려져 있으며²⁴⁾, 선천적인 난청을 제외한 난청은 인구 10만 명 당 5~20명 가량이 이환되는 것으로 보고 되었다²⁵⁾. 이명과 난청 질환은 산업의 발달, 소음의 증가, 노령화 추세, 복잡해진 생활, 과도한 스트레스, 약물남용 등으로 인

해 증가하는 추세에 있으나, 원인 및 발병기전에 대하여 정립된 학설이 없을 뿐만 아니라, 아직 만족할 만한 진단 치료법도 없는 실정이다²⁶⁾.

난청을 보이는 환자의 약 60~80%가 이명을 가지는 것으로 보고 되었으며²⁵⁻²⁷⁾, 병태생리학적 동물모델에서도 두 질환을 공통적인 것으로 간주하는 경향이 있다³⁾. 이명과 난청질환의 동물모델은 행동모델, 이독성 모델, 외상성 모델이 주로 이용된다. 행동모델은 실험동물에게 지속적으로 낮은 소음을 들려준 후, 소음이 없는 환경에 있었던 대조군과의 행동유형을 비교하는 연구이다. 이독성 모델은 와우에 독성이 있는 것으로 알려진 약제를 투여하여 동물 와우의 생리화학적 변화를 유발하는 것으로, 살리실산나트륨, cisplatin, kanamycin, gentamicin 등의 약물을 주로 이용한다. 외상성 모델은 소음에 의한 이명

난청을 재현하기 위한 것으로, 갇힌 동물에게 스피커를 통해 고강도의 소음을 방사하여 청신경의 이상을 유발한다⁴⁾. 하지만, 이명 난청의 원인 및 발생 기전이 명확히 밝혀져 있지 않아서 어떤 모델이 이상적인가에 대한 논란이 계속되고 있는 실정이다.

그 가운데에서도 살리실산나트륨 이독성 모델은 영구적인 조직병리화학적 변화를 나타내지 않으며, 일정시간이 지나면 회복되는 가역적인 이명을 동반한 청각장애를 일으킨다는 점에서 치료제의 효과를 검증하는 데에 유용한 모델로 알려져 있다^{5,29)}.

살리실산나트륨의 이독성 작용기전에 대해서는 외유모세포의 형태학적인 변화^{6,31)}, 와우혈류 감소^{32,33)}, cyclooxygenase의 활성 차단을 통한 PG합성의 억제³⁴⁾, 카테콜아민 농도의 증가³⁵⁾, lipoxgenase의 생산물인 Leukotrien의 농도 증가³²⁾, arachidonic acid 대사산물에 의한 혈류량 감소³⁶⁾, 외유모세포의 칼슘 대사와 PG 합성에 영향을 주어 membrane conduction을 증가시킴으로써 세포 기능에 이상을 발생²⁹⁾, 내이 외림프에서의 글루탐산 농도의 변화³⁷⁾, 외유모세포의 유연성과 강도의 변화 등 여러 가지 가설이 제시되었다.

그 중에서도 형태학적 변화에 주목한 연구들을 살펴보면, Perez³⁸⁾ 등은 광학현미경을 통해 기저막(Basilar Membrane)의 세포수 감소와 혈관선조(Stria Vascularis)의 위축을 관찰하였다. Douek³⁹⁾ 등은 살리실산나트륨의 이독성으로 인한 기니픽 와우의 형태학적 변화를 주목하였는데, 외유모세포의 세포벽 부근에서의 과도한 공포형성을 관찰하였다. 또한 부동모가 휘어지는 현상도 관찰하였는데, 이 두 가지 현상이 세포내외의 농도 조절 실패로 기인하는 것이 아닌가 추측하였다.

우리나라의 연구에서는 김¹⁶⁾ 등이 cisplatin을 투여하여 형태학적 변화를 관찰하였는데, Lysosome의 증가, 소포체 배열의 흩어짐, 공포의 형성, mitochondria의 증창 및 변성 등을 관찰하였고, 외유

모세포가 붕괴하여 내림프강 내로 유출되는 현상도 관찰하였다. 혈관계의 부분적인 위축과 변연세포의 내림프강 내로의 돌출을 발견하기도 하였다. 라¹⁹⁾ 등은 Gentamicin을 투여하여 와우의 형태학적 변화를 전자현미경으로 관찰하였다. 외유모세포의 증창, 위축, 변성의 양상을 관찰하였으며, 심한 경우 내림프강 내로의 압출도 발견하였다. 또한 변연세포에서 여러 가지 공포를 관찰하였고, 공포로 인한 변연세포의 돌출을 발견하였다. 안⁴⁰⁾ 등은 살리실산나트륨을 투여하여 백서 와우의 미세구조 변화를 관찰하였는데, 일반적으로 광학현미경 소견에서 외유모세포의 부동모가 변형되었으며, 심하게 손상된 경우는 내유모세포에서도 변형이 발견되었다. 외유모세포에서 부동모의 굴곡, 응집, 표면에서 부분적 또는 전체적 탈락이 관찰되었으며, 심한 경우는 내유모세포에서도 같은 변화가 나타났다. 전자현미경 소견에서 가장 뚜렷한 변화는 다양한 크기의 공포 또는 수포들이 Golgi 소포 또는 내형질세망 등과 인접되어 나타난 것이었다. mitochondria와 lysosome의 수적 증가가 관찰되기도 하였다.

최근의 연구로는 김⁴¹⁾ 등의 연구가 있는데, cisplatin을 투여하여 와우기저부에서 외유모세포의 감소를 발견하였다. 특히 내유모세포에 비하여 외유모세포의 형태 및 수적감소가 두드러짐을 발견하였으며, 혈관선조의 두드러진 변화는 없었지만, 세포의 공포성 변화와 모세혈관의 내피세포의 퇴화를 관찰하였다.

이와 같이 앞선 연구들은 살리실산나트륨을 포함한 이독성 약물들이 와우에 미치는 영향은 내유모세포에 비하여 외유모세포에 더 강하게 작용하며, 부동모의 변형과 다양한 형태의 공포로 나타남을 증명하고 있다.

치료제 투여로 살리실산나트륨의 이독성을 경감시킨 연구들은 홍삼에서 추출한 Saponin²⁰⁾, 은행잎 추출물^{8,9)}, 활성산소 형성차단제의 일종인 allopurinol¹¹⁾, 부신피질호르몬제¹²⁾, Ca²⁺ channel

antagonist의 일종인 Nimodipine^{13,14)} 등을 사용하였다. 장²⁰⁾ 등은 홍삼에서 추출한 Saponin을 기니픽에 투여한 후 살리실산나트륨을 복강내 주사하여, 투여하지 않은 대조군과 청성뇌간유발반응 검사로 청력역치의 변화를 측정하였다. 살리실산나트륨은 복강내 주사한 경우 3시간만에 외림프액에서 최고 농도에 도달하여 최대 청력역치 변화를 보였으며, 6-7시간 안에 기준역치로 회복되었는데, 3시간과 4시간에서 청력 손실의 유의한 차이를 발견하였다. 박⁹⁾ 등과 이⁹⁾ 등은 은행잎 추출물을 기니픽에 복강내 주사한 후 60분 뒤에 살리실산나트륨을 근육 주사하였으며, 추출물을 투여하지 않은 대조군과 청성뇌간유발반응 검사로 청력역치의 변화를 측정하여, 3시간 이후에 역치변화 정도에 차이를 발견하였다.

백¹¹⁾ 등은 활성산소 형성차단제로 알려진 Allopurinol을 기니픽의 위장관 내에 투여한 후 2시간과 직후에 살리실산나트륨을 근육 주사하고, 추출물을 투여하지 않은 대조군과 청성뇌간유발반응 검사로 청력역치의 변화를 비교하여, 4시간에서만 청력역치의 유의한 변화를 관찰하였다. Park¹²⁾ 등은 Chinchilla를 실험동물로 이용하였으며, dexamethasone을 복강내 주사로 전처치한 군과 대조군에 살리실산나트륨을 투여한 후 청성뇌간유발반응 검사로 청력역치의 변화를 비교하여 dexamethasone 투여군에서 부분적인 청력손실 억제 를 발견하였다. Kentaro¹³⁾ 등은 기니픽에서 살리실산나트륨 투여군, Nimodipine 투여군, 살리실산나트륨과 Nimodipine 투여군으로 나누어 복강내 감작을 하고, CAP(compound action potential와 CBF(cochlear blood flow)를 측정하였다. Nimodipine이 살리실산나트륨으로 인한 CBF 감소를 방어하는 기전이 있음을 증명하였다.

많은 연구에서 살리실산나트륨을 복강내 주사한 경우 2-4시간에 외림프액에서 최고 농도에 도달하여, 최대 청력손실을 나타내며, 6-7시간 안에 회복됨을 증명하고 있다. 또한 청력손실의 억제는 다양한 기전으로 일어나며, 치료약물의 청력손실을 억제하는

효과가 감작 후 3-4시간 사이에 많이 나타남을 설명하였다.

한의학에서 耳鳴과 耳聾은 發病原因과 症狀에 따라 虛와 實로 나뉘며, 實證의 原因은 風邪, 肝膽火, 痰火 등이었고, 虛證의 原因은 氣虛, 血虛, 肝腎虧損 등이다. 肝, 膽, 胃, 腎, 膀胱 등의 臟腑機能과 밀접한 관계가 있으며, 經絡에 있어서는 足少陽, 足太陽, 手少陽, 手太陽, 手陽明, 足陽明, 手厥陰, 足厥陰 등 經絡機能의 불균형과 연관이 있었다⁴²⁾. 黃帝內經에서 病因으로 胃虛, 肝火, 氣虛, 髓海不足 등을 지적하였는데, 이후 문헌에서는 病因病機에 있어 暴怒傷肝 혹은 情志抑鬱로 鬱而化火하여 肝膽火旺하고, 勞倦 및 房勞過度하여 氣血과 腎精이 虧損되며, 聚濕成痰으로 痰鬱化火하여 痰火上壅 한 것을 중요시하고 있다⁴³⁾. 현대 사회에 무절제한 생활과 스트레스로 인해 耳鳴 耳聾질환이 증가되는 것을 고려하더라도, 임상적으로 腎과 肝膽이 耳鳴 耳聾질환의 病因病機에 있어 중요한 歸經과 臟腑配屬이며, 부수적으로 생성된 痰이 중요한 病因으로 작용한다²¹⁾.

본 실험에서는 耳鳴과 耳聾의 치료에 發陽通陰湯을 사용하였다. 發陽通陰湯은 辨證奇聞²³⁾에 수록된 처방으로, “人有耳痛之後雖愈 而耳鳴如故者 人以爲風火猶在耳也 仍用祛風散火之藥 而鳴且更甚 然以手按其耳 則其鳴少息 此乃陽虛而氣閉也 治宜補陽氣爲主 而兼理其肝腎之虛”라고 하였으므로, 陽虛하여 氣閉되어 발생한 耳鳴에 肝腎之虛를 補하기 위해 사용한다. 구성은 人蔘, 茯苓, 白朮, 黃芪, 肉桂, 熟地黃, 當歸, 白芍藥, 柴胡, 甘草, 白芥子, 荊芥로 이루어져 있어, 十全大補湯에서 川芎을 去하고 柴胡, 荊芥, 白芥子를 加한 처방이다. 처방 중에 人蔘 熟地黃은 甘溫하여 益氣養心하고, 茯苓 白朮은 健脾燥濕하고, 當歸 白芍藥은 養血和營하고, 甘草는 和中益氣하여 氣血을 雙補하는 효능을 지녔고, 여기에 益氣固表의 黃芪와 溫補脾腎의 肉桂가 더하여 脾腎을 補하는 의미를 강하게 하였다⁴⁴⁾. 柴胡는 肝膽經으로

歸經하여 和解退熱, 疏肝解鬱, 升舉陽氣의 효능을 가지고, 白芥子는 肺經으로 歸經하여 溫肺祛痰, 利氣散結, 通絡止痛의 효능을 가지며, 荊芥는 肺·肝經으로 歸經하여 發表散風, 透疹理血의 효능을 가진다⁴⁵⁾. 처방 구성에 근거하여 發陽通陰湯은 補氣血, 補脾胃, 疏肝, 祛痰, 散風의 효능을 가지고 있으므로, 耳鳴 耳聾의 病因病機에 합당한 치료 처방이라고 할 수 있다. 실제로 임상에서 耳鳴 耳聾 질환의 通治方으로 활용되어왔다. 따라서 發陽通陰湯 추출물을 치료 약물로 선택하여 실험적인 효과를 검증하고자 하였다.

이러한 연구결과와 문헌근거를 바탕으로 본 실험은 살리실산나트륨으로 유발된 이독성 동물모델에서 광학현미경과 전자현미경을 이용한 관찰을 시행하였다. 외유모세포내의 소피판(cuticular plate), 세포질(cytoplasm)에 공포의 발생정도, 외유모세포내의 세포내소기관(subcellular organelle)의 손상 등의 가역적인 변화를 시간에 따라 형태학적으로 관찰하였다. 이를 통해 發陽通陰湯 추출물의 경구투여가 살리실산나트륨에 의한 이독성 동물모델에서 미치는 영향을 연구하였다.

실험동물에 살리실산나트륨을 복강내 주사한 후 1시간, 2시간, 3시간, 5시간에 걸쳐 대조군과 실험군의 와우를 광학현미경과 전자현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 광학현미경 상에서는 형태학적 변화를 관찰할 수 없었으나, 전자현미경 상에서는 와우의 변화가 관찰되었다. 외유모세포의 소피판과 세포질에서 공포가 형성되었으며, 일부 이차용해소(Ly)의 존재 외에는 세포내소기관의 손상은 발견되지 않았다.

대조군에서는 發陽通陰湯 추출물 투여 후 1시간, 2시간, 3시간, 5시간 모두에서 소피판에 공포형성이 관찰되었으며, 5시간에는 세포질에도 공포가 발견되었다. 실험군에서는 살리실산나트륨 투여 후 1시간, 2시간에는 소피판, 세포질 모두 정상 소견을 보였다. 이후 시간대에서는 대조군과 차이가 없었는데,

3시간, 5시간에서 소피판에 공포형성이 관찰되었고, 5시간에서 세포질에도 공포가 발견되었다. 많은 연구에서 살리실산나트륨을 복강내 주사한 경우 24시간에 외림프액에서 최고 농도에 도달하여, 최대 청력손실을 나타낸다고 하였다^{8,9,11,20)}. 또한 살리실산나트륨 투여 후 3-4시간 사이에 유의한 청력손실 감소 효과를 보인 실험이 많았고, 2시간 이전에 청력손실에 영향을 준 논문은 없었다. 본 실험에서는 실험군의 1시간, 2시간 경과군에서 소피판에 공포가 관찰되지 않았고, 3시간, 5시간 경과군에서는 실험군과 대조군의 차이가 없었다.

따라서 發陽通陰湯 추출물이 살리실산나트륨 투여 후 나타나는 외유모세포의 형태학적 변화를 감소시킬 수 있으며, 그 영향은 초기 2시간에 현저하게 나타나는 것으로 생각된다. 다만 이전의 연구와 비교하여 약물의 영향이 나타나는 시간에 있어 차이를 보이나, 이는 실험약물의 동물 개체에 따른 감수성 차이에 기인하는 것이라고 생각된다.

이상의 결과를 종합하면 發陽通陰湯 추출물은 실험군의 외유모세포의 안정성에 도움을 줄 것으로 추정되나, 아직 그 기전이 명확하지 않아 추가적인 보완실험을 통하여 이상과 같은 결과가 나온 기전을 확립해야 할 것으로 생각된다.

결론

실험적으로 유발한 이독성 동물모델에서 發陽通陰湯의 치료효과를 알아보기 위하여 흰쥐에 發陽通陰湯 추출물을 4일간 경구 투여한 후 살리실산나트륨을 복강내 주사하고 시간의 경과에 따른 와우의 형태학적 변화를 관찰하였다. 전자현미경을 통해 대조군 및 실험군 외유모세포의 핵, 세포질, 소피판, 섬모의 변화를 중심으로 관찰하였고, 광학현미경을 통해 와우의 기저막, 코르티기관, 혈관선조, 라이스너막 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조군의 경우 살리실산나트륨 과량 투여 시 흰쥐의 와우에 변화가 관찰되었는데, 1시간, 2시간, 3시간, 5시간 경과한 모든 대조군에서 외유모세포의 부동모가 붙어있는 소피판(cuticular plate)에 공포형성이 관찰되었다. 또한 5시간 경과한 군에서는 세포질 내에도 공포형성이 관찰되었다.
2. 실험군에서는 1시간, 2시간 경과 시에 소피판에 공포형성이 관찰되지 않았다. 그러나 3시간, 5시간 경과한 군의 소피판과 5시간 경과한 군의 세포질에는 대조군과 유사한 형태의 공포형성이 관찰되었다.
3. 실험군에 투여된 發陽通陰湯 추출물은 살리실산나트륨 투여 후 나타나는 외유모세포의 형태학적 변화를 감소시킬 수 있으며, 그 영향은 초기 2시간에 현저하게 나타나는 것으로 생각된다.
4. 이전의 연구와 비교하여 약물의 영향이 나타나는 시간대에 있어 차이를 보이나, 이는 실험약물의 동물 개체에 따른 감수성 차이에 기인하는 것이라고 생각된다.

이상의 결과를 종합하면 發陽通陰湯 추출물은 외유모세포의 안정성에 도움을 주어 살리실산나트륨 이독성으로 인해 나타나는 흰쥐 와우의 형태학적 변화를 완화시키는 것으로 추정되며, 아직 그 기전이 명확하지 않아 추가적인 보완실험을 통하여 이상과 같은 결과가 나온 기전을 확립해야 할 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Bauer CA. Animal models of tinnitus. *Otolaryngol Clin North Am.* 2003;6(2):267-85.
2. Jastreboff PJ, Sasaki CT. An animal model of tinnitus: a decade of development. *Am J Otol.*

- 194;15(1):19-27.
3. Bauer CA, Brozoski TJ, Rojas R, Boley J, Wyder M. Behavioral model of chronic tinnitus in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;121(4):457-62.
4. Jastreboff PJ, Brennan JF, Sasaki CT. An animal model for tinnitus. *Laryngoscope.* 1988;98(3):280-6.
5. Boettcher FA, Salvi RJ. Salicylate ototoxicity: review and synthesis. *Am J Otolaryngol.* 1991; 12(1):33-47.
6. Jung TT, Rhee CK, Lee CS, Park YS, Choi DC. Ototoxicity of salicylate, nonsteroidal antiinflammatory drugs, and quinine. *Otolaryngol Clin North Am.* 1993;26(5):791-810.
7. Sahley TL, Nodar RH : A biochemical model of peripheral tinnitus. *Hear Res.* 2001;152(1-2):43-54.
8. 박찬일, 이민한, 신광철. 은행잎 추출물이 Salicylate에 의한 청성뇌간유발반응역치 변화에 미치는 영향. *충남의대잡지.* 1997;24(2):397-403.
9. 이민한. 기니픽에서 은행잎 추출액이 Salicylate 이독성에 미치는 영향. *충남대학교 석사학위논문.* 1996.
10. Arruda J, Jung TT, McGann DG. Effect of leukotriene inhibitor on otoacoustic emissions in salicylate ototoxicity. *Am J Otol.* 1996;17(5): 787-92.
11. 백승숙. 기니픽에서 Allopurinol이 Salicylate이독성에 미치는 영향. *충남대학교 석사학위논문.* 1995.
12. Park YS, Jung TT, Choi DJ, Rhee CK. Effect of corticosteroid treatment on salicylate ototoxicity. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1994;103(11):896-900.
13. Ochi K, Kinoshita H, Kenmochi M, Nishino H, Ohashi T. Effects of nimodipine on salicylate ototoxicity. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002;111 (12 Pt 1):1092-6.
14. Kay IS, Davies WE. The effect of nimodipine on salicylate ototoxicity in the rat as revealed by the auditory evoked brain-stem response. *Eur Arch*

- Otorhinolaryngol. 1993;250(1):51-4.
15. Shujiro B. Minami, Su-Hua Sha, Jochen Schacht. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. *Hear Res.* 2004;193(1-2):1-6.
 16. 김성학. Cis-diamminedichloroplatinum[II] 投與에 의한 內耳의 超微形態的 研究. 조선대학교 박사학위논문. 1986.
 17. 박찬일, 송영복, 정봉진, 박용호. 기니픽에서 Kanamycin 이독성. *충남의대잡지.* 1999;26(2):111-115.
 18. Sha SH, Schacht J. Salicylate attenuates gentamicin-induced ototoxicity. *Lab Invest.* 1999;79(7):807-13.
 19. 라한조. Gentamicin에 의한 內耳의 超微形態的 研究. 조선대학교 석사학위논문. 1987.
 20. 장재용. 홍삼에서 추출한 Saponin이 Salicylate 이 독성에 미치는 영향. 충남대학교 석사학위논문. 1999.
 21. 하미경. 龜板 合 釣鉤藤 추출액이 살리실산 나트륨으로 유발된 와우의 형태학적 변화에 미치는 영향. 동국대학교 석사학위논문. 2003.
 22. 채병윤. 東醫眼耳鼻咽喉皮膚科學. 서울:집문당. 1997:pp250-255, pp281-287.
 23. 陣士鐸. 變証奇聞. 北京:中國中醫藥出版社. 1995: p88.
 24. Heller AJ. Classification and epidemiology of tinnitus. *Otolaryngol Clin North Am.* 2003;36(2):239-48.
 25. Saeki N, Kitahara M. Assessment of prognosis in sudden deafness. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1994;510:56-61.
 26. 강성호, 문교갑, 박철원, 이형석, 안경성. 돌발성 난청의 임상적 관찰. *한양의대학술지.* 1993;13(2):771-778.
 27. 임귀채, 박경윤, 이건일, 김진용, 청경두. 돌발성 난청의 임상적 분석. *대한이비인후과학회지.* 1995;38(6):834-841.
 28. 최인화. 耳鳴에 관한 임상적 연구. *대한안이비인후과학회지.* 2001;14(2):134-145.
 29. Stypulkowski PH. Mechanisms of salicylate ototoxicity. *Hear Res.* 1990; 46(1-2):113-45.
 30. Filipo R, Barbara M, Cordier A, Mafera B, Romeo R, Attanasio G, Mancini P, Marzetti A. Osmotic drugs in the treatment of cochlear disorders: a clinical and experimental study. *Acta Otolaryngol.* 1997;117(2):229-31.
 31. Myers En, Brenstein Jm, Fostropoulos G. Salicylate ototoxicity: A Clinical study. *N Engl J Med.* 1965;273:587-90.
 32. Arruda J, Jung TT, McGarrn DG. Effect of leukotriene inhibitor on otoacoustic emissions in salicylate ototoxicity. *Am J Otol.* 1996;17(5):787-92.
 33. Didier A, Miller JM, Nuttall AL. The vascular component of sodium salicylate ototoxicity in the guinea pig. *Hear Res.* 1993;69(1-2):199-206.
 34. Waltheusser-Franke E, Braum S, Langner G. Salicylate alters 2-DG uptake in the auditory system: a model for tinnitus? *Neuroreport.* 1996;7(10):1585-8.
 35. 김상운. 살리실산 나트륨이 내이 외림프의 카테콜아민 농도에 미치는 영향. 서울대학교 박사학위논문. 1992.
 36. Jung TT, Park YM, Miller SK, Rozehnal S, Woo HY, Baer W. Effect of exogenous arachidonic acid metabolites applied on round window membrane on hearing and their levels in the perilymph. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1992;493:171-6.
 37. 윤태현, 박형섭. 살리실산 나트륨 투여후 내이 외림프에서 글루탐산 농도의 변화. *울산의대잡지.* 1995;4(2):55-61.
 38. Perez de Moura LF, Hayden RC Jr. Salicylate ototoxicity. A human temporal bone report. *Arch*

- Otolaryngol. 1968;87(4):368-72.
39. Douek EE, Dodson HC, Bannister LH. The effects of sodium salicylate on the cochlea of guinea pigs. J Laryngol Otol. 1983;97(9):793-9.
40. 안영민. 살리실산 나트륨이 白鼠 蝸牛의 微細構造에 미치는 影響에 關한 研究. 서울대학교 박사 학위논문. 1987.
41. 김동욱. 이독성약제 투여 후 흰쥐 와우에서의 형태학적 변화. 건국대학교 석사학위논문. 2000.
42. 신명섭, 성낙기. 耳鳴의 病因病機 및 鍼灸治療에 대한 文獻的 考察. 대전대학교 韓醫學연구소 논문집. 1994;3(1):157-180.
43. 최용태 외. 鍼灸學. 서울. 집성당. pp1221-1222, 1988.
44. 김상찬 외. 方劑學. 서울. 영림사. pp292-294. 1999.
45. 김선희 외. 本草學. 서울. 영림사. p 127, p149, p453. 1995.