

원저

對金飲子 약침이 알코올 독성 흰쥐의 해마에서 신경세포생성과 NOS 발현에 미치는 영향

김현중* · 김이화** · 이은용*

*세명대학교 한의과대학 침구학교실

**세명대학교 한의과대학 경혈학 교실

Abstract

Effect of *Daekumeumja* Herb-acupuncture on Alcohol-induced Suppressed Cell Proliferation and Expression of Nitric Oxide Synthase in Hippocampus of Rats

Kim Hyun-joong*, Kim Ee-hwa** and Lee Eun-yong*

*Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Se-Myung University

**Department of Meridianology, College of Oriental Medicine, Se-Myung University

Objectives : The purpose of this study is to assess the effect of *Daekumeumja* herb-acupuncture on neural cell proliferation and nitric oxide synthase(NOS) expression in hippocampus of ethanol-intoxicated Sprague-Dawley(SD) rats.

Methods : SD rats were randomly assigned into 5 groups ; the normal group, the alcohol-treated(control) group, the alcohol- and 1 mg/kg *Daekumeumja*- treated(sample A) group, the alcohol- and 5mg/kg *Daekumeumja*-treated (sample B) group, the alcohol- and 10 mg/kg *Daekumeumja*-treated (sample C) group(n = 6 in each group).

Normal group were received with Saline, while control group were injected intraperitoneally with alcohol(2 g/kg) once per day for 5 days. Sample groups were treated *Daekumeumja* herb-acupuncture on Chungwan(CV12) for 5 consecutive days.

Bromo-deoxyuridine(BrdU) was injected into all animals once per day for 5 days. For the detection of BrdU-positive cells and NADPH-d- positive cells in hippocampus, immunohistochemistry was performed.

- 접수 : 2006년 8월 6일 · 수정 : 2006년 9월 8일 · 채택 : 2006년 9월 8일
· 교신저자 : 이은용, 충북제천시 신월동 산 21-11 세명대학교 부속한방병원 침구과
Tel. 043-649-1816 E-mail : acupley@paran.com

Results : 1. In the dentate gyrus area, the number of BrdU-positive cells in the sample B(278.08±6.46), C(331.33±16.68) groups was significantly(p<0.05) increased compared with the control group.

2. In the dentate gyrus area, the number of NADPH-d-positive cells in the sample C(86.50±10.02) groups was significantly(p<0.05) increased compared with the control group.

3. In the CA1 area, the number of NADPH-d-positive cells in the sample A(63.90±2.69), B(75.70±3.01), C(97.70±4.06) groups was significantly(p<0.05) increased compared with the control group.

4. In the CA 2-3 area, the number of NADPH-d-positive cells in the sample B(30.20±1.89), C(62.70±2.08) groups was significantly(p<0.05) increased compared with the control group.

Conclusion : These results indicate that, neural cell proliferation and NOS expression in hippocampus was reduced in ethanol-intoxicated group. Treatment of Daekumeumja herb-acupuncture increased this diminution. Daekumeumja could be able to effect on the prevention of the amnesia and learning disability in alcoholism.

Key words : Daekumeumja, hippocampus, ethanol, cell proliferation, nitric oxide synthase

I. 緒 論

에탄올(ethanol)은 술의 주성분으로 우리의 일상 생활과 밀접한 관계가 있으며, 물질적 문명의 발달로 말미암아 유, 무형의 심적 중압감을 해소하기 위한 방편으로 그 소비가 증가되고 있다. 알코올에 노출된 중추신경계는 손상받기 쉬우며¹⁾, 중추신경계 중 특히 해마 부위는 알코올 노출에 쉽게 손상을 받아 병적으로 변화되기 쉬운 영역으로 알려져 있다²⁾.

과거에 성숙한 뇌는 재생이나 새로운 신경발생이 일어나지 않는 것처럼 알려져 왔으나 성숙한 해마(hippocampus)의 치상회(dentate gyrus)에서 신경발생이 일어난다는 보고는 이미 1965년에 있었으며³⁾, 최근 연구에서 설치류와 인간을 포함한 포유류의 해마의 치상회 등에서는 일생동안 새로운 신경세포의 생성이 지속적으로 이루어진다고 보고되고 있다⁴⁻⁵⁾.

한의학에서 음주로 인해 발생된 질환을 酒傷이라고 하고, 酒傷과 관련되는 간질환은 주로 酒疸, 酒積, 酒癰, 酒癩 등의 증후에서 관찰하고 있다⁶⁾. 《內經》⁷⁾에서는 음주과도로 인한 氣의 變調와 병리현상에 대해 기술하고 있으며, 張⁸⁾은 과음으로 인한 黃疸을 酒疸이라 하였고, 巢⁹⁾는 酒疸, 酒癰에 대해 언급하고 臟器의 虛實에 따른 변화를 관찰하였으며, 李¹⁰⁾는 酒傷病의 治法으로 發散汗出하고 다음으로 利小便하여 其濕을 上下로 分消하는 것을 원칙으로 하였다.

對金飲子は 宋代 《太平惠民和劑局方》¹¹⁾에 처음 소개된 처방으로 “益氣, 健脾進食, 和胃祛痰, 自然營衛調暢”의 효능이 있어, 治酒食傷¹²⁾하는 처방으로 활용되고 있다. 許¹³⁾는 對金飲子가 酒食傷을 治하고, 和胃消痰의 작용을 한다 하였으며, 황¹⁴⁾은 對金飲子가 이차적인 급성 염증성 점막손상을 차단한다고 보고하였고, 김¹⁵⁾은 對金飲子가 알코올성 간손상에 대한 억제효과가 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 인위적으로 알코올을 주입하여 알코올 독성을 유발시킨 Sprague Dawley(SD)계 흰쥐에게 對金飲子 약침을 투여하여 해마에서 뇌 신경세포생성에 미치는 영향을 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU) 면역조직화학법으로 규명하고, NO의 합성효소인 NOS의 변화를 NADPH-d 조직화학 방법으로 관찰하여 對金飲子가 알코올 독성 흰쥐의 해마에서 신경세포생성과 NOS의 활성화도에 미치는 영향을 살펴보았다.

II. 실험 방법

1. 실험동물 및 재료

1) 실험동물

본 실험에는 5주령된 체중 180±10g되는 수컷

Table 1. The Amount and Composition of Daekumeumja

Herbal name	Weight(g)
<i>Citri Pericarpium</i> (陳皮)	12.00
<i>Magnoliae Cortex</i> (厚朴)	2.80
<i>Atractylodis Rhizoma</i> (蒼朮)	2.80
<i>Glycyrrhizae Radix</i> (甘草)	2.80
Total amount	20.40

SD계열 수컷 흰쥐(샘타고, 한국) 30마리를 사용하였다. 실험 과정은 NIH(National Institute of Health)와 Korean Academy of Medical Science의 실험 동물의 관리 지침에 따라 진행되었다. 선정된 실험동물은 전 실험기간을 통하여 충분한 고형사료와 물을 공급하였으며, 밤낮주기(12시간 light/12시간 dark)를 조절하였다. 온도는 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 60%의 환경조절 장치가 갖추어진 항온 사육실에서 사육케이스 (30cm×20cm)를 이용하여 각 군별로 한 사육실내에 6마리씩 동일한 환경에서 사육하였다.

2) 약제

본 실험에서 사용한 약제는 세명대학교 부속 한방병원에서 구입한 것을 엄선하여 사용하였으며, 처방은 《東醫寶鑑》¹³⁾에 기재된 對金飮子로 1첩의 구성약재와 용량은 다음과 같다(Table 1).

3) 약침액 제조

對金飮子 10貼(204g)에 증류수를 가하여 rotary evaporator(TOKYO RIKAKIKAI, JAPAN)를 이용하여 감압 농축한 후 동결건조하여 얻어진 분말 30g(收率 14.3%)을 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 실험군 설정

SD계 흰쥐 30마리를 각각 6마리씩 5군으로 나누어 실험하였다.

- (1) 정상군(Normal) : 생리식염수를 주입한 군.
- (2) 대조군(Control) : 에탄올을 주입한 군.
- (3) 실험군 A(Sample A) : 에탄올과 對金飮子 (1 mg/kg)를 주입한 군.
- (4) 실험군 B(Sample B) : 에탄올과 對金飮子 (5 mg/kg)를 주입한 군.

(5) 실험군 C(Sample C) : 에탄올과 對金飮子 (10 mg/kg)를 주입한 군.

2) 에탄올 투여 및 혈중 알코올 농도 측정

대조군과 실험군 A, B, C에게 에탄올 2g/kg의 용량을 1일 1회, 5일간 복강에 주사하였다.

알코올을 마지막으로 투여한 지 2시간이 지난 후에 심장 천자로 혈액을 채취하여 혈중 알코올 농도를 Sigma Diagnostics Kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 측정하였다.

3) 약침 자극

정상군은 1회에 생리식염수 0.2ml를 주입하였으며, 실험군 A, B, C는 對金飮子 추출물을 생리식염수 0.2ml에 희석하여 주입하였다.

생리식염수 및 對金飮子 약침 자극은 인체의 中腕穴(CV12)에 상응하는 부위에 1일 1회 5일간 주입하였다.

4) BrdU 주사

각 군은 thymidine analog인 BrdU(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 5일간 1일 1회 50mg/kg용량으로 복강 내에 주입하였다.

5) 조직 처리

모든 실험동물들은 동물용 마취제인 Zoletil 50[®] (10mg/kg, i.p ; Vibac, Carros, France)을 복강 내 주사하여 마취시킨 후 흉강을 열고 좌심실을 통하여 50mM 인산염 완충식염수(phosphate buffer saline ; PBS)를 주입하고, 100mM 인산 완충액(phosphate buffer, pH 7.4)에 녹인 4% paraformaldehyde(PFA) 고정액을 관류하였다. 관류 고정 후 뇌를 적출한 다음 PFA 고정액에 담아서 하룻밤 동안 침전시킨 후 고정을 실시하였다. 고정된 뇌 조직은 동결방지를 위

해 30% sucrose 용액으로 옮겨진 후 microtome (Leica, Nussloch, Germany)을 이용하여 40 μ m 두께의 연속관상절편을 제작하였다.

6) BrdU 면역조직화학염색

해마 치상회에서 새로운 세포의 생성을 조사하기 위하여 BrdU 면역조직화학법을 실시하였다.

우선 대천문에서 3.30mm~4.16mm 거리의 해마 배측면에서 평균 10장의 절편을 취하였다. 조직절편들은 PBS에서 0.5% Triton X-100으로 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 50% formamide-2x standard saline citrate (SSC) 용액에서 65 $^{\circ}$ C로 2시간 동안 전처리한 후, 2 N HCl과 37 $^{\circ}$ C로 30분간 반응시킨 후 100mM sodium borate(pH 8.5)로 2차례 세척하였다. 세척 후에 조직절편들은 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤동안 BrdU-specific mouse monoclonal antibody(1:600 ; Boehringer Mannheim, Germany)와 반응시켰다. PBS로 3차례 세척 후 biotinylated mouse secondary antibody (1:200 ; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)와 1시간 동안 반응시킨 후 VECTASTAIN Elite ABC Kit (1:100 ; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에서 1시간동안 반응시켰다.

발색을 위해 nickel chloride(40mg/ml)을 함유하는 0.02% 3,3'-diaminobenzidine(DAB)와 50mM Tris-HCl (pH 7.6)에 0.03% 과산화수소와 반응시키고, mouse anti-neuronal nuclei antibody(1:300 ; Chemicon International, Temecula, CA, USA)로 발색시켰다. 그 후 PBS로 3차례 세척하고 1시간 동안 biotinylated mouse secondary antibody와 반응시키고, VECTASTAIN ABC kit로 처리하였다. 발색을 위해 0.02% DAB와 50mM Tris-HCl에 0.03% 과산화수소와 5분간 반응시킨 후 PBS에 세척하고 gelatin-coating된 slide에 mounting하였다.

7) NADPH-d 조직화학법

NOS의 발현을 조사하기 위하여 NADPH-d 조직화학법을 실시하였다. 자유부유(free-floating)법을 이용하여 조직절편들은 0.3% Triton X-100, 0.1mg/ml nitroblue tetrazolium, 0.1mg/ml β -NADPH을 100mM PB에 녹인 반응혼합액에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 원하는 정도의 반응이 나타나면 조직절편들을 PBS로 3차례 세척한 후 gelatin-coating된 slide에 mounting하여 실온에서 하룻밤동안

건조시키고 polymount로 봉입하였다.

8) 조직관찰 및 영상분석

해마에서 각각의 항체들과 면역반응이 일어난 세포들은 광학 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였고, 해마의 과립세포층의 면적을 영상 분석기(Multiscan, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. BrdU 양성세포와 NADPH-d 양성 세포들은 치상회의 과립 세포층의 횡단면에서 mm 단위로 표시하였다.

9) 통계 처리

실험결과는 SPSS Window program(Ver. 10)을 이용하였으며, 모든 측정값은 평균값 \pm 표준오차 (Mean \pm S.E.M)으로 나타내었고, 유의성은 p<0.05로 하였다. 각 실험군간의 통계학적 분석은 ANOVA와 Scheffe's 사후 검정을 실시하였다.

III. 실험 결과

1. 혈중 알코올 농도

대조군의 혈중 알코올 농도는 82.04 \pm 3.78mg/dl였고, 정상군에서는 알코올이 검출되지 않았다(Fig. 1).

2. 해마 치상회의 BrdU 양성세포 발현

실험 결과 해마 치상회에서 BrdU 양성세포수는 정상군은 301.08 \pm 12.01, 대조군은 224.75 \pm 12.09, 실험군 A는 258.16 \pm 9.65, 실험군 B는 278.08 \pm 6.46, 실험군 C는 331.33 \pm 16.68로 관찰되었다. 대조군의 양성세포수는 정상군에 비해 유의한 감소를 나타내었고, 실험군 B, C는 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 실험군 A는 유의성을 관찰할 수 없었다(Fig. 2, 3).

3. 해마 치상회의 NADPH-d 양성세포 발현

실험 결과 해마 치상회에서 NADPH-d 양성세포

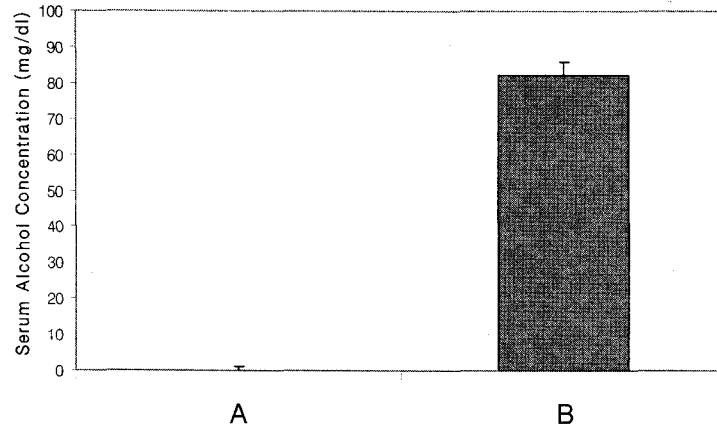


Fig. 1. Serum alcohol concentration in each group
 A: normal group
 B: control group(alcohol-treated group).

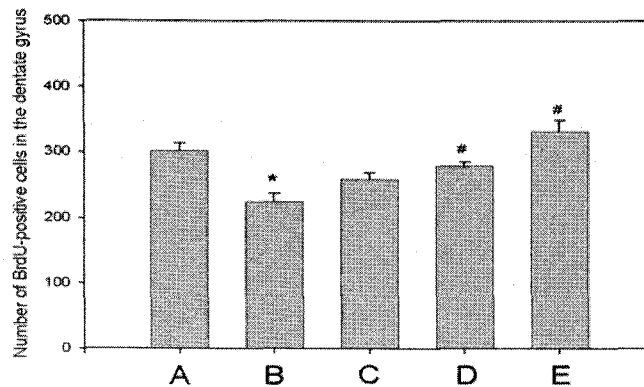


Fig. 2. Mean number of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-positive cells in the subgranular layer of the dentate gyrus in each group

A: normal group.
 B: control group(alcohol-treated group).
 C: sample A(alcohol- and 1 mg/kg Daekumeumja treated group).
 D: sample B(alcohol- and 5 mg/kg Daekumeumja treated group).
 E: sample C(alcohol- and 10 mg/kg Daekumeumja treated group).
 Values are represented as mean ± S.E.M.
 * represents $p < 0.05$ compared to the normal group.
 # represents $p < 0.05$ compared to the alcohol-treated group.

수는 정상군이 93.40±4.78, 대조군은 64.40±2.43, 실험군 A는 62.80±3.30, 실험군 B는 63.00±1.86, 실험군 C는 86.50±10.02로 관찰되었다. 대조군의 양성세포수는 정상군에 비해 유의한 감소를 나타내었고, 실험군 C는 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 실험군 A, B는 유의성을 관찰할 수 없었다(Fig. 4, 5).

4. 해마의 CA1에서 NADPH-d 양성세포 발현

실험 결과 해마의 CA1에서 NADPH-d 양성세포수는 정상군은 118.50±7.33, 대조군은 51.00±2.16, 실험군 A는 63.90±2.69, 실험군 B는 75.70±3.01, 실험

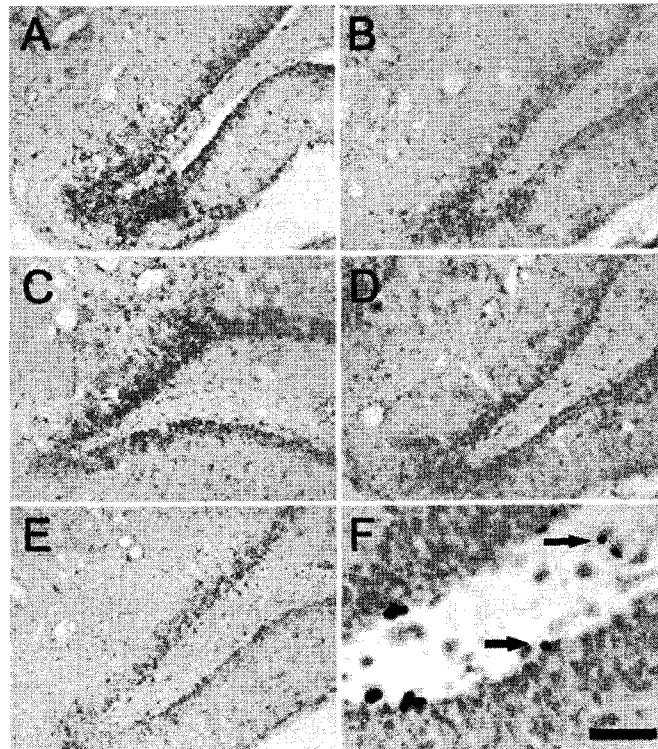


Fig. 3. Photomicrograph of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-positive cells. Sections were stained for BrdU (black) and neuronal nuclei (NeuN) (brown). Scale bar represents 100 μm (A-E) and 400 μm (F)

- A: normal group.
- B: control group(alcohol-treated group).
- C: sample A(alcohol- and 1 mg/kg Daekumeumja treated group).
- D: sample B(alcohol- and 5 mg/kg Daekumeumja treated group).
- E: sample C(alcohol- and 10 mg/kg Daekumeumja treated group).
- F: NADPH-d-positive cells(E \times 4).

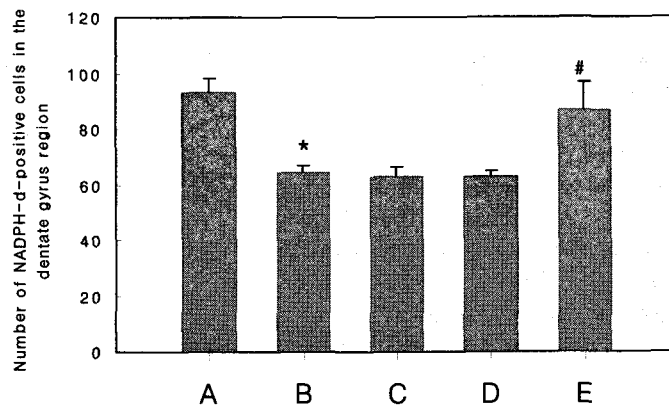


Fig. 4. Mean number of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d)-positive cells in the dentate gyrus in each group

- A: normal group.
- B: control group(alcohol-treated group).
- C: sample A(alcohol- and 1 mg/kg Daekumeumja treated group).
- D: sample B(alcohol- and 5 mg/kg Daekumeumja treated group).
- E: sample C(alcohol- and 10 mg/kg Daekumeumja treated group).
- * represents $p < 0.05$ compared to the normal group.
- # represents $p < 0.05$ compared to the alcohol-treated group.

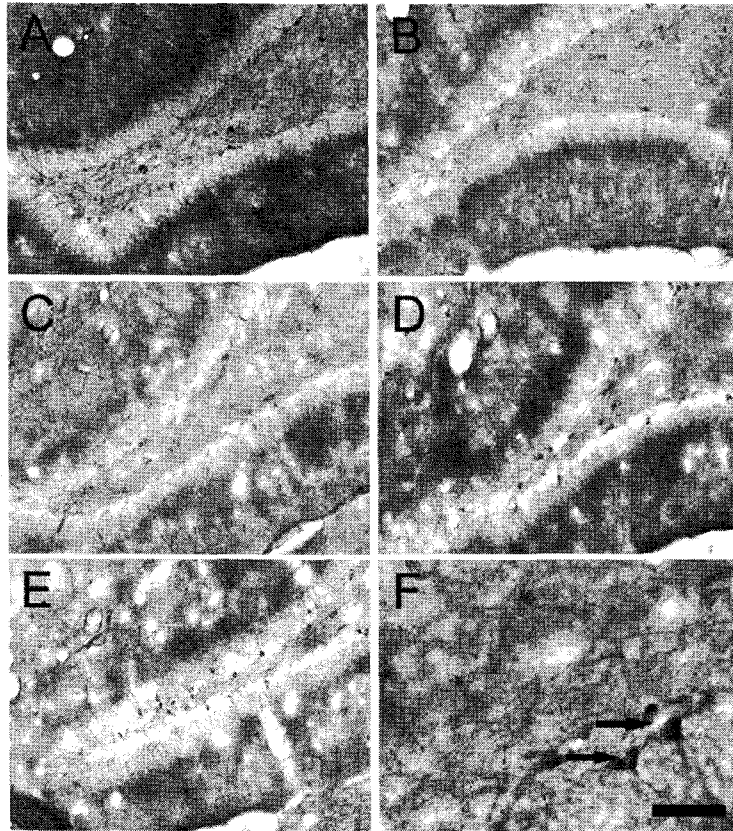


Fig. 5. Photomicrograph of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d)-positive cells. Sections were stained for nitric oxide synthase (blue). Scale bar represents 100 μ m(A-E) and 400 μ m(F)
 A: normal group.
 B: control group(alcohol-treated group).
 C: sample A(alcohol- and 1mg/kg Daekumeumja treated group).
 D: sample B(alcohol- and 5mg/kg Daekumeumja treated group).
 E: sample C(alcohol- and 10mg/kg Daekumeumja treated group).
 F: NADPH-d-positive cells(E \times 4).

군 C는 97.70 \pm 4.06로 관찰되었다. 대조군의 양성세포 수는 정상군에 비해 유의한 감소를 나타내었고, 실험군 A, B, C는 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 6).

5. 해마의 CA2, CA3에서 NADPH-d 양성세포 발현

실험 결과 해마의 CA2, CA3에서 NADPH-d-양성세포수는 정상군은 55.60 \pm 3.21, 대조군은 23.30 \pm 1.40, 실험군 A는 25.90 \pm 1.39, 실험군 B는 30.20 \pm 1.89, 실험군 C는 62.70 \pm 2.08로 관찰되었다. 대조군의 양성세포수는 정상군에 비해 유의한 감소를 나타내었고, 실험군 B, C는 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 실험군 A는 유의성을 관찰할 수 없었다(Fig. 7).

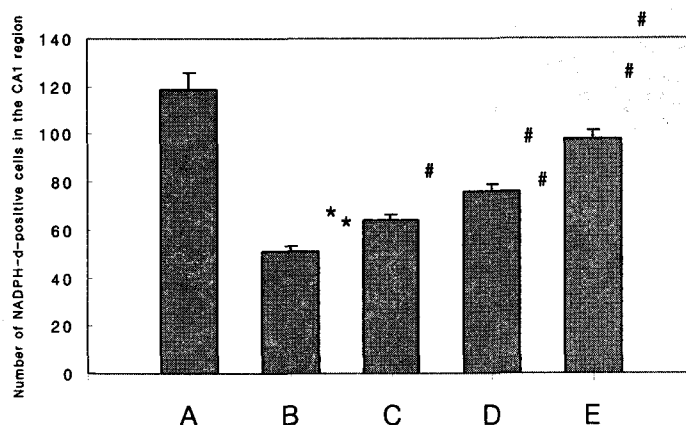


Fig. 6. Mean number of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d)-positive cells in the CA1 region in each group

A: normal group.

B: control group(alcohol-treated group).

C: sample A(alcohol- and 1 mg/kg *Daekumeumja* treated group).

D: sample B(alcohol- and 5 mg/kg *Daekumeumja* treated group).

E: sample C(alcohol- and 10 mg/kg *Daekumeumja* treated group).

* represents $p < 0.05$ compared to the normal group.

represents $p < 0.05$ compared to the alcohol-treated group.

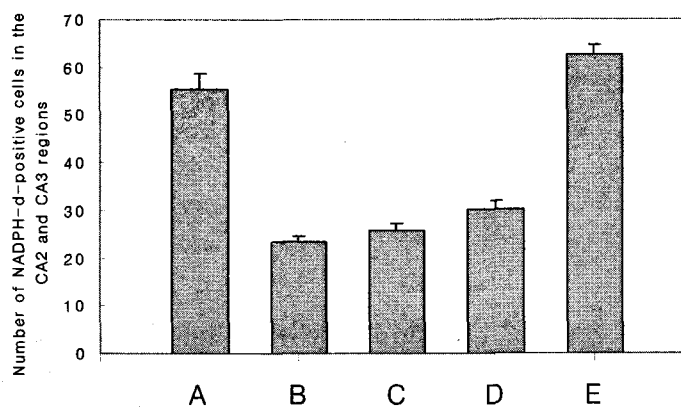


Fig. 7. Mean number of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d)-positive cells in the CA2 and CA3 regions in each group

A: normal group.

B: control group(alcohol-treated group).

C: sample A(alcohol- and 1 mg/kg *Daekumeumja* treated group).

D: sample B(alcohol- and 5 mg/kg *Daekumeumja* treated group).

E: sample C(alcohol- and 10 mg/kg *Daekumeumja* treated group).

* represents $p < 0.05$ compared to the normal group.

represents $p < 0.05$ compared to the alcohol-treated group.

IV. 고 찰

알코올은 인체의 신체와 정신에 영향을 미치게 되며, 중추신경계는 알코올의 독성에 민감한 부위¹⁾로 특히 해마 부위는 알코올 노출에 쉽게 손상을 받아 병적으로 변화되기 쉬운 영역으로 알려져 있다²⁾.

해마는 변연계 가운데 가장 중심적인 신경구조로 세포구축학적으로 CA1, CA2, CA3 및 CA4 세포영역으로 구성된 해마본체(hippocampal proper)와 치상회 세포영역으로 이루어져 있다. 기능은 현재까지 충분히 밝혀져 있지 않으나, 포유동물의 뇌에서 학습과 기억의 저장과 연관이 있는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾.

새로운 신경세포 생성은 신경세포가 증식(proliferation)되고 생존(survival)하며 분화(differentiation)되는 과정을 거치게 된다. 해마 치상회의 과립세포하 영역(subgranular layer)에 생성된 신경전구세포(progenitor cells)는 과립세포층으로 지속적으로 이동하여 신경세포로 분화되고, 축삭을 뻗어 다른 신경세포와 시냅스를 이루어 성숙된 신경세포를 생성하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾.

과거에 성숙한 뇌는 재생이나 새로운 신경발생이 일어나지 않는 것처럼 알려져 왔으나 최근 연구에서 설치류와 인간을 포함한 포유류의 측뇌실 전측의 뇌하실 영역, 후구, 해마의 치상회에서는 일생동안 새로운 신경세포의 생성이 지속적으로 이루어진다고 보고되었다³⁻⁵⁾.

BrdU를 이용한 연구에서 환경적 다양성이나 학습은 새로운 신경세포의 생존을 증진시키고, 달리기¹⁸⁾는 신경세포의 증식을 증가시켰던 반면, 급성 및 만성 스트레스¹⁹⁾, 스테로이드²⁰⁾ 등은 신경발생을 억제시키는 것으로 보고되었다.

NO는 신경세포의 신호전달에서부터, 혈관계의 긴장성 조절, 면역계에서 식균작용에 이르기까지 각종 세포에서 다양한 기능을 나타낸다. 신경계에서 NO는 자유롭게 확산되는 가스로서 중추신경계 및 말초신경계의 neuronal messenger로 생각되고 있으며²¹⁾, 뇌에서 synaptic plasticity의 역할과 관련이 있을 것으로 보고되어졌다²²⁾. 해마에서 관찰되는 long-term potentiation은 기억과 학습을 세포학적 수준으로 설명할 수 있는 기전인데 이때 필요한 retrograde neurotransmitter로서 NO의 역할이 강조되고 있다. NO는 많은 중추신경계의 신경병리학적 변화의 주

요한 변인일 것이라고 제안되었으며, 이러한 NO가 과도하게 지속적으로 생성될 경우 신경퇴행성 변화와 세포사를 유발한다고 알려져 있다²³⁾.

L-arginine으로부터 NO를 생성시키는 효소인 NOS는 조직에 따라 다른 형태를 취하는데 NOS를 갖고 있는 신경세포를 조직학적으로 관찰하는 방법으로 NADPH-d 조직화학을 사용하는데 이 방법은 NOS가 nitroblue tetrazolium(NBT)을 물에 녹지 않는 NBT formazan으로 환원시키는 NADPH-d 활성작용이 있다는 원리를 이용한 방법이다. 이 작용에는 꼭 NADPH가 필요하며 NOS는 NADPH를 전자 공여자로 필요로 한다. NADPH-d 활성은 NOS가 없어도 부신피질과 신장에서 나타날 수 있지만, 대뇌피질과 선조체에 분포하는 NADPH-d 함유신경원은 NOS와 일치하는 것으로 알려졌다²⁴⁻²⁵⁾. 즉 NO를 만드는 효소인 NOS를 함유한 신경세포는 NADPH-d 조직화학을 통하여 염색할 수 있으며 NOS의 효소 활성은 NADPH-d 활성도와 비례한다는 보고가 있어 본 실험에서 NADPH-d의 활성도를 측정하였다²⁶⁾.

알코올은 중추신경계를 손상시킬 뿐 아니라 영아기의 고농도 알코올 노출은 뇌의 중량을 감소시키고 중추신경세포를 손상시킬 수 있으며²⁷⁾, 뇌 신경세포를 사멸시키고, 뇌 성장 발달과정에 투여된 에탄올은 뇌 신경세포의 사멸성 신경퇴행을 유발시킨다고 하였으며²⁸⁾, Groul²⁹⁾은 신생아 시 알코올에 노출되면 소뇌 과립세포에서 NMDA를 감소시킨다고 보고하였다.

Bonthius²⁾와 West²⁷⁾는 흰쥐를 선택하여 뇌가 급속히 성장하는 생후 4~9일 동안 매일 하루에 4회나 2회에 걸쳐 4.5g/kg 용량의 알코올을 투여시킨 집단과 6.6g/kg의 알코올을 투여시킨 두 집단을 비교한 결과, 매일 저용량의 알코올(4.5g/kg)을 투여시켰던 흰쥐가 고용량의 알코올(6.6g/kg)을 투여시켰던 흰쥐보다 오히려 뇌 중량을 더욱 감소시켰고 뇌 신경세포도 손상시켰다고 보고하였다. 또한 Bonthius²⁾는 생후 4~10일에 해당되는 흰쥐에게 12번 식사 중 매일 4회에 걸쳐 또는 2회에 걸쳐 저용량의 알코올 농도(4.5g/kg)을 투여시킨 후 평균 혈중 알코올 농도를 측정된 결과 알코올 농도가 190.7mg/dl로 나타났으며 해마의 CA1 피라미드 신경세포를 손상시킨다고 보고하였다.

알코올의 작용은 몇 가지 신경전달물질들과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근 연구에 의하면 NO가 알코올에 의한 행동양상에 관여하는

것으로 알려졌다.

韓醫學으로 술은 水穀의 精微와 熟穀之液을 발효시켜서 만들며, 甘辛苦淡, 大熱한 性味が 있다. 熱飲하면 傷肺하나 溫飲하면 和中하고, 적게 마시면 和血行氣, 壯神禦寒하며, 遊興消愁, 辟邪逐穢하고, 水藏을 따뜻하게 하며 藥勢를 行한다³⁰⁾고 하여 적당량의 음주는 건강에 도움이 되고 藥力을 行한다고 하였다. 그러나 過飲하면 傷神耗血, 損胃燦精하고, 火를 動하고, 痰을 만들며, 怒를 발하고, 慾心을 북돋고, 濕熱을 일으키며 여러 가지 병에 이르게 된다³¹⁾고 하여 현대 의학에서 과량의 에탄올 섭취로 여러 가지 질환이 유발되는 것과 유사함을 알 수 있다. 한의학에서 음주로 인해 발생한 질환을 酒傷이라 하는데, 李¹⁰⁾는 酒傷病에 대하여 治法으로 發散汗出하고 다음으로 利小便하여 其濕을 上下로 分消하는 것을 원칙으로 하였다.

對金飲子は 宋代 《太平惠民和劑局方》¹¹⁾에 처음 소개된 처방으로 “益氣, 健脾進食, 和胃祛痰, 自然營衛調暢”의 효능이 있어 治酒食傷¹²⁾하는 처방으로 활용되고 있다. 王³²⁾은 脾胃의 병변에 腹脹身重, 食慾不振, 肢痠, 浮腫이 있을 때 응용한다 하였고, 張¹²⁾은 對金飲子가 胃强邪實한 경우에 응용하므로 常服은 하지 말라고 하였으며, 許¹³⁾는 對金飲子가 酒食傷을 治하고 和胃消痰의 작용을 한다고 하였다. 《太平惠民和劑局方》¹¹⁾에서의 약물은 陳皮, 蒼朮, 厚朴, 甘草로 구성되어 있으나, 醫家들에 따라 처방의 구성약물이나 용량에는 조금씩 차이가 있다. 본 실험에 사용한 對金飲子는 許¹³⁾의 《東醫寶鑑》에 기재된 구성약물과 용량을 따라 실험에 사용하였다. 이 처방에 사용된 약물의 효능을 살펴보면 陳皮는 溫無毒하고 味苦辛한데, 脾, 胃, 肺經으로 들어가서 理氣健脾, 燥濕化痰, 調中快膈, 導滯消痰, 定喘止嗽, 利水破癥, 宣通五臟하고, 蒼朮은 脾, 胃, 肺, 大腸, 小腸經에入하여 燥濕健脾, 祛風濕, 發汗除濕, 升發胃中陽氣, 止吐瀉, 逐痰水, 散風寒濕한다. 厚朴은 脾, 胃, 大腸經에入하여 燥濕散滿, 行氣降逆, 平胃調中, 消痰化食, 行結水, 破宿血, 散風寒하고, 甘草는 肝, 脾經에入하여 補中益氣, 瀉火解毒, 潤肺祛痰, 緩和藥性, 緩急定痛, 補三焦元氣, 散表寒, 生肌止痛, 通行十二經, 諸腫瘡瘍, 解百藥毒한다³³⁻³⁴⁾.

종합해보면 對金飲子の 전체적인 方義는 滲濕利尿하고 健脾除濕하며 消食醒酒하여 알코올로 유발된 손상에 적합한 方劑라고 사료된다. 유³⁵⁾는 에탄올로 인한 간손상에 對金飲子와 그 개별 구성약재들이 유

호한 효과가 있다고 보고하였고, 황¹⁴⁾은 對金飲子가 스트레스와 에탄올로 기인된 공장 점막 손상에 대한 방어작용을 가지며, 그 결과 이차적인 급성 염증성 점막손상을 차단한다고 보고하였으며, 김¹⁵⁾은 對金飲子가 알코올성 간손상에 대한 억제효과가 있다고 보고하였다.

이에 본 실험에서는 흰쥐에게 에탄올을 투여하여 중독을 유발한 후 對金飲子를 투여하였을 때 해마의 각 영역에서 신경세포의 생성과 NOS 신경세포의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

혈중 알코올 농도를 측정하였을 때 대조군에서만 알코올이 검출되었다. 이는 알코올로 인해 뇌 신경세포의 발생 및 신경가역성 등에 부정적인 영향을 미쳐 중추신경계를 손상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

해마 치상회에서 BrdU 양성세포수를 관찰한 결과 실험군 B, C에서 대조군에 비해 유의한 증가를 보여 對金飲子가 알코올 중독으로 손상된 뇌 신경세포의 생성을 증가시키는 것으로 사료된다.

해마에서 NADPH-d 양성세포수를 관찰한 결과 치상회에서는 실험군 C만 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으며, CA1 영역에서는 실험군 A, B, C 모두 유의한 증가를 보였고, CA 2-3 영역에서는 실험군 B, C가 유의한 증가를 보여 對金飲子가 알코올로 인해 손상된 해마에서 NOS 신경세포의 발현을 증가시키는 것으로 사료된다.

이상의 결과들로 보아 김³⁶⁾의 실험과 같이 흰쥐에게 에탄올을 투여했을 때 해마에서 뇌 신경세포의 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 정³⁷⁾의 실험과 같이 NOS 신경세포의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 에탄올로 인해 해마의 신경세포가 손상되었을 때 對金飲子를 투여하면 뇌 신경세포의 생성을 증가시키고 NOS 신경세포의 발현을 증가시키는 것으로 확인되어 결국 對金飲子가 알코올로 인한 뇌 신경세포의 손상을 감소시키고 회복을 증가시키고, 이와 연관된 기억과 학습능력의 저하를 방어할 수 있을 것으로 사료되며, 이러한 결과를 바탕으로 향후 뇌 기능을 회복시키고 손상을 감소시키는 한방적인 치료법들에 대해 지속적인 연구와 논의가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

對金飮子が 알코올 중독 흰쥐의 해마에서 뇌 신경세포 생성과 NOS 신경세포 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 면역조직화학을 통한 해마의 CA1, 2-3, 치상회 영역의 BrdU 양성세포, NAPDH-d 양성세포수를 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 치상회에서 BrdU 양성세포수는 對金飮子を 투여한 실험군 B, C가 유의성 있게 증가하였다.
2. 치상회에서 NAPDH-d 양성세포수는 對金飮子を 투여한 실험군 C가 유의성 있게 증가하였다.
3. CA1 영역에서 NAPDH-d 양성세포수는 對金飮子を 투여한 실험군 A, B, C 모두 유의성 있게 증가하였다.
4. CA2-3 영역에서 NAPDH-d 양성세포수는 對金飮子を 투여한 실험군 B, C가 유의성 있게 증가하였다.

이상의 결과를 바탕으로 실험동물에 알코올을 투여시 해마에서 뇌 신경세포의 생성과 NOS 신경세포의 발현성이 정상군보다 억제됨을 알 수 있었다. 그러나 對金飮子を 병용하여 투여한 경우에는 이러한 감소가 다시 증가함을 확인할 수 있었다. 이로써, 알코올 중독으로 유발된 학습 능력과 기억 능력의 저하를 방어하는데 對金飮子が 유효한 영향을 미칠 것으로 사료된다.

VI. 참고 문헌

1. Jang MH, Shin MC, Jung SB, Lee TH, Bahn GH, Kwon YK, Kim EW, Kim CJ. Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport*. 2002 ; 13(12) : 1509-1513.
2. Bonthius DJ, Woodhouse J, Bonthius NE, Taggard DA, Lothman EW. Reduced seizure threshold and hippocampal cell loss in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt. *Alcohol Clinical Experience Research*. 2001 ; 25(1) : 70-82.
3. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*. 1965 ; 124 : 319-335.
4. Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *Journal of Neurobiology*. 1998 ; 36 : 249-266.
5. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson D, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*. 1998 ; 4 : 1313-1317.
6. 이원철 외. 간계내과학. 서울 : 동양의학연구원 1997 : 197, 598-611.
7. 王冰 註. 黃帝內經. 서울 : 高文社. 1971 : 31, 141, 329.
8. 張仲景. 金匱要略. 서울 : 성보사. 1985 : 74-76, 119-120.
9. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 臺中 : 國際書局. 1976 : 卷十二 : 7, 卷二十 : 13.
10. 李時珍. 圖解 本草綱目. 서울 : 高文社. 1983 : 1055-1056.
11. 徽宗. 太平惠民和劑局方. 北京 : 中國中醫藥出版社. 1996 : 48-49.
12. 張景岳. 景岳全書(上). 서울 : 대성문화사. 1992 : 417.
13. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 여강출판사. 2003 : 1680.
14. 황태현, 최준혁, 임성우. 에탄올과 스트레스로 유발된 생쥐의 공장 점막 손상에 대한 對金飮子の 방어효과. 대한한방내과학회지. 2003 ; 24(4) : 735-746.
15. 김영철, 우홍정, 김병운. 加味對金飮子の 효능에 관한 실험적 연구. 경희한의대논문집. 1993 ; 16 : 7-29.
16. 현성용. 해마의 기능에 관한 이론적 고찰. 사회문화연구. 1991 ; 10 : 91-107.
17. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat, age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience*. 1996 ; 16 : 2027-2033.
18. Gould E, Tanapat P, Rydel T, Hastings N. Regulation of hippocampal Neurogenesis

- in adulthood. *Biological Psychiatry*. 2000 ; 48 : 715-720.
19. Gould E, Tanapat P, McEwan BS, Flugge F, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of The National Academy of Science of the USA*. 1998 ; 95 : 3168-3171.
 20. Cameron HA, Gould E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience*. 1994 ; 61 : 203-209.
 21. Schuman EM, Madison DV. Nitric oxide and synaptic function. *Annual Review of Neuroscience*. 1994 ; 17 : 153-183.
 22. Feldman PL, Griffith OW, Sheuhr DJ. The suprising life of nitric oxide. *Chemical and Engineering News*. 1993 : 26-38.
 23. McCann SM, Licinio J, Wong ML, Yu WH, Karanth S, Rettori V. The nitric oxide hypothesis of aging. *Experimental Gerontology*. 1998 ; 33(7-8) : 813-826.
 24. Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 1991 ; 88 : 2811-2814.
 25. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhu M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 1991 ; 88 : 7797-7801.
 26. Bicker G. NO News from insect brains. *Trends in Neurosciences*. 1998 ; 21 : 349-355.
 27. West JR, Goodlett CR, Bonthius DJ, Pierce DR. Manipulating peak blood alcohol concentrations in neonatal rats : review of an animal model for alcohol related developmental effects. *Neurotoxicology*. 1989 ; 10(3) : 347-365.
 28. Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimura MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Strfovska V, Horster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*. 2000 ; 287 : 1056-1060.
 29. Groul DL, Ryabini AE, Parsons KL, Cole M, Wilson MC, Qui Z. Neonatal alcohol exposure reduces NMDA induced Ca²⁺ signal in developing cerebellar granule neurons. *Brain Research*. 1998 ; 793 : 12-20.
 30. 黃宮綉. 本草求真. 北京 : 人民衛生出版社. 1987 : 210-212.
 31. 楊東喜. 本草備要解析. 6版. 新竹市 : 國興出版社. 1984 : 22-27, 475-481.
 32. 王昂. 醫方集解. 台北 : 們光圖書有限公司. 1961 : 336.
 33. 이상인 외. 本草學. 서울 : 修書院. 1981 : 197, 198.
 34. 上海中醫學院. 本草藥學. 上海 : 商務印書館. 1983 : 54, 222, 223, 226, 227.
 35. 유기원, 구분홍. 주상병에 응용되는 加味對金 飮子が Ethanol로 인한 백서의 간손상에 미치는 영향. *경희한의대논문집*. 1980 ; 3 : 1-14.
 36. 김연희, 김이화, 장미현, 임백빈, 김연정, 정주호, 서정철, 김창주. 갈화 약침이 알콜 중독 흰쥐의 치상회에서 신경세포 생성에 미치는 영향. *대한침구학회지*. 2001 ; 18(6) : 206-214.
 37. 정재훈, 김호현, 이은용. 갈근약침이 알콜 중독 백서 해마의 Nitric Oxide Synthase에 미치는 영향. 2003 ; 20(4) : 1-10.