

## 人蔘養營湯의 산화적 stress에 대한 뇌세포 보호효과

경희대학교 한의과대학 한방부인과학 교실

김승현, 이창훈, 이진무, 조정훈, 장준복, 이경섭

### ABSTRACT

#### Neuroprotective Effect of *Insamyangyung-tang*

Seung-Hyun Kim, Chang-Hoon Lee, Jin-Moo Lee,  
Jung-Hoon Cho, Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee

Dept. of Oriental Medicine, Graduate School, Kyung Hee University

**Purpose:** Oxidative stress was thought to play a critical role in neurodegenerative disease. Many *in vivo* and *in vitro* reports explained the possible pathway of human aging. But in therapeutic aspects, there was no clear answers to prevent aging associated with neural diseases. In this study, we investigated the antioxidant and neuroprotective effects of the *Insamyangyung-tang* (IYT).

**Methods:** To estimate the antioxidant effects, we carried out 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical cation decolorization assay, and measurement of total polyphenolic content. To evaluate neuroprotective effect of IYT *in vitro*. We performed thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay, reactive oxygen species (ROS) creation in SH-SY5Y. Tyrosine hydroxylase (TH) immunocytochemistry, nitric oxide (NO) assay, and TNF- $\alpha$  assay in primary rat mesencephalic dopaminergic neurons.

**Results:** The IC<sub>50</sub> values were 571.6 $\mu$ g/ml and 202.3 $\mu$ g/ml in DPPH and ABTS assay respectively. Total polyphenolic content was 1.05%. In SH-SY5Y culture, IYT significantly increased the decreased cell viability by 6-OHDA at the concentrations of 10  $\mu$ g/ml in pre-treatment group, 10-100 $\mu$ g/ml in post-treatment group, and 100 $\mu$ g/ml in co-treatment group. The production of ROS induced by 6-OHDA was significantly inhibited in IYT treated group. In mesencephalic dopaminergic cell culture, the IYT group reduced the dopaminergic cell loss against 6-OHDA toxicity and the production of NO and TNF- $\alpha$  at the concentration of 0.2 $\mu$ g/ml.

**Conclusion:** These results showed that IYT has antioxidant and neuroprotective effects in the dopaminergic cells through decreasing the production of ROS, NO and TNF- $\alpha$  which can cause many neurodegenerative changes in brain cell.

**Key words:** *Insamyangyung-tang*, Antioxidative, Neuroprotective effect, Herbs, ROS.

## I. 緒 論

인간의 평균 수명이 점진적으로 늘어남에 따라 전체 인구 중에서 노인이 차지하는 비율이 증가하고 있다<sup>1,2)</sup>. 50세 이상의 연령층에서는 여성 인구가 남성 인구보다 증가되어 70세 이상에서는 2배 이상의 비율을 차지 하여<sup>3)</sup> 폐경이후 삶의 질에 관한 관심이 높아지고 있다<sup>4)</sup>.

노화는 각 장기들의 항상성이 점차 손상되는 것으로 과도한 산화 스트레스와 염증반응으로 인한 DNA의 손상, 단백질 손상, mitochondria의 기능 이상 및 지질 과산화 등이 원인으로 제기되고 있다<sup>1,5)</sup>. 인간의 뇌는 단위세포 당 산소 함량이 높아 산화 스트레스에 취약한 특징을 가지며<sup>6-10)</sup> 특히 여성은 폐경 이후 에스트로겐이 감소하여 뇌세포에 대한 항산화, 항염증 및 신경전달물질 분비 작용을 저하시켜 대뇌 인지기능에 영향을 끼치는 것으로 보여 진다<sup>11-13)</sup>. 폐경기 이후 처방되는 에스트로겐은 기억, 인지력, 감정에 영향을 미치고 치매나 우울, 파킨슨 질환과 같은 뇌의 퇴행성 질환에 대한 작용이 있는 것으로 알려져 있다<sup>14,15)</sup>.

여성의 특징적인 생리증상인 월경의 근본은 衝脈에 있고 衝任脈이 허손하여 발생하는 폐경은 心脾虛로 인한 血虛의 특징을 지니게 된다<sup>16)</sup>. 人蔘養營湯은 폐경 여성의 心脾兩虛로 인한 上熱感, 發汗, 無氣力, 기억력 감퇴 등의 증상<sup>17)</sup>에 활용되어 임상적으로 갱년기 장애 중 정신증상의 호전효과<sup>18)</sup>가 보고된 바 있다. 실험적으로는 人蔘養營湯의 항암작용에 대한 연구와<sup>19)</sup> 人蔘養營湯 구성 약물들의 항산화 효과 및 뇌세포보호 효과가 보고되어<sup>12,19-28)</sup>, 폐경 이후 호르몬 변화

에 따른 기억력 감퇴 등 정신증상과 관련된 뇌세포 보호효과가 기대되나, 이에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

이에 저자는 人蔘養營湯의 뇌신경세포에 대한 보호효과를 알아보고자, 人蔘養營湯 추출물의 항산화 효과 및 human neuroblastoma cell과 태아중뇌 도파민 세포에서 6-OHDA로 유도된 세포 독성에 대한 보호효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 藥材와 材料

#### 1) 藥 材

실험에서 사용한 人蔘養營湯은 <東醫寶鑑><sup>29)</sup>의 處方에 의해 구성되었으며 각 약재들은 경희대학교 한의과대학 부속한방병원 약재과에서 구입하여 사용하였고, 약재의 구성과 1貼의 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. The contents of *Insamyangyung-tang*

Herbs	Pharmaceutical name	Amount (g)
白芍藥	Paeony Root	8
當 歸	Angelica Gigas Root	4
人 蔘	Ginseng	4
白 朮	Atractylodes Rhizoam White	4
黃 芪	Astragalus Root	4
肉 桂	Cinnamon Bark	4
陳 皮	Citrus Unshiu Peel	4
甘 草	Licorice	4
生 薑	Zingiberis Rhizoma Crudus	4
防 風	Saposhnikovia Root	3
五味子	Shisandra Fruit	3
熟地黃	Prepared Rehmannia Root	3
遠 志	Polygala Root	2
Total amounts		51

## 2) 試料의 製造

人蔘養營湯 1貼 분량 (51g)에 증류수 510ml를 가하여 100℃에서 2시간 동안 환류추출 한 후, Whatman filter #2를 이용하여 여과하였다. 여과액을 55℃에서 감압 농축 (R-200; Buchi. Flawil, Switzerland)하여 얻은 시료를 -60℃에서 동결 건조 (FDU-550R; Eylea Co., Tokyo, Japan)하여 人蔘養營湯 추출물 7.82g(수득율 15.34%)을 얻었으며, -20℃에서 보관하여 매 실험 시 일정용매에 녹인 후 사용하였다.

## 3) 試 藥

항산화 효과 연구에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (이하 DPPH), 2,2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (이하 ABTS), potassium persulfate, tannic acid, folin 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Neuroblastoma cell 보호효과 연구에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (이하 DMEM), minimum essential medium (MEM), fetal bovine serum (이하 FBS), 1% penicillin/streptomycin 등은 Gibco Industries Inc. (Auckland, New Zealand)에서, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (이하 MTT), 6-hydroxydopamine (이하 6-OHDA), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub> DCF-DA), dimethyl sulfoxide (이하 DMSO) 및 Griess reagent 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하였다.

Primary culture에 사용한 para-formaldehyde (이하 PFA), poly-L-lysine (이하 PLL) 및 diaminobenzidine (이하 DAB) 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서,

biotinylated anti-rabbit antibody, normal goat serum, avidin biotin peroxidase complex (이하 ABC) standard kit 등은 Vector laboratories (Burlingame, USA)에서, rat tumor necrosis factor- $\alpha$  (이하 TNF- $\alpha$ ) ELISA kit는 Invitrogen Corp. (Carlsbad, USA)에서, tyrosine hydroxylase (이하 TH)-rabbit in goat primary antibody는 Chemicon International Inc. (Temecula, USA)에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 方 法

## 1) 항산화 측정

## (1) DPPH free radical inhibition assay

DPPH free radical inhibition activity를 측정하기 위해 0.2mM DPPH ethanolic solution 100 $\mu$ l에 농도별 人蔘養營湯 추출물(1, 10, 100, 500 및 1000 $\mu$ g/ml)을 100 $\mu$ l씩 가하여 반응시켰다. 반응 30분 후 37℃에서 spectrophotometer (Versamax; Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용하여 517nm에서의 흡광도를 측정하였다. Ac는 control군의 흡광도이고 As는 人蔘養營湯을 함께 반응시켰을 때의 흡광도이며, IC<sub>50</sub> 은 DPPH free radical 소거가 50% 이루어졌을 때의 농도이다.

*DPPH free radical inhibition activity (%)*

$$= \frac{Ac - As}{Ac} \times 100$$

## (2) ABTS radical cation inhibition assay

ABTS cation inhibition activity를 측정하기 위해 7mM ABTS와 2.45mM potassium persulfate를 혼합하여 상온의 암실에서 24시간 반응시켰다. ABTS와

potassium persulfate 혼합액을 pH 7.4의 phosphate buffer saline(이하 PBS)로 희석하여 732nm에서의 흡광도 값이  $0.70 \pm 0.02$  가 되게 하였다. 희석된 용액 950 $\mu$ l에 농도별 人蔘養營湯(1, 10, 100, 500 및 1000  $\mu$ g/ml)을 각각 50 $\mu$ l를 가하여 5분간 상온에서 반응시킨 후 spectrophotometer로 732nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS cation inhibition activity를 아래와 같이 계산하였고, IC<sub>50</sub>도 측정하였다.

$$ABTS \text{ cation inhibition activity}(\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

(3) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해 人蔘養營湯 抽出物 10mg/ml를 증류수를 이용해 희석하여 2N folin 200 $\mu$ l와 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2ml를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 암실에서 방치한 후 spectrophotometer를 이용하여 725nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 함량을 구하였다.

2) SH-SY5Y 세포에 대한 보호 효과 측정

(1) 세포배양

American Type Culture Collection (Rockville, USA)로부터 human neuroblastoma인 SH-SY5Y를 분양 받아, 60mm dish에서 10% (v/v) FBS, 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 DMEM으로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

(2) Cell viability

96 well plate에  $2.5 \times 10^4$  /well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 48 시간 배양 후, 농도별 人蔘養營湯 抽出物(1, 5, 10, 25, 50 및 100 $\mu$ g/ml)

100 $\mu$ l를 PBS에 녹여 24시간 동안 배양하였다. 이 후 MTT 1mg/ml를 처리하여 3시간 배양한 다음 DMSO로 생성된 formazan을 녹여 15분간 shaking 하고 spectrophotometer를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였으며, 생존율은 무처리 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

(3) 6-OHDA에 대한 cell viability

96 well plate에  $2.5 \times 10^4$  /well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 48시간 배양 후 농도별 人蔘養營湯 抽出物 (1, 5, 10, 25, 50 및 100 $\mu$ g/ml) 100 $\mu$ l와 6-OHDA를 처리하였다. 이 때 pre-treatment군은 농도별 人蔘養營湯 抽出物을 가한 다음 21시간 후 6-OHDA 200 $\mu$ M을 가하여 3시간 처리 하였고, co-treatment군은 농도별 人蔘養營湯 抽出物과 6-OHDA 150 $\mu$ M을 가한 후 동시에 24시간 배양하였으며, post-treatment군은 먼저 6-OHDA 150 $\mu$ M을 처리하고 3시간 후 농도별 人蔘養營湯 抽出物을 21시간 배양하였다. 그 후 MTT 1mg/ml를 처리하여 3시간 배양하고, 생성된 formazan을 DMSO로 녹여 15분간 shaking하였다. Spectrophotometer를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 생존율은 무처리 대조군에 대한 백분율 (%)로 표시하였다.

(4) 6-OHDA에 의한 ROS 생성

ROS 측정은 H<sub>2</sub> DCF-DA를 사용해 fluorescence를 측정하는 방법을 이용하였다. 96 well plate에  $2.5 \times 10^4$ /well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 48 시간 배양 후 농도별 人蔘養營湯 抽出物(5, 10 및 25 $\mu$ g/ml) 100 $\mu$ l를 처리하였다. PBS로 세척 후, 10 $\mu$ M H<sub>2</sub> DCF-DA를 넣어 30분 배양하였다.

PBS로 세척 후, 200 $\mu$ M의 6-OHDA를 처리하여 0, 15, 30, 60 및 120분에서 fluorescence excitation 495nm, emission 530nm로 측정하였다.

3) 태아중뇌세포에 대한 세포 보호 효과 측정

(1) 태아중뇌세포 배양 및 약물처리

Orient Bio. (Osan, Korea)에서 14일 된 Sprague-Dawley 태아를 구매하여 forceps으로 태아 중뇌 조직을 얼음위에서 박리하고 10% FBS를 포함한 MEM에 모은 후, pipet을 이용하여 기계적으로 dissociation하였다. 조직에 trypsin을 처리하여 세포 수를 counting 한 후, PLL로 미리 coating한 coverslip에 1.5 $\times$ 10<sup>5</sup>의 조직을 seeding 한 다음, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 5일 간 배양하였다. FBS가 없는 MEM에서 태아중뇌세포에 0.2와 1 $\mu$ g/ml의 人蔘養營湯 추출물을 가하고 6시간 배양 후 10 $\mu$ M의 6-OHDA를 처리하였다. 18시간 후 4% PFA로 고정한 다음 pH 7.2의 PBS로 세척하였다.

(2) TH immunohistochemistry

세척된 태아중뇌세포를 1% bovin serum albumin과 normal goat serum으로 blocking한 후, 0.1% Triton X-100과 normal goat serum을 포함하는 PBS로 primary antibody (1:2,000 rabbit anti rat TH)를 희석하여 세포와 상온에서 반응 시켰다. 일정시간이 지난 뒤 PBS로 세척한 후 secondary antibody인 biotinylated anti rabbit IgG(H+L)을 반응 시켰으며 PBS 세척을 거쳐 ABC solution에서 90분간 반응시킨 후 DAB에 5분간 발색시켰다. Gelatin-coated slide에 coverslip을 mounting 후, 각 군당 무작위로 4개를 선택하고 각 sample

당 9구역에서 현미경 (Axioskop 2; Carl Zeiss Inc., Göttingen, Germany)를 이용하여 세포수를 계측 (400X) 후, 무처리 대조군에 대한 백분율 (%)로 표시하였다.

(3) NO assay

태아중뇌세포에 0.2와 1 $\mu$ g/ml의 人蔘養營湯 추출물 및 10 $\mu$ M의 6-OHDA를 처리하여 20 시간 배양한 다음, 배양액 100 $\mu$ l을 회수하여 Griess reagent 100 $\mu$ l를 첨가하고 상온 암실에서 10분간 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 sodium nitrite를 이용해 표준곡선을 그려 NO 농도를 결정하였다.

(4) TNF- $\alpha$  assay

태아중뇌세포에 0.2와 1 $\mu$ g/ml의 人蔘養營湯 추출물 및 10 $\mu$ M의 6-OHDA를 처리하여 20시간 배양한 다음, 배양액 50  $\mu$ l를 incubation buffer 50 $\mu$ l, diluent buffer가 포함된 rat TNF- $\alpha$  항체코팅 96 well plate에 가하였다. 추가로 rat TNF- $\alpha$  biotin conjugate 50 $\mu$ l를 가하여 상온에서 1시간 진탕 배양 후 세척액으로 4회 세척하고, thymol을 포함한 streptavidin peroxidase 희석액 100 $\mu$ l를 가하여 상온에서 45분 진탕 배양 후 세척액으로 4번 세척하였다. 이 후 TMB substrate 용액 100 $\mu$ l를 가하여 암실에서 30분 동안 진탕 배양 후 stop solution 100 $\mu$ l를 가하여 반응시켰다. 반응 종결 후 ELISA leader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 0pg/ml~1,000pg/ml의 TNF- $\alpha$  standard를 이용한 standard curve에 측정된 흡광도를 대입하여 TNF- $\alpha$ 의 농도 (pg/ml)를 구하였다.

### 3. 통계처리

실험 결과는 SPSS ver 12.0K for windows를 이용하여 one-way ANOVA test로 통계적 유의성을 검증하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 하였다.

## III. 結 果

### 1. 항산화 효과

#### 1) DPPH free radical inhibition activity

농도별 人蔘養營湯 추출물의 DPPH free radical inhibition activity를 측정된 결과 농도 의존적으로 증가하여 최대 활성은  $1,000\mu\text{g/ml}$ 에서 95.66%로 나타났으며,  $IC_{50}$ 은  $571.6\mu\text{g/ml}$ 이었다(Fig. 1).

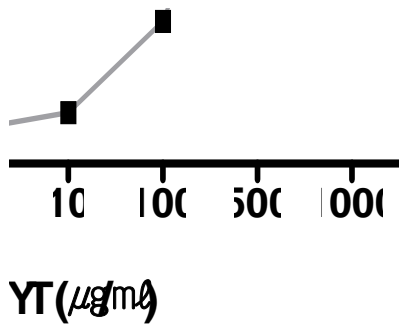


Fig. 1. Effect of *Insamyangyung-tang* (IYT) on decreasing DPPH free radical generation

#### 2) ABTS radical cation inhibition activity

농도별 人蔘養營湯 추출물의 ABTS cation inhibition activity를 측정된 결과 농도 의존적으로 증가하여 최대 활성은  $1,000\mu\text{g/ml}$ 에서는 94.11%로 나타났으며  $IC_{50}$ 은  $202.3\mu\text{g/ml}$ 이었다(Fig. 2).

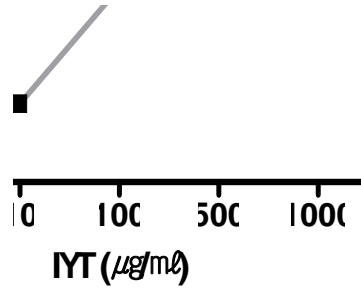


Fig. 2. Effect of IYT on decreasing ABTS radical generation

#### 3) 총 폴리페놀 함량

$10\text{mg/ml}$  人蔘養營湯 추출물의 total polyphenolic contents를 tannic acid 표준곡선으로부터 구한 결과 1.05%로 나타났다.

### 2. SH-SY5Y 세포 보호 효과

#### 1) Cell viability

농도별 人蔘養營湯 추출물의 SH-SY5Y cell에 대한 cell viability를 측정된 결과, 5,  $10\mu\text{g/ml}$  人蔘養營湯 추출물에서 각각 90.89, 89.83%의 cell viability로 통계적으로 유의한 ( $p < 0.01$ ) 감소를 보였고, 25, 50 및  $100\mu\text{g/ml}$  人蔘養營湯 추출물에서도 92.53, 92.98 및 92.03%의 cell viability로 통계적으로 유의한 ( $p < 0.05$ ) 감소를 나타내었다(Fig. 3).

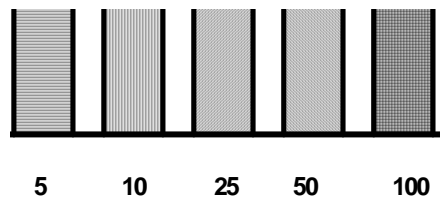


Fig. 3. Dose-dependent effect of IYT treatment on the viability of SH-SY5Y cells

2) 6-OHDA에 대한 cell viability

SH-SY5Y cell에서 농도별 人蔘養營湯 추출물 처리에 따른 6-OHDA에 대한 cell viability를 측정 한 결과 人蔘養營湯 추출물 pre-treatment 군의 경우 6-OHDA 200 $\mu$ M 단독에 의한 cell viability는 control에 비해 57.32%로 감소되었고, 10 $\mu$ g/ml의 人蔘養營湯 추출물 투여군에서 6-OHDA 단독 투여군에 비해 cell viability가 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.01$ ).

人蔘養營湯 추출물 co-treatment군의 경우 6-OHDA 150 $\mu$ M 단독에 의한 cell viability는 control에 비해 36.10%로 감소되었고, 100 $\mu$ g/ml의 人蔘養營湯 추출물 투여군에서 6-OHDA 단독 투여군에 비해 cell viability가 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ).

人蔘養營湯 추출물 post-treatment군의 경우 6-OHDA 150 $\mu$ M 단독에 의한 cell viability는 control에 비해 36.13%로 감소되었고, 1 $\mu$ g/ml의 人蔘養營湯 추출물 투여군을 제외한 모든 경우에서 6-OHDA 단독투여군에 비해 cell viability가 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ )(Fig. 4).

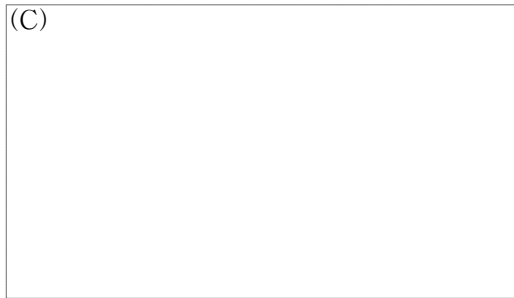
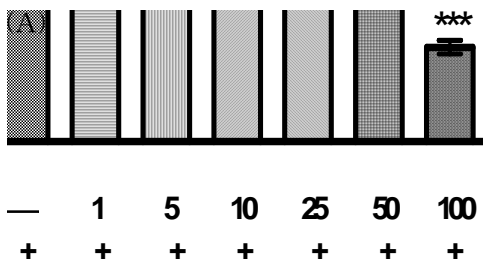


Fig. 4. Effect of IYT on the viability of 6-OHDA treated SH-SY5Y cells. (A) Cell viability of IYT pre-treatment (B) Cell viability of IYT and 6-OHDA co-treatment (C) Cell viability of IYT post-treatment  
###:  $p < 0.001$ , #: compared with control, \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$  and \*:  $p < 0.05$ , \*: compared with 6-OHDA treated group

3) 6-OHDA에 대한 ROS inhibition activity

농도별 人蔘養營湯 추출물에 따른 ROS의 변화를 6-OHDA에 반응하는 시간에 따라 H<sub>2</sub> DCF-DA를 사용하여 측정 한 결과, 6-OHDA 단독으로 처리한 군에서 control에 비해 통계적으로 유의한 수준의 ROS 증가를 나타내었으나, 5, 10 및 25 $\mu$ g/ml 人蔘養營湯 추출물 처리군에서 ROS의 생성은 6-OHDA를 단독으로 처리한 군에 비해 30, 60 및 120분에서 통계적으로 유의하게 억제되었다 (Fig. 5).

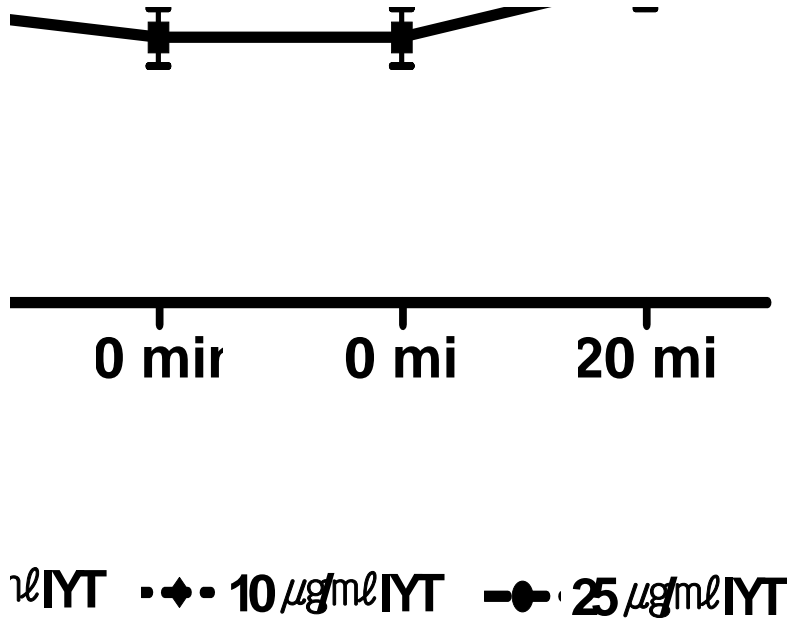


Fig. 5. ROS inhibitory effect of IYT group

###:  $p < 0.001$ , #: compared with control

\*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$  and \*:  $p < 0.05$ , \*: compared with 6-OHDA treated group

### 3. 태아중뇌세포에 대한 세포보호 효과

#### 1) TH positive 세포 수

태아중뇌세포를 이용하여 人蔘養營湯 추출물의 6-OHDA에 대한 TH positive 세포수를 측정된 결과, 6-OHDA 10 $\mu\text{M}$ 을 단독의 경우 control에 비하여 32.01%로 통계적으로 유의하게( $p < 0.001$ ) 도파민세포의 분화 및 생존을 억제시켰다. 6-OHDA와 농도별 人蔘養營湯 추출물을 처리한 결과, 6-OHDA 단독에 비하여 0.2 $\mu\text{g/ml}$  人蔘養營湯 추출물에서 47.92%로 통계적으로 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 도파민세포를 증가시켰다(Fig. 6, 7).

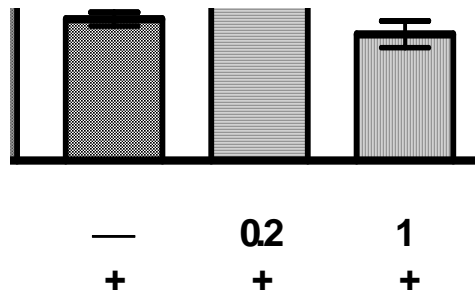


Fig. 6. TH positive cell count of 6-OHDA and IYT treated esencephalic

###:  $p < 0.001$ , #: compared with control

\*\*\*:  $p < 0.001$ , \*: compared with 6-OHDA treated rroup



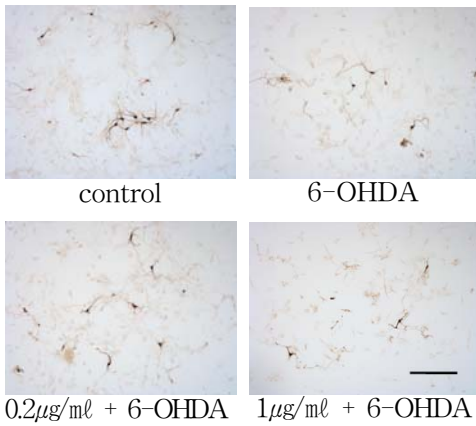


Fig. 7. Neuroprotective effect of IYT in mesencephalic dopaminergic neurons against neurotoxicity induced by 6-OHDA. Scale bar=250µm

2) NO inhibition 효과

태아중뇌세포를 이용하여 人蔘養營湯 추출물의 6-OHDA 처리 후 배양액 내 NO의 농도를 측정 한 결과, 6-OHDA 10µM 단독의 경우 control에 비하여 132.48%로 통계적으로 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 증가되었다.

6-OHDA와 농도별 人蔘養營湯 추출물을 처리한 경우 6-OHDA 단독에 비해 0.2µg/ml 人蔘養營湯 추출물에서 통계적으로 유의하게 ( $p < 0.01$ ) NO가 감소되었다(Fig. 8).

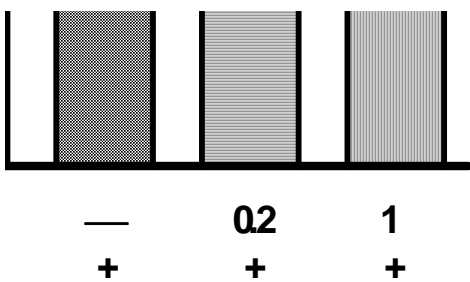


Fig. 8. Inhibitory effect of IYT on the NO production in 6-OHDA-induced

mesencephalic cell

###:  $p < 0.01$ , #: compared with control

\*\* :  $p < 0.01$ , \*: compared with 6-OHDA treated group

3) TNF-α inhibition 효과

태아중뇌세포에 人蔘養營湯 추출물과 6-OHDA를 처리 후 배양액 내 TNF-α의 농도를 관찰한 결과, 6-OHDA 10µM 단독의 경우  $4.90 \pm 0.26 \text{ pg/ml}$ 로 control에 비하여 증가되었다.

6-OHDA와 농도별 人蔘養營湯 추출물을 처리한 경우 6-OHDA 단독에 비해 0.2µg/ml 人蔘養營湯 추출물에서  $2.34 \pm 0.69 \text{ pg/ml}$ 로 통계적으로 유의하게 ( $p < 0.01$ ) TNF-α가 감소되었고, 1µg/ml 人蔘養營湯 추출물에서도  $3.00 \pm 0.56 \text{ pg/ml}$ 로 통계적으로 유의하게 ( $p < 0.05$ ) TNF-α가 감소되었다(Fig. 9).

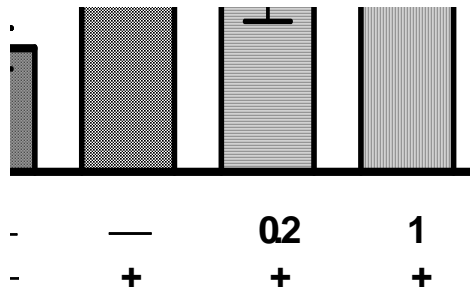


Fig. 9. Inhibitory effect of IYT on TNF-α production in 6-OHDA-induced mesencephalic cell

###:  $p < 0.001$ , #: compared with control

\*\* :  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , \*: compared with 6-OHDA treated group

IV. 考 察

대뇌 인지기능과 감정의 변화로 인한 치매나 우울증은 폐경 여성에게서 많이

나타나는 증상이다. 여성에게 있어 폐경은 호르몬 변화의 결과로 발생하는 증상으로 폐경기의 인지기능의 변화는 노화의 과정 중 나타나는 호르몬의 감소가 대뇌 기능에 영향을 주어 나타난다<sup>11)</sup>.

노화에 관한 이론은 다양하게 발표되고 있으며 과도한 산화작용으로 인한 조직의 손상, 만성적인 염증에 의한 DNA와 단백질의 손상, mitochondria의 기능 이상으로 인한 손상, apoptosis로 인한 손상 등이 제기되고 있다<sup>1,8-10)</sup>. ROS는 mitochondria의 대사 중 자연적으로 발생하는 물질로서 정상적인 상태에서는 체내에서 항산화 효소를 생성하여 과도한 ROS의 생성을 막는다. 그러나 노화로 항상성의 유지가 잘 안되거나 혹은 약물복용 등의 외부 환경으로 인해 발생한 과도한 ROS는 단백질의 이상대사를 일으켜 유전자의 변형을 일으키며 염증 반응을 유발하기도 한다. 즉, 산화적 손상 뿐 아니라 노화로 진행되는 전 과정에서 촉발 요인이나 매개인자로 작용하게 된다. 노화는 한 가지 요인이 아닌 복합적인 과정의 결과로서 진행되나 그 중 산화적 스트레스는 여러 반응들에 직접적 간접적으로 영향을 미치는 요인으로 작용 한다<sup>1,8)</sup>.

人蔘養營湯은 <東醫寶鑑><sup>29)</sup>에 “虛勞로 損證이 되어 氣血이 부족하여 몸이 몹시 여위고 나른하며, 숨이 가쁘고 음식을 적게 먹으며 惡寒과 身熱로 저절로 땀이 나는 것을 치료 한다”고 기재되었다. 구성 약물 중 기존에 발표된 논문들에서 當歸<sup>19)</sup>, 人蔘<sup>12,21,22)</sup>, 白芍藥, 肉桂, 陳皮, 甘草<sup>20)</sup>, 熟地黃<sup>21)</sup>, 白朮<sup>26)</sup>, 五味子<sup>24)</sup>, 黃芪<sup>28)</sup>가 단일 약재로도 일정한 항산화의 작용이 있다고 발표되었으며 生薑<sup>25)</sup>과

遠志<sup>27)</sup>의 뇌세포 보호효과도 발표되었으나, 人蔘養營湯을 이용하여 항산화작용이나 뇌세포 보호효과를 실험적으로 연구한 논문은 없었다.

人蔘養營湯의 항산화 효과 측정을 위해 DPPH와 ABTS radical inhibition activity 실험과 총 폴리페놀의 양을 조사하였다. 농도별 人蔘養營湯 추출물의 DPPH inhibition activity는 농도 의존적으로 증가하였으며 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 95.66%의 활성을 나타냈으며 IC<sub>50</sub>은 571.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. ABTS radical inhibition activity는 농도별 人蔘養營湯 추출물을 가했을 때 농도 의존적으로 증가하였으며 최대 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 94.11%의 활성을 나타냈고 IC<sub>50</sub>은 202.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. ABTS radical cation를 이용한 IC<sub>50</sub> 수치가 DPPH free radical을 사용한 경우보다 높게 나타난 이유는 이 실험에 사용한 약재는 증류수를 사용하여 추출하였기 때문에 수용성, 지용성 모두에 반응하는 ABTS<sup>30)</sup>가 보다 더 반응성이 좋았다. 폴리페놀은 플라보노이드가 풍부한 식물에서 유래하는 천연항산화 물질로 노화에 관련된 질환의 위험성을 낮추어진다고 알려져 있다<sup>31)</sup>. 人蔘養營湯 추출물의 총 폴리페놀은 전체 함량의 1.05% 였다.

SH-SY5Y에서의 6-OHDA에 대한 人蔘養營湯 추출물의 보호효과를 알아보고자 MTT assay를 통한 cell viability를 측정하였다. 人蔘養營湯 추출물만을 처리했을 때 cell viability가 감소하였다. 6-OHDA는 신경독성물질로서 *in-vitro*는 물론 *in-vivo*에서도 dopamine 세포의 degeneration model에 많이 사용하는 물질이다. 6-OHDA와 人蔘養營湯 추출물을 시간차를 두고 처리하여 pre-treatment,

co-treatment and post treatment group 으로 나눈 실험에서, pre-treatment 군에서는 10 $\mu$ g/ml의 人蔘養營湯 추출물을 투여한 군에서 통계적으로 유의하게 증가하였고, co-treatment 군에서는 100 $\mu$ g/ml의 人蔘養營湯 추출물을 투여한 군에서 유의하게 증가하였으며, post-treatment 군에서는 1 $\mu$ g/ml의 농도의 人蔘養營湯 추출물 투여 군을 제외한 모든 농도에서 유의한 증가를 보였다.

6-OHDA로 인해 유발된 ROS는 과도한 산화스트레스로 인한 세포의 손상을 의미하기 때문에 모든 人蔘養營湯 추출물에서 6-OHDA로 유발된 ROS의 생성은 30분 이후 유의하게 억제됨으로 산화스트레스로 인한 뇌세포의 손상을 보호하는 것으로 보인다.

태아중뇌세포에서 TH positive cell의 측정은 도파민의 생성에 관여하는 TH를 염색함으로써 도파민 세포 보호효과를 확인할 수 있는 방법으로 이 실험에서 人蔘養營湯 추출물이 6-OHDA로 유발된 도파민 세포 독성을 감소시킴을 확인할 수 있었다.

NO와 TNF- $\alpha$ 는 대표적인 염증매개물질이다. TNF- $\alpha$ 는 cytokine의 일종으로서 노화에 따른 뇌세포 파괴를 일으키는 염증반응에 주요한 작용을 하는 것으로 연구되고 있다<sup>1,10,32,33,35</sup>. 특히 중추신경계 중 도파민 세포는 TNF- $\alpha$ 에 파괴가 잘 되는 것으로 알려져 있으며 그 역할에 대한 논란이 많으나 혈중 TNF- $\alpha$ 의 농도와 치매의 위험성이 비례적으로 높아진다는 발표가 있었다<sup>1,33</sup>. NO는 lysosome에서 만들어 내는 염증매개물질로서 iNOS라는 효소의 작용에 의하여 생성된다. 미생물을 사멸시킬 수 있는 고도의 반응

성인 과산화질소 라디칼을 생성하는 작용을 하며<sup>34</sup> 뇌세포의 만성적인 염증으로 인해 발생하는 산화적 스트레스의 증가요인으로 작용 한다<sup>35</sup>. 태아중뇌세포에서 6-OHDA로 인해 생성된 NO와 TNF- $\alpha$ 에 대해 人蔘養營湯 추출물을 0.2 $\mu$ g/ml 처리한 군에서 가장 유의한 수준의 제거가 이루어졌다. 이결과로서 흰쥐 중뇌세포에 대해 人蔘養營湯이 6-OHDA로 유발된 염증매개물질 생성을 억제함으로써 태아 중뇌 세포 보호효과를 나타내는 것을 확인 할 수 있다.

인간의 노화에 대한 많은 연구가 이루어지고 그 기전들이 여러 가지 가설로서 발표되고 실험적 논문을 통해서 확인되고 있다<sup>6-10</sup>. 하지만 실험적 방법이 아닌 사람에게 대한 치료에 있어서는 만족할만한 효과를 내지 못하고 있는 현실이며<sup>9</sup> 폐경 이후 발생하는 인지기능 저하에 대한 호르몬 대체 요법은 그 효능의 여부가 논란 중이다<sup>13-15,36</sup>. 인지기능의 향상에 긍정적인 효과가 있다 하더라도 호르몬 대체요법의 부작용으로 인해 환자들의 거부감이 증가되고 있는 것이 현실이다<sup>4</sup>. 폐경기의 증상을 心脾虛로 인한 血虛로 발생하는 증상으로 볼 때 心脾虛를 치료하는 人蔘養營湯을 응용하여 폐경기 증상의 호전을 가져올 수 있을 것으로 사료되며 人蔘養營湯을 이용하여 인지기능을 향상을 가져왔다는 논문이 발표되었으나<sup>18</sup> 그 기전에 대해서 명확하게 밝혀진 것은 없다. 따라서 저자는 虛勞로 인한 제 병증에 사용되는 人蔘養營湯이 노화와 관련된 뇌질환에 있어서 그 한 원인으로 꼽히는 산화적 스트레스에 대한 항산화 효과 및 뇌세포 보호 작용이 있음을 확인함으로써 폐경 여성의 인지

기능 향상에 대한 기전을 밝히고 향후 폐경기 클리닉에서의 응용 방안을 모색하고자 하였다. 이를 바탕으로 임상실험 연구가 이루어져서 실제 환자에게 적용되었을 때의 효과를 확인하는 연구가 이루어져야 하겠다.

## V. 結 論

人蔘養營湯의 항산화 효과 및 뇌세포 보호효과를 알아보기 위해 人蔘養營湯 추출물이 human neuroblastoma cell과 태아중뇌 도파민세포에서 6-OHDA로 유도된 세포독성에 대한 보호효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPH free radical inhibition activity와 ABTS radical cation decolorization activity를 측정된 결과, 人蔘養營湯 추출물의 농도 의존적 소거능을 확인하였고, IC<sub>50</sub>은 각각 571.6, 202.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. 총 폴리페놀 함량은 1.05%였다.
2. SH-SY5Y세포에서 6-OHDA 처리 전 人蔘養營湯 추출물 투여 시에는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군에서, 동시 처리 시에는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군에서, 6-OHDA 처리 후 人蔘養營湯 추출물 투여 시에는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군을 제외한 모든 투여군에서 통계적으로 유의한 세포보호 효과가 관찰되었다.
3. 모든 농도의 人蔘養營湯 추출물 처리군에서 6-OHDA 처리 후 30, 60 및 120분 반응시간에 따라 ROS의 생성은 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 억제되었다.

4. 태아중뇌세포에서 6-OHDA에 의해 감소된 도파민 세포를 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  人蔘養營湯 추출물이 6-OHDA 단독 투여군에 비하여 통계적으로 유의하게 도파민세포를 증가시켰다
5. 태아중뇌세포에서 6-OHDA에 의해 증가된 NO와 TNF- $\alpha$ 를 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 人蔘養營湯 추출물이 6-OHDA 단독 투여군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소시켰다.

## 參考文獻

1. Workshop report. Aging—from molecules to populations. Mechanisms of ageing and development. 2008;199:614-623.
2. 노인복지총람편찬위원회. 노인복지총람. 서울: 대한노인신문사. 2006:3-7, 677-686.
3. 통계청. 연령,성별,인구 읍면동 조사. 2005.
4. 김동일 등. 갱년기클리닉의 운영방안과 활용 약물에 관한 고찰. 대한한방부인과학회지. 2000;13(2):418-436.
5. 대한노인병학회. 노인병학. 서울: 의학출판사. 2000:3-49, 808-830.
6. Sayre LS, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. Chem Res Toxicol. 2008;21:172-188.
7. Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM. Free radicals as mediators of neuronal injury. Cellular and molecular neurobiology. 1998;18(6):667-682.
8. Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. Molecularand cellular biochemistry.

- 1997;174:305-319.
9. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry*. 2006;97:1634-1658.
  10. Kurz T, Terman A, Brunk UT. Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arc of biochemistry and biophysics*. 2007;42:222-230.
  11. 대한폐경학회 편찬위원회. 폐경기 여성의 관리. 서울: 군자출판사. 2001:62-65.
  12. Jung JW et al. Estrogen replacement effect of Korean ginseng saponin on learning and memory of ovariectomized mice. *J Ginseng Res*. 2000;24(1):8-17.
  13. Zhao L, Mao Z, Brinton RD. A select combination of clinically relevant phytoestrogens enhances estrogen receptor  $\beta$ -binding selectivity and neuroprotective activities in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 2008.
  14. Currie LJ et al. Postmenopausal estrogen use affects risk for parkinson disease. *Arc Neurol*. 2004;61:886-888.
  15. Wise PM. Estrogens and neuroprotection. *Trends in endocrinology & metabolism*. 2002;13(6):229-230.
  16. 張介賓. 부인규. 서울: 법인문화사. 1999:13-33.
  17. 한의부인과학고재편찬위원회. 한의부인과학. 서울: 정담출판사. 2002:221-233.
  18. 반혜란 등. 人蔘養榮湯 투여로 호전된 갱년기장애 15례에 대한 임상 고찰. *대한한방부인과학회지*. 2006;19(3):257-266.
  19. 하지용, 조성연. 人蔘養榮湯이 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향. *대한동의병리학회지*. 1998;12(1):60-71.
  20. Huang S, Lin CM, Chian BH. Protective effects of *Angelica sinensis* extract on amyloid  $\beta$ -peptide-induced neurotoxicity. *Phytomedicine*. 2008;15:710-721.
  21. 박홍주 등. 한국약식동원 식물자원의 항산화 활성 비교. *한국지역사회생활과학회지*. 2004;15(4):11-1622.
  22. 최영성 등. 인삼고본환과 그 구성약물군의 항산화 효과. *대한본초학회지*. 2003;18(3):41-50.
  23. Sohn EH et al. Effects of non-saponin red ginseng components on the function of brain cells. *J Ginseng Res*. 2008;32(1):62-66.
  24. 권후자, 박찬성. 오미자 추출물의 생리활성. *한국식품저장유통학회*. 2008;15(4):587-592.
  25. 서운교, 정효원, 박용지. 생강 클로로로포름 분획의 활성화된 뇌신경교세포에서 염증반응 억제효과. *대한본초학회지*. 2008;23(3):73-83.
  26. 박찬성, 김동한. 황금, 산조인, 백출 추출물의 생리활성. *대한본초학회지*. 2008;23(3):41-51.
  27. 이수배, 성낙설, 이영중. 원지가 NMDA로 유발된 신경세포 손상에 미치는 효과. *대한본초학회지*. 2005;20(2):115-125.
  28. 박찬성, 김동한, 김미림. 산수유, 황기, 감초 추출물의 생리활성. *대한본초학회지*. 2008;28(1):98-101.
  29. 허준. 동의보감. 서울: 법인문화사. 2002:1176-1177.
  30. Yoo KM, Kim DO, Lee CY. Evaluation

- of different methode of antioxidant measurement. *Food Sci Biotechnol.* 2007;16(2):177-182.
31. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? what do we learn from cell cultre and in vivo studies?. *Arc Biochem and Biophysics.* 2008 ;476:107-112.
32. Doris LL, Stanley SL. Microglia and myeloperoxidase: a deadly partnership in neurodegenerative disease. *Free radical biology & medicine.* 2008;45 :726-731.
33. Pieper HC et al. Different methylation of the TNF-alpha promoter in cortex and substantia nigra: implications for selective neuronal vulnerability. *Neurobiology of disease.* 2008;4:1-741.
34. 강재성 등. 세포분자면역학. 서울: 범문사. 2005:287-288.
35. McCOy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implication for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of neuroinflammation.* 2008;45:1-13.
36. Rapp SR et al. Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the women's health initiative memory test: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003;289(20):2663-2672.
37. Drechsel DA, Patel M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free radical biology & medicine.* 2008;44:1873-1886.