

淸肝解酒丸의 알코올 유도 뇌신경세포 손상에 대한 보호 효과

주미선^{1,2}, 김효근^{1,2}, 조해정³, 심재종⁴, 전용준⁴, 오명숙^{1,2,3*}

1 : 경희대학교 약학대학 한약학과, 2 : 경희대학교 경희동서약학연구소,
3 : 경희대학교 나노의약생명과학과, 4 : 다사랑병원 · 다사랑한방병원(중앙)

Effect of Chungganhaeju-hwan in Ethanol-induced Neuronal Cell Damage

Mi Sun Ju^{1,2}, Hyo Geun Kim^{1,2}, Hae Jeong Cho³, Jae Jong Sim⁴,
Yong Jun Jeon⁴, Myung Sook Oh^{1,2,3*}

1 : Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University
2 : Kyung Hee East-West Pharmaceutical Research Institute, Kyung Hee University
3 : Department of Life and Nanopharmaceutical Science, Kyung Hee University
4 : Dasarang Central Hospital · Oriental Hospital

ABSTRACT

Objectives : In this study, we evaluated the effect of Chungganhaeju-hwan(CGHJH) on hydrogen peroxide(H₂O₂)-induced and ethanol(EtOH)-induced neuronal damage *in vitro* and *in vivo*, respectively.

Methods : We carried out the anti-oxidant effects of CGHJH against hydrogen peroxide(H₂O₂)-induced toxicity in HT22 and PC12 cells using thiazolyl blue tetrazolium bromide. Then, to investigate the protective effect on CGHJH against EtOH-induced memory impairment and hippocampal cell damage in male ICR mice, we performed novel object recognition test(NORT), and analysed the brain tissues after immunohistochemistry and western blotting.

Results : CGHJH showed protective effect from H₂O₂-induced cell toxicity at doses of 1~100 μ g/mL in both HT22 and PC12 cells. CGHJH had also recovery effect from EtOH-induced memory impairment in ICR mice from NORT and it protected hippocampal cells against EtOH toxicity in the result of cresyl violet and NeuN immunoreactivity.

Conclusion : These results demonstrate that CGHJH has protective effect in neuronal cells against H₂O₂ and EtOH toxicities and this effect could be a main role of recovery effect on EtOH-induced memory loss.

Key words : Chungganhaeju-hwan, ethanol, hydrogen peroxide, memory loss, hippocampal cells

서론

현대사회에서 알코올은 흔히 남용되는 물질 중 하나로, 전체 인구의 약 30-45%는 음주 관련 문제를 경험하게 되며, 이는 경제적, 신체적, 정신적 손실을 야기하게 된다. 특히, 알코올의 소비량이 증가하면서 알코올성 간 병변과 더불어 알코올 의존 및 중독증, 정신분열증 등의 알코올성 질환 문제가 급격히 증가하고 있다. 알코올이 분해되는 과정에서 생성되는 부산물인 아세트알데히드 등으로 인한 산화 스트레스(Oxidative stress)와 전염증인자(Proinflammatory cytokine)

의 독성으로, 간염, 지방간, 간섬유화, 간경화 및 이에 의한 간부전 등의 알코올성 간 질환(Alcoholic liver disease)을 유발하는 것이 알코올의 일반적 영향으로 알려져 왔다^{1,2)}.

지금까지 알코올은 일차적으로 간에 악영향을 미치기 때문에 알코올과 간 손상에 관한 연구에 치우쳐 왔지만, 알코올은 간 뿐 아니라 뇌, 심장, 말초혈관 등 신체 전반에 질환을 야기한다. 특히, 알코올 의존 및 중독은 급성 호흡곤란 증후군(Acute respiratory distress syndrome)의 발병률증가와 다양한 장기의 기능저하를 야기할 뿐 아니라³⁾ 중추신경계 전반에 영향을 주어 소뇌퇴화, 뇌의 백색질 및 회색질의 용량감소와

*교신저자 : 오명숙, 서울시 동대문구 회기동1 경희대학교 약학대학 한약학과 본초학교실.
· Tel : 02-961-9436, · E-mail : msohok@khu.ac.kr.
· 접수 : 2011년 8월 15일 · 수정 : 2011년 9월 6일 · 채택 : 2011년 9월 17일

더불어 코르사코프 증후군(Korsakoff's syndrome), 기억력 저하, 우울증 등의 정신질환을 일으킨다는 보고들이 발표되면서 알코올성 뇌 손상에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다⁴⁾. 또한, 알코올성 기억력 감퇴 및 기억장애는 알코올에 의해 기억과 학습에 관여하는 뇌의 신경세포가 손상을 받아 그 세포 기능이 상실되어 나타나는 것으로 알려져 있으며 알코올에 의한 질환의 증가와 함께 알코올성 뇌 손상에 대한 관심이 높아지고 있기 때문에 이를 예방하고 치료할 수 있는 제제 연구가 필요한 실정이다.

현재까지 한약에서의 알코올에 의한 간 손상에 관한 연구는 활발히 진행되어 왔으나, 알코올 유도 뇌 손상에 관한 연구는 몇 가지 약물에서만 연구되었다. 그 예로,鬱金丹과 薑黃의 성분으로 잘 알려진 curcumin이 HT22 hippocampal cell에서 알코올로 유도된 세포독성을 mitogen-activated protein kinase phosphatase-1의 활성을 통해 감소시켰다는 보고⁵⁾가 있으며 治酒食傷의 대표적인 처방인 對金飮子 약침이 알코올 독성 흰쥐의 해마에서 뇌신경세포의 생성과 nitric oxide synthase 발현 증가 효과⁶⁾, 葛花 물 추출물이 알코올 유도 학습과 인지 손상, 그리고 스코폴라민(Scopolamine) 유도 기억상실에 대한 기억력 개선 효과⁷⁾, 그리고 알코올과 아세트알데히드에 의한 흰쥐 뇌조직의 산화적 스트레스에 대한 은행엽 추출물의 항산화 효능에 관한 연구⁸⁾ 등이 있다. 그러나 알코올성 뇌 손상에 관한 기전 및 치료 후 보 물질에 대한 연구는 아직까지 미미한 실정이다.

淸肝解酒丸(Chungganhaeju-hwan, CGHJH)은 酒傷에 임상적으로 사용되고 있는 처방으로 澤瀉, 茵陳, 陳皮, 白茯苓, 厚朴, 甘草, 山靑木, 赤陽皮, 梅實, 甘草 외 11종으로 구성된 방제이다. 淸肝解酒丸을 구성하는 약재중 解酒하는 역할로 山靑木, 赤陽皮, 梅實, 甘草 등이 알려져 있고, 관련 연구에 따르면 山靑木이 간성상세포의 활성화와 증식을 억제 및 procollagen 합성을 저해하여 간성상세포의 간섬유화를 억제하였고⁹⁾, 赤陽皮 추출물이 헛개나무 추출물 혼합으로 알코올 분해능과 간의 해독 증진 및 숙취 해소 작용이 있다고 보고하고 있다¹⁰⁾. 그리고 梅實 에탄올 추출물이 알코올 투여로 상승된 GSH-Px, ALT, AST를 감소시켜 알코올에 의한 지방간 또는 간세포 손상에 대해 회복작용을 보였고¹¹⁾, 甘草 물 추출물이 알코올 섭취 억제효과 및 금단증상 억제효과를 나타내었다는 보고가 있다¹²⁾.

본 연구에서는 실제 임상에서 酒毒을 풀어주는 방제로 사용된 淸肝解酒丸이 알코올성 뇌 손상에 효과가 있는지 연구하여 결과를 얻었기에 이에 보고하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 淸肝解酒丸은 다사랑한방병원(Uiwang-si, Korea)에서 제공받았고, 山靑木(Acer tegmentosum Max., 제천, 24 g), 澤瀉(Alismatis Rhizoma, 순천, 24 g), 白朮(Atractylodis Rhizoma Alba, 영천, 24 g), 麥芽(Hordei Fructus Germinatus, 여수, 24 g), 柑皮

(Persimmon Peels, 청도, 24 g), 赤陽皮(Alnus japonica Cortex, 군위, 24 g), 陳皮(Citri Unshii Pericarpium, 제주, 12 g), 白茯苓(Hoelen, 청송, 12 g), 厚朴(Magnoliae Cortex, 중국, 12 g), 梅實(Mume Fructus, 중국, 12 g), 茵陳(Artemisiae Capillaris Herba, 경주, 6 g), 梔子(Gardeniae Fructus, 제천, 6 g), 藿香(Agastachis Herba, 청송, 6 g), 蘿菔子(Raphani Semen, 중국, 6 g), 枳實(Ponciri Fructus, 영주, 6 g), 川芎(Cnidii Rhizoma, 안동, 6 g), 紅花(Carthami Flos, 중국, 6 g), 靑皮(Citrii Unshiu Immaturi Pericarpium, 제주, 6 g), 木香(Aucklandiae Radix, 중국, 6 g), 砂仁(Amomi Fructus, 중국, 6 g), 甘草(Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, 중국, 6 g) 등으로 구성되었다. 개체간 균일한 시료 처리 및 투약을 위하여, 淸肝解酒丸에 20배의 증류수를 가하여 상온에서 2시간 동안 sonication 후 감압여과(Whatman No. 2)하였다. 여과액을 -60℃ 이하에서 얼려 동결건조 하였고(FDU-550R; EYELA Co, Japan), 동결건조 후의 수득율은 40.42%였다. -20℃에 보관 후 매 실험 시 용매에 녹여 사용하였다.

2) 시약

세포배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 medium, fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin(P/S), horse serum은 Hyclone(Auckland, New Zealand)에서 구입하여 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), phosphate buffer saline(PBS), collagen, glycine, hydrogen peroxide(H₂O₂), trizma base, sodium dodesyl sulfate (SDS), paraformaldehyde(PFA), diaminobenzidine(DAB), 100% ethanol, cresyl violet acetate 등은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, CA, USA)에서 구입하였다. TEMED, protein standards dual color, protein assay, tween-20, protein extraction solution, acrylamide, ammonium persulfate, skim milk, ECL reagent 등은 Bio-Rad Laboratories(Hercules, CA, USA)에서 구입하였고, nitrocellulose membrane는 Amersham Bioscience(Pittsburgh, PA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 일차항체인 mouse anti-NeuN은 Chemicon사(Temecula, CA, USA)에서, anti-rabbit/mouse-horseradish peroxidase(HRP)와 rabbit anti-β-actin 항체는 Assay Designs Inc.(Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다. Biotinylated anti-mouse antibody, avidin-biotin peroxidase complex(ABC) standard kit, normal goat serum은 Vector사(Burlingame, CA, USA)에서 구입하여 사용하였으며 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) HT22 및 PC12세포에서 H₂O₂독성에 대한 세포보호 효과 측정

(1) 세포배양

HT22 hippocampal neuronal 세포 및 rat pheochromocytoma PC12 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. HT22 세포배양은 37°C의 5% CO₂, 95% air 조건에서 10% FBS, 1% P/S를 포함하는 high-glucose DMEM 배지를 사용하였고 PC12 세포배양은 같은 조건에서 10% horse serum, 5% FBS, 1% P/S를 포함하는 high-glucose RPMI1640 배지를 사용하였다. 각 세포는 2~3일마다 1:3의 비율로 계대하여 배양하였다.

(2) 세포 생존율 측정

96-well plate에 HT22 cell는 0.5×10⁴/well, PC12 cell 은 50 μg/mL의 collagen으로 코팅된 96-well plate에 2×10⁴/well로 seeding하고 24시간 배양한 후, 淸肝解酒丸 추출물 0.1~100 μg/mL 농도별로 7시간 동안 처리하였다. 약물처리 후 상층액을 제거하고 MTT 1 mg/mL을 처리하여 2 시간 동안 반응시킨 후, DMSO를 이용해 decrystallize시켜 spectrophotometer(Versamax microplatereader; Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율을 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

(3) H₂O₂독성에 대한 세포보호 효과 측정

위의 조건과 동일하게 각 세포를 96-well plate에 seeding하고 淸肝解酒丸 0.1~100 μg/mL을 1 시간 처리 후 각각의 세포에 300 μM의 H₂O₂와 50 μM의 H₂O₂ 을 6 시간 더 처리하였다. 약물과 H₂O₂의 반응 종료 후 상층액을 제거하고 MTT 1 mg/mL을 처리하여 2 시간 동안 반응시킨 후, DMSO를 이용해 decrystallize시켜 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율을 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

2) ICR마우스에서의 알코올 독성에 대한 淸肝解酒丸의 보호 효과 평가

(1) 실험동물 및 투여

실험동물 및 사료는 (주)대한 바이오링크(Eumseong, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 6주령 ICR계 자성 마우스(25~28 g)를 일정한 조건(온도: 22±1°C, 습도: 55±3%, 12시간 명암주기)으로 5일간 적응시켰으며, 각 군당 8마리씩 사용하였다. 인체투여량(3 g)을 마우스의 대사율 및 체표면적당 환산법을 적용하였으며¹³⁾, 기존 연구에서 한약추출물이 동물에게 투여하는 용량을 참고하여^{14,15)}, 淸肝解酒丸 물 추출물을 생리식염수에 용해하여 100 mg/kg로 28일간 1일 1회 경구 투여하였다. 약물투여 한 시간 후 30% 알코올 5 g/kg를 2회에 걸쳐 4시간 간격으로 경구 투여하였으며, 대조군은 생리식염수를 동일 용량 투여하였다. 약물 및 알코올 투여에 의한 체중변화를 관찰하기 위해 마우스의 체중은 2일 간격으로 측정하였다.

(2) 물체인식실험(Novel object recognition test)

마지막 투여 다음 날, 물체인식 행동실험을 수행하였다. 실험이 진행될 환경에서 실험동물을 1시간 적응시킨 후 본 실험에 앞서 training을 진행하기 위해 실험용 아크릴 박스에 넣어 5분간 박스 안 공간에 적응시켰다. 5분 적응시간이 지

나면 2개의 유사한 물체를 넣어 3분간 마우스가 각 물체를 탐색하는 시간을 측정하였다. 24시간 후 같은 방법으로 실험을 진행하되 2개의 물체 중 하나는 새로운 물체를 넣어 각 물체를 탐색하는 시간을 측정하여 결과값을 Recognition index(%)=새로운 물체 탐색시간/(새로운 물체 탐색시간+다른 물체 탐색시간)*100으로 처리하여 그래프로 나타내었다.

(3) 뇌 조직 분리

투여가 완료된 각 군의 쥐를 치사시킨 후, 해마 세포에 미치는 영향을 웨스턴 블롯법으로 알아보기 위해 뇌의 해마조직을 분리하여 -20°C에 보관하였고, 면역조직화학법을 위해 마우스를 PBS와 4% PFA로 관류하여 뇌를 적출하고 4% PFA에 하루 동안 보관한 후, 동결시 생기는 조직의 손상을 막기 위해 30% sucrose에 냉장보관 하였다. 뇌 조직을 cryostat(CM3000, Leica, Wetzlar, Germany)로 30 μm 동결박편 후, 4°C에서 storing solution에 보관하였다.

(4) Cresyl violet staining 및 면역조직화학법

Cresyl violet staining을 위해 고정된 뇌 조직의 해마부분을 골라 PBS로 3회 세척한 후 gelatin coated slide에 마운팅하여 cresyl violet 용액과 3분간 반응시켰다. 증류수로 세척하고 70%~100% 알코올과 자일렌의 탈수 및 투명화과정 후 커버슬라이드로 조직을 덮어 보관하였다. NeuN의 항체반응을 위해 해마조직을 PBS로 3회 세척한 후 내인성 peroxidase를 제거하기 위하여 과산화수소로 처리하고, 1차 항체 mouse anti-NeuN(1:1000 dilution)을 하룻밤 반응시켰다. 2차 항체 biotinylated anti-mouse(1:200 dilution, 1시간), ABC 반응(1시간)을 거쳐 DAB를 이용하여 3분간 발색시켰다. 각 과정 사이에 PBS로 3회 세척을 행하였다. 뇌 조직은 gelatin coated slide에 마운팅 후 70~100% 알코올과 자일렌의 탈수 및 투명화과정 후 커버슬라이드로 조직을 덮어 보관하였다. 현미경(Olympus Microscope System BX51; Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 淸肝解酒丸의 해마부위의 세포에 대한 영향을 관찰하였다.

(5) 웨스턴 블롯(Western blotting)

분리한 마우스 해마조직을 단백질 정량 후 전기영동장치를 이용하여 12% SDS-acrylamide gel에 로딩하고 membrane에 이동시킨 후 1차 항체로 NeuN(1:1000), β-actin(1:10000), 2차 항체로 anti-mouse/rabbit HRP-conjugated(1:2000)를 각각 반응시켰다. 각 과정마다 멤브레인을 TBST로 15분간 4번씩 세척하였다. 항체반응을 마친 멤브레인은 ECL detection kit를 이용하여 LAS-4000 mini system(Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan)을 통해 노출되도록 하였다.

3. 통계처리

모든 측정값은 mean±SEM으로 표시하였다. 본 연구의 통계처리는 GraphPad Prism 4.0 software 프로그램을 사용하였으며, one way ANOVA(Tukey's post hoc test)를 이용하여 평균값의 유의성을 5% 미만의 한계로 조사하였다.

결 과

1. HT22 세포에서 淸肝解酒丸이 H₂O₂로 유도된 세포독성에 미치는 영향

淸肝解酒丸이 mouse hippocampal neuronal 세포인 HT22 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 淸肝解酒丸의 농도별 약물처리에 따른 세포 생존률과 H₂O₂에 대한 세포보호 효과를 MTT assay로 측정해본 결과는 다음 그림과 같다(Fig. 1). HT22 세포에 淸肝解酒丸 1~100 μ g/mL만을 처리한 경우에 대조군과 비교하여 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다(Fig. 1A). 반면, H₂O₂독성에 대한 淸肝解酒丸의 보호 효과를 측정한 결과, 300 μ M H₂O₂에 의하여 세포 생존율이 대조군 대비 60.16%로 감소하였고, 淸肝解酒丸(1~100 μ g/mL)의 전처리에 의하여 각각 73.72~72.35%의 생존율을 나타내어 H₂O₂로 유도된 세포독성에 대해 보호 효과를 나타내었다(Fig. 1B).

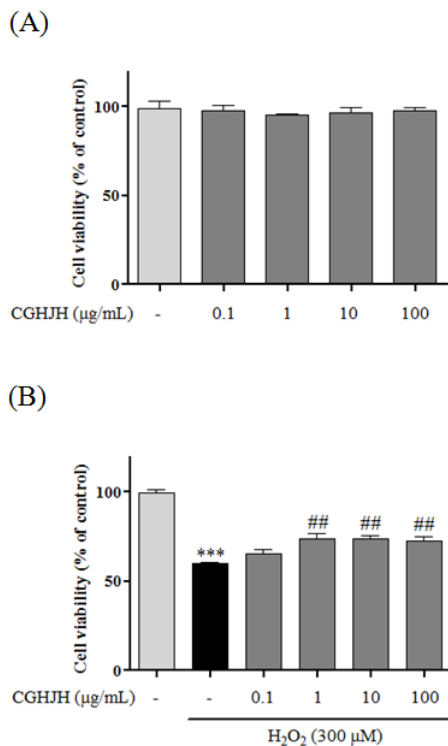


Fig. 1. Effect of CGHJH on H₂O₂-induced toxicity in HT22 cells. The cells were treated with CGHJH for 7 h (A). The cells were treated with 300 μ M H₂O₂ for 6 h after pretreatment with CGHJH for 1 h (B). Cell viability were measured using the MTT assay and were expressed as a percentage of the control. Values are given as the mean \pm SEM. *** p < 0.001 compared with the control group and ## p < 0.01 compared with the H₂O₂-only treated group.

2. PC12 세포에서 淸肝解酒丸이 H₂O₂로 유도된 세포독성에 미치는 영향

淸肝解酒丸이 rat pheochromocytoma 세포인 PC12 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 淸肝解酒丸의 농도별 약물처리에 따른 세포 생존률과 H₂O₂에 대한 세포보호 효과를 MTT assay로 측정해본 결과는 다음 그림과 같다(Fig. 2).

PC12 세포에 淸肝解酒丸 1~100 μ g/mL만을 처리한 경우에는 대조군과 비교하여 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다(Fig. 2A). 반면, H₂O₂독성에 대한 淸肝解酒丸의 보호 효과를 측정한 결과, 50 μ M H₂O₂에 의하여 세포 생존율이 대조군 대비 64.87%로 감소하였고, 淸肝解酒丸(1과 10 μ g/mL)의 전처리에 의하여 각각 78.14%와 78.35%의 생존율을 나타내어 H₂O₂로 유도된 세포독성에 대해 보호 효과를 나타내었다(Fig. 2B).

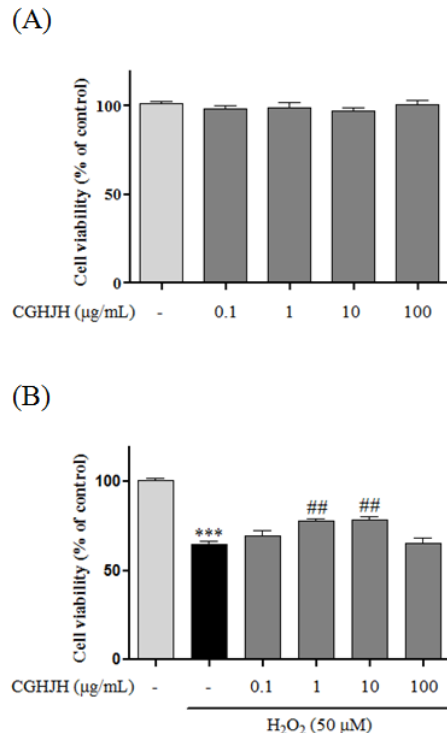


Fig. 2. Effect of CGHJH on H₂O₂-induced toxicity in PC12 cells. The cells were treated with CGHJH for 7 h (A). The cells were treated with 50 μ M H₂O₂ for 6 h after pretreatment with CGHJH for 1 h (B). Cell viability were measured using the MTT assay and were expressed as a percentage of the control. Values are given as the mean \pm SEM. *** p < 0.001 compared with the control group and ## p < 0.01 compared with the H₂O₂-only treated group.

3. 수컷 ICR마우스에서 淸肝解酒丸과 알코올 투여에 따른 몸무게 변화

알코올 독성에 의한 기억력 감퇴 및 해마 세포 손상에 대한 淸肝解酒丸의 효과를 알아보기 위하여 4주간 淸肝解酒丸 100 mg/kg와 알코올 5 g/kg를 투여하였다. 투여에 의한 마우스의 체중에 미치는 영향을 알아보기 위하여 2일 간격으로 체중을 측정한 결과, 알코올 독성을 가하지 않은 대조군은 무게가 꾸준히 증가하는 경향을 보였다(Table 1). 반면, 알코올을 투여한 알코올 단독 투여군과 淸肝解酒丸+알코올 투여군은 투여시작 2일째부터 4일까지 체중이 감소하였고 6일째부터 회복하기 시작하여 10일째에는 세 그룹간 체중차이가 나타나지 않았다. 특히 알코올과 淸肝解酒丸을 함께 투여한 그룹은 알코올 단독 투여군보다 체중감소가 더 심하게 나타났으나 빠른 회복 속도를 보였다. 대조군과 알코올 단독 투여군과 통계적으로 유의한 체중 차이를 보이지 않았다.

Table 1. Weight chart of ICR mice

day	Control	EtOH	EtOH+CGHJH
0	25.86±0.22	25.78±0.75	24.75±0.26
2	25.26±0.21	25.18±0.69	22.95±0.24 ** ##
4	26.51±0.43	24.76±1.28	20.73±0.25 ** #
6	29.24±0.48	27.88±0.74	22.25±0.30 *** ###
8	30.75±0.38	30.08±0.47	28.32±0.32 ** #
10	29.15±0.35	29.35±0.39	29.50±0.41
12	30.69±0.27	30.67±0.47	30.86±0.49
14	29.30±0.30	29.40±0.32	30.24±0.69
16	30.46±0.41	30.02±0.37	30.28±0.45
18	31.58±0.31	30.89±0.46	31.18± 0.53
20	32.34±0.38	30.60±0.50	31.37±0.47
22	32.33±0.51	30.53±0.42	31.42±0.62
24	32.24±0.51	30.71±0.36	31.54±0.58
26	31.28±0.40	29.21±0.42	29.95±0.50
28	32.02±0.47	29.90±0.35	31.21±0.70

Values are indicated as the mean±SEM of each group. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ compared with the control group. ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ compared with the EtOH-only treated group.

4. 清肝解酒丸이 알코올 유도 기억력 손상에 대해 행동실험에 미치는 영향

알코올 유도 기억력 감퇴에 대한 清肝解酒丸의 효과를 평가하기 위하여 마지막 약물 및 알코올 투여 24시간 후 물체 인식실험을 수행하였다. 그림 3에서 보는 바와 같이, 본 실험 24시간 전에 두 개의 비슷한 물체를 가지고 training을 실시하였을 때, 각 그룹은 64.29%, 55.54%, 48.96%로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 반면, 훈련 24시간 후 실시한 본 실험에서는 알코올 그룹이 37.91%로 대조군(62.62%)에 비해 새로운 물체를 탐색하는 정도가 적었고, 이에 대해 清肝解酒丸 투여군은 66.63%로 통계적으로 유의한 회복 효과를 보였다. 이는 물체인식 행동실험에서 清肝解酒丸이 알코올에 의한 기억력 저하에 대한 방어효과를 의미한다고 볼 수 있다.

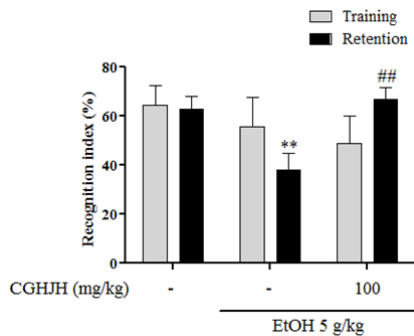


Fig. 3. Effect of CGHJH on EtOH-induced memory impairment in ICR mice.

Mice were treated with 100 mg/kg of CGHJH orally for 4 weeks 1h before they were administrated 5 g/kg of EtOH orally. One day after the last administration, we conducted the novel object recognition test. Values are given as the mean±SEM. ** $p < 0.01$ compared with the control group and ## $p < 0.01$ compared with the EtOH-only treated group.

5. 清肝解酒丸이 알코올로 유도된 해마 신경세포 손상에 미치는 영향

물체인식실험을 통해 알코올에 의해 기억력 감퇴가 유도되었음을 확인하고 알코올과 清肝解酒丸이 기억에 관여하는 뇌의 해마부분에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포의 핵을

염색하여 세포사멸의 유무를 판단하는 cresyl violet과 신경세포의 핵을 발현시켜 세포의 손상 유무를 판단할 수 있는 NeuN인자를 염색하였다. Cresyl violet staining 결과, 해마세포 중 CA3부분에서 대조군보다 세포수가 감소하고 넓게 발색된 것으로 알코올에 의해 세포사멸이 유도되었음을 확인하였고 특히, 알코올에 의한 세포사멸은 CA1에 비해 CA3부분에서 예민하게 일어나는 경향을 보였다. 반면, 清肝解酒丸 투여에 의하여 세포사멸 억제되었음을 확인하였다(Fig 4). NeuN단백질의 면역염색 결과에서도 알코올에 의해 NeuN 양성세포가 적게 발현되어 알코올 독성에 의해 신경세포의 손상이 일어났으며, 이에 대해 清肝解酒丸이 알코올에 의한 신경세포사멸을 억제함을 확인하였다(Fig 5).

NeuN 면역조직화학법으로 清肝解酒丸의 해마 신경세포보호 효과를 확인한 후, NeuN 단백질의 정량을 통한 단백질 발현의 차이를 알아보기 위하여 웨스턴 블롯법을 실시하였다. 조직사진으로 확인한 결과와 같이 알코올을 투여한 해마조직에서 NeuN단백질의 발현이 감소되었으며, 清肝解酒丸에 의해 NeuN단백질 발현 감소가 억제된 결과를 얻었다. 이는, 清肝解酒丸의 알코올성 독성에 대한 해마 신경세포보호 효과가 있음을 나타내는 결과이다(Fig 6).

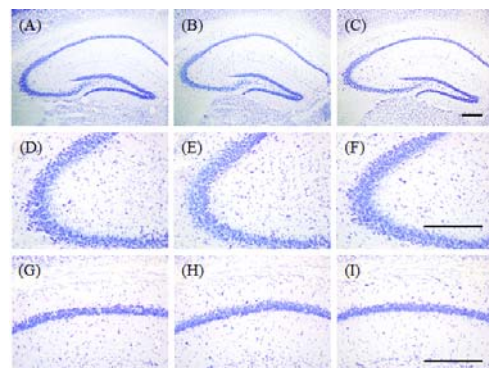


Fig. 4. Effect of CGHJH on EtOH-induced hippocampal cell damage in ICR mice.

Mice were treated with 100 mg/kg of CGHJH orally for 4 weeks 1h before they were administrated 5 g/kg of EtOH orally. The cells were investigated using cresyl violet staining. Representative photomicrographs are shown of the hippocampus (A-C), CA3 (D-F) and CA1 (G-I) of each group. (A, D, G) Control group; (B, E, H) EtOH group; (C, F, I) EtOH+CGHJH group. Scale bar=200 μ m.

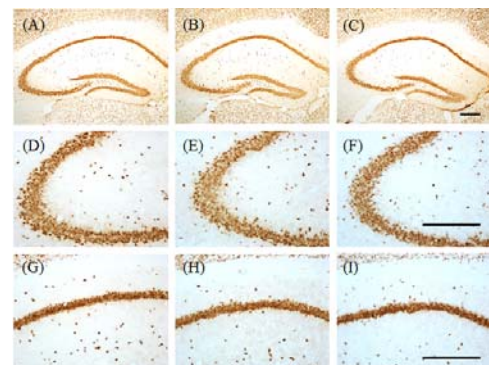


Fig. 5. Effect of CGHJH on NeuN-immunoreactive cells against EtOH in the hippocampus of ICR mice

Mice were treated with 100 mg/kg of CGHJH orally for 4 weeks 1h before they were administrated 5 g/kg of EtOH orally. The cells were investigated using NeuN-immunohistochemistry. Representative photomicrographs are shown of the hippocampus (A-C), CA3 (D-F) and CA1 (G-I) of each group. (A, D, G) Control group; (B, E, H) EtOH group; (C, F, I) EtOH+CGHJH group. Scale bar=200 μ m.

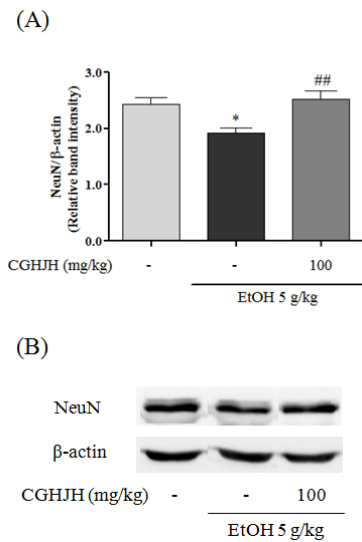


Fig. 6. Effect of CGHJH on EtOH-induced memory impairment. in ICR mice.

Mice were treated with 100 mg/kg of CGHJH orally for 4 weeks 1h before they were administrated 5 g/kg of EtOH orally. NeuN protein in mice hippocampal tissue was detected by Western blotting using NeuN primary antibody. β -Actin was included as a control. Values are given as the mean \pm SEM. * p < 0.05 compared with the control group and ## p < 0.01 compared with the EtOH-only treated group.

고찰

본 연구에서는 淸肝解酒丸 물 추출물의 HT22 및 PC12 세포에서의 H₂O₂로 유발한 독성에 대한 세포보호 효능과 ICR 마우스에서의 알코올로 유도한 기억력 감퇴 및 해마세포 손상에 대한 보호 효능 연구를 수행하였다.

첫 번째로, H₂O₂에 대한 세포보호 효과를 비교하기 위하여 HT22 및 PC12 세포에서 MTT assay를 수행하였다. MTT 실험법은 MTT 물질이 살아있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 succinate dehydrogenase와 반응하여 나타나는 색의 변화로서 미토콘드리아의 활성을 통해 세포 생존율을 측정할 수 있는 방법이다. 본 실험에서 淸肝解酒丸의 전처리하는 두 가지 세포주 모두에서 H₂O₂로 유도된 세포독성에 대해 보호 효과를 나타내었다(Fig 1과 2). H₂O₂는 산화 스트레스를 유도하는 독성물질로 활성산소 및 라디칼 등을 생성하여 세포를 산화 스트레스 상태에 이르게 하여 세포의 산화적 손상을 야기하는데¹⁶⁾, 산화 스트레스는 세포내에서 hydroxy radical 등의 활성산소 생성과 이를 방어하는 항산화 메커니즘의 균형이 깨지면서 발생하는 것으로 활성산소의 증가로 인한 라디칼의 생성이 세포내 미토콘드리아의 파괴, 단백질 및 DNA 변형, 지질과산화에 기인한다¹⁷⁾. 산화 스트레스 메커니즘은 뇌질환 및 심혈관계 질환을 비롯하여 주요 질환의 병인으로 작용하고 있다¹⁸⁻²⁰⁾. 이 결과를 통해 淸肝解酒丸이 신경세포 효능 평가에 사용되는 HT22와 PC12세포에서 산화 스트레스를 매개하는 H₂O₂ 세포독성에 대해 뇌신경세포 보호 효과를 보였고, 이에 항산화 메커니즘 작용했을 것으로 예상된다.

다음으로 淸肝解酒丸의 알코올 유도 해마 신경세포 손상에 대한 효능을 평가하기 위해 ICR 마우스에 알코올과 淸肝解酒丸을 4주간 경구 투여하여 기억력 판단 행동실험 및 해마세

포에 미치는 영향에 대해 알아보았다. 해마(Hippocampus)는 뇌의 변연계(Limbic system)에 속한 한 부분으로 단기기억에서 장기기억으로의 정보를 강화하는 역할을 수행함으로 학습과 기억의 저장과 연관이 깊고²¹⁾, 알코올에 의해 해마 신경세포가 손상을 받고 해마의 기능이 억제되어 학습 및 기억력 손상이 나타난다^{12,23)}. 본 연구에서 알코올에 의한 기억력 감퇴와 淸肝解酒丸의 효능을 판단하기 위해 사용된 물체인식실험은 해마에 의해 주관되는 인지기능에 가장 깊이 연관되어 있는 기억력 평가에 관한 행동실험 중 하나이다. 동물은 처음 접하는 물체나 환경에 호기심을 느끼고, 탐색하는 시간을 가진 다음 그 물체 및 환경을 기억하게 되는데, 이는 뇌 속의 해마에 저장된다. 동일한 물체나 환경에 노출된 경우 해마에 저장되어 있는 정보를 바탕으로 물체나 환경에 대한 인식 시간이 줄어들게 되는데, 본 실험은 해마의 이러한 정보저장 및 인지 능력을 확인하는 방법이다²⁴⁾. 물체인식실험 결과를 통해 알코올이 기억력 감퇴를 유도하였고, 淸肝解酒丸에 의해 기억력이 회복된 것을 알 수 있었다.

행동실험 후 조직학적 분석을 통해 알코올에 의한 해마 신경세포가 손상여부와 淸肝解酒丸의 효과에 관한 결과를 그림 4, 5 그리고 6에 나타내었다. 알코올에 의해 해마의 뇌신경세포에 자가 사멸이 증가하면 인지 및 기억력에 장애가 발생하게 되는데 이는 해마상의 세포 염색을 이용한 cresyl violet과 NeuN 단백질 항체 반응을 통해 세포 사멸 정도를 확인할 수 있다. NeuN은 신경의 핵이라고도 불리며 척추동물에서 신경에 특이적으로 작용하는 핵단백질로 NeuN의 발현은 성인 쥐의 신경계에서 대부분의 신경세포타입에서 관찰되며²⁵⁾, 따라서 NeuN 양성 및 면역반응은 뇌 조직에서 신경세포를 증명하고 신경세포와 신경교세포(Glial cell)의 비율을 측정하는 데에 널리 사용된다²⁶⁾. Cresyl violet staining 결과에서 淸肝解酒丸이 알코올에 의한 세포사멸에 대해 보호효과를 보였고, NeuN 면역조직염색과 단백질 정량의 결과에서도 淸肝解酒丸이 알코올로 유도된 해마신경세포 손상을 억제하였다. 위의 결과로부터 ICR 마우스 동물 실험을 통해 淸肝解酒丸이 해마 신경세포보호 효과를 통한 알코올 유도 기억력 감퇴 억제 효과가 있는 것을 확인하였다.

본 연구에서 淸肝解酒丸의 알코올성 뇌신경세포 손상에 대한 보호효과를 확인하였듯이, 酒傷을 치료하는 것으로 알려진 對金飲子和 葛花解醒湯의 알코올성 손상에 대한 뇌신경세포 보호 효과가 밝혀져 왔다^{27,28)}. 對金飲子(陳皮, 厚朴, 蒼朮, 甘草)는 알코올에 의한 nitric oxide synthase 생성 및 알코올성 해마신경세포 생성 억제에 대한 보호 효과가 있음이 밝혀졌으며⁶⁾, 葛花解醒湯(葛花, 砂仁, 白豆蔻, 乾薑, 茯苓, 豬苓, 澤瀉, 青皮, 陳皮, 木香, 神麩, 人蔘, 白朮)은 알코올 유도 산화적 손상에 대하여 뇌에서 ALT와 활성산소 생성 억제 효과가 있음이 밝혀졌다²⁹⁾. 알코올이 뇌세포에 작용하는 독성기전은 크게 산화 스트레스와 세포사멸(Apoptosis)에 기인하는 것으로 밝혀졌다^{30,31)}. 특히 산화 스트레스에 취약한 뇌신경세포는 알코올에 의해 산화적 손상을 받는데, 그 예로 마우스 해마 세포에서 알코올이 활성산소를 매개한 mitogen-activated protein kinase의 변화를 각 억제제를 사용하여 증명하였고³²⁾, 알코올에 의해 흰쥐의 뇌 조직에서 지질과산화반응이 증가하는 결과가 보고되었다³³⁾. 본 연구에서는 淸肝解酒丸의 산화 스트레스를 유발하는 H₂O₂독성에 대한 뇌신경세

포보호 효과를 우선 검증하였고, 그 보호 효과를 확인하였다. 따라서 알코올성 독성에 의한 기억력 감퇴와 해마 신경세포 손상에 대하여 清肝解酒丸의 보호 효과는 항산화 작용을 통한 것으로 예상되며, 清肝解酒丸의 뇌신경세포보호 효과에 대한 정확한 기전 연구는 추후 필요할 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 清肝解酒丸의 뇌신경세포 보호 효과와 알코올 유도 기억력 감퇴 억제 작용 및 해마 신경세포보호 효과에 대하여 연구를 수행하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HT22 및 PC12 세포에서 清肝解酒丸(0.1~100 μ g/mL)은 생존율에 영향을 미치지 않았으며, H₂O₂에 의한 세포 독성에 대해 세포보호 효과를 보였다.
2. ICR 마우스 동물 실험에서 清肝解酒丸의 해마 신경세포에 미치는 영향을 실험한 결과 清肝解酒丸 100 mg/kg 투여군은 알코올에 의한 기억력 저하 및 해마 신경세포 독성에 대해 보호 효과를 보였다.

이상의 결과에서 清肝解酒丸은 뇌신경세포보호 효과를 가지며 알코올에 의한 기억력 감퇴에 억제작용을 확인함으로써 알코올 중독으로 유발된 기억 능력 저하를 방어하는데 清肝解酒丸이 유효한 영향을 미칠 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol*. 2002 ; 27 : 63-8.
2. Zima T, Fialova L, Mestek O, Janebova M, Crkovska J, Malbohan I, Stipek S, Mikul i kova L, Popov P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *Journal of Biomedical Science*. 2001 ; 8 : 59-70.
3. Moss M, Burnham EL. Chronic alcohol abuse, acute respiratory distress syndrome, and multiple organ dysfunction. *Critical Care Medicine*. 2003 ; 31(4) : 207-12.
4. Harper C. The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol & Alcoholism*. 2009 ; 44(2) : 136-40.
5. Pae HO, Jeong SO, Zheng M, Ha HY, Lee KM, Kim EC, Kim DH, Hwang SY, Chung HT. Curcumin attenuates ethanol-induced toxicity in HT22 hippocampal cells by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Neuroscience Letters*. 2009 ; 453 : 186-9.
6. Kim HJ, Kim EH, L EY. Effect of Daekumeumja Herb-acupuncture on alcohol-induced suppressed

cell proliferation and expression of nitric oxide synthase in hippocampus of rats. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2006 ; 23(5) : 187-98.

7. Yamazaki T, Yaguchi M, Nakajima Y, Hosono T, Niiho Y, Hibi Y, Kinjo J, Nohara T. Effects of an aqueous extract of Puerariae flos(Thomsonide) on impairment of passive avoidance behavior in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005 ; 100 : 244-8.
8. Park SU, Kim JB, Heo Y, Lee SD, Kim HJ, Lee IS, Han JH, Park YC. Effects of *Ginkgo Biloba* extracts on ethanol and acetaldehyde-induced oxidative stress in rat brain. *The Korean Journal of Oriental Preventive Medicine*. 2004 ; 8(1) : 109-14.
9. Lee SB, Woo HJ. A study of the inhibitory effect of *Acer tegmentosum* Max. on fibrogenesis in hepatic stellate cell line T6. *Journal of Korean Oriental Internal Medicine*. 2010 ; 32(2) : 346-55.
10. An SW, Kin YG, Kin MH, Lee BI, Lee SH, Kwon HI, Hwanf B, Lee HY. Comparison of hepatic detoxification activity and reducing serum alcohol concentration of *Hovenia dulcis* THUNB and *Alnus japonica* Steud. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 1999 ; 7(4) : 263-8.
11. Lee JH, Na MS, Lee MY. Effect of ethanol extract of *Prunus mume* on the antioxidative system and lipid peroxidation on ethanol-induced hepatotoxicity in rat liver. *Korean Journal of Food Preservation*. 2004 ; 11(1) : 71-8.
12. Kwak JI, Kim KJ. Effect of Glycyrrhizae Radix on alcohol intake and alcohol withdrawal syndrome. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. 2007 ; 21(1) : 33-8.
13. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal*. 2007 ; 22 : 659-61.
14. Kim JJ, Seo BI, Choi HS, Kim SM, Woo CH, Koo JS, Park GY. Preventive effect of Daekumeumja on fatty degeneration of liver and immunosuppression induced by alcohol. *The Journal of Korean Oriental Medicine*. 2010 ; 16(2) : 167-79.
15. Ahn TK, Shin JW, Cho CK, Cho JH, Yoo HS, Lee YW, Lee NH, Yun DH, Son CG. Effect of Galwahyejung-tang(GHT) on protection for alcohol-induced liver injury. *The Journal of Korean Oriental Medicine*. 2005 ; 26(1) : 76-84.
16. Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases : new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *Journal of Experimental Biology*. 2003 ; 206 : 1107-15.
17. Sayre ML, Perry G, Smith AM. Oxidative stress

- and neurotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*. 2008 ; 21 : 172–88.
18. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005 ; 25 : 29–38.
 19. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *European Journal of Pharmacology*. 2001 ; 429 : 195–207.
 20. Mosley RL, Benner EJ, Kadiu I, Thomas M, Boska MD, Hasan K, Laurie C, Gendelman HE. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clinical Neuroscience Research*. 2006 ; 6 : 261–81.
 21. Available from : URL : [http : //en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus](http://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus).
 22. White AM, Matthews DB, Best PJ. Ethanol, memory, and hippocampal function : A review of recent findings. *Hippocampus*. 2000 ; 10 : 88–93.
 23. Ryabinin AE. Role of hippocampus in alcohol-induced memory impairment : implications from behavioral and immediate early gene studies. *Psychopharmacology*. 1998 ; 139 : 34–43.
 24. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats : Behavioral data. *Behavioural Brain Research*. 1988 ; 31 : 47–59.
 25. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1992 ; 116 : 201–11.
 26. Herculano-Houzel S, Lent R. Isotropic fractionator : A simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *Journal of Neuroscience*. 2005 ; 25(10) : 2518–21.
 27. Available from : URL : [http : //www.dsrh.co.kr/central/haeju](http://www.dsrh.co.kr/central/haeju).
 28. Heo J. Dongui Bogam. Seoul : Bubin Munhwasa. 1999 : 1135–8.
 29. Kim DG. Effect of Galhwahyejung-tang(GHT) on alcohol-induced oxidative stress in rats. Department of Oriental Medicine, Graduate school, Dongeui university, Thesis of the master's degree.
 30. Young C, Klocke BJ, Tenkova T, Choi J, Labruyere J, Qin YQ, Holtzman DM, Roth KA, Olney JW. Ethanol-induced neuronal apoptosis in vivo requires BAX in the developing mouse brain. *Cell death and differentiation*. 2003 ; 10 : 1148–55.
 31. Olney JW, Ishimaru MJ, Bittigau P, Ikonomidou C. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Apoptosis*. 2000 ; 5 : 515–21.
 32. Ku BM, Lee YK, Jeong JY, Mun J, Han JY, Roh GS, Kim HJ, Cho GJ, Choi WS, Yi G, Kang SS. Ethanol-induced oxidative stress is mediated by p38 MAPK pathway in mouse hippocampal cells. *Neuroscience letters*. 2007 ; 419 : 64–7.
 33. Park MK, Lee YJ. Effect of different ethanol treatments on the oxidative stress in liver and brain of SD rats. *Journal of Food Hygiene and Safety*. 2002 ; 17(3) : 124–8.