

국민 건강보험 급여 한약 처방 56종의 치매 주요 생리지표 및 신경세포 변화에 대한 효능 비교 연구

임혜선^{1†}, 김유진^{1,2†}, 김윤주¹, 김부여¹, 정수진^{1*}

¹한국한의학연구원 임상의학부, ²충남대학교 약학대학

Screening of 56 Herbal formulae covered by the National Health Insurance Service on Dementia-related Factors

Hye-Sun Lim^{1†}, Yu Jin Kim^{1†}, Yoon ju Kim¹, Bu-Yeo Kim¹, Soo-Jin Jeong^{1*}

¹Clinical Medicine Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 34054, Republic of Korea, ²College of Pharmacy, Chungnam National University

Objectives: The purpose of this study was to investigate the effects of 56 herbal formulae covered by the National Health Insurance Corporation (NHIC) on dementia-related biomarkers and neuronal cell changes.

Methods: The 56 herbal formulae were extracted with 70% ethanol at 100°C for 2 h. The antioxidant properties was measured by radical scavenging assay using ABTS+ radical. The acetylcholinesterase (AChE) activity was tested by Ellman's assay and amyloid- β ($A\beta$) aggregation was determined using fluorescence method. To estimate the inhibitory effects of herbal formulae on neuronal cell death and inflammation using HT22 hippocampal cells and BV-2 microglia, respectively.

Results: Among the 56 herbal formulae, Dangguiyukhwangtang, Banhasasimtang, Samhwangsasimtang, Cheongwiesan, Hwangryunhaedoktang, Banhabaekchulchunmatang, Jaeumganghwatang, Cheongseoikgitang, and Hoechunyanggyuksan has a significant inhibitory effects on acetylcholinesterase (AChE) activity. Doinseunggitang and Samhwangsasimtang exerted the effect on the inhibition of amyloid- β ($A\beta$) aggregation. Additionally, 10 herbal formulae affected AChE and $A\beta$ aggregation revealed antioxidant activity as well as neuroprotective and anti-neuroinflammation effects in neuronal cell lines.

Conclusions: 10 herbal formulae that have been shown to be effective against the major dementia markers have been shown to have antioxidant activity, neuronal cell protection and inhibition of brain inflammation. Further investigation of these herbal formulae will need to be validated in dementia animal models.

Key Words : Dementia; Acetylcholinesterase; Amyloid- β ; Antioxidant; Neuronal cells; Herbal formula

서론

우리나라의 한방 건강보험은 1984년부터 1986년까지 시범사업을 거쳐 1987년부터 건강보험 피보험자에게 전국적으로 확대 실시되었다. 2017년 현재 한방

건강보험의 급여범위는 진찰료, 검사, 처치, 시술, 한방요법, 입원료, 식대, 약제 항목이 포함되어 있으며, 이 중 약제 항목에는 혼합엑스산제 56종과 단미엑스산제 68종이 포함되어 있다¹⁾. 과거에는 한약은 보약이라는 인식이 강하여 치료보다는 예방의 역할이 더 강하게

• Received : 12 July 2018

• Revised : 7 September 2018

• Accepted : 7 September 2018

• Correspondence to : 정수진(Soo-Jin Jeong)

대전 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 임상의학부

Tel : +82-42-868-9651, Fax : +82-41-521-7007, E-mail : sjjeong@kiom.re.kr

부각 되었으나, 실제 한약은 전통적으로 치료약으로 사용되어 온 것이 사실이다. 이러한 사실은 한의약을 보다 치료의학으로서 발전시킬 수 있는 기반이 된다고 할 수 있으며, 이를 통하여 보다 적극적인 한방의료보험 활성화에 기여할 수 있을 것이다.

현재 우리 정부에서는 ‘치매국가책임제’를 통한 치매에 대한 관리, 예방 및 치료 등에 대한 중요성을 강조하고 있고, 이 시점에서 치매의 예방 및 치료에 대한 한의학의 역할 및 위치를 확고히 할 필요가 있다. 서양의학에서 치매의 정의는 여러 가지 원인에 의하여 뇌기능이 급격히 손상 및 저하되는 상태를 말하며, 치매관리법에서는 퇴행성 뇌질환 또는 뇌혈관계 질환 등으로 인하여 기억력, 언어능력, 지남력, 판단력 및 수행능력 등의 기능이 저하됨으로써 일상생활에서 지장을 초래하는 후천적인 다발성 장애로 정의하고 있다²⁾. 한의학에서는 매병, 건망, 치병 등의 범주에 속하며 기혈을 소통시켜 담과 어혈을 없애 몸을 보하는 치료를 적용하고 있다³⁾. 국내에서 발표된 한약처방의 치매 임상연구 논문 검색 결과, 단면연구에서 성향정기산, 우황청심원, 조위승청탕 등이 있었다^{4,5)}. 일본에서는 지속적인 연구를 통하여 조동산과 역간산의 치매 개선 효과가 발표된 바 있다^{6,7)}. 이에 반하여, 한약처방의 임상 효능에 대한 과학적 근거에 대한 연구는 미미한 실정이다.

본 연구팀에서는 50종 한방 다빈도 한약처방의 치매 관련 주요 생리지표에 대한 실험적 연구를 통한 결과를 발표한 바 있다⁸⁾. 본 연구에서는 추가적으로 56종의 건강보험급여 기준 처방의 치매 병리기전에서의 주요 효능 평가지표들의 변화를 측정하여 이들의 유효성에 대한 과학적 근거를 구축하고자 하였다. 치매의 생리지표인 아세틸콜린 분해효소(acetylcholinesterase) 활성 및 아밀로이드 베타(amyloid- β , A β) 단백질 응집에 대한 효능과 자유 라디칼 소거능 측정을 통한 항산화 효능을 검색하였다. 또한 신경세포보호 및 뇌세포염증 저해 효능을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 한약처방의 제조

본 연구에 사용된 한약처방은 보험급여 한약제제 중 혼합엑스산제 56종에 대하여 기준처방별 가격표에 제시된 처방 내용에 따라 단미재를 혼합하여 추출물을 제조하였다⁹⁾. 한약처방의 구성 한약재는 모두 광명당 제약 (Ulsan, Korea)에서 규격품을 구입하여 사용하였다. 각각의 처방을 구성하는 한약재를 제시된 비율로 배합한 후 70%(v/v) 에탄올을 시료의 6배에 해당하는 양으로 첨가하여 100°C에서 2시간씩 2회 환류추출 장치 (MS-E105 Heating mantle, MTOPS®, Korea)로 추출하였다¹⁰⁾. 상기 추출액을 여과지 (5 mm)를 이용하여 불용성 물질을 제거한 후, 냉각 콘텐서가 장착된 농축 장치 (EYELA N-1000, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 40°C에서 감압 농축하여 분말 형태의 추출물을 얻었다.

2. 아세틸콜린 분해효소 활성 저해 효능 탐색

아세틸콜린 분해효소 저해 활성은 Ellman법¹¹⁾을 변형하여 분광 광도법으로 측정하였다. 활성 분석을 위한 완충용액은 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.3, 이하 A-buffer)를 사용하였고, 아세틸콜린 분해효소는 0.1% bovine serum albumin/H₂O용액에 25 U/mL 농도로 일정량씩 분주하여 -80°C에 보관하고, 실험 시 assay buffer에 녹여 최종 농도 35.2 mU/mL로 하여 사용하였다. 기질인 acetylthiocholine iodide와 발색 시약 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)는 A-buffer에 각각 10 mM의 농도로 일정량씩 분주하여 -80°C에 보관하고, 실험 시 최종 농도 0.5mM로 하여 사용하였다. 시료는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 녹여 최종 농도 100 ug/mL이 되도록 사용하였다. 효소 반응은 다음과 같이 전개하였다. 50 uL의 시료와 50 uL의 기질과 발색 시약 혼합액을 섞어주고, 10 분간 preincubation한 후, 아세틸콜린 분해효소를 처리하고 60 분간 상온에서 반응시켰다.

흡광도는 Epoch Microplate Spectrophotometer

(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT)를 이용하여 412 nm에서 측정하였다. 대조약물로는 아세틸콜린 분해효소 저해 약물로 잘 알려진 berberine을 사용하였고¹²⁾, 결과는 control군에 대한 %로 표시하였으며, 계산식은 아래와 같다.

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - \{(S - S') / (C - C')\}] \times 100$$

S: samples (sample solution, A-buffer with DTNB, substrate, and enzyme)

S': samples (sample solution, A-buffer with DTNB and substrate, without enzyme)

C: control (0.1M sodium phosphate buffer (pH 8.0), A-buffer with DTNB, substrate, and enzyme)

C': control (0.1M sodium phosphate buffer (pH 8.0), A-buffer with DTNB and substrate, without enzyme)

3. 아밀로이드 베타 (Aβ₁₋₄₂) 응집 저해 효능 탐색

아밀로이드 베타의 응집 저해 측정은 형광 분석법¹³⁾을 이용한 SensoLyte[®] Thioflavin T β-Amyloid (1-42) Aggregation Kit (AnaSpec, Inc., Fremont, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 아밀로이드 베타 (Aβ₁₋₄₂) 펩티드는 영하 80°C에서 보관하였으며, 측정 시 사용한 최종 농도는 100 μg/mL로 사용하였다. 형광 물질로 사용하는 thioflavin T는 assay buffer (50 mM Tris/150 mM NaCl (pH=7.2), 20 mM HEPES/150 mM NaCl (pH=7.2), 10 mM phosphate/150 mM NaCl (pH=8.0))에 녹여 제조하여 2 mM 농도로 사용하였다. 시료는 assay buffer에 녹여 최종 농도 100 μg/mL로 사용하였다. Aβ₁₋₄₂ 응집억제 정도를 측정하기 위하여 96 well plate (black microplate)에 thioflavin T (ThT) 10 μL와 Aβ₁₋₄₂ 85 μL를 넣은 후 일정 농도로 만든 시료 5 μL와 혼합하여 형광 분광 분석기로 측정하였다. 이때 사용한 형광 분광 분석기의 파장값은 440 nm/484 nm (excitation/emission)이며, 37°C에서 20분 간격으로 총 2시간 측정하였다. 활성 비교를 위하여 양성 대조군으로 morin 을 사용하였고¹⁴⁾, 결과는 응집 저

해능에 대한 %로 표시하였으며, 계산식은 아래와 같다.

$$\text{aggregation inhibition (\%)} = [1 - \{(S - S') / (C - C')\}] \times 100$$

$$= [1 - \{(S - S') / (C - C')\}] \times 100$$

S: samples (sample solution, assay buffer with ThT, amyloid-solution)

S': samples (sample solution, assay buffer with ThT, without amyloid-solution)

C: control (assay buffer with ThT, amyloid-solution)

C': control (assay buffer with ThT, without amyloid-solution)

4. ABTS 자유 라디칼 소거능 측정

3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) 라디칼을 이용한 항산화능 측정은 ABTS+· cation decolorization assay 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다¹⁵⁾. 7mMABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+·를 형성 시킨 후 743 nm에서 0.7의 흡광도 값을 갖도록 PBS로 희석하였다. 96 well plate에 ABTS+·용액과 시료를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, Epoch Microplate Spectrophotometer를 사용하여 743 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거활성은 용매인 PBS를 대조군으로 하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타냈다.

5. 세포독성시험

마우스 유래 신경 해마 세포 HT22와 미세아교세포 BV-2는 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 DMEM 배지에 penicillin (100 U/mL)과 streptomycin (100 μg/mL)을 첨가하여 37°C 및 5% CO₂조건에서 배양하였다. 각각의 세포를 96 well plate에서 18 시간 배양한 후, 한약 처방을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이어서 Cell Count Kit (Dojindo, Kumamoto, Japan) 용액 10 μL를 첨가하여 2시간

동안 반응시킨 후 microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 상대적인 세포 생존율 (% of control)을 계산하였다. 세포 활성 실험은 세포 독성이 나타나지 않는 최고 농도를 기준으로 진행하였다.

6. 신경세포 보호 효능 측정

신경세포 손상을 유도하기 위하여 HT22 세포에 250 μ M hydrogen peroxide (H_2O_2)를 6시간 처리하였으며, H_2O_2 단독 처리군과 한약처방과 H_2O_2 를 동시 처리군의 세포 생존율 변화를 비교하여 세포 보호 효능을 판단하였다.

7. 뇌세포 염증 억제 효능 측정

BV-2 세포에 한약처방을 2시간 전처리 한 다음, 염증 반응을 유도하기 위하여 lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/mL)을 처리하고 24시간 배양한 다음 상등액을 회수하였다. 상등액과 Griess 시약(sulfanilamide: *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride =1:1)를 동량 혼합하여 5-10분 반응 시킨 다음 540 nm에서 흡광도를 측정한 다음 표준 곡선에 따라 nitrate 양을 계산하였다.

8. 통계처리

실험값은 mean \pm S.E.M.으로 표시하였다. 실험 결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 ANOVA검정을 적용하였으며, Dunnet's multiple comparison test를 이용하여 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

급속한 노령화 사회로의 진입과 함께 노화 관련 질환의 발병률이 뚜렷하게 증가하고 있다. 그 중 치매는

20 가지 노인 질환 중 증가율뿐만 아니라, 노인 치매 외래 환자의 연평균 증가율 또한 가장 높은 것으로 나타났다¹⁶⁾. 이와 같은 현실에도 불구하고 현재까지 치매 치료제로서 개발된 약물은 없으며, 미국 FDA의 승인을 받은 치매 약물들은 증상 완화 또는 지연 등의 효과에 불과하다¹⁷⁾. 이들 약물의 대부분은 신경전달물질인 아세틸콜린의 제거에 대한 역할을 하는 아세틸콜린 분해효소의 활성 억제제이다^{18,19)}. 따라서 이들 아세틸콜린분해효소 억제제의 문제점을 해결하기 위하여 여러 가지 치매 관련 바이오마커들을 타겟팅하는 약물들에 대한 연구가 진행되고 있으나, 연이은 임상시험에서의 실패는 치매치료제 개발지연을 야기하고 있다. 치매 발병에 대한 분자기전은 염증, 세포손상, 산화적 스트레스, 미토콘드리아 기능장애, 대뇌 글루코스 대사 등과 관련된 여러 경로들이 관여되어 있다¹⁹⁾. 따라서 치매 치료제의 개발 연구는 주요 바이오마커에 대한 효과와 함께 관련된 다양한 기전에 대한 부분이 복합적으로 고려되어야 할 것이다. 이와 같은 측면에서 다수의 한약재의 배합으로 다양한 약물들 간의 생체 내 상호작용에 의한 시너지 및 조절을 나타내며, 이는 치매와 같은 복잡한 병리기전에 의해 조절되는 질환의 치료제 개발에 보다 적합할 것으로 생각된다. 현재까지 여러 가지 한약처방의 치매에 대한 효능을 제시하는 비임상 또는 임상 연구결과들이 발표되어 왔으며^{20,21)}, 본 연구팀에서도 다빈도 한약처방 50종의 항치매 효능 평가 비교 결과를 발표한 바 있다⁸⁾.

본 연구에서는 건강보험 적용 한약처방 56종의 치매 주요 바이오마커에 대한 효능과 함께 항산화, 신경세포보호 및 뇌염증 저해능을 분석하였다. 아세틸콜린 분해효소의 활성화 및 아밀로이드 베타의 응집은 치매 환자에서의 주요 현상으로 알려져 있다^{17, 22)}. 따라서 56종 처방들의 아세틸콜린 분해효소 활성 및 아밀로이드 베타 응집 변화에 미치는 영향을 평가하였다. 56종 처방 중 9종이 아세틸콜린 분해효소의 활성을 저해하였다(당귀육황탕, 반하사심탕, 삼황사심탕, 청위산, 황련해독탕, 반하백출천마탕, 자음강화탕, 청서익기탕, 회춘양격산) (Table 1).

Table 1. Inhibitory Activity of the 56 Herbal Formulas in the National Health Insurance Coverage on AChE Activity and Amyloid- β Aggregation in vitro (at 100 μ g/mL)

	Herbal formulas	Original	AChE activity inhibition (%)	Amyloid- β aggregation inhibition (%)
1	가미소요산(加味逍遙散)	동의신경정신과학	2.47±0.82	-17.88±6.31
2	당귀육황탕(當歸六黃湯)	한방산부인과학	92.32±0.39	15.38±2.37
3	대시호탕(大柴胡湯)	상한론	3.11±2.26	26.76±17.64
4	대황목단피탕(大黃牡丹皮湯)	동의보감	22.54±2.30	47.47±5.79
5	도인승기탕(桃仁承氣湯)	방약합편	26.42±1.61	74.06±3.44
6	반하사심탕(半夏瀉心湯)	동의보감	83.47±1.00	51.63±1.92
7	백출탕(白朮湯)	동의보감	-18.49±0.78	-17.74±17.80
8	보중익기탕(補中益氣湯)	동원십서	-16.20±1.76	-1.32±1.92
9	보허탕(補虛湯)	의학입문	-16.85±1.65	-5.85±1.10
10	삼황사심탕(三黃瀉心湯)	동의보감	93.30±0.23	76.00±5.57
11	소시호탕(小柴胡湯)	상한론	-8.03±5.33	46.15±2.61
12	시호계지탕(柴胡桂枝湯)	동의보감	-12.85±2.28	36.46±5.62
13	오림산(五淋散)	방약합편	-0.45±1.87	24.56±4.39
14	이중탕(理中湯)	방약합편	-12.23±1.04	23.29±1.60
15	이진탕(二陳湯)	방약합편	-9.22±1.19	-26.37±35.65
16	익위승양탕(益胃升陽湯)	방약합편	-9.85±1.33	-6.76±10.14
17	인진호탕(茵陳蒿湯)	득효력	30.30±0.32	36.98±2.58
18	조위승기탕(調胃承氣湯)	동의보감	34.33±3.15	64.80±10.10
19	청위산(淸胃散)	방약합편	89.12±0.10	-0.29±16.49
20	팔물탕(八物湯)	방약합편	-2.23±3.80	7.83±15.77
21	황금작약탕(黃金芍藥湯)	방약합편	9.07±1.42	41.89±12.74
22	황련해독탕(黃連解毒湯)	방약합편	96.71±0.31	38.57±5.20
23	갈근탕(葛根湯)	상한론	-4.48±3.32	4.64±0.33
24	갈근해기탕(葛根解肌湯)	방약합편	-13.33±9.08	17.90±0.95
25	구미강활탕(九味羌活湯)	방약합편	-25.32±2.82	16.38±2.43
26	궁소산(芎蘇散)	방약합편	-16.28±2.15	29.62±0.24
27	궁하탕(芎夏湯)	방약합편	-6.82±6.34	21.54±0.54
28	내소산(內消散)	방약합편	-19.34±4.48	4.31±0.06
29	당귀연교음(當歸連翹飲)	동의보감	-18.15±3.04	5.78±4.29
30	대청룡탕(大靑龍湯)	상한론	-24.89±3.82	-3.15±3.40
31	대화중음(大和中飲)	방약합편	-5.67±1.53	7.94±3.70
32	반하백출천마탕(半夏白朮天麻湯)	방약합편	67.71±0.11	-3.94±1.56
33	반하후박탕(半夏厚朴湯)	동의보감	-2.30±1.29	42.42±2.31
34	복령보심탕(茯苓補心湯)	방약합편	-7.89±3.29	21.25±6.75

	Herbal formulas	Original	AChE activity inhibition (%)	Amyloid- β aggregation inhibition (%)
35	불환금정기산(不換金正氣散)	동의보감	-11.45±2.33	29.31±6.20
36	삼소음(參蘇飲)	동의보감	-16.97±2.26	11.76±0.83
37	삼출진비탕(參朮健脾湯)	동의보감	-15.97±2.12	0.90±1.80
38	삼호작약탕(參胡芍藥湯)	방약합편	-19.57±1.09	25.62±0.48
39	생맥산(生脈散)	천금익방	-27.77±1.66	2.99±3.06
40	소청룡탕(小青龍湯)	상한론	-13.75±0.41	23.94±2.20
41	승양보위탕(升陽補胃湯)	동의보감	2.22±2.23	22.45±5.68
42	시경반하탕(柴梗半夏湯)	방약합편	-5.00±1.82	47.56±1.95
43	시호소간탕(柴胡疏肝湯)	동양의학대사전	0.23±2.56	28.36±2.78
44	시호청간탕(柴胡淸肝湯)	의종금감	3.07±0.39	44.85±30.86
45	안태음(安胎飲)	동의보감	1.25±1.12	33.49±4.08
46	연교패독산(連翹敗毒散)	동의보감	-7.39±0.81	24.20±6.41
47	오적산(五積散)	방약합편	-1.93±0.26	27.59±4.80
48	인삼패독산(人蔘敗毒散)	동의보감	-3.07±0.43	34.16±1.94
49	자음강화탕(滋陰降火湯)	만병회춘	75.72±0.55	37.48±2.64
50	청상견통탕(淸上鑊痛湯)	제중신편	-2.39±0.71	51.58±3.35
51	청서익기탕(淸暑益氣湯)	방약합편	82.60±0.30	25.64±6.89
52	평위산(平胃散)	동의보감	-6.42±0.61	31.08±5.91
53	행소탕(散)(杏蘇湯(散))	동의보감	-7.73±0.81	25.66±18.14
54	향사평위산(香砂平胃散)	방약합편	1.19±0.65	33.58±7.45
55	형개연교탕(荊芥連翹湯)	방약합편	0.51±0.43	38.42±2.03
56	회춘양격산(回春涼隔散)	방약합편	91.87±0.20	49.94±1.20
	Berberine		60.63±0.6	
	Morin			68.3±6.2

양성대조군 berberine이 60.63 ± 0.6%의 아세틸콜린 분해효소 활성에 대한 저해를 나타낸 것과 비교하여, 9종의 처방은 모두 양성대조군 보다 높은 67% 이상의 저해 효과를 나타내었다. 특히 이들 중 당귀육향탕, 삼황사심탕, 황련해독탕, 회춘양격산은 각각 92.32 ± 0.39%, 93.30 ± 0.23%, 96.71 ± 0.31%, 91.87 ± 0.20%의 높은 저해 활성을 나타내었다. 또한, 9종 처방은 다양한 농도(12.5, 25, 50 or 100 μ g/mL)에서 분석하였을 때, 농도 의존적으로 아세틸콜린 분해효소 활성을 저해함을 확인하였다(Fig. 1).

아세틸콜린 분해효소 활성에 대한 효능 평가와는 달리 아밀로이드 베타 응집에 대한 저해 효능은 56종 처방 중 2종에서만 관찰되었다(도인승기탕, 삼황사심탕)(Table 1). 양성대조군으로 사용된 morin의 아밀로이드 베타 응집 저해 효능이 68.3 ± 6.2%인 것과 비교하여 도인승기탕과 삼황사심탕은 각각 74.06 ± 3.44%, 76.00 ± 5.57%의 저해 활성을 나타내었다. 이들 2종 처방의 활성은 다양한 농도에서 재검증되었으며 2종 모두 농도 의존적으로 아밀로이드 베타 저해 활성을 보였다(Fig. 2).

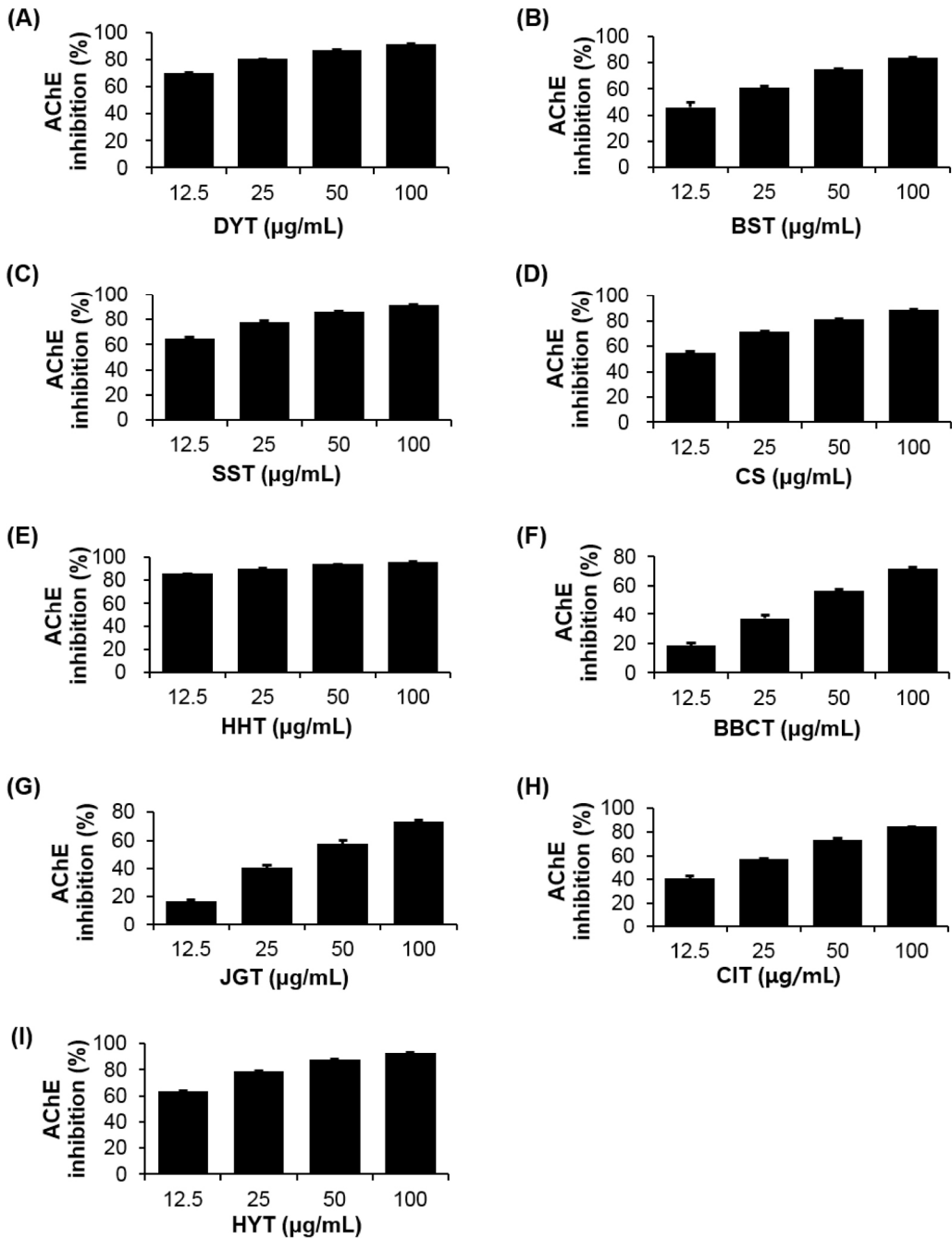


Fig. 1. Inhibitory effects of ethanol extract of herbal formulas on acetylcholinesterase (AChE) activity. (A) Dangguiyukhwangtang (DYT), (B) Banhasasimtang (BST), (C) Samhwangsasimtang (SST), (D) Cheongwiesan (CS), (E) Hwangryunhaedoktang (HHT), (F) Banhabaekchulchunmatang (BBCT), (G) Jaeumganghwatang (JGT), (H) Cheongseokgitang (CIT), and (I) Hoechunyanggyuksan (HYS).

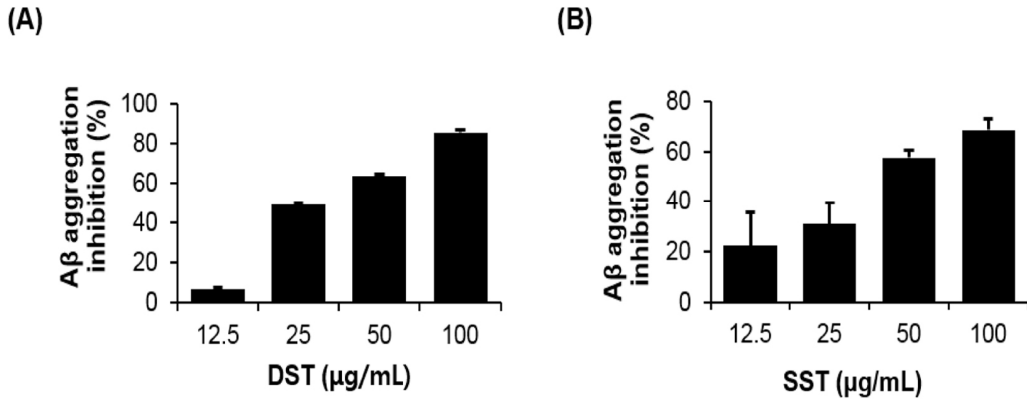


Fig. 2. Inhibitory effects of ethanol extracts of herbal formulas on amyloid β ($A\beta$) aggregation. (A) Doinseunggitang (DST) and (B) Samhwangsasimtang (SST).

두 결과를 종합하였을 때, 56종 보험급여 한약처방 중 삼황사심탕만이 치매에 대한 두 종류의 주요 바이오마커 아세틸콜린 분해효소 활성 및 아밀로이드 베타 응집을 모두 저해하였으며, 다른 처방들은 아세틸콜린 분해효소 활성 또는 아밀로이드 베타 응집 중 한 가지 마커에 대해서만 효능을 나타내었다.

치매의 발병에서 산화적 스트레스로 인한 뇌 손상은 주요하게 나타나는 현상 중 하나이며, 이는 뇌 부위에 과도한 자유 라디칼 생성을 유도하게 된다¹⁹⁾. 상기 치매 주요 바이오마커들에 대한 저해 효능이 확인된 10종 처방들의 ABTS 라디칼의 생성에 대한 소거능을 측정하였다. 10종 처방은 모두 농도 의존적으로 강한 ABTS 소거 활성을 나타내었으며, 그 중 도인승기탕 (B)과 삼황사심탕(D)이 저농도에서도 활성이 높음이 확인되었다(Fig. 3).

치매 환자에서 아밀로이드 베타, 그람음성균, 박테리아 및 바이러스 등 다양한 신경 독소들은 뇌에 축적되어 신경세포 손상을 야기한다²³⁾. 따라서 주요 바이오마커들의 활성에 효과를 나타낸 10종 한약처방들의 신경세포 손상에 대한 보호 효능에 대한 평가를 실시하였다. HT22 마우스 유래 신경 해마 세포주를 사용하였으며 각각 처방들의 세포 독성을 측정하여 HT22 세포에 대한 비독성 농도 범위에서 다음의 실험을 수행하였다(Table 2). H_2O_2 를 처리하여 세포 손상을 유

도하였다. Fig. 4의 결과는 H_2O_2 의 처리는 HT22 세포 생존율을 유의적으로 감소시켰다. 반면에 치매 주요 마커들에 대한 효능을 나타낸 10종 처방 모두가 H_2O_2 에 의하여 유발된 신경세포 손상에 대한 보호 효과가 있음이 확인되었다. 치매를 포함함 퇴행성 뇌질환에서의 뇌 손상은 염증 반응을 유도하며, 이 과정에서 미세아교세포의 활성화가 나타난다. 활성화된 미세아교세포는 NO를 비롯한 염증 매개 물질을 분비를 촉진한다²⁴⁾. 본 연구에서는 항뇌염증 효능을 평가하기 위하여 10종 한약처방의 NO 생성에 미치는 영향을 측정하였다. BV-2 미세아교세포주의 세포독성을 평가한 다음 (Table 3), 비독성 범위의 다양한 농도로 한약처방 추출물을 처리하고, LPS를 처리하여 염증 반응을 유도하였다. 그 결과 LPS를 처리한 세포를 약물을 처리하지 않은 정상 세포와 비교하였을 때, NO의 생성량이 유의적으로 증가되었음을 확인하였다(Fig. 5). 반면에 한약처방을 처리한 경우, 10종 처방 모두 LPS에 의한 NO 생성을 농도 의존적인 감소시켰다(Fig. 5). 본 연구에서 항치매 활성을 나타낸 10종의 처방들의 치매와 관련한 비임상 및 임상 논문들을 분석한 결과, 황련해독탕에 대한 것이 다수 있었으며 삼황사심탕 효능의 임상논문이 1건 있었다. 나머지 8종의 처방들의 치매 관련 논문들은 확인 되지 않았다.

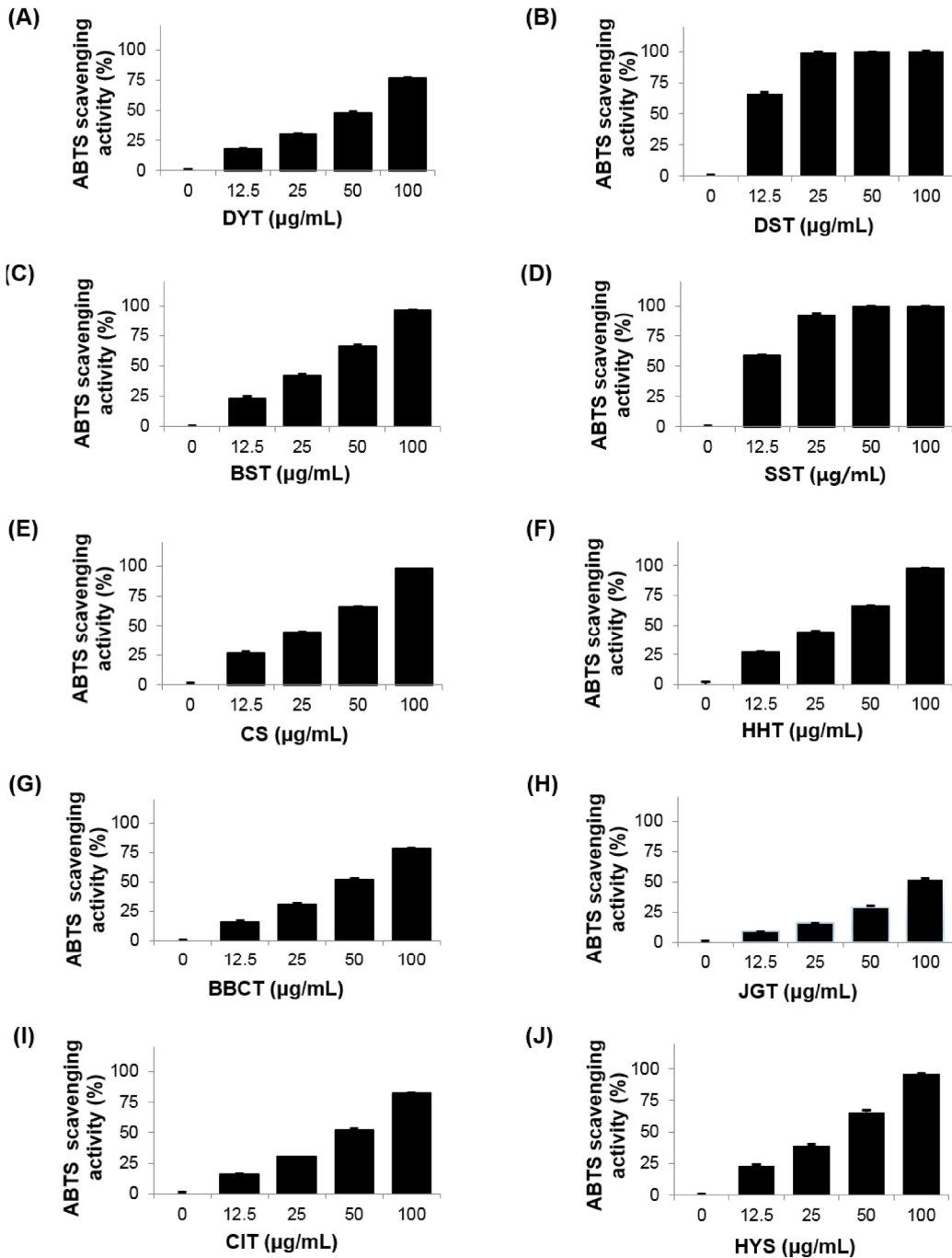


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of ethanol extracts of dementia effective herbal formulas. (A) Dangguiyukhwangtang (DYT), (B) Doinseunggitang (DST), (C) Banhasasintang (BST), (D) Samhwangsasintang (SST), (E) Cheongwiesan (CS), (F) Hwangryunhaedoktang (HHT), (G) Banhabaekchulchunmatang (BBCT), (H) Jaeumganghwatang (JGT), (I) Cheongseoikgitang (CIT), and (J) Hoechunyanggyuksan (HYS).

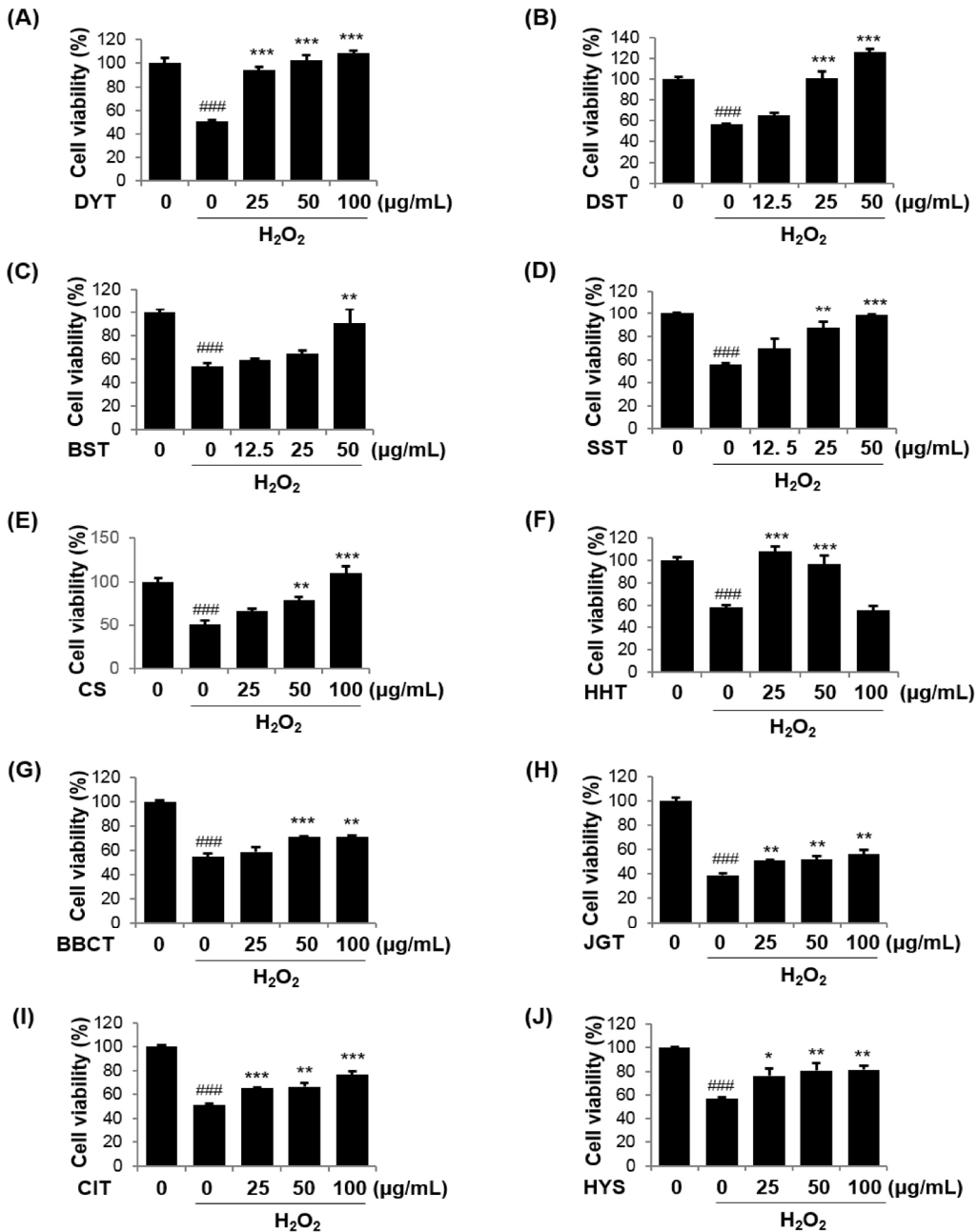


Fig. 4. Neuroprotective effects of ethanol extracts of dementia effective herbal formulas. HT22 cells were exposed to H₂O₂ in the absence or presence of herbal formula extracts for 6 h. Cell viability was determined using CCK assay kit. The results are expressed as mean ± SEM of three independent experiments. ###P < 0.01 vs vehicle control cells; *, P < 0.05, **, P < 0.01, ***, P < 0.001 vs H₂O₂-treated cells. (A) Dangguiyukhwangtang (DYT), (B) Doinsunggitang (DST), (C) Banhasasimtang (BST), (D) Samhwangsasimtang (SST), (E) Cheongwiesan (CS), (F) Hwangryunhaedoktang (HHT), (G) Banhabaekchulchunmatang (BBCT), (H) Jaeumganghwatang (JGT), (I) Cheongseoikgitang (CIT), and (J) Hoechunyanggyuksan (HYS).

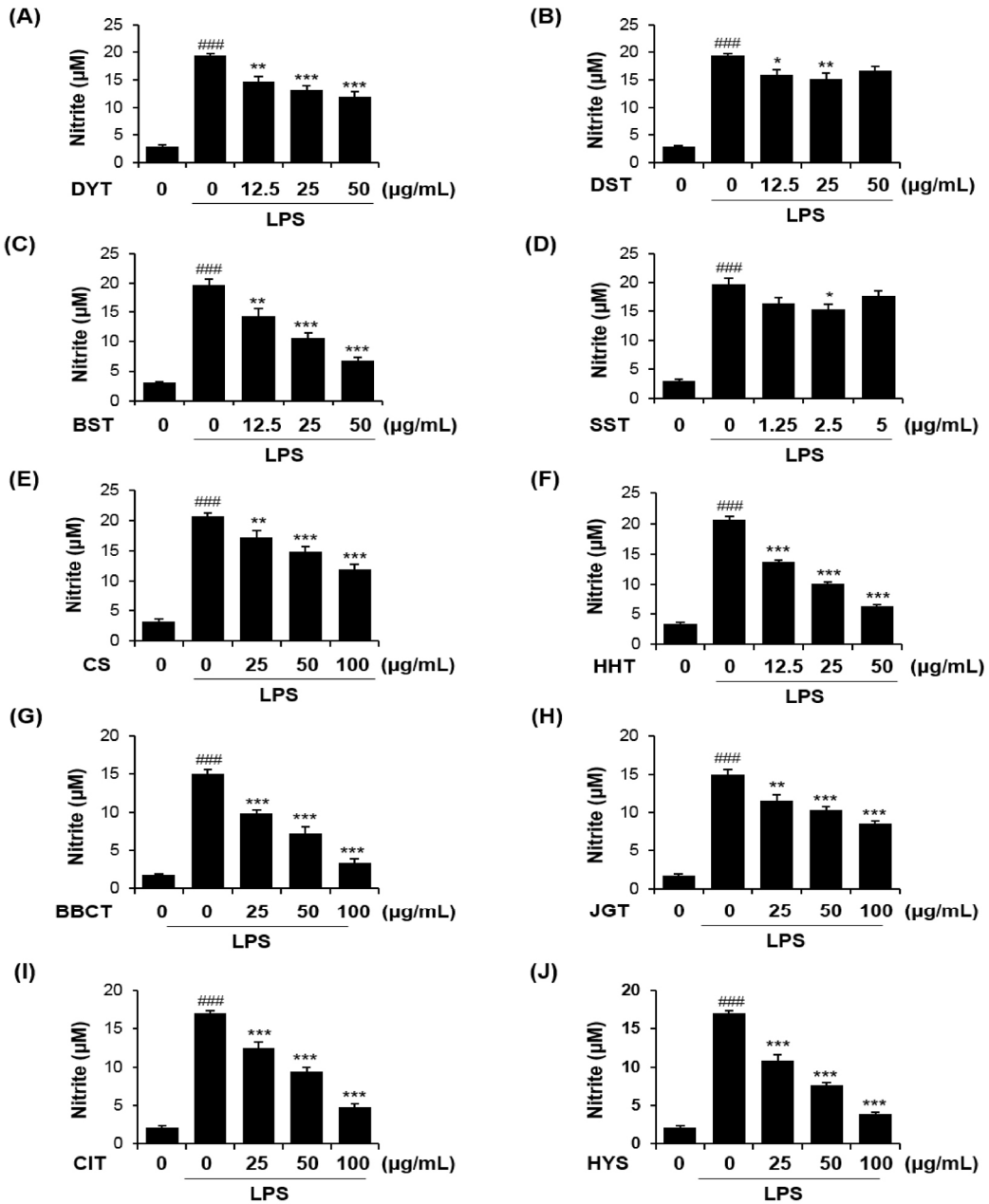


Fig. 5. Anti-neuroinflammatory effects of ethanol extracts of dementia effective herbal formulas. BV-2 cells were pretreated with herbal formula extracts for 2 h and stimulated with LPS for additional 22 h. Culture supernatants were collected and subjected to NO assay using Greiss reagents. Data represent mean \pm SEM from three independent experiments. ###, $P < 0.001$ vs untreated control; *, $P < 0.05$ **, $P < 0.01$ ***, $P < 0.001$ vs LPS-treated group. (A) Dangguiyukhwangtang (DYT), (B) Doinseunggitang (DST), (C) Banhasasimtang (BST), (D) Samhwangsasimtang (SST), (E) Cheongwiesan (CS), (F) Hwangryunhaedoktang (HHT), (G) Banhabaekchulchunmatang (BBCT), (H) Jaemganghwatang (JGT), (I) Cheongseoikgitang (CIT), and (J) Hoechunyanggyuksan (HYS).

Table 2. Cytotoxicity of Dementia Effective Herbal Formulas Against HT22 cells.

Herbal formula	$\mu\text{g/mL}$				
	0	12.5	25	50	100
당귀육황탕	100.00±2.47	100.08±7.36	100.25±11.7	100.40±7.12	100.83±5.36
도인승기탕	100.00±8.63	100.27±2.30	100.68±9.44	100.44±8.58	84.89±6.54
반하사십탕	100.00±3.23	101.82±4.37	100.29±8.48	80.75±8.39	67.01±0.46
삼황사십탕	100.00±7.55	100.92±1.81	100.58±9.79	100.83±9.50	84.83±2.96
청위산	100.00±8.52	102.53±5.83	100.07±3.31	100.40±3.01	100.95±3.43
황련해독탕	100.00±8.89	100.89±3.55	100.48±7.84	106.01±5.02	71.12±0.13
반하백출천마탕	100.00±7.80	100.98±3.18	100.48±7.84	106.01±5.02	71.12±0.13
자음강화탕	100.00±6.31	109.26±7.06	102.77±5.95	94.10±4.37	81.54±1.69
청서익기탕	100.00±2.14	100.74±1.47	100.69±1.25	100.30±4.14	86.70±1.59
회춘양격탕	100.00±3.67	100.51±4.82	100.86±2.18	109.49±4.92	95.66±4.72

Table 3. Cytotoxicity of Dementia Effective Herbal Formulas Against BV-2 cells.

Herbal formula	$\mu\text{g/mL}$				
	0	12.5	25	50	100
당귀육황탕	100.00±5.27	102.59±4.92	93.39±4.07	90.08±2.43	83.00±2.50
도인승기탕	100.00±1.38	102.56±2.58	102.78±3.27	95.89±4.55	84.96±5.36
반하사십탕	100.00±3.50	95.99±1.11	98.88±1.79	96.17±1.39	85.98±1.30
삼황사십탕	100.00±8.54	80.96±2.24	73.97±2.81	70.32±2.37	66.39±1.03
청위산	100.00±1.53	97.00±2.48	92.33±2.54	90.15±1.98	83.14±1.33
황련해독탕	100.00±2.95	113.31±5.74	99.46±4.13	91.64±4.15	77.36±2.19
반하백출천마탕	100.00±1.92	99.83±1.66	96.63±1.79	91.97±3.05	91.00±0.90
자음강화탕	100.00±1.19	95.42±1.89	91.31±2.68	90.57±0.88	90.44±1.00
청서익기탕	100.00±1.15	98.55±2.81	94.08±2.15	92.57±1.53	91.27±1.50
회춘양격탕	100.00±2.65	98.31±2.08	95.85±1.40	93.65±0.19	93.44±1.84

황련해독탕은 청열사회해독(淸熱瀉火解毒)의 대표적인 처방이며, 보건복지부 고시 급여 적응증은 비교적 체력이 강한 사람의 각종 발열과 염증성 조건을 동반하는 질환, 감염에 의한 고열, 경련, 의식 혼탁, 불면증, 기침, 코피, 구내염, 설염, 이명, 어지러움, 동계, 알코올성 위염, 알코올성 간질환, 자극성 접촉피부염, 단독, 급성결막염, 정신분열병, 양극성 정동장애, 해리장애, 신경증이다²⁵⁾. 황련해독탕의 비임상 연구 논문은

항암 및 항염증 효능에 대한 것들이 많았으며^{26,27)}, 조 건부 공포 스트레스 유발 동물 모델에서의 항불안 효 능²⁸⁾과 장기간 경압력 (chronic mild stress)로 유발 된 우울증 동물 모델에서 항우울 효능의 연구 논문이 있었다²⁹⁾. 황련해독탕 임상시험의 연구 결과 또한 비임 상 연구와 같이 종양, 고지혈 및 불면증 등에 대한 개 선 효과가 발표되었다³⁰⁻³²⁾. 황련해독탕의 치매 관련 비 임상 논문들은 대부분이 2011년 이전 중국에서 발표

된 것들이었으며, 국내에서는 glucose deprivation으로 유발된 PC-12 신경세포 손상에 대한 보호 효과에 대한 논문이 있었다³³⁾. 중국 논문의 연구 결과에서는 아밀로이드 베타를 주입하여 알츠하이머성 치매를 유도한 동물 모델에서 수증미로실험을 통한 학습 및 기억 향상과 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interferon-gamma (IFN- γ), interleukin-2 (IL-2)와 같은 염증성 사이토카인들의 생성 억제를 통하여 알츠하이머성 치매 유발에 대한 저해 효능을 설명하였다³⁴⁾. 또한 PS1/APP 형질전환 알츠하이머성 치매 동물 모델에서 염증성 사이토카인 IL-6, IL-1 β 함량 감소 그리고 아밀로이드 베타 전구 단백질 억제를 통한 항알츠하이머성 치매 효능 결과를 발표하였다³⁵⁾. 노인성 치매 환자들의 임상시험에서 대조약물(piracetam) 및 황련해독탕을 하루 3회 3개월간 복용한 결과, 대조군과 비교하여 황련해독탕을 복용한 시험군이 치매 선별검사(mini mental state examination, MMSE), 하세가와 지능검사(Hasegawa dementia scale), 일상생활능력 평가(activities of daily living)에서 좋은 결과를 얻었으며, SOD 활성 및 lipid peroxide (LPO) 함량이 높았다³⁶⁾.

삼황사심탕의 한의학적 주치병증은 내열(內熱), 변비(便秘), 심하비경(心下痞硬)이며, 일본에서는 신경정신 증상을 호소하는 환자에서 응용이 많은 처방이다. 보건복지부 고시에서의 삼황사심탕의 적응증은 체력이 있는 사람의 안면홍조, 불안, 변비, 고혈압 수반증상(어깨걸림), 이명, 두중, 불면, 명치 밑이 답답하고 단단하게 느껴지나 만지면 부드러운 경우, 심장 기능의 약화, 심장병의 불명확한 기록 및 합병증, 심통, 원인 미상의 발열, 코피, 피를 토하는 경우, 재발성 구내염, 혀 유두의 비대, 소양증이다³⁷⁾. 삼황사심탕의 유효성에 관한 논문으로는 비만 및 아토피성피부염에 대한 비임상 연구^{38,39)}와 여드름환자에서 항박테리아 효능⁴⁰⁾ 및 신경정신과 약물 복용 우울증 환자에서 불면증 개선⁴¹⁾에 관한 임상연구들이 있었다. 삼황사심탕의 치매 효능 관련 논문으로는 2001년 신 등이 발표한 저산소증으로 유발된 다발성경색치매의증 환자 증례 보고가 있다⁴²⁾. 기억력 저하, 착란, 불면 등을 주소로 하는 저산소성다발성경

색의 치매의증환자를 삼황사심탕가미방으로 치료한 결과 지남력과 집중력이 향상되어 MMSE 검사 점수의 상승과 함께 야간 불면증상과 착란증상이 현저히 개선되었다고 하였다.

본 논문에 포함된 효능 시험은 *in vitro* 수준에서만 이루어졌다. 이들 처방 효능에 대한 보다 신뢰도 높은 과학적 근거 제시를 위해서는 복수의 동물 모델을 활용한 효력 시험을 통한 비임상 유효성 검증이 반드시 필요할 것이다.

결론

본 연구에서는 국민건강보험 급여 한약처방 56종의 치매 관련 평가 지표에 대한 영향을 분석하여 유효처방의 과학적 근거를 확보하고자 하였다. 한약처방 56종 중 당귀육황탕, 반하사심탕, 청위산, 황련해독탕, 반하백출천마탕, 자음강화탕, 청서익기탕, 회춘양격산이 아세틸콜린분해효소 활성 저해 효능을 보였고, 도인승기탕이 아밀로이드 베타 응집 억제 효능을 나타내었다. 또한 삼황사심탕은 두 가지 지표 모두에 효과를 나타내었다. 치매 주요지표에 대한 효능이 확인된 총 10종 처방들은 항산화 활성, 신경세포보호, 뇌염증 억제에 대한 효능이 있음이 확인되었다. 향후 이들 처방들에 대하여 치매 동물 모델에서 유효성 검증이 필요할 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 기관고유사업(K18293)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Son CH, Kim YH, Lim S. A Study on Korean Oriental Medical Doctors' Use of Uninsured Herbal Extracts and How to Promote the Insurance Coverage of Such Herbal Extracts. J Korean Oriental Med. 2009;30(4):64-78.

2. Burns AI, Iliffe S. Dementia. *BMJ*. 2009;338:b75.
3. Akhondzadeh S, Abbasi SH. Herbal medicine in the treatment of Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2006;21(2):113-8.
4. Cho HY, Hong SS, Whang WW, Cho SH. A Retrospective Study on Dementia Outpatients in Oriental Neuropsychiatry Clinic of One Medical Center. *J of Oriental Neuropsychiatry*. 2010;21(4):137-49.
5. Kim BG, Hyun KC, Kim JW, Whang WW. A Clinical Study on the Effects of Oriental Medical Treatment on Dementia of Alzheimer type. *J of Oriental Neuropsychiatry*. 1998;9(1);25-43.
6. Terasawa K, Shimada Y, Kita T, Yamamoto T, Tosa H, Tanaka N, et al. Choto-san in the treatment of vascular dementia: a double-blind, placebo-controlled study. *Phytomedicine*. 1997;4(1):15-22.
7. Matsuda Y, Kishi T, Shibayama H, Iwata N. Yokukansan in the treatment of behavioral and psychological symptoms of dementia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Hum Psychopharmacol*. 2013;28(1):80-6.
8. Lim HS, Kim Y, Kim OS, Jeong SJ. Screening of 50 Korean Herbal formulas with Inhibitory Effects on Acetylcholinesterase Activity and Amyloid- β Aggregation. *Kor J Pharmacogn*. 2016;47(3):287-294.
9. Ministry of Health and Welfare Notice. No. 2014-56. 2014 Apr 18.
10. Lim HS, Ha H, Seo CS, Jin SE, Kim Y, Jeon WY, et al. Comparative study on efficacies and ingredient contents of different solvent extracts of Insampaedok-san. *Kor. J. Herbology*. 2012;27(6):115-122.
11. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88-95.
12. Habtemariam S. The therapeutic potential of *Berberis darwinii* stem-bark: quantification of berberine and in vitro evidence for Alzheimer's disease therapy. *Nat Prod Commun* 2011;6(8): 1089-90.
13. Hellstrand E, Boland B, Walsh DM, Linse S. Amyloid β -protein aggregation produces highly reproducible kinetic data and occurs by a two-phase process. *ACS Chem. Neurosci*. 2010; 1:13-8.
14. Lemkul JA, Bevan DR. Morin inhibits the early stages of amyloid β -peptide aggregation by altering tertiary and quaternary interactions to produce "off-pathway" structures. *Biochemistry*. 2012;51(30):5990-6009.
15. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*. 1999;26:1231-7.
16. Prince M, Ali GC, Guerchet M, Prina AM, Albanese E, Wu YT. Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with dementia. *Alzheimers Res Ther*. 2016;8(1):23.
17. Raina P, Santaguida P, Ismaila A, Patterson C, Cowan D, Levine M, et al. Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline. *Ann Intern Med*. 2008;148(5): 379-97.
18. Naik RS, Hartmann J, Kiewert C, Duysen EG, Lockridge O, Klein J. Effects of rivastigmine and donepezil on brain acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice. *J Pharm Pharm Sci*. 2009;12:79-85.
19. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:7915-7922.

20. Koo JS, Seo BI, Park JH, Roh SS. Analysis of papers on Oriental herbal medicines(prescriptions and herbs) for dementia. *Kor J Herbology*. 2010;25:131-137.
21. Kim W, Jeon W, Heo E, Park S, Han C. Literature review and suggestions: dementia clinical studies in Korean Oriental Medicine. *Kor J Orient Med*. 2011;17:39-46.
22. Vetrivel KS, Thinakaran G. Amyloidogenic processing of betaamyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology*. 2006;66: S69-73.
23. Eikelenboom P, van Gool WA. Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2004;111:281-94.
24. Liu B, Hong JS. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304:1-7.
25. Ministry of Health and Welfare Notice. No. 2015-35. 2015 Feb 23.
26. Hsu YL, Kuo PI, Tzeng TF, Sung SC, Yen MH, Lin YT, et al. Huang-lian-jie-du-tang, a traditional Chinese medicine prescription, induces cell-cycle arrest and apoptosis in human liver cancer cells in vitro and in vivo. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:e290-9.
27. Lu J, Wang JS, Kong LY. Anti-inflammatory effects of Huang-Lian-Jie-Du decoction, its two fractions and four typical compounds. *J Ethnopharmacol*. 2011;134:911-8.
28. Sasaki K, Sudo T, Kurusu T, Kiuchi T, Yoshizaki F. The mechanism of alteration of monoamine metabolism in brain regions in marble burying behavior-isolated housing mice and effect of oren-gedoku-to on this alteration. *Yakugaku Zasshi*. 2000;120(6):559-67.
29. Chung SY, Kim JW, Lee JR, Jang HH, Kim HT, Whang WW. The Effects of Whangryonghaedoktang on Morris Water Maze and Tyrosine Hydroxylase Expression in Ventral Tegmental Area and Locus Coeruleus of the Chronic Mild Stress Animal Model of Depression. *J of Oriental Neuropsychiatry*. 2003;14(1):1-16.
30. Guoxin DU, Shangqin LIU, Xiaoxi XIE, Li HE, Xiaoling ZHU, Wenyu RONG, et al. The efficacy of Huang-Lian-Jie-Du-Tang combined with chemotherapy for multiple myeloma. *J Clinical Hematology*. 2012;25(5):306-8.
31. Sao L, Goto K, Shimada Y, Terasawa Y. Clinical comparative study of Huangyang detoxification hot water boiled rhubarb and atorvastatin for hyperlipidemia: including diet control, comparison with Placebo. *Japan Toyo Kagaku Journal*. 2004;55:236.
32. Tohru S. Significance of Combined Use of Huangyaku Toxin for Insomnia in Manic Condition. *Journal of Japan Toyo Medical Journal*. 2004; 55:179.
33. Kim HY, Shin SH, Lee I. Neuroprotective Effect of Hwangryunhaedok-tang Against Glucose-deprivation Induced Cytotoxicity in PC-12 Cells. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2008;22(6):1462-9.
34. Qing F, Xiaoping Z, Jianwei M, Mei S. The therapeutic effect of Huanglian Jiedu Decoction on AD rats and its effect on cytokine content. *J of Tradit Chin Med*. 2004;29(6):575-8.
35. Qiu Y, Chen G, Mei G, Wang W, Wang K, Pan S. Effect of Huanglian Jiedu Decoction on free radical metabolism and IL-6, IL-1 β content in brain tissue of mice with APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease. *Stroke and neurological diseases*. 2011;18(2):72-4.
36. Chen G, Shan P, Qiu Y. Clinical study of Huanglian Jiedu Decoction in the treatment of senile dementia (Heart and Liver). *Chinese Journal of Emergency Medicine*. 2007;16(4):386-7.

37. Ministry of Health and Welfare Notice. No. 2017-214. 2017 Nov 27.
38. Lee JY, Kook YB. Effects of Samhwangsasim-tang on obesity-related metabolic disease in mice. Herbal formula science. 2014;22(1):93-104.
39. Lee HC, Jeong MY, Choi JH, Park SY. Effects of Samhwangsasim-tang Gamibang on Atopic Dermatitis in Mice. Herbal formula science. 2017;25(3)337-47.
40. Koo JS, Kwon DK, Seo BI, Park JH, Roh SS, Kim SM, et al. The Antimicrobial Activity of Samhwangsasim-tang against pseudomonas aeruginosa 38 isolated from an acne patient. Kor J Herbology. 2010;25(2):11-9.
41. Seok SH, Kim JH, Kim GW, Koo BS. A case of insomnia incurable by neuropsychiatric medication alone, but made possible with Sam-Hwang-Sa-Sim-Tang. J of Oriental Neuropsychiatry. 2006; 17(3):117-29.
42. Shin SU, Lee JS, Kim SS. Effect of modified Samhwangsasim-tang(三黃瀉心湯加味方) on Suspicious Dementia of Multiple Infarction Induced by Hypoxia: A Case ReportJ Oriental Rehab Med. 2001;11(2):219-26

ORCID

임혜선

<https://orcid.org/0000-0003-0727-3864>