



한방건강보험약 12종의 항산화 활성 및 신경세포 독성 스크리닝 연구

서지은¹ · 이한울¹ · 배창환¹ · 윤동학² · 김희영³ · 김승태^{1,3}

¹부산대학교 한의학전문대학원 한의과학과, ²경희운동학한의원, ³부산대학교 건강노화한의학연구소

Comparative Study of 12 Herbal Formulae Covered by the National Health Insurance Service in Korea

Ji Eun Seo¹, Hanul Lee¹, Chang-Hwan Bae¹, Dong Hak Yoon²,
Hee-Young Kim³, Seungtae Kim^{1,3}

¹Department of Korean Medical Science, School of Korean Medicine, Pusan National University,

²KyungHee YDH Oriental Clinic,

³Korean Medicine Research Center for Healthy Aging, Pusan National University

Objectives : Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease caused by dopaminergic neuronal death in the substantia nigra pars compacta. PD is known to be linked with mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress. In this study, anti-cytotoxic and anti-oxidative effect of 12 herbal formulae were compared. **Methods :** According to experts' advice, 12 types of herbal formulae (*Gamisoyosan*, *Galgeuntang*, *Galgeunhaegitang*, *Banhabaekchoolcheonmatang*, *Bojungikgitang*, *Boheotang*, *Sihogyejitang*, *Sihosogantang*, *Sihocheonggantang*, *Ojeoksan*, *Cheongsanggyeontongtang* and *Palmultang*) were selected from 56 types of herbal formulae covered by the National Health Insurance Service in Korea. To detect anti-oxidative effect, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay was performed, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was performed to detect anti-cytotoxic effect of 12 herbal formulae using SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Results :** In DPPH assay, anti-oxidant activity was increased in a dose-dependent manner and half maximal inhibitory concentration was highest in the order of *Galgeuntang*, *Gamisoyosan*, *Galgeunhaegitang*, *Ojeoksan*, *Palmultang*, *Sihogyejitang*, *Sihosogantang*, *Cheongsanggyeontongtang*, *Sihocheonggantang*, *Bojungikgitang*, *Boheotang* and *Banhabaekchoolcheonmatang*. In MTT assay, concentration of 80% cell survival was highest in the order of *Sihosogantang*, *Cheongsanggyeontongtang*, *Sihocheonggantang*, *Sihogyejitang*, *Bojungikgitang*, *Galgeuntang*, *Ojeoksan*, *Boheotang*, *Palmultang*, *Galgeunhaegitang*, *Banhabaekchoolcheonmatang* and *Gamisoyosan*. Formulae with more than 50% DPPH radical scavenging activity at concentrations for 80% cell survival were *Sihosogantang*, *Cheongsanggyeontongtang*, *Sihogyejitang*, *Galgeuntang* and *Sihocheonggantang*. **Conclusions :** *Sihosogantang*, *Cheongsanggyeontongtang*, *Sihogyejitang*, *Galgeuntang* and *Sihocheonggantang* extracts can be candidate medicines for PD, but the effect should be validated in PD models.

Key words : Parkinson's disease, national health insurance, Korean medicine, antioxidant, herb, formula

Received March 7, 2022, Revised March 25, 2022, Accepted March 31, 2022

Corresponding author: **Seungtae Kim**

Department of Korean Medical Science, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49 Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yangsan 50612, Korea
Tel: +82-51-510-8473, Fax: +82-51-510-8437, E-mail: kimst@pusan.ac.kr

This work was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (grant number : HF21C0053).

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

한국의 의료보험제도는 1977년에 시작되었으나, 한방진료의 특수성과 한약재의 가격 결정 등의 문제점으로 인하여 의료보험 요양취급기관에 한방의료기관은 제외되었다. 하지만 세계보건기구(WHO)에서 1978년에 알마아타 선언을 통해 전통 의료 자원을 적극 활용할 것을 권고하였고¹⁾, 대한한의사협회에서 한방의료보험 실시를 강력히 요구한 결과, 1984년 12월에 청주시와 청원군에서 한방의료보험 시범사업을 실시하였으며, 이 결과를 바탕으로 한방의료보험이 1987년 2월에 전국적으로 실시되었다²⁾. 한방건강보험약은 처음에 68종 단위엑스산제로 조제되는 26종의 처방으로 시작하였으며, 현재 56개 처방이 한방건강보험약으로 임상에서 다양한 질환의 치료에 사용되고 있다.

파킨슨병은 대표적인 신경퇴행성질환 중 하나로 중뇌의 흑질에 있는 도파민성신경세포가 파괴되면서 도파민 부족으로 인해 떨림, 근육 강직, 자세 이상, 동작의 완만 등의 증상이 나타난다³⁾. 파킨슨병의 원인으로는 미토콘드리아 기능장애, 산화스트레스 증가, α -synuclein 축적 등이 제시되고 있으며⁴⁾, 건강보험심사평가원 보건 의료 빅데이터 개방 시스템 자료에 의하면 우리나라 파킨슨병 환자의 수는 2004년 3만여명에서 2010년 6만여명, 2014년 9만여명, 2019년 11만여명으로 급증하고 있다⁵⁾. 파킨슨병은 현재 완치가 불가능하기에, 서양의학에서는 약물요법이나 수술적 치료를 통해 병의 진행 억제나 증상 완화에 초점을 두고 치료하고 있다. 약물요법으로는 부족한 도파민을 보충시켜 파킨슨병 증상을 개선시키는 레보도파를 널리 사용하고 있지만⁶⁾, 병의 진행을 막지 못하고 3년 이상 장기투여하는 경우 약물효과 감소, 이상운동증 등의 부작용이 발생하는 문제점이 존재한다⁷⁾. 따라서 파킨슨병의 증상을 완화하고 질병의 진행을 억제할 수 있으며 부작용이 적은 효과적인 치료제가 필요한 상황이다.

파킨슨병이라는 병명은 1817년에 James Parkinson이 '진전마비에 대한 소고'라는 논문을 발표한 것을 기념하여 명명하였지만⁸⁾, 고대 이집트의 파피루스, 인도의 아유르베다, 성경, 갈렌의 의서에 파킨슨병 증상에 대한 내용이 기재되어 있을 정도로 오래전부터 파킨슨병의 존재를 인지하고 있었다⁹⁾. 한의학에서도 『素問·至真要大論』의 病機十九條에 “諸風掉眩 皆屬於肝”, “諸暴強直 皆屬於風”라고 기재되어 있을 정도로 일찍부터 파킨슨병의 증상을 인지하고 있었으며, 파킨슨병을 떨림, 강직, 보행장애 등으로 분류하여 치료해왔다¹⁰⁾. 실제로 인삼¹¹⁾, 양계근¹²⁾, 천마¹³⁾ 등의 한약재와 역간산¹⁴⁾, 천마구등음¹⁵⁾ 등의 처방이 파킨슨병 동물모델에서 증상을 완화하고 도파민성신경세포를 보호하는 효과가 있다는 연구가 지속적으

로 발표되는 것을 볼 때, 한약이 파킨슨병의 증상 완화와 병의 진행 억제에 도움이 될 가능성이 매우 높다.

비록 한약이 파킨슨병 환자에게 도움이 될 수 있지만, 약물을 장기간 복용해야 하는 파킨슨병의 특성상 환자들이 처방을 지속적으로 복용하기에는 경제적으로 부담이 된다. 따라서 건강보험제도를 이용하여 환자를 지원하는 정책이 필요하지만, 현재 안면신경마비, 뇌혈관질환 후유증, 월경통에 대한 처방 건강보험 적용 시범사업이 진행 중이라 파킨슨병 치료용 처방이 건강보험에 편입되기까지 많은 시간이 걸릴 것으로 추정된다. 따라서 건강보험에 편입된 56종의 한방건강보험약 중 파킨슨병에 효과를 나타내는 처방을 찾아낸다면, 현재 임상에서 사용 중인 약이므로 적응증 추가를 통해 환자에게 바로 사용할 수 있으며, 환자의 경제적 부담도 덜 수 있다는 장점이 존재한다.

본 연구는 56종의 한방건강보험약 중 파킨슨병 치료에 사용할 수 있는 처방을 발굴하기 위한 기초 단계로, 파킨슨병에 효과가 있을 것으로 기대되는 한방건강보험약 12종을 선정하고 이들의 항산화 효과 및 신경세포에 대한 독성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 처방선정방법

56종의 한방건강보험약 중 파킨슨병에 효과가 있을 것으로 기대되는 처방을 선정하기 위하여, 대학교 부속 한방병원에서 파킨슨병 환자를 진료하는 임상 한의사 4인의 자문을 구하였다. 한의사들은 56종의 한방건강보험약 처방 구성 약재 목록과 본인의 임상 경험을 바탕으로 각 처방이 떨림, 뻣뻣함, 서동증, 균형 장애 등 파킨슨병 증상의 치료에 어느 정도 효과를 기대할 수 있는가를 최소 0점에서 최대 5점까지 평가하였다. 56종의 처방 중 4명의 한의사가 평가한 점수가 평균 3점 이상인 한방건강보험약은 14종이었으며, 이중 시중에서 구매할 수 있는 12종의 한방건강보험약을 연구에 사용하였다(Table 1).

2. 실험재료

본 실험에 사용한 한방건강보험약은 가미소요산(H-01, 한풍제약, 서울, 한국), 갈근탕(H-02, 한풍제약), 갈근해기탕(H-03, 한풍제약), 반하백출천마탕(H-15, 한풍제약), 보충익기탕(H-19, 한풍제약), 보허탕(경진제약, 이천, 한국), 시호계지탕(HS-35, 한국신약, 논산, 한국), 시호소간탕(HS-36, 한국신약), 시호청간탕(No. 34, 경방신약, 인천, 한국), 오적산(H-38, 한풍제약), 청상견통탕

Table 1. List of 14 formulae expected to be effective in Parkinson's disease.

No.	Formula	Score (0~5)	Purchase
1	<i>Gamisoyosan</i>	3.75	○
2	<i>Galgeuntang</i>	3.75	○
3	<i>Galgeunhaegitang</i>	3.5	○
4	<i>Banhabaekchoolcheonmatang</i>	3.5	○
5	<i>Bojungikgitang</i>	3.5	○
6	<i>Boheotang</i>	3.5	○
7	<i>Seungyangbowitang</i>	3.5	×
8	<i>Sihogyejitang</i>	3.25	○
9	<i>Ojeoksan</i>	3.25	○
10	<i>Cheongsanggyeontongtang</i>	3.25	○
11	<i>Sihosogantang</i>	3	○
12	<i>Sihocheonggantang</i>	3	○
13	<i>Ikwiseungyangtang</i>	3	×
14	<i>Palmultang</i>	3	○

The formulae were selected through evaluation by 4 experts treating Parkinson's disease patients in university Korean medicine hospitals, but 2 formulae extracts were excluded because they were not produced in Korea.

(H-46, 한풍제약), 팔물탕(No. 49, 경방신약)으로 총 12종의 엑스산제이며, 각 약은 100 mg/ml 농도로 Dulbecco's phosphate buffered saline에 녹여 4°C에 보관 후 실험 시 세포 배양액에 희석해 사용하였다.

3. 항산화력 측정

한방건강보험약 12종의 항산화력을 측정하기 위하여 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능을 측정하였다. DPPH (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 메탄올(Merck, Darmstadt, 독일)에 0.2 mM 농도로 희석시킨 용액을 제조한 후, DPPH 용액 0.1 ml와 2.5, 2, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml의 농도로 희석한 한약 0.1 ml를 각각 넣어 실온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 한약 대신 메탄올을 첨가하였고, positive control로 L-ascorbic acid (LAA)를 사용하였다. DPPH 라디칼 소거율은 한약 시료 자체 흡광도를 blank, DPPH 시약에 시료를 넣지 않은 흡광도를 control로 사용하여 다음 공식에 따라 계산하였다¹⁰⁾.

$$\text{DPPH scavenging (\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample} - \text{blank}}{\text{control}}\right) \times 100$$

소거율이 50%에 해당하는 반수 최대 억제 농도(half maximal inhibitory concentration, IC50)는 농도별 소거율을 바탕으로 추세선의 관계식을 이용하여 계산하였다.

4. 세포배양

실험에 사용된 SH-SY5Y 인체신경세포주(KCLB, Korean cell line bank, 서울, 한국)는 10% (v/v) fetal bovine serum (Welgene, 대구, 한국)과 100 units/ml penicillin/streptomycin (Welgene)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Welgene) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

5. 세포 생존율 측정

SH-SY5Y 신경세포에서 대한 12종 한약의 농도별 세포 생존율을 측정하기 위해 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands) assay로 분석하였다. 96 well plate에 3×10⁵ cells/ml로 분주한 후 incubator에서 24시간 배양하여 부착시켰다. 기존의 배양액을 제거한 후 한약을 5, 2.5, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 뒤 MTT 용액 0.5 mg/ml로 4시간 동안 반응시키고, MTT 용액을 제거하고 100 μl DMSO를 첨가하여 MTT를 환원하고 생성된 formazan을 용해시킨 후 30분 동안 배양하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 80% 세포 생존율은 한방건강보험약의 농도별 생존율을 추세선의 관계식을 이용하여 계산하였다.

6. 통계분석

모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. One-way analysis of variance 실시 후 Duncan's multiple-range test를 실시하여 p<0.05 경우를 통계적으로 유의한 것으로 평가하였다.

결 과

1. 한방건강보험약 12종의 항산화 효과

12종 한방건강보험약의 항산화 효능을 검증하기 위해 한방건강보험약 12종을 각각 2.5, 2, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml 농도로 희석하고 DPPH 라디칼 소거능을 확인한 결과, 모든 한방건강보험약이 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였다(Fig. 1).

DPPH 라디칼을 50% 제거하는 한약의 농도(IC₅₀)를 구한 결과, DPPH 라디칼을 제거하는 항산화 효과는 갈근탕(0.438 mg/ml)과 가미소요산(0.458 mg/ml)이 가장 뛰어나고, 다음으로 갈근해기탕(0.484 mg/ml), 오적산(0.700 mg/ml), 팔물탕(0.732 mg/ml), 시호계지탕(0.760 mg/ml), 시호소간탕(0.803 mg/ml), 청상견통탕(0.966 mg/ml), 시호청간탕(1.052 mg/ml), 보중익기탕(1.506

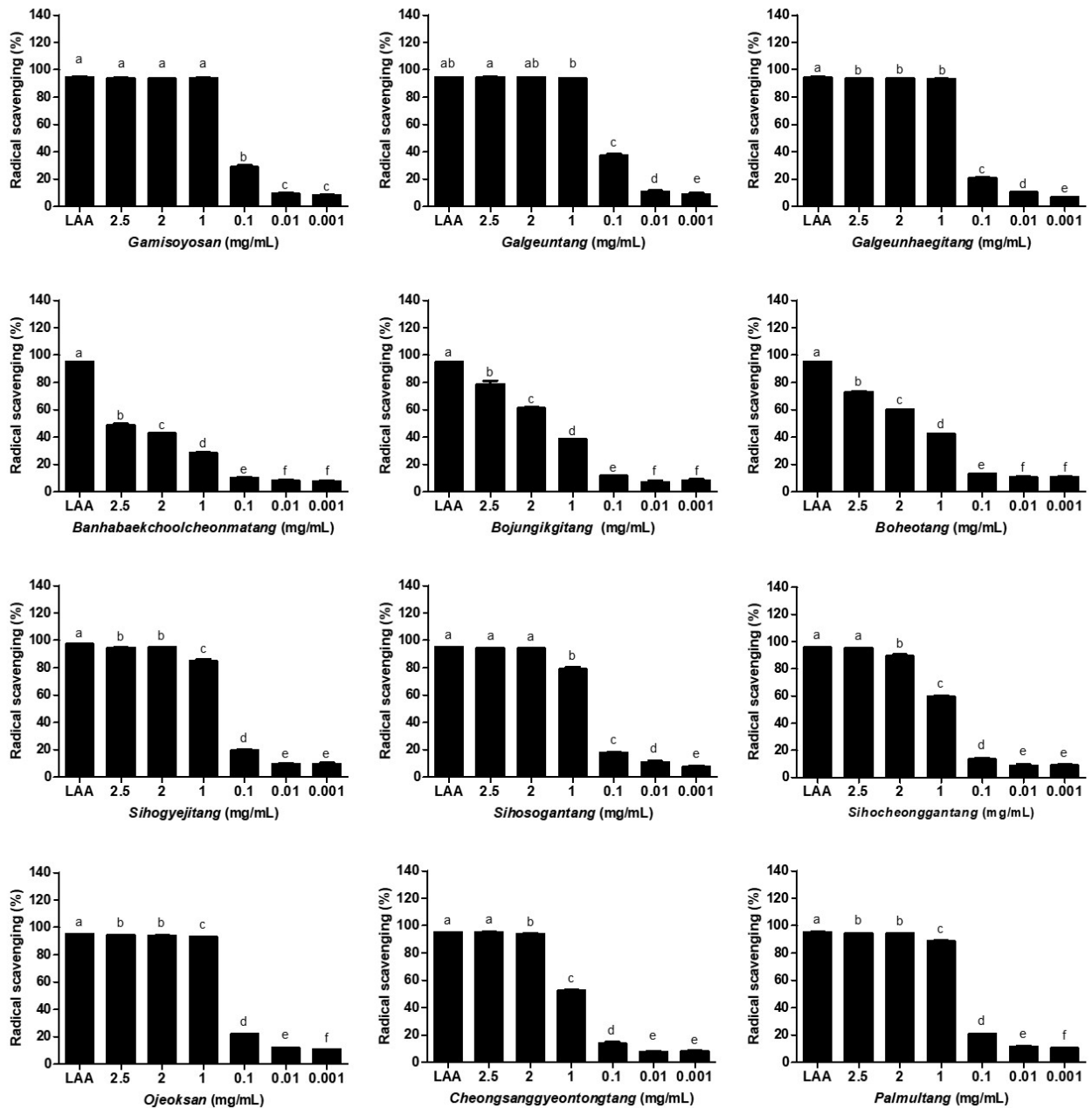


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity at concentrations of 12 formulae extracts. Data presented as means±standard deviation (n=4). Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test. DPPH, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; LAA, L-ascorbic acid.

mg/ml), 보허탕(1.538 mg/ml), 반하백출천마탕(2.476 mg/ml) 순으로 우수한 것으로 나타났다(Fig. 2).

2. SH-SY5Y 신경세포에 대한 한방건강보험약 12종의 독성 평가

12종 한방건강보험약의 신경세포 독성을 확인하기 위해 SH-SY5Y 세포에 한약을 여러 가지 농도(5, 2.5, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml)

로 투여하고 24시간 후 MTT assay를 수행하였으며, 대조군과 비교해 세포 생존율이 80% 이상인 한약 농도를 무독성 안전 농도로 간주하였다. 가미소요산은 0.001 mg/ml 이하 농도에서, 시호소간탕, 시호청간탕, 청상견통탕은 1 mg/ml 이하 농도에서, 갈근탕, 갈근해기탕, 반하백출천마탕, 보중익기탕, 보허탕, 시호계지탕, 오적산, 팔물탕은 0.01 mg/ml 이하 농도에서 세포 생존율이 80% 이상이었다(Fig. 3).

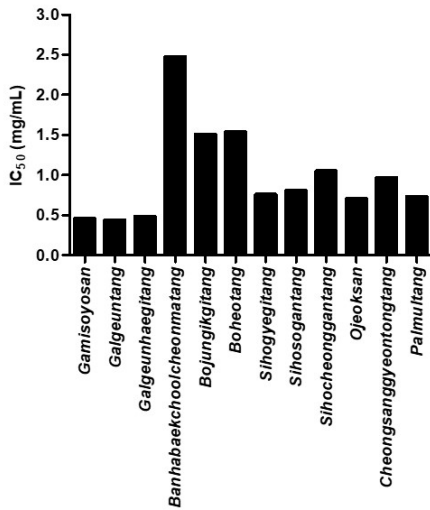


Fig. 2. Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 12 formulae extracts.

Concentration to reduce the initial DPPH radical concentration by 50% was calculated using trend line.

세포생존율이 80%인 한약의 농도를 구한 결과, 시호소간탕 (1.858 mg/ml), 청상견통탕(1.851 mg/ml), 시호청간탕(1.070 mg/ml), 시호계지탕(0.825 mg/ml), 보중익기탕(0.740 mg/ml), 갈근탕(0.617 mg/ml), 오적산(0.103 mg/ml), 보허탕(0.061 mg/ml), 팔물탕(0.051 mg/ml), 갈근해기탕(0.050 mg/ml), 반하백출천마탕(0.042 mg/ml), 가미소요산(0.004 mg/ml) 순으로 세포 독성이 약한 것으로 나타났다(Fig. 4).

3. 한방건강보협약 12종의 세포생존율 대비 항산화 효과

한방건강보협약 12종의 세포생존율 대비 항산화 효과를 평가하기 위하여 세포생존율이 80%일 때의 DPPH 라디칼을 제거하는 항산화 효과를 계산한 결과, 시호소간탕(97.658%), 청상견통탕(88.102%), 시호계지탕(71.976%), 갈근탕(64.470%), 시호청간탕(54.459%), 보중익기탕(28.776%), 오적산(20.147%), 팔물탕(15.190%), 갈근해기탕(13.498%), 보허탕(13.172%), 가미소요산(12.513%), 반하백출천마탕(9.346%) 순으로 우수한 것으로 나타났다(Fig. 5).

고 찰

본 연구는 56종의 한방건강보협약 중 파킨슨병 치료에 사용할 수 있는 처방을 발굴하기 위해 전문가 자문을 통해 한방건강보협약 12종을 선정하고 이들의 항산화 효과 및 신경세포에 대한 독성을 조사하였으며, 그 결과 시호소간탕, 청상견통탕, 시호계지탕,

갈근탕, 시호청간탕이 세포 독성 대비 우수한 항산화 효과가 있음을 확인하였다.

활성산소종은 산화적 대사의 부산물로서 정상적인 세포대사 과정에서도 소량 생성되어 산화적 손상을 야기시키지만, 세포는 이러한 활성산소종의 독성을 최소화하는 보호 기전을 가지고 있다. 그러나 과도한 활성산소종은 체내에서 세포막, 미토콘드리아 DNA를 손상을 초래하여 각종 암뿐만 아니라 파킨슨병 같은 질병과 노화를 촉진한다고 알려져 있다¹⁷⁾. 활성산소종은 스트레스, 흡연, 세균, 음식, 환경 등 다양한 원인에 의해 발생하며, 세포 내 미토콘드리아의 기능 이상으로도 발생한다. 특히 파킨슨병 환자의 뇌 흑질에 위치한 도파민성신경세포 내 미토콘드리아에 존재하는 mitochondrial complex I의 활성이 저하된다는 보고가 있는 것을 볼 때¹⁸⁾, 파킨슨병의 발병 원인인 흑질 내 도파민성신경세포의 파괴에 미토콘드리아의 기능 저하로 인한 활성산소종의 증가가 관여할 가능성이 존재한다.

파킨슨병 환자뿐만 아니라 동물모델에서도 미토콘드리아 기능 이상이 관찰된다. 파킨슨병 동물 모델 제작에 사용되는 신경 독성 물질인 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)은 뇌혈관장벽을 통과한 후 monoamin oxidase B에 의해 1-methyl-4phenylpyriminium ion의 형태로 미토콘드리아에 축적되어 mitochondrial complex I의 기능장애와 이로 인한 활성산소종 및 자유 라디칼 생성을 유발한다¹⁹⁾. 미토콘드리아에서 생성된 활성산소종으로 인한 산화스트레스는 미토콘드리아 외막에서 Bax 발현을 증가시켜 미토콘드리아 막의 투과성을 높이고 cytochrome c를 세포질로 방출시킨다. 방출된 cytochrome c는 Apaf-1과 결합해 apoptosome을 형성하여 caspase 9과 3를 활성화시켜 결과적으로 세포사멸을 유도한다²⁰⁾. 또한 파킨슨병은 중뇌의 흑질에 위치한 도파민성신경세포가 파괴되면서 도파민 부족으로 인해 발병하지만, 반대로 도파민이 산화되어 생성되는 활성산소종인 퀴논(quinone)은 도파민성신경세포의 사멸에 관여하고²¹⁾ α -synuclein, parkin, DJ-1, superoxide dismutase-2 (SOD2)와 같은 파킨슨병 관련 단백질들을 변형시킬 수 있다²²⁾. 이렇듯 활성산소종은 파킨슨병의 발병 및 진행에 밀접한 관련이 있기에, 활성산소종을 억제하는 항산화 효과는 파킨슨병의 예방 및 치료에 매우 중요하다.

본 연구에서는 12종 한방건강보협약의 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH 라디칼 소거능 실험을 진행하였다. 그 결과 가미소요산, 갈근탕, 갈근해기탕, 오적산은 1 mg/ml 이상 농도에서 90% 이상의 DPPH 라디칼을 소거하였고, 시호계지탕, 시호소간탕, 시호청간탕, 청상견통탕, 팔물탕은 2 mg/ml 이상 농도에서 90% 이상의 DPPH 라디칼을 소거하였으며, 보중익기탕, 보허탕, 반하백

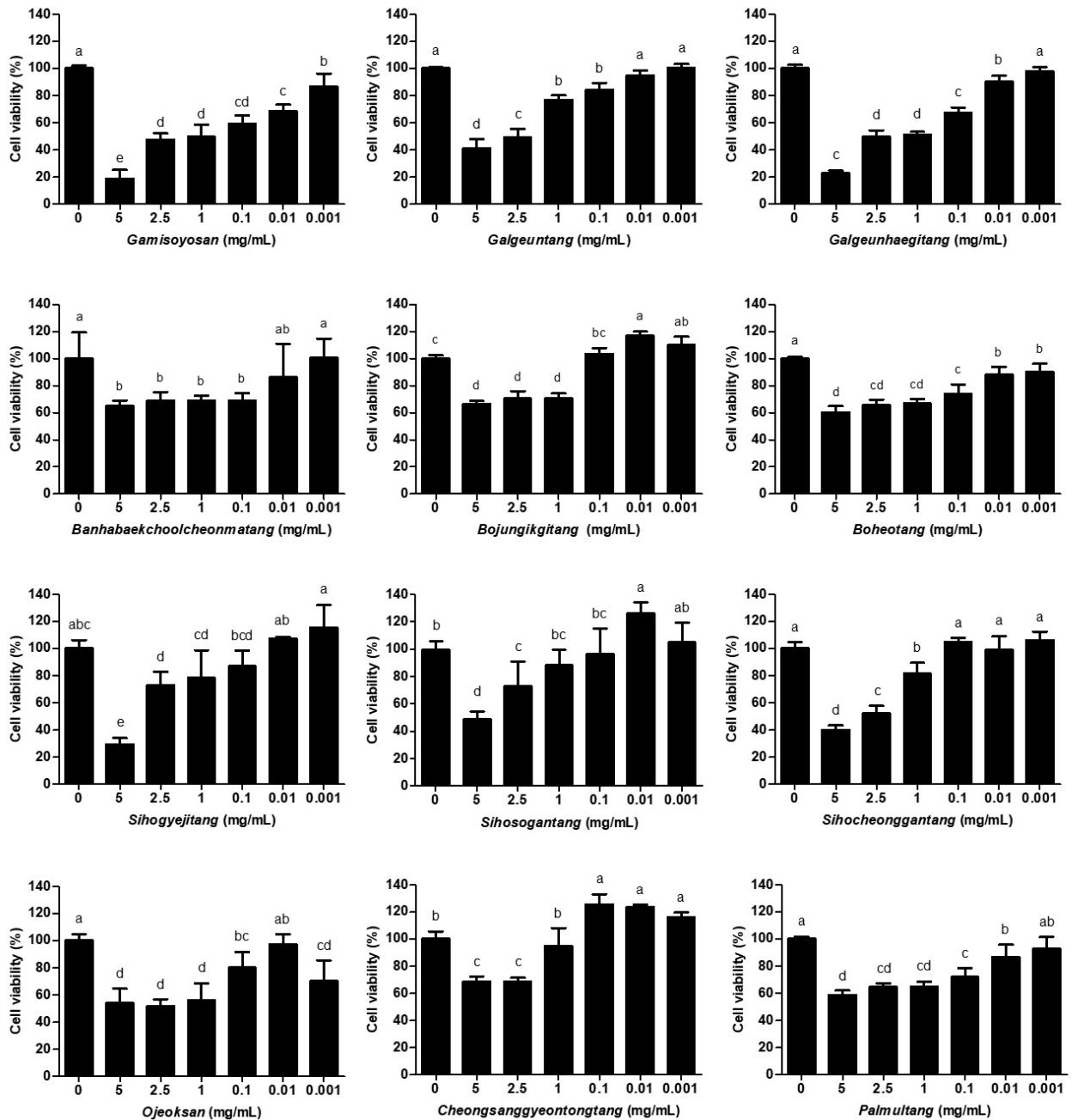


Fig. 3. Cell viability of SH-SY5Y cells after 12 formulae treatment.

Cell viability was measured by 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay. Data presented as means ± standard deviation (n=3). Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test.

출천마탕은 앞에서 기술된 처방들에 비해 DPPH 라디칼 소거능이 약했다. 처방 별 항산화 효과를 비교하기 위해 IC₅₀을 구한 결과, 갈근탕, 가미소요산, 갈근해기탕, 오적산, 팔물탕, 시호계지탕, 시호소간탕, 청상견통탕, 시호청간탕의 순서로 항산화 효과가 강했으며, 보중익기탕, 보허탕, 반하백출천마탕은 다른 처방들에 비해 항산화 효과가 약했다. 따라서 항산화 효과만 놓고 본다면 갈근탕,

가미소요산이 갈근해기탕이 가장 우수하다고 할 수 있다.

한방건강보협약은 식약처에서 허가된 품목이기에 용법 및 용량에 따른 안전성은 확보되어 있지만, 신경세포에 대한 직접적인 안전성은 연구된 바가 없다. 따라서, 본 연구에서는 MTT assay를 이용하여 신경세포에 대한 12종 한방건강보협약의 세포 독성을 평가하였다. SH-SY5Y 신경세포주에 다양한 농도의 한약을 처리한

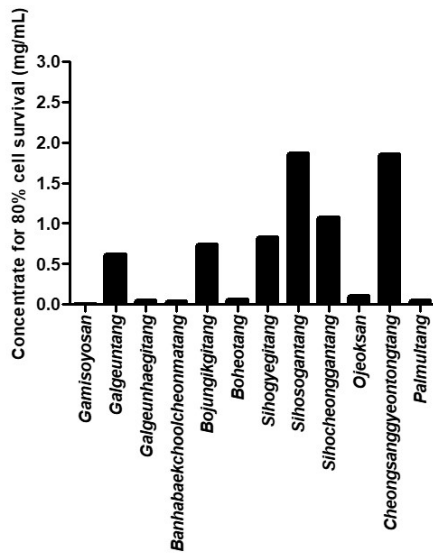


Fig. 4. Concentrations of 12 formulae extracts for 80% cell survival. The concentrations were calculated using trend line.

결과 시호소간탕, 청상견통탕, 시호청간탕, 시호계지탕, 보중익기탕, 갈근탕, 오적산, 보허탕, 팔물탕, 갈근해기탕, 반하백출천마탕, 가미소요산 순으로 독성이 약했다. 또한 시호소간탕, 청상견통탕, 시호청간탕, 시호계지탕, 보중익기탕, 갈근탕은 80% 세포생존율이 0.6 mg/ml 이상 농도에서 나타났지만 오적산은 0.103 mg/ml 농도에서 세포생존율이 80%였고, 보허탕, 팔물탕, 갈근해기탕, 반하백출천마탕, 가미소요산은 0.1 mg/ml 미만에서 세포생존율이 80%일 정도로 세포 독성이 강하였다. 특히 항산화 효과가 가장 좋게 나타난 세 처방 중 가미소요산과 갈근해기탕 두 처방의 신경세포 독성이 높게 나왔기에 항산화 효과만으로는 파킨슨병에 효과가 있을 가능성이 있는 한방건강보험약을 선정하기 어렵다.

항산화 효과와 신경세포 독성을 평가한 결과 한방건강보험약의 항산화 효과와 세포 독성의 정도가 각기 다르기에, 파킨슨병 연구에 후보 약물로 사용하기 위해서는 항산화 효능이 높으면서 세포 독성이 약한 약을 선별할 필요가 있다. 일반적으로 정상군 대비 80% 세포 생존율을 보이는 경우 독성이 없다고 평가하기에, 한방건강보험약 12종의 세포 생존율이 80%일 때의 DPPH 라디칼을 제거하는 항산화 효과를 계산하였다. 그 결과, 시호소간탕, 청상견통탕, 시호계지탕, 갈근탕, 시호청간탕이 50% 이상으로 나타났으며, 이 처방들은 모두 0.01 mg/ml 농도 조건에서 세포 생존율이 80% 이상이었으므로 파킨슨병에 적용 가능한 후보 약물로 적절한 것으로 사료된다.

그러나 본 연구는 다음과 같은 한계점이 존재한다. 첫째, 비록 파킨슨병의 병리 기전에서 활성산소종이 중요한 역할을 하지만,

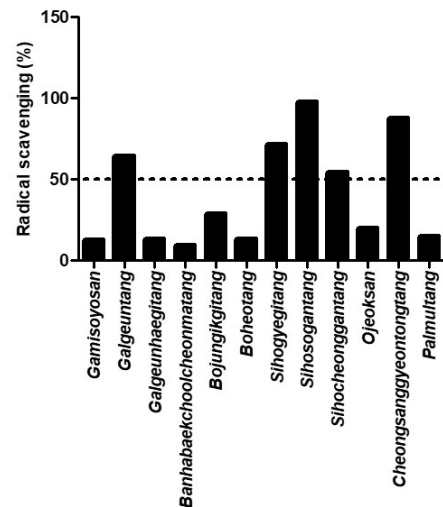


Fig. 5. DPPH radical scavenging activity at concentrations for 80% cell survival of 12 formulae extracts. The activity was calculated using trend line.

항산화 효과가 있는 약물이 모두 파킨슨병에 효과가 있는 것은 아니기에, 파킨슨병 세포 및 동물 모델에서 효능을 검증할 필요가 있다. 둘째, 56종의 한방건강보험약 중 임상 전문가의 자문을 통해 12종을 선정하고 항산화 효과 및 세포 독성을 검증했지만, 나머지 44종의 한방건강보험약 중 파킨슨병에 효과가 있는 약물이 존재할 가능성이 있기에 이에 관한 추가 연구가 필요하다. 마지막으로, 본 연구는 엑스산제를 사용했지만, 같은 처방이라도 제조 회사나 탕제, 환제, 산제 등 제형에 따라 효과의 차이가 날 수가 있으며, 실제로 같은 처방이라도 엑스산제, 연조엑스, 알약 등 다양한 형태의 한방건강보험약이 시중이 유통되기에, 제조사 및 제형에 따른 효과 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

56종의 한방건강보험약 중 임상에서 파킨슨병에 효과가 있을 것으로 기대되는 12종 한방건강보험약의 항산화 효과 및 세포 보호 효과를 조사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 모든 한방건강보험약이 농도 의존적으로 항산화 효과가 증가하였으며, 갈근탕, 가미소요산, 갈근해기탕, 오적산, 팔물탕, 시호계지탕, 시호소간탕, 청상견통탕, 시호청간탕, 보중익기탕, 보허탕, 반하백출천마탕 순으로 항산화 효과가 강하였다.
2. 한방건강보험약의 신경세포 독성은 시호소간탕이 가장 약하였으며, 청상견통탕, 시호청간탕, 시호계지탕, 보중익기탕, 갈근

탕, 오적산, 보허탕, 팔물탕, 갈근해기탕, 반하백출천마탕, 가미소요산 순으로 세포 독성이 높았다.

3. 한방건강보험약의 신경세포 독성 대비 항산화 효과를 평가하기 위해 세포 생존율이 80%일 때의 DPPH 라디칼을 제거하는 항산화 효과를 확인한 결과 시호소간탕, 청상견통탕, 시호계지탕, 갈근탕, 시호청간탕, 보중익기탕, 오적산, 팔물탕, 갈근해기탕, 보허탕, 가미소요산, 반하백출천마탕 순으로 우수하였으며, 특히 시호소간탕, 청상견통탕, 시호계지탕, 갈근탕, 시호청간탕은 LAA 대비 50% 이상의 항산화 효과를 나타냈다.

파킨슨병의 발병 및 진행에 산화스트레스가 중요한 역할을 하기에 항산화 효과가 강하면서 신경세포에 대한 독성이 낮은 시호소간탕, 청상견통탕, 시호계지탕, 갈근탕, 시호청간탕은 파킨슨병에 도움이 될 가능성이 크지만, 파킨슨병 세포 및 동물모델에서 그 효능 및 작용기전을 확인하는 추가 연구가 필요하다.

Acknowledgement

None.

Funding

This work was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (grant number : HF21C0053).

Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

References

- Hong JE. Changes of healthcare environment and the role of the health insurance review and assessment service from the viewpoint of Korean medicine society. HIRA Res. 2021 ; 1(1) : 91-7. <https://doi.org/10.52937/hira.21.1.1.91>
- Seo BI, Kim SH. A study on improve plans for Korean medical insurance system - about herbal medicine. J East-West Med, 1995 ; 20(3) : 3-20.
- Albanese A. Diagnostic criteria for Parkinson's disease. Neurol Sci. 2003 ; 24(Suppl 1) : s23-6. <https://doi.org/10.1007/s100720300032>
- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron. 2003 ; 39(6) : 889-909. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00568-3)
- Health Insurance Review & Assessment Service. Healthcare big-data hub [data base] 2004-2019 [cited 2022 Mar 3] : [1 screen]. Available from: URL: <http://opendata.hira.or.kr/op/opc/olap3thDsInfo.do>
- Katzenschlager R, Lees AJ. Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice. J Neurol. 2002 ; 249(Suppl 2) : II19-24. <https://doi.org/10.1007/s00415-002-1204-4>
- Lee JJ. Pharmacological Treatment in Parkinson's Disease. J Korean Neurol Assoc. 2019 ; 37(4) : 335-44. <https://doi.org/10.17340/jkna.2019.4.1>
- Lees AJ. Unresolved issues relating to the shaking palsy on the celebration of James Parkinson's 250th birthday. Mov Disord. 2007 ; 22(Suppl 17) : S327-34. <https://doi.org/10.1002/mds.21684>
- Garcia Ruiz PJ. Prehistory of Parkinson's disease. Neurologia. 2004 ; 19(10) : 735-7.
- Park SM, Lee SH, Yin CS, Kang MK, Chang DI, Kang SK, et al. Literature review on Parkinson's disease in Oriental medicine. J Acupunct Res. 2004 ; 21(1) : 202-10.
- Jeon H, Bae CH, Lee Y, Kim HY, Kim S. Korean red ginseng suppresses 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced inflammation in the substantia nigra and colon. Brain Behav Immun. 2021 ; 94 : 410-23. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.02.028>
- Kim HY, Bae CH, Kim J, Lee Y, Jeon H, Kim H, et al. *Rumex japonicus* Houtt. protects dopaminergic neurons by regulating mi-

- tochondrial function and gut-brain axis in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *Antioxidants*. 2022 ; 11(1) : 141. <https://doi.org/10.3390/antiox11010141>
13. Lin YE, Lin CH, Ho EP, Ke YC, Petridi S, Elliott CJ, et al. Glial Nrf2 signaling mediates the neuroprotection exerted by *Gastrodia elata* Blume in Lrrk2-G2019S Parkinson's disease. *ELife*. 2021 ; 10 : e73753. <https://doi.org/10.7554/eLife.73753>
 14. Doo AR, Kim SN, Park JY, Cho KH, Hong J, Kim EK, et al. Neuroprotective effects of an herbal medicine, *Yi-Gan San* on MPP+/MPTP-induced cytotoxicity in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol*. 2010 ; 131(2) : 433-42. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.008>
 15. Jiang YN, Guo YZ, Lu DH, Pan MH, Liu HZ, Jiao GL, et al. *Tianma Gouteng* granules decreases the susceptibility of Parkinson's disease by inhibiting ALOX15-mediated lipid peroxidation. *J Ethnopharmacol*. 2020 ; 256 : 112824. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112824>
 16. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 1995 ; 28(1) : 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
 17. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*. 1996 ; 313(1) : 17-29. <https://doi.org/10.1042/bj3130017>
 18. Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, et al. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 ; 163(3) : 1450-5. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)91141-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)91141-8)
 19. Yeo S. Neuroprotective effects of Cervi Cornu in MPP+ treated SH-SY5Y cells. *Korean J Acupunct*. 2020 ; 37(2) : 97-103. <https://doi.org/10.14406/acu.2020.011>
 20. Zhang W, Xue X, Fu T. Construction of a Bcl-2-shRNA expression vector and its effect on the mitochondrial apoptosis pathway in SW982 cells. *Int J Mol Med*. 2017 ; 40(6) : 1914-20. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3156>
 21. Kim YJ. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *J Korean Neurol Assoc*. 2004 ; 22(5) : 421-32.
 22. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat*. 2015 ; 9 : 91. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00091>