

清心蓮子湯 水抽出物이 XO/HX에 의해 損傷된 培養 海馬神經細胞에 미치는 影響

황승연* · 이재흥* · 김형순* · 배영춘* · 김경요* · 원경숙**

Abstract

Effects of Cheongsimyeonja-tang water extract on the Cultured Primary Hippocampal Cell Damaged by XO/HX

Hwang Seung-Yeon* · Lee Jae Heung* · Kim Hyong Soon* · Bae Young Chun* · Kim Kyung Yo* · Won Kyoung Sock**

* Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang Univ.

** Dept. of Nuclear Medicine, College of Medicine, Keimyung Univ.

The purpose of this study is to examine the toxic effects caused by xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX) and the effects of herbal extracts such as Cheongsimyeonjatang(CYT) on the treatment of the toxic effects. For this purpose, experiments with the cultured hippocampal cells from new born mice were done.

The results of these experiments were as follows.

1. XO/HX, a oxygen radical-generating system, decreased the survival rates of the cultured cells on MTT assay and NR assay, protein synthesis, and amounts of neurofilaments.
2. CYT have the efficacy of increasing protein synthesis decreased by XO/HX.
3. CYT have the efficacy of increasing the amount of neurofilaments decreased by XO/HX.

From the above results, it is suggested that Cheongsimyeonjatang (CYT) have marked efficacy as a protection for the damages caused by the XO/HX-mediated oxidative stress.

Key words: Cheongsimyeonjatang, xanthine oxidase/hypoxanthine, protein synthesis, neurofilaments

I. 緒 論

現代 醫學의 발전에도 불구하고, 여전히 해결되지 못하고 있는 많은 난치병들이 존재하

며, 이에 대한 새로운 치료방법을 모색하는 시도가 다양하게 이루어 지고 있다. 四象醫學 또한 기존의 보편적 병리와는 달리 각 體質을 구분하고, 체질별 특수성에 따른 접근을 시도하

* 원광대학교 한의과대학 사상체질의학과

** 계명대학교 의과대학 핵의학과

교신저자 : 황승연 주소) 전북 전주시 완산구 태평1동236 세동한의원 전화)063-253-0253 e-mail: nowhere3@dreamwiz.com

고 있어, 이를 이용한 연구가 진행되고 있다.

東醫壽世保元에서 太陰人은 肝大肺小한 특징을 가지고 있고¹⁾, 肺之黨에 속하는 頭腦 역시 肝大肺小한 영향을 받는다고 하였다.²⁾ 더욱이 최근 金³⁻⁴⁾ 등이 임상 연구 보고에서 太陰人의 중풍 발병율이 가장 높다고 지적한 것처럼 太陰人은 타 체질에 비해 頭腦의 질병에 걸리기 쉬운 체질적 소인을 가지고 있다고 볼 수 있다.

대표적 太陰人 처방 중의 하나인 淸心蓮子湯은 李濟馬의 『東醫壽世保元』⁵⁾에 나오는 太陰人 新定方으로서 虛勞, 夢泄無度, 食滯, 胸腹痛, 泄瀉, 中風, 舌卷 등을 치료하며, 開竅醒腦, 安神情志, 補肺調氣, 安神安意 등의 효능으로 보아 痴呆를 비롯한 여러가지 두뇌와 관련된 질환이나, 신경손상질환에 응용될 수 있음을 알 수 있다.¹⁾

산소자유기는 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것인데, 그 특수구조 때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러 가지 병태생리화학적 반응에 관여하고 있으며 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시킨다.⁶⁻⁷⁾ 특히 산소자유기는 중추나 말초신경계를 구성하고 있는 신경세포에 산화적 손상을 유발함으로써 노인성 치매나 파킨슨씨병을 비롯하여⁸⁻¹¹⁾, 뇌허혈이나 뇌졸중 등과 같은 신경질환의 병인으로 밝혀지고 있다.¹²⁻¹⁴⁾

이에 저자는 淸心蓮子湯도 뇌신경조직에 대한 산소자유기의 산화적 손상기전을 방어하는 작용 즉 항산화작용이 있는지 알아보기로 하였다.

본 실험에서는 산소자유기를 유발하기 위하여 XO/HX를 培養한 海馬神經細胞에 처리한 후 세포독성을 MTT 정량, NR 정량 측면에서 조사하였으며, 淸心蓮子湯의 방어효과를 관찰하기 위하여 淸心蓮子湯 煎湯液을 培養 海

馬神經細胞에 전처리한 후 SRB(sulforhodamin B) 정량, Neurofilament정량을 통하여 총단백질량의 변화와 신경세사량의 변화측면에서 측정을 하였는 바, 유의한 결과를 관찰하였기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 재 료

1) 동 물

본 실험에 사용한 동물은 임신 14~16일의 250~300g의 Sprague-Dawley종의 건강상태가 양호한 생쥐를 사용하였다.

2) 약 제

본 실험에 사용된 淸心蓮子湯은 李⁵⁾의 東醫壽世保元에 의거하였으며 약재는 圓光大學校 韓醫科大學 韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 사용하였으며 처방내용은 다음과 같다.

Prescription of Cheongsimyeonjatang(CYT)

Herbal Name	Scientific Name	Weight (g)
蓮子肉	<i>Semen Nelumbinis</i>	8.0
山藥	<i>Rhizoma Dioscoreae</i>	8.0
石菖蒲	<i>Rhizoma Acori Graminei</i>	4.0
黃芩	<i>Radix Scutellariae</i>	4.0
麥門冬	<i>Radix Ophiopogonis</i>	4.0
酸棗仁	<i>Semen Zizyphi Spinosae</i>	4.0
龍眼肉	<i>Arillus Longan</i>	4.0
天門冬	<i>Radix Asparagi</i>	4.0
萊菔子	<i>Semen Raphni</i>	4.0
遠志	<i>Radix Polygalae</i>	4.0
柏子仁	<i>Semen Biotae</i>	4.0
甘菊	<i>Semen Nelumbinis</i>	2.0
Total amount		54.0

2. 방 법

1) 檢液의 調製

淸心蓮子湯 3첩 반 분량인 189g을 증류수와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간동안 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 동결 건조하여 45.57g의 분말 시료를 얻었다.

2) 藥劑 製造

본 실험에 사용한 시약으로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypoxanthine(HX, Sigma)으로 XO의 경우 100mU/ml, 10mU/ml, 1mU/ml의 저장액을, HX의 경우 1M, 100mM, 10mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3) 細胞培養

임신 14~16일의 Sprague-Dawley종 흰쥐의 복강을 70% 알콜로 소독, 절개한 뒤 자궁을 적출하여 태아의 두경부를 절단하여 피부와 두개골을 제거한 뒤 후뇌에서 연수까지의 뇌를 꺼내어서 HBSS(Hank's balanced salt solution)에 모은 다음 현미경하에서 뇌조직 주위의 뇌막을 제거 후 해마부위를 분리하였다. 분리된 조직에 0.25% trypsin과 0.01% DNase를 첨가하여 37°C 수조에서 20분간 배양한 다음 HBSS로 3~4회 씻어내어 trypsin을 완전히 제거하고 조직 덩어리를 작은 입자 덩어리로 만든 후 상층액을 취하여 HBSS를 첨가 후 세포를 분리하였다. 수차례 반복 후 상층액을 버리고 배지에 부유시켰다. 부유시킨 일부 세포를 취하여 trypan blue로 염색한 후

현미경하에서 hemacytometer를 이용하여 세포의 수를 측정한 다음 $10^4 \sim 10^5$ 개의 세포수를 B-27, 0.5mM L-glutamine, 25uM glutamine, 25uM 2-mercaptoethanol이 첨가된 Neurobasal media(Boehringer Mannheim, Germany)에 4일간 배양 후 glutamate가 없는 배지로 1/2 교환하고 2주간 배양하여 신경세포가 성숙한 다음 실험에 사용하였다.

4) XO/HX의 처리

산소자유기가 생쥐의 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 海馬神經細胞를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM(modified essential medium)으로 3회 세척한 후 xanthine oxidase(XO)에 다양한 농도의 hypoxanthine(HX)을 여러 농도로 조합하여 혼합한 다음 이들 각각의 배양액에서 처리한 후 분석하였다.

5) 세포독성 및 방어효과 검증

(1) 세포생존율 분석

① MTT 정량

MTT-3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma) 정량은 Mosmann¹⁵⁾의 방법에 의하였다. 산소자유기를 처리한 培養 海馬神經細胞를 PBS(phosphate buffered saline)로 3회 세척한 후 전날 제조한 50mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 배양 완료후 dimethylsulfoxide(DMSO, Merk)를 처리한 다음 spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교 조사하였다.

② NR 정량

Neutral red(NR, Sinma)의 정량은 Borenfreud와 Puerner¹⁶⁾의 방법에 따랐다. 즉 여러 농도의 XO를 처리한 培養 海馬神經細胞를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5mg/ml의 NR을 well당 최종농도로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 PBS로 3회 세척 후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

③ SRB 정량

산소자유기나 淸心蓮子湯으로 일정시간 동안 처리한 海馬神經細胞에 0.4% sulforhodamine B를 200 μ l 씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음 1.0% acetic acid로 3회 세척하였다. 세척 완료 후 10mM Tris base를 이용하여 SRB-bound protein을 녹인 후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

④ Neurofilament enzymeimmuno assay(EIA)

배양중인 海馬神經細胞를 PBS로 3회 세척하여 알콜로 고정시킨 다음 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료후 NE14(1:100, Sigma)로 1시간 동안 반응시킨 후 0.04% O-phenylenediamine(OPD, Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide로 처리한 다음 ELISA Reader로 490nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다. EIA는 490nm에서 빛의 흡수량에 의해 신경세사의 양을 측정하는 효소면역 분석법이다.

6) 통계 처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA 한 후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

III. 實驗 成績

1. 산소자유기의 독성효과

1) 세포생존율 분석

(1) MTT 정량

XO가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 xanthine oxidase(XO)가 5mU/ml에서 60mU/ml까지의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 5시간 동안 배양한 후 XO의 독성을 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 5mU/ml XO 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 76.2%로 나타났으며 15mU/ml의 처리에서는 62.6%로 나타났다. 그러나 30mU/ml와 60mU/ml XO를 처리한 경우 세포 생존율은 각각 51.0%(p<0.05)와 25.9%(p<0.01)로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났다(Table 1, Fig. 1).

XO/HX가 배양시간에 따라 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30mU/ml XO/0.1mM HX가 포함된 배양액에서 海馬神經細胞를 각각 1~7시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하는 경향이 있었으며 특히 5시간과 7시간에서는 각각 50.5%(p<0.05), 27.7%(p<0.01)으로 나타나 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Table 2, Fig. 2).

Table 1. Dose-dependency of xanthine oxidase (XO) in the cultured hippocampal cells

XO (mU/ml)	MTT absorbance (570 nm)	Decrease rate of cell viability (%)
0	1.47±0.19	-
5	1.12±0.17	23.8
15	0.92±0.08	37.4
30	0.75±0.06*	49.0
60	0.38±0.02**	74.1

The cultured hippocampal cells were treated with various concentrations of xanthine oxidase (XO) for 5 hours. The values are the mean±SE for 6 experiments. The significant differences from the control are marked with the asterisks. *p<0.05; **p<0.01

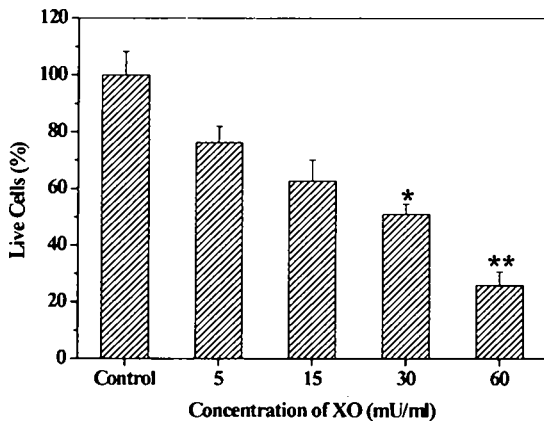


Fig. 1. Dose-dependency of xanthine oxidase (XO) in the cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 1. *p<0.05; **p<0.01

Table 2. Time-response relationships of xanthine oxidase (XO) in the cultured hippocampal cells

XO/HX (mU/ml/mM)	MTT absorbance (570 nm)				
	0 hr	1 hr	3 hr	5 hr	7 hr
0	1.53±0.18	1.51±0.17	1.48±0.13	1.46±0.15	1.43±0.14
30	1.34±0.11	1.10±0.09	0.95±0.07	0.72±0.05*	0.49±0.02**

The cultured hippocampal cells were treated with various time intervals at a the concentration of 30mU/ml XO in 0.1mM HX. The values are the mean±SE for 6 experiments. The significant differences between groups are marked with the asterisks. *p<0.05; **p<0.01

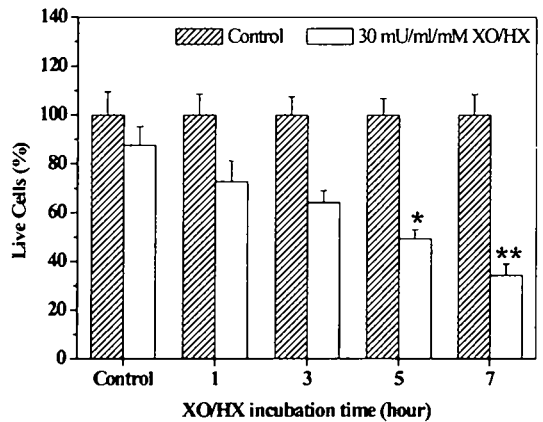


Fig. 2. Time-response relationship of xanthine oxidase (XO) in hypoxanthine (HX) on the cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 2. *p<0.05; **p<0.01

(2) NR 정량

배양중인 海馬神經細胞를 Ca^{2+} , Mg^{2+} free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 XO가 10mU/ml에서 70mU/ml 까지의 농도로 포함된 배양액에서 5시간 배양한 다음 이의 영향을 조사한 결과 10mU/ml의 처리에서 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 85.7%로 나타났으며 30mU/ml 에서는 63.7%로 나타났다. 또한 50mU/ml 과 70mU/ml 에서는 각각 48.8%($p<0.05$), 36.3%($p<0.01$)로 나타났다(Table 3, Fig. 3).

XO가 배양시간에 따라 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MCV(midpoint cytotoxicity value)값인 50mU/ml XO농도에서 1~7시간 동안 배양한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 조사한 결과 1시간, 3시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 각각 72.7%, 61.3%로 나타났으며 5시간과 7시간 각각 53.5%($p<0.05$), 28.4%($p<0.01$)로 나타났다(Table 4, Fig. 4).

Table. 3. Absorbance (% of control) at 540nm wavelength for the NR assay on xanthine oxidase (XO) in the cultured hippocampal cells.

XO (mU/ml)	NR absorbance (540 nm)	Decrease rate of cell viability (%)
0	1.68±0.17	-
10	1.44±0.15	14.3
30	1.07±0.13	36.3
50	0.82±0.06*	51.2
70	0.61±0.05**	63.7

The cultured hippocampal cells were grown in the media containing various concentrations of xanthine oxidase (XO) for 5 hours. The values represent the mean±SE for 6 experiments. The significant

differences from the control are marked with the asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

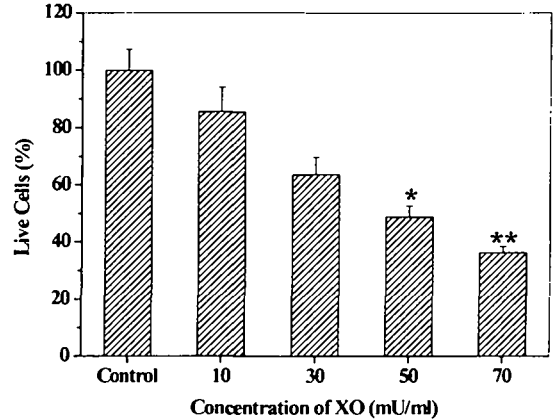


Fig. 3. Dose-response relationships of xanthine oxidase (XO) in the cultured hippocampal cells. Other legends are the same as table 3. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

Table 4. Time-response relationships of xanthine oxidase (XO) in hypoxanthine (HX) by NR assay in the cultured hippocampal cells.

XO/HX (mU/ml/mM)	NR absorbance (540 nm)				
	0 hr	1 hr	3 hr	5 hr	7 hr
0	1.79±0.16	1.76±0.18	1.73±0.17	1.70±0.15	1.62±0.14
50	1.40±0.13	1.28±0.11	1.05±0.09	0.91±0.07*	0.46±0.04**

The cultured hippocampal cells were incubated with 50mU/ml xanthine oxidase (XO) in 0.1mM hypoxanthine (HX) for various time intervals. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with the asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

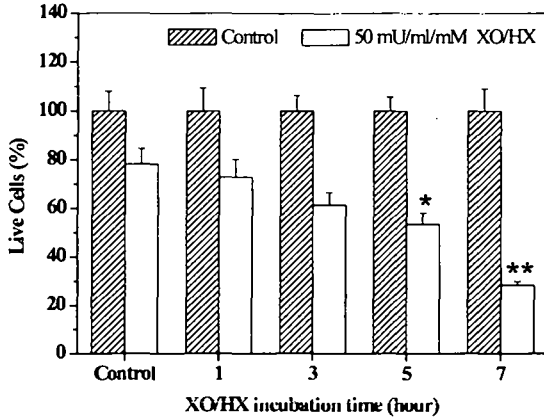


Fig. 4. Time-dependency of xanthine oxidase (XO) in hypoxanthine (HX) in the cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 4. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

2. 한약추출물의 효과

1) SRB 정량

(1) XO/HX의 영향

산소자유기가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 총단백질양의 측면에서 조사하기 위하여 0.1mM Hypoxanthine(HX)에 Xanthine Oxidase(XO)가 10mU/ml에서 80mU/ml까지의 농도로 포함된 배양액에서 5시간 동안 배양한 후 XO에 의한 단백질 합성의 변화에 대해 조사한 결과 10mU/ml XO 처리에서는 단백질의 합성이 대조군(100%)에 비하여 82.7%로 나타났다. 또한 20mU/ml의 처리에서는 대조군에 비하여 73.5%로 다소 낮게 나타났다. 또한 40mU/ml과 80mU/ml XO를 처리한 경우 단백질 합성은 각각 52.6%($p < 0.05$)과 34.7%($p < 0.01$)로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의하게 낮게

나타났으며, MCV값은 40mU/ml에서 나타났다 (Table 5, Fig. 5).

Table 5. Dose-response relationship of xanthine oxidase(XO) on total protein synthesis in the cultured hippocampal cells.

XO/HX (mU/ml/mM)	Total protein (% of control)
0	100±9.6
10	82.7±7.4
20	73.5±6.8
40	52.6±4.2*
80	34.7±5.3**

Cultured hippocampal cells were exposed to 10, 20, 40 and 80mU/ml xanthine oxidase(XO) for 5 hours, respectively. Amount of total protein was measured by SRB assay(540nm), and shown as % of control. The results indicate the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the contrl are marked with asterisks. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

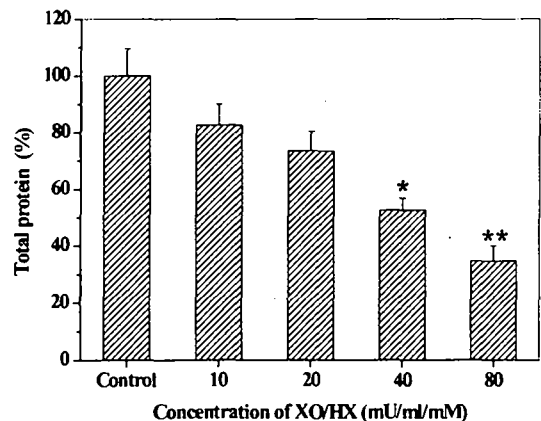


Fig.5. Dose-dependency of xanthine oxidase(XO) on total protein synthesis in cultured mouse hippocampal cells.

Other legends are the same as the Table 5. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(2) 清心蓮子湯의 效果

培養 海馬神經細胞에 대한 XO의 산화적 손상에 있어서 清心蓮子湯의 效果를 總蛋白質의 양적변화 측면에서 조사하기 위하여 XO의 MCV값(midcyto- toxicity value)인 40mU/ml XO농도에서 5시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15 μ g/ml에서 100 μ g/ml 清心蓮子湯이 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 15 μ g/ml XO만을 처리한 경우 總蛋白質의 양적변화는 대조군(100%)에 비하여 56.4%로 나타났으며, 또한 25 μ g/ml 清心蓮子湯의 처리에서는 대조군에 비하여 75.4%로 나타났다. 그리고 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 처리에서는 각각 83.6%($p < 0.05$), 87.9%($p < 0.01$)로 XO만의 처리에 비하여 높게 나타났다(Table 6, Fig.6).

Table 6. Dose-response relationship of *CYT* for its neuroprotective effect on XO in total protein synthesis.

XO/HX (mU/ ml/ mM)	Total protein (% of control)				
	concentration of <i>CYT</i> (μ g/ml)				
	0	15	25	50	100
0	100 \pm 8.8	100 \pm 7.9	100 \pm 9.1	100 \pm 6.4	100 \pm 7.6
40	56.4 \pm 6.7	63.9 \pm 8.2	75.4 \pm 5.9	83.6 \pm 7.4*	87.9 \pm 8.6**

Cultured mouse hippocampal cells were treated with *CYT*. Cultures were preincubated with 15, 25, 50 and 100 μ g/ml *CYT* for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 40mU/ml XO for 5 hours. Amount of total protein was measured at wavelength of 540nm. The

results indicate the mean \pm SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences from the control group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

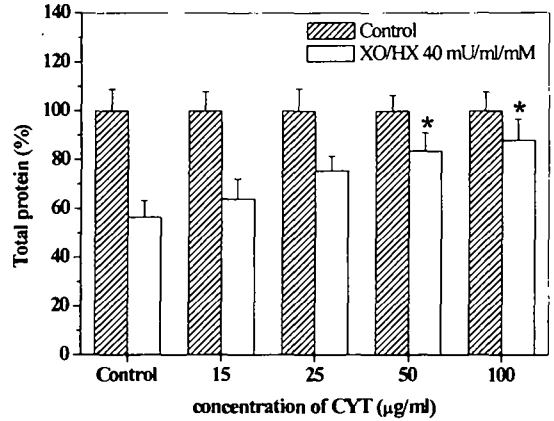


Fig. 6. Dose-dependency of *CYT* for its neuroprotective effect on XO in total protein synthesis. Other legends are the same as the Table 6 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

2) Neurofilament 含量

(1) XO/HX의 영향

XO/HX가 培養 海馬神經細胞에 미치는 影響을 神經細絲量을 이용하여 조사하기 위하여 XO/HX가 5mU/ml~50mU/ml의 농도까지 5시간 동안 처리한 후 神經細絲量을 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 세포의 神經細絲量이 감소하였으며 특히 25mU/ml, 50mU/ml의 농도에서는 대조군에 비하여 각각 47.3%($p < 0.05$)와 22.6%($p < 0.01$)로 유의하게 감소하였다(Table 7, Fig. 7).

Table 7. Dose-response relationships of XO/HX on neurofilament in the cultured hippocampal cells

XO/HX (mU/ml/mlM)	EI absorbance (490 nm)	Decrease of neurofilament(%)
0	1.86±0.17	-
5	1.59±0.15	14.5
15	1.29±0.12	30.6
25	0.88±0.07*	52.7
50	0.42±0.05**	77.4

The cultured hippocampal cells were treated with various concentrations of XO in 0.1mM HX for 5 hours. Neurofilament were measured as "material method". The values are the mean±SE for 6 experiments. The significant differences from the control are marked with the asterisks *p<0.05; **p<0.01

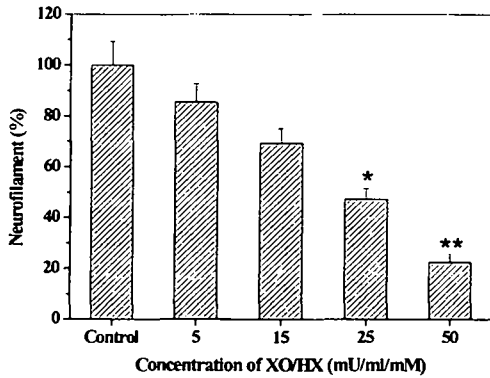


Fig. 7. Dose-response relationships of XO/HX on neurofilament in the cultured hippocampal cells. Other legends are the same as Table 7. *p<0.05; **p<0.01

(2) 淸心蓮子湯의 효과

培養 海馬神經細胞에 대한 XO/HX의 산화

적 손상에 있어서 淸心蓮子湯의 효과를 神經細絲量의 변화 측면에서 조사하기 위하여 0.1mM HX안에 XO의 MCV값(midcyto-toxicity value)인 25mU/ml XO농도가 포함된 배양액에서 5시간 동안 노출시키기 3시간 전에 60µg/ml에서 150µg/ml 淸心蓮子湯이 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 25mU/ml XO만을 처리한 경우 神經細絲量의 양적변화는 대조군(100%)에 비하여 51.3%로 나타났으며, 또한 60µg/ml, 90µg/ml 淸心蓮子湯의 처리에서는 대조군에 비하여 각각 63.7%, 72.5%로 나타났다. 그리고 120µg/ml, 150µg/ml 처리에서는 각각 83.6%(p<0.05), 91.9%(p<0.01)로 XO만의 처리에 비하여 높게 나타났다(Table 8, Fig.8).

Table 8. Dose-response relationships of CYT for its neuroprotective effects on neurofilament in hippocampal cells

concentration of CYT (µg/ml)	EI absorbance (490 nm)	
	XO/HX 0 mU/ml/mlM	XO/HX 25 mU/ml/mlM
0	1.58±0.16	0.81±0.06
60	1.56±0.14	0.99±0.08
90	1.53±0.15	1.11±0.10
120	1.50±0.13	1.25±0.13*
150	1.48±0.12	1.36±0.15**

The cultured hippocampal cells were treated with 60, 90, 120 and 150 µg/ml concentration of CYT for 3 hours, after then the cultures were exposed to 25mU/ml XO in 0.1mM HX for 5 hours. Neurofilament were measured as "material method". The values are the mean±SE for 6 experiments. The significant differences from the control are marked with the asterisks. *p<0.05;

**p<0.01

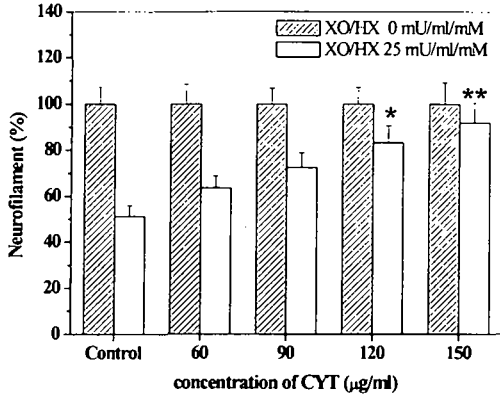


Fig 8. Dose-response relationships of *CYT* for their neuroprotective effects on neurofilament in the hippocampal cells. Other legends are the same as Table 8. The significant differences between groups are marked with the asterisks. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

IV. 考 察

清心蓮子湯은 太陰人의 腦卒中의 恢復期나 각종 腦神經 系統의 장애에 광범위하게 응용되는 처방으로 蓮子肉, 山藥, 天門冬, 麥門冬, 遠志, 石菖蒲, 酸棗仁, 龍眼肉, 柏子仁, 黃芩, 萊菔子, 甘菊으로 구성되어 있는데, 蓮肉은 胃氣를 열어 消食 進食하고, 山藥은 肺臟을 壯實케 하여 안으로 지키는 힘이 있고, 天門冬, 甘菊은 皮毛를 열고, 麥門冬은 肺臟을 보하고, 遠志는 肺臟의 眞氣를 醒起하며, 石菖蒲는 肺氣를 均調하고, 酸棗仁, 龍眼肉은 神과 意를 안정케 하고, 黃芩은 肺元을 收斂한다. 즉, 清心蓮子湯은 醒肺安神, 開肺消食, 補肺和肺, 開胃進食, 壯肺開皮毛, 收斂肺元의 효능이 있다.^{1,5,17-18)}

이에 근거하여 후세의가들은 虛勞, 夢泄無度, 腹痛, 泄瀉, 舌卷, 中風, 食滯, 胸腹痛, 心臟病, 神經性疾患, 怔忡, 健忘, 高血壓, 暑滯, 骨蒸, 倒胞, 不思飲食, 嘔吐, 滯泄, 氣鬱, 食鬱, 食脹, 臑脹, 夢精, 精漏, 怔忡, 不眠, 七氣, 九氣, 氣鬱, 吐血, 尿血, 便血등에 清心蓮子湯을 응용하였다.^{1,18-21)}

이상의 문헌을 볼 때 清心蓮子湯은 遠志, 石菖蒲, 酸棗仁, 龍眼肉 등 구성 약물의 藥性이나 開竅醒腦, 安神情志, 補肺調氣, 安神安意 등의 효과로 보아 痴呆와 같은 精神疾患, 中風과 같은 腦血管 疾患이나 각종 神經症과 心身症의 증상, 心血管系의 질환, 消化器系의 일부 질환에 이용될 수 있음을 알 수 있으며, 이들 疾患은 모두 頭腦 및 腦神經 系統과 밀접한 관련을 가지고 있다.

산소자유기는 생체내의 여러가지 병태생리 학적인 반응에 관여하고 있으며 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시킨다.⁶⁻⁷⁾ 또한, 세포막의 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐 만 아니라 질소자유기의 하나인 Nitric Oxide(NO)와 상호 작용함으로써 독성이 강한 Peroxynitrite를 생성하여 병변을 더욱 가속화 시킨다고 한다. 그리고, 培養 海馬神經細胞에서 흥분성 아미노산(EAAs)을 분비케 유도한다는 것이 밝혀졌으며 분비된 흥분성 아미노산(EAAs)은 N-methyl-D aspartate(NMDA) 수용체를 과활성화시킴으로써 세포내 Ca^{2+} 의 항상성을 깨뜨리며 그 결과 신경세포를 손상시킬 뿐만 아니라 나아가서는 세포의 사멸을 초래한다고 한다.^{12,22-24)} 그 밖에도 산소자유기는 protein kinase C(PKC)나 cyclic AMP 와 같은 이차전달자에 영향을 미침으로서 세포독성을 초래한다고 한다.

산소자유기가 중추나 말초신경계를 구성하고 있는 신경세포에 산화적 손상을 유발함으

로써 노인성 치매나 파킨슨씨병을 비롯하여⁸⁻¹¹⁾ 뇌허혈이나 다발성경화증의 병인으로 밝혀지면서 산소자유기의 신경독성에 대한 병리적 기전규명^{12,30,32)}과 산화적 손상에 대한 신경병변의 치료적 방법³³⁻³⁶⁾에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있고, 최근에는 한방의 각종 처방들이 가지는 생화학적, 약리학적 작용을 구명하기 위한 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 아울러 산소자유기의 산화적 손상에 대하여 한약제의 추출물이나 동식물에서 정제한 천연 추출물들이 강력한 항산화작용을 나타낸다는 실험결과들이 보고되고 있으나, 淸心蓮子湯과 산소자유기에 대한 연구는 아직 부족하다.

淸心蓮子湯에 관한 각종 실험적 연구를 살펴보면 金³⁷⁾은 淸心蓮子湯이 心筋虛血에 미치는 영향에 대해 연구한 결과 淸心蓮子湯은 혈소판 증가, fibrinogen 양 증가, prothrombin time 감소 등의 작용이 있어 허혈성 심질환에 적용될 수 있음을 보고하였고, 金³⁸⁾은 免役反應과 抗알레르기 효과에 관한 실험적인 연구를 통하여 淸心蓮子湯이 면역반응을 증강시킨다고 보고한 바 있으며, 洪³⁹⁾은 淸心蓮子湯의 抗스트레스 효과에 대한 논문에서 스트레스에 따른 심신질환에 대해 淸心蓮子湯의 임상적 가치를 제시하였다. 이러한 실험들을 통해 淸心蓮子湯의 心血管系 疾患 및 心身症, 神經症 등에 대한 임상적 효과가 뒷받침되고 있으나 각종 뇌 병변에 대한 淸心蓮子湯의 약리적 작용 연구는 미진하다. 따라서 뇌 병변에 대한 淸心蓮子湯의 적용 가능성을 실험적으로 검증할 필요성이 제기되고 있으며, 이는 뇌혈관 질환이나 치매, 파킨슨병, 건망증 등과 같이 뇌 신경의 기능적 또는 기질적 손상이나 퇴행을 초래하는 질환에 대한 새로운 가능성을 탐색해 본다는 측면에서 관심을 끈다.

이에 저자는 培養 海馬神經細胞에 태음인

淸心蓮子湯이 어떠한 영향을 미치는 지 알아보기 위하여 산소자유기에 의해 손상된 培養 海馬神經細胞에 淸心蓮子湯을 투여하여 그 효과를 알아보았다.

XO의 산화적 손상에 대한 海馬神經細胞 독성을 조사하기 위하여 5-60mU/ml의 XO가 각각 여러 농도로 포함된 배양액에서 海馬神經細胞를 시간별로 배양한후 MTT assay에 의한 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 XO의 처리농도에 비례하여 유의하게 세포의 생존율이 감소하였다.(Table 1, Fig. 1). 또한 XO의 처리 시간에 의한 영향을 조사하기 위하여 XO 30mU/ml에서 1-7시간 동안 각각 培養 海馬神經細胞를 배양한 결과 XO의 처리 시간에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 감소시켰다.(Table 2, Fig. 2).

XO의 독성에 대한 영향을 NR assay에 의하여 조사하기 위하여 10-70mU/ml의 XO가 각각 여러 농도로 포함된 배양액에서 海馬神經細胞를 시간별로 배양한 후 NR assay에 의한 세포생존율을 측정하였다. 그결과 XO의 처리농도에 비례하여 유의하게 세포의 생존율이 감소하였다.(Table 3, Fig. 3). 또한 XO의 처리 시간에 의한 영향을 조사하기 위하여 XO의 MCV인 50mU/ml에서 1-7시간 동안 각각 培養 海馬神經細胞를 배양한 결과 XO의 처리 시간에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 감소시켰다.(Table 4, Fig. 4).

총단백질량의 조사를 위한 SRB 분석에 있어서 XO가 10-80mU/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 培養 海馬神經細胞를 5시간 동안 배양한 다음 총단백질량은 처리 농도에 비례하여 감소하였으며 MCV는 40mU/ml XO처리에서 나타났다.(Table 5, Fig. 5). 그러나 40mU/ml XO를 5시간 동안 신경세포에 처리하기 전 15-100µg/ml의 淸心蓮子湯을 각각

포함된 배양액에서 3시간 동안 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 단백질량의 증가를 보였으며, 특히 50, 100µg/ml의 淸心蓮子湯 처리에서는 대조군에 비하여 매우 유의한 증가를 나타냈다.(Table 6, Fig. 6).

또한 XO가 神經細絲量에 미치는 영향을 조사하기 위하여 5-50mU/ml의 여러 농도가 각각 포함된 배양액에서 海馬神經細胞를 5시간 동안 배양 후 神經細絲量을 조사를 하였다. 淸心蓮子湯에 대한 神經細絲量의 변화에 있어서 XO는 培養 海馬神經細胞에 처리한 농도에 비례하여 神經細絲量을 감소시켰으며 25mU/ml XO처리에서 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다. (Table7, Fig. 7). 그러나 25mU/ml XO를 5시간 동안 신경세포에 처리하기 전 60-150µg/ml의 淸心蓮子湯이 각각 포함된 배양액에서 3시간동안 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 神經細絲量의 감소를 보였다.(Table 8, Fig. 8).

이상의 실험을 고찰한 결과 산소자유기인 XO/HX는 MTT·NR assay에 의해 세포생존율의 유의한 감소를 보였고, 淸心蓮子湯의 투여로 XO/HX의 산화적 손상에 의한 신경독성에 유의한 총단백질량과 神經細絲量의 증가를 나타냈으므로 淸心蓮子湯은 培養 海馬神經細胞의 산화적 손상에 대해 유의성 있는 방어효과가 있는 것으로 사료된다.

V. 結 論

Xanthine Oxidase/Hypoxanthine(XO/HX)의 산화적 손상에 의한 독성효과를 究明하기 위하여 신생 생쥐에서 분리 배양한 海馬神經細胞에 여러 농도의 XO가 포함된 배양액에서

1-7시간 동안 처리한 다음 XO가 培養 海馬神經細胞에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 XO/HX의 독성효과에 대한 한약추출물인 淸心蓮子湯의 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 산소자유기인 XO/HX는 MTT assay에 의한 세포생존율의 유의한 감소를 보였다.
2. 산소자유기인 XO/HX는 NR assay에 의한 세포생존율의 유의한 감소를 보였다.
3. XO/HX의 산화적 손상에 의한 신경독성에 대하여 淸心蓮子湯의 투여로 총단백질량의 유의한 증가를 보였다.
4. XO/HX의 산화적 손상에 의한 신경독성에 대하여 淸心蓮子湯의 투여로 神經細絲量의 유의한 증가를 보였다.

이상의 실험결과는 淸心蓮子湯이 海馬神經細胞의 산화적 손상에 대하여 유의한 방어적 작용을 나타낸 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 전국 한의과대학 사상의학교실 : 四象醫學, 서울, 집문당, pp.102, 100-105, 107-108, 157-158, 159-160, 342-353, 538, 552-553, 1997.
2. 옥윤영 : 太陰人 淸心蓮子湯이 Hydrogen peroxide에 손상된 白鼠의 海馬神經細胞에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1998.
3. 김경요 : 太陰人의 혈액 변화에 대한 연구, 원광대학교 대학원, 1991.
4. 송일병 : 四象醫學的 中풍관리의 임상적 연구, 四象醫學會誌, 8(2) ; pp.117-130, 1996.
5. 이제마 : 동의수세보원(초판본), 서울, 대성문화사, 卷之一 pp.5, 15, 卷之四 pp.15, 29, 33, 1997
6. 姜益鉉 : 天麻鉤藤飲이 뇌조직의 생화학적 변화에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1996.

7. Pellegrini-Giampietro D E, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J. Neurochem.* 1988;51:1960-1963
8. Bracco F, Scarpa M, Rio A, Battistin L : Determination of superoxide dismutase activity by the polarographic method of catalytic currents on the cerebrospinal fluid of aging brain neurologic degenerative disease. *Proc. So. Exp. Biol. Med.*, 196:36-41, 1991.
9. Difazio M C, Hollingsworth Z, Young A B, Penny J B : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brain. *Neurology*, 42:402-412, 1992.
10. Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J : NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature(London)*, 336:68-70, 1988.
11. Mattson M P, Cheng B, Smith-Swintosky V L : Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium and free radical mediated excitotoxic injury : Implications for treating neurodegenerative disorders. *J. Exp. Neurol.*, 124 : 89-95, 1993
12. Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T : A possible role of lipid peroxidation in cellular damage caused by cerebral ischemia and protective effect of alpatocopherol administration. *Stroke*, 14:977-982, 1983.
13. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.*, 59:1609-1623, 1992.
14. Vannucci R C, Vasta F, Vanucci S J : Cerebral metabolic response of hyperglycemic immature rats to hypoxia-ischemia. *Pediatr. Res.* 21:524-529, 1987.
15. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol Methods.* 65:55-63, 1983.
16. Borenfreund, E., Puermer, J. A.: A Simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J. Tiss. Cult. Meth.* 9:7-9, 1984.
17. 노현수: 청심연자탕이 태음인 뇌경색증 환자의 세포활성물질 생성조절에 미치는 영향. *사상의학회지* 12(2): pp.162-170. 2000.
18. 이도경: 사상요람, 원불교출판사, pp.100, 139, 203~204, 1995.
19. 원지상: 동의사상신편. 서울, 문우사 pp.2, 64, 1926.
20. 한동석: 동의수세보원주석. 서울, 성리회출판사, pp.300-302, 1967.
21. 홍순용 · 이을호: 사상의학원론, 서울, 행림출판사, pp.79-82, 305, 344-345, 349-350, 1973.
22. Hall, E. and Braugher. J. M. : Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. *CNS Trauma* 3:281-294, 1986.
23. Pellegrini-Giampietro D E, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis

- of ischemia-induced neuronal damage. *J. Neurochem.* 10:1035-1041, 1990.
24. Zhang, Y., Tatsuno, T., Carney, J. M. Mattson, M. P. : Basic FGF, NGF, and IGF's protect hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. *J. Cereb. Blood Flow, Metab.* 13:378-388, 1993.
25. Jesberger JA, Richardson JS. Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int. J. Neurosci* 57:1-17, 1991.
26. Johnson D, Toms R, Weiner H : Studies of myelin breakdown on vitro. In Kim SU(ed): "Myelination and Demyelination". New York, Plenum Press, 219, 1989.
27. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alcuacil N: Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red(NR) and Terazolium MTT tests. *Toxic in vitro*, 2:1-6, 1988.
28. Kontos H, Wei E, Ellis E, Jenkins L, Povlishock J, Rowe G, Hess M : Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cat. *Circ. Res.*, 57:142-151, 1985.
29. Li W, Zhao Y, Chou I N : Alterations in cytoskeletal protein sulfhydryls and cellular glutathione in cultured cells exposed to cadmium and nickel ions. *Toxicology*, 77: 65-79, 1993.
30. Park S T, Lim K T, Chung Y T, Kim S U: Methylmercury-Induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology*, 17:37-46, 1996.
31. 김남선 : 淸心蓮子湯이 심근허혈에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1987.
32. 김달래 : 태음인 淸心蓮子湯과 청폐사간탕의 면역반응과 항알러지 효과에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원, 1991.
33. 홍철희, 고병희, 송일병 : 태음인 淸心蓮子湯의 항스트레스 효과에 관한 실험적 연구, *사상의학회지* 7(2): pp.227-240, 1995.