

# 七福飲이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響

## Effects of Chilbokyum on the Cerebral Cortex Neuron injured by Glucose Oxidase

최공한\* · 박승택\*\* · 류도곤\*\*\* · 최민호\*\*\* · 임상섭\*\*\* · 허진영\*\*\* · 강성도\*\*\* · 고정수\*\*\* · 서의  
석\*\*\* · 성은경\*\*\* · 조남수\*\*\* · 이준우\*\*\* · 황일택\*\*\* · 선성규\*\*\* · 류영수\*

### 1. 緒論

韓醫學에서 腦는 《靈樞·海論篇》<sup>1)</sup>에 “腦爲髓之海”라 하여 단순한 腎의 生理作用의 發現 場所로 認識되어 왔다. 以後 後世에 이르러 “腦爲元神之府”<sup>2)</sup>, “人之記性 皆屬腦中”<sup>3)</sup> 이라 하여 腦의 精神 및 記憶作用을 말하였으며, 張<sup>4)</sup>은 腦와 心에 대한 進一步된 見解로 “腦爲元神, 心爲識神, 腦中之神, 體也; 心中之神, 用也”라 하여 心腦共主神明說을 주창하여 臨床에서도 이를 적극적으로 活用하여 왔다<sup>5)</sup>.

腦의 病理變化로, 代謝過程中 生成되는 毒性物質의 一種인 酸素自由基(oxygen radical)는 中樞神經系를 비롯하여 末梢神經系에 影響을 미침으로써 파킨슨씨병, 알츠하이머병 등과 같은 神經疾患을 誘發하는 病因으로 밝혀지면서 酸素自由基의 神經毒性에 대한 病理的 機轉糾明과 關聯疾患에 대한 治療的 接近이 활발하게 研究되어지고 있다<sup>6-8)</sup>.

七福飲은 明代 張景岳의 著書인 《景岳全書》<sup>9)</sup>에 최초로 收載되었으며, 그 後 歷代醫書 및 臨床에서 五臟氣血虛損으로 인한 不眠, 癲狂 등의 精神活動障得의 症狀이 나타나는 疾患에 活用하며<sup>10-12)</sup>, 또한 心脾陽虛, 稟受不足으로 인한 痴呆에 포괄적으로 應用되어 왔다<sup>13-14)</sup>. 七福飲에 관한 研究로는 孫<sup>15)</sup>이 七福飲投與가 老化白鼠 腦組織에서 noradrenalin 增加로 인해 腦組織을 개선시켰다는 보고는 있으나, 酸素自由基에 의해 손상된 大腦의 變化에 관한 研究는 아직 보고된 바 없었다.

따라서 酸素自由基의 神經毒性에 대한 七福飲의 影響을 究明하기 위하여 新生 생쥐에서 순수 분리한 大腦神經細胞를 培養하여 glucose oxidase(GO)에 노출시킨 후 이의 毒性效果를 測定하였으며, 또한 七福飲 煎湯液을 投與한 後 GO에 의하여 誘發된 毒性에 대한 防禦 效果를 比較 調査하여 유의성 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

### II. 實驗材料 및 方法

#### 1. 材料

\* : 원광대학교 한의과대학 정신과교실

\*\* : 원광대학교 의과대학 해부학교실

\*\*\* : 원광대학교 한의과대학 생리학교실

1) 動物

本 實驗에 使用한 동물은 ICR 계통의 생후 3 일된 건강상태가 양호한 생쥐를 使用하였다.

2) 藥 材

本 實驗에 使用한 七福飲의 處方內容은 《景岳 全書》<sup>9)</sup>에 依據하였으며, 藥材는 圓光大學校 附屬 益山韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였고, 七福飲의 內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription of Chibokyeum(CBY)

韓 藥 名	生 藥 名	重 量 (g) (한침량×4.5침)
人 參	<i>Radix Ginseng</i>	8×4.5=36
熟 地 黃	<i>Rhizoma Rehmanniae</i>	8×4.5=36
當 歸	<i>Radix Angelicae Gigantis</i>	8×4.5=36
白 朮	<i>Rhizoma Atractylodis Macrocephalae</i>	6×4.5=27
炙 甘 草	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	4×4.5=18
遠 志	<i>Radix Polygalae</i>	8×4.5=36
酸 棗 仁	<i>Semen Ziziphi Spinosae</i>	2×4.5=9
總 計		198

2. 實驗方法

1) 檢液의 調劑

七福飲 4貼半 分量인 198g을 각각 환저플라스 크에 넣고 冷却器를 附着하여 2시간동안 電熱器로 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 凍結乾燥器에서 24시간 凍結乾燥하여 각각 60.23g의 분말 시료를 얻었다.

2) 藥劑 製造

本 實驗에 使用한 약제로는 glucose oxidase (GO, Sigma)로서 각각 100mU/ml, 10mU/ml, 1mU/ml의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 實驗 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 培養液에 첨가하여 使用하였다.

3) 細胞培養

大腦神經細胞의 분리는 Michikawa 등<sup>16)</sup>의 方法에 따라 施行하였다. 즉 생후 1-3일된 생쥐에서 적출한 뇌조직은 0.25% trypsin이 포함된

phosphate buffered saline(PBS)으로 處理한 후 36℃, 5% CO<sub>2</sub>/95%air로 조절된 항온기 내에서 培養하였다. 培養完了後 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)으로 3회 세척 후 Pasteur 피펫으로 세포를 분리시켰다. 분리된 세포들은 Poly-L-lysine (Sigma)으로 전처리된 96-multiwell에 3×10<sup>6</sup>cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 培養液으로 교환하여 주었으며 7일동안 培養後 本 實驗에 使用하였다.

4) 酸素自由基 處理

酸素自由基가 생쥐의 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 일정시간 培養한 神經細胞를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 1-30mU/ml glucose oxidase(GO)가 포함된 培養液에서 2-12시간 동안 處理後 分析하였다.

5) 細胞毒性 및 防禦效果 檢定

(1) 細胞生存率 分析

① NR定量

Neutral red(NR, Sigma)의 定量은 Borenfreund와 Puerner(1984)<sup>17)</sup>의 方法에 따랐다. 즉 여러 濃度의 GO를 處理한 培養 神經細胞를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5mg/ml의 NR을 well당 최종濃度로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료후 PBS로 3회 세척후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 處理한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다.

② MTT定量

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphe

nyltetrazolium bromide(Sigma) 定量은 Mosmann<sup>18)</sup>의 方法에 의하였다. 酸素自由基나 항산화제를 處理한 培養 神經細胞를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50mg/ml의 MTT를 well당 最終濃度로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 로 조절된 證온기에서 培養하였다. 培養 完了後 dimethylsulfoxide(DMSO, Merk)를 處理한 다음 spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 測定後 對照群과 比較 調査하였다.

### ③ LDH 定量

LDH활성의 測定은 변형된 Takahashi 등 (1987)<sup>19)</sup>의 方法에 의하여 행하였다. 즉, LDH kit(Atron lab, Japan)의 효소기질액 1.0ml를 직경 10cm인 튜브에 넣은후 여기에 검체인 培養液를 넣어 잘 혼합한 다음 37도에서 10분간 반응시켰다. 10분후 희석반응 정지액 3.0ml를 넣어 혼합한 후 570nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다.

### ④ Lipid peroxidation 定量

Lipid peroxidation은 GO나 七福飲抽出物을 일정시간 동안 處理한 大腦神經細胞의 상층액과 세포용해액내의 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)를 測定한 것으로, 위액에 12N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0ml와 0.3ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응 완료후 TBA 를 1.0ml를 가한 후 90도에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각후 n-butanol로 處理하였다. n-butanol 處理완료 후 원침하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 測定하였다.

### 6) 統計 處理

實驗 結果에 대한 유의성의 검정은 ANOVA 후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

## III. 實驗成績

### 1. 酸素自由基의 毒性效果

#### 1) 細胞 生存率 分析

##### (1) MTT 定量

酸素自由基가 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 glucose oxidase(GO)가 1mU/ml에서 30mU/ml 까지의 各各의 濃度로 포함된 培養液에서 6시간 동안 培養한 후 GO의 毒性效果를 MTT assay법에 의하여 調査한 結果 1mU/ml GO 處理에서는 세포의 생존율이 對照群(100%)에 비하여 86.3%로 나타났다. 그러나 10mU/ml의 處理에서는 74.4%로 이보다 다소 낮게 나타났다. 또한 25mU/ml와 30mU/ml GO를 處理한 경우 이의 생존율은 각각 52.9%(p<0.05)와 36.9%(p<0.01)%로 對照群에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났다(Table I). GO가 시간에 따라 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 25mU/ml GO가 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 각각 2~12시간 동안 培養한 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 對照群과 比較 調査한 結果 2시간 培養에서는 對照群(100%)에 비하여 76.8%의 細胞生存率을 보였다. 또한 4시간 培養에 있어서는 59.5%로 對照群에 비하여 다소 낮은 생존율을 나타냈으며 6시간 培養에서는 對照群에 비하여 51.1%(p<0.05)의 생존율을, 12시간 培養에 있어서는 37.6%(p<0.01)의 생존율을 각각 나타냈다(Table II).

Table I. Absorbance (% of control) at 570nm wavelength for the MTT assay on glucose oxidase(GO) in cultured mouse cerebral neurons

GO(ml/ml)	MTT absorbance(570nm)	Decrease of cell viability(%)
0	1.68 ± 0.13	
1	1.45 ± 0.10	13.7
10	1.25 ± 0.15	25.6
25	0.89 ± 0.08*	47.1
30	0.62 ± 0.06**	63.1

Cultured mouse cerebral neurons were treated with various concentrations of glucose oxidase(GO) for 6 hours. The values are the mean ± SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*p<0.05; \*\*p<0.01

**Table II. Time-response relationship of glucose oxidase(GO) by MTT assay in cultured mouse cerebral neurons**

GO concentration (mU/ml)	MTT absorbance(570nm)			
	2hr	4hr	6hr	12hr
0	1.73±0.15	1.63±0.12	1.76±0.16	1.57±0.14
25	1.33±0.09	0.97±0.06	0.90±0.04*	0.59±0.05**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with 25mU/ml GO for various time intervals. The values are the mean ±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are made with asterisks. \*p<0.05; \*\*p<0.01

**(2) NR 定量**

培養中인 大腦神經細胞를  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 GO가 1mU/ml에서 20mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 6시간 培養한 다음 이의 影響을 調査한 結果 1mU/ml의 處理에서 細胞의 生存率은 對照群(100%)에 比하여 73.5%로 나타났으며 5mU/ml와 10mU/ml에서는 각각 64.0%와 47.1%(p<0.05)로 나타났다. 또한 20mU/ml GO에서는 21.3%(p<0.01)로 나타났다(Table III). GO가 培養時間에 따라 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 MCV(midpoint cytotoxicity value)값인 10mU/ml GO濃度에서 2~12시간 동안 培養한 후 각 시간 별로 세포의 생존율을 調査한 結果 2시간 培養에서는 對照群(100%)에 比하여 68.3%로 나타났으며 4시간과 6시간 및 12시간에서는 각각 56.3%(p<0.05), 50.0%(p<0.05), 및 25.9%(p<0.01)로 나타났다(Table IV).

**Table III. Absorbance (% of control) at 540nm wavelength for the NR assay on glucose oxidase(GO) in cultured mouse cerebral neurons**

GO(mU/ml)	NR absorbance(540nm)	Decrease of cell viability(%)
0	1.36±0.16	
1	1.00±0.12	26.5
5	0.87±0.11	36.0
10	0.64±0.09*	52.9
20	0.29±0.07**	78.7

Cultured mouse cerebral neurons were grown in media containing various concentrations of glucose oxidase(GO) for 6 hours. The values represent the mean ±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*p<0.05; \*\*p<0.01

**Table IV. Time-response relationship of glucose oxidase(GO) by NR assay in cultured mouse cerebral neurons**

GO concentration (mU/ml)	NR absorbance(570nm)			
	2hr	4hr	6hr	12hr
0	1.42±0.17	1.51±0.15	1.48±0.13	1.54±0.11
25	0.97±0.08	0.85±0.05*	0.74±0.05*	0.40±0.02**

Cultured mouse cerebral neurons were incubated with 10 mU/ml GO for various time intervals. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*p<0.05; \*\*p<0.01

**2. 韓藥抽出物の 效果**

**1) Lipid peroxidation 定量**

**(1) GO의 影響**

GO濃度에 따른 lipid peroxidation의 測定하기 위하여 GO가 15-120mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 6시간 동안 處理한 후 細胞의 生存率을 對照群과 比較 調査하였다. 그 結果 15mU/ml GO 處理에서는 TBARS가 25.7로 나타났다. 그러나 30mU/ml GO를 處理한 경우 TBARS가 28.9로 나타나 細胞 生存率 減少는 對照群에 比하여 12.5%로 나타났다. 또한 30mU/ml, 60mU/ml 및 120mU/ml GO 處理의 경우 TBARS가 각각 39.5(p<0.01), 50.2(p<0.01), 58.1(p<0.01)로 나타났다. 이에 대한 細胞 生存率 減少는 53.7%, 95.3%, 126.1%로 각각 나타났으며 細胞 生存率 減少의 MCV값은 30mU/ml GO處理에서 나타났다(Table V).

**Table V. Dose-response relationship of glucose oxidase(GO) on lipid peroxidation in cultured mouse cerebral neurons.**

GO(mU/ml)	TBARS(pmol/10 <sup>6</sup> cell)	Decrease rate of cell viability(%)
0	25.7±3.2	
15	28.9±3.7	12.5
30	39.5±4.6**	53.7
60	50.2±5.1**	95.3
120	58.1±5.8**	126.1

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to various concentrations of glucose oxidase(GO) for 6 hours. Thiobarbituric acid(TBA) fluorometric assay was adopted to analyse lipid peroxidation and TBA reactive substance(TBARS) were represent as pmol/10<sup>6</sup> cells. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*\*p<0.01

**(2) 七福飲(chilbokyeum, CBY)의 效果**

培養 大腦神經細胞에 대한 GO의 산화적 손상 에 있어서 七福飲(CBY)의 效果를 lipid

peroxidation측면에서 調査하기 위하여 GO의 MCV값(midcytotoxicity value)인 30mU/ml GO 濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 5-60 μg/ml CBY가 각각 포함된 培養液에서 전 처리한 후 이의 방어效果를 調査하였다. 그 結果 30mU/ml GO만을 處理한 경우 TBARS는 對照群 28.1에 비하여 86.1로 나타났다. 그러나 5 μg/ml CBY의 處理에서는 對照群 27.9에 비하여 59.4%로 나타났으며 15 μg/ml CBY處理에서는 對照群 26.3에 비하여 51.9로 나타났다. 또한 30mU/ml와 60mU/ml GO處理에 있어서는 각각 對照群 25.1에 비하여 42.9(p<0.01)와, 對照群 25.6에 비하여 38.4(p<0.01)로 나타나 이는 GO만의 處理에 비하여 매우 유의하게 減少하였다 (Table VI).

Table V. Dose-response relationship of *Chilbokyueum* for its neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in lipid peroxidation.

GO (mU/ml)	TBARS (pmol/10 <sup>6</sup> cell)				
	concentration of <i>chilbokyueum</i> (μg/ml)				
	0	5	15	30	60
0	28.1±4.6	27.9±4.7	26.3±4.5	25.1±4.2	25.6±4.3
30	86.1±5.8	59.4±5.1	51.9±4.4	42.9±3.6**	38.4±3.1**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with *Chilbokyueum*. Cultures were preincubated with 5, 15, 30 and 60 μg/ml *Chilbokyueum* for hours, respectively. After then, cultures were exposed to 30mU/ml GO for 6 hours. TBA reactive substance(TBARS) were represent as pmol/10<sup>6</sup> cells. The results represent the mean±SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. \*\*p<0.01

## 2) LDH 定量

### (1) GO의 影響

GO濃度에 따른 LDH 활성도를 測定하기 위하여 GO가 10-80mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 6시간 동안 處理한 후 세포培養液내로 유출된 LDH양을 對照群과 比較 調査하였다. 그 結果 10mU/ml GO 處理에서는 對照群100%(18.2±1.3)에 비하여 108.8%(19.8±1.8)로 나타났다. 또한 20mU/ml GO를 處理한 경우 127.0%(23.1±2.4)(p<0.05)로 나타났으며 40mU/ml와 80mU/ml GO 處理에서는 각각 對照群에 비하여 152.2%(27.7±2.6)(p<0.01)와 188.5%(34.3±3.8)(p<0.01)로 나타

났다. LDH활성도의 MCV값은 40mU/ml GO의 處理에서 나타났다(Table VII).

Table VII. Dose-response relationship of glucose oxidase(GO) on lipid peroxidation in cultured mouse cerebral neurons

GO mU/ml	0	10	20	40	80
LDH Release	18.2±1.3	19.8±1.8	23.1±2.4*	27.7±2.6**	34.3±3.8**

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to various concentrations of glucose oxidase(GO) for 6 hours. LDH activity was measured at wavelength of 570nm. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. \*p<0.05; \*\*p<0.01

### (2) 七福飲(*chilbokyueum*, CBY)의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 GO의 산화적 손상에 있어서 七福飲(CBY)의 效果를 LDH활성도측면에서 調査하기 위하여 GO의 MCV값 (midcytotoxicity value)인 40mU/ml GO濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 5-100 μg/ml CBY가 각각 포함된 培養液에서 전 처리한 후 이의 防禦效果를 調査하였다. 그 結果 5mU/ml GO만을 處理한 경우 對照群 15.6에 비하여 39.5로 나타났다. 그러나 5 μg/ml CBY의 處理에서는 對照群 15.8에 비하여 31.4로 나타났으며 25 μg/ml CBY處理에서는 對照群 14.7에 비하여 26.9로 나타났다. 또한 50 μg/ml CBY處理에 있어서는 對照群 14.3에 비하여 23.1로 나타났으며, 특히 100 μg/ml CBY의 處理에서는 對照群 13.9에 비하여 21.1(p<0.05)로 나타나 GO만의 處理에 비하여 유의하게 減少하였다(Table VIII).

Table VIII. Dose-response relationship of *Chilbokyueum* for its neuroprotective effect on glucose oxidase(GO) in LDH release

GO (mU/ml)	LDH Release				
	concentration of <i>chilbokyueum</i> (μg/ml)				
	0	5	25	50	100
0	15.6±1.7	15.8±1.5	14.7±1.9	14.3±1.8	13.9±1.5
40	39.5±3.8	31.4±3.1	26.9±2.9	23.1±3.2	21.1±2.6*

Cultured mouse cerebral neurons were treated with *Chilbokyueum*. Cultures were preincubated with 5, 25, 50 and 100 μg/ml *Chilbokyueum* for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 40mU/ml GO for 6 hours. LDH release was measured at wavelength of 570nm. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. \*p<0.05

#### IV. 考察

韓醫學에서 腦에 관한 記錄은 《素問·五臟別論篇》<sup>20)</sup>에 “或而腦髓爲臟 或而爲腑……故藏而不瀉, 名曰奇恒之府”라고 하여 奇恒之府 중의 하나로 보았으며, 또한 《素問·陰陽應象大論篇》<sup>20)</sup>에서는 “腎生骨髓”, 《靈樞·海論篇》<sup>1)</sup>에서는 “腦爲髓之海”라 하여 腦를 腎과 관련된 단순한 生理器管의 하나로 認識하였다<sup>21-22)</sup>. 以後 後世에 이르러 “腦爲元神之府”, “人之記性 皆屬腦中”이라 하여 腦의 精神 및 記憶作用을 언급하여 오늘날 西洋醫學의 인 腦와 類似한 概念으로 認識하였다<sup>23)</sup>.

특히, 張<sup>4)</sup>은 腦와 心에 대한 進一步된 見解로 “腦爲元神, 心爲識神, 腦中之神, 體也; 心中之神, 用也”라 하여 人間의 高位精神機能인 ‘神明’을 元神과 識神으로 區別하여 腦·心 모두가 精神機能을 主管한다는 心腦共主神明說을 주창하여 臨床에서도 이를 적극적으로 活用하여 왔다<sup>24)</sup>.

西洋醫學에서 人間의 高位精神機能은 大腦皮質의 神經細胞活動으로 나온다고 認識하는데, 즉 腦가 人間活動의 全領域을 統括하는 control center로서 認識, 思考, 判斷 등의 力動的인 意識活動과 다양한 感情, 行動 그리고 더 나아가 高次元의 精神世界까지도 담당하는 것으로 알려져 있다<sup>25-26)</sup>.

腦의 病理變化로는 甚한 彌滿性 腦萎縮과 腦神經細胞의 消失 등 器質的 變성과 腦의 各種 神經傳達物質의 減少 등 生化學的 變化를 招來함으로써 記憶力과 知能低下 등 高等精神活動에 障礙를 일으키는데 이는 人間의 老化로 인한 腦의 退行性 疾患과 不可分의 關係를 가지고 있다<sup>27-28)</sup>.

痴呆는 意識이 淸明한 狀態에서 全般的인 認知機能의 障礙를 나타내는 疾患으로 보통 慢性, 또는 進行性 腦疾患에 의해 發生되며 記憶, 思考, 指南力, 理解, 計算, 學習, 言語, 判斷 등 多數의 高位大腦機能에 障礙가 나타나는 症候群이다<sup>29)</sup>. 痴呆는 여러 原因에 의해 發病할 수 있는데 痴呆를 惹起하는 原因疾患으로는 腦의 萎縮性 變化, 腦血管障礙, 梅毒이나 流行性 腦炎과 같은 腦의

炎症性障礙, korsakoff 症候群과 같은 代謝性 內分泌疾患, 腫瘍, 外傷, 中毒 등이며 이중 腦萎縮性變化에 의한 老年性 痴呆와 腦血管性 痴呆가 많은 比率을 차지하고 있다<sup>30)</sup>.

韓醫學에서 痴呆라는 病名은 張景岳의 《景岳全書·雜病謨》<sup>31)</sup>의 癡狂篇에서 痴獸라고 처음 言及된 이후, 呆病, 癡狂, 健忘, 虛勞 등의 범주에 속한다<sup>32-34)</sup>. 七福飲은 明代 張景岳의 著書인 《景岳全書》<sup>9)</sup>에 최초로 收載되었으며, 그 後 歷代醫書 및 臨床에서 五臟氣血虛損으로 인한 不眠, 癡狂 등의 精神活動障礙의 症狀이 나타나는 疾患에 活用되어온 處方이다<sup>10-12)</sup>.

本方은 五臟氣血虛損으로 인한 不眠, 癡狂 등의 精神活動障礙의 症狀이 나타나는 疾患에 活用될 뿐만 아니라, 近來에는 虛勞에 의한 諸般 疾患, 특히 心脾陽虛, 稟受不足으로 인한 痴呆에 대표적으로 應用되고 있다<sup>13)</sup>.

韓醫學에서 腦에 關한 研究로는, 우<sup>35)</sup>와 趙<sup>36)</sup>는 調胃升清湯 및 荊防地黃湯이 알츠하이머형 치매 모델백서에 投與하여 學習과 記憶을 增進시키는 效果가 있음을, 金<sup>37)</sup>과 鄭<sup>38)</sup>은 洗心湯 및 溫膽湯이 腦組織의 抗酸化作用이 있음을 報告하였다.

七福飲에 관한 研究로는 孫<sup>15)</sup>이 老化白鼠 腦組織에서 noradrenalin 增加 등의 生化學的인 變化를 관찰하여 腦組織을 改善시켰다는 報告는 있으나 酸素自由基를 통한 구체적인 大腦皮質의 變化에 관한 實驗은 아직 報告된 바가 없다.

自由基는 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않은 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것으로서 이러한 특수구조 때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러 가지 병태 생리적인 반응에 관여하고 있으며<sup>39)</sup>, 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시키는데<sup>40)</sup>, 특히 代謝過程中 生成되는 毒性物質의 일종인 酸素自由基는 흥분성아미노산 (excitatory amino acids, EAAs)의 分泌를 促進시키고, 세포내 Ca<sup>++</sup>의 濃度를 增加시켜 결국 세포의 死滅을 招來하며<sup>41)</sup>, 中樞나 末梢神經系를 구성하고 있는 神經細胞에 酸化의 損傷을 誘發함으

로써 老人性 痴呆나 파킨슨씨병을 비롯하여<sup>6-7)</sup>, 腦虛血이나 腦卒中 등과 같은 각종 神經疾患을 誘發하는 病因으로 밝혀지면서<sup>42-43)</sup> 酸素自由基의 神經毒性에 대한 病理的 機轉究明과 關聯 疾患에 대한 治療的 接近이 活潑하게 연구되어지고 있다<sup>8)</sup>.

本 實驗에서 GO를 생쥐의 培養 大腦神經細胞에 노출시킨 후 NR assay와 MTT assay법으로 分析한 結果, GO는 處理 濃도와 時間에 비례하여 細胞의 生存率을 현저하게 減少시켰다. 이같은 結果는 酸素自由基가 培養 생쥐의 척수신경절 세포에, 소의 배양 회소돌기아교세포에 각각 毒性을 나타냈다는 實驗 結果와 일치하였다<sup>16)</sup>. 이러한 현상은 酸素自由基가 中樞나 末梢神經細胞에 모두 細胞毒性을 가지고 있음을 證明해 주고 있다. 本 實驗에 있어서 酸素自由基가 생쥐의 培養 大腦神經細胞에 독성을 나타낸 것은 GO가 항산화계에 손상을 줌으로서 항산화효소의 活性減少를 초래했거나 또는 酸素自由基중 superoxide와 같은 환원제가 세포내  $Fe^{+++}$ 와 상호작용하여 毒性을 나타냈을 가능성도 배제할 수는 없지만<sup>44)</sup>, 本 實驗의 NR assay와 MTT assay를 비롯하여 lipid peroxidation 定量分析과 LDH활성도 分析의 結果를 볼 때 GO는 세포막의 지질과산화반응을 촉진을 비롯하여 세포막의 손상하는 것으로 생각된다<sup>42)</sup>.

GO의 酸化的 損傷에 대한 神經毒性을 調査하기 위하여 1-30mU/ml의 GO가 각각 여러 濃도로 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 시간별로 培養한 후 MTT assay에 의한 細胞生存率을 測定하였다. 그 結果 GO의 處理濃도에 비례하여 有意하게 細胞의 生存率이 減少하였으며 25mU/ml GO處理에서 MCV값(midcytotoxicity value)이 나왔다(Table I). 또한 GO의 處理 時間에 의한 影響을 調査하기 위하여 GO의 MCV인 25mU/ml에서 2-12시간 동안 각각 培養 大腦神經細胞를 培養한 結果 GO의 處理 時間에 비례하여 세포의 생존율을 有意하게 減少시켰으며 6시간 培養에서 MCV를 나타냈다(Table II). GO

의 毒性에 대한 影響을 調査하기 위하여 1-20mU/ml의 GO가 각각 여러 濃도로 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 시간별로 培養한 후 NR assay에 의한 細胞生存率을 測定하였다. 그 結果 GO의 處理濃도에 비례하여 有意하게 細胞의 生存率이 減少하였으며 10mU/ml GO處理에서 MCV값(midcytotoxicity value)이 나왔다(Table III). 또한 GO의 處理 時間에 의한 影響을 調査하기 위하여 GO의 MCV인 10mU/ml에서 2-12시간 동안 각각 培養 大腦神經細胞를 培養한 結果 GO의 處理 時間에 비례하여 細胞의 生存率을 有意하게 減少시켰으며 6시간 培養에서 MCV를 나타냈다(Table IV). 最近에는 韓藥抽出物을 비롯한 天然抽出物들이 항산화효과나 세포성장인자등의 藥리적 활성을 가지고 있어 뇌나 척수의 神經病變을 비롯하여 中風이나 암과 같은 각종 난치성 질환의 治療에 매우 效果가 뛰어나다는 研究들이 報告되고 있다. 本 實驗에서는 여러 腦病變의 原因이라고 밝혀진 酸素自由基에 대하여 이의 酸化的 損傷에 의한 韓藥抽出物의 效果를 調査하기 위하여 생쥐에서 순수분리하여 培養한 大腦神經細胞에 酸素自由基의 하나인 GO를 處理한 후 七福飲抽出物의 效果를 lipid peroxidation 測定, LDH 活性度 測定에 의하여 調査하였다.

GO가 지질과산화반응에 미치는 影響을 調査하기 위하여 15-120  $\mu$ g/ml의 여러 濃도가 각각 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 6시간 동안 培養후 lipid peroxidation의 調査를 하였다. 七福飲에 대한 lipid peroxidation에 있어서 GO는 培養 大腦神經細胞에 處理한 濃도에 비례하여 TBARS의 濃도를 增加시켰으며 30mU/ml GO處理에서 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다(Table V). 그러나 30mU/ml GO를 6시간 동안 神經細胞에 處理하기 전 5-60  $\mu$ g/ml의 七福飲이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리 한 경우 處理한 濃도에 비례하여 TBARS 濃도의 增加를 보였으며 특히 60  $\mu$ g/ml의 七福飲 處理에서는 對照群(25.6 $\pm$ 3.1)에 비하여 38.4 $\pm$ 3.1로 나타나 이는 30mU/ml GO만을 處理한 경우(86.1 $\pm$ 5.8)에

비하여 절반으로 增加하였다(Table VI).

GO가 大腦神經細胞에 미치는 影響에 대한 LDH활성調查를 위하여 10-80  $\mu$ g/ml의 七福飲이 각각 포함된 培養液에서 6시간 동안 培養한 다음 LDH활성도를 調查하였다. GO는 培養 大腦神經細胞에 處理한 濃도에 비례하여 LDH의 量的 增加를 보였으며 40mU/ml GO處理에서 對照群 100%(18.2 $\pm$ 1.3)에 비하여 152.2%(27.7 $\pm$ 2.6)로 나타나 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다(Table VII). 그러나 40mU/ml GO를 6시간 동안 神經細胞에 處理하기 전 5-100  $\mu$ g/ml의 七福飲이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 進처리한 경우 處理한 濃도에 비례하여 LDH의 유의한 量的 減少를 보였으며 특히 100  $\mu$ g/ml의 七福飲 處理에서는 對照群(13.9 $\pm$ 1.5)에 비하여 21.1 $\pm$ 2.6(p<0.05)으로 나타나 이는 40mU/ml GO만을 處理한 경우(39.5 $\pm$ 3.8)에 비하여 유의한 減少를 나타냈다(Table VIII).

이와같은 實驗 結果를 綜合해보면, GO와 같은 酸素自由基는 酸化的 損傷에 의해 細胞 生存率을 減少시키고 神經細胞에 대하여 毒性을 나타내며, 이에 대한 七福飲의 投與가 lipid peroxidation의 減少 및 LDH量的 減少를 보여 痴呆治療에 일정한 藥理的 效果가 있는 것으로 나타났다.

## V. 結論

本 研究에서는 glucose oxidase(GO)의 酸化的 損傷에 의한 毒性 效果를 糾明하고 이 毒性 效果에 대한 七福飲의 效果를 確認하기 위해 新生 생쥐에서 분리 培養한 大腦 神經細胞를 對象으로 實驗한 結果는 다음과 같다.

1. 酸素自由基인 GO는 NR assay와 MTT assay에서 細胞生存率을 減少시켰다.

2. 酸素自由基인 GO는 lipid peroxidation과 LDH량을 增加시켜 생쥐의 培養 大腦神經細胞에 毒性을 나타내었다.

3. 七福飲(CBY)은 lipid peroxidation을 유의하게 減少시켰다.

4. 七福飲(CBY)은 LDH량을 유의하게 減少시켰다.

이상의 實驗結果에 따르면 七福飲은 GO와 같은 酸素自由基의 酸化的 損傷에 대한 防禦作用이 있어 痴呆 治療에 대해 效果的으로 活用할 수 있으며, 尙後 이에 대한 臨床的인 研究가 보완되어 져야 할 것으로 思料된다.

## = Abstract =

### Effects of *Chilbokyeum* on the Cerebral Cortex Neuron injured by Glucose Oxidase

Choi, Kong-Han\* · Park, Seung-Taeck\*\* · Ryu, De-Gon\*\*\* · Choi, Min-ho\*\*\* · Um, Sang-sub\*\*\* · Hea, Jin-young\*\*\* · Kang, Sung-do\*\*\* · Go, Jeong-soo\*\*\* · Sou, Eui-uk\*\*\* · Sung, Yeun-Kyung\*\*\* · Cho, Nam-su\*\*\* · Lee, Chun-Woo\*\*\* · Whang, Il-Taeck\*\*\* · Sun, Sung-kyu\*\*\* · Ryu, Young-su\*

\*Dept. of Psychology, \*\*\*Dept. of Physiology, College of Oriental medicine, \*\*Dept. of Anatomy, College of medicine, Wonkwang Univ., Iksan, Korea

As the average life span have been lengthened and the rate of senile population have been raised, chronic degenerative diseases incident to aging has been increased rapidly and become a social problem.

With this social background, recently, the facts that oxygen radicals(OR) have toxic effects on Central Nervous System and Peripheral Nervous System and cause neuropathy such as Parkinson's Disease, Alzheimer Disease have been turned out, and accordingly lots of studies on the mechanism of the toxic effects of OR on nerves, the diseases caused by OR and the approaches to curing the diseases have been made.



The purpose of this study is to examine the toxic effects caused by Glucose Oxidase(GO) and the effects of herbal extracts such as *Chilbokyeum*(CBY) on the treatment of the toxic effects. For this purpose, experiments with the cultured cell from the cerebrums of new born mice were done.

The results of these experiments were as follows.

1. GO, a oxygen radical, decreased the survival rate of the cultured cells on NR assay and MTT assay
2. GO, a oxygen radical, increased lipid peroxidation and the amount of LDH.
3. CBY have efficacy of decreasing lipid peroxidation.
4. CBY have efficacy of decreasing the amount of LDH.

From the above results, It is concluded that *Chilbokyeum* has marked efficacy as a treatment for the damages caused in the GO-mediated oxidative process. And *Chilbokyeum* is thought to have certain pharmacological effects on controlling over aging and treating Dementia. Further clinical study of this pharmacological effects of *Chilbokyeum* should be complemented.

Key Word : glucose oxidase(GO), *Chilbokyeum* (CBY), oxygen radicals(OR).

### 參考文獻

1. 楊維傑編 : 黃帝內經譯解(靈樞), 서울, 成輔社, pp.84-89, 104-145, 280-283, 1980.
2. 李時珍 : 本草綱目, 서울, 高文社, pp.603-604, 1973.
3. 王清任 : 醫林改錯, 臺聯, 國風出版社, pp.22-25, 1975.
4. 程如海 : 略論張錫純心腦共主神明說, 北京, 北京中醫藥大學學報, 19(6): 12, 1996
5. 董蓮榮等編著 : 中醫形神病學, 北京, 光明日報出版社, pp.22-23, 1991.
6. 김승업 : 치매, 알츠하이머병, 서울, 삶과 꿈, pp.53-54, 57-62, 87-94, 1997.
7. Difazio MC. Hollingsworth Z. Young AB. Penny JB : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. Neurology., 42:402, 1992.
8. Floyd RA : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J., 4:2587-2597, 1990.
9. 張介賓 : 景岳全書, 上海, 上海科學技術出版社, p.576, 981, 1984.
10. 彭懷仁 主編 : 中華名醫方劑大全, 北京, 金盾出版社出版總發行, pp.56- 57, 1995.
11. 江克明·包明惠 編著 : 簡明方劑辭典, 上海, 上海科學技術出版社, p.29, 1989.
12. 楊思澍 外 : 中醫臨床大全(上卷), 北京, 北京科學技術出版社, 大成文化社影印, p.227, 1991.
13. 程紹思·夏洪生 : 中醫證候診斷治療學, 北京, 北京科學技術出版社, pp.395- 409, 1993.
14. 董黎明 : 實用中醫內科學, 서울, 一中社, pp.378-380, p.408, 1986.
15. 손정석外 : 七福飲이 老化 白鼠 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2): 25-38, 1997.
16. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU : Oxygen radical -induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J Neurosci Res., 37:62-70, 1994.
17. Borenfreund E, Puerner JA ; A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). J. Tiss cult Mett 9:1-9, 1984.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol Methods., 65:55-63, 1983.
19. Takahashi K, Fujita T, Mayum T, Kish T : Effect of Adramycin on cultured mouse embryo myocardial cells. Chem Pharm 35(1) : 326-334, 1987.

20. 楊維傑編 : 黃帝內經譯解(素問), 서울, 成輔社, pp.1-12, 42-61, 100- 103, 131-145, 206-211, 455-468, 701-704, 1980.
21. 金完熙外編著: 東醫生理學, 서울, 慶熙大學校 出版局, p.384, 1993.
22. 成彊慶 : 腦의 機能에 對한 臟象論的 考察, 서울, 大韓韓醫學會誌, 16 (1):468-474, 1995.
23. 張德祥 : 試論腦爲君主之官神明出焉, 甘肅中醫學院學報, 13(2):3-4, 1996.
24. 鄭彝倫 : 從腦神與五臟神相關學說探討郁症的治原則, 北경, 중의학연구, 14 (7):3-4, 1998.
25. 金基錫譯, Richard F. Thompson著 : 腦, 서울, 星苑社, p.28, 35, 1989.
26. 丁彰炫 : 神에 대한 研究-《黃帝內經》을 中心으로-, 慶熙大學校 大學院 博士論文, 1997.
27. 지제근 : 치매(Dementia)의 병리, 大韓神經科學會誌, 3(1):5-9, 1985.
28. 이근후 : 精神科 영역에서의 痴呆, 大韓神經科學會誌, 3(1):25-27, 1985.
29. 배영철外 : 老人醫學, 서울, 高麗醫學, pp.193-209, 1996.
30. 이근후 : 최심임상정신의학, 서울, 하나의학사, p.138, pp.216-228, 1988.
31. 張介賓 : 國譯 景岳全書 第三冊, 서울, pp.841-849, 1992.
32. 錢鏡湖 : 辨證奇門全書, 서울, 甘地出版社, pp.233-235, 1990.
33. 李梴 : 編註醫學入門(卷二), 서울, 大成文化社, pp.180-182, 1984.
34. 孫思邈 : 備急千急要方(卷四十), 서울, 杏林出版社, pp.12-13, 1976.
35. 우주영 : 調胃升清湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 影響, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 8(1):69-79, 1997.
36. 趙潤淑 : 荊防地黃湯이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 博士論文, 1997.
37. 金聖賢·李相龍 : 洗心湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2): 39-50, 1997.
38. 鄭仁哲·李相龍 : 溫膽湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(2): 51-62, 1997.
39. 대한병리학회 편저 : 병리학, 서울, 고문사, pp. 36-40, 1990.
40. 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., 51:1960- 1963, 1988.
41. Mayer M L, Westrook G L : Permeation and block of N-methyl -D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. J. Physiol., 394:501-527, 1987.
42. Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T : A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpatocopherol administrtion. Stroke., 14:977-982, 1983.
43. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. J. Neurochem., 59:1609-1623, 1992.
44. Halliwell B : Oxidants and human disease : Some new concepts. FASEB J., 1:358-364, 1987.