

洗心湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響

大田大學校 韓醫科大學 神經精神科教室

金聖賢 · 李相龍

I. 緒論

洗心湯은 陳의 《辨證奇門》¹⁾에 처음으로 收錄된 處方으로 終日悠悠 忽不言不語 不飲不食 忽笑忽歌 忽愁忽哭 등의 症狀를 治療하는 데 使用한 以來 《實用中醫內科學》²⁾과 《實用中醫腦病學》³⁾에서는 脾虛痰阻型의 呆病을 治療하는 處方으로 提示되고 있다.

痴呆는 韓醫學의 으로 《景岳全書·癡狂痴呆》⁴⁾에 “痴呆症, 凡平素無痰而或以鬱結..... 或以驚恐而漸致痴呆”라 記述 되었고 《辨證奇門》¹⁾과 《石室秘錄》⁵⁾에는 痴呆의 類似概念으로 神志淡漠, 寡言少語, 遲鈍, 健忘, 終日不語, 閉戶獨處, 口中喃喃自語, 言辭顛倒, 舉動不經, 忽笑忽哭^{2,3)} 등의 症狀를 나타내는 “呆病”을 言及 하였으며, 歷代醫書^{6~11)}에서 痴呆와 類似한 症狀이 記錄되고 있다.

西洋醫學의 으로 老年期에 자주 發生하는 痴呆는 原因不明의 腦變性疾患으로 知能의 喪失을 特徵으로 하는 臨床症候群으로^{12,13)}, 주로 腦質量의 減少, 腦神經細胞數의 減少, 血管의 老化, 神經細胞안에 沈着物이 生成 등의 形態學的 變化를 나타내며 이중 老年痴呆와 腦血管性 痴呆가 많은 比重을 차지하고 있다^{12,14)}. 一般的으로 老化란 成熟期 以後부터 생기는 生體變化로써¹⁵⁾ 發育, 成長, 成熟과 老化的 生物學的 過程에서 形態的·機能的 退縮, 豫備力과 適應力의 低下로 外部環境에 對해 反應이 떨어지는 普遍的인 生理的 現象을 말한다^{16,17)}.

老化的 原因은 遺傳學說, error破滅說, 體細胞突然變異說, 代謝産物蓄積說, 自由遊離基說, 生體防禦機構障得說, 스트레스說 등으로 多樣하지만¹⁷⁾, 최근에는 自由遊

離基說(Free Radical Theory)에 많은 關心이 集中되고 있다¹⁸⁾. 自由遊離基說은 細胞內的 酸化酵素에 의하여 觸媒가 되는 O₂가 不完全한 酸素의 還元 形態로 superoxide anion (O₂⁻) 및 hydroxyl radical(OH), hydrogen peroxide(H₂O₂) 등이 생기며 이것이 細胞成分과 任意로 反應하여 그 酸化體 혹은 過酸化體를 만들게 되어 蛋白質, 酵素, DNA 등 각 細胞成分 本來의 機能을 喪失하게 되는데, 年齡의 增加에 따라 이 遊離基의 作用이 增大하여 老化나 癌 各種 急慢性疾患의 原因이 된다는 學說^{17,18)}로써 現在 이를 基礎로 하여 實驗動物에 抗酸化劑를 投與함으로써 組織의 損傷을 막고 壽命을 年長시키는 多樣한 研究^{19~27)}가 修行되고 있다.

最近의 抗酸化作用에 대한 研究를 살펴보면, 安 등¹⁹⁾은 當歸藥針, 金²⁰⁾ 등은 榭桃藥針, 李²¹⁾는 白何首烏藥針, 成²²⁾은 杜冲葉藥針으로 抗酸化作用이 있음을 報告하였고, 蘇²³⁾는 鹿蔘地黃湯을, 禹²⁴⁾ 등은 Rat의 肝細胞를 利用한 血府逐瘀湯의 抗酸化 作用에 關한 報告를 하였으며, 左歸飲과 右歸飲을 利用하여 鄭²⁵⁾은 活性 酸素類의 消去作用과 抗酸化 酵素系의 活性增加 效果에 對하여, 尹 등²⁶⁾은 老化 Rat의 肝 過酸化脂質 生成 및 活性酸素 生成系 酵素活性에 미치는 影響을 報告하였고 徐²⁷⁾는 聰明湯이 老化白鼠 腦細胞의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 影響을 報告를 하였다.

이와 같이 現在까지 抗酸化 作用에 關한 研究는 老化的 原因이 腎虛라는 觀點에서 腎의 機能을 補完하는 藥物들을 爲主로 이루어 졌으나 脾虛痰阻 등의 다른 觀點에서의 報告는 尠하지 못하였다.

이에 著者는 洗心湯이 腦細胞에 對한 抗酸化作用에

미치는 影響을 糾明할 目的으로, 特別한 處置를 하지않은 10個月 정도의 老化된 正常 對照群(negative control)과, 1日 1回 15日間 Vitamin E를 投與한 陽性 對照群(positive control), 洗心湯을 投與한 實驗群(SST) 등 各 群에 흰쥐를 6마리씩 配定하여, 흰쥐의 腦組織에서 細胞質分劃(microsome)을 分離한 後, MDA (malonaldehyde) 生成抑制 活性, 過酸化水素(hydrogen peroxide) 形成, SOD(superoxide dismutase)의 活性度, catalase 活性度, NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性도를 測定하여 有意한 結果를 얻었기에 이에 報告 하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 動物

動物은 雌雄 區分 없이 體重 400±20g의 Sprague-Dawley系(韓國化學研究所) 雄性 흰쥐를 使用 하였고, 固型飼料(조단백질22.1%이상, 조지방8.0%이하, 조섬유5.0%이하, 조회분8.0%이하, 칼슘0.6%이상, 인 0.4%이상 삼양사 배합 사료 Co.)와 물을 充分히 供給 하고 4週日間 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用 하였다.

2) 藥物

實驗에 使用된 藥物은 《辨證奇門》¹⁾에 收載된 洗心湯으로 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入한 것을 精 選하여 使用하였는데 各各 1貼의 處方內容과 分量은 다음과 같다.

Priscription of Sesimtang(SST)

韓 藥	生 藥 名	重 量(g)
白茯苓	Poria(Hoelen)	37.5
酸棗仁	Zizyphi Semen	37.5
半 夏	Pinelliae Tuber	18.75
神 曲	Massa Medicata Fermentata	11.25
陳 皮	Aurantii Nobiliss Pericarpium	11.25
人 蔘	Ginseng Radix	3.75
附子炮	Aconiti Tuber	3.75
石菖蒲	Acori Rhizoma	3.75
甘 草	Glycyrrhiae Radix	3.75
Total amount		131.25

3) 一般 試藥 및 機器

Thiobarbituric acid(TBA), Malonaldehyde bis(diethyl acetatal), Ascorbic acid, Trichloroacetic acid(TCA), HEPES, Sodium tartrate, Folin reagent, Na₂S₂O₄(Sodium Hyrosulfite), Cytochrome C, NADPH, Chloroform, Magnesium chloride(MgCl₂), Hydrogen peroxide(H₂O₂), Catalase, Acetic acid, EDTA, Xanthine, Potassium cyanide, Sodium deoxycholate, Xanthine oxidase등은 Sigma社(USA) 製品을, Methanol, Ethanol, alc Acetic acid는 Merck社 (Germany) 製品을 使用하였고, 그의 試藥들은 特級 및 一級을 使用하였다.

본 實驗에 使用된 機器는 centrifuge (Beckman Co.(GS-6R)), rotary vaccum evaporator(Büchi 461), autoclave (Hirayama, Japan), Spectrophotometer (shimazue. japan), Ultracentrifuge (kontron, sweden), High centrifuge(kontron, sweden), Bio-freezer(sanyo, japan), Ice-maker(비전科學) 및 Homogenizer (OMNI,U.S.A)등을 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 檢液의 造劑

洗心湯 4貼分量 525g을 3,000ml round flask에 蒸溜水 1,500ml와 함께 넣은 다음 冷却器를 附着시키고 2時 間 동안 加熱하여 濾過한 濾液을 rotary vaccum evaporator(Buchi 461)에서 減壓 濃縮하고 이 round flask를 -84℃ deep freezer(Sanyo Co, Japan)에서 1시

간 동안 放置하고 freeze dryer(EYELA Co, Japan)로 凍結乾燥하여 乾燥엑기스를 88.0g을 얻어 實驗에 필요한 濃度 735mg/kg을 2ml의 生理食鹽水에 녹여 檢液으로 使用하였다.

2) 檢液投與

實驗動物 各 群에 6마리씩을 配定하여 아무런 處置를 하지 않은 正常 對照群(negative control ; NC)과 100unit/ml vitamin E를 投與한 陽性對照群(positive control ; PC) 및 735mg/kg 洗心湯을 投與한 實驗群(SST)등으로 구분하여 1日 1回 15日間 經口投與 하였다.

3) 腦組織 細胞質 分割의 分離

Bansal등²⁸⁾의 方法에 따라 摘出した 흰쥐의 腦을 잘게 썰고 4배의 150mM KCl을 함유한 30mM Hepes완충액(pH 7.4)으로 稀釋하여 均질화한 다음, 遠心分離關에 넣고 1차 원심 분리(700xg, 20분)하였다. 그 상등액을 원심분리관에 취하고 2차 고속원심분리(11,000xg, 30분)하여 2차 상등액을 얻었으며 그 11,000xg pellet은 제거하였다. 또 2차 상등액을 취하여 다시 3차 초고속원심분리(105,000xg, 60분)하고 그 3차 상등액으로 세포질 분획을 얻었다. 그리고 105,000xg pellet은 130mM KCl 함유 Hepes완충액으로 씻어낸 다음, 다시 초고속 원심분리(105,000xg, 60분)하고 얻은 pellet을 같은 완충액으로 재 均질화하여 마이크로솜 분획을 얻었다. 마이크로솜과 세포질 분획을 분리하는 전 과정은 0-4 °C 저온실에서 수행하였으며 -70°C에 보관하면서 각종 실험에 사용하였다.

4) 蛋白質 定量

Bovine serum albumin(BSA)을 標準 物質로 使用하여 Lowry등의 方法²⁷⁾에 따라 蛋白質 濃度を 결정하였다.

5) Malonaldehyde(MDA) 생성 억제 활성

MDA활성도 측정은 YU등²⁹⁾의 方法에 따라 시험관에 세포질분획(700ug/ml)을 넣고, 8.1% Sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225ul를 가하고 5sec.동

안 voltex mixer로 mixing한다. 20% acetic acid 1.5ml을 가하고 그리고 75ul 蒸溜水를 넣고 5sec.동안 vortex mixer로 mixing한다. 1.2% Thiobarbituric acid solu.을 각각의 1ml씩 tube에 더하고, clean dry marble(유리구슬)로 cover한 후, 30분간 water bath에서 끓인다. 그리고 室溫에서 30분간 cooling한 후에 3000rpm에서 20분간 원심 분리하여 上層液을 實驗에 使用한다. 532nm에서 흡광도를 測定한다.

6) 과산화 수소(hydrogen peroxide) 측정

Alfred등³⁰⁾의 方法에 따라 시험관에 100mM Tris완충액(pH 7.5) 500ul, 마이크로솜 단백질(2mg/ml) 100ul, 3 M KCl 50ul, 1 M methanol 50ul, catalase(3.2 mg/ml) 50ul, 0.2 M MgCl₂ 50ul 와 5mg/ml NADPH 25ul를 넣고 증류수를 넣어 총 1ml로 한 다음 반응을 시작하였다. 30°C에서 15분간 반응시킨 다음 15% TCA을 넣고 원심 분리(3,000rpm, 15분)하였다. 그리고 상등액 1.5ml을 취하여 1.5ml Nash시약을 첨가한 후 58°C에서 8분동안 보온하여 발색시켰다. 412 nm에서 흡광도를 측정하여 밀리몰흡광계수 17.8 cm⁻¹mM⁻¹로 계산하였다.

7) Superoxide dismutase의 活性度 측정

이 효소의 活性度 측정은 McCord등³¹⁾의 方法에 따라 xanthine과 xanthine oxidase의 존재 하에 생성되는 superoxide anion이 cytochrome c의 환원을 억제시키는 반응 원리를 이용하였다. 즉 3.0ml용량의 cuvette에 0.1 mM EDTA를 함유하는 50 mM 인산염 완충액(pH 7.8) 2.1ml와 0.5mM xanthine 0.3ml 및 0.1 mM cytochrome c 0.3ml을 가한 다음 cytochrome oxidase에 의한 환원형의 cytochrome C의 재산화를 막기 위해 반응액에 50ul potassium cyanide 0.1ml을 가하였다. 반응액의 미립자를 분해시키기 위해서 sodium deoxycholate(0.1 mg/ml)를 0.1ml 넣어 0.033% 되도록 하였다. 혼합액을 잘 섞는 다음 xanthine oxidase 0.1 ml 와 세포질 분획(3mg/ml) 0.1ml를 첨가 한 후 550nm에서 흡광도의 증가율을 결정하였다. 흡광도 증가에 대한 기준은 xanthine oxidase의 농도를 조절하여 흡광도 증가를 분당 0.021이 되도록 하였다.

8) Catalase 活性度 측정

Aebi³²⁾의 방법에 따라 3.0ml cuvette에 30% H₂O₂가 함유된 50mM 인산염 완충액(pH 7.0) 2.9ml을 넣고, catalase(50units/ml) 0.1ml를 첨가한 후 240nm에서 흡광도 감소율을 결정하였다. 실험군 측정에서 세포질 분획(700 μg/ml) 0.1ml를 첨가하여 흡광도 감소율을 측정하였고, 효소의 活性度는 흡광도가 0.40~0.45까지 감소되는 시간을 3.45 μmoles/H₂O₂/min으로 표시하였다.

9) NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性度 측정

William 와 Kamin의 방법³³⁾에 따라 분광광도계의 기준 및 시료 cuvette에 200nM cytochrome C 0.3ml와 간 마이크로솜의 단백질이 0.25mg/ml의 농도가 되게 만든 희석액을 0.3ml 넣고 0.5M 인산염 완충액(pH 7.7)으로 총 용량을 1.5ml로 한 다음 37℃에서 분광광도계의 흡광도를 0으로 맞추었다. 그리고 시료 cuvette에 0.1 μmole의 NADPH 0.1ml를 첨가하고 550nm에서 3-4분간 흡광도 變化를 測定하였다. 흡광도의 차이로부터 밀리몰흡광계수 21 cm⁻¹mM⁻¹를 이용하여 cytochrome C의 還元 速度를 계산하였다.

10) 統計處理

實驗結果는 mean과 standard error로 나타내고 student's t-test로 검정하였다.

III. 實驗成績

1. 세포질 분획에서 Malonaldehyde 生成에 미치는 影響

뇌세포질 분획에서 Malonaldehyde 生成에 미치는 影響을 살펴본 結果 正常 對照群의 Malondialdehyde 흡광도値는 0.029±0.005 이고 vitamin E 陽性對照群은 0.017±0.008로 減少한 반면 洗心湯 實驗群은 0.045±0.006로 增加하여 有意性이 없었다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effect of SST on the Thiobarbituric Acid(TBA) Reactive Substances in Brain Microsome in Rats

Group	No. of Animals	Malondialdehyde (O.D at 532nm)	P-value
NC	6	0.029±0.005 ^{a)}	-
PC	6	0.017±0.008	-
SST	6	0.045±0.006	-

a) : Mean ± Standard Error

NC : None treated group

PC : 100unit/ml vitamin E treated group

SST : 735mg/kg of solid extract of SST treated group

* : Statistically significant value compared with NC data by test

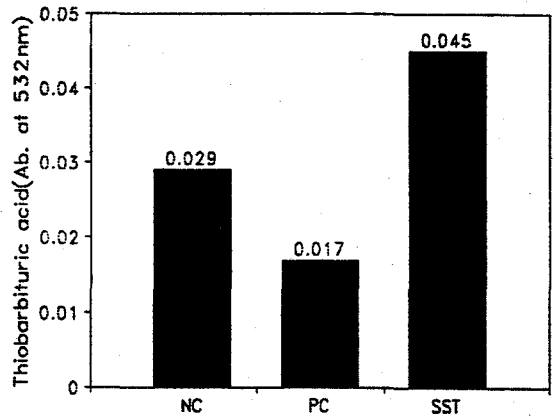


Fig. 1. Effect of SST on the thiobarbituric acid(TBA) reactive substances in brain microsome in Rats

NC : None treated group

PC : 100unit/ml vitamin E treated group

SST : 735mg/kg of solid extract of SST treated group

2. 세포질 분획에서 Hydrogen peroxide生成에 미치는 影響

腦細胞에서 hydrogen peroxide生成에 미치는 影響을 살펴본 結果 正常 對照群의 hydrogen peroxide生成은 0.98 ± 0.027 nmol/mg protein/min이고 vitamin E 陽性 對照群은 1.20 ± 0.032 nmol/mg protein/min으로 增加하였으며, 洗心湯 實驗群은 1.11 ± 0.024 nmol/mg protein/min로 增加하였다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Hydrogen Peroxide Formation in Brain Microsoms in Rats.

Group	No. of Animals	Hydrogen peroxide (nmol/mg protein/min)	P-value ^{a)}
NC	6	$0.98 \pm 0.027^{a)}$	
PC	6	1.20 ± 0.032	<0.001
SST	6	1.11 ± 0.024	<0.01

a) : Mean \pm Standard Error

NC : None treated group

PC : 100unit/ml vitamin E treated group

SST : 735mg/kg of solid extract of SST treated group

* : Statistically significant value compared with control data by T test

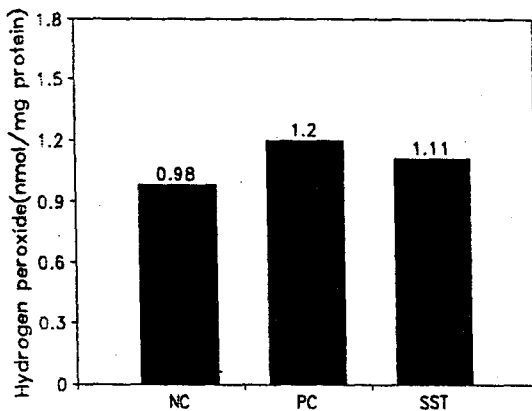


Fig. 2. Hydrogen peroxide formation in brain microsoms in rats.

NC : None treated group

PC : 100unit/ml vitamin E treated group

SST : 735mg/kg of solid extract of SST treated group

3. 세포질 분획에서 Superoxide dismutase 活性度에 미치는 影響

腦細胞의 superoxide dismutase의 活性度에 미치는 影響을 살펴본 結果 正常 對照群의 superoxide dismutase의 活性度는 0.69 ± 0.09 units/mg protein이고 vitamin E 陽性 對照群은 1.75 ± 0.40 units/mg protein로 有意性 있는 增加를 보였으며 洗心湯 實驗群은 1.25 ± 0.11 units/mg protein로 약간 增加하여 有意性이 있었다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Effect of SST on the Changes of Superoxide Dismutase Activities in Brain Microsomes in Rats

Group	No. of Animals	Superoxide dismutase activity (units/mg protein)	P-value
NC	6	$0.69 \pm 0.09^{a)}$	-
PC	6	1.75 ± 0.40	<0.05
SST	6	1.25 ± 0.11	<0.01

a) : Mean \pm Standard Error

NC : None treated group

PC : 100unit/ml vitamin E treated group

SST : 735mg/kg of solid extract of SST treated group

* : Statistically significant value compared with control data by T test

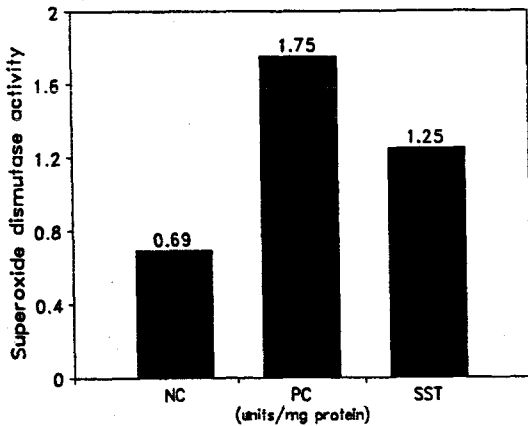


Fig 3. Effect of SST on the changes of superoxide dismutase activities in brain microsomes in Rats

NC : None treated group

PC : 100unit/ml vitamin E treated group

SST : 735mg/kg of solid extract of SST treated group

4. 세포질 분획에서 Catalase 活性度에 미치는 影響

腦細胞에서 catalase 活性度에 미치는 影響을 살펴본 結果 正常 對照群의 catalase의 活性度은 $0.22 \pm 0.01 \mu \text{ moles}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ 이고 vitamin E 陽性對照群은 $0.62 \pm 0.04 \mu \text{ moles}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ 로 有意性 있는 增加를 보였고 洗心湯 實驗群 역시 $0.56 \pm 0.09 \mu \text{ moles}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ 로 增加여 有意性이 있었다(Table 4, Fig. 4).

Table 4. Effect of SST on the Changes of Catalase Activities in Brain Microsomes in Rats

Group	No. of Animals	Catalase activity ($\mu \text{ moles}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$)	P-value
NC	6	0.22 ± 0.01^a	
PC	6	0.62 ± 0.04	<0.001
SST	6	0.56 ± 0.09	<0.01

a) : Mean \pm Standard Error

NC : None treated group

PC : 100unit/ml vitamin E treated group

SST : 735mg/kg of solid extract of SST treated group

* : Statistically significant value compared with control data by T test

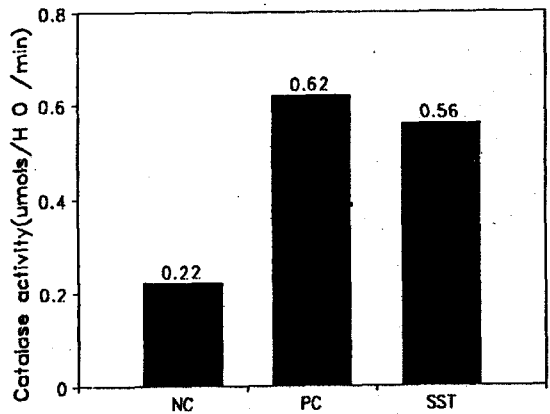


Fig 4. Effect of SST on the changes of catalase activities in brain microsomes in Rats

NC : None treated group

PC : 100unit/ml vitamin E treated group

SST : 735mg/kg of solid extract of SST treated group

5. 세포질 분획에서 NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性度에 미치는 影響

腦細胞에서 NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性度에 미치는 影響을 살펴본 結果 正常 對照群의 NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性는 $67.2 \pm$

2.11 nmole/mg protein이고 vitamin E 陽性對照群은 78.9±2.23 nmole/mg protein로 有意性 있는 增加를 보였으며 洗心湯 實驗群은 77.1±4.31 nmole/mg protein로 增加하여 有意性이 있었다(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Cytochrome P-450 Reductase Activities in Brain Microsomes in Rats.

Group	No. of Animals	Cytochrome P-450 reductase(nmole/mg protein)	P-value ^{a)}
NC	6	67.2±2.11 ^{ab}	
PC	6	78.9±2.23	<0.01
SST	6	77.1±4.31	<0.01

a) : Mean ± Standard Error

NC : None treated group

PC : 100unit/ml vitamin E treated group

SST : 735mg/kg of solid extract of SST treated group

* : Statistically significant value compared with control data by T test

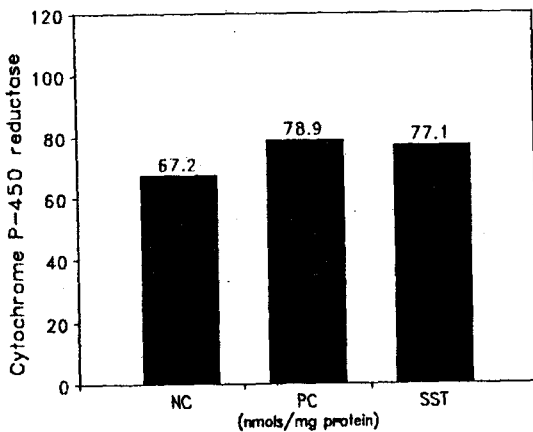


Fig. 5. Cytochrome P-450 reductase activities in brain microsomes in rats.

NC : None treated group

PC : 100unit/ml vitamin E treated group

SST : 735mg/kg of solid extract of SST treated group

IV. 總括 및 考察

老化란 生命體의 成長과 同時에 進行되는 一連의 反應¹⁸⁾으로서, 한 個體에서 時間의 進行에 比例하여 일어나는 漸進的이고 內的인 退行性 變化로, 構造的, 機能的 變化가 招來되어 外部環境에 對해 反應하는 能力이 低下되는 現象이다^{17,34)}.

老化的 現狀으로써 解剖學的으로 核의 크기 變化, 골지체(Golgi's body)의 區劃과 같은 細胞 微細構造의 變化 등을, 生化學的으로는 酵素의 活性과 機能的 減少, 老化色素(lipofuscin)와 같은 物質의 蓄積 등을, 生理學的으로 머리카락의 損失 血管壁의 硬化 등을, 行動的으로는 記憶力の 減退 및 精神 機能的 低下, 感覺 運動 機能的 低下 등을 例로 들 수 있다^{18,35)}.

西洋醫學에서 老化的 發生原因은 아직 充分히 糾明되지는 못하고 있으나 細胞·細胞下單位 老化說인 遺傳學說, error破滅說, 體細胞突然變異說, 代謝產物蓄積說, 磨耗說, 自由遊離基說과, 生體의 防禦, 調節機構에 대한 個體單位에서의 老化說인 生體防禦機構 혹은 調節機構의 障礙說, 스트레스說로 크게 나누어 볼 수 있으며^{36,37)} 이런 여러 가지 假說들 중에서 近來 自由遊離基說이 많이 研究되고 있다^{38,39)}.

自由遊離基說은 生體에 吸入되어진 酸素가 脂質이나 蛋白質같은 生體高分子등과 反應하여 酸化를 誘發시키며 이들의 反應生成物들이 細胞나 組織을 破壞하거나 그곳에 蓄積되어 老化나 痴呆, 急慢性 疾患의 病因으로 作用하는 學說으로써 1956년 Harman에 의해 提唱되었다^{18,38)}.

生體內 正常代謝 過程에서 생긴 free radical은 物質과 細胞를 酸化시켜 破壞하기도 하고 遺傳을 擔當하기 위해 保存되어 온 染色體(DNA)를 酸化하여 變化시키며, DNA合成중에 생기는 酵素作用을 妨害하여 DNA過酸化물을 만들어 生體에 障礙를 주며, 血管內的 不飽和 脂肪酸과 結合하여 細胞脈과 毛細血管의 纖維化를 일으키게 된다^{18,36)}.

酸素遊離基들 (oxygen free radicals)은 分子狀態의 酸素가 生體內 酸化還元 反應의 電子受容體로 利用되므로서 持續的으로 還元되어 가는 중에 生成되는 不完全한 酸素의 還元 形態로 superoxide anion (O₂⁻) 및

hydroxyl radical(OH), hydrogen peroxide(H₂O₂) 등이 있으며 이중 hydroxyl radical이 가장 強力한 活性을 지니는 것으로 알려져 있다⁴⁰⁾.

生體膜들에 損傷을 입히고 細胞機能을 低下시키며 壞死에 關係하는 過酸化脂質(Lipid Peroxides)은 自動酸化反應에 依한 다가불포화 脂肪酸에 O₂가 附加된 生成物의 總稱¹⁸⁾으로써 過酸化脂質의 代謝産物인 Malondialdehyde(MDA)를 TBA와 反應시키는 TBA-螢光法 등으로 測定할 수 있으며 肝疾患에서 高濃度를 보이고 動脈硬化症, 老化와의 關聯面에서도 檢討되어지고 있다¹⁶⁾.

正常細胞속에는 酸素遊離基들을 分解하는 酵素들을 가지고 있는데 이들 酵素에는 superoxide를 分解하는 超過酸化 불균등화 酵素(SOD), H₂O₂을 分解하는 catalase와 glutathione peroxidase⁴¹⁾ 등이 있으며 이 외에도 體内に 存在하는 抗酸化劑 役割을 하는 物質로는 體細胞의 老廢物이 酸素와 結合하여 過酸化水素와 같은 有毒物質을 만들지 못하도록 作用하는 維生素 E(tocopherol)과, ascorbic acid 및 glutathione 등이 있어 O₂⁻, OH⁻를 除去하게 된다^{40,42)}.

이러한 自由遊離基들은 나이를 먹어감에 따라서 여러 가지 身體的인 變化를 나타나게 하는데 腦神經系統에는 腦室의 擴大, 腦회전의 萎縮과 神經細胞數의 減少, 腦質量的 減少, 內彈力膜의 纖維化와 退行性變成 등의 腦血管의 老化, Lipofuscin含量的 增加, Alzheimer型 原纖維變化, 老人斑, 神經축삭의 萎縮, 沈着物의 形成 등이 그 예이다¹⁴⁾. 이 중 腦의 重量은 점차 減少하여 60歲以上에서는 平均 100g이 減少하며 腦의 病理的 老化現象이라 할 수 있는 老年痴呆의 경우는 다시 100g以上の 減少를 招來한다^{12,14)}.

痴呆는 보통 慢性, 또는 進行性 腦疾患에 의해 發生되어 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으로써^{12,43)} 腦의 萎縮性 變化로 起因하여 病理解剖의 肉眼的 所見으로 腦의 全般的인 萎縮과 腦室의 擴大가 나타나며, 組織學的 所見으로는 老人斑, Alzheimer의 原纖維變化 및 神經細胞의 顆粒空胞變性を 나타내는⁴⁴⁾ 老年痴呆와 腦梗塞 등의 腦血管障礙에 의한 腦血管性痴呆로 나눌 수 있다^{12,45)}.

呆病은 神志淡漠, 寡言少語, 遲鈍, 健忘, 終日不語, 閉戶獨處, 口中喃喃自語, 言辭顛倒, 舉動不經, 忽笑忽哭^{2,3)} 등의 症狀을 나타내는 것으로 《辨證奇門》⁶⁾, 《石室秘錄》⁶⁾, 《實用中醫內科學》²⁾, 《實用中醫腦病學》³⁾에서는 痴呆와 類似한 概念으로 記述하고 있다.

痴呆에 대한 最初의 韓醫學的 記載은 明代 張⁵⁾의 《景岳全書·癡狂痴呆》중에 “痴呆症, 其症則千奇萬怪,, 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常.....”이며 그 主要症狀은 神志淡漠, 寡言少語, 遲鈍, 健忘, 終日不語, 舉動不經, 忽笑忽哭 등이다^{2,3,5)}. 陳¹⁾은 《辨證奇門·呆病門》에서는 “大約其始也 起於肝氣之鬱 其終也由於胃氣之衰 使神明不清 而成其呆病矣”라 하여 肝氣의 鬱滯와 胃氣의 衰退가 原因이 되어 胸中에 痰이 積滯되므로써 呆病이 생기게 되는 病理를 言及하였고 “呆病成於鬱 鬱病必傷肝木 肝木火焚以傷心 則木爲心火所剋 肝中之血盡燥 而木爲枯焦之木矣”라 하여 鬱症에서 呆病이 形成될 수 있음을 言及하였으며 “一時而成呆病者 痰成而復傷其胃土 則火且迷心 輕則成呆 而重則發厥矣”라 하여 環境의 惡影響으로 胃氣가 傷하고 痰이 생겨 呆病에 이르는 病理를 說明하였다.

《實用中醫內科學》²⁾에서는 “痴呆于稱呆病 數日不之飢餓等 此類患者多不能獨自處理日常生活 甚至不能抵禦危險傷害”이라 定義 하였고, 原因으로는 稟賦不足과 脾虛痰阻, 脾腎虧損, 血瘀氣滯로 나누었으며 脾虛痰阻型의 경우 益氣健脾 化痰宣竅하는 處方으로 洗心湯을 使用하였다^{2,3)}.

洗心湯은 《辨證奇門·呆病門》¹⁾에 처음으로 收錄된 處方으로 終日悠悠 忽不言不語 不飲不食 忽笑忽歌 忽愁忽哭 등의 症狀을 治療하는데 使用하였고, 《實用中醫內科學》²⁾에서는 “本方補正與攻痰并重, 補正是益脾胃之氣以生心氣, 攻痰是滌湯干憂心宮之濁邪, 再加養心之品, 以治痴呆.”라 하였다.

洗心湯을 構成하는 藥物의 效能을 살펴보면, 白茯神⁴⁶⁻⁴⁹⁾은 寧神定志, 開心益智, 安魂養神하고, 酸棗仁⁴⁶⁻⁴⁹⁾은 補肝膽, 斂汗寧神, 助陰氣하며, 半夏⁴⁶⁻⁴⁹⁾는 除濕化痰, 開鬱發表, 和胃健脾하고, 神曲⁴⁶⁻⁴⁹⁾은 健脾暖胃, 養胃氣하며, 陳皮⁴⁶⁻⁴⁹⁾는 燥濕利氣, 和中消痰하고, 人蔘⁴⁶⁻⁴⁹⁾은 大補肺中元氣, 安精神, 安魂魄하며, 附子⁴⁶⁻⁴⁹⁾는 回陽退陰, 補命門相火하고, 石菖蒲⁴⁶⁻⁴⁹⁾는 豁痰開竅, 開心

竅하며 甘草⁴⁶⁻⁴⁹)는 和中解毒, 補脾胃하는 效能이 있다.

老化和 關聯하여, 安 등¹⁹)은 當歸藥針, 金²⁰) 등은 胡桃藥針, 李²¹)는 白何首烏藥針, 成²²)은 杜冲葉藥針으로, 蘇²³)는 鹿蔘地黃湯, 鄭²⁵)은 左歸飲과 右歸飲²⁵)으로 抗酸化作用에 대하여 報告하였으며, 이와 같은 數篇의 論文들이 대부분 老化的 原因이 腎虛라는 觀點에서 腎의 機能을 補完하는 藥物들을 爲主로 이루어졌으나, 脾虛痰阻型的 呆病, 痴呆 등 老化和 關聯된 疾患에 治療效果가 있는 洗心湯에 대한 報告는 접하지 못하였다.

이에 著者는 洗心湯이 自由遊離基 理論에 根據한 腦細胞에 對한 抗酸化作用에 미치는 影響을 糾明할 目的으로, 特別한 處置를 하지않은 正常 對照群과, 1日 1회 15日間 Vitamin E를 投與한 陽性對照群, 洗心湯을 投與한 實驗群등 各 群에 흰쥐를 6마리씩 配定하여, 흰쥐의 腦조직에서 microsome을 分離한 후 MDA 生成억제 활동, hydrogen peroxide 形成, SOD의 活性度, catalase 活性度, NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性도를 測定하였다.

正常 對照群과 vitamin E 陽性對照群 및 洗心湯 實驗群 등의 MDA흡광도치를 測定한 結果 正常 對照群의 MDA値는 0.029 ± 0.005 이고 陽性對照群은 0.017 ± 0.008 로 약간 減少한 반면 洗心湯 實驗群은 0.045 ± 0.006 으로 增加하여 有意성이 없었다(Table 1, Fig. 1).

NC, PC, SST의 hydrogen peroxide生成을 測定한 結果 NC의 hydrogen peroxide生成度은 0.98 ± 0.027 nmol/mg protein/min이고 PC는 1.20 ± 0.032 nmol/mg protein/min으로 增加하였으며, SST 實驗群은 1.11 ± 0.024 nmol/mg protein/min로 약간 增加하였으나 有意성은 없었다(Table 2, Fig. 2).

NC, PC, SST의 SOD 活性도의 變化를 測定한 結果, NC의 SOD 活性도는 0.69 ± 0.09 units/mg protein이고, PC는 1.75 ± 0.40 units/mg protein으로 增加를 보였으며, SST 實驗群은 1.25 ± 0.11 units/mg protein로 增加하여 鄭²⁵)의 實驗에서 左歸飲 64%增加, 右歸飲 52%의 增加에 比하여 有意성이 있었다(Table 3, Fig. 3).

NC, PC, SST의 catalase의 活性도의 變化를 測定한 結果, NC는 0.22 ± 0.01 μ moles/H₂O₂/min이고 PC는 0.62 ± 0.04 μ moles/H₂O₂/min으로 有意性 있는 增加를 보였고 SST 實驗群, 역시 0.56 ± 0.09 μ moles/H₂O₂/

min로 增加하여 鄭²⁵)의 實驗에서 左歸飲 53%增加, 右歸飲 45%의 增加에 比하여 有意성이 있었다(Table 4, Fig. 4).

NC, PC, SST의 NADPH-cytochrome P-450 reductase의 活性도의 變化를 測定한 結果 NC는 67.2 ± 2.11 nmole/mg protein이고 PC는 78.9 ± 2.23 nmole/mg protein로 有意性 있는 增加를 보였으며 735mg/kg SST洗心湯 實驗群은 77.1 ± 4.31 nmole/mg protein로 增加하여 有意성이 있었다(Table 5, Fig. 5).

本 實驗에서 洗心湯이 活性酸素類를 分解시켜 O₂를 H₂O₂로 轉換시키고 H₂O₂를 分解하여 無毒化함으로써 抗酸化 作用을 나타내는 SOD, catalase, NADPH-cytochrome P-450 reductase의 活性를 增加시켰는데 이러한 增加 現狀이 어떤 機轉으로 나타났는지 對해서는 알 수 없었다. 그러나 洗心湯의 藥物들이 어떤 機轉으로 酵素의 活性를 增加 시켰던지 간에 이러한 效果는 活性酸素類에 依해 誘發될수 있는 여러 가지 病的 狀態를 豫防할 수 있는 可能性을 提示하고 있었다.

以上的 結果를 綜合하여 보면 洗心湯은 oxygen free radical의 分解系酵素인 SOD, catalase, NADPH-cytochrome P-450 reductase의 活性를 增加 시켜 抗酸化作用을 하며, 正常 對照群에 比하여 有意性 있는 增加를 하였던 것으로 나타나 向後 臨床을 통한 研究가 必要할 것으로 思慮된다.

IV. 結論

洗心湯이 腦細胞의 抗酸化 作用에 미치는 影響에 대하여 觀察하고자 特別한 處置를 하지않은 正常 對照群과, 1日 1회 15日間 Vitamin E를 投與한 陽性對照群 및, 洗心湯을 投與한 實驗群으로 區分하여, 흰쥐의 腦組織에서 microsome을 分離한 後, MDA 生成抑制 測定, hydrogen peroxide 形成度, SOD의 活性度, catalase 活性度, NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性도를 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. MDA 生成抑制 測定은 正常 對照群에 比하여 實驗群에서 有意성이 없었다.

2. Hydrogen peroxide形成은 正常 對照群에 比하여 實驗群에서 有意性이 없었다.
3. O₂⁻에 대한 抗酸化酵素Superoxide dismutase의 活性도는 正常 對照群에 比하여 實驗群에서 有意性 있는 增加를 보였다.
4. 過酸化水素에 대한 抗酸化酵素Catalase 活性도는 正常 對照群에 比해 實驗群에서 有意性 있는 增加를 보였다.
5. NADPH-cytochrome P-450 reductase는 正常 對照群에 比하여 實驗群에서 有意性 있는 增加를 보였다.

以上的 結果에서 洗心湯은 抗酸化劑인 Catalase, Superoxide dismutase와 NADPH-cytochrome P-450 reductase의 活性에 有效한 效果를 나타내어 老化에 抗酸化作用을 통한 治療效果가 있는 것으로 나타났다.

參考文獻

1. 陳士澤 : 國譯辨證奇門, 서울, 大原出版社, pp.136~138, 1989.
2. 黃大東 外 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.378~381, 1989.
3. 陳輝 外 : 實用中醫腦病學, 北京, 學苑出版社, pp.242~251, 1993.
4. 李東垣 外 : 痴呆에 關한 東西醫學의 比較 考察, 서울, 大韓韓方內科學會誌 第16卷 1號, pp.2~5, p.11, 14, 1995.
5. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 大星文化社, pp.688~693, 1978.
6. 陳士澤 : 新編石室秘錄, 서울, 大星文化社, pp.35~37, 1993.
7. 龔廷賢 : 壽世保元, 江蘇城, 江蘇科學技術出版社, p.43, 1980.
8. 孫思邈 : 備急千金要方, 서울, 杏林出版社, pp.129~

- 135, p.534, 545, 550, 1982.
9. 趙佶 : 聖濟總錄 43卷, 北京, 人民衛生出版社, pp.822~825, 1987.
10. 朱震亨 : 金匱鉤玄, 서울, 鼎談出版社, p.727, 1992.
11. 王肯堂 : 證治準繩, 서울, 鼎談出版社, pp.306~307, 1992.
12. 黃義完 外 : 東醫精神醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp.256~271, 327~330, 1992.
13. 李定均 : 精神醫學, 서울, 一潮閣, pp.87~88, 465~467, 514~518, 597, 600, 1995.
14. 郭隆燦 : 圖解腦神經外科學, 서울, 第一醫學社, pp.27~29, 1992.
15. 崔鎮浩 : 老化의 메카니즘과 研究方向, 生化學뉴스, 韓國生化學會, 5(3):39~53, 1985.
16. 大韓皮膚科學會刊行委員會 : 皮膚科學, 서울, 麗文閣, p.23, 1994
17. 徐舜圭 : 成人病·老人醫學, 서울, 高麗醫學, pp.10~14, 1992.
18. 김숙희 外 : 老化, 서울, 大宇學術叢書, pp.88~91, 1995.
19. 安竣撤 外 : 當歸藥針液의 抗酸化 效能에 關한 研究, 大韓鍼灸學會誌, 13(2):254~262, 1996.
20. 金永海 外 : 胡桃藥針液의 抗酸化 效果에 對한 研究, 大韓韓醫學會誌, 17(1):9~20, 1996.
21. 李鍾賢 : 白何首烏 藥針의 抗酸化作用에 關한 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 1997.
22. 成日煥 : 抗酸化作用에 對한 杜沖葉藥針의 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 1997.
23. 蘇敬順 外 : 蔘龍地黃湯이 抗老化에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 18(2):127~148, 1995.
24. 禹大潤 外 : 人工膜과 Rat의 肝細胞를 利用한 血府逐瘀湯의 抗酸化 作用에 關한 研究, 大韓韓醫學會誌, 17(1), pp.465~477, 1996.
25. 鄭智天 : 左歸飲, 右歸飲에 의한 活性 酸素類의 消去作用과 抗酸化 酸素系의 活性增加 效果에 對한 研究. 大韓韓醫學會誌, 17(1), pp.21~36, 1996.
26. 尹哲浩 外 : 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 肝 過酸化 脂質生成 및 活性酸素 生成系 酵素 活性에 미치는 影響, 大韓韓方內科學會誌, 16(1):62~67, 1995.

27. 徐敏華 : 聰明湯이 老化白鼠 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 影響, 圓光大大學院, 1996.
28. Bansal, S.K., Love, J. and Gurtoo, H.L. High pressure liquid chromatographic separation of multiple form of cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*(117), pp.268~274, 1983.
29. Yu, B.P., LEE, D.W., Marler, C.G. and Choi, J. H. Mechanism of feed restriction ; protection of cellular homeostasis. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, pp 13~15, 1990.
30. Alfred, G., Hildebrandt, Ivar. *Roots. Mei Tjoe and Gerhard heinemeyer.* p.158, 1962.
31. McCord, J.R., Colby, M.D. and Fridovich, I. Superoxide dismutase, Enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* (231), pp. 6049~6055, 1972.
32. Aebi, H. Catalase erythrocytaire in ; *Exposes Annuels de Biochimie Medicale*, 29ieme serie. Masson & Cie(eds), Paris, pp.139~164, 1969.
33. Williams, C.H., Jr. and Kamin, M. Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J. Biol. Chem.*(237) 587~595, 1962.
34. 杜胡京 : 腎系內科學, 서울, 高文社, pp.1327~1334, 1985.
35. 리정복 : 長壽學, 서울, 醫聖堂, pp.11~99, 492~576, 1987.
36. 高仁錫 譯 : 老化는 왜 일어나는가, 서울, 電波科學社, pp.143~144, 1991.
37. Alexander Leaf : 世界 長壽寸 探訪, 서울, 大光文化社, pp.221~235, 1978.
38. Harman, d. : Free radical theory of aging : Role of radicals in the organization and evolution of life, aging and disease process. *Free radicals, Aging and Degenerative degenerative Disease*(ed. Johnson, J.E. et al), Alan R.Liss. inc. New York, pp.3~49, 1986.
39. Milan L., Jozef R., Villiaan K., Peter P. and Ladslav V. : *Free Radicals in Chemistry and Biology*, CRC Press, pp.29~31, 283~284, 1989.
40. Barry, h : *Oxidants and human disease : Some new concept.* *FASEB.J.*, 1:358~364, 1987.
41. Reiter RJ : *Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the ageing brain.* *FASEB. j.*, 9:526~533, 1995.
42. 이귀녕 外 : 臨床病理과일, 서울, 醫學文化社, pp. 138~139, 1990.
43. 金賢兒 : 老人性痴呆에 대한 文獻的 考察, 서울, 大韓韓方內科學會 13(2):58~62, 66~67, 1992.
44. 鄭仁哲 外 : 痴呆에 관한 文獻的 考察, 서울, 東醫神經精神科學會誌 7(1):77~94, 1996.
45. 黃義完 外 : 痴呆에 관한 韓醫學的 臨床研究, 서울, 東醫神經精神科學會誌 7(1):1~13, 1996.
46. 康秉秀 外 : 本草學, 서울, 永林社, p.137, 303, 348, 350, p.448, 467, pp.541-542, 1991.
47. 黃宮繡 : 本草求真, 서울, 一中社, p.2, 15, 24, 62, 87, 116, 117, 177, 1991.
48. 申佶求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, p.1, 16, 23, 68, 501, 514, 515, 697, 725, 1982.
49. 李尙仁 : 本草學, 서울, 學林社, p.51, 58, 63, 95, 174, 344, 348, 424, 1986.

= Abstract =

The Antioxidant Effects of Sesimting on the Brain Tissue of Rat

Seong-Hyeon Kim,
Sang-Ryong Lee

Dept. of Oriental Neuropsychiatry
College of Oriental medicine, Taejon University

This experiment was done to investigate the antioxidant effect of Sesimtang(SST) on brain tissues of mouse. The experimental groups were divided into three groups and treated as follows for

15 days ; Normal group(NC), Vt.E administrated group(PC), SST administrated Group(SST). After the extracting microsome from brain of mouse, those were measured the amounts of oxidant materials like MDA(malonaldehyde) and H_2O_2 , then activities of antioxidant enzymes like SOD(superoxide dismutase), catalase, NADPH-cytochrome P-450 reductase.

The results were as follows;

1. In TBA reaction to measure the amount of MDA, oxidant material of brain tissue of aged rat, both treated groups showed significant decrease.
2. Hydrogen peroxide formation was showed

significant decrease in both treated groups than normal group.

3. Superoxide dismutase activity was increased in both treated groups than normal group, and showed little change in SST administrated group than normal group.
4. Catalase activity was increased in both treated groups than normal group.
- 5 NADPH-cytochrome P-450 reductase activity was increased in both treated groups than normal group.