대한한의학회지 : 제19권 제1호
K.O.M.S. Vol. 19. No. 1. 1998

定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗的 硏究

崔 龍 埈, 成 彊 慶, 文 炳 淳*

ABSTRACT

An Experimental Study of Jeongjihwan(定志丸) on the Biochemical Changes in Brain Tissue and the Damages of the Neuron

Choi, Yong-Joon. Sung, Kang-Kyung. Moon, Byung-Soon*
* Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The present experiment was designed to examine the effects of *Jeongjihwan* on catecholamines, serotonin, amino acids, lipid peroxide, free radical scavenging activity, malondialdehyde and superoxide dismutase activity in senile brain. It was performed by administering *Jeongjihwan* extracts of a variety of concentration to senile rats to experimentally determine effects of *Jeongjihwan* on biochemical changes in senile brain and examine protective effects against neurotoxin. To examine survival rate, the rat's spinal cord sensory ganglion cell pretreated in *Jeongjihwan* extracts was cultured in oxygen free radical.

The results were summarized as follows:

1. *Jeongjihwan* significantly increased noradrenaline in the hippocampus and hypothalamus of the brain tissue of senile rats, and even though *Jeongjihwan* increased noradrenaline also in other brain tissue, there was no significance.
2. *Jeongjihwan* had no effects on dopamine changes in all brain tissue of senile rats.
3. *Jeongjihwan* significantly increased serotonin, but decreased in other brain tissue.

* 圓光大學校 韓醫科大學 心系內科學敎室

4. *Jeongjihwan* increased amino acid in the brain tissue of senile rats.
5. *Jeongjihwan* significantly decreased lipid peroxide and free radical in the brain tissue of senile rats.
6. *Jeongjihwan* significantly increased survival rate of nerve cell exposed to oxygen free radical.

According to the above results, *Jeongjihwan* is assumed to improve brain function by reacting on biochemical changes of the senile brain and carries effects of protecting against neurocytotoxicity, and that *Jeongjihwan* can be used to treat regressive brain disease carrying symptoms of psychoactive disorders.

Ⅰ. 서 론

定志丸은 ≪備急千金要方≫에 心氣不足으로 인한 憂愁悲傷不樂, 忽忽喜忘, 朝瘥暮劇, 暮瘥朝劇, 狂眩을 治療한다[16]고 처음 수록되었으며, 그 후 歷代醫書에서 驚悸, 怔忡, 健忘, 癲狂, 精神恍惚 등의 病症을 치료하는데 활용되어 왔다[2,12-13,28-29,31,37,39,42,46-47].

心氣不足은 心의 主要 生理機能이 低下되는 것으로[6,14-15,36,45], 人間의 思惟, 意識, 精神活動을 主宰하는 心의 主神志[6,11,14-15,18,33,51] 機能 低下와 血의 흐름을 調節하는 心의 主血脈[6,11,14-15,33,45,51] 機能이 低下되어, 心神不安으로 因한 驚悸不安, 失眠健忘, 喜悲欲哭, 多憂善忘, 精神恍惚, 喃喃獨語 등 精神活動障碍를 나타낸다[2,12-13,19,28-29,37,39,42,46-47].

이러한 精神活動障碍는 腦의 彌滿性 萎縮과 腦神經細胞 消失과 같은 器質的 變性과 腦의 生化學的 變化로 각종 神經傳達物質의 減少 등으로 인하여 발생한다[25,48,52,57].

定志丸은 補益心氣하고, 安神定志시키는 人蔘, 茯苓과 開心散, 寧心神의 效能이 있는 遠志, 石菖蒲로 구성되어[3,17,26], 心氣不足으로 인한 精神活動障碍의 증상이 나타나는 疾患에 활용되고 있는 處方이다.

定志丸에 대한 實驗硏究는 朴[54]의 心血管系에 미치는 影響에 대한 報告만 있을 뿐, 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 影響에 대한 硏究는 아직 報告된 바가 없었다.

이에 著者는 여러 濃度의 定志丸 抽出液이 老化白鼠의 腦組織에 미치는 生化學的 變化와 酸素自由基에 露出된 神經細胞毒性에 대한 防禦效果를 實驗的으로 관찰하였던 바 有意한 결과를 얻었기에 報告하는 바이다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 材料

1) 動物

本 實驗에 사용된 動物은 圓光大學校 韓醫科大學 動物 飼育室에서 分離 飼育된 CD-1 계통의 생쥐 및 24개월 以上된 male Wistar rat를 老化白鼠로 選定하고, 여러 實驗群으로 나누어 사용하였다. 실험기간 동안 물과 기본 配合食餌는 자유롭게 먹을 수 있도록 하였으며, 12시간 간격으로 明暗을 조절하고 일정한 溫度와 濕度를 유지하여 飼育하였고, 1주일 이상 實驗室 環境에 적응시킨 후 實驗에 사용하였다.

2) 藥材

本 實驗에 사용한 定志丸의 處方內容은 ≪備急千金要方≫[16]에 依據하였으며, 藥材는 圓光大學校 附屬益山韓方病院에서 嚴選 購入하여 사용하였다. 1貼의 內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription of *Jeongjihwan*

韓藥名	生藥名	重量(gr)
人 蔘	Ginseng Radix	5.625
白茯苓	Hoelen	5.625
遠 志	Polygalae Radix	3.750
石菖蒲	Acori Rhizoma	3.750
總 量		18.750

3) 檢液의 調製

定志丸 20貼 分量을 蒸溜水 3000 ㎖와 함께 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 2시간 동안 電熱器로 煎湯한 후, 3000 rpm에서 20분간 遠心分離하여 上淸液을 取한 다음, 濾過紙로 濾過한 溶液을 減壓回轉蒸發器를 이용하여 減壓濃縮한 후, 凍結乾燥器에서 24시간 凍結乾燥하여 乾燥엑기스 59.7 g을 製造하였다. 이 乾燥엑기스를 蒸溜水로 再調整하여 사용하였으며, 試料를 細胞에 投與하기 前에는 1.2, 0.8, 0.45, 0.2 ㎛ pore size의 micro filter(Milipore)를 이용하여 濾過滅菌하였다.

4) 細胞 培養 및 器具 滅菌

Dulbeco's modification of Eagles's medium (MEM, Gibco) 등의 培養液을 사용하였다. Medium은 5% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS)이나 10% FBS를 보충하여 사용하였으며, antibiotic-antimycotic(Gibco)을 處理하였다. 0.25% trypsin EDTA(Gibco) 溶液으로 處理하여 細胞를 脫着시키고 培養하였다. 本 實驗에 사용된 細胞 培養液 및 試藥은 deionized distilled water(DDW)를 사용하여 製造하였으며, micro-filter(pore size 0.2 μm)를 이용하여 濾過滅菌하여 사용하였고, 器具는 121℃, 15 psi 下에서 高壓濕熱滅菌하거나 160℃ dry oven에서 2시간 이상 乾熱滅菌하여 사용하였다.

2. 方法

1) 老化白鼠의 腦組織의 生化學的 變化 測定

(1) Catecholamines와 serotonin의 測定

① 動物과 試料의 投與 : 6개월된 雄性의 Wistar rats를 成人白鼠로, 24개월된 雄性의 Wistar rats를 老化白鼠로 選定하여, 일정한 溫度와 濕度가 유지되고 12시간 간격으로 明暗이 조절되는 實驗室에서 물과 飼料만을 자유롭게 먹게 하면서 飼育한 對照群과, 여러 濃度의 定志丸 抽出液을 함께 投與한 實驗群으로 나누어 實驗을 실시하였다. 定志丸 抽出液은 3개월 동안 물에 稀釋하여 投與하였다.

② 腦組織의 解剖 및 切開 : 試料의 投與가 끝난 動物을 cage에서 꺼낸 즉시 頸椎脫臼法에 의하여 處置하고, 즉시 腦組織을 分離하여 液體窒素에 凍結한 후, -80℃의 defreezer에 보관하여 사용하였다. 腦組織을 切開하기 3시간 전에 -15℃의 cold box에 보관하여 切開가 쉽고 일정하게 할 수 있도록 한 후, -10℃가 유지되는 cryomicrotome 안에서 腦組織을 切開하였다. 腦組織을 500 ㎛의 두께로 관상봉합선상으로 박절하였다. 성공적으로 切開한 박편을 內部直徑이 3-5 mm 되는 미리 冷凍保管한 needle을 사용하여 Stevens 등[73]의 方法으로 cortex, striatum, hippocampus, hypothalamus, midbrain, pons-medulla oblongata와 cerebellum 등을 구분하여 組織을 取하였다. 組織標本은 다시 air-tight plastic tubes에 넣어 -80℃에 보관하였다가 2개월 안에 사용하였다.

③ Catecholamines와 serotonin의 分析 : noradrenaline, dopamine, serotonin 등을 high performance liquid chromatography(HPLC) 法[74]에 의하여 測定하였다. 즉 腦組織을 0.4 M $HClO_4$에 均質化해서 遠心分離하고 上淸液을 取한 후, 이것을 0.4 M K_2CO_3로 pH 6.5-6.8로 調整하여 遠心分離하고, amberlite column에 걸어 분획을 얻은 후, HPLC 法으로 分析하였다(Fig. 1).

Brain tissue was homogenized in 3 ml of 0.4 M $HClO4$ with 150mg dihydroxybenzylamine(DHBA) and 75 mg p-hydroxyphenylacetic acid(PHPA) as internal standards.

↓ Centrifuged at 10,900 × g for 20 min

Supernatant solution was adjusted to pH 6.3-6.8 with 0.4 *M* K_2CO_3.

↓ Centrifuged at 500 × g for 5 min

Clean supernatant was placed on a column of Amberlite CG-50 (height, 25 min; internal diameter, 3 mm)

↓ Wash the column with 0.2 ml of H_2O

Wash the column with 3.5 ml of H_2O

Wash the column with 0.1 ml of 0.6 *M* HCl containing 0.01% of cysteine(sol. A)

Elute with 0.7 ml of sol. A

↓

Take 30 μl for HPLC analysis (Noradrenaline, Dopamine, Serotonin, DHBA)
Mobile phase : 0.1 *M* KH_2PO_4/H_2O containing 3% CH_3OH and 0.1 *M* KH_2PO_4/H_2O containing 10% CH_3OH

Fig. 1. Measurement procedures.

(2) Amino acids의 測定

動物, 試料의 投與, 腦組織의 解剖 및 切開는 上記의 monoamines 測定時의 方法과 동일하게 시행하였으며, 腦組織의 amino acids의 測定은 다음과 같이 시행하였다. 각각의 腦組織을 1% picric acid에 넣고 組織을 均質化하여, 3,000 rpm 에서 10분 동안 遠心分離하고 上淸液을 取한다. 上淸液의 picric acid는 Dowex 2X8에 흡수시키고, 남은 溶液을 蒸發시켜 試料를 건조시킨다. 건조시킨 試料는 0.01 N HCl(pH 2.2)에 溶解시킨다. 溶解시킨 溶液을 amino acid analyzer로 amino acids의 含量을 分析하였다.

(3) Lipid peroxide와 free radical scavenging activity의 測定

前處置를 하지 않은 雄性의 Wistar rats를 頸椎脫臼法으로 處置한 후, 즉시 腦組織을 分離하고, 全腦組織의 均質液을 2 ㎖ 준비하여, 37℃에서 30분간 定志丸 抽出液 및 α- tocoperol 등의 對照藥物과 함께 incubation하였다. 20 ㎕의 ethanol에 溶解시킨 藥物과 함께 incubation 한 試料를 Okawa 등[69]과 Buege 등[60]의 方法을 약간 變形한 thiobarbituric acid(TBA) 法에 의하여 分析하였다.

定志丸 抽出液으로 處理한 腦組織에서의 free radical scavenging activity의 測定은 安定된 自由基인 1,1-diphenyl-2-pycrylhydrazyl(DPPH)를 이용한 Blois 등[58]의 分析시스템을 응용하였다. 100 μM DPPH ethanol 溶液은 violet 色을 띄고, α-tocopherol 같은 自由基 청소물질에 의하여 脫色된다. 이 溶液의 517 nm에서 吸光度는 free radical scavenging activity를 나타낸다.

(4) Malondialdehyde와 superoxide dismutase activity의 測定

動物, 試料의 投與, 腦組織의 解剖 및 切開는 上記의 monoamines 測定時의 方法과 동일하게 시행하였고, 採取한 腦組織의 malondialdehyde는 上記의 TBA 法에 의하여 測定하였으며, superoxide dismutase(SOD) 測定은 환원된 cytochrome C를 測定하는 간접적인 方法을 시행하였다.

Malondialdehyde의 間接定量法인 TBA 法은 過酸化脂質이 산화하여 발생한 carboxyl 基인 malondialdehyde가 TBA와 축합반응을 나타낸다. 이것을 butanol로 抽出하여 比色定量하는 것이다. 즉 0.15 ㎖의 腦組織 均質液에 2% Na_2WO_4를 포함하는 0.1 M H_2SO_4를 0.5 ㎖ 加하여 反應을 중단시킨다. 50 μM deferoxamine을 0.4 ㎖ 加하여 추가적인 TBA 反應物質 생성을 방지한다. TBA를 최종 濃度가 0.67%가 되도록 加하여, 試料를 0.05% butylated hydroxytoluene의 存在下에 30분 동안 煮沸한 후, 試料를 냉각하여 遠心分離하고, 上淸液을 532 nm에서 吸光度를 測定하였다.

2) 酸素自由基에 의한 細胞毒性에 대한 防禦效果 檢索

(1) 細胞 培養 : 脊髓 感覺神經節 細胞의 分離는 Michikawa 등[67]의 方法에 따라 시행하였다. 즉 分離된 感覺神經節은 0.25% trypsin(Sigma)으로 20분간 處理한 후, 細胞를 1000 rpm에서 10분간 遠沈시켰다. 遠沈된 細胞들은 phosphate buffered saline(PBS)으로 3-4회 洗滌하였다. 洗滌 완료후 10% FBS(Gibco)가 포함된 MEM(Gibco)에 浮游시킨 다음, poly-L-lysine(Sigma)으로 미

리 處理된 96-multiwell plate(Gibco)에 5×10^5 cells/well의 密度로 細胞를 도입하였다. 도입된 細胞는 5%, CO_2/95% air로 조절된 定溫器에서 일정 시간 培養하였으며, 細胞 도입후 3일만에 새로운 培養液으로 교환하여 주었다.

(2) 藥劑 處理 : 本 實驗에 사용한 藥劑로는 xanthine oxidase(XO, grade 1, from buttermilk, 1875), hypoxanthine(HX, Sigma), deferoxamine (DFX, Aldrich) 및 tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine(TPEN, Aldrich)으로써, 本 實驗에 사용하기 위하여 위의 藥劑들을 일정 濃度의 貯藏液을 만들어 冷暗所에 보관한 후, 實驗 당일 적당한 量으로 稀釋하거나 필요한 量을 직접 培養液에 첨가하여 사용하였다.

(3) 酸素自由基 處理 : 酸素自由基가 脊髓 感覺神經節 細胞에 미치는 毒性效果를 調査 하기 위하여, 일정 시간 동안 培養한 細胞를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3-4회 洗滌한 다음, 25 mU/ml XO와 0.3 mM HX를 혼합한 培養液에서 3시간 동안 處理한 후 分析하였다.

(4) 定志丸 抽出液의 處理 : 定志丸 抽出液이 酸素自由基에 의해서 초래되는 毒性效果에 미치는 影響을 分析하기 위하여, 培養 神經細胞를 XO/HX system에 露出하기 4시간 전에 여러 濃度의 定志丸 抽出液을 處理한 후, 일정 시간 培養한 다음 이를 分析하였다.

(5) 細胞 生存率 分析 : 實驗 分析을 위하여 (3-(4,5-dimethylthiazol)-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma) assay와 neurofilament enzymeimmuno assay(EIA)를 사용하였다. MTT assay는 Mosmann의 方法68)에 따라 培養이 완료된 細胞들에 實驗 전날 製造한 5 mg/ml MTT 貯藏液을 一定量 處理한 다음, acid proparanol로 formazan MTT를 溶解시킨 후, Dynatech Microelisa reader로 570 nm에서 測定하였다. Neurofilament EIA를 위하여 運動神經 細胞를 PBS로 3-4회 洗滌하여 알콜로 고정시킨 다음, 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3-4회 洗滌하였다. 洗滌 완료후 NE14(1:100, Sigma)로 1시간 동안 反應시킨 후, 0.04% O-phenylenediamine(OPD, Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide로 處理한 다음, Dynatech Microelisa reader로 490 nm에서 吸光度를 測定하였다.

III. 실험성적

1. 老化白鼠의 腦組織의 生化學的 變化

1) Catecholamines와 serotonin의 變化

定志丸 抽出液의 5% 水溶液을 投與한 群(JJH-5)에서 腦組織中 hippocampus와 hypothalamus에서 有意性 있게 noradrenaline을 增加시키는 結果를 나타내었으며, 10% 水溶液 投與群(JJH-10)에서도 유사한 結果를 보였다. 다른 腦組織에서는 定志丸 抽出液을 投與한 群에서 대체로 noradrenaline이 增加하는 結果를 보였지만 有意性은 없었다(Table I).

老化白鼠의 腦組織에서 dopamine은 腦의 거의 모든 組織에서 크게 變化하지 않았다. 그리고 serotonin은 cerebellum에서만 有意性있게 增加하는 結果를 보였을 뿐, cerebellum을 제외한 모든 腦組織에서 抑制되는 結果를 보였다(Table II, III).

Table Ⅰ. Levels of noradrenaline in various parts of the brains of 24 months old male Wistar rats treated with the extract of *Jeongjihwan*(JJH) for 3 months

Brain Tissue	Noradrenaline Level(μg/g tissue wet weight)			
	CONT	JJH-1	JJH-5	JJH-10
Cortex	0.42±0.11	0.43±0.13	0.56±0.08	0.55±0.07
Striatum	0.51±0.13	0.54±0.14	0.67±0.11	0.69±0.09
Hippocampus	0.48±0.12	0.56±0.12	0.89±0.09*	0.81±0.08*
Hypothalamus	1.63±0.18	1.74±0.21	2.39±0.23*	2.42±0.29*
Midbrain	0.94±0.07	1.12±0.15	1.14±0.13	1.11±0.11
Pons-medulla oblongata	0.91±0.09	1.10±0.13	1.08±0.07	0.98±0.13
Cerebellum	0.32±0.05	0.41±0.06	0.43±0.06	0.39±0.05

The experimental animals were divided into 4 groups. Control group received only food and water. JJH-1 group was orally treated with a 1% aqueous solution of *Jeongjihwan* water extract for 3 months. JJH-5 group was orally treated with a 5% aqueous solution of *Jeongjihwan* water extract for 3 months. JJH-10 group was orally treated with a 10% aqueous solution of *Jeongjihwan* water extract for 3 months. The number of experimental animal in each group is 9. Values represent means±SD. * $p<0.05$

Table Ⅱ. Levels of dopamine in various parts of the brains of 24 months old male Wistar rats treated with the extract of Jeongjihwan(JJH) for 3 months

Brain Tissue	Dopamine Level(μg/g tissue wet weight)			
	CONT	JJH-1	JJH-5	JJH-10
Cortex	0.65±0.13	0.63±0.14	0.66±0.12	0.65±0.11
Striatum	0.21±1.56	10.13±1.68	11.6±1.31	12.1±1.24
Hippocampus	0.14±0.02	0.15±0.04	0.21±0.02	0.20±0.02
Hypothalamus	0.32±0.05	0.41±0.03	0.44±0.04	0.43±0.03
Midbrain	0.56±0.03	0.54±0.04	0.51±0.04	0.56±0.04
Pons-medulla oblongata	0.24±0.02	0.26±0.04	0.23±0.03	0.26±0.03
Cerebellum	0.11±0.01	0.12±0.01	0.09±0.02	0.12±0.02

The experimental animals were divided into 4 groups. control group received only food and water. JJH-1 group was orally treated with a 1% aqueous solution of *Jeongjihwan* water extract for 3 months. JJH-5 group was orally treated with a 5% aqueous solution of *Jeongjihwan* water extract for 3 months. JJH-10 group was orally treated with a 10% aqueous solution of *Jeongjihwan* water extract for 3 months. The number of experimental animal in each group is 9. Values represent means±SD. * $p<0.05$

Table Ⅲ. Levels of serotonin in various parts of the brains of 24 months old male Wistar rats treated with the extract of Jeongjihwan(JJH) for 3 months

Brain Tissue	Serotonin Level(μg/g tissue wet weight)			
	CONT	JJH-1	JJH-5	JJH-10
Cortex	0.49±0.08	0.46±0.11	0.47±0.07	0.48±0.05
Striatum	0.54±0.11	0.54±0.12	0.51±0.09	0.51±0.08
Hippocampus	0.49±0.08	0.51±0.11	0.47±0.06	0.48±0.06
Hypothalamus	1.24±0.12	1.18±0.09	1.13±0.12	1.15±0.14
Midbrain	0.71±0.06	0.72±0.11	0.68±0.08	0.67±0.14
Pons-medulla oblongata	0.59±0.04	0.57±0.12	0.59±0.08	0.61±0.07
Cerebellum	0.21±0.03	0.23±0.04	0.33±0.07	0.32±0.06*

The experimental animals were divided into 4 groups. control group received only food and water. JJH-1 group was orally treated with a 1% aqueous solution of *Jeongjihwan* water extract for 3 months. JJH-5 group was orally treated with a 5% aqueous solution of *Jeongjihwan* water extract for 3 months. JJH-10 group was orally treated with a 10% aqueous solution of *Jeongjihwan* water extract for 3 months. The number of experimental animal in each group is 9. Values represent means±SD. * $p<0.05$

2) Amino acids의 變化

6개월된 白鼠의 腦組織 皮質에서 taurine은 1, 5, 10% 濃度의 定志丸 抽出液을 投與할 때, 對照群에 比하여 각각 102, 115, 117%로 增加하였고, glutamine은 각각 112, 123, 124%로 有意性있게 增加하였으며, glysine은 각각 121, 148, 145%로, alanine은 115, 136, 138%로 有意性있게 增加하였다. 또한 다른 amino acids들도 대체로 增加하는 結果를 나타냈다. 24개월된 老化白鼠에서 taurine은 1, 5, 10% 濃度의 定志丸 抽出液을 投與할 때, taurine은 각각 112, 131, 129%로 有意性있게 增加하였고, alanine은 각각 126, 143, 142%로, serine은 112, 123, 121%로 有意性있게 增加하였으며, 다른 amino acids들도 대체로 增加하는 結果를 나타냈다(Fig. 2, 3).

腦組織中 cerebellum에서는 定志丸 抽出液 投與 後 6개월된 白鼠에서 glysine과 GABA가 有意性있게 增加하는 結果를 보였으며, 24개월된 老化白鼠에서는 alanine과 proline이 有意性있게 增加하는 結果를 나타냈다. 그밖에 다른 amino acids들은 대체로 定志丸 抽出液을 投與하였을 때 增加하는 傾向을 나타냈다(Fig. 4, 5).

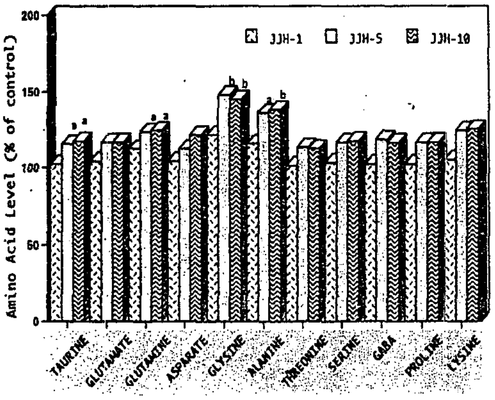

Fig. 2. Effect of Jeongjihwan water extract on amino acid levels in cortex of brain tissue of adult male Wister rats.
JJH-1 : the group treated orally with 1% water solution of JJH extract for 3 months, JJH-5 : the group treated orally with 5% water solution of JJH extract for 3 months, JJH-10 :the group treated orally with 10% water solution of JJH extract for 3 months.
Values are expressed as percentages of control levels n=9, a : p<0.05, b : p<0.01 vs control.

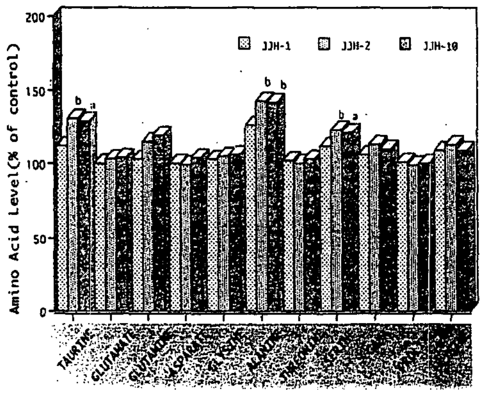

Fig. 3. Effect of Jeongjihwan water extract on amino acid levels in cortex of brain tissue of 24 months old male Wistar rats.
JJH-1 : the group treated orally with 1% water solution of JJH extract for 3 months, JJH-5 : the group treated orally with 5% water solution of JJH extract for 3 months, JJH-10 :the group treated orally with 10% water solution of JJH extract for 3 months.
Values are expressed as percentages of control levels n=9, a : p<0.05, b : p<0.01 vs control.

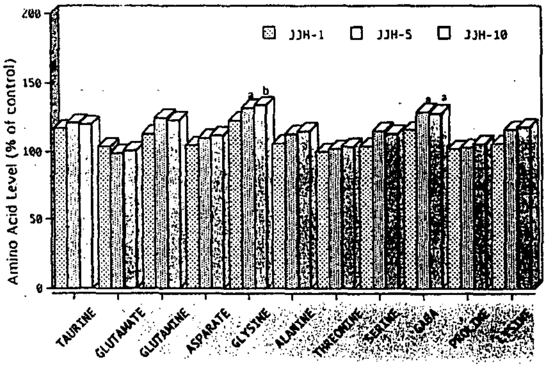

Fig. 4. Effect of Jeongjihwan water extract on amino acid levels in cerebellum of brain tissue of adult male Wister rats.
JJH-1 : the group treated orally with 1% water solution of JJH extract for 3 months, JJH-5 : the group treated orally with 5% water solution of JJH extract for 3 months, JJH-10 :the group treated orally with 10% water solution of JJH extract for 3 months.
Values are expressed as percentages of control levels n=9, a : p<0.05, b : p<0.01 vs control.

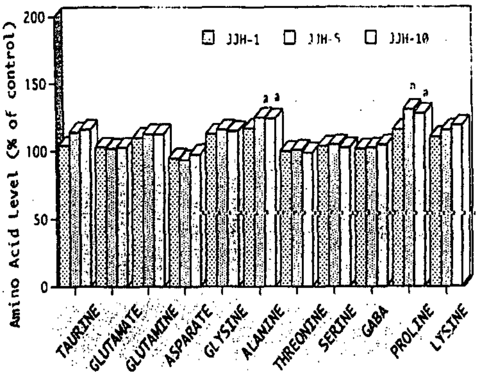

Fig. 5. Effect of Jeongjihwan extract on amino acid levels in cerebellum of brain tissue of 24 months old male Wistar rats.
JJH-1 : the group treated orally with 1% water solution of JJH extract for 3 months, JJH-5 : the group treated orally with 5% water solution of JJH extract for 3 months, JJH-10 :the group treated orally with 10% water solution of JJH extract for 3 months.
Values are expressed as percentages of control levels n=9, a : $p<0.05$, b : $p<0.01$ vs control.

3) Lipid peroxide와 free radical scavenging activity의 變化

自由基에 의한 脂質過酸化는 넓은 범위의 病理的 疾患을 유발하는데 중요한 역할을 한다. 특히 自由基는 腦血管疾患 誘發의 중요한 원인이 되며, 腦의 退行性疾患에도 중요한 원인이 된다. 따라서 定志丸 抽出液과 抗癎疾 및 抗不整脈劑로 쓰이는 phenytoin과 산화방지에 중요한 역할을 하는 α-tocopherol 등과 함께 處理한 후 投與하여, 腦組織中의 脂質過酸化와 自由基의 變化에 미치는 效果를 관찰하였다. α-Tocopherol은 10^{-7} g/ml 濃度에서 過酸化脂質을 抑制하는 效果가 뚜렷하게 나타나기 시작하여, 10^{-4} g/ml 濃度에서 過酸化脂質을 抑制하는 效果를 분명하게 관찰할 수 있었다. Phenytoin은 거의 별다른 變化를 보이지 않았으며, 定志丸 抽出液은 10^{-5} g/ml 濃度에서 過酸化脂質을 抑制하는 效果가 나타나기 시작하여, 5×10^{-3} g/ml 濃度에서 過酸化脂質을 抑制하는 效果가 뚜렷하게 나타났다. Free radical scaveging activity는 α-tocopherol의 경우 10^{-5} g/ml 濃度에서부터 自由基를 抑制하는 效果가 나타나기 시작하여, 10^{-4} g/ml 濃度에서 自由基를 抑制하는 분명한 效果를 보였다. 定志丸 抽出液은 10^{-4} g/ml 濃度에서부터 自由基를 抑制하는 效果를 보였고, 10^{-3} g/ml 濃度에서 분명한 抑制效果를 관찰할 수 있었다(Fig. 6, 7).

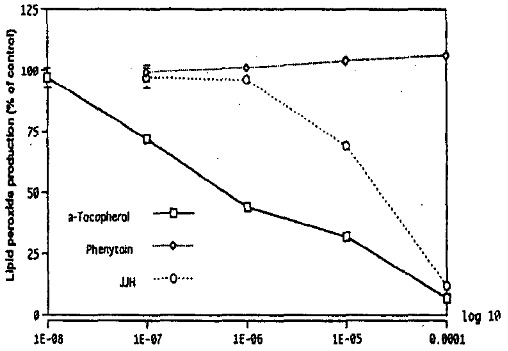

Fig. 6. Effect of Jeongjihwan extract, a-tocopherol, and phenytoin on lipid peroxide production in forebrain hogenate of adult Wister rats.
Various concentrations of drugs(20㎕) were added to 2㎖ of forebrain brain homogenate in phosphate saline buffer and incubated at 37 centigrade for 3h. Each point represents the mean and SE in 6 experiemtnts.

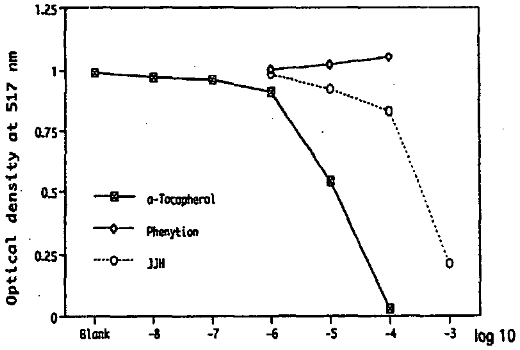

Fig. 7. Free radical scavenging activity of JJH extract, phenytoin, and a-tocopherol in forebrain hogenate of adult Wister rats. Various concentrations of drugs in ethao (300㎕) were added to 3㎖ of ethanol DDPH(100㎛). Each point represents the mean and SE in 6 experiemtnts. SE are smaller than symbol mark.

4) Malondialdehyde의 變化

實驗 對照群의 malondialdehyde는 46.3±2.1이었으며, 1% 定志丸 抽出液 投與群(JJH-1)은 별다른 變化를 나타내지 않았고, 5% 定志丸 抽出液 投與群(JJH-5)은 39.7±2.4로 有意한 減少效果를 보였으며, 10% 定志丸 抽出液 投與群(JJH-10)에서도 역시 有意한 malondialdehyde 減少效果를 보여, 24개월된 白鼠의 腦組織에서 定志丸의 投與가 脂質의 過酸化를 抑制하는 效果를 보여주었다(Fig. 8).

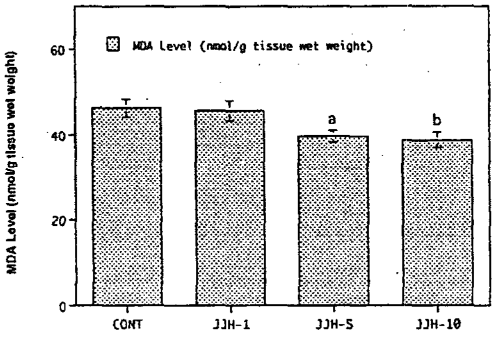

Fig. 8. Influence on cerebral levels of malondialdehyde in 24 months old rats treated with Jeingjihwan extract.
JJH-1 : the group treated orally with 1% water solution of JJH extract for 3 months, JJH-5 : the group treated orally with 5% water solution of JJH extract for 3 months, JJH-10 :the group treated orally with 10% water solution of JJH extract for 3 months.
Values are expressed as percentages of control levels n=9, a : $p<0.05$, b : $p<0.01$ vs control.

2. 酸素自由基의 毒性效果에 대한 定志丸 抽出液의 防禦效果

1) 酸素自由基의 毒性效果

XO가 1-100 mU/ml 濃度로 각각 포함된 培養液에서 脊髓 感覺神經節 細胞를 3시간 동안 露出시킨 후, 細胞의 生存率을 MTT assay에 의하여 分析한 結果, 1과 10 mU/ml XO를 處理한 경우 對照群(100%)에 比하여 細胞의 生存率은 각각 93%와 85%로 나타났으며, 25 mU/ml XO에서는 51%로 나타났다. 또한 50 mU/ml에서는 36%로 나타났다(Fig. 9A). 시간의 變化에 따른 酸素自由基의 影響을 分析하기 위하여, 25 mU/ml XO와 0.3 mM HX를 混合한 培養液에서 神經細胞를 1-5시간 동안 培養한 結果, 細胞의 生存率은 1시간 培養에서는 對照群(100%)에 比하여 96%로 나타났으나, 2시간과 3시간 培養에서는 각각 84%와 43%로 나타났다. 또한 4시간 培養에서는 35%로 나타났다(Fig. 9B).

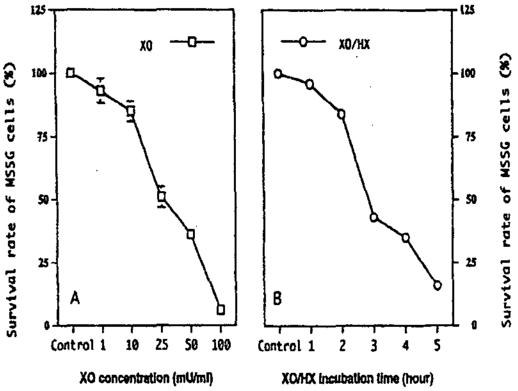

Fig. 9. A : Dose-dependent response of xanthine oxidase(XO) in cultured mouse spinal sensory ganglionic(MSSG) cells. The survival rats of cells was measured by MTT assay. B : Time-dependent response of XO and hypoxanthine(HX) in cultured MSSG cells. The survival rats of cells was measured by MTT assay. Values represents the mean and SE. The number of samples is 6. SE is sometimes smaller than the symbol.

2) 定志丸 抽出液의 防禦效果

培養 神經細胞를 25 mU/ml XO/0.3 mM HX에 露出시키기 4시간 前에 定志丸 抽出液이 여러 濃度로 調整된 培養液에서 각각 處理한 다음, 이에 대한 影響을 MTT assay와 neurofilament EIA에 의하여 調査한 結果, XO/HX만 處理한 경우 細胞의 生存率은 對照群(100%)에 比하여 46%로 나타난 반면, 100 μg/ml 處理한 群에서는 49%로 나타났으며, 500과 1000 μg/ml 處理한 群에서는 각각 74%와 79%의 높은 生存率을 나타냈다(Fig.10A). 定志丸 抽出液을 處理한 후 neurofilament 測定을 위하여 neurofilament EIA를 行한 結果, XO/HX만 處理한 경우 23%로 나타난 반면, 100 μg/ml 投與群에서는 38%로 나타났다. 또한 500 μg/ml와 1000 μg/ml에서는 각각 52%와 56%로 나타났다(Fig. 10B).

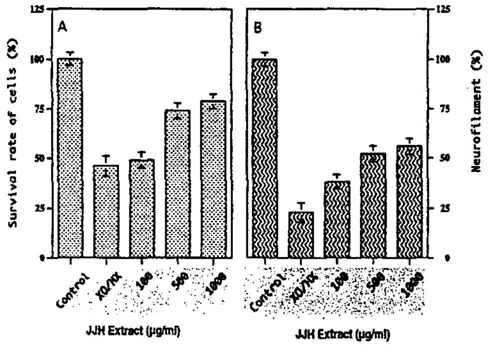

Fig. 10. The change of survival rats of cells (A), the change of neurofilaments (B). Dose depent response of Jeongjihwan water extract on for its neuroprotective effect on oxidant induced neurotoxicity by MTT assay. Cultured neuron were preincubated with Jeongjihwan extract for 4 hours before exposure to oxygen radicals. Values represents the mean and SE.

Ⅳ. 고 찰

최근 生活水準의 향상과 醫學의 발달로 인간의 壽命이 크게 연장되어 老年層 인구가 증가됨에 따라 腦의 退行性 變化로 인한 疾患을 비롯한 여러 가지 醫學的 問題點들이 社會問題로 대두되고 있다[24,56].

특히 腦의 老化는 神經細胞의 減數 및 萎縮를 비롯하여 神經原纖維의 엉킴(neurofibrillary tangle), 老人性 神經斑(senile plaque), 顆粒空胞變性(granulovacular degeneration) 및 Lewy 小體 등이 출현하는 組織病理學的 變化 이외에도 Cholinergic 系, Noradrenergic 系, Dopamine 등의 神經傳達物質(neurotransmitters) 減少와 Aluminium

등의 金屬 Ion 蓄積 등과 같은 生化學的 變化를 유발시킨다[25,48,52,57]. 이러한 腦의 退行性 疾患으로는 大腦 皮質에 침범하여 精神活動障碍를 수반하는 老人性 痴呆(Alzheimer's disease), Pick's disease 등과 基底部 神經節을 침범하여 運動神經系에 障碍를 발생시키는 Huntington's disease, Parkinson's disease 등이 있다[48,52,57].

大腦皮質의 老化로 發生하는 痴呆는 知的 機能의 全體的 障碍를 의미하는 것으로[11,25,50], 記憶力과 知能이 減退되어[25,52], 抽象的 思考, 判斷 등의 高等 大腦皮質 機能障碍를 招來하며[52,55], 性格變化, 不眠, 妄想 및 行動障碍 등의 증상을 수반하기도 한다[48].

韓醫學에서 痴呆는 言語, 感情, 行動面에서 非正常的인 증상이 나타나는 "健忘"[5,12,27-28,35,42,47,49], "癲狂"[4,28,31,42,46], "虛勞"[16,33], "呆病"[13,34,43-44], "痴呆"[9,40-41,44] 등의 範疇에 포함되는 것으로, 年高體弱에 따른 臟腑機能의 失調[9,20], 髓海不足[20,29,33], 痰迷心竅[9,21,29,32], 情緖的 要因[21,29,32-33] 및 氣滯血瘀[8-9,21] 등의 主要 病因이 心의 機能에 影響을 미쳐 發病하게 된다.

心은 血의 흐름을 調節하는 主血脈의 機能과 意識, 思惟, 精神活動을 主宰하는 主神志의 機能을 가진 臟腑이며[6,11,14], 心氣虛로 인한 精神障碍에 대한 病機에 대하여 ≪靈樞·天年篇≫[33]에서는 六十歲가 되면 心氣가 衰退하기 시작하여 쉽게 憂鬱해지고 근심하게 된다 하였고, 錢 등[7,13]은 魂魄이 不安한 것은 血氣가 少한 것인데, 血氣가 少한 것은 心에 屬하므로 心氣가 虛하면 사람을 두려워하고, 헛된 꿈을 꾸며 精神이 흐트러지고, 魂魄이 妄行한다 하였으며, 許 등[12,46-47]은 思慮過度로 心이 傷하면 血이 耗損되어서 神이 집을 지키지 못하므로 健忘이 發生한다 하였다. 또한 程[35]은 心은 神을 藏하는 법인데 神明이 不充하면 일을 앞두고 잊어버린다 하였고, 徽[49]는 健忘의 病本은 心虛에 있는 것으로, 만약 血氣가 衰少하면 精神이 昏憒하는 까닭에 心志가 動亂하여 잘 잊는다 한 것으로 보아 心氣가 虛할 경우 心의 主血脈, 主神志의 機能이 失調됨으로써 血脈의 運行이 遲滯되고, 心의 神志活動에 필요한 氣血의 滋養을 받지 못하여 痴呆를 비롯한 기타 精神活動障碍를 隨伴하는 腦의 退行性 疾患이 發生하는 것을 알 수 있다[6,14].

한편 定志丸은 定志小丸[16], 開心散[46], 定志補心湯[1], 小定志丸[38,42] 등으로 불리어 온 處方으로 人蔘, 茯苓, 遠志, 石菖蒲의 네가지 藥物로 구성되어 있으며, 각 藥物에 대한 本草學的인 性味와 效能을 살펴보면 다음과 같다.

人蔘은 甘, 微溫하여 大補元氣, 安精神, 健脾益氣, 生津止渴의 效能이 있고, 茯苓은 甘, 平하여 精神安靜, 利水滲濕, 健脾補中시키고, 遠志는 苦, 辛, 溫하여 安神益智, 鎭心, 祛痰利竅시키는 效能이 있으며, 石菖蒲는 辛, 溫하여 開竅安神, 化痰濕, 和中辟濁의 效能이 있다[3,17,26]. 따라서 本 方은 補益心氣, 安神定志시키는 效能으로 心氣虛로 인한 忽忽善忘, 神魂不安, 驚悸恐怯, 夢寐不祥 등 精神不安의 病證에 應用되고 있으므로[37-38,46-47], 記憶力 低下를 爲主로한 精神活動障碍의 증상이 나타나는 痴呆 등 腦의 退行性疾患에 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

이에 著者는 여러 濃度의 定志丸 抽出液이 老化白鼠의 腦組織에 미치는 生化學的 變化와 酸素自由基에 露出된 神經細胞毒性에 대한 防禦效果 및 methylmercury에 露出된 神經細胞毒性에 미치는 影響을 관찰하였다.

Catecholamines과 serotonin의 分析은 noradrenaline, dopamine, serotonin 등을 HPLC 法[74]에 의하여 測定하였다. 定志丸 抽出液의 5%와 10% 水溶液을 投與한 群(JJH-5, JJH-10)의 hippocampus와 hypothalamus에서 有意性있게 noradrenaline을 增加시켰으며, 定志丸 抽出液을 投與한 群에서 대체로 noradrenaline이 增加하는 結果를 보였다. 그러나 老化白鼠의 腦組織에서 dopamine은 腦의 거의 모든 組織에서 크게 變化하지 않았다. 그리

고 serotonin은 cerebellum을 제외한 모든 腦組織에서 抑制되는 結果를 보였으며, 특히 cerebellum에서는 有意性있게 增加하는 結果를 보였다.

Dopamine - β - hydroxylase는 noradrenergic neurons에 대한 표지효소로서 老人의 腦脊髓液에서 그 level이 낮아진다는 報告가 있다. 또한 serotoninergic과 cholinergic 活性은 老化된 사람의 腦의 皮質에서 減少한다는 報告가 있어 神經傳達物質이 老化에 따라 減少한다는 사실을 알 수 있다. 이러한 指標는 老化에 따라 중요한 神經傳達物質인 monoaminergic 活性이 減少한다는 사실을 말해준다. 따라서 定志丸의 投與가 老化白鼠의 腦組織에서 catecholamines의 濃度 減少를 抑制하는 效果를 보이므로, 神經機能의 退化를 抑制할 수 있는 處方으로 이해할 수 있다.

酸素自由基는 여러 神經細胞 즉 척수 운동신경원을 비롯하여[67] 희소돌기아교세포 및 도파민성 신경원[66] 등에 손상을 줌으로써 Parkinson's disease를 비롯한[63] 多發性 硬化症, Huntington's disease 및 근위축성 축삭경화증 등[59,62]과 같은 각종 神經病變을 招來한다는 것은 이미 잘 알려져 있다. 酸素自由基에 의한 神經病變은 외부의 손상이나 老化에 의하여 腦속의 酸素自由基를 제거하는 酸素自由基의 除去酵素의 生成이 減少되거나, superoxide dismutase(SOD-1) 遺傳子의 突然變異에 의하여 cytosolic Cu, Zn-SOD의 酵素活性 異常으로 환자 腦속에 酸素自由基가 과다하게 蓄積됨으로써 病變을 가속화 시킨다고한다[71]. 酸素自由基에 의한 神經毒性 效果에 대한 機轉은 아직까지 완전히 밝혀져 있지 않지만, 최근의 報告에 의하면 酸素自由基는 excitotoxic amino acids(EAAs)의 分泌를 促進시킨다는 것이 酸素自由基에 露出된 培養 해마신경원에서 研究報告된 바 있으며[70], 酸素自由基에 의한 細胞毒性에 대한 結果와 Iron-chelator의 影響에 대한 報告도 있다[53]. 本 研究에서는 酸素自由基의 神經毒性에 대한 定志丸 抽出液의 神經細胞毒性 防禦效果를 알아보기 위하여 생쥐의 脊髓 感覺神經節 細胞를 培養한 후 酵素的으로 酸素自由基를 發生시켜 이를 細胞에 露出시킨 다음, 酸素自由基에 의하여 중재된 神經毒性效果를 分析하고, 또한 酸素自由基의 毒性效果에 대한 定志丸의 防禦效果를 調査하였다.

酸素自由基의 毒性效果는 XO가 1-100 mU/ml 濃度로 각각 포함된 培養液에서 脊髓 感覺神經節 細胞를 3시간 동안 露出시킨 후 細胞의 生存率은 10 mU/ml XO를 處理한 경우 細胞의 生存率은 85%로 나타났고, 25 mU/ml XO에서는 51%로 나타났다. 또한 50 mU/ml에서는 36%로 나타나 酸素自由基에 의한 細胞毒性을 확인할 수 있었으며, 시간의 變化에 따른 酸素自由基의 影響을 分析하기 위하여 25 mU/ml XO와 0.3 mM HX를 혼합한 培養液에서 神經細胞를 1-5시간 동안 培養한 結果, 細胞의 生存率은 4시간 培養에서 35%로 生存率이 시간이 경과에 따라 점차 낮아지는 結果를 나타냈다. 培養 神經細胞를 25 mU/ml XO/0.3 mM HX에 露出시키기 4시간 前에 定志丸 抽出液이 여러 濃度로 調整된 培養液에서 각각 處理한 結果, XO/HX만 處理한 경우 細胞의 生存率은 46%로 나타난 반면, 定志丸 抽出液 100 μg/ml 處理한 群에서는 49%로 나타났으며, 500과 1000 μg/ml 處理한 群에서는 각각 74%와 79%의 높은 生存率을 나타낸 것으로 보아, 定志丸 抽出液은 酸素自由基에 의한 細胞毒性에 대하여 防禦效果를 보였다. 또한 neurofilament에서도 定志丸의 投與로 毒性效果를 防禦한 것으로 나타났다.

酸素自由基는 腦虛血이나 腦卒中과 같은 여러 神經病變에 病因的 要因으로 작용한다[75]. 또한 酸素自由基의 形成은 細胞內 Ca^{2+}의 恒常性 유지를 어렵게 하며[72], EAAs의 分泌를 促進 시킴으로써 神經病變時 神經細胞의 退化를 誘導한다고 한다[70]. 本 實驗에서 酵素的으로 발생시킨 酸素自由基를 培養 脊髓 感覺神經節 細胞에 露出시킨

結果, 濃度와 時間에 비례하여 細胞의 生存率을 減少시켰다. 이러한 結果는 Michikawa 등[67]이 培養 생쥐 脊髓神經 細胞에서, Kim 등[66]이 소의 희소돌기아교세포에서 각각 酸素自由基의 影響에 대한 報告와 일치하였다. 이에 대한 原因으로는 신경원 속에 들어있는 Fe^{3+}와 같은 철이온이 XO와 HX의 相互作用에 의해서 생성된 superoxide와 같은 物質과 相互 反應함으로써 細胞에 損傷을 招來하였을 가능성이 클 것으로 생각되며[65], 동시에 이같이 생성된 superoxide나 hydroperoxide와 같은 酸素自由基들이 직접 細胞膜의 lipid peroxide chain을 活性化시켜, 그 結果 이와 관련된 각종 酵素와 二次傳達者에 影響을 줌으로써 細胞의 退化를 促進시켰을 가능성이 높다[75]. 本 實驗에서 酸素自由基에 露出시킨 培養 神經細胞에 定志丸 抽出液을 處理한 후, 이들이 酸素自由基에 의하여 유도된 神經毒性에 미치는 影響을 관찰한 結果, 定志丸 抽出液은 神經毒性을 어느 정도 효과적으로 防禦하는 結果를 나타냈다. 이와 같은 현상은 XO와 HX의 相互 反應에 의하여 생성된 superoxide radical이나 hydroperoxide[64]와 같은 酸素自由基 및 이로 인한 hydroxyl radical의 生成作用을 抑制시켰거나, 또는 酸素自由基의 생성을 미리 방지함으로써 酸素自由基 생성시 細胞內 Ca^{2+} 增加를 防止하여 細胞의 損傷을 防禦하였을 것으로 생각할 수는 있으나[61], 정확한 機轉은 앞으로 계속 硏究를 진행해야 할 것으로 생각된다.

따라서 定志丸 抽出液이 酸素自由基의 生産抑制나 自由基의 除去機轉에 의해 細胞毒性을 減少시켰을 것으로 생각되며 定志丸의 보다 상세한 神經細胞毒性에 대한 防禦機轉을 밝히기 위해서는 形態學的, 神經生理學的 側面에서 다양하고 종합적인 分析이 필요할 것으로 思料된다.

V. 결 론

本 實驗은 여러 濃度의 定志丸 抽出液이 老化白鼠의 腦組織에 미치는 生化學的 變化와 酸素自由基에 露出된 神經細胞毒性에 대한 防禦效果를 관찰하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 定志丸은 老化白鼠의 腦組織中 hippocampus와 hypothalamus에서 noradrenaline을 有意性 있게 增加시켰고, 다른 腦組織에서도 增加는 시켰으나 有意性은 없었다.

2. 定志丸은 老化白鼠의 全腦組織에서 dopamine의 變化에 影響을 주지 못하였다.

3. 定志丸은 老化白鼠의 腦組織中 cerebellum에서 serotonin을 有意性있게 增加시켰으나 다른 腦組織에서는 抑制시켰다.

4. 定志丸은 老化白鼠의 腦組織에서 amino acids를 增加시켰다.

5. 定志丸은 老化白鼠의 腦組織에서 脂質過酸化와 自由基를 有意性있게 抑制시켰다.

6. 定志丸은 酸素自由基에 露出된 神經細胞의 生存率을 有意性있게 增加시켰다.

以上의 結果로 보아 定志丸은 老化된 腦의 生化學的 變化에 影響을 미쳐 腦機能을 改善시키고, 神經細胞毒性에 防禦 效果가 있어, 精神活動障碍의 증상을 수반하는 腦의 退行性 疾患에 활용할 수 있을 것으로 思料된다.

참고문헌

1. 江克明・包明蕙 : 簡明方劑辭典, 上海, 上海科學技術出版社, p.121, 676, 1989.
2. 康命吉 : 濟衆新編, 서울, 杏林書院, p.69, 1975.

3. 康秉秀 外 : 本草學, 서울, 永林社, pp.302-303, 496-497, 523-524, 531-533, 1995.
4. 龔 信 : 古今醫鑑, 江西, 江西科學技術出版社, pp.193-194, 1990.
5. 龔廷賢 : 增補 萬病回春, 서울, 一中社, pp.229-230, 1994.
6. 金完熙 · 崔達永 : 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, pp.167-181, 1990.
7. 譚日强 編著 : 金匱要略淺述, 北京, 人民衛生出版社, pp.229-310, 422-426, 1985.
8. 唐宗海 : 血證論, 臺北, 力行書局有限公司, p.159, 1988.
9. 董黎明 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.378-380, 1986.
10. 朴英培 · 金泰熙 : 漢方診斷學(Ⅱ), 서울, 成輔社, pp.221-224, 1986.
11. 朴贊國 : 臟象學, 서울, 一中社, pp.167-168, 1992.
12. 方 賢 : 奇效良方(全四冊中三), 香港, 商務印書館, pp.880-887, 1977.
13. 謝 觀 : 東洋醫學大辭典, 서울, 高文社, p.302, 378, 1980.
14. 上海中醫學院 : 中醫學基礎, 香港, 商務印書館香港分館, pp.79-80, 170-171, 1981.
15. 邵念方 : 臟腑證治與用藥, 山東, 山東科學技術出版社, p.7, 1983.
16. 孫思邈 : 備急千金要方(卷四十), 서울, 杏林出版社, pp.12-13, 1976.
17. 辛民敎 : 原色臨床本草學, 서울, 永林社,pp.166-167, 250-251, 370-371, 374-375, 1991.
18. 王新華 : 中醫歷代醫論選, 서울, 一中社, pp.29-31, 1991.
19. 汪訒庵 : 醫方集解, 서울, 成輔社, p.366, 1983.
20. 王淸任 : 醫林改錯, 臺北, 臺聯國風出版社, pp.22-25, 1975.
21. 王顯明 : 중의내과변證學, 北京, 人民衛生出版社, pp.477-481, 1984.
22. 柳熙英 : 東醫精神科學, 서울, 南山堂, pp.116-120, 1988.
23. 尹吉榮 : 東醫方劑學, 서울, 高文社, p.63, 1971.
24. 이근후 : 最新臨床精神醫學, 서울, 하나의학사, pp.138, 216-228, 1988.
25. 李文鎬 外 : 內科學(上), 서울, 醫林社, pp.256-259, 1986.
26. 李尙仁 外 : 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp.151-153, 308-313, 419-420, 426-428, 1990.
27. 李中梓 : 醫宗必讀, 서울, 一中社, pp.323-324, 1991.
28. 李 梴 : 編註 醫學入門(全五卷中二), 서울, 大星文化社, pp.180-182, 1984.
29. 林佩琴 : 類證治裁, 臺北, 旋風出版社, pp.235, 255-257, 1978.
30. 張介賓 : 景岳全書(上), 上海, 上海科學技術出版社, pp.523-576, 1984.
31. 張 璐 : 張氏醫通, 上海, 上海科學技術出版社, pp.300-301, 832, 1990.
32. 張伯臾 : 中醫內科學, 北京, 人民衛生出版社, pp.223-224, 1988.
33. 張隱庵 · 馬元臺 : 黃帝內經素問靈樞合編, 臺北, 臺聯國風出版社, pp. 73, 121, 191-198, 329, 403, 1986.
34. 錢鏡湖 : 辨證奇門全書, 서울, 甘地出版社, pp.233-235, 1990.
35. 程國彭 : 醫學心悟, 香港, 友聯出版社, pp.209--210, 1961.
36. 鄭遇悅 : 漢方病理學, 서울, 三進社, pp.127-128, 1988.
37. 周命新 : 醫門寶鑑, 大邱, 東洋綜合通信敎育院出版部, pp.172-173, 1987.
38. 朱 橚 : 普濟方(1-2), 서울, 翰成社, pp.425-432, 1976.
39. 朱震亨 : 丹溪心法附餘(上), 서울, 大星文化社, pp. 358-359, 1993.
40. 陳家揚 : 實用中醫精神醫學, 北京, 北京出版

社, pp.27-28, 1985.
41. 陳貴廷・楊思澍 : 實用中西醫結合診斷治療學(上), 서울, 一中社, pp.824-826, 1992.
42. 陳無擇 : 三因方, 서울, 翰成社, pp.311, 338-340, 1977.
43. 陳士鐸 : 辨證錄, 서울, 醫聖堂, pp.241-246, 1989.
44. 陳士鐸 : 石室秘錄, 서울, 杏林出版社, p.208, 1987.
45. 崔虎錫 : 漢方臨床入門, 서울, 成輔社, p.172, 1985.
46. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.98-99, 1987.
47. 黃度淵 : 醫宗損益(上), 서울, 醫藥社, pp.58-62, 1976.
48. 黃義完・金知赫 : 東醫精神醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp.256-257, 262-264, 266, 1987.
49. 徽宗勅 : 聖濟總錄(中國醫學大系 7), 서울, 麗江出版社, p.487.
50. 김명호 : 痴呆의 定義와 分類, 大韓神經科學會誌, 3(1):1-4, 1985.
51. 金知赫・黃義完 : 內經에 나타난 神의 考察, 大韓韓醫學會誌, 7(1):104-108, 1986.
52. 김진수 : Alzheimer's disease의 神經化學的 變化에 關한 考察, 大韓神經科學會誌, 3(1):10-15, 1985.
53. 박승택 : 酸素自由基에 의해서 誘導된 神經毒性에 대한 Iron-chelator의 影響에 관한 硏究, 大韓體質人類學會誌, 8(2):113-121, 1995.
54. 朴晉永 : 定志丸煎湯液이 實驗動物의 心血管系에 미치는 影響, 圓光大學校大學院, 碩士學位論文, 1995.
55. 이근후 : 精神科 領域에서의 痴呆, 大韓神經科學會誌, 3(1):25-27, 1985.
56. 李東垣 外 : 痴呆에 관한 東西醫學的 比較考察, 大韓韓方內科學會誌, 16(1):1-16, 1995.
57. 지제근 : 痴呆의 病理, 大韓神經科學會誌, 3(1):5-9, 1985.
58. Blois, M.S. : Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 181:1199-1200, 1958.
59. Bracco, F., Scarpa, M., Rigo, A., Battistin, L. : Determination of superoxide dismutase activity by the polarographic method of catalytic currents in the cerebrospinal fluid of aging brain and neurologic degenerative diseases, Proc Soc Exp BiolMed, 196:36-41, 1991
60. Buege, J.A. and Aust, S.D. : Microsomal lipid peroxidation. In S. Fleischer and L. Parker(Eds.), New York, Academic Press, *Methods in Enzymology, 52*:302-310, 1978.
61. Choi, D.W. : Ionic dependence of glutamate neurotoxicity, J. Neurosci, 7:368-379, 1987.
62. Conradi, S., Ronnevi, L., Norris, F. : Amyotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP(ed):"Human Neuron Disease", New York, Raven Press, pp.35-56, 1982.
63. Difazio, M.C., Holling sworth, Z., Young, A.B., Penny, J.B. : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains, Neurology, 42:402-406, 1992.
64. Fridovich, I. : Quantitative aspects of the productin of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase, J. Biochem, 245:4053-4057, 1970.
65. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. : Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, J. Biochim, 219:1-14, 1984.
66. Kim, Y.S., Kim, S.U. : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase, J. Neurosci Res, 29:100-106, 1991.
67. Michikawa, M., Lim, K.T., Mclamon, J.G.,

Kim, S.U. : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures, J. Neurosci Res, 37:62-70, 1994.

68. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays, J. Immum Methods, 65:55-63, 1983.

69. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by hiobarbituric acid reaction, Anal Biochem, 95:351-58, 1979.

70. Pellegrini-Giampietro, D.E., Cherici, G., Alesiani, M., Carrla, V., Moroni, F. : Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage, J. Neurosci, 10:1035-1041, 1990.

71. Rosen, D., Siddique, T., Patterson, D., Figlewiez, D., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J.O., Regan, J., Deng, H., Rahmani, Z., Krrizus, A., et al. : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, Nature(London), 362: 59-62, 1993.

72. Siesjo, B.k., Bengtsson, F., Grampp, W., Theander, S. : Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain, Ann N.Y. Acad Sci, 568:234-251, 1989.

73. Stevens, T.J. and Bird, E.D. : Microdissections of nuclear areas from human brain slices, in IBRO Handbook Series;Methord in the Neurosciences, New York, John Wiley and Sons, Brain Microdissection techniques(Cuello A.C., ed), 2:171-183, 1983.

74. Yamaguchi, K., Arai, H., Watanabe, N., and Moroji, T. : Simultaneous determination of biogenic amines and their metabolites in brain tissue by HPLC with electrochemical detection. Twelfth Annual Meeting of the Japanese Society of Psychopharmacology, *Jpn. J. Psychopharmacol*, 2:9, 1982.

75. Yamamoto, M., Shima, T., Uozumi, T., et al. : A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of α-tocopherol administration, Stroke, 14:977-82, 1983.