

## 分心氣飲의 도파민 세포 보호 효과

경희대학교 한의과대학 한방부인과학 교실  
김로사, 이창훈, 이진우, 조정훈, 장준복, 이경섭

### ABSTRACT

#### Neuroprotective Effects of *Bunsimgieum*

Ro-Sa Kim, Chang-Hoon Lee, Jin-Moo Lee, Jung-Hoon Cho,  
Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee

Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, KyungHee University

**Purpose:** The depression accompanied with menopause shows the relation with the dopamine secretion. These studies were undertaken to evaluate the anti-oxidative and neuroprotective effects of *Bunsimgieum*(BSGE) on dopaminergic neurons.

**Methods:** To estimate the antioxidant effects, we carried out 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical cation decolorization assay, and measurement of total polyphenolic content. To evaluate neuroprotective effect of BSGE in vitro, We performed thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay, reactive oxygen species (ROS) creation in SH-SY5Y. Tyrosine hydroxylase (TH) immunocytochemistry, nitric oxide (NO) assay, and TNF- $\alpha$  assay in primary rat mesencephalic dopaminergic neurons.

**Results:** The DPPH free radical and the ABTS radical cation inhibition activities were increased at a dose dependent manner. Total polyphenolic content was 0.83%. In SH-SY5Y culture, BSGE significantly increased the decreased cell viability by 6-OHDA at the concentrations of 10 $\mu$ g/ml in pre-treatment group, 0.1-200 $\mu$ g/ml in post-treatment group. The production of ROS induced by 6-OHDA was significantly inhibited in BSGE treated group. In mesencephalic dopaminergic cell culture, the BSGE group reduced the dopaminergic cell loss against 6-OHDA toxicity and the production of No and TNF- $\alpha$  at the concentration of 5 $\mu$ g/ml.

**Conclusion:** These results shows that BSGE has antioxidant and neuroprotective effects in the dopaminergic cells through decreasing the production of ROS, NO and TNF- $\alpha$  which can cause many neurodegenerative changes in brain cell. We suggest that BSGE could be useful for the treatment of postmenopausal depression related with the decrease of dopamine.

**Key Words:** *Bunsimgieum*, Antioxidant effects, Neuroprotective effect, Herbs, Dopaminergic neurons

## I. 緒 論

한국 여성 평균 수명은 82.36세<sup>1)</sup>, 폐경 연령은 49.2세<sup>2)</sup>로 인생의 30%이상을 폐경 상태로 지내게 되었다. 폐경 전후로 안면 홍조, 야간 발한, 불규칙한 생리, 질 건조감, 우울증, 두통, 수면 장애, 무기력, 집중력 저하, 기억력 감퇴 등 다양한 증상을 경험하게 된다<sup>3)</sup>.

이들 증상에 대하여 hormone replacement therapy (HRT)가 보편적으로 처방되어 왔고, 일부 항우울제들이 혈관 운동 증상을 포함한 갱년기 증상들을 경감시킨다고 보고되어<sup>4-6)</sup> 항우울제도 사용되고 있다<sup>6,7)</sup>. 그러나 HRT의 위험성에 대한 보고<sup>8)</sup> 이후 이를 대체할 치료법에 대한 필요성이 대두되었다.

갱년기 장애는 腎氣衰退와 肝氣鬱結에 기인하는데<sup>9)</sup> 瘧병의 병리 기전<sup>10)</sup>과 유사하므로 40-50대에 심화되거나 발현되어 폐경 전기 여성에 비해 우울증 발생에 취약하며, 혈관 운동성 장애를 나타낸 사람에게서 우울증 발생 위험이 커진다<sup>6,11)</sup>는 점에서 유사하다고 볼 수 있다.

分心氣飲은 太平惠民和劑局方에 처음記載된 處方으로 男子와 婦人의 一切氣不和를 치료하는 처방이다<sup>12)</sup>.

分心氣飲의 항암 작용 및 면역 기능증강<sup>13)</sup>, 고혈압에서 심박수 감소 및 동맥 내피세포 보호 효과<sup>14)</sup>, 우울<sup>15)</sup>, 스트레스<sup>16,17)</sup>, 수면 장애와 정서 및 불안<sup>18,19)</sup> 등과 같은 정신적 증상에 대한 보고는 있으나, 우울증과 관련된 도파민 분비 뇌신경 세포 보호 효과에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

이에 저자는 分心氣飲의 항산화 효과와 SH-SY5Y human neuroblastoma cell

및 태아 중뇌 세포에서 6-OHDA로부터 유도된 도파민 세포 독성에 대한 보호 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 藥材와 試藥

#### 1) 藥 材

실험에서 사용한 處方은 경희대학교 한의과대학 부속한방병원의 慶熙韓方處方集에 收載된 分心氣飲 (HK086)<sup>20)</sup>을 따랐으며, 각 약재들은 경희대학교 한의과대학 부속한방병원 약제과에서 구입하여 사용하였고, 약재의 구성과 1貼의 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of *Bunsimgieum*

Herbs	Pharmaceutical Name	Amount (g)
桂 枝	Cinnamomi Ramulus	6
白芍藥	Paeoniae Radix	4
木 通	Akebiae Caulis	4
半 夏 (薑 製)	Pinelliae Rhizoma	4
青 皮	Citrii Unshiu Immaturi Pericarpium	4
陳 皮	Citrii Unshiu Pericarpium	4
白茯苓	Hoelen	4
羌 活	Angelicae Koreanae Radix	4
桑白皮	Mori Cortex	4
燈心草	Junci Herb	3
大腹皮	Arecae Pericarpium	3
蘇 葉	Perillae Folium	3
甘 草	Glycyrrhizae Radix	3
生 薑	Zingiberis Rhizoma	3
大 棗	Zizyphi inermis Fructus	3
Total		56

## 2) 試 藥

항산화 효과 연구에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (이하 DPPH), 2,2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (이하 ABTS), potassium persulfate, tannic acid, folin 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Neuroblastoma cell 보호 효과 연구에 사용한 Dulbeco's Modified Eagle's Medium (이하 DMEM), minimum essential medium (MEM), fetal bovine serum (이하 FBS), 1% penicillin/streptomycin 등은 Gibco Industries Inc. (Auckland, New Zealand)에서, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (이하 MTT), 6-hydroxydopamine (이하 6-OHDA), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA), dimethyl sulfoxide (이하 DMSO) 및 Griess reagent 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하였다.

Primary culture에 사용한 para-formaldehyde (이하 PFA), poly-L-lysine (이하 PLL) 및 diaminobenzidine (이하 DAB) 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서, biotinylated anti-rabbit antibody, normal goat serum, avidin biotin peroxidase complex (이하 ABC) standard kit 등은 Vector laboratories (Burlingame, USA)에서, rat tumor necrosis factor- $\alpha$  (이하 TNF- $\alpha$ ) ELISA kit는 Invitrogen Corp. (Carlsbad, USA)에서, tyrosine hydroxylase (이하 TH)-rabbit in goat primary antibody는 Chemicon International Inc. (Temecula, USA)에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 方 法

## 1) 抽出物 製造

分心氣飲 한 찻(56g)에 증류수 560ml를 가해 100°C, 2시간 환류추출 후 Whatman filter paper #2를 이용해 여과하였다. 여과액을 55°C에서 감압농축 (R-200; Buchi Flawil, Switzerland)하여 얻은 시료를 -60°C에서 동결건조 (FDU-550R; Eyela Co., Tokyo, Japan)하여 分心氣飲 抽出物 (이하 BSGE) 20.37g (수득율 36.37%)을 얻었으며, -20°C에서 보관하여 매 실험 시 일정 용매에 녹인 후 사용하였다.

## 2) 항산화 작용

## (1) DPPH free radical 소거 작용 측정

DPPH free radical 소거능 측정을 위해 0.2mM DPPH ethanolic solution 100  $\mu$ l에 농도별 BSGE (1, 10, 100, 500 및 1,000  $\mu$ g/ml)를 100  $\mu$ l씩 가하였다. 반응 30분 후 37°C에서 spectrophotometer (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였으며, DPPH free radical 소거능은 아래와 같이 계산하였다. control은 0분일 때의 값으로 하였다.

$$DPPH \text{ free radical 소거능 (\%)} \\ = \frac{\text{control OD} - \text{sample OD}}{\text{control OD}} \times 100$$

## (2) ABTS radical cation 소거 작용 측정

ABTS radical cation 소거능 측정을 위해 7mM ABTS와 2.45mM potassium persulfate를 혼합하여 상온 암실에서 24시간 반응시켰다. ABTS와 potassium persulfate 혼합액을 phosphate buffer saline (PBS pH 7.4)로 희석하여 732nm에서 흡광도 값이 0.70 $\pm$ 0.02가 되게 하였다. 희석 용액 950  $\mu$ l에 1, 10, 100, 500 및 1,000  $\mu$ g/ml의 BSGE를 50  $\mu$ l씩 가하여 5분간 상온에서 반응시킨 후 spectrophotometer

로 732nm에서 흡광도를 측정하였으며, ABTS radical cation 소거능은 아래와 같이 계산하였다.

$$ABTS \text{ radical cation 소거능 (\%)} = \frac{\text{control OD} - \text{sample OD}}{\text{control OD}} \times 100$$

(3) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정을 위해 BSGE 10mg/ml를 증류수로 희석한 후, 2N folin 200 $\mu$ l와 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2ml를 첨가하여 실온 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. spectrophotometer로 725nm에서 흡광도를 측정하였으며, 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 함량을 구하였다.

3) SH-SY5Y 세포에 대한 보호 효과

(1) 세포 배양

American Type Culture Collection (Rockville, USA)로부터 human neuroblastoma cell인 SH-SY5Y를 분양받아, 60mm dish에서 10% (v/v) FBS, 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 DMEM으로 37°C와 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

(2) Cell viability 측정

96 well plate에 2.5×10<sup>4</sup> /well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 48시간 배양 후, 농도별 BSGE (0.1, 1, 10, 50, 100 및 200 $\mu$ g/ml) 100 $\mu$ l를 PBS에 녹여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 1mg/ml를 처리하여 3시간 배양 후, DMSO로 생성된 formazan을 녹여 15분간 shaking하고, spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. cell viability를 무처리 control group에 대한 백분율로 표시하였다.

(3) 6-OHDA에 대한 SH-SY5Y cell viability 측정

96 well plate에 2.5×10<sup>4</sup> /well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 48시간 배양 후, 농도별 BSGE (0.1, 1, 10, 50, 100 및 200 $\mu$ g/ml) 100 $\mu$ l와 6-OHDA를 처리하였다. 이 때 pre-treatment군은 농도별 BSGE를 21시간 처리 후 6-OHDA 200 $\mu$ M을 가하여 3시간 처리하였고, co-treatment군은 농도별 BSGE와 6-OHDA 150 $\mu$ M을 동시에 24시간 배양하였으며, post-treatment군은 먼저 6-OHDA 150 $\mu$ M을 3시간 처리 후 농도별 BSGE를 21시간 처리하였다. 그 후 MTT 0.5mg/ml로 100 $\mu$ l씩 처리하여 3시간 배양 후, 생성된 formazan을 DMSO로 녹여 15분간 shaking하였다. Spectrophotometer를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였으며, cell viability를 무처리 control group에 대한 백분율로 표시하였다.

(4) 6-OHDA에 의한 ROS 생성 측정

ROS는 H<sub>2</sub> DCF-DA를 사용해 fluorescence를 측정하였다. 96 well plate에 2.5×10<sup>4</sup>/well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 48시간 배양 후, 0.1, 1 및 10 $\mu$ g/ml 농도의 BSGE 100 $\mu$ l을 각각 6시간 처리하였다. PBS로 세척 후, 10 $\mu$ M H<sub>2</sub> DCF-DA 100 $\mu$ l를 넣어 30분 배양하였다. PBS로 세척 후, 200 $\mu$ M의 6-OHDA를 처리하여 15분, 30분 및 60분에서 fluorescence excitation 495nm, emission 530nm로 측정하였다.

4) Primary culture에서 6-OHDA에 대한 세포 보호 효과

(1) 태아 중뇌 세포 배양 및 약물 처리

Orient Bio. (Osan, Korea)에서 14일 된 Sprague-Dawley 태아를 구매하여 forceps으로 태아 중뇌 조직을 얼음 위에서 박리하고 10% FBS를 포함한 MEM

에 모은 후, pipet을 이용하여 기계적으로 dissociation하였다. 조직에 trypsin을 처리하여 세포 수를 counting한 후, PLL로 미리 coating한 coverslip에  $1.5 \times 10^5$ 의 조직을 seeding한 다음, 37°C 배양기에서 5일간 배양하였다. FBS가 없는 MEM에서 태아 중뇌 세포에 0.2, 1 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 BSGE를 가하고 6시간 배양 후 10 $\mu\text{M}$ 의 6-OHDA를 처리하였다. 18시간 후 4% PFA로 고정된 다음 pH 7.2의 PBS로 세척하였다.

#### (2) TH-positive 세포 수 측정

세척된 태아 중뇌 세포를 1% bovin serum albumin과 normal goat serum으로 blocking한 후, 0.1% Triton X-100과 normal goat serum을 포함하는 PBS로 primary antibody (1:2,000 rabbit anti rat TH)를 희석하여 세포와 상온에서 반응시켰다. 일정 시간이 지난 뒤 PBS로 세척한 후 secondary antibody인 biotinylated anti rabbit IgG (H+L)을 반응시키고, PBS 세척을 거쳐 ABC solution에서 90분간 반응시킨 후 DAB에 5분간 발색시켰다. Gelatin-coated slide에 조직을 mounting 후 에탄올을 이용해 탈수시킨 뒤 histomount용액을 이용해 coverslide를 덮어 보관하였다. 무작위로 4개의 조직을 선택하여 각 조직 당 9구역에서 현미경 (Axioskop 2; Carl Zeiss Inc., Göttingen, Germany)를 이용하여 세포 수를 계측 (100X) 후, 무처리 control group에 대한 백분율로 표시하였다.

#### (3) NO 생성 측정

태아 중뇌 세포에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 BSGE 및 10 $\mu\text{M}$ 의 6-OHDA를 처리하여 20시간 배양한 다음, 배양액 100 $\mu\text{l}$ 을 회

수하여 Griess reagent 100 $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 상온 암실에서 10분간 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, sodium nitrite를 이용해 표준 곡선을 그려 NO 농도를 결정하였다.

#### (4) TNF- $\alpha$ 생성 측정

태아 중뇌 세포에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 BSGE 및 10 $\mu\text{M}$ 의 6-OHDA를 처리하여 20시간 배양 후, 배양액 50 $\mu\text{l}$ 을 incubation buffer 50 $\mu\text{l}$ 와 diluent buffer가 포함된 human TNF- $\alpha$  항체코팅 96 well plate에 가하였다. 추가로 rat TNF- $\alpha$  biotin conjugate 50 $\mu\text{l}$ 를 가하여 상온에서 1시간 진탕배양 후 세척액으로 4회 세척하고, thymol을 포함한 streptavidin peroxidase 희석액 100 $\mu\text{l}$ 를 가하여 상온에서 45분 진탕배양 후 세척액으로 4회 세척하였다. 이 후 TMB substrate 용액 100 $\mu\text{l}$ 를 가해 암실에서 30분간 진탕배양 후 stop solution 100 $\mu\text{l}$ 를 가해 반응을 종결시켰다. ELISA reader로 450nm 파장에서 0pg/ml ~ 1,000pg/ml의 TNF- $\alpha$  standard를 이용한 standard curve에 측정된 흡광도를 대입하여 TNF- $\alpha$ 의 농도(pg/ml)를 구하였다.

### 3. 통계처리

결과 data는 Mean $\pm$ S.E.M.으로 표시하였고 유의성 평가는 SPSS 12.0K for windows (SPSS Inc., USA) 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA 방법을 실시하였다. 후 검정은 LSD를 실시하였으며 평균값의 유의성을 5% 미만의 한계로 조사하였다.

### III. 結 果

#### 1. 항산화 작용에 미치는 영향

1) DPPH free radical 소거 효과

DPPH free radical 소거능을 측정한 결과, 1 $\mu$ g/ml에서는 11.11%, 500 $\mu$ g/ml에서는 70.24%, 1000 $\mu$ g/ml에서는 89.22%로 농도에 비례하여 소거능이 증가하였다 (Fig. 1).

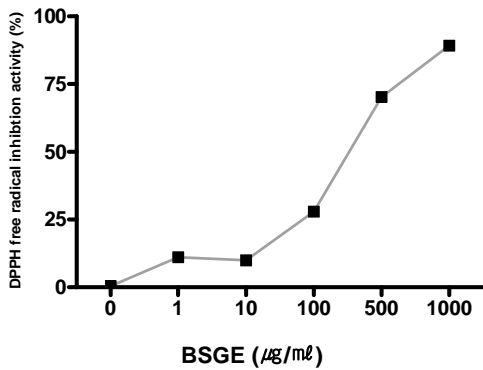


Fig. 1. Effect of BSGE on the generation of DPPH free radical

2) ABTS radical cation 소거 효과

BSGE의 항산화 효과를 알아보기 위하여 ABTS radical cation 소거능을 측정한 결과, 1 $\mu$ g/ml 농도에서는 25.38%, 500 $\mu$ g/ml 농도에서는 93.67%, 1000 $\mu$ g/ml 농도에서는 94.12%로 농도 의존적으로 소거능이 증가하였다(Fig. 2).

3) 총 폴리페놀 함량 측정

BSGE 10mg/ml에 들어있는 총 폴리페놀의 함량은 0.83%였다.

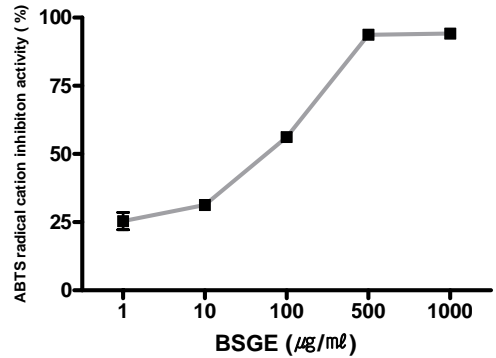


Fig. 2. Effect of BSGE on the generation of ABTS radical cation

#### 2. SH-SY5Y 세포에 미치는 영향

1) Cell viability

SH-SY5Y 세포 보호 효과를 알아보기 위해 0.1, 1, 10, 50, 100 및 200 $\mu$ g/ml 농도의 BSGE 처리 후 측정한 결과, control group의 cell viability 100%를 기준으로 0.1 $\mu$ g/ml에서 95.88%, 50 $\mu$ g/ml에서 92.05% 및 200 $\mu$ g/ml에서 83.40%로 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

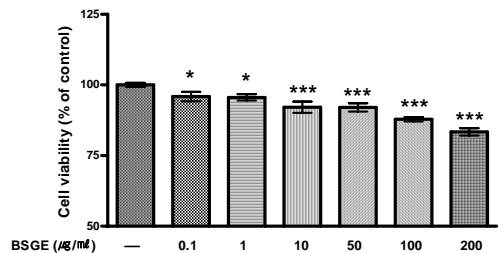


Fig. 3. Cell viability of BSGE treatment only.

\*:  $p < 0.05$ , and \*\*\*:  $p < 0.001$  indicate significant differences from the group treated with 6-OHDA only

2) 6-OHDA에 대한 cell viability

6-OHDA에 대한 SH-SY5Y 세포보호 효과를 농도별 BSGE 처리 후 측정한 결과, pre-treatment군의 cell viability는 6-OHDA만 처리시 66.91%였고, 10 $\mu$ g/ml

이하의 BSGE에서 증가된 cell viability를 나타내었으나 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서만 유의하게( $p < 0.01$ ) 증가하였다. Co-treatment군의 cell viability는 6-OHDA만 처리했을 때 46.58%였고, BSGE의 농도에 따라 유의한 변화는 없었다. Post-treatment군의 cell viability는 6-OHDA만 처리했을 때 45.40%였고, 모든 농도의 BSGE에서 유의한 ( $p < 0.001$ , 단 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는  $p < 0.01$ ) cell viability 증가를 나타내었다(Fig. 4).

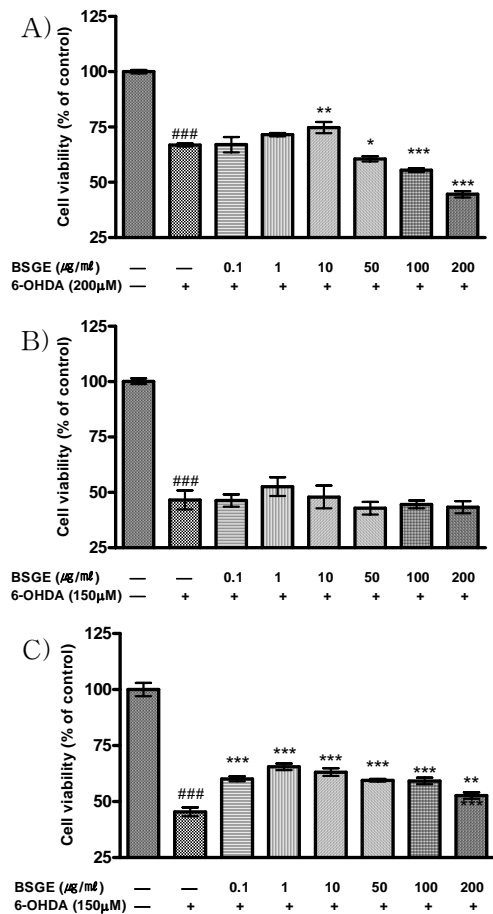


Fig. 4. Effect of BSGE on the viability of 6-OHDA treated SH-SY5Y cells (A) Cell viability of BSGE pre-treatment (B) Cell viability of BSGE co-treatment

(C) Cell viability of BSGE post-treatment. ###:  $p < 0.001$  indicate significant differences from the control group. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\*:  $p < 0.001$  indicate significant differences from the group treated with 6-OHDA only.

3) 6-OHDA에 대한 ROS 억제 효과  
BSGE의 6-OHDA에 의한 ROS 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.1, 1 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 BSGE를 pre-treatment하고, 6-OHDA를 처리하여 0분, 15분, 30분 및 60분 후 ROS생성을 측정된 결과, 6-OHDA만 처리한 경우 30분, 60분 후 control group에 비해 유의하게 ( $p < 0.001$ ) ROS생성이 증가하였으며, 농도별 BSGE를 pre-treatment하고 6-OHDA를 투여하였을 때 30분, 60분에서 6-OHDA만 처리하였을 때에 비해 ROS생성이 억제되었다(Fig. 5).

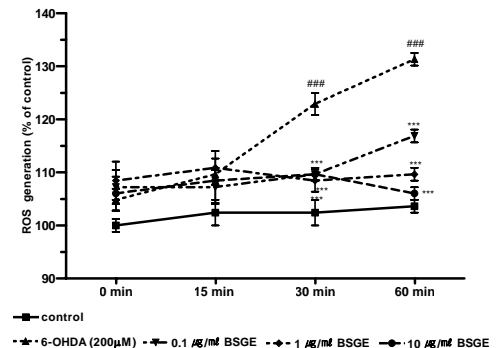


Fig. 5. Inhibitory effect of BSGE on ROS production in 6-OHDA induced SH-SY5Y cells. ###:  $p < 0.001$  indicate significant differences from the control group. \*\*\*:  $p < 0.001$  indicate significant differences from the group treated with 6-OHDA only.

### 3. 태아 중뇌 도파민 세포에 미치는 영향

#### 1) TH-positive 세포 수

태아 중뇌 세포를 이용하여 BSGE의

6-OHDA에 대한 세포 보호 효과를 관찰한 결과, 6-OHDA만 투여 시 37.63%에 비하여 0.2, 1 $\mu$ g/ml BSGE에서 39.07%, 47.85%(p<0.01), 5 $\mu$ g/ml BSGE에서 65.23%(p<0.001)로 농도 의존적으로 cell viability가 증가되었다(Fig. 6, 7).



control

Fig. 6. Neuroprotective effect of BSGE in mesencephalic dopaminergic neurons against damage induced by 6-OHDA. ###: p<0.001 indicate significant differences from the control group. \*\*: p<0.01 and \*\*\*: p<0.001 indicate significant differences from the group treated with 6-OHDA only.

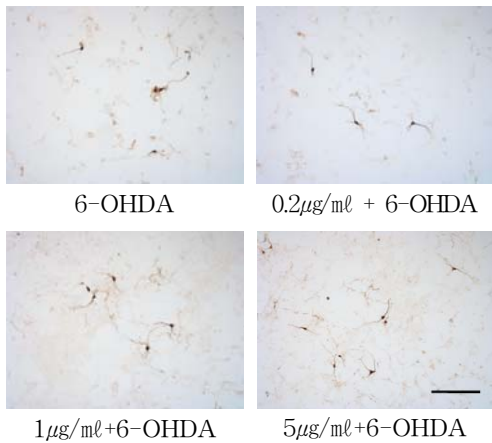


Fig. 7. Morphological evidence of the protective effect of BSGE against 6-OHDA induced damage to dopaminergic neurons in mesencephalic neuron cultures. (X400) Scale bar 250 $\mu$ m.

### 2) NO 생성 억제 효과

태아 중뇌 세포에 BSGE와 6-OHDA

를 처리 후 배양액 내 NO의 농도를 관찰한 결과, 6-OHDA만 투여 시 171.30%에 비하여 5 $\mu$ g/ml BSGE에서 117.83%로 유의하게 (p<0.05) NO가 감소하였으며, 1 $\mu$ g/ml BSGE에서는 감소하였으나 유의한 차이는 없었다(Fig. 8).

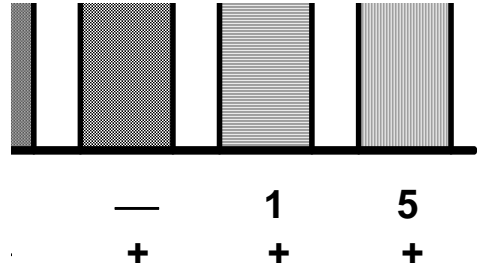


Fig. 8. Inhibitory effect of BSGE on the NO production in 6-OHDA induced SH-SY5Y cells. ###: p<0.001 indicate significant differences from the control group. \*: p<0.05, indicate significant differences from the group treated with 6-OHDA only.

### 3) TNF- $\alpha$ 생성 억제 효과

태아 중뇌 세포에 BSGE와 6-OHDA를 처리한 후 배양액 내 TNF- $\alpha$ 의 농도를 관찰한 결과, 6-OHDA만 투여 시 5.01pg/ml에 비하여 5 $\mu$ g/ml BSGE에서 2.74pg/ml로 유의하게 (p<0.05) TNF- $\alpha$ 가 감소되었으며, 1 $\mu$ g/ml BSGE에서는 감소하였으나 유의한 차이는 없었다(Fig. 9).



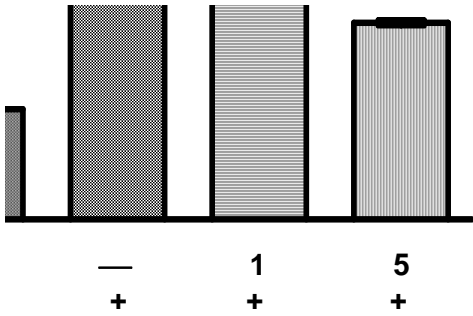


Fig. 9. Inhibitory effect of BSGE on TNF- $\alpha$  in 6-OHDA induced SH-SY5Y cells.

###:  $p < 0.001$  indicate significant differences from the control group. \*:  $p < 0.05$ , indicate significant differences from the group treated with 6-OHDA only.

#### IV. 考 察

폐경 전후 여성들은 다양한 증상을 경험하게 된다<sup>3)</sup>. 이는 에스트로젠이 혈관 운동 증상을 조절하는 역할을 넘어 다양한 방법으로 신경계에 영향을 미치기 때문이다<sup>21)</sup>. 특히 뇌는 에스트로젠과 모노아민 시스템의 영향을 받기 쉽다<sup>6)</sup>. 에스트로젠은 세로토닌, 노르아드레날린, 도파민의 합성, 방출, 대사에 영향을 주어 우울증의 발생 및 치료에 관계하며<sup>11)</sup>, 퇴행성 신경 질환에서 신경 보호 효과<sup>21)</sup>, 산화적 스트레스에 의해 유발된 세포 사멸로부터 중뇌의 도파민 뉴런 보호 효과<sup>22)</sup> 등을 통해 뇌기능을 개선시킨다<sup>21)</sup>고 보고되고 있다.

폐경기의 제반 증상에 hormone replacement therapy (HRT)가 보편적으로 처방되어 왔다. 또한 일부 항우울제들이 혈관 운동 증상을 포함한 갱년기 증상들을 경감시킨다고 보고되어<sup>4-6)</sup> 항우울제도 사용되고 있다<sup>6,7)</sup>. 그러나 HRT의 위험성에

대한 보고<sup>8)</sup> 이후 이를 대체할 치료법에 대한 필요성이 대두되었다.

도파민 세포의 90%정도가 위치하고 있는 mesencephalon의 도파민 시스템에는 nigrostriatal system, mesolimbic system, mesocortical system이 있다<sup>23)</sup>. 도파민을 방출이 안되면 동기 유발의 결여와 쾌락 상실로 우울증이 발생하게 되는데<sup>24)</sup>, nigrostriatal system의 신경 세포 퇴행 환자의 45%정도에서도 운동 이상과 같이 우울증이 발생하며<sup>25,26)</sup>, nigrostriatal system의 신경 세포 퇴행 치료제로 dopamine agonist인 pramipexole과 ropinirole은 항우울 효과도 보고되었다<sup>25)</sup>. 따라서 도파민 세포의 보호가 우울증상에 도움이 될 것으로 보인다.

『東醫寶鑑』<sup>27)</sup>에 “... 女子는 陰이니 氣를 만나면 대부분 鬱滯가 된다. 그래서 일반적으로 男子는 氣病이 적고 女子는 氣病이 많다.”고 하여 여자는 氣의 鬱滯가 문제가 되어 病이 발생한다고 하였다. 특히 정신적 문제를 포함하는 갱년기 장애는 腎氣의 衰退와 肝氣鬱結에 기인하는데<sup>9)</sup> 瘧疾의 병리 기전<sup>10)</sup>과 유사하므로 40-50대에 심화되거나 발현된다. 이는 폐경 주위기에 폐경 전기 여성에 비해 우울증 발생에 취약하며, 혈관 운동성 장애를 나타낸 사람에게서 우울증 발생 위험이 더 커진다<sup>6,11)</sup>는 점에서 유사하다고 볼 수 있다.

分心氣飲은 太平惠民和劑局方에 처음記載된 處方으로 男子와 婦人의 一切氣不和를 치료하는데, 憂愁, 思慮, 怒氣로 인하여 神을 傷하고 抑鬱한 氣가 留滯不散하며, 胸膈之間에 멈추어 流暢하지 못하여 나타나는 증상을 治한다<sup>12)</sup>고 하였다. 연구에 사용된 分心氣飲은 흥부에

上衝하는 氣를 내리기 위해 桂枝<sup>28)</sup>를 2g  
加하여 君藥으로 사용하였다.

정신 증상과 관련된 分心氣飲 연구<sup>15-19)</sup>가 많으나 도파민 분비 뇌신경세포 보호 효과에 대한 연구는 없었다. 이에 저자는 分心氣飲의 항산화 효과 및 human neuroblastoma cell 및 태아 중뇌 세포에서 6-OHDA로부터 유도된 세포 독성에 대한 보호 효과를 알아보았다.

BSGE의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH free radical 소거능, ABTS radical cation 소거능을 측정된 결과 농도 의존적으로 증가하였고, BSGE 10mg/ml의 총 폴리페놀 함량은 0.83%로 BSGE이 free radicals를 제거하여 산화적 세포손상을 억제할 수 있었다.

BSGE의 SH-SY5Y 세포에서 6-OHDA에 대한 보호 효과를 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였다. 6-OHDA는 세포내 ROS를 생성하여 산화적 스트레스 상태를 만들고<sup>29)</sup>, 도파민 세포의 자가 산화를 자극하여 신경 생존에 중요한 역할을 하는 세포 분자들의 변성을 일으켜 세포를 퇴행시키는 신경 독성물질로 많이 사용되고 있다<sup>29,30)</sup>. MTT assay는 MTT 물질이 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 succinate dehydrogenase와 반응하여 보라색으로 변하게 되어 cell viability를 측정하는 방법이다<sup>31)</sup>.

SH-SY5Y 세포에 농도별 BSGE 단독 처리 시 농도비례로 cell viability가 감소하였다. SH-SY5Y 세포에 농도별 BSGE와 6-OHDA를 함께 투여 시 pre-treatment 중 10 $\mu$ g/ml 농도, post-treatment에서는 모든 농도에서 cell viability를 증가시켜 세포 보호 효과를 확인할 수 있었다.

6-OHDA와 BSGE 처리 시기에 관계

없이 SH-SY5Y 세포 보호 효과가 있는 0.1, 1 및 10 $\mu$ g/ml농도의 BSGE를 이용하여 6-OHDA에 의해 발생하는 ROS생성을 측정하였다. NOS (reactive nitrogen species)와 함께 세포가 산화적 스트레스 상태가 되면 증가하는 ROS는 생성 정도에 따라 세포의 산화적 손상 정도를 확인할 수 있는데<sup>32)</sup>, 0.1, 1 및 10 $\mu$ g/ml농도의 BSGE가 SH-SY5Y 세포에서 6-OHDA에 대한 ROS생성을 시간 경과에 따라 유의하게 억제하였다. 이는 6-OHDA에 의해 발생하는 산화적 스트레스를 BSGE가 억제하여 SH-SY5Y 세포 보호 효과가 있는 것으로 보인다.

SH-SY5Y 세포에서 6-OHDA에 대한 ROS생성을 억제한 10 $\mu$ g/ml이하의 BSGE를 이용하여 primary culture를 시행하였다. TH-positive cell 측정은 도파민 세포 생성에 관여하는 TH를 염색함으로써 생존해 있는 도파민성 세포를 확인할 수 있다<sup>33)</sup>. Sprague-Dawley 14일 태아 중뇌로부터 얻은 세포에 6-OHDA만 반응시켰을 때 TH-positive 세포 수가 유의하게 감소하였고, BSGE를 처리한 후 6-OHDA를 반응시켰을 때 농도비례로 TH-positive 세포 수가 유의하게 증가되었다.

NO는 중요한 생리 기능을 조절할 뿐 아니라 superoxide이온과 반응하여 peroxynitrite radical을 형성하는 등 신경독성을 유발하며 염증 매개 물질로 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>34,35)</sup>. 도파민 세포에 6-OHDA만 반응시켰을 때 NO생성이 증가되었다. BSGE를 처리한 후 6-OHDA를 반응시켰을 때 농도에 비례하여 NO생성이 억제되었는데, 5 $\mu$ g/ml 농도에서만 유의하게 확인하였다. TNF- $\alpha$ 는 염증 과정과

세포의 apoptosis를 조절하는 중요한 요소인데<sup>33)</sup>, BSGE는 5 $\mu$ g/ml에서 6-OHDA에 의한 TNF- $\alpha$ 생성을 억제하여 항염증 효과가 있음이 확인되었다.

이와 같이 갱년기 鬱火를 치료하는 BSGE가 항산화작용으로 도파민 세포보호 효과를 보였으며, 이를 통해 갱년기 여성의 신체적, 감정적, 인지적 증상의 치료 및 관리에 HRT를 대체할 약물 후보가 될 수 있을 것으로 기대된다.

## V. 結 論

BSGE의 항산화 효과 및 SH-SY5Y human neuroblastoma cell 및 태아중뇌 도파민 세포에서 6-OHDA로부터 유도된 세포 독성에 대한 보호 효과 연구에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. BSGE의 DPPH free radical 소거능과 ABTS radical cation 소거능을 측정한 결과 농도 의존적으로 증가하였고, 총 폴리페놀 함량은 0.83%였다.
2. SH-SY5Y 세포에 농도별 BSGE를 처리한 결과 cell viability가 control group에 비하여 유의하게 감소하였다.
3. SH-SY5Y 세포에 농도별 BSGE와 6-OHDA를 처리 하고 pre-treatment, co-treatment 및 post-treatment로 나누어 관찰한 결과, pre-treatment는 10  $\mu$ g/ml농도, post-treatment는 모든 농도에서 유의하게 cell viability가 증가되었다.
4. SH-SY5Y 세포에 BSGE를 pre-treatment 하고 6-OHDA를 처리하여 ROS 생성 반응을 관찰한 결과, 모든 농도에서

유의하게 시간 경과에 따라 억제되었다.

5. 태아 중뇌 세포에서 6-OHDA에 의해 감소된 도파민 세포는 1 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml 농도의 BSGE에서 유의하게 증가되었다.
6. 태아 중뇌 세포에서 6-OHDA에 의해 증가된 NO생성은 5 $\mu$ g/ml농도의 BSGE에서 유의하게 억제되었다.
7. 태아 중뇌 세포에서 6-OHDA에 의해 증가된 TNF- $\alpha$ 는 5 $\mu$ g/ml농도의 BSGE에서 유의하게 억제되었다.

- 투 고 일 : 2009년 4월 23일
- 심 사 일 : 2009년 4월 29일
- 심사완료일 : 2009년 5월 10일

## 參 考 文 獻

1. KOSIS국가 통계 포털. 2006년 생명표. 디지털 간행물 통계로 보는 여성의 삶. 2008. <http://www.kosis.kr/search/totalSearch2.jsp>
2. 박영주 등. 한국 여성의 폐경 연령, 갱년기 증상 관련 요인. 여성건강간호학회지. 2001;7(4):473-485.
3. Avis NE, Brockwell S, Colvin A. A Universal menopausal syndrome? Am J Med. 2005;18(12):37-46 .
4. Soares CN et al.. Escitalopram versus ethinyl estradiol and norethindrone acetate for symptomatic peri-and postmenopausal women:impact on depression, vasomotor symptoms, sleep, and quality of life. Menopause. 2006

- ;13(5):780-786.
- Joffe H et al. Treatment of depression and menopause-related symptoms with the serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor duloxetine. *J Clin Psychiatry*. 2007;68(6):943-950.
  - Dennerstein L, Soares CN. The unique challenges of managing depression in mid-life women. *World psychiatry*. 2008;7(3):137-142.
  - McIntyre RS et al. Hormone replacement therapy and antidepressant prescription patterns: a reciprocal relationship. *CMAJ*. 2005;172(1):57-59.
  - Rossouw JE et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-333.
  - 方讜妍, 金知赫, 黃義完. 스트레스와 갱년기 장애에 관한 문헌적 고찰. *동의신경정신과학회지*. 1992;3(2):143-159.
  - 김종우, 황의완. 한의학에서 본 황병의 해석. *동의신경정신과학회지*. 1994;5(1):9-15.
  - Wise DD, Felker A, Stahl SM. Tailoring Treatment of Depression for Women Across the Reproductive Lifecycle: The importance of Pregnancy, Vasomotor Symptom, and Other Estrogen-Related Events in Psychopharmacology. *CNS Spectr*. 2008;13(8):647-655,658-662.
  - 劉景源 點校. 太平惠民和劑局方. 北京:人民衛生出版社. 1985:1114.
  - 여대원 등. 分心氣飲의 항암 작용 및 면역 기능에 관한 연구. *대한한방내과학회지*. 2003;24(2):315-328.
  - 전연이 등. 分心氣飲이 고혈압 백서와 인간 유래 혈관내피세포주(ECV304)에 미치는 영향에 대한 연구. *대한한방내과학회지*. 2005;26(1):182-198.
  - 이승기 등. 分心氣飲의 우울증 모델 흰쥐에 대한 실험적 연구. *대한한의학회지*. 2001;22(3):129-140.
  - 김지옥 등. 分心氣飲의 항스트레스 효과에 관한 실험적 연구. *대한한의학회지*. 1989;10(1):42-52.
  - 지선영, 정대규. 分心氣飲 투여에 따른 Stress 관련 Hormone의 함량 변화에 관한 실험적 고찰. *동의신경정신과학회지*. 1992;3(2):49-63.
  - 허용석 등. 分心氣飲加味方이 수면 장애와 정서성에 미치는 영향. *동의신경정신과학회지*. 2000;11(2):43-52.
  - 김경옥 등. 分心氣飲加味方이 흰쥐의 수면 장애와 불안에 미치는 영향. *동의신경정신과학회지*. 2000;11(2):53-62.
  - 경희대학교한외과대학, 慶熙韓方處方集. 서울:경희대학교 한외과대학 부속한방병원. 1997:84.
  - Markou A, Duka T, Prelevic GM. Estrogens and brain function. *Hormones*. 2005;4(1):9-17.
  - Sawada H S et al. Estradiol Protects Mesencephalic Dopaminergic Neurons From Oxidative Stress-Induced neuronal Death. *J Neurosci Res*. 1998;54:707-719.
  - Chinta SJ, Andersen JK. Dopaminergic neurons. *IJBCB*. 2005;37:942-946.
  - Zangen A et al. Association between depressive behavior and absence of serotonin-dopamine interaction in

- the nucleus accumbens. *Psychopharmacology*. 2001;155:434-439.
25. Lemke MR et al. Depression and Parkinson's disease. *J Neurol*. 2004 ;9(6):24-27.
26. Fahn S, Sulzer D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson Disease. *NeuroRx*. 2004;1(1):139-154.
27. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:東醫寶鑑出版社. 2005:79.
28. 吉益東洞. 藥徵. 서울: 청충. 2006: 216-217.
29. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39(6):889-909.
30. Singh S et al. Neuroprotection of the nigrostriatal dopaminergic neurons by melatonin in hemiparkinsonium rat. *Indian J Med Res*. 2006;124(4) :419-426.
31. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2) :474-482.
32. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3(28):1-21.
33. Baker H, Joh TH, Reis DJ. Genetic control of number of midbrain dopaminergic neurons in inbred strains of mice: Relationship to size and neuronal density of the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(7) :4369-4373.
34. Wilms H et al. Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Curr Pharm Des*. 2007;13:1925-1928.
35. Dehmer T et al. Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. *J Neurochem*. 2000;74(5):2213-2216.
-