

## 加味逍遙散의 抗酸化 效果 및 神經細胞 保護效果

경희대학교 한의과대학 한방부인과 교실  
이성한, 이진무, 조정훈, 이창훈, 장준복, 이경섭

### ABSTRACT

#### Antioxidant and Neuroprotective Effects of *Gamisoyo-san*

Seung-Han Lee, Jin-Moo Lee, Jung-Hoon Cho, Chang-Hoon Lee,  
Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee

Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

**Purpose:** These studies were undertaken to evaluate the anti-oxidative and neuroprotective effects of *Gamisoyo-san*(GMSYS).

**Materials and Methods:** We studied the antioxidant effects of GMSYS by assessing the DPPH free radical and the ABTS radical cation inhibition activities, the total polyphenolic contents(TPC). To evaluate the effects of GMSYS in the human neuroblastoma cells, we measured the cell viabilities in SH-SY5Y cells treated with GMSYS. Then we observed the protective effects of GMSYS against 6-OHDA induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. To confirm the neuroprotective effects of GMSYS in the primary culture of mesencephalic dopaminergic cells, we counted the TH-immunopositive cells and measured the NO and TNF- $\alpha$  after the treatment of GMSYS and 6-OHDA.

**Results:** The DPPH free radical and the ABTS radical cation inhibition activities were increased in a dose dependent manner and the IC<sub>50</sub> were 133.60 $\mu$ g/ml and 106.20 $\mu$ g/ml, respectively. The TPC was 0.78%. There were no differences between the various concentrations of GMSYS and the control in the cell viability of SH-SY5Y cells. The neuroprotective effects of GMSYS were shown in the co-treatment group at the low concentrations of 25 $\mu$ g/ml and the post-treatment group at all concentrations. After the treatment of GMSYS and 6-OHDA in the primary culture of dopaminergic cells, the TH-immunopositive cells were significantly increased in 0.2 $\mu$ g/ml of GMSYS than the 6-OHDA group. The NO and TNF- $\alpha$  were significantly decreased in 0.2 $\mu$ g/ml of GMSYS than the 6-OHDA group.

**Conclusions:** This study shows that GMSYS has the antioxidant and neuroprotective effects, especially in the mesencephalic dopaminergic cells. We suggest that GMSYS could be useful for the treatment of postmenopausal depression related with the degeneration of dopamine neuron.

**Key Words:** Herbmed, *Gamisoyo-san*, Antioxidants, Neuroprotective agents, Menopause

## I. 緒 論

월경주기에 따른 estrogen과 progesterone의 변화는 여성의 정신신경학적 발달에 중요한 역할을 담당하며, 뇌기능, 식욕 및 감정 등에 영향을 미친다<sup>1)</sup>. 이들 hormones의 현저한 변화가 나타나는 폐경기에는 다양한 증상들이 발현되나, 안면홍조와 질 건조감을 제외한 감정변화, 수면장애, 요실금, 기억력 감퇴 및 성기능 감소 등의 발생 원인은 정확히 알려져 있지 않다<sup>2)</sup>.

폐경기에 발생하는 우울증 역시 명확한 원인은 밝혀져 있지 않으나, 폐경기에 발생하는 hormones 변화가 관련될 것으로 추측된다<sup>3)</sup>. 특히 estrogen은 dopamine, serotonin 및 choline system에 의한 감정 변화에 주요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다<sup>4)</sup>.

갱년기 환자에게 대한 estrogen 치료가 putamen으로의 dopamine transporter를 증가시키고<sup>5,6)</sup> dopamine에 대한 반응도를 증가시킨다는 점 등으로 미루어 볼 때<sup>7)</sup>, 폐경기 여성에서의 dopamine 분비가 폐경기 우울증 조절의 한 기전일 것으로 추정된다.

加味逍遙散은 宋代《太平惠民和劑局方》<sup>8)</sup>의 逍遙散에 薛<sup>9)</sup>이 牧丹皮와 梔子를 加味한 處方으로, 肝鬱血虛를 化熱生血하는 逍遙散의 主治에 火鬱이 겸한 경우에 사용된다<sup>10)</sup>.

실험적으로도 逍遙散 및 그 加味方은 抗스트레스 효과<sup>11-13)</sup>가 보고된 바 있으며, 특히 뇌내 monoamines 함량에 대한 영향<sup>14,15)</sup>과 난소적출 후 항스트레스 효과<sup>16,17)</sup>가 보고되어, 폐경 시 호르몬 변화로 인한 우울과 관련된 dopamine에도 영

향을 미칠 수 있을 것으로 사료되나, 이에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

이에 저자는 加味逍遙散의 神經細胞 保護效果를 알아보고자, 加味逍遙散 추출물의 항산화 효과 및 human neuroblastoma cell과 태아 중뇌 도파민 세포에서 6-OHDA로 유도된 細胞毒性에 대한 保護效果를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 藥材와 材料

#### 1) 藥 材

실험에서 사용한 處方은 OO대학교 한의과대학 부속한방병원의 慶熙韓方處方集에 收載된 加味逍遙散(HK013)을 따랐으며, 각 약재들은 경희대학교 한의과대학 부속한방병원 약재과에서 구입하여 사용하였고, 약재의 구성과 1貼의 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of *Gamisoyosan*(加味逍遙散)

Herbs	Pharmaceutical name	Amount (g)
當 歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	6
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	6
白 朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	6
白茯苓	<i>Hoelen</i>	6
柴 胡	<i>Bupleuri Radix</i>	6
牧丹皮	<i>Moutan Cortex Radicis</i>	4
山梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	4
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3
乾 薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	2
薄 荷	<i>Menthae Herba</i>	2
Total amounts		45

## 2) 試料의 製造

加味逍遙散 1貼 분량(45g)에 증류수 450ml를 가하여 100℃에서 2시간 동안 환류추출한 후, Whatman filter paper #2로 여과하였다. 여과액을 55℃에서 감압 농축(R-200; Buchi, Flawil, Switzerland)하여 얻은 시료를 -60℃에서 동결건조(FDU-500R; Eyela Co., Tokyo, Japan)하여 加味逍遙散 抽出物 (이하 GMSYS) 4.57g (수득율 10.16%)을 얻었으며, -20℃에서 보관하여 매 실험 시 용매에 녹여 사용하였다.

## 3) 試 藥

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

Neuroblastoma cell 保護效果 연구에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium(이하 DMEM), minimum essential medium(MEM), fetal bovine serum(이하 FBS) 및 1% penicillin-streptomycin 등은 Gibco Industries Inc.(Auckland, New Zealand)에서, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(이하 MTT), 6-hydroxydopamine(이하 6-OHDA), dimethyl sulfoxide(이하 DMSO) 및 Griess reagent 등은 Sigma-Aldrich(St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

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 및 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) 抗酸化 測定

(1) DPPH free radical inhibition assay  
DPPH free radical inhibition activity를 측정하기 위해 0.2mM DPPH ethanolic solution 100 $\mu$ l에 농도별 GMSYS(1, 10, 100, 500 및 1,000 $\mu$ g/ml)를 100 $\mu$ l씩 가하여 반응시켰다. 반응 30분 후 37℃에서 spectrophotometer(Versamax; Molecular Device, Sunnyvale, USA)를 이용하여 517nm에서 optical density(이하 OD)를 측정하였으며, DPPH free radical inhibition activity는 아래와 같이 계산하였고, IC50을 측정하였다.

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

### (2) ABTS radical cation inhibition assay

ABTS radical cation inhibition activity를 측정하기 위해 7mM ABTS와 2.45mM potassium persulfate를 혼합하여 상온의 암실에서 24시간 반응시켰다. ABTS와 potassium persulfate 혼합액을 pH 7.4의 phosphate buffer saline(이하 PBS)로 희석하여 732nm에서 흡광도 값이 0.70 $\pm$ 0.02가 되게 하였다. 이 희석 용액에 최종농도가 1, 10, 100, 500 및 1,000 $\mu$ g/ml가 되도록 GMSYS를 가하여 5분간 상온에서 반응시킨 후, spectrophotometer를 이용

하여 732nm에서 흡광도를 측정하였으며, ABTS radical cation inhibition activity는 아래와 같이 계산하였고, IC50을 측정하였다.

ABTS radical cation inhibition activity(%)

$$= \frac{\text{control OD} - \text{sample OD}}{\text{control OD}} \times 100$$

(3) Total polyphenolic contents 測定  
총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해 GMSYS 10mg/ml를 증류수로 희석한 후, 2N folin 200 $\mu$ l와 Na2CO3 2ml를 첨가하여 상온 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 725nm에서 흡광도를 측정하였으며, total polyphenolic contents는 tannic acid를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 함량을 구하였다.

2) Human neuroblastoma cell에 對한 細胞保護 效果 測定

(1) 細胞培養

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 $^{\circ}$ C와 5% CO2에서 배양하였다.

(2) Cell viability

96 well plate에 2.5 $\times$ 10<sup>4</sup>/well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO2에서 48시간 배양 후, 농도별 GMSYS (1, 10, 25, 50, 75 및 100 $\mu$ g/ml) 100 $\mu$ l를 PBS에 녹여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 1mg/ml를 처리하여 3시간 배양한 다음 DMSO로 생성된 formazan을 녹여 15분간 shaking하고, spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 생존율은 무처리 대조군에 대한 백분율(%)로 표시하였다.

(3) 6-OHDA에 對한 cell viability

96 well plate에 2.5 $\times$ 10<sup>4</sup>/well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 37 $^{\circ}$ C와 5% CO2에서 48시간 배양 후, 농도별 GMSYS (1, 10, 25, 50, 75 및 100 $\mu$ g/ml) 100 $\mu$ l와 6-OHDA를 처리하였다. 이 때 pre-treatment군은 먼저 농도별 GMSYS를 21시간 처리 후 6-OHDA 200 $\mu$ M을 3시간 처리하여 배양하였고, co-treatment군은 농도별 GMSYS와 6-OHDA 150 $\mu$ M를 동시에 처리한 후 24시간 배양하였으며, post-treatment군은 먼저 6-OHDA 150 $\mu$ M를 3시간 처리 후 농도별 GMSYS를 가하여 21시간 배양하였다. 그 후 MTT 1mg/ml를 처리하여 3시간 배양하고, 생성된 formazan을 DMSO로 녹여 15분간 shaking하였다. Spectrophotometer를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 생존율은 무처리 대조군에 대한 백분율(%)로 표시하였다.

3) Primary culture에 對한 細胞保護 效果 測定

(1) 胎兒中腦細胞 培養 및 藥物處理

Orient Bio.(Osan, Korea)에서 14일 된 Sprague-Dawley 태아를 구입하여 forceps으로 태아 중뇌 조직을 얼음위에서 박리하고 10% FBS를 포함한 MEM에 모은 후, pipet을 이용하여 기계적으로 dissociation하였다. 조직에 trypsin을 처리하여 세포수를 counting한 후, PLL로 미리 coating한 coverslip에 1.5 $\times$ 10<sup>5</sup>의 조직을 seeding한 다음, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 5일간 배양하였다. FBS가 없는 MEM에서 胎兒中腦細胞에 0.2와 1 $\mu$ g/ml의 GMSYS를 가하고 6시간 배양 후 10 $\mu$ M의 6-OHDA를 처리하였다. 18시간 후 4% PFA로 고정된 다음 pH 7.2의 PBS로 세척하였다.

## (2) TH immunohistochemistry

세척된 胎兒中腦細胞를 0.5% 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 coverslip을 mounting 후, 각 군당 무작위로 4개의 sample을 선택하고 각 sample당 9구역에서 현미경 (Axioskop 2; Carl Zeiss Inc., Göttingen, Germany)를 이용하여 세포수를 계측 (100X) 후, 무처리 대조군에 대한 백분율 (%)로 표시하였다.

## (3) NO assay

胎兒中腦細胞에 0.2와 1 $\mu$ g/ml의 GMSYS 및 10 $\mu$ M의 6-OHDA를 처리하여 20시간 배양한 다음, 배양액 100 $\mu$ l을 회수하여 Griess reagent 100 $\mu$ l를 첨가하고 상온 암실에서 10분간 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였으며, sodium nitrite를 이용해 표준곡선을 그려 NO 농도를 결정하였다.

(4) TNF- $\alpha$  assay

胎兒中腦細胞에 0.2와 1 $\mu$ g/ml의 GMSYS 및 10 $\mu$ M의 6-OHDA를 처리하여 20시간 배양한 다음, 배양액 50 $\mu$ l을 incubation buffer 50 $\mu$ l와 diluent buffer가 포함된 rat TNF- $\alpha$  항체코팅 96 well plate에 가하였다. 추가로 rat TNF- $\alpha$  biotin conjugate 50 $\mu$ l를 가하여 상온에서 1시간 진탕배양 후 세척액으로 4회 세척하고, thymol을

포함한 streptavidin peroxidase 희석액 100 $\mu$ l를 가하여 상온에서 45분 진탕배양 후 세척액으로 4회 세척하였다. 이 후 TMB substrate 용액 100 $\mu$ l를 가하여 암실에서 30분간 진탕배양 후 stop solution 100 $\mu$ l를 가하여 반응 시켰다. 반응 종결 후 ELISA reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 0pg/ml~1,000pg/ml의 TNF- $\alpha$  standard를 이용한 standard curve에 측정된 흡광도를 대입하여 TNF- $\alpha$ 의 농도(pg/ml)를 구하였다.

## 4) 統計處理

실험 결과는 SPSS ver 12.0K for windows를 이용하여 one-way ANOVA test로 통계적 유의성을 검증하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 하였다.

## III. 結 果

## 1. 抗酸化 效果

1) DPPH free radical inhibition activity  
농도별 GMSYS의 DPPH free radical inhibition activity를 측정한 결과, 농도 의존적으로 증가하여 최대 활성은 1,000  $\mu$ g/ml GMSYS에서 93.67%로 나타났으며, IC<sub>50</sub>은 133.60  $\mu$ g/ml이었다(Fig. 1).

2) ABTS radical cation inhibition activity  
농도별 GMSYS의 ABTS radical cation inhibition activity를 측정한 결과, 대체로 농도 의존적으로 증가하였으며 최대 활성은 500  $\mu$ g/ml GMSYS에서 94.67%로 나타났으며, IC<sub>50</sub>은 106.20  $\mu$ g/ml이었다(Fig. 2).

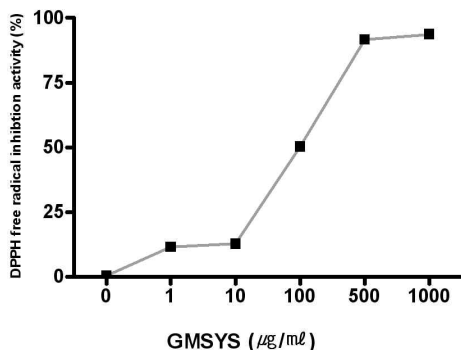


Fig. 1. Effect of GMSYS on the generation of DPPH free radical.

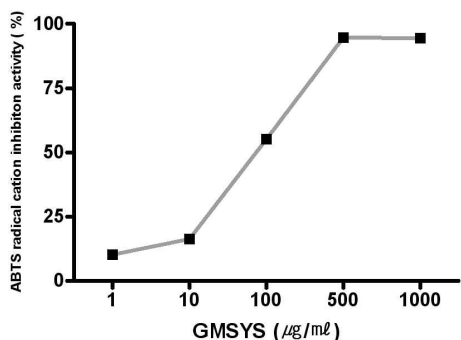


Fig. 2. Effect of GMSYS on the generation of ABTS radical cation.

### 3) Total polyphenolic contents

10mg/ml GMSYS의 total polyphenolic contents를 tannic acid 표준곡선으로부터 구한 결과 0.78%로 나타났다.

## 2. SH-SY5Y細胞에 對한 保護效果

### 1) Cell viability

농도별 GMSYS의 SH-SY5Y cell에 대한 cell viability를 측정한 결과, 모든 농도의 GMSYS에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).

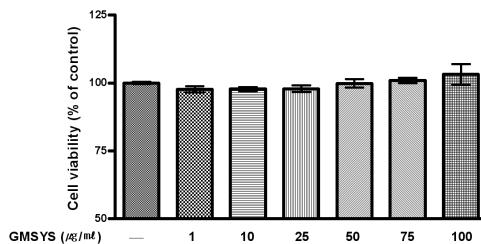


Fig. 3. Dose-dependent effect of GMSYS treatment on the viability of SH-SY5Y cells.

### 2) 6-OHDA에 對한 cell viability

SH-SY5Y cell에서 농도별 GMSYS 처리에 따른 6-OHDA에 대한 cell viability를 측정한 결과, GMSYS pre-treatment군의 경우 6-OHDA 200µM 단독에 의한 cell viability는 control에 비해 68.84%로 감소되었고, 10µg/ml 이하의 GMSYS에서는 6-OHDA 단독에 비하여 cell viability가 증가되었으나 통계적으로 유의하지 않았다.

GMSYS co-treatment군의 경우 6-OHDA 150µM 단독에 의한 cell viability는 control에 비해 37.57%로 감소되었고, 25µg/ml 이하의 GMSYS에서 6-OHDA 단독에 비하여 cell viability가 통계적으로 유의하게(p<0.01) 증가하였다.

GMSYS post-treatment군의 경우 6-OHDA 150µM 단독에 의한 cell viability는 control에 비해 32.59%로 감소되었고, 모든 농도의 GMSYS에서 6-OHDA 단독에 비하여 cell viability가 통계적으로 유의하게 (p<0.001) 증가하였다(Fig. 4).

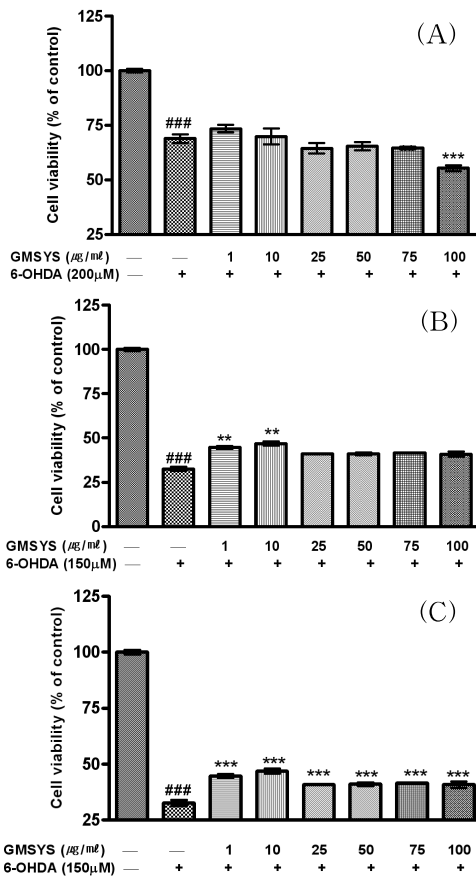


Fig. 4. Effect of GMSYS on the viability of 6-OHDA treated SH-SY5Y cells. (A) Cell viability of GMSYS pre-treatment (B) Cell viability of GMSYS and 6-OHDA co-treatment (C) Cell viability of GMSYS post-treatment  
###,  $p < 0.001$  compared with the control  
\*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$  compared with the 6-OHDA treated group

### 3. 胎兒中腦細胞에 對한 保護效果

#### 1) TH-positive 細胞 保護效果

태아중뇌세포를 이용하여 GMSYS의 6-OHDA에 대한 세포보호 효과를 측정 한 결과, 6-OHDA  $10\mu\text{M}$  단독의 경우 control에 비하여 32.13%로 통계적으로 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 도파민 세포의 분화 및 생존을 억제시켰다.

6-OHDA와 농도별 GMSYS을 처리한

경우 6-OHDA 단독에 비하여  $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$  GMSYS에서 통계적으로 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 도파민 세포를 증가시켰다(Fig. 5, Fig. 6).

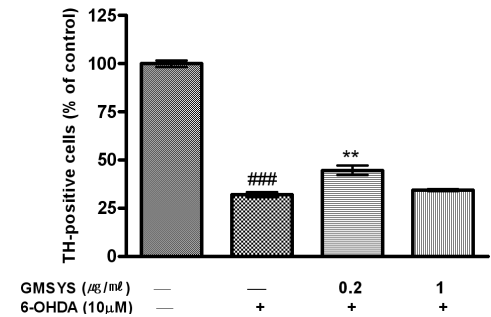


Fig. 5. Neuroprotective effect of GMSYS in mesencephalic dopaminergic neurons against neurotoxicity induced by 6-OHDA. ###,  $p < 0.001$  compared with the control  
\*\*,  $p < 0.01$  compared with the 6-OHDA treated group

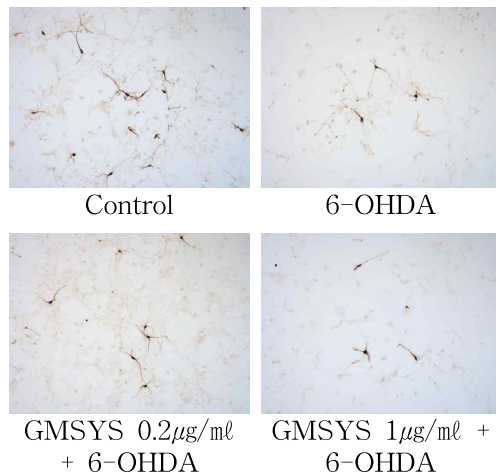


Fig. 6. Neuroprotective effect of GMSYS in mesencephalic dopaminergic neurons against neurotoxicity induced by 6-OHDA (100X).  
Scale bar=250 $\mu\text{m}$

#### 2) NO inhibition 效果

태아중뇌세포를 이용하여 GMSYS의 6-OHDA 처리 후 배양액 내 NO 농도를 측정 한 결과, 6-OHDA  $10\mu\text{M}$  단독의 경

우 control에 비하여 155.76%로 통계적으로 유의하게( $p < 0.001$ ) 증가되었다.

6-OHDA와 농도별 GMSYS을 처리한 경우 6-OHDA 단독에 비하여 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  GMSYS에서 통계적으로 유의하게( $p < 0.01$ ) NO 농도가 감소되었다(Fig. 7).

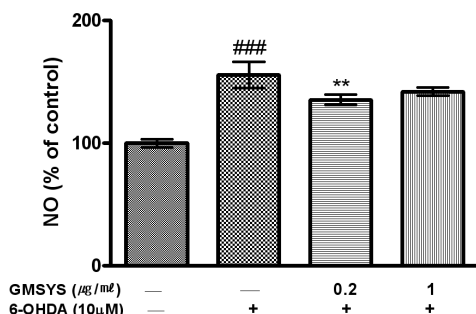


Fig. 7. Inhibitory effect of GMSYS on the NO production in mesencephalic dopaminergic neurons treated by 6-OHDA.

###,  $p < 0.001$  compared with the control  
 \*\*,  $p < 0.01$  compared with the 6-OHDA treated group

### 3) TNF- $\alpha$ inhibition 效果

태아중뇌세포를 이용하여 GMSYS의 6-OHDA 처리 후 배양액 내 TNF- $\alpha$  농도를 측정 한 결과, 6-OHDA 10 $\mu\text{M}$  단독의 경우 8.63 $\pm$ 0.81pg/ml로 control에 비하여 통계적으로 유의하게( $p < 0.001$ ) 증가되었다.

6-OHDA와 농도별 GMSYS을 처리한 경우 6-OHDA 단독에 비하여 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  GMSYS에서 통계적으로 유의하게( $p < 0.01$ ) TNF- $\alpha$  농도가 감소되었다(Fig. 8).

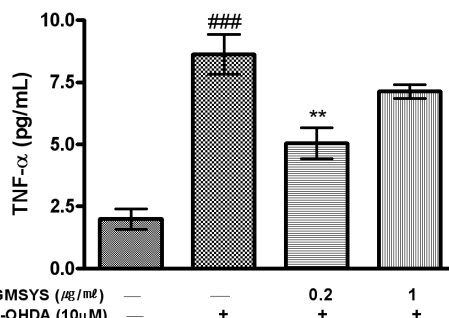


Fig. 8. Inhibitory effect of GMSYS on the TNF- $\alpha$  production in mesencephalic dopaminergic neurons treated by 6-OHDA.  
 ###,  $p < 0.001$  compared with the control  
 \*\*,  $p < 0.01$  compared with the 6-OHDA treated group

## IV. 考 察

2006년 대한민국 통계청은 우리나라의 평균수명이 78.63세이며 여성의 경우엔 81.89세로 남성의 75.14세와 6.75세의 차이가 있다고 보고하였다<sup>18)</sup>. 2002년 발표된 여성의 평균폐경 연령이 약 48세임을 고려할 때<sup>19)</sup>, 우리나라의 여성은 인생의 약 1/3이 폐경 후이므로 폐경 후 여성의 건강과 삶의 질에 관한 관심이 요구되고 있다.

폐경 여성이 경험하는 흔한 증상으로는 안면홍조, 야간발한, 감정변화, 수면장애, 기억력 감퇴 및 우울 등이 있으며, Berg JA 등<sup>20)</sup>은 수면장애, 기억력 감퇴 및 감정변화가 가장 흔하고 가장 심한 증상이라고 보고하고 있다.

폐경과 감정변화, 특히 우울증과의 관련 여부는 아직도 논란이 있으나<sup>21-23)</sup>, Dennerstein L 등<sup>24)</sup>은 estrogen의 대뇌에 대한 생화학적 기전 또는 수용체 매개성 작용이 우울증 발생에 영향을 미친다고 하였으며, 호르몬 대체요법이 dopamine



또는 serotonin 등과 관련됨이 임상적으로 확인된 바 있다<sup>25)</sup>.

Dopamine 분비세포를 포함하고 있는 대뇌는 산화적 스트레스에 대단히 취약하여 우울증을 포함한 많은 정신과적 질환과 대뇌의 퇴행성 질환이 뇌세포의 산화적 손상에 기인되며<sup>26,27)</sup>, 산화적 뇌손상은 연령 증가와도 관련 된다<sup>28)</sup>. 따라서 폐경과 관련된 dopamine 분비세포의 산화적 손상 예방이 폐경기 우울증 감소에도 효과가 있을 것으로 사료되나 이에 대한 보고는 접한 바 없다.

《傷寒論》의 四逆散에서 유래된<sup>29)</sup> 逍遙散은 宋代 陳<sup>8)</sup>의 《太平惠民和劑局方》에서 血虛勞倦 五心煩熱 肢體疼痛 頭目昏重 心忪頰赤 口燥咽乾 發熱盜汗 減食嗜臥 등을 치료할 목적으로 創方되었으며, 疎肝解鬱 健脾養血하는 효능이 있어 七情損傷이나 情志抑鬱로 발생하는 다양한 질환에 응용되는 處方이다<sup>30)</sup>.

이 후 창방된 逍遙散의 다양한 加味方중, 薛이 《校注婦人良方》<sup>9)</sup>에서 逍遙散에 牧丹皮와 梔子를 加味한 加味逍遙散은 일명 八味逍遙散이라고도 하며, 肝鬱血虛를 化熱生血하는 逍遙散의 主治에 火鬱이 겸한 경우에 사용된다<sup>10)</sup>.

실험적으로 逍遙散 및 그 加味方은 갑상선 기능저하에 대한 효과<sup>31)</sup>, 氣鬱性 乳汁分泌過多 改善 效果<sup>32)</sup>, 排卵에 미치는 影響<sup>33)</sup>, 骨多孔症 改善效果<sup>34)</sup> 및 melanin 생성 억제를 통한 미백효과<sup>35)</sup> 등이 보고되었다.

또한 抗스트레스 효과<sup>10-12)</sup>와 뇌내 monoamines에 대한 영향<sup>13,14)</sup>과 난소적출 후 항스트레스 효과<sup>15,16)</sup>가 보고된 바 있으며, 임상적으로도 갱년기로 인한 증상 개선 효과가 보고되어<sup>36)</sup>, 폐경 시 호르몬

변화로 인한 우울증과 관련되는 dopamine 생성에도 관여할 것으로 사료되나, 이에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

이에 저자는 dopamine 分泌細胞에 대한 加味逍遙散의 抗酸化의 效果를 알아보고자 항산화효과와 6-OHDA로 유도된 SH-SY5Y human neuroblastoma cell 및 태아중뇌 dopamine 세포 보호효과를 관찰하였다.

DPPH free radical의 안정성, 높은 민감도 및 검사의 편의성 등으로 인해 DPPH free radical 소거 활성 검사는 항산화능 평가에 흔히 사용되는 검사법으로<sup>37)</sup>, 가미소요산의 구성약물인 梔子<sup>38)</sup>, 生薑<sup>39)</sup> 및 薄荷 추출물<sup>40)</sup>과 芍藥甘草湯<sup>41)</sup>의 DPPH에 대한 항산화 효과가 보고된 바 있다. 농도별 GMSYS 처리 후 DPPH free radical inhibition activity는 농도 의존적으로 증가하여 1,000 $\mu$ g/ml에서 93.67%의 최대 inhibition activity를 나타내었으며, IC50은 133.60 $\mu$ g/ml이었다.

ABTS radical cation 생성은 시료의 항산화 작용을 광학적으로 측정하는 것으로, 항산화 물질의 농도, 반응시간 및 양에 따라 민감한 차이를 나타내므로 수용성 및 지용성 항산화 물질의 항산화 효과 측정에 흔히 사용된다<sup>42)</sup>. 농도별 GMSYS 처리 후 ABTS radical cation 소거 활성을 측정한 결과, 대체로 농도 의존적으로 증가하여 500 $\mu$ g/ml에서 94.67%의 최대 inhibition activity를 나타내었으며, IC50은 106.20 $\mu$ g/ml이었다.

Polyphenol은 2개 이상의 수산기(OH)를 갖는 다가페놀의 총칭으로, 자연계에서는 다양한 형태의 polyphenol 화합물이 존재하며 녹차에 포함된 catechins가 대표적인 물질이므로, 이들의 항산화 작용

과 콜레스테롤 흡수방지 등의 건강에 대한 효과가 밝혀져 있다<sup>43)</sup>. GMSYS 10 $\mu$ g/ml의 총 페놀 함량을 tannic acid 표준곡선으로부터 구한 결과 0.78%로 나타나, 이상의 결과를 통해 GMSYS의 抗酸化 效果를 확인할 수 있었다.

뇌세포의 기능저하의 주된 원인 중 하나가 산화적 stress에 의한 급·만성 신경손상에 의한 것으로 알려져 있으며, 실험적으로 뇌세포에 대한 산화적 스트레스를 유발하는 대표적인 물질이 6-OHDA다<sup>44)</sup>. 6-OHDA로 유발된 신경손상에 대한 GMSYS의 효과를 관찰하기에 앞서, 뇌신경 세포인 SH-SY5Y cell에 대한 농도별 GMSYS의 영향을 관찰한 결과, 모든 농도의 GMSYS는 cell viability에 영향을 미치지 않았다.

6-OHDA 처리 순서에 따른 농도별 GMSYS의 SH-SY5Y cell 보호효과를 관찰한 결과에서는, pre-treatment군의 경우 10 $\mu$ g/ml 이하의 GMSYS에서 cell viability가 6-OHDA 단독에 비하여 세포 생존율이 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았고, co-treatment군의 경우는 25 $\mu$ g/ml 이하의 GMSYS에서 6-OHDA 단독에 비하여 유의한 cell viability 증가를 보였으며, post-treatment군의 경우 모든 농도의 GMSYS에서 6-OHDA 단독투여군에 비하여 증가된 세포 생존율을 나타내어, 6-OHDA로 유발된 산화적 stress에 대하여 비교적 저농도의 GMSYS가 뇌세포에 대한 보호 및 치료효과가 있음을 알 수 있었다.

도파민 분비세포의 퇴화가 발생하는 기전은 명확하지 않으나, Carvour M 등<sup>45)</sup>은 산화적 stress가 중요한 역할을 담당하며, 항산화제가 도파민 분비세포 퇴

화를 막을 수 있다고 보고한 바 있다. 도파민 분비세포에 대한 GMSYS의 효과를 6-OHDA에 대한 태아중뇌세포 보호 효과를 TH-immunopositive cell을 통해 관찰한 결과, 0.2 $\mu$ g/ml GMSYS 투여군에서 6-OHDA 단독투여군에 비하여 통계적으로 유의한 세포 생존율 증가를 나타내어 저농도 GMSYS의 뇌세포 보호효과를 재확인 하였다.

신경세포의 염증성 반응은 다양한 기전에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으며, NO의 過生産<sup>46)</sup>과 TNF- $\alpha$ 의 역할<sup>47)</sup>에 대한 가능성이 제시된 바 있다. 태아중뇌세포에 GMSYS과 6-OHDA를 처리한 배양액 내 NO와 TNF- $\alpha$ 의 농도를 관찰한 결과, 0.2 $\mu$ g/ml GMSYS 투여군이 6-OHDA 단독투여군에 비하여 통계적으로 유의한 NO와 TNF- $\alpha$ 의 농도 감소를 나타내었다.

이상의 연구결과를 종합해 볼 때, GMSYS은 항산화 효과를 통한 뇌세포 보호 효과가 있음을 알 수 있었으며, 특히 6-OHDA로 유발된 산화적 stress에 대하여 저농도에서 보다 양호한 효과를 보여 향후 이에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

加味逍遙散의 神經細胞 保護效果를 알아보고자, GMSYS의 抗酸化 效果 및 human neuroblastoma cell과 태아중뇌 dopamine 세포에서 6-OHDA로 유도된 細胞毒性에 대한 保護效果를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPH free radical inhibition activity와 ABTS radical cation inhibition activity를 측정 한 결과, 농도의존적인 소거활성 증가를 나타내었고 IC50은 각각 133.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 106.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으며, GMSYS 10mg/ml의 총 페놀 함량은 0.78%로 관찰되었다.
2. 모든 농도의 GMSYS는 SH-SY5Y세포의 cell viability에 영향을 미치지 않았다.
3. SH-SY5Y세포에 6-OHDA와 GMSYS를 처리한 결과, co-treatment 시에는 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하에서, post-treatment 시에는 모든 투여군에서 세포보호 효과가 관찰되었다.
4. 태아중뇌세포에서 6-OHDA에 의해 감소된 도파민 세포를 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  GMSYS가 유의하게 증가시켰다.
5. 태아중뇌세포에서 6-OHDA에 의해 증가된 NO와 TNF- $\alpha$ 를 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  GMSYS가 유의하게 감소시켰다.

□ 투 고 일 : 2010년 7월 30일

□ 심 사 일 : 2010년 8월 3일

□ 심사완료일 : 2010년 8월 10일

## 參 考 文 獻

1. Farage MA, Osbom TW, MacLean AB. Cognitive, sensory and emotional changes associated with the menstrual cycle: a review. Arch Gynecol Obstet. 2008;278(4):299-307.
2. Nelson HD. Menopause. Lancet. 2008; 371(9614):760-70.
3. Steinberg EM et al. A cross-sectional evaluation of perimenopausal depression. J Clin Psychiatry. 2008;69(6):973-80.
4. Craig MC, Murphy DG. Estrogen: effects on normal brain function and neuropsychiatric disorders. Climacteric. 2007;10:97-104.
5. Watson CS et al. Estradiol effects on the dopamine transporter-protein levels, subcellular location and function. J Mol Signal. 2006;1:1-14.
6. Gardiner SA et al. Pilot study on the effect of estrogen replacement therapy on brain dopamine transporter availability in healthy, postmenopausal women. Am J Geriatr Psychiatry. 2004;12(6):621-30.
7. Craig MC et al. Effect of long-term estrogen therapy on dopaminergic responsivity in post-menopausal women: a preliminary study. Psychoneuroendocrinology. 2004; 29(10):1309-16.
8. 陳師文 등. 太平惠民和劑局方. 中國: 人民衛生出版社. 1985:308.
9. 薛己 注. 校注婦人良方. 中國:江西人民出版社. 1991:419-23.
10. 金在瑩, 柳同烈. 丹樞逍遙散에 관한 文獻的 考察. 大田大學校 韓醫學研究所 論文集. 1999;7(2):531-51.
11. 李錫駿, 柳熙英. 柳氏逍遙散과 柳氏歸脾湯의 抗스트레스 效果에 관한 臨床的 研究. 東醫神經精神科學會誌. 1994; 5(1):41-60.
12. 崔銀洙, 李仁仙. 逍遙散·加味逍遙散의 效能에 관한 實驗的 研究. 大韓韓方婦人科學會誌. 1996;9(1):41-53.
13. 홍성은 등. 逍遙散이 생쥐에 immobilization stress 負荷 後 血中 免疫機能에 미치

- 는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2003 ;16(3)101-27.
14. 황귀서, 이기선, 박종형. 단치소요산이 구속 스트레스를 가한 흰쥐의 뇌내 catecholamine 함량변화에 미치는 영향. Kor J Environ Toxicol. 1998;13(3-4) :143-9.
15. 이정호, 정대규. 逍遙散과 淸肝逍遙散이 스트레스 생쥐의 腦部位別 monoamines 함량에 미치는 影響. 東醫神經精神科學會誌. 1998;9(2):1-18.
16. 金潤相 등. 逍遙散이 卵巢摘出 흰쥐에 미치는 抗憂鬱效果. 大韓韓方婦人科學會誌. 2001;14(2):69-84.
17. 오승희 등. 逍遙散 藥鍼이 卵巢摘出 흰쥐의 抗스트레스 作用에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2002;22(1):117-30.
18. 대한민국 통계청. 2005년 생명표. 2006.
19. 대한민국 통계청. 2001년 국민건강·영양조사. 2002.
20. Berg JA, Larson CA, Pasvogel AE. Menopausal symptom perception and severity: results from a screening questionnaire. J Clin Nurs. 2008; 17(7):940-8.
21. Woods NF, Mitchell ES. Pathways to depressed mood for midlife women: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study. Res Nurs Health. 1997;29(2):119-29.
22. Avis NE et al. Longitudinal study of hormone levels and depression among women transitioning through menopause. Climacteric. 2001;4(3) :243-9.
23. Bromberger JT et al. Psychologic distress and natural menopause: a multiethnic community study. Am J Public Health. 2001;91(9):1435-42.
24. Dennerstein L, Soares CN. The unique challenges of managing depression in mid-life women. World Psychiatry. 2008;7(3):137-42.
25. Pae CU et al. Effectiveness of antidepressant treatments in premenopausal versus postmenopausal women: a pilot study on differential effects of sex hormones on antidepressant effects. Biomed Pharmacother. 2008; 30:1-8.
26. Ng F et al. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. Int J Neuropsychopharmacol. 2008;11(6) :851-76.
27. Reynolds A et al. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. Int Rev Neurobiol. 2007 ;82:297-325.
28. Gredilla R et al. Differential age-related changes in mitochondrial DNA repair activities in mouse brain regions. Neurobiol Aging. 2008;11 :1-10.
29. 中山醫學院. 中醫方劑學選講. 廣州: 廣東科學技術出版社. 1983:173-81.
30. 趙漢栢. 婦人科에 活用되고 있는 逍遙散에 對한 研究. 大韓韓方婦人科學會誌. 2000;13(2):265-77.
31. 崔昇勳, 李學仁. 丹梔逍遙散이 白鼠의 甲狀腺 損傷에 미치는 影響. 대전대학교 대학원.
32. 金昭延, 裴鍾局. 加味逍遙散이 스트레스로 因한 白鼠의 乳汁過多分泌에

- 미치는 影響. 경산대학교 대학원.
33. 강솔, 김철원. 逍遙散이 白鼠의 排卵에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2000;13(1):111-26.
  34. 박찬수, 손영주. 加味逍遙散이 卵巢摘出로 誘發된 흰 쥐의 骨多孔症에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2008;21(1):1-15.
  35. 김은섭 등. 逍遙散加減化裁의 멜라닌 생성억제와 작용기전에 관한 연구. 大韓韓方婦人科學會誌. 2008;21(1):83-98.
  36. 신경숙 등. 丹樞逍遙散이 갱년기 장애에 미치는 효능에 관한 임상보고. 大韓韓方婦人科學會誌. 2003;16(4):77-82.
  37. Nishizawa M et al. Non-reductive scavenging of 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) by peroxyradical: a useful method for quantitative analysis of peroxyradical. Chem Pharm Bull. 2005;53(6):714-6.
  38. Kim HJ et al. Vanillic acid glycoside and quinic acid derivatives from *Gradeniae Fructus*. J Nat Prod. 2006;69(4):600-3.
  39. Masuda Y et al. Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. Biofactors. 2004;21(1-4):293-6.
  40. Sroka Z, Fecka I, Cisowski W. Antiradical and anti-H2O2 properties of polyphenolic compounds from and aqueous peppermint extract. Z Naturforsch. 2005;60(11-12):826-32.
  41. Kang TH, Baek HY, Kim YC. Protective effect of jakyak-gamcho-tang extract and its constituents against t-BHP-induced oxidative damage in HT22 cells. Am J Chin Med. 2005;33(2):181-9.
  42. Re R et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999;26(9-10):1231-7.
  43. Appel H et al. Limitations of Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. J Chem Ecol. 2001;27(4):761-78.
  44. Gomez-Lazaro M et al. 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp-1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. Free Radic Biol Med. 2008;44(11):1960-9.
  45. Carvour M et al. Chronic low-dose oxidative stress induces caspase-3-dependent PKC $\delta$  proteolytic activation and apoptosis in a cell culture model of dopaminergic neurodegeneration. Ann N Y Acad Sci. 2008;1139:197-205.
  46. Kumral A et al. Neuroprotective effect of the peptides ADNF-9 and NAP on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. Brain Res. 2006;1115(1):169-78.
  47. O'Callaghan JP, Sriram K, Miller DB. Defining "neuroinflammation". Ann NY Acad Sci. 2008;1139:318-30.