

鈞鈎藤이 酸素自由基에 의하여 損傷된 培養脊髓感覺神經節細胞에 미치는 影響에 關한 研究

원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과 *원광대학교 한의과대학 신경정신과학교실
**Dept. of Anatomy & Neurosciences U.T.M.B

강형원 · 박진성* · 류영수* · Jin-Mo Chung** · 이근목

I. 縮 論

최근에 酸素自由基(oxygen free radical)는 중추신경세포나 말초신경세포에 산화적 손상에 의한 세포독성을 나타내어 그 결과 파킨슨씨병¹⁾과 같은 신경병변을 유발하는 병리적 요인으로 밝혀지면서^{2,3)} 酸素自由基의 신경독성에 대한 병리적 기전규명과 연관 疾患에 대한 치료적 접근이 국내외 많은 학자들에 의해 활발하게 研究되어져 왔다^{4,5)}.

酸素自由基에 의한 感覺神經細胞의 손상은 지각의 소실은 물론이고 나아가서는 운동신경계에도 영향을 미쳐 뇌졸중을 비롯한 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)⁶⁾이나 다발성경화증(multiple sclerosis)^{7,8)}과 같은 만성난치성 신경병변을 초래함은 이미 잘 알려져 있다.

韓醫學에서는 感覺神經細胞의 손상에 의한 병변을痿證보다는 痺證이나 麻木에 더 가까운 症狀으로 넣고 있는데⁹⁾, 그 이유는 痺證과 痿證은 모두 사지의 活動障礙가 공통적이거나 痺證은 四肢軀體의 關節肌肉이 疼痛·麻木·重着한 것에 비하여 痿證은 운동신경장애에 더 가깝기 때문이다¹⁰⁻¹³⁾.

최근에 이와같은 난치성 신경병변의 치료에 韓藥材의 추출물이나 동·식물의 天然物등이 매우 效果가 있음이 밝혀지면서 동물을 대상으로 한 임상실험에서 이들의 效能에 대한 작용기전을 밝히려는 研究가 활발히 이루어지

고 있다^{14,15)}.

鈞鈎藤(Ramulus et Uncus Uncariae)은 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 常綠 木質藤本인 鈞鈎 혹은 華鈞藤의 가시를 포함한 줄기를 햇볕에 말리거나 썬서 乾燥한 藥材로서¹⁶⁻²⁰⁾ 甘苦微寒 無毒한 性味와 清熱, 平肝, 熄風, 鎮驚하는 效能이 있어 小兒驚風, 頭昏目眩, 中風癱瘓, 筋脈拘攣 등의 諸症狀에 사용되어져 왔다¹⁶⁻²²⁾.

이제까지 많은 연구자들이 그 성분 및 약효에 관해 보고한바 있으며, 그 주요 성분으로는 rhynchophylline을 비롯하여 수종의 oxyindole계 alkaloid 류, 즉 isorhynchophylline, dihydrocorynantheine, hirsutine, firsutine, 3- α - dihydrocadambine, corynoxine, 및 isocorynoxine 등이 분리 확인^{17,19,23)} 되었고, 생리활성의 研究로는 Joji 등²⁴⁻²⁷⁾이 alkaloid 성분의 혈압강하 혹은 혈관확장 작용에 대해, 김 등²⁸⁻³⁰⁾은 鈞鈎藤이 신경계통의 鎮痛, 鎮靜, 抗痙攣作用에 대해, 李³¹⁾는 鈞鈎藤의 phospholipase C γ 1 저해 성분과 그 항암 효과에 대해 보고한 바가 있으나, 感覺神經節細胞를 대상으로 酸素自由基의 손상에 대한 感覺神經障礙의 효과에 관한 研究는 아직 수행된 바가 없다.

이에 著者는 韓醫學에서 高血壓, 頭暈, 中風癱瘓, 筋脈拘攣 등에 臨床적으로 널리 사용하고 있는 鈞鈎藤이 脊髓 感覺神經細胞損傷에 미치는 영향을 究明하기 위하여 脊髓 後根神經節細胞를 재료로 hydrogen peroxide(H₂O₂)에 의한 酸素自由基의 독성효과 및 鈞鈎藤의 효과를 MTT assay를 비롯하여 NR assay, lactate dehydrogenase

* 이 논문은 2000년도 두뇌한국21사업에 의하여 지원되었음.

(LDH)의 활성도, Neurofilament enzymeimmuno assay (EIA), sulforhodamine B (SRB) 測定 및 Lipid peroxidation 測定을 시행하여 有意한 結果를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 實驗動物

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

2) 藥材

本 實驗에 使用한 鈞鈞藤 藥材는 中國産으로 圓光大學 校 附屬益山韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였다.

김²⁾이 鈞鈞藤의 成分과 분리된 성분들의 鈞鈞藤내 함량을 HPLC와 GC를 이용하여 精量한 結果는 다음과 같다.

Content of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU)

| 성분 | 함량 |
|---------------------------------|---------|
| isocorynoxine-N-oxide | 0.40 % |
| anti-isorhynchophylline-N-oxide | 0.030 % |
| hirsuteine | 0.046 % |
| 3- α -dihydrocadambine | 0.097 % |
| Alkaloid | |
| cadambine | 0.054 % |
| corynoxine | 0.28 % |
| rhynchophylline | 0.23 % |
| isocorynoxine | 0.21 % |
| isorhynchophylline | 0.16 % |
| Physcion | 0.039 % |
| Ursolic acid | 0.26 % |

2. 實驗方法

1) 檢液의 調劑

檢液의 調劑를 위하여 鈞鈞藤을 환저 플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 2시간동안 電熱器로 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농

축한 후 凍結乾燥器에서 24시간 凍結乾燥하여 분말 시료를 얻었다.

2) 藥劑 製造

本 實驗에 使用한 약제로는 hydrogen peroxide (H₂O₂, Sigma)로서 각각 100mM, 10mM, 1mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 實驗 당일 적당한 양으로 희석 사용하여거나 필요한 양을 직접 培養液에 첨가하여 사용하였다.

3) 細胞培養

脊髓後根神經節細胞의 분리는 Kim 등(1988)³⁾의 方法에 따라 施行하였다. 즉, 생후 3일된 생쥐에서 적출한 신경조직을 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline (PBS)으로 處理한 후 36°C, 5% CO₂/95%air로 조절된 정온기 내에서 培養하였다. 細胞培養完了後 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Gibco)으로 3회 세척 후 Pasteur 피펫으로 세포를 분리시켰다. 분리된 세포들은 poly-L-lysine (Sigma)으로 전처리된 96-multiwell에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 培養液으로 교환하여 주었으며 5일 동안 培養後 本 實驗에 使用하였다.

4) 酸素自由基 處理

생쥐의 脊髓後根神經節細胞에 酸素自由基가 미치는 영향을 조사하기 위하여 정온기에서 일정시간 배양한 脊髓後根神經節細胞를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 1~100mM hydrogen peroxide (H₂O₂)를 배양액에 넣어 여러 농도로 희석한 다음 이들 각각이 포함된 배양액에서 脊髓後根神經節細胞를 1~24시간 동안 처리한 후 분석하였다.

5) 細胞毒性 및 防禦效果 分析

(1) 細胞生存率 分析

① MTT 測定

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

olium bromide(Sigma) 定量을 위하여 酸素自由基나 한약 추출물을 處理한 培養 神經細胞를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50mg/ml의 MTT를 well당 最終濃度로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養完了後 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk)를 處理한 다음 spectrophotometer로 590nm에서 흡광도를 測定後 對照群과 比較 調査하였다. MTT assay는 590nm에서 빛의 흡수량에 비례하여 세포의 생존율을 측정하는 분석법이다.

② NR 測定

Neutral red (NR, Sigma)의 定量은 Mosmann(1983)³³⁾의 방법에 따랐다. 즉 여러 濃度의 H₂O₂를 處理한 培養 神經細胞를 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5mg/ml의 NR을 well당 최종 濃度로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료후 PBS로 3회 세척후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 處理한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다. NR assay는 540nm에서 빛흡수량에 의해 세포의 생존율을 측정하는 분석법이다.

③ Neurofilament enzymeimmuno assay (EIA)

일정 時間동안 培養한 神經細胞를 PBS로 3회 세척하여 알코올로 고정시킨 다음 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료후 NE14 (1:100, Sigma)로 1시간 동안 반응시킨후 0.04% O-phenylenediamine (OPD, Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide로 處理한 다음 Dynatech Microelisa reader로 490nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다. EIA는 490nm에서 빛의 흡수량에 의해 신경세사의 양을 측정하는 효소면역 분석법이다.

④ Sulforhodamine B (SRB) 測定

Sulforhodamine B (SRB)의 分析을 위하여 酸素自由基나 한약재 추출물로 일정시간 동안 處理한 脊髓後根神經節細胞에 0.4% sulforhodamine B를 200 μ 씩 첨가하여 1

시간 동안 실온에 방치한 다음 1.0% acetic acid로 3회 세척하였다. 세척 완료후 10mM Tris base를 이용하여 SRB-bound protein을 녹인 후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다. Sulforhodamine B (SRB) assay 는 540nm에서 빛흡수량에 의한 세포의 단백질 활성량을 측정하는 분석법이다.

⑤ LDH 測定

酸素自由基나 한약재 추출물에 대한 LDH활성의 測定은 변형된 Takahashi 등(1987)³⁴⁾의 방법에 의하여 행하였다. 즉, LDH kit (Atron lab, Japan)의 효소기질액 1.0ml를 직경 10cm인 튜브에 넣은 후 여기에 검체인 培養液을 넣어 잘 혼합한 다음 37도에서 10분간 반응시켰다. 10분 후 희석반응 정지액 3.0ml를 넣어 혼합한 후 570nm에서 흡광도를 測定하여 對照群과 比較 調査하였다. LDH 활성 측정은 570nm에서 빛흡수량에 의한 세포막의 손상정도를 측정하는 분석법이다.

⑥ Lipid peroxidation 測定

脊髓 神經細胞Lipid peroxidation의 定量 測定은 酸素自由基나 한약재 추출물을 일정시간 동안 處理한 脊髓後根神經節細胞의 상층액과 세포용해액내의 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)를 測定한 것으로, 위액에 12N H₂SO₄와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0ml와 0.3ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응 완료후 TBA를 1.0ml를 가한 후 90도에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각후 n-butanol로 處理하였다. n-butanol 處理 완료 후 원침하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 測定하였다. Lipid peroxidation 측정은 553nm에서 빛흡수량에 의한 세포의 지질과산화 반응량을 측정하는 형광분석법이다.

6) 統計 處理

實驗 結果에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Student-t test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

III. 實驗成績

1. 酸素自由基의 細胞毒性

1) 細胞 生存率 分析

(1) MTT 側定

培養 脊髓後根神經節細胞에 hydrogen peroxide (H_2O_2)가 미치는 영향을 조사하기 위하여 $10\mu M$ 에서 $80\mu M$ 까지의 H_2O_2 가 각각의 농도로 포함된 培養液에서 5시간 동안 培養한 후 H_2O_2 의 독성효과를 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 $10\mu M H_2O_2$ 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 84.2%로 나타났다. 그러나 $20\mu M$ 의 처리에서는 75.4%로 나타났다. 또한 $40\mu M$ 과 $80\mu M H_2O_2$ 를 처리한 경우 세포 생존율은 각각 50.9%($p<0.05$)와 42.1%($p<0.01$)로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났다(Table I, Fig. 1).

처리한 時間에 따라 H_2O_2 가 培養 脊髓後根神經節細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 $40\mu M H_2O_2$ 가 포함된 培養液에서 脊髓後根神經節細胞를 각각 1시간에서 7시간 동안 培養한 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 1시간 培養에서는 대조군(100%)에 비하여 64.7%의 세포생존율을 보였다. 또한 3시간 培養에 있어서는 60.0%로 대조군보다 다소 낮게 나타났으며 5시간 培養에서는 대조군에 비하여 47.1%($P<0.05$)로, 7시간 培養에서는 33.3%($p<0.01$)로 각각 나타났다(Table II, Fig. 2).

Table I. Absorbance (% of control) at 590nm wavelength for the MTT assay on hydrogen peroxide (H_2O_2) in cultured mouse spinal DRG neurons

| $H_2O_2(\mu M)$ | MTT absorbance(590nm) | Decrease of cell viability(%) |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|
| 0 | 0.57 ± 0.08 | - |
| 10 | 0.48 ± 0.04 | 15.8 |
| 20 | 0.43 ± 0.05 | 24.6 |
| 40 | $0.29\pm 0.02^*$ | 49.1 |
| 80 | $0.24\pm 0.03^{**}$ | 57.9 |

Cultured mouse spinal DRG neurons were treated with various concentrations of H_2O_2 for 5 hours. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences from the

control are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

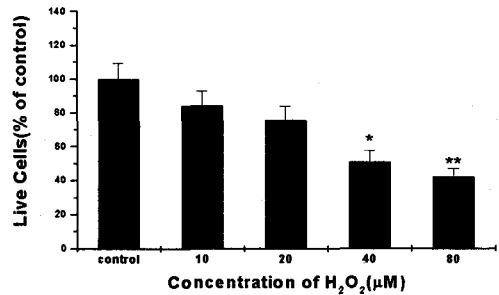


Fig. 1. Dose-response relationship of hydrogen peroxide (H_2O_2) in cultured mouse spinal DRG neurons. Other legends are same as the Table I.

Table II. Time-response relationship of hydrogen peroxide (H_2O_2) by MTT assay in cultured mouse spinal DRG neurons

| $H_2O_2(\mu M)$ | MTT absorbance(590nm) | | | | |
|-----------------|-----------------------|----------------|----------------|------------------|---------------------|
| | 0hr | 1hr | 3hr | 5hr | 7hr |
| 0 | 0.36 ± 0.06 | 0.34 ± 0.05 | 0.35 ± 0.03 | 0.34 ± 0.02 | 0.33 ± 0.04 |
| 40 | 0.35 ± 0.04 | 0.22 ± 0.03 | 0.21 ± 0.01 | $0.16\pm 0.02^*$ | $0.11\pm 0.01^{**}$ |

Cultured DRG neurons were treated with $40\mu M H_2O_2$ for various time intervals. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

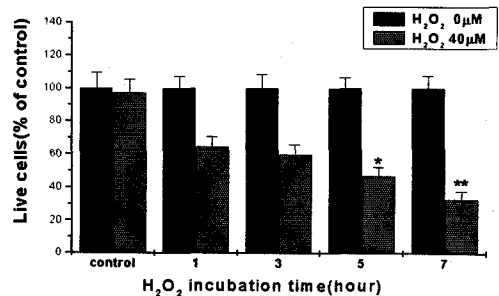


Fig. 2. Time-dependency of hydrogen peroxide (H_2O_2) in cultured mouse DRG neurons. Other legends are same as the Table II.

(2) NR 側定

脊髓後根神經節細胞를 일정시간 동안 培養한 후 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free인 Hank's balanced salt solution (HBSS,

Gibco)으로 3회 세척한 후 H_2O_2 가 $1\mu M$ 에서 $35\mu M$ 까지의 농도로 각각 포함된 培養液에서 5시간 培養한 다음 세포의 생존율을 조사한 결과 $1\mu M$ 의 처리에서 세포생존율은 대조군(100%)에 비하여 74.4%로 나타났으며 $15\mu M$ 과 $25\mu M$ 에서는 각각 65.1%와 48.8%($p<0.05$)로 나타났다. 또한 $35\mu M H_2O_2$ 에서는 37.2%($p<0.01$)의 생존율을 나타냈다.(Table III, Fig. 3).

培養시간에 따라 H_2O_2 가 脊髓感覺神經節細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NR50값인 $25\mu M H_2O_2$ 농도에서 1~7시간 동안 培養한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 조사한 결과 1시간 培養에서는 대조군(100%)에 비하여 62.5%로 나타났으며 3시간 배양에서는 59.3%로 나타났으며 5시간과 7시간에서는 각각 52.7($p<0.05$)% 및 41.5%($p<0.01$)로 나타났다(Table IV, Fig. 4).

Table III. Absorbance (% of control) at 540nm wavelength for the NR assay on hydrogen peroxide (H_2O_2) in cultured mouse DRG neurons

| $H_2O_2(\mu M)$ | NR absorbance(540nm) | Decrease of cell viability(%) |
|-----------------|----------------------|-------------------------------|
| 0 | 0.43±0.06 | - |
| 1 | 0.32±0.03 | 25.6 |
| 15 | 0.28±0.05 | 34.9 |
| 25 | 0.21±0.04* | 51.2 |
| 35 | 0.16±0.02** | 62.8 |

Cultured mouse spinal DRG neurons were grown in media containing various concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2) for 5 hours. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

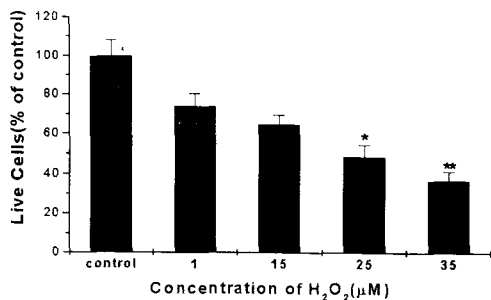


Fig. 3. Dose-response relationship of hydrogen peroxide (H_2O_2) in cultured mouse DRG neurons. Cytotoxicity was measured by NR assay. Other legends are same as the Table III.

Table IV. Time-response relationship of hydrogen peroxide (H_2O_2) by NR assay in cultured mouse spinal DRG neurons

| $H_2O_2(\mu M)$ | NR absorbance(540nm) | | | | |
|-----------------|----------------------|-----------|-----------|------------|-------------|
| | 0hr | 1hr | 3hr | 5hr | 7hr |
| 0 | 0.57±0.08 | 0.56±0.07 | 0.54±0.05 | 0.55±0.06 | 0.53±0.05 |
| 25 | 0.56±0.07 | 0.35±0.06 | 0.32±0.03 | 0.29±0.04* | 0.22±0.01** |

Cultured mouse spinal DRG neurons were treated with $25\mu M H_2O_2$ for various time intervals. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

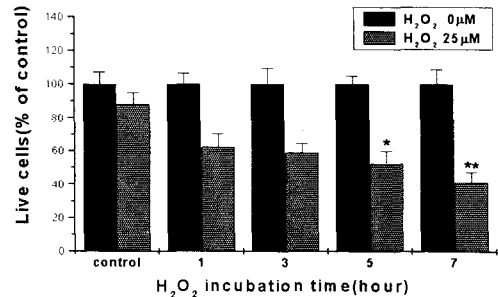


Fig. 4. Time-dependency of hydrogen peroxide (H_2O_2) in cultured mouse DRG neurons. Other legends are same as the Table II.

2. 韓藥抽出物の 效果

1) Neurofilament 側定

(1) H_2O_2 의 影響

培養 神經細胞에서 H_2O_2 의 농도변화에 의한 neurofilament의 양적 측정을 위하여 neurofilament EIA를 행한 결과 H_2O_2 가 $1\sim 70\mu M$ 까지의 농도로 각각 포함된 培養液에서 脊髓後根神經節細胞를 5시간 동안 처리한 후 neurofilament의 양적 변화를 대조군과 비교 조사하였다.

1 μ M H₂O₂ 처리에서는 neurofilament의 양적 변화는 대조군(100%)에 비하여 68.5%로 나타났으며, 15 μ M H₂O₂ 처리에서는 62.0%으로 나타났다. 또한 35 μ M과 70 μ M H₂O₂의 처리에서는 각각 46.7%(p<0.05)와 23.9%(p<0.01)의 neurofilament 양을 나타내 유의하게 감소하였다(Table V, Fig.5).

Table V. Dose-response relationship of hydrogen peroxide (H₂O₂) by neurofilament enzymeimmuno assay (EIA) in cultured mouse spinal DRG neurons

| H ₂ O ₂ (μ M) | EI absorbance(490nm) | Decrease of neurofilament(%) |
|--|----------------------|------------------------------|
| 0 | 0.92 \pm 0.07 | - |
| 1 | 0.63 \pm 0.04 | 31.5 |
| 15 | 0.57 \pm 0.06 | 38.0 |
| 35 | 0.43 \pm 0.05* | 53.3 |
| 70 | 0.22 \pm 0.03** | 76.1 |

Cultured mouse spinal DRG neurons were exposed to various concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂) for 5 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay (EIA). The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

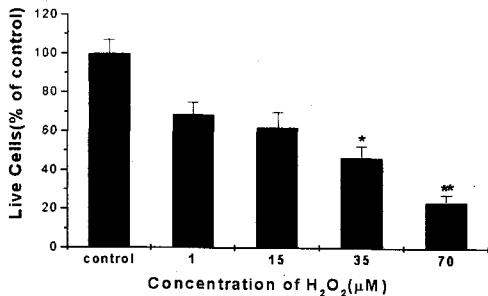


Fig. 5. Dose-dependency of hydrogen peroxide (H₂O₂) in cultured mouse spinal DRG neurons. Other legends are same as the Table V.

(2) 釣鈎藤(Ramulus et Uncus Uncariae)의 效果

Neurofilament의 양적변화측면에서 H₂O₂에 의하여 손상된 培養 脊髓後根神經節細胞에 대한 Ramulus et Uncus Uncariae의 效果를 조사하기 위하여 H₂O₂의 MCV값

(midcytotoxicity value)인 35 μ M H₂O₂농도에서 培養 脊髓後根神經節細胞를 5시간 동안 노출시키기 2시간 전에 1~60 μ g/ml Ramulus et Uncus Uncariae가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 neurofilament EIA법으로 조사하였다. 35 μ M H₂O₂만을 처리한 경우 neurofilament의 양적 변화는 대조군(100%)에 비하여 42.1%로 나타났다. 그러나 1 μ g/ml Ramulus et Uncus Uncariae를 전처리한 경우 53.8%로 나타났다. 또한 15 μ g/ml와 30 μ g/ml Ramulus et Uncus Uncariae 처리에서는 각각 69.3%와 74.7%로 증가하는 경향을 나타냈으나 유의성을 보이지 않았다. 그러나 60 μ g/ml Ramulus et Uncus Uncariae의 경우 86.6%(p<0.05)로 나타남으로서 이는 H₂O₂만을 처리한 경우에 비하여 유의한 증가를 나타냈다 (Table VI, Fig. 6).

Table VI. Dose-response relationship of REUU for its neuroprotective effect on hydrogen peroxide (H₂O₂) by neurofilament EIA assay in cultured mouse DRG neurons

| H ₂ O ₂ (μ M) | EI absorbance(490nm) concentration of REUU(μ g/ml) | | | | |
|--|---|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | 0 | 1 | 15 | 30 | 60 |
| 0 | 0.76 \pm 0.05 | 0.78 \pm 0.08 | 0.75 \pm 0.06 | 0.79 \pm 0.05 | 0.82 \pm 0.09 |
| 35 | 0.32 \pm 0.06 | 0.42 \pm 0.05 | 0.52 \pm 0.04 | 0.59 \pm 0.03 | 0.71 \pm 0.06* |

Cultured mouse spinal DRG neurons were preincubated with various concentrations of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) for 2 hours before treatment with 35 μ M H₂O₂ for 5 hours. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. *p<0.05

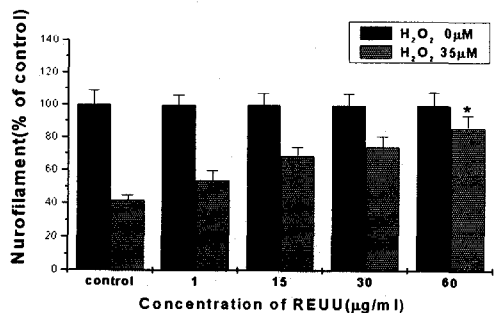


Fig. 6. Dose-dependency of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) for its protective effect on hydrogen

peroxide (H_2O_2) in cultured mouse spinal DRG neurons. Cultures were preincubated with 1, 15, 30 and 60 $\mu g/ml$ REUU for 2 hours. Other legends are same as the Table VI.

2) Lipid peroxidation 側定

(1) H_2O_2 의 影響

H_2O_2 에 의하여 손상된 培養 神經節細胞에서 H_2O_2 의 농도에 따른 lipid peroxidation의 양적 변화를 측정하기 위하여 H_2O_2 가 1~50 μM 까지의 농도로 각각 포함된 培養液에서 脊髓後根神經節細胞를 5시간 동안 처리한 후 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)를 測定하고 세포의 생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 1 μM H_2O_2 처리에서는 TBARS가 대조군(36.8 \pm 4.2)에 비하여 41.7 \pm 4.8로 나타났으며, 세포생존율의 감소율은 대조군(100%)에 비하여 113.3%로 나타났다. 또한 10 μM 과 30 μM H_2O_2 를 처리한 경우 TBARS가 각각 46.4 \pm 5.3과 59.7 \pm 6.5($p<0.01$)로 나타났으며, 세포생존율 감소율은 대조군에 비하여 각각 126.1%와 162.2%($p<0.01$)로 나타났다. 50 μM H_2O_2 의 처리에 있어서는 TBARS가 75.9 \pm 8.7($p<0.01$)로 나타났으며 세포생존율 감소율은 206.3%($p<0.01$)로 나타나 유의한 증가를 보였다. (Table VII, Fig. 7).

Table VII. Dose-response relationship of hydrogen peroxide (H_2O_2) on lipid peroxidation in cultured mouse spinal DRG neurons

| H_2O_2 (μM) | TBARS(pmol/ 10 ⁶ cells) | Decrease rate of cell viability(%) |
|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 0 | 36.8 \pm 4.2 | - |
| 1 | 41.7 \pm 4.8 | 113.3 |
| 10 | 46.4 \pm 5.3 | 126.1 |
| 30 | 59.7 \pm 6.5** | 162.2 |
| 50 | 75.9 \pm 8.7** | 206.3 |

Cultured mouse spinal DRG neurons were exposed to various concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2) for 5 hours. Thiobarbituric acid (TBA) fluorometric assay was adopted to analyse lipid peroxidation and TBA reactive substance (TBARS) were represent as pmol/10⁶ cells. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant

differences from the control are marked with asterisks. ** $p<0.01$

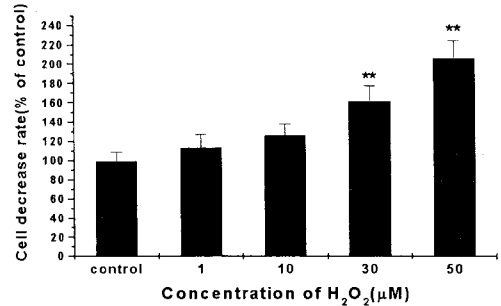


Fig. 7. Dose-dependency of hydrogen peroxide (H_2O_2) in cultured mouse DRG neurons. Cultures were exposed to 1, 10, 30 and 50 μM H_2O_2 for 5 hours, respectively. Cell viability was determined as % of control. Other legends are same as the Table VII.

(2) 鈞鈞藤(Ramulus et Uncus Uncariae)의 效果

lipid peroxidation 側面에서 H_2O_2 에 의하여 損傷된 培養 脊髓後根神經節細胞에 대한 Ramulus et Uncus Uncariae의 效果를 조사하기 위하여 H_2O_2 의 MCV값 (midcytotoxicity value)인 30 μM H_2O_2 농도에서 5시간 동안 노출시키기 2시간 전에 15~120 $\mu g/ml$ Ramulus et Uncus Uncariae가 각각 포함된 培養液에서 처리한 후 이의 防禦效果를 조사하였다. H_2O_2 만을 처리한 경우 TBARS는 대조군(32.7 \pm 5.3)에 비하여 22.7 \pm 3.8로 나타났으며, 세포생존율의 감소율은 대조군(100%)에 비하여 69.4%로 나타났다. 그러나 15 $\mu g/ml$ 와 30 $\mu g/ml$ 의 Ramulus et Uncus Uncariae 처리에 있어서는 TBARS가 대조군에 비하여 각각 20.2 \pm 2.6과 17.4 \pm 1.6($p<0.05$)으로 나타났으며 이때 세포생존율의 감소율은 대조군(100%)에 비하여 62.3%와 53.0%($p<0.05$)로 각각 나타났다. 또한 60 $\mu g/ml$ 와 120 $\mu g/ml$ 의 Ramulus et Uncus Uncariae 처리에 있어서는 TBARS가 대조군에 비하여 각각 13.4 \pm 2.3($p<0.01$)과 9.5 \pm 0.7($p<0.01$)로 나타났으며 이때 세포생존율의 감소율은 대조군(100%)에 비하여 41.7%($p<0.01$)와 30.1%($p<0.01$)로 각각 나타났다(Table VIII, Fig. 8).

Table VIII. Dose-response relationship of REUU for its neuroprotective effect on hydrogen peroxide (H_2O_2) in TBARS assay in cultured mouse DRG neurons

| H_2O_2 (μ M) | TBARS(pmol/ 10^6 cells) concentration of REUU(μ g/ml) | | | | |
|---------------------|---|----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | 0 | 15 | 30 | 60 | 120 |
| 0 | 32.7 \pm 5.3 | 32.4 \pm 5.1 | 32.8 \pm 4.2 | 32.1 \pm 3.5 | 31.6 \pm 4.6 |
| 30 | 22.7 \pm 3.8 | 20.2 \pm 2.6 | 17.4 \pm 1.6* | 13.4 \pm 2.3** | 9.5 \pm 0.7** |

Cultured mouse spinal DRG neurons were preincubated with various concentrations of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) for 2 hours before treatment with 30 μ M H_2O_2 for 5 hours. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

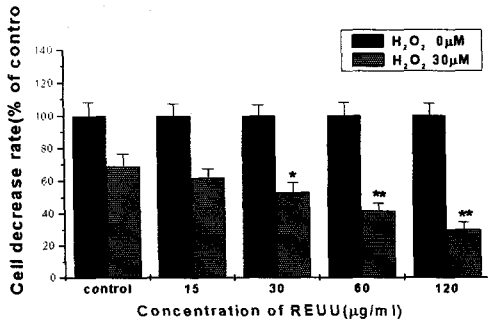


Fig. 8. Dose-dependency of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) for its protective effect on hydrogen peroxide (H_2O_2) in cultured mouse spinal DRG neurons. Cultures were preincubated with 15, 30, 60 and 120 μ g/ml REUU for 2 hours. Other legends are same as the Table VIII.

3) LDH 測定

(1) H_2O_2 의 影響

H_2O_2 에 의하여 損傷된 培養 脊髓後根神經節細胞에 있어서 LDH 활성도를 측정하기 위하여 H_2O_2 가 1~40 μ M까지의 농도로 각각 포함된 培養液에서 神經細胞를 5시간 동안 처리한 후 細胞培養液내로 유출된 LDH양을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 1 μ M H_2O_2 처리에서는 대조군 100%(18.3 \pm 1.6)에 비하여 116.4%(21.3 \pm 2.4)로 나타났다. 또한 10 μ M과 20 μ M H_2O_2 의 처리에 있어서는 각각 124.6%(22.8 \pm 2.1)와 156.3%(28.6 \pm 3.4)(p<0.05)로 나타

났다. 한편 40 μ M H_2O_2 를 처리한 경우 183.1%(33.5 \pm 4.3)(p<0.01)로 나타나 H_2O_2 를 처리하지 않은 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다. LDH활성도의 MCV값은 20 μ M H_2O_2 의 처리에서 나타났다(Table IX, Fig. 9).

Table IX. Dose-response relationship of hydrogen peroxide (H_2O_2) on lactate dehydrogenase (LDH) release in cultured mouse DRG neurons

| H_2O_2 (μ M) | 0 | 1 | 10 | 20 | 40 |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|
| Amount of LDH Release | 18.3 \pm 1.6 | 21.3 \pm 2.4 | 22.8 \pm 2.1 | 28.6 \pm 3.4* | 33.5 \pm 4.3** |

Cultured mouse spinal DRG neurons were exposed to various concentrations of hydrogen peroxide(H_2O_2) for 5 hours. LDH release was measured at wavelength of 570nm. The values represent the mean \pm SE for 6 experiments. * :significantly different from the value of control group. *p<0.05; **p<0.01

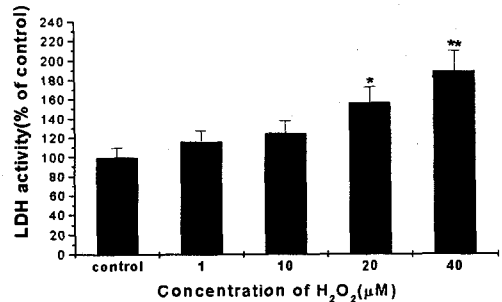


Fig. 9. Dose-dependency of hydrogen peroxide (H_2O_2) in cultured mouse DRG neurons. Cultures were exposed to 1, 10, 20 and 40 μ M H_2O_2 for 5 hours, respectively. Cell viability was determined as % of control. Other legends are same as the Table IX.

(2) 釣鈎藤(Ramulus et Uncus Uncariae)의 效果

LDH활성도 側面에서 H_2O_2 에 의하여 손상된 培養 脊髓後根神經節細胞에 대한 Ramulus et Uncus Uncariae의 효과를 조사하기 위하여 H_2O_2 의 MCV값(midcytotoxicity value)인 20 μ M H_2O_2 농도에서 5시간 동안 노출시키기 2시간 전에 10~100 μ g/ml Ramulus et Uncus Uncariae가 각각 포함된 培養液에서 처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 20 μ M H_2O_2 만을 처리한 경우 대조군 100%(14.5 \pm 1.8)에 비하여 77.9%(11.3 \pm 1.3)로 나타났다.

그러나 10 μ g/ml의 Ramulus et Uncus Uncariae 처리에서는 대조군에 비하여 72.5%(10.3 \pm 1.1)로 나타났으며 25 μ g/ml와 50 μ g/ml의 H₂O₂의 처리에서는 각각 65.7%(9.0 \pm 0.5)와 51.1%(6.9 \pm 0.8)(p<0.05)로 유의하게 감소하였다. 또한 100 μ g/ml Ramulus et Uncus Uncariae의 처리에서는 대조군에 비하여 40.5%(5.1 \pm 0.6)(p<0.01)로 매우 유의한 감소를 나타냈다(Table X, Fig. 10).

Table X. Dose-response relationship of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) for its neuroprotective effect on hydrogen peroxide (H₂O₂) in lactate dehydrogenase (LDH) release on cultured mouse DRG neurons

| H ₂ O ₂ (μ M) | LDH Release(% of control) concentration of REUU(μ g/ml) | | | | |
|---|---|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| | 0 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| 0 | 14.5 \pm 1.8 | 14.2 \pm 1.6 | 13.7 \pm 1.5 | 13.5 \pm 1.2 | 12.6 \pm 1.4 |
| 20 | 11.3 \pm 1.3 | 10.3 \pm 1.1 | 9.0 \pm 0.5 | 6.9 \pm 0.8* | 5.1 \pm 0.6** |

Cultured mouse spinal DRG neurons were preincubated with various concentrations of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) for 2 hours before treatment with 20 μ M H₂O₂ for 5 hours. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

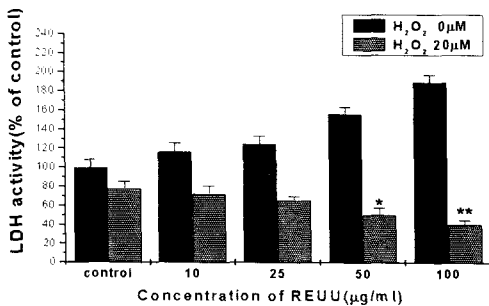


Fig. 10. Dose-dependency of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) for its protective effect on hydrogen peroxide (H₂O₂) in cultured mouse spinal DRG neurons. Cultures were preincubated with 10, 25, 50 and 100 μ g/ml REUU for 2 hours. Other legends are same as the Table X.

4) SRB 測定

(1) H₂O₂의 影響

H₂O₂가 培養 脊髓後根神經節細胞에 미치는 영향을 총 단백질량의 측면에서 조사하기 위하여 10 μ M에서 100 μ M까지의 H₂O₂가 각각 포함된 培養液에서 5시간 동안 培養한 후 H₂O₂에 의한 단백질 합성의 변화에 대해 조사한 결과 10 μ M H₂O₂ 처리에서는 단백질의 합성이 대조군(100%)에 비하여 75.6%로 나타났으며 25 μ M H₂O₂의 처리에서는 대조군에 비하여 68.2%로 다소 낮게 나타났다. 또한 50 μ M과 100 μ M H₂O₂를 처리한 경우 단백질 합성은 각각 47.2%(p<0.01)와 32.3%(p<0.01)%로 나타나 유의적인 감소를 보였다(Table, Fig. 11).

Table. XI Dose-response relationship of hydrogen peroxide (H₂O₂) on total protein synthesis in cultured mouse spinal DRG neurons

| H ₂ O ₂ (μ M) | Total Protein (% of control) |
|--|------------------------------|
| 0 | 100 \pm 8.3 |
| 10 | 75.6 \pm 6.4 |
| 25 | 68.2 \pm 7.6 |
| 50 | 47.2 \pm 4.8** |
| 100 | 32.3 \pm 5.2** |

Cultured mouse spinal DRG neurons were exposed to 10, 25, 50 and 100 μ M H₂O₂ for 5 hours. Amount of total protein was measured by SRB assay(540nm), and shown as % of control. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. * :significantly different from the value of control group. **p<0.01

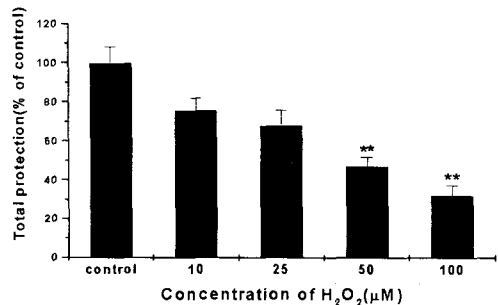


Fig. 11. Dose-dependency of hydrogen peroxide (H₂O₂) in cultured mouse DRG neurons. Other legends are the same as the Table

(2) 鈞藤(Ramulus et Uncus Uncariae)의 效果

총단백질의 양적변화 (側面에서 H₂O₂에 의한 培養 脊髓後根神經節細胞에 있어서 Ramulus et Uncus Uncariae의 效果를 조사하기 위하여 H₂O₂의 MCV값(midcytotoxicity value)인 50 μ M H₂O₂ 농도에서 5시간 동안 노출시키기 2시간 전에 10~80 μ g/ml Ramulus et Uncus Uncariae가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 H₂O₂만을 처리한 경우 총단백질의 양적 변화는 대조군(100%)에 비하여 42.6%로 나타났다. 한편 10 μ g/ml Ramulus et Uncus Uncariae의 처리에서는 대조군에 비하여 63.8%로 나타났으며, 20 μ g/ml, 40 μ g/ml 처리에서는 대조군에 비하여 각각 71.5%, 76.7%로 나타났다. 또한 80 μ g/ml Ramulus et Uncus Uncariae의 처리에서는 81.2%(p<0.05)로 나타나 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다(Table, Fig. 12).

Table. XII Dose-response relationship of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) for its neuroprotective effect on hydrogen peroxide (H₂O₂) by SRB assay in cultured mouse DRG neurons

| H ₂ O ₂ (μ M) | Total protein(% of control) concentration of REUU(μ g/ml) | | | | |
|---|---|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| | 0 | 10 | 20 | 40 | 80 |
| 0 | 100 \pm 6.3 | 100 \pm 5.8 | 100 \pm 7.1 | 100 \pm 8.6 | 100 \pm 7.5 |
| 50 | 42.6 \pm 5.2 | 63.8 \pm 7.4 | 71.5 \pm 8.3 | 76.7 \pm 6.5 | 81.2 \pm 9.8* |

Cultured mouse spinal DRG neurons were preincubated with various concentrations of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) for 2 hours before treatment with 50 μ M H₂O₂ for 5 hours. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. *p<0.05

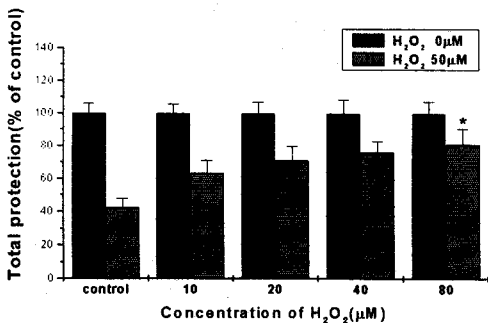


Fig. 12. Dose-dependency of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) for its protective effect on hydrogen peroxide (H₂O₂) in cultured mouse spinal DRG neurons. Cultures were preincubated with 10, 20, 40 and 80 μ g/ml REUU for 2 hours. Other legends are same as the Table

IV. 考 察

脊髓는 腦와 함께 중추신경계를 구성하고 있는 신경조직으로서 腦와 같이 인체의 모든 運動과 知覺을 맡아보는 神經細胞들로 구성되어 있다^{6,7,45}. 따라서 인체의 전도로는 運動神經細胞와 知覺神經細胞에서 나오는 神經纖維에 의하여 이루어지는데, 말초에서 중추까지의 지각전달은 상행성전도로를 통하여, 중추에서 말초로의 운동전달은 하행성전도로를 통하여 각각 전해지게 된다. 이중 지각전도로는 脊髓의 後根神經節을 통하여 척수의 후각신경세포에 연결되어 있기 때문에 脊髓後根神經節細胞의 손상은 곧 감각의 소실은 물론이고 四肢의 疼痛 및 運動의 不調和를 일으키는 직접적인 요인이 된다^{7,36,40}. 韓醫學의 측면에서는 이를 痺證, 痿證, 麻木不仁의 범주에 넣고 있다^{9,11,13,41,42}.

痺證이란 不通, 阻滯의 개념으로 氣血의 運行이 阻塞되어 筋肉이나 뼈 또는 關節 등의 疼痛을 비롯하여 重着이나 屈伸不利와 같은 運動障礙 및 感覺異常을 나타내는 病證을 말한다^{9,11,12,41,45}. 痺證은 病邪의 特徵에 따라 風·寒·濕·熱痺 등으로 分類되며, 發病部位 및 發病樣相에 따라서도 각각 그 分類方法에 다르다. 痺證의 證狀들을 皮·肌肉, 筋骨, 臟腑의 部位별로 나누어 考察하여 보면, 皮·肌肉部位에 나타나는 痺證은 주로 感覺障礙에 該當되고, 筋骨部位에서는 筋攣·骨重·關節疼痛 등 주로 運動障礙의 症狀들이 나타나고 있으며, 臟腑에서는 각기 해당하는 臟腑의 病症들이 나타나는데, 이는 危症에 屬한다¹². 痿證은 手足이 痿軟無力한 病證으로서, 肢體柔弱不用과 下肢가 軟弱無力하여 步行이 不可能한 症狀을 나타낸다^{43,44}. 그러나 이들 病證들은 모두 活動障礙와 肌肉萎縮을 수반하고 있다^{12,41,46}.

韓醫學에서 麻는 雖不知痛痺이나 尙覺氣微流行하는 것이고, 木은 氣亦不覺流行하며⁴⁷, 或은 風邪走皮膚中如蟲

行하는 것으로 이는 麻木이 四肢 或은 全身의 感覺障礙를 일으키는 狀態를 말하는 것이다¹³⁾. 그러므로 麻木不仁은 肌部知覺의 消失로 인하여 痛痒을 알지 못하는 感覺障礙를 초래하는 病症으로서 이의 치료를 위하여 한의학에서는 扶正祛邪하는 것을 根幹으로 하였다^{13,43)}.

鈞鈞藤(Ramulus et Uncus Uncariae)은 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 常綠 木質藤本인 鈞鈞 혹은 華鈞藤의 가시를 포함한 줄기를 햇볕에 말리거나 썬서 乾燥한 藥材로서 鈞藤, 鈞藤, 鈞鈞, 芘藤鈞, 嫩鈞藤, 雙鈞藤, 鈞屯 등의 異名을 가지고 있다¹⁶⁻²⁰⁾. 그리고 性味가 甘苦微寒 無毒하고 效能이 清熱, 平肝, 熄風, 鎮驚하여 小兒驚, 頭昏目眩, 中風癱瘓, 筋脈拘攣 등의 諸症狀에 사용되어 왔다¹⁶⁻²²⁾.

실제 臨床에서도 鈞鈞藤은 高血壓 頭昏이나 目眩 및 神經性 頭痛 등의 치료에 頻用할 뿐만 아니라 척수 및 말초신경의 손상에 의한 마비와 뇌졸중 등에 유효한 효과가 있는 것으로 보고되고 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

또한 古來로 鈞鈞藤은 오래 달이면(久煎) 약효가 약하고 약 15분 정도 달이는 것이 가장 약효가 강하다고 기록되어 있고, 실제 김²³⁾이 鈞鈞藤의 血壓降下作用을 가지고 시간별 약효를 분석한 실험적 研究에서도 이에 상응하는 결과가 나왔다.

鈞鈞藤의 주요 성분으로는 최초로 분리된 rhynchophylline을 비롯하여 수종의 oxyindole계 alkaloid 류, 즉 isorhynchophylline, dihydrocorynantheine, hirsutine, firsutine, 3- α -dihydrocadambine, corynoxine, 및 isocorynoxine 등이 분리 확인^{17,19,23)} 되었고, 생리활성의 研究로는 alkaloid 성분의 혈압강하 혹은 혈압확장 작용에 관한 것이 多數 보고²⁴⁻²⁷⁾ 되었다. 그 외 김 등²⁸⁻³⁰⁾은 鈞鈞藤이 신경계통의 鎮痛, 鎮靜, 抗痙攣 作用이, 李³¹⁾는 鈞鈞藤의 phospholipase C γ 1 저해 성분과 그 항암 효과에 대해 보고한 바가 있으나, 感覺神經障礙의 效果에 관한 研究는 아직 수행된 바가 없다.

척수병변은 외상이나 면역저하등과 같은 요인들에 의하여 척수를 구성하고 있는 지각신경세포나 운동신경세포의 손상에 기인하게 된다^{7,38)}. 이 경우 신경섬유의 손상은 회복이 가능하지만^{48,50)} 일단 신경세포체가 손상이 되면 재생이 되지 않기 때문에 이의 손상은 지각의 소실은 물

론 운동기능의 상실을 초래함으로써 결국 인간으로서의 고귀한 삶을 포기케 한다^{49,54)}. 지금까지 신경세포를 저해하는 병인으로 알려진 것을 살펴보면 酸素自由基와 excitotoxic amino acids (EAAs) 및 신경성장인자(neurotrophic factor, NTF)의 결핍 등이 있다.

특히 酸素自由基는 세포막에서 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐만 아니라^{55,56)} 질소자유기의 하나인 nitric oxide (NO)와 상호 작용함으로써 독성이 강한 물질인 peroxynitrite을 생성하여 병변을 더욱 가속화시킨다고 한다⁵⁷⁾. 이중 reactive oxygen species (ROS)나 reactive nitrogen species (RNS)와 같은 自由基는 생체내에서 여러 생리적인 반응에 관여하고 있으나^{3,58)}, 이들이 필요 이상 형성되는 경우는 세포막의 불포화지방산을 과산화시켜 그 결과 지질과산화반응을 가속화시킬 뿐만 아니라, 세포질내의 protein kinase C (PKC)와 같은 이차전달자의 변성, 단백질 및 DNA합성 억제를 촉진시킨다고 한다^{9,52,54)}. 특히 酸素自由基는 항산화계에 영향을 주어 superoxide dismutase (SOD)나 catalase와 같은 항산화효소의 기능을 저하시킴으로써 인체내에 불필요한 酸素自由基의 축적을 초래케 하여 각종 세포나 조직에 산화적 손상을 유발한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다^{51,56,58,59,60)}. 최근의 研究에서 酸素自由基는 배양 해마신경세포에서 흥분성아미노산(excitatory amino acid, EAA)의 분비를 촉진시킨다고 보고됨으로써 酸素自由基와 흥분성아미노산과의 상호작용에 대한 현상이 밝혀지게 되었다^{1,38,52,59,61-63)}. 더욱이 이같이 분비된 酸素自由基는 세포내 자유 Ca²⁺의 농도를 증가시켜 결국 세포의 사멸을 초래함은 물론이고^{12,58,64)}, NO와 작용함으로써 peroxynitrite라는 맹독성물질을 형성하여 세포의 손상을 가중시킨다고 한다^{14,49,65,66)}. 최근의 研究에 의하면 근위축성측삭경화증이 SOD-1 유전자의 돌연변이에 의하여 과량의 酸素自由基가 환자의 뇌 속에 축적된다는 것이 밝혀지면서 중추나 말초신경계를 구성하고 있는 신경세포손상의 병인으로 증명되었다^{6,49,50)}.

그러나 酸素自由基의 독성효과에 대하여 아직까지 자세한 기전규명이 되어 있지 않았을 뿐만 아니라 또한 酸素自由基의 산화적 손상으로 인하여 유발되는 각종 신경병변에 대한 효과적인 치료방법이 매우 미흡하다. 그러나

다행히도 최근에 한약추출물을 비롯한 천연추출물들이 항산화효과나 세포성장인자 와 같은 약리적 활성을 가지고 있어 실제로 동물을 대상으로 한 많은 임상실험에서 산화적 손상에 의하여 유발되는 질환의 치료에 매우 효과적인 연구결과가 보고되어지고 있다.^{36,38,67)}

이에 著者는 血壓降下 作用을 비롯하여 鎮痛·鎮靜·抗痙攣 등의 效能을 가지고 있는 鈎鈎藤이 酸素自由基의 산화적 손상에 의하여 유발되는 感覺神經障礙에 대한 影響을 조사하기 위하여 생쥐의 脊髓後根神經節細胞에 鈎鈎藤 및 H₂O₂를 처리한 후 MTT assay, NR assay를 비롯하여 LDH 활성측정, 총단백질양의 측정, Neurofilament 측정 및 Lipid peroxidation의 측정하였다.

酸素自由基의 신경독성효과를 조사하기 위하여 본 실험에서는 순수분리 배양한 생쥐의 脊髓後根神經節細胞에 여러 농도의 H₂O₂에 노출시킨 후 MTT assay와 NR assay를 시행한 결과 H₂O₂를 배양 신경세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 대조군에 비하여 세포생존율의 유의한 감소를 보였다. 특히, MTT assay에 있어서 40 μ M H₂O₂ 농도에서 5시간 동안 처리한 결과 MCV(midcytotoxicity value)값을 나타냈으며(Table I, Fig. 1). NR assay에서는 25 μ M H₂O₂ 농도에서 5시간 동안 처리에서 MCV값을 나타냈다(Table III, Fig. 3). 본 실험에서 NR 50 과 MTT 50 값이 모두 100 μ M이하로 나타남으로써 이 값은 Borenfreund와 Puerner⁵⁴⁾의 독성판정기준에 의하여 H₂O₂를 培養脊髓後根神經節細胞에 고독성(NR50, MTT50<100 μ M)인 것으로 나타났다.

本 實驗의 이같은 結果는 H₂O₂가 脊髓後根神經節細胞에 독성효과를 가지고 있음을 말하는 것으로, 이는 Kim과 Kim⁴³⁾이나 임³⁸⁾이 酸素自由基에 의하여 신경세포가 손상되었다는 연구결과와 일치하였다. 따라서 이 같은 연구결과들은 酸素自由基의 산화적 손상이 신경독성에 관여하고 있음을 말해 주고 있다. 이러한 현상은 아마도 酸素自由基가 세포내 손상을 주어 그 결과 항산화효소의 酸素自由基의 제거 능력이 감소된 결과일 가능성이 클 것으로 생각된다. 이러한 가설의 증명의 하나로 xanthine oxidase (XO)를 신경세포에 처리한 후 SOD와 같은 항산화제로 처리한 결과 세포의 생존율이 크게 증가되었다는 많은 研

究들이 보고된 바 있다.^{5,49,50,58)} 본 실험에 있어서도 H₂O₂는 培養된 脊髓後根神經節細胞에 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포막의 lipid peroxidation을 촉진함으로써 TBARS의 유의한 증가와 세포생존율의 감소를 보였다. 이는 모두 세포의 항산화효소의 손상에 의한 결과로서 위와 같은 연구 결과를 뒷받침하고 있다.

H₂O₂가 神經細胞의 분화에 미치는 양적 측정을 위하여 neurofilament EIA를 시행하였다. Neurofilament의 측정을 위하여 neurofilament EIA에 있어서 먼저 H₂O₂가 neurofilament의 양적변화에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 培養된 脊髓後根神經節細胞에 H₂O₂를 1~70 μ M이 각각 포함된 배양액에서 5시간 동안 처리한 결과 처리한 농도에 비례하여 유의한 neurofilament의 양적 감소를 보였다. 특히, 35 μ M 농도에서 H₂O₂의 MCV값을 나타내었다(Table V, Fig. 5). 이에 비하여 35 μ M H₂O₂를 培養 脊髓後根神經節細胞에 처리하기 전 1~60 μ g/ml의 鈎鈎藤이 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 경우 조구 등의 처리 농도에 비례하여 neurofilament의 양적 증가를 보였다. 1~30 μ M H₂O₂ 조구 등의 처리에서는 대조군(100%)에 비하여 50~70%이상으로 나타나는 H₂O₂만의 처리(41.2%)에 비하여 모두 증가한 것으로 나타났다. 특히, 60 μ g/ml 농도에서는 대조군에 비하여 86.6%(p<0.05)로 나타남으로서 이는 H₂O₂만을 처리한 경우에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Table VI, Fig. 6).

培養 脊髓後根神經節細胞에 H₂O₂가 지질과산화반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 H₂O₂가 1~50 μ M 까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 神經細胞를 5시간 동안 배양후 lipid peroxidation을 조사하였다. H₂O₂는 배양 신경세포에 처리한 결과 처리농도와 시간에 비례하여 TBARS 농도를 유의성있게 증가시켰으며 또한 세포생존율의 감소를 나타냈다. 동시에 30 μ M H₂O₂ 농도에서 MCV값을 나타냈다(Table VII, Fig. 7). 이같은 결과는 酸素自由基가 세포막의 인지질과 작용하여 막손상을 초래한 결과로서 결국 세포의 퇴화나 사멸을 일으키게 된다.^{5,6,30,68,69)} 한편 H₂O₂에 의하여 손상된 培養 脊髓後根神經節細胞에 대한 鈎鈎藤의 영향을 알아보기 위하여 30 μ M H₂O₂ 농도에서 5시간 동안 노출시키기 2시간 전에 15~

120 μ g/ml 鈎鈎藤이 각각 포함된 培養液에서 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 TBARS 농도의 감소를 나타냈다. 특히, 60 μ g/ml과 120 μ g/ml의 鈎鈎藤처리에서는 각각 41.7% ($p < 0.01$)와 30.1% ($p < 0.01$)로 나타나 H_2O_2 만을 처리한 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다(Table VIII, Fig. 8).

H_2O_2 와 산화적 손상에 의한 세포막의 손상 정도를 정량적으로 측정하기 위하여 LDH 활성도를 조사하였다. 培養 脊髓後根神經節細胞에 있어서 H_2O_2 의 농도에 따른 LDH 활성도를 조사하기 위하여 細胞培養液내로 유출된 LDH양을 대조군과 비교 조사하였다. H_2O_2 가 1~40 μ M 농도로 각각 포함된 배양액에서 脊髓後根神經節細胞를 처리한 결과 처리농도에 비례하여 LDH 양적 증가를 보였으며, MCV값은 20 μ M H_2O_2 농도에서 나타났다(Table IX, Fig. 9). LDH의 양적 측정은 세포막의 손상 정도를 측정할 수 있는 지표로서 본 실험에 있어서와 같이 H_2O_2 의 처리농도와 시간에 비례하여 LDH의 양적 증가를 보인 것은 H_2O_2 가 세포막에 손상을 주었다는 것을 의미하며 이는 본 실험에 있어서 H_2O_2 에 의한 지질과산화반응의 증가와도 일치되는데, 즉 이 반응의 촉진에 의하여^(6,57,58,70,71), 그 결과 세포막의 손상으로 인하여 세포내의 LDH가 빠져나온 것으로 생각된다^{(17,36,50(61,72,73))}. 한편 LDH활성도 측면에서 H_2O_2 에 의하여 손상된 培養 脊髓後根神經節細胞에 대한 鈎鈎藤의 效果를 조사하기 위하여 20 μ M H_2O_2 농도에서 노출시키기 전에 10~100 μ g/ml 鈎鈎藤이 각각 포함된 培養液에서 5시간 동안 전처리한 경우 H_2O_2 를 처리한 농도에 비례하여 LDH의 양적 감소를 보였으며 또한 100 μ g/ml 鈎鈎藤 처리에서는 대조군에 비하여 40.5% ($p < 0.01$)로 매우 유의한 감소를 나타냈다(Table X, Fig. 10).

本 實驗의 結果는 鈎鈎藤이 酸素自由基에 의한 세포막의 손상을 방어해 준 것으로서 이는 막의 지질과산화반응을 억제해준 것과도 일치한다고 생각된다. 따라서 鈎鈎藤은 酸素自由基를 제거해 주는 항산화효과와 같은 약리적 활성을 가지고 있음을 제시한다 하겠다.^(6,55,71,74,75)

H_2O_2 가 培養 脊髓後根神經節細胞에 미치는 영향을 총 단백질양의 측면에서 조사하기 위하여 SRB 분석을 행한

결과 H_2O_2 의 처리농도에 비례하여 총단백질양이 감소하였으며, 50 μ M H_2O_2 처리농도에서 MCV값을 나타내었다(Table, Fig. 11). 50 μ M H_2O_2 농도에서 5시간 동안 노출시키기 2시간 전에 10~80 μ g/ml 鈎鈎藤이 각각 포함된 培養液에서 신경세포를 전처리한 경우 鈎鈎藤을 처리한 농도에 비례하여 단백질양의 증가를 보였으며, 특히 80 μ g/ml 鈎鈎藤의 처리에서는 81.2% ($P < 0.05$)로 나타나 이는 50 μ M H_2O_2 만을 처리한 경우(42.6%)에 비하여 유의한 증가를 보였다(Table, Fig. 12).

이상의 實驗 結果를 綜合해 볼 때 H_2O_2 는 세포생존율을 감소시킴으로서 神經毒性을 나타냈다. 이에 대하여 한 약추출물인 鈎鈎藤은 neurofilament의 量的 增加를 비롯하여 lipid peroxidation의 減少, LDH량의 減少 및 총단백질양의 增加를 나타냄으로서 神經毒性의 방위에 매우 효과적이었으며 韓醫學의 측면에서 痺證, 麻木으로 분류되는 感覺神經의 損傷病變에 有效한 藥理的 활성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

V. 結 論

鈎鈎藤(Ramulus et Uncus Uncariae)이 酸素自由基(oxygen free radicals)에 의하여 損傷된 培養脊髓感覺神經節細胞에 미치는 影響에 關한 研究 結果는 다음과 같다.

1. NR 분석법과 MTT 분석법에 있어서 생쥐의 培養 脊髓後根神經節細胞에 H_2O_2 를 처리한 농도와 시간에 비례하여 유의한 세포생존율의 감소를 보였다.
2. 생쥐의 培養 脊髓後根神經節細胞에 H_2O_2 를 처리한 농도와 시간에 비례하여 SRB분석법에 의한 총단백질양의 감소를 비롯하여 neurofilament enzyme-immunoassay (ELA)에 의한 신경세사의 양적 감소, LDH양의 증가 및 lipid peroxidation의 증가를 나타냈다.
3. H_2O_2 에 의하여 유도된 신경독성에 대한 鈎鈎藤의 영향에 있어 H_2O_2 만의 처리에 비하여 총단백질과

neurofilament의 양적 증가를 보인 반면, LDH 활성과 lipid peroxidation에 있어서는 유의한 감소를 보였다.

이상의 결과로부터 H₂O₂는 생쥐에서 분리한 培養 脊髓 後根神經節細胞에 神經毒性을 나타냈으며, 鈞鈎藤과 같은 한약추출물이 H₂O₂의 산화적 손상으로 부터 신경세사와 총단백질의 양적 증가와 lipid peroxidation과 LDH 활성을 유의하게 감소시킴으로서 脊髓感覺神經節細胞 損傷에 효과적으로 作用한 것으로 나타나 韓醫學에서 痺證, 麻木으로 분류되는 感覺神經의 損傷病變에도 效果的으로 活用할 수 있으며 向後 이에 대한 臨床的인 研究가 보완되어져야 할 것으로 思料된다.

參考文獻

1. Levi-Montalcini : The nerve growth factor : Thirty-five years later. JEMBO(Eur Mol Biol Organ) 6 : 1145-1154, 1987.
2. Lesniak MA, Hill JM, Kiess W, Rojeski M, Pert CB, Roth J : Receptors for insulin-like growth factors I and II : Autoradiographic localization in rat brain and comparison to receptors for insulin. Endocrinology 123 : 2089-2099, 1988.
3. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A et al. : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature(London) 362:59-62, 1993.
4. Floyd RA : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J 4:2587-2597, 1997
5. Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU : Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists, Neurotoxicology 17:37-46, 1996.
6. Rothstein JD, Tsai G, Kunel RW, Clawson S, Cornblath DR, Drachman DR, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT : Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 28 : 18-25, 1990.
7. Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU : Oxygen radical- induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J Neurosci Res 37:62-70, 1994.
8. Jackson GR, Apfell L, Werrbach-Perex K, Perex-Polo JR : Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balanced and neuronal infury. 1. Stimulation of hydrogen peroxide resistance. J NeurosciRes 25 : 360-368, 1990.
9. 宋峰根 : 痺證의 形證과 病域에 관한 文獻的 考察, 원광대학교 대학원 학위논문(석사), 1985.
10. 朴建培·黃致元 : 三痺症의 治方에 對한 文獻的 考察, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集 7(2):453-478, 1999.
11. 姜仁守 : 痺證治療의 用藥에 關한 小考, 大韓韓醫學會誌, 11(1):245-252, 1990.
12. 南相環·芮鏡旭 : 痺證의 分類 및 症狀에 對한 文獻的 考察, 東西醫學, 17(3):36-56, 1992.
13. 朴재현·임재훈 : 麻木에 對한 文獻的 考察, 동서의학, 41:32-40, 1989.
14. Suzuki J, Fujimoto S, Oba M : The protective effects of combined administration of anti-oxidants and perfluorochemicals on cerebral ischemia, Stroke, 15:672-678, 1984.
15. 尹向錫·朴承澤·洪起年·李康昌·李廷憲·柳道坤 外 : 脊髓 感覺神經節 細胞에 對한 重金屬 및 酸素遊離氣의 細胞損傷에 미치는 韓藥劑의 神經細胞損傷 回復에 미치는 影響에 對한 研究, 대한동의병리학회지 14(1):113-121, 2000.
16. 王浴生 : 中藥藥理與應用, 北京, 人民衛生出版社, pp.408-443, 1984.
17. 陳存仁 : 圖說 漢方醫藥大辭典, 서울, 도서출판 松嶽, pp.(IV)90, 1988.
18. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, pp.658-659,

- 1986.
19. 金昌玟·辛民教·安德均·李京淳 外 譯 : 完譯 中藥大辭典(全10卷 第1卷), 서울, 圖書出版 鼎談, pp.423-427, 1999.
 20. 李盛雨·盧昇鉉: 鈞鈞藤에 관한 文獻的 研究, 大韓韓醫學會誌 第8卷第1號 附錄 本草分科學會誌 2(1): 53-58, 1987.
 21. 許 俊 : 國譯增補 東醫寶鑑, 南山堂, 서울, p.1231, 1992.
 22. 明·李時珍 : 本草綱目 第二冊, 北京, 人民衛生出版社, pp.1319-1320, 1977.
 23. 김중문 : 조구등과 홍삼의 성분에 관한 연구, 서울대 대학원 학위논문(박사), 1995
 24. Y. Joji, M.Shuji, M. Hisashi, K. Hogo, Nippon Yakurigaku Zasshi, 90(3), 133 (1987)
 25. K. Endo, Y. Oshima, H. Kikuchi, Y. Kodihara, H. Hikino, J. Med. Plant Research, 49, 188(1983)
 26. J. D. Phillipson, S. R. Hemingway, Lloydia, 41(6), 503 (1978)
 27. Chag, P., Koh, Y. K., GEH, S. L., Soepadmo, E., Goh, S. H., and Wong, A. K., J. of Ethnopharmacology, 25, 213-215(1989)
 28. 김동영 : 조구등(鈞鈞藤) 성분의 항경련 효과 I: 에틸 아세테이트 분획의 항경련 효과, 생약학회지, 104:53-57, 1996
 29. 김동영: 조구등 추출물의 항경련 효과 기전 및 활성성분의 분리, 경성대 대학원 학위논문(박사), 1998
 30. 김정현·송춘호: 鈞鈞藤水鍼이 鎮痛 및 鎮痙效果에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 12(1):310-319, 1995
 31. 이지숙 : 조구등의 phospholipase C γ 1 저해 성분과 그 항암 효과, 서울대 대학원 학위논문(박사), 1998.
 32. Kim SU, Osborne D, Kim MW, Spigelman I, Puil E, Shin D : Long-term culture of human fetal spinal cord neurons : Morphological immunocytochemical and electrophysiological characteristics. Neuroscience 25:659-670, 1988.
 33. Mosmann T., : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods, 65:55-63, 1983.
 34. Takahashi K, Fujita T., Mayum T., Kish T., : Effect of Adriamycin on Cultured mouse embryo myocardial cells. Chem. Pharm., 35(1): 326-334, 1987.
 35. Neil R. Carlson : Foundations of Physiological Psychology 4th Edition, USA, Allyn and Bacon, pp.78-80, 194-198, 1999.
 36. 田炳薰·姜益賢·文炳淳 : 人蔘이 산소유리기로 손상된 척수신경세포의 손상에 미치는 영향, 대한동의병리학회지, 12(1):96-101, 1998.
 37. Park BR, Kim MS, Kim SG, Kim HK, Kim SS : Effect of intermittent electrical stimulation of muscle atrophy in hindlimb suspended rats, Proceeding of the 1st International FES Symposium, Japan, pp. 223-229, 1992.
 38. Zeman S, Liloyd C, Meldrum B, Leigh PN : Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease, Neuropathol. Appl Neurobiol., 20:219-231, 1994.
 39. Mayer ML, Westbrook GL : Permeation and block of N-methyl- D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons, J. Physiol., 394:501-527, 1987.
 40. Gregory D. Cramer, Susan A. Darby : Basic and clinical anatomy of the Spine, Spinal cord, and ANS, St. Louis, Mosby, pp.296-299, 1995.
 41. 박연용·박성하: 痺症의 病因及 發病機轉에 關한 文獻的 考察, 동의논집 자연과학 20:201-209, 1993.
 42. 이재수·김광중: 內經의 원리를 기반으로한 痺症에 대한 연구, 경산대동서의학 64:83-92, 1995.
 43. 謝 觀: 中國醫學大辭典(下), 北京, 商務印書館國際有限公司, p.3540, 3543, 1921.
 44. 楊維傑編 : 黃帝內經譯解(素問), 서울, 成輔社, pp.328-336, 337-342, 1980.

45. 楊維傑編 : 黃帝內經譯解(靈樞), 서울, 成輔社, pp.68-74, 1980.
46. 漢醫學大辭典編纂委員會 : 漢醫學大辭典 基礎理論編, 서울, p.79, 255, 1989.
47. 李 樞: 醫學入門, 서울, 南山堂, pp.204-212, 1982.
48. 朴承澤·田炳薰·朴炳林 : 배양 희소돌기아교세포에 있어서 酸素自由基의 神經毒性에 대한 淫羊藿의 效果, 대한동의병리학회지, 11(2):58-62, 1997.
49. Kim YS, Kim SU : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. J Neurosci Res 29:100-106, 1991.
50. Borgers M, Vandeplassche G, van Reempts J : Cytochemical markers of ischemia in the heart and brain. Histochem J 22:125-133, 1990
51. Cao UJ, Carney M, Duchan A, Floyd RA, Chevian M : Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. Neurosci Lett 88:233-238, 1988
52. Mayevsky A : Brain redox state monitored in-vivo by fiberoptic surface fluorometry. Brain Res Rev 7:49-68, 1984
53. Smith DS, Rosenthal M, Nioka S, et al. : Brain cytochromes and changes in brain energy state. Soc Mag Res 4:1113-1114, 1986
54. Borenfreund E., Puerner J. A., : A Simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). J. Tiss. Cult. Meth., 9:7-9, 1984
55. Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T : A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpa-tocopherol administration, Stroke, 14:977-982, 1983.
56. Baird A, Walicke P : Fibroblast growth factors. Br Med Bull 45:438- 452, 1989
57. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem 59:1609-1623, 1992.
58. 李星根·成彊慶·朴承澤·鄭遇悅 : 신경세포성장인자로서 척수운동신경세포의 손상에 미치는 한약재의 약류별 효능 및 기전에 관한 연구, 동의병리학회지, 12(2):40-48, 1998.
59. Finklestein SP, Apostolids PJ, Caday CG, Prosser J, Philips MK, Klagsbrum M : Increased basic fibroblast growth factor(bFGF) immunoreactivity at site of focal brain wounds. Brain Res 460 :253-259, 1988.
60. Michelon AM, Puget K : Cell penetration by exogenous superoxide dismutase. Acta Physiol Scand Suppl 492 : 67-77, 1980.
61. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla V, Moroni F : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation, J. Neurochem., 51:1960-1963, 1988.
62. Kontos H, Wei E, Ellis E Jenkins L, Povlishock J, Rowe G, Hess M : Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cat. Circ Res 57:142-151, 1985.
63. Erencinska M, Silver IA : ATP and brain function. J Cereb Blood Flow Metab 9:2-19, 1989
64. 이원택·박경아 : 의학신경해부학, 서울, 고려의학, pp. 329-342, 1996.
65. Pellegrini-Giampietro DE, 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.
66. Elion GB, Kovensky A, Hitchings GH, Metz E, Rundles RW : Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. Biochem Pharmacol 15:863-880, 1966.
67. 최공한·강형원·유영수 : 七福飲加味方이 Glucose

Oxidase에 의해 손상된 大腦皮質神經細胞에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 10(1):53-78, 1999.

68. 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 Biol Med 196:36-41, 1991.
69. Choi DW : Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. J Neurosci 7:369-379, 1987.
70. Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J : NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. Nature (London) 336:68-70, 1988.
71. Hall E, Braugher JM : Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. Cent Nerv System Trauma 3:281-294, 1986.
72. Mattson MP, Cheng B, Smith-Swintosky VL : Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium and free radical mediated excitotoxic injury : Implications for treating neurodegenerative disorders. J Exp Neurol 124:89-95, 1993.
73. Saunders RD, Dugan LL, Demediuk P, Means ED, Harrocks LA, Anderson DK : Effect of methyl prednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. J Neurochem 49:24-31, 1987
74. Nistico G, Ciriolo MR, Fiskin D, Iannone M, DeMartino A, Rotilio G : NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of aged rat. Free Rad Biol Med 12 : 177-181, 1992.
75. Savage CR jr, Cohen S : Epidermal growth factor and a new derivative. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization. J Biol Chem 247 : 7609-7611, 1972.

=Abstract=

A Study on the Effects of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) on the Cultured Spinal Dorsal Root Ganglion Neurons Damaged by Oxygen Free Radicals

Hyung-Won Kang · Jin-Sung Park* ·

Yeong-Su Lyu* · Jin-Mo Chung** · Geon-Mok Lee

Dept. of The Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Won Kwang University, Iksan, Korea

*Dept. of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Won Kwang University, Iksan, Korea

**Dept. of Anatomy & Neurosciences, University of Texas Medical Branch 301 University Boulevard, Rt. 1069, Galveston, Texas 77555-1069

To study the effects of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) on oxygen free radical-mediated damage by hydrogen peroxide (H_2O_2) on cultured spinal sensory neurons, in vitro assays such as MTT assay, NR assay, neurofilament enzymeimmuno assay (EIA), sulforhodamine B (SRB) assay, assay for lactate dehydrogenase (LDH) activity and assay for lipid peroxidation were used in cultured spinal dorsal root ganglion neurons derived from mice. Spinal dorsal root ganglion neurons were cultured in media containing various concentrations of H_2O_2 for 5 hours, after which the neurotoxic effect of H_2O_2 was measured by in vitro assay. The protective effect of the herb extract, Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) against H_2O_2 -induced neurotoxicity was also examined. The results are as follows.

1. In NR assay and MTT assay, H_2O_2 significantly decreased the cell viability of cultured mouse spinal dorsal root ganglion neurons according to exposure

concentration in these cultures. An additional time course study was done on these cultures.

2. Cultured spinal dorsal root ganglion neurons which were exposed to various concentrations of H_2O_2 showed a quantitative decrease of neuronal cells by EIA and of total protein by sulforhodamine B (SRB) assay, while they showed an increase of both lipid peroxidation and LDH activity.

3. The effect of Ramulus et Uncus Uncariae (REUU) on H_2O_2 induced neurotoxicity showed a quantitative increase in both neurofilament and total protein, but showed a decrease of lipid peroxidation and LDH

activity.

These results suggest that H_2O_2 has a neurotoxic effect on cultured spinal dorsal root ganglion neurons from mice and that the herb extract, Ramulus et Uncus Uncariae (REUU), was very effective in protecting H_2O_2 induced neurotoxicity by decreasing lipid peroxidation and LDH activity.

"This work was supported by the Brain Korea 21 Project."