

# 白屈菜가 손상된 배양척수감각신경세포에 미치는 영향

신병철 · 송용선

원광대학교 한의과대학 한방재활의학교실

## Effects of Herbar Chelidonii on the Cultured Spinal Sensory Neurons Damaged by XO/HX

Byung-Cheul Shin, O.M.D., Ph.D., Yung-Sun Song, O.M.D., Ph.D.

*Dept. of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Won Kwang University*

**Objectives and Methods :** To evaluate the mechanism of oxidative damage by xanthine oxydase(XO) and hypoxanthine(HX)-induced oxygen radicals, MTT assay and NR assay were carried out after the cultured mouse spinal sensory neurons were preincubated for 4 hours with various concentrations of XO/HX. And the amount of total protein, neurofilament EIA, lipid peroxidation and LDH activity were measured, to evaluate the protective effect of Herbar Chelidonii(HC) water extract on cultured spinal sensory neurons damaged by XO/HX, after the cultured mouse spinal sensory neurons were preincubated with various concentrations of HC water extract for 3 hours prior to exposure of XO/HX.

**Results :** XO/HX decreased significantly the survival rate of the cultured mouse sensory neurons by NR assay and MTT assay in proportion to concentration and exposed time. In proportion to concentration and exposed time on cultured spinal sensory neurons, XO/HX showed the quantitative decrease of neurofilament by EIA, the decrease of total protein amount by SRB assay and the increase of lipid peroxidation as well as LDH. HC showed the quantitative increase of neurofilament and total protein, but showed the decrease of lipid peroxidation and LDH activity against the neurotoxicity of XO/HX.

**Conclusions :** From the above results, it is concluded that XO/HX have a neurotoxic effect on cultured spinal sensory neurons and that the herbs extract, such as HC, prevent the toxicity of XO/HX effectively in that they decrease lipid peroxidation and LDH activity.

**Key Words :** Herbar Chelidonii(HC), Xanthine Oxydase(XO), Hypoxanthine(HX), Spinal Sensory Neurons, Oxygen Radicals

## I. 緒 論

척수는 중추신경계의 한 부분으로 적은 면적에 비해 거의 모든 운동계와 감각계를 포함하고 있기 때문에 손상받은 부위가 아무리 미세하더라도 사지마비, 대마비, 감각장애 등을 일으키게 된다<sup>1)</sup>. 척수 질환은 상당히 많은 원인에 의하여 발생되지만 염증, 종양, 손상, 혈관질환, 변성, 탈수초 질환 등이 대부분을 차지한다<sup>1)</sup>.

이러한 신경손상의 병태생리를 살펴보면 국소혈류의 감소에 따른 일련의 대사물질에 의해 산소자

유기<sup>2)</sup>, 글루타민산 등의 독성물질이 생성되거나 침착되어 이들의 상호작용에 의해 신경세포는 사망하게 되어 운동마비, 감각장애를 포함한 신경학적인 증후를 나타내게 된다<sup>3,4)</sup>.

신경손상의 원인이 되는 산소자유기는 정상적인 대사과정에서 인체내에 소량이 만들어지나 이는 곧 superoxide나 catalase 등과 같은 항산화제들에 의하여 물로 변환되면서 소실된다<sup>5)</sup>. 그러나 뇌허혈이나 근위축성측삭경화증과 같은 많은 신경병변에 있어서 산소자유기가 과량 형성되어 신경조직에 축적이 됨으로서 신경원이나 신경교세포 등과 같은 신경조직의 구성에 산화적 손상을 초래함으로써 신경세포

는 물론 병변을 더욱 악화시키는 이미 잘 알려진 사실이다<sup>6)</sup>.

척수감각신경의 손상질환인 척수염, 척수압박증, 척수변성질환, 척수손상, 척수혈관질환은 대부분肢體의 癱瘓이나, 힘이 약해지거나, 근육의 위축, 감각장애 등이 나타나는데 이는 한의학의 痺證, 痿證, 麻木과 유사하다<sup>1,7-12)</sup>. 痺證과 痿證은 모두 사지의 活動障礙가 공통적이거나, 痺證의 임상특징은 四肢軀體의 關節肌肉이 疼痛한 것이며, 통증이 없는 痿證은 운동신경장애에 가까우며, 不知覺痛痒하는 麻木은 감각의 소실로 볼 수 있다<sup>13)</sup>.

白屈菜(Herba Chelidonii)는 罂粟科에 속한 多年生 草本인 애기똥풀의 全草로서<sup>14)</sup>, <救荒本草>에 처음으로記載된 이래 理氣止痛, 利水消腫, 解瘡毒의 效能<sup>15)</sup>이 있어, 脚氣病, 胃脘疼痛, 下痢腹痛, 水腫, 咳嗽 등에 응용되어 왔다<sup>15,16)</sup>. 성분 및 약리작용에 관한 研究로는 Chelidone, protopine, Stylopin, Allocryptopine, Berberine 등이 家兔 小腸의 平滑筋을 억제시키고 鎮痙작용을 하며, 中樞神經 抑制作用, 抗癌作用, 抗菌作用, 心血管系에 대한 작용 등 많은 보고가 있다<sup>16)</sup>.

본 연구는 각종 신경병변의 병인적 요인으로 밝혀지고 있는 산소자유기의 독성에 대하여 罂粟科의 白屈菜를 선정하여 척수감각신경세포손상에 대한 방어효과를 실험적으로 究明해 보고자 하였다. Xanthine oxydase(XO)와 Hypoxanthine(HX)에 의한 배양된 생쥐의 척수감각신경세포에 대한 산소자유기의 독성효과를 MTT 定量, NR 定量을 통해 관찰한 후, 한약추출물인 白屈菜의 산소자유기에 의한 산화적 손상에 대한 방어효과를 Neurofilament EIA, Lipid peroxidation, SRB 定量, LDH 활성도를 측정하여 본 바 有意한 結果를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材 料

#### 1) 動 物

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

#### 2) 藥 材

本 實驗에 使用한 白屈菜는 圓光大學校 益山韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였다.

### 2. 方 法

#### 1) 檢液의 調劑

白屈菜 200g을 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 2시간 동안 電熱器로 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 凍結乾燥器에서 24시간 凍結乾燥하여 19.3g의 분말 시료를 얻었다.

#### 2) 藥劑 製造

本 實驗에 使用한 약제로는 xanthine oxydase (XO, Sigma)와 hypoxanthine (HX, Sigma)으로서 XO의 경우 100mU/ml, 10mU/ml, 1mU/ml의 저장액을, HX의 경우 1M, 100mM, 10mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 實驗 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 培養液에 첨가하여 使用하였다.

#### 3) 細胞 培養

脊髓感覺神經細胞의 분리는 Michikawa 등<sup>5)</sup>의 方

법에 따라 施行하였다. 즉 생후 3일된 생쥐에서 적출한 척수신경절은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 處理한 후 36°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air로 조절된 항온기 내에서 培養하였다. 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 3×10<sup>6</sup>cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 培養液으로 교환하여 주었으며 7일 동안 培養後 本 實驗에 사용하였다.

#### 4) 酸素自由基 處理

酸素自由基가 생쥐의 脊髓感覺神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 脊髓感覺神經細胞를 0.6%-D glucose가 함유된 EMEM으로 3회 세척한 다음 1~200mU/ml XO에 0.1~50mM HX를 여러 농도로 조합하여 혼합한 다음 이들 각각의 배양액에서 1~24시간 동안 처리한 후 분석하였다.

#### 5) 細胞毒性 및 防禦效果 檢定

##### (1) 細胞生存率 分析

##### ① MTT 定量

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma)> 定量은 Mosmann<sup>17)</sup>의 방법에 의하여었다. 酸素自由基나 항산화제를 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% CO<sub>2</sub> 로 조절된 항온기에서 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.

##### ② NR 定量

Neutral red(NR, Sigma)의 定量은 Borenfreund와 Puerner(1984)<sup>18)</sup>의 방법에 따랐다. 즉 여러 농도의 XO를 처리한 배양 신경세포를 PBS로 3회 세척 후 전날 제조한 5mg/ml의 NR을 well당 최종농도로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 로 조절된 항온기에서 배양하였다. 배양 완료후 PBS로 3회 세척후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 測定하여 대조군과 비교 조사하였다.

##### ③ Neurofilament enzymeimmuno assay(EIA)

배양중인 신경세포를 PBS로 3회 세척하여 알코올로 고정시킨 다음 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료후 NE14(1:100, Sigma)로 1시간 동안 반응시킨 후 0.04% O-phenylenediamine(OPD, Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide로 처리한 다음 Dynatech Microelisa reader로 490nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

##### ④ SRB 定量

산소자유기나 한약재 추출물로 일정시간 동안 처리한 척수감각신경세포에 0.4% sulforhodamine B를 200μl씩 첨가하여 1시간 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 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

##### ⑤ LDH 定量

LDH활성의 측정은 변형된 Takahashi 등(1987)<sup>19)</sup>의 방법에 의하여 행하였다. 즉, LDH kit(Atron lab,

Japan)의 효소기질액 1.0ml를 직경 10cm인 튜브에 넣은 후 여기에 검체인 배양액을 넣어 잘 혼합한 다음 37°C에서 10분간 반응시켰다. 10분후 회색반응 정지액 3.0ml를 넣어 혼합한 후 570nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

⑥ Lipid peroxidation 정량

Lipid peroxidation은 산소자유기나 한약재 추출물을 일정시간 동안 처리한 척수감각신경세포의 상층액과 세포용해액내의 Thiobarbituric Acid Reactive Substances(TBARS)를 측정한 것으로, 위의 액에 12N H2SO4와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0ml와 0.3ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응 완료후 TBA를 1.0ml를 가한 후 90°C에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각후 n-butanol로 처리하였다. n-butanol 처리완료 후 원침하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 측정하였다.

6) 통계 처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

III. 成 績

1. 酸素自由基의 毒性效果

1) 細胞生存率 分析

(1) MTT 定量

XO가 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1mU/ml에서 30mU/ml까지의 각각의 농도로 XO가 포함된 培養液에서 4시간 동안 培養한 후 XO의 독성효과를 MTT assay에 의하여 조사한 결과 1mU/ml XO 처리에서는 세포의 생존

율이 대조군(100%)에 비하여 71.9%로 나타났으며 10mU/ml의 처리에서는 62.5%로 나타났다. 그러나 20, 30mU/ml XO를 처리한 경우 세포 생존율은 각각 50.0%(p<0.05)와 37.5%(p<0.01)로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났다(Table I).

Table I. Absorbance(% of control) at 590nm Wavelength for the MTT Assay on Xanthine Oxydase(XO) in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO(mU/ml)	MTT absorbance(590nm)	Decrease of cell viability(%)
control	0.64 ± 0.07	-
1	0.46 ± 0.05	28.1
10	0.40 ± 0.06	37.5
20	0.32 ± 0.04*	50.0
30	0.24 ± 0.02**	62.5

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with various concentrations of xanthine oxydase(XO) for 4 hours. The values are the mean ± SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks.

\*p<0.05; \*\*p<0.01

XO/HX가 시간에 따라 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 20mU/ml XO/0.1mM HX가 포함된 培養液에서 脊髓感覺神經細胞를 각각 1~9시간 동안 培養한 후 세포의 생존율을 MTT assay에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 1시간 培養에서는 대조군(100%)에 비하여 79.4%의 세포생존율을 보였다. 또한 3시간 培養에 있어서는 63.8%로 대조군보다 다소 낮게 나타났으며 6시간 培養에서는 대조군에 비하여 47.5% (p<0.05)로, 9시간 培養에서는 27.8%(p<0.01)로 각각 나타났다 (Table II).

Table II. Time-response Relationship of Xanthine Oxydase(XO) and Hypoxanthine (HX) by MTT Assay in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO/HX (mU/ml/mM)	MTT absorbance(590nm)				
	0hr	1hr	3hrs	6hrs	9hrs
0	0.61 ± 0.08	0.63 ± 0.04	0.61 ± 0.07	0.57 ± 0.05	0.54 ± 0.03
	0.52 ± 0.06	0.50 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.27 ± 0.04*	0.15 ± 0.01**

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with 20mU/ml XO/0.1mM HX 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

## (2) NR 定量

일정시간 동안 배양한 脊髓感覺神經細胞를 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 XO가 1mU/ml에서 30mU/ml까지의 농도로 각각 포함된 培養液에서 4시간 배양한 다음 세포의 생존율을 조사한 결과 1mU/ml의 처리에서 세포생존율은 대조군(100%)에 비하여 80.4%로 나타났으며 5mU/ml와 15mU/ml에서는 각각 71.4%와 51.8%(p<0.05)로 나타났다. 또한 30mU/ml XO에서는 41.1%(p<0.01)의 생존율을 나타냈다(Table III).

XO/HX가 배양시간에 따라 脊髓感覺神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NR50인 15mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 1~9시간 동안 배양한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 조사한 결과 1시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 76.4%로 나타났으며 3시간 배양에서는 64.7%로 나타났으며 6, 9시간 배양에서는 각각 53.8%(p<0.05) 및 36.5%(p<0.01)로 나타났다(Table IV).

Table III. Absorbance(% of control) at 540nm Wavelength for the NR Assay on Xanthine Oxydase(XO) in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO(mU/ml)	NR	Decrease of cell viability(%)
	absorbance(540nm)	
0	0.56 ± 0.09	-
1	0.45 ± 0.06	19.6
5	0.40 ± 0.04	28.6
15	0.29 ± 0.03*	48.2
30	0.23 ± 0.01**	58.9

Cultured mouse spinal sensory neurons were grown in media containing various concentrations of xanthine oxydase(XO) for 4 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

Table IV. Time-response Relationship of Xanthine Oxydase(XO) and Hypoxanthine (HX) by NR Assay in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO/HX (mU/ml/mM)	NR absorbance(540nm)				
	0hr	1hr	3hrs	6hrs	9hrs
0	0.55 ± 0.05	0.54 ± 0.06	0.51 ± 0.04	0.53 ± 0.08	0.52 ± 0.03
	0.42 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.28 ± 0.03*	0.19 ± 0.02**

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with 15mU/ml XO/0.1mM HX 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

## 2. 韓藥抽出物の 效果

### 1) Neurofilament 定量

#### (1) XO/HX의 影響

XO/HX농도에 따른 neurofilament의 양적 측정

위한 neurofilament EIA에 있어서 0.1mM HX에 XO가 15~90mU/ml까지의 농도로 각각 포함된 培養液에서 脊髓感覺神經細胞를 4시간 동안 처리한 후 neurofilament의 양적 변화를 대조군과 비교 조사하였다. 15mU/ml/0.1mM XO/HX 처리에서는 neurofilament의 양적 변화는 대조군(100%)에 비하여 79.9%로 나타났으며, 25mU/ml/0.1mM XO/HX 처리에서는 72.7%로 나타났다. 또한 45, 90mU/ml /0.1mM XO/HX의 처리에서는 각각 53.9%(p<0.05)와 34.4%(p<0.01)의 neurofilament 양을 나타내 유의하게 감소하였다(Table V).

Table V. Dose-response Relationship of Xanthine Oxydase(XO) and Hypoxanthine (HX) by Neurofilament Enzymeimmuno Assay (EIA) in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO/HX(mU/ml/mM)	EI absorbance(490nm)	Decrease of neurofilament(%)
control	1.54 ± 0.18	-
15	1.23 ± 0.13	20.1
25	1.12 ± 0.06	27.3
45	0.83 ± 0.05*	46.1
90	0.53 ± 0.04**	65.6

Cultured mouse spinal sensory neurons were exposed to various concentrations of xanthine oxydase(XO) and hypoxanthine(HX) for 4 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values are the mean ± SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks.

\*p<0.05; \*\*p<0.01

## (2) 白屈菜的 效果

XO/HX에 의하여 손상된 培養 脊髓感覺神經細胞에 대한 HC의 효과를 neurofilament의 양적변화측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값인 45mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 培養 脊髓感覺神經細胞를 4시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10~

1080 µg/ml HC가 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 neurofilament EIA법으로 조사하였다.

HC를 보면 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml HC를 처리한 경우 세포의 neurofilament의 양적 변화는 XO/HX만을 처리한 대조군(100%)에 비하여 각각 107.0%, 115.8%, 136.8%로 나타나 증가하는 경향을 나타냈으나 유의성은 보이지 않았다. 그러나 80 µg/ml HC처리에서는 163.2%(p<0.05)로 유의한 증가를 나타냈다(Table VI).

Table VI. Dose-response Relationship of Herba Chelidonii(HC) for It's Neuroprotective Effect on Xanthine Oxydase(XO) and Hypoxanthine(HX) in Neurofilament

Concentration of hebal medicine (µg/ml)	EI absorbance(490nm)	
	XO/HX 0mU/ml/mM	XO/HX 45mU/ml/mM
control	1.39 ± 0.13	0.57 ± 0.04
10	1.37 ± 0.15	0.61 ± 0.07
20	1.33 ± 0.11	0.66 ± 0.05
40	1.46 ± 0.16	0.78 ± 0.07
80	1.45 ± 0.14	0.93 ± 0.06*

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with 10, 20, 40 and 80 µg/ml Herba Chelidonii(HC) respectively. Cultures were preincubated with HC for 3 hours respectively. After then cultures were exposed to 45mU/ml xanthine oxydase(XO) and 0.1mM hypoxanthine (HX) for 4 hours. Amount of neurofilament was measured by enzymeimmuno assay(EIA). The values are the mean ± SE for 6 experiments.

\* :significantly different from the value of control group. \*p<0.05; \*\*p<0.01

## 2) Lipid peroxidation 定量

### (1) XO/HX의 影響

XO/HX의 농도에 따른 lipid peroxidation을 측정하기 위하여 0.1mM HX에 XO가 1~30mU/ml까지

의 농도로 각각 포함된 培養液에서 脊髓感覺神經細胞를 4시간 동안 처리한 후 TBARS를 測定하고 세포의 생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 1mU/ml XO, 5mU/ml XO 처리에서는 TBARS가 대조군(22.6±3.5)에 비하여 각각 26.4±3.8, 31.9±4.5로 나타났으며, 세포생존율의 감소율은 대조군(100%)에 비하여 각각 116.8%, 141.2%로 나타났다. 또한 15mU/ml XO, 30mU/ml XO를 처리한 경우 TBARS가 각각 34.7±3.2(p<0.05), 49.9±5.6(p<0.01)로 나타났으며, 세포생존율 감소율은 대조군에 비하여 각각 153.5%(p<0.05), 220.8%(p<0.01)로 나타나 유의한 증가를 나타냈다(Table VII).

Table VII. Dose-response Relationship of Xanthine Oxidase(XO) and Hypoxanthine (HX) on Lipid Peroxidation in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO/HX(mU/ml/mM)	TBARS (pmol/106cells)	Decrease rate of cell viability(%)
control	22.6±3.5	-
1	26.4±3.8	116.8
5	31.9±4.5	141.2
15	34.7±3.2*	153.5
30	49.9±5.6**	220.8

Cultured mouse spinal sensory neurons were exposed to various concentrations of xanthine oxydase(XO) and hypoxanthine(HX) for 4 hours. Thiobarbituric acid(TBA) fluorometric assay was adopted to analyze lipid peroxidation and TBA reactive substance(TBARS) was represent as pmol/106 cells. The values are the mean ±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks:

\*p<0.05; \*\*p<0.01

## (2) 白屈菜의 效果

XO/HX에 의하여 손상된 培養 脊髓感覺神經細胞에 대한 HC의 效果를 lipid peroxidation측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값인 15mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 4시간 동안 노출시키기 3시간

전에 10~80 µg/ml HC가 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다.

HC를 처리한 경우에 있어서 XO/HX만을 처리한 경우 TBARS는 대조군(25.1±1.8)에 비하여 54.3±6.7로 나타났으며, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml HC의 처리에서는 XO/HX만을 처리한 대조군(25.1±1.8)에 비하여 각각 81.8%, 76.2%, 73.8%로 나타나 유의성을 보이지 않았다. 그러나 80 µg/ml HC처리에 있어서는 대조군에 비하여 58.2%로 나타나 유의한 감소(p<0.05)를 나타냈다(Table VIII).

Table VIII. Dose-response Relationship of Herba Chelidonii(HC) for It's Neuroprotective Effect on Xanthine Oxydase(XO) and Hypoxanthine(HX) in Lipid Peroxidation

Concentration of herbal medicine (µg/ml)	TBARS(pmol/106cells)	
	HC	
	XO/HX 0mU/ml/mM	XO/HX 15mU/ml/mM
control	25.1±1.8	54.3±6.7
10	25.3±3.1	44.4±7.4
20	25.6±2.4	41.4±3.8
40	24.7±3.5	40.1±5.6
80	24.2±2.6	31.6±4.2*

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with 10, 20, 40 and 80 µg/ml Herba Chelidonii(HC) respectively. Cultures were preincubated with HC for 3 hours respectively. After then cultures were exposed to 15mU/ml xanthine oxydase(XO) and 0.1mM hypoxanthine (HX) for 4 hours. TBA reactive substance (TBARS) was represent as pmol/106 cells.

\* :significantly different from the value of control group.

\*P<0.05; \*\*P<0.01

## 3) LDH 定量

### (1) XO/HX의 影響

培養 脊髓感覺神經細胞에 있어서 XO/HX농도에 따른 LDH 활성도를 측정하기 위하여 0.1mM HX에 XO가 1~50mU/ml까지의 농도로 각각 포함된 培養

액에서 神經細胞를 4시간 동안 처리한 후 細胞培養液내로 유출된 LDH양을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 1mU/ml XO, 10mU/ml XO 처리에서는 대조군100%(16.7±1.3)에 비하여 각각 132.3%(22.1±1.5), 138.3%(23.1±1.7)로 나타났다. 또한 30mU/ml XO, 50mU/ml XO를 처리한 경우 각각 163.5%(27.3±2.1)(p<0.05), 196.4%(32.8±2.8)(p<0.01)로 나타나 XO를 처리하지 않은 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며, LDH활성도의 MCV값은 30mU/ml XO의 처리에서 나타났다(Table IX).

Table IX. Dose-response Relationship of Xanthine Oxydase(XO) and Hypoxanthine (HX) on Lactate Dehydrogenase (LDH) Release in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO/HX (mU/ml/mM)	control	1	10	30	50
Amount of LDH Release	16.7±1.3	22.1±1.5	23.1±1.7	27.3±2.1*	32.8±2.8**

Cultured mouse spinal sensory neurons were exposed to various concentrations of xanthine oxydase(XO) and hypoxanthine(HX) for 4 hours. LDH release was measured at wavelength of 570nm. The values represent the mean±SE for 6 experiments.

\* :significantly different from the value of control group. \*p<0.05; \*\*p<0.01

## (2) 白屈菜의 效果

XO/HX에 의하여 손상된 培養 脊髓感覺神經細胞에 대한 HC의 효과를 LDH활성도 측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값인 30mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 4시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10~80 µg/ml HC가 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 XO/HX만을 처리한 경우 대조군(18.5±1.9)에 비하여 45.8±3.7로 나타났다. 10 µg/ml, 20 µg/ml HC의 처리에서는 XO/HX만을 처리한 대조군에 비하여 각각 82.3%, 74.7%로 나타났으나 유의성은 보이지 않

았다. 그러나 40 µg/ml, 80 µg/ml HC처리에서는 각각 50.7%(p<0.05), 54.5%(p<0.05)로 나타나 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다(Table X).

Table X. Dose-response Relationship of Herba Chelidonii(HC) for it's Neuroprotective Effect on Xanthine Oxydase(XO) and Hypoxanthine(HX) in Lactate Dehydrogenase(LDH) Release

Concentration of hebal medicine (µg/ml)	Amounts of LDH Release	
	HC	
	XO/HX 0mU/ml/mM	XO/HX 30mU/ml/mM
control	18.5±1.9	45.8±3.7
10	18.1±1.6	37.7±4.1
20	17.6±1.7	34.2±3.2
40	17.3±1.5	23.2±2.8*
80	17.2±1.8	25.0±2.3*

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with 10, 20, 40 and 80 µg/ml Herba Chelidonii(HC) respectively. Cultures were preincubated with HC for 3 hours respectively. After then cultures were exposed to 30mU/ml xanthine oxydase(XO) and 0.1mM hypoxanthine (HX) for 4 hours. LDH release was measured at wavelength of 570nm. The values are represented the mean±SE for 6 experiments.

\* :significantly different from the value of control group. \*P<0.05; \*\*P<0.01

## 4) SRB 定量

### (1) XO/HX의 影響

XO/HX가 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 영향을 총단백질양의 측면에서 조사하기 위하여 0.1mM HX에 5mU/ml~50mU/ml 까지의 XO가 각각 포함된 培養液에서 4시간 동안 培養한 후 XO/HX에 의한 단백질 합성의 변화에 대해 조사한 결과 5mU/ml XO 처리에서는 단백질의 합성이 대조군(100%)에 비하여 84.5%로 나타났으며, 20mU/ml의 처리에서는 대조군에 비하여 71.8%로 다소 낮게 나타났다.



또한 35, 50mU/ml XO를 처리한 경우 단백질 합성은 각각 54.6%(p<0.05)와 45.2%(p<0.01)로 나타나 유의성있는 감소를 보였다(Table XI).

Table XI. Dose-response Relationship of Xanthine Oxydase(XO) and Hypo-xanthine(HX) on Total Protein Synthesis in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO/HX concentration(mU/ml/mM)	Total Protein(% of control)
control	100±7.6
5	84.5±8.5
20	71.8±9.3
35	54.6±6.4*
50	45.2±4.2**

Cultured mouse spinal sensory neurons were exposed to various concentrations of 5, 20, 35 and 50 mU/ml xanthine oxydase(XO) and 0.1mM hypoxanthine(HX) for 4 hours. Amount of total protein was measured by SRB assay(540nm), and shown as % of control. The values are the mean±SE for 6 experiments.

\* :significantly different from the value of control group. \*p<0.05; \*\*p<0.01

Table XII. Dose-response Relationship of Herba Chelidoni(HC) for It's Neuroprotective Effect on Xanthine Oxydase(XO) and Hypoxanthine(HX) in Total Protein

Concentration of hebal medicine (μg/ml)	Total Protein(% of control)	
	HC	
	XO/HX 0mU/ml/mM	XO/HX 35mU/ml/mM
control	100±8.8	45.2±5.8
10	100±6.7	56.3±4.2
20	100±6.9	61.7±7.4
40	100±9.1	68.4±3.5
80	100±7.2	80.2±8.6*

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with 10, 20, 40 and 80 μg/ml Herba Chelidoni(HC) respectively. Cultures were preincubated with HC for 3 hours respectively. After then cultures were exposed to 35mU/ml xanthine oxydase(XO) and 0.1mM hypoxanthine (HX) for 4 hours. Amount of total protein was measured by SRB assay(540nm). The values are the mean±SE for 6 experiments.

\* :significantly different from the value of control group.

\* P<0.05; \*\*P<0.01

## (2) 白屈菜의 效果

XO/HX에 의한 培養 脊髓感覺神經細胞에 있어서 HC의 效果를 총단백질의 양적변화측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값인 35mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 4시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10~80 μg/ml HC가 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다.

HC의 경우에 있어서는 XO/HX만을 처리한 경우 총단백질의 양적 변화는 대조군(100%)에 비하여 45.2%로 나타났다. 10 μg/ml, 20 μg/ml, 40 μg/ml HC의 처리에서는 대조군에 비하여 각각 56.3%, 61.7%, 68.4%로 나타났으나 유의성은 없었다. 그러나 80 μg/ml HC의 처리에서는 80.2%로 나타나 대조군(100%)에 비하여 유의하게 증가하였다(Table XII).

## IV. 考 察

척수질환은 영구적이고, 심한 신경장애를 초래하기 쉽다<sup>1)</sup>. 척수신경세포(신경원, 신경 단위)는 무산소증, 저혈당증, 바이러스 감염 및 세포내 대사 장애 등의 여러 다양한 인자들에 의하여 손상받기 쉬우며<sup>20)</sup>, 지금까지 알려진 신경세포의 저해 원인으로는 산소자유기<sup>21)</sup>와 excitotoxic amino acids(EAAs)<sup>22)</sup> 및 신경성장인자의 결핍<sup>23)</sup> 등이 있다.

신경세포의 손상원인중 하나로 주목되는 활성산소는 고반응성의 산소 화합물로서 주변의 세포 구성 물질들로부터 전자를 빼앗아 자신을 안정화하려는 성질이 강하여 주변 물질을 산화시키게 된다. 이 과정에서 전자를 빼앗긴 주변 물질 또한 활성 산소의 변형물로서 되어 다시 주변 물질로부터 전자를

빠앗는 과정을 되풀이하며 손상은 연쇄적으로 증폭된다<sup>24,25)</sup>.

최근에 산소자유기의 신경독성에 대한 하나의 연구에서 산소자유기는 흥분성 아미노산(excitotoxic amino acids, EAAs)을 분비케 하며<sup>26)</sup>, 분비된 흥분성 아미노산은 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 자극시킴으로서 세포내 칼슘유입을 증가시킨다고 한다<sup>27)</sup>. 따라서 흥분성 아미노산과 세포내 칼슘변화에 대한 기전을 산화적 손상 측면에서 규명하려는 시도가 진행되고 있지만<sup>28)</sup>, 이에 대한 자세한 기전에 대해서는 아직까지 잘 정립되어 있지 않다<sup>29)</sup>.

산소자유기는 근위축성측삭경화증<sup>30)</sup>이나 뇌졸중<sup>31)</sup> 및 Huntington's disease<sup>32)</sup>와 같은 여러 신경병변과 밀접한 관련이 있음이 많은 연구에서 보고되고 있으며<sup>33)</sup>, 이러한 신경손상질환은 임상상 운동마비, 감각장애를 포함한 신경학적인 증후를 나타내게 되는데<sup>34)</sup>, 이는 한의학적으로는 痺證, 麻木, 痿症(痿癱)의 範疇에 해당된다고 볼 수 있다<sup>7-12)</sup>.

痺라는 것은 風, 寒, 濕과 같은 邪氣가 人體表面과 經絡에 침범하면 氣血運행이 순조롭지 못하게 되어 肢體, 筋肉, 關節 등에 疼痛, 酸澀, 麻木, 重着, 腫脹, 屈伸不利와 關節腫脹 등의 증상이 나타나는 것이며<sup>34)</sup>, 痿證은 四肢筋脈이 弛緩하고 手足이 軟無力하며 隨意運動을 하지 못하는 疾患이며, 臨床에서는 下肢痿軟이 비교적 많이 나타나는 까닭에 “痿躄”이라 하는데, 痿證과 痺證은 모두 四肢運動의 障碍와 심한 경우 瘦削枯痿가 나타나고 鑑別은 痛症의 有無로 한다. 麻木이란 肌部知覺이 消失되어 痛痒을 알지 못하는 것으로, 感覺障碍를 주증상으로 한다<sup>13)</sup>.

<素問·痿論><sup>13,34)</sup>에서는 痿證에 대하여 비교적 상세하게 논술하였는데 肺主皮毛, 心主血脈, 肝主筋, 脾主肉, 腎主骨髓의 이론에 의하여 痿證을 痿癱, 脈痿, 筋痿, 肉痿, 骨痿 등의 “五痿”로 나누었으며, 그 原因은 모두 熱에 의해서 발생된다고 하였고, 주요

병인병리는 肺熱葉焦라 하였다<sup>34)</sup>.

현대의학의 최근 연구동향<sup>35)</sup>을 살펴보면 활성산소가 glutamate toxicity에 의한 신경세포사의 주된 최종 원인 물질이며, 항산화 물질이 신경손상질환에 효과적이라고 보고됨에 따라 천연물로부터 유래한 강력한 새로운 항산화물질 탐색연구가 활발히 진행되어 왔다. 이러한 신경세포손상 발생기전으로 free radical, glutamate, calcium overload등 많은 요소들이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 따라서 이의 치료약물로는 glutamate receptor antagonist, calcium channel antagonist, GABA neurotransmission 촉진제, NOS inhibitors등이 연구되고 있다<sup>35)</sup>.

白屈菜(Herba Chelidonii)는 양귀비과 식물 白屈菜의 개화기의 지상부 全草<sup>14,16)</sup>로서, 性味는 苦寒 有小毒하고 歸經은 胃, 大腸, 肺이며, 理氣止痛, 消腫鎮痛, 利水의 효능<sup>15)</sup>을 가지고 있다. 白屈菜의 유액에는 여러 가지 alkaloid가 함유되어 있다. 그 중에는 chelidionine 41%, protopine 22%, stylophine 17%, allocryptopine 9%, berberine 5%, chelerythrine 3%, sanguinarine 1.5%, sparteine 0.1%가 함유되어 있고 또 hydroxychelidionine이 함유되어 있다. alkaloid 외에도 chelidonic acid, malic acid, citric acid, succinic acid, choline, methylamine, histamine, tyramine, saponin, flavonol, celidoniol이 들어 있고 또 강심 배당체가 함유되어 있다<sup>16)</sup>.

성분에 대한 약리작용<sup>16)</sup>으로 chelidionine은 근육에 대하여 평활근을 억제시키고 鎮痙작용을 하며, 신경계에 대하여 protopine과 마찬가지로 감각과 운동신경말초를 마비시키지만 神經幹에 대해서는 아무런 작용도 하지 않는다. 종양에 대한 억제작용이 있으며, 고양이의 혈압에 대하여 지속적이고 경한 강하작용을 보인다.

본 연구는 각종 신경병변의 병인적 요인으로 밝혀지고 있는 산소자유기의 독성에 대한 기전을 규명하기 위하여 척수감각신경세포를 배양한 후 신경

세포에 여러 농도의 산소자유기를 처리한 다음 산소자유기의 독성효과를 분석하고 동시에 산소자유기의 산화적 손상에 대한 한약추출물인 白屈菜的 방어효과를 조사하였다.

먼저 본 실험에서는 산소자유기의 신경독성효과를 조사하기 위하여 생쥐의 척수조직으로부터 순수 분리하여 배양한 척수감각신경세포를 여러 농도의 XO나 XO/HX에 노출시킨 후 MTT 정량분석과 NR 정량분석을 시행한 결과 산소자유기의 처리농도와 노출시간에 비례하여 세포의 생존율은 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다. 특히, MTT assay법에서는 20mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 6시간 동안 처리에서 MCV값을 나타내었으며(Table I ~ II), NR assay법에서는 15mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 6시간 동안 처리에서 MCV값을 나타내었다(Table III ~ IV).

이러한 결과는 산소자유기가 척수감각신경세포에 세포독성을 가지고 있다는 것을 증명하는 것으로, 이는 Michikawa 등<sup>5)</sup>이 산소자유기가 척수신경을 손상함으로써 독성효과를 나타냈다는 연구보고와 일치하였다. 따라서 이 같은 연구결과들은 산화적 손상이 신경독성에 관여하고 있음을 말해 주고 있을 뿐만 아니라, 동시에 세포내 항산화계에 손상을 주어 그 결과 항산화효소의 활성이 감소됨으로서 항산화효소에 의해 미처 처리되지 못한 산소자유기들이 축적되어 세포막의 지질과산화반응을 촉진시키고<sup>31)</sup>, 흥분성아미노산(excitatory amino acid, EAA)의 분비를 촉진시키고<sup>36)</sup>, 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 농도를 증가시킴<sup>27,30)</sup>으로써 세포의 퇴화 내지는 사멸을 초래하였을 가능성이 크다고 생각된다. 본 실험에서도 XO/HX는 배양된 脊髓感覺神經細胞에 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포의 LDH 활성증가와 총단백질량의 감소를 보였는데 이는 세포막의 lipid peroxidation을 촉진함으로써 인한 세포막의 손상, 신경세사의 손상 및 단백질합성계를 억제한 것

에 기인한 것으로 생각된다<sup>27)</sup>.

白屈菜에 대한 neurofilament의 측정을 위한 neurofilament EIA에 있어서 XO/HX는 배양된 脊髓感覺神經細胞에 처리한 농도에 비례하여 neurofilament의 양을 유의성있게 감소시켰으며, 45mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 MCV값을 나타내었다(Table V). 그러나 45mU/ml XO/0.1mM HX를 척수감각신경세포에 처리하기 전 10~80 µg/ml의 白屈菜가 포함된 배양액에서 3시간 동안 전처리한 경우 농도에 비례하여 neurofilament의 양이 증가하는 경향을 나타냈으며, 특히 80 µg/ml HC 처리에서 163.2%(p<0.05)로 유의한 증가를 나타냈다(Table VI). 본 약제가 XO/HX만의 처리에 비하여 신경세사의 양적 증가를 보인 것은 아마도 白屈菜가 산소자유기의 독성을 감소시켰거나 또는 세포의 단백질 합성계에 영향을 주어 신경세사의 성장을 촉진시켰을 가능성이 클 것으로 생각된다<sup>36)</sup>.

XO/HX가 지질과산화반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.1mM HX에 XO가 1~30mU/ml까지의 여러 농도로 각각 포함된 배양액에서 脊髓感覺神經細胞를 4시간 동안 배양후 lipid peroxidation을 조사하였다. HO/HX를 신경세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 TBARS 농도는 유의성있게 증가하였으며 15mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 MCV값을 나타내었다(Table VII). 白屈菜가 XO/HX에 의하여 손상된 培養 脊髓感覺神經細胞에 대한 lipid peroxidation의 방어효과를 알아보기 위하여 15mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 4시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10~80 µg/ml HC가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 TBARS 농도의 감소를 나타내었으며, 특히 80 µg/ml HC처리에서 대조군에 비하여 58.2%로 나타나는 유의한 감소(p<0.05)를 나타냈다(Table VIII). 본 약제에 의해 지질과산화반응이 감소된 것은 아마도 약제가 가지고 있는 성분들이 산소자유기에 의한 산

화적 손상을 방어하는 약리적 활성을 나타낸 것으로 생각되며, 이는 본 실험에서 약제들에 의하여 LDH활성이 감소된 결과가 이를 증명하고 있다 하겠다<sup>32)</sup>.

XO/HX농도에 따른 培養 脊髓感覺神經細胞에 있어서 LDH 활성도는 細胞培養液내로 유출된 LDH양을 대조군과 비교 조사하였는데, XO/HX를 培養 脊髓感覺神經細胞에 처리한 농도에 비례하여 LDH 양적 증가를 보였으며, MCV값은 30mU/ml XO의 처리에서 나타났다(Table IX). 白屈菜的 XO/HX에 의하여 손상된 培養 脊髓感覺神經細胞에 대한 방어효과를 LDH활성도 측면에서 조사하기 위하여 30mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 노출시키기 전에 10~80 $\mu$ g/ml HC가 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH의 양적 감소를 보였으며, 40 $\mu$ g/ml, 80 $\mu$ g/ml HC처리에서는 각각 50.7%( $p<0.05$ ), 54.5% ( $p<0.05$ )로 나타나 역시 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다(Table X). 약제에 의한 LDH의 활성감소는 본 실험에서 XO/HX에 의한 지질과산화반응의 감소와 일치하며 이는 위의 약제가 산소자유기의 독성효과를 제거 내지는 감소시켰음을 의미하며 이는 아마도 약제의 성분이 항산화제와 같은 약리적 활성을 가지고 있음을 암시하고 있다 하겠다<sup>37)</sup>.

XO/HX가 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 영향을 SRB 분석에 의한 총단백질양의 측면에서 조사한 결과 XO/HX의 처리농도에 비례하여 총단백질양의 감소를 보였으며 35mU/ml XO/0.1mM HX 처리농도에서 MCV값을 나타내었다(Table XI). 35mU/ml XO/0.1mM HX농도에서 4시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10~80 $\mu$ g/ml HC가 각각 포함된 培養液에서 白屈菜를 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 단백질양의 증가를 보였으며, 80 $\mu$ g/ml HC의 처리에서는 80.2%로 나타나 대조군(100%)에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Table XII). 본 실험

에서 약제에 의한 단백질의 양적 증가는 아마도 직접적으로는 약제의 성분이 세포의 단백질 합성을 촉진시켰거나, 또는 간접적으로 XO/HX의 산화적 손상을 방어함으로써 산소자유기에 의한 단백질 합성의 저해를 막았을 결과로 생각된다.

이상의 實驗 結果를 綜合해 보면, XO/HX와 같은 산소자유기는 산화적 손상에 의해 신경독성을 나타내어 세포생존율을 감소시켰으며, 이에 대한 白屈菜煎湯液의 投與는 neurofilament의 양적 증가, 총단백질양의 증가, lipid peroxidation의 감소 및 LDH양의 감소 효과를 나타내었다. 이와 같은 結果는 白屈菜가 산소자유기의 형성을 저해하거나 지질과산화반응을 억제시키고, 세포내 칼슘농도의 항상성을 조절하여 세포막의 손상에 방어작용을 나타내었기 때문이라 생각된다. 그러나 본 실험의 결과에서처럼 白屈菜와 같은 한약추출물들에 있어서 항산화효과와 같은 약리적 활성에 대한 자세한 기전을 규명하기 위해서는 형태를 비롯한 생리, 병리 및 약리학적 등 종합적인 측면에서 더욱 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## V. 結 論

Xanthine oxydase(XO)와 hypoxanthine(HX)의 산화적 손상에 대한 기전을 究明하기 위하여 신생 생쥐의 척수조직에서 순수 분리 培養한 감각신경세포에 여러 농도의 XO/HX가 포함된 培養液에서 4시간 동안 처리한 다음 XO/HX가 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 XO/HX의 독성효과에 대한 한약추출물인 白屈菜의 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. XO/HX는 NR 분석법과 MTT 분석법에 의하여 생쥐의 培養 脊髓感覺神經細胞에 처리한 농도와 시

간에 비례하여 유의한 세포생존율의 감소를 보였다.

2. XO/HX는 생쥐의 培養 脊髓感覺神經에 처리한 농도와 시간에 비례하여 neurofilament EIA에 의한 신경세사의 양적 감소를 비롯하여, SRB분석법에 의한 총단백질양의 감소, lipid peroxidation의 증가 및 LDH양의 증가를 나타냈다.

3. XO/HX의 신경독성에 대하여 白屈菜는 XO/HX만의 처리에 비하여 다소의 neurofilament의 양적 증가 및 총단백질양의 증가를 보인 반면, lipid peroxidation과 LDH활성에 있어서 유의한 감소를 보였다.

이상의 결과로부터 XO/HX는 생쥐에서 분리한 培養 脊髓感覺神經細胞에 신경독성을 나타냈으며, 동시에 白屈菜와 같은 한약추출물이 XO/HX의 산화적 손상으로부터 lipid peroxidation과 LDH활성을 유의하게 감소시킴으로서 XO/HX의 독성을 효과적으로 방어한 것으로 생각된다.

### 参 考 文 献

- 김창환, 김용식. 마비질환클리닉. 서울 : 정담. 1996 : 98, 101, 104, 109-114.
- Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA. Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am J Physiol.* 1992 ; 263 : 1356-62.
- 이광우, 정희원 편저. 임상신경학. 서울:고려의학. 1997 : 680-681.
- 이원택, 박경아. 의학신경해부학. 서울 : 고려의학. 1996 : 329-342.
- Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res.* 1994 ; 37 : 62-70.
- Michaels RL, Rothman SM. Glutamate neurotoxicity in vitro: Antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J Neurosci.* 1990 ; 10 : 283-292.
- 張斗浩. 素問·痺論에 대한 연구. 원광대학교 대학원 석사학위논문. 1995.
- 宋峰根. 痺證의 形證과 病域에 관한 文獻的 考察. 원광대학교 대학원 석사학위논문. 1985.
- 金湘洙, 高成奎, 曹基湖, 金永錫, 裴亨燮, 李京燮. 痺證에 對한 東西醫學的 考察(原因, 症狀을 爲主로). *大韓韓方內科學會誌.* 1994 ; 15(1) : 116-127.
- 조한숙, 송대원, 김신석. 東醫寶鑑에 나타난 麻木不仁에 對한 小考. *韓方再活醫學會誌.* 1998 ; 8(1) : 352-366.
- 鄭錫熙, 李鍾秀, 金性洙, 申鉉大. 麻木에 關한 文獻的 考察. *大韓韓醫學會誌.* 1988 ; 9(1) : 137-144.
- 嚴祥燮. 素問·痿論에 對한 研究. 圓光大學校 大學院 碩士學位論文. 1996.
- 한국한의학회연구원. 한의진단명과 진단요건의 표준화연구(III). 서울 : 한국한의학회연구원. 1997 : 327-336.
- 辛民敎. 臨床本草學. 서울 : 永林社. 1997 : 427.
- 上海中醫學院. 中藥臨床手冊. 中國:上海人民出版社. 1977 : 246.
- 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 서울 : 도서출판 정담. 1978 : 2032-2035.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods.* 1983 ; 65 : 55-63.
- Borenfreund E., Puerner J. A. A Simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay(HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth.* 1984 ; 9 : 7-9.
- Takahashi K., Fujita T., Mayum T., Kish T.

- Effect of Adriamycin on Cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem Pharm.* 1987 ; 35(1) : 326-334.
20. 이중달. 병리학. 서울:고려의학. 1991 : 733.
21. Rosen D., Siddique T., Patterson D., Figlewix D., Sapp P., et al. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature London.* 1993 ; 362 : 59-62.
22. Rothstein JD., Tsai G., Kunel RW., Clawson S., Cornblath DR., et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1990 ; 28 : 18-25.
23. Jackson GR., Apfell L., Werrbach-Perex K., Perex-Polo JR. Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balanced and neuronal injury : Stimulation of hydrogen peroxide resistance. *J Neurosci Res.* 1990 ; 25 : 360-368.
24. Alberts MJ. Diagnosis and treatment of ischemic stroke. *AM J Med.* 1999 ; 106 : 1-21.
25. Martin LJ., Al-Abdulla NA., Brambrink AM., Kirsch JR., Sieber FE., Portera-Cailiau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia and target deprivation : A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull.* 1998 ; 46 : 281-309.
26. 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.* 1988 ; 51 : 1960-1963.
27. 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.* 1987 ; 394 : 501-527.
28. Mattson MP., Cheng B., Smith-Swintosky VL. Mechanism of neurotrophic factor protection against calcium and free radical mediated excitotoxic injury : Implications for treating neurodegenerative disorders. *J Exp Neurol.* 1993 ; 124 : 89-95.
29. Takahashi K., Akaike N. Calcium antagonist effects on low-threshold(T-type) calcium current in rat isolated hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991 : 256-275.
30. Zeman S., Lioyd C., Meldrum B., Leigh PN. Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neurons disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994 ; 20 : 219-231.
31. Yamamoto M., Shima T., Uozumi T., Sogabe 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.* 1983 ; 14 : 977-982.
32. 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.* 1991 ; 196 : 36-41.
33. Saunders RD., Dugan LL., Demediuk P., Means ED., Harrocks LIA., Anderson DK. Effects of methyl prednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium

- on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation on traumatized spinal cord tissue. *J Neurochem.* 1987 ; 49 : 24-31.
34. 全國韓醫科大學再活醫學科學教室. 東醫再活醫學科學, 서울:書苑堂. 1995 : 95-149.
35. 조동욱 외4인. 뇌신경세포의 허혈성 및 산화적 손상에 대한 한방처방의 치료효능연구. *한국한의학연구원.* 2000 : 6, 17.
36. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 1992 ; 59 : 1609-1623.
37. Borgers M, Vandeplassche G. van Reempts J : Cytochemical markers of ischemia in the heart and brain, *Histochem J.* 1990 ; 22 : 125-133.