

大造丸이 大脳神經細胞의 虛血性 損傷에 미치는 영향

박세홍 · 이광로 · 배선준¹ · 정상수 · 강세영 · 이상관 · 이성근 · 윤지원 · 성강경*

원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 1:연세대학교 마취통증학교실

Effects of Daejo-whan on the Ischemic Damage of Cerebral Neurons in Culture

Se Hong Park, Kwang Ro Lee, sun jun Bai, Sang Su Cheong, Sei Young Kang,
Sang Kwan Lee, Sung Keun Lee, Ji won Yoon, Kang Keyng Sung*

Department of Neuroscience and Internal Medicine, College of Orinental Medicine, Wonkwang University

This study was performed to clarify the neurotoxic mechanism of nerve cells damage by brain ischemia. The cytotoxic effect of ischemia was determined by XTT assay, NR assay, superoxide dismutase(SOD) activity, amount of malondialdehyde(MDA), lactate dehydrogenase(LDH) activity, protein synthesis and tumor necrosis factor(TNF)- α activities after cerebral neurons derived from mouse were exposed to ischemia for 1~30 minutes. In addition, the protective effect of extract of Daejo-whan(DJW) on ischemia-induced neurotoxicity was examined in these cultures. 1. Ischemia decreased cell number and viability by XTT assay or NR assay when cultured cerebral neurons were exposed to 95% N₂/5% CO₂ for 1~20 minutes in these cultures. 2. Ischemia decreased SOD and protein syntheses, but it increased amount of MDA and, LDH and TNF- α activities in these cultures. 3. In the neuroprotective effect of DJW extracts on cerebral neurons damaged by ischemia, DJW extracts increased SOD activity and protein synthesis, while, it decreased amount of MDA and, LDH and TNF- α activities after cerebral neurons preincubated with herb extracts. It suggests that brain ischemia has neurotoxicity on cultured mouse cerebral neurons, and the herb extract such as DJW was very effective in blocking the neurotoxicity induced by ischemia in cultured mouse cerebral neurons.

Key words : Daejo-whan, neurotoxicity, Ischemic Damage.

서 론

뇌허혈은 뇌손상의 중요한 병리적 요인의 하나로 뇌를 구성하고 있는 뇌조직의 괴사나 뇌세포의 손상을 초래함으로써 뇌성마비나 언어장애와 같은 각종 뇌질환을 초래함은 이미 잘 알려진 사실이다⁹. 허혈로 인한 신경세포 손상기전은 산소유리기의 급격한 생성으로 미토콘드리아의 기능이 손상되고, 세포내의 ATP의 생산이 결핍되어 에너지가 부족하게 되므로 뇌세포 대사에 이상을 초래한다는 것과 아미노산 글루타메이트에 의해 매개되는 흥분성 전달물질의 이상적인 분비 및 신호전달체계의 이상, 허혈상태에서 비정상적으로 생성된 산소유리기에 의한 세포지질막의 과산화반응, 세포내 각종 효소와 단백질의 불활성화 반응 및 세포의 apoptosis에 의한 세포사 등이 보고되고 있다^{7,10}. 특히, 최근에는 뇌허혈이나 저산소증으로 인한 신경세포의 손상이

산화적 손상과 밀접한 관련이 있다고 보고됨에 따라 산화적손상으로 인한 신경세포의 손상기전을 밝혀내과 산화적 손상에 대한 방어효과를 규명하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다^{2,6,9,11,18}.

腦虛血은 韓醫學에서 中風의 範疇에 屬하는 疾患으로³², 中風의 病因으로는 風·火·痰·瘀血·氣虛, 陰虛로 大別되며³²⁻³⁷, 病理機轉으로는 肝腎陰虛, 陰不潛陽, 陽亢風動하여 痰火逆上하므로 風이 動한다고 하여 本虛標實로 認識하고 있는 疾患이다³⁸⁻³⁹. 治法으로는 卒中期에는 開竅, 調氣, 祛痰, 清熱의 方法을 爲主로 하며, 後遺症期에는 益氣活血, 育陰通絡, 滋陰潛陽, 健脾化痰 등의 方法을 사용하고 있다³².

本實驗에 사용된 大造丸은 明代의 《扶壽精方》²²에 收錄된 處方으로, 養陰補精·滋補肺腎·滋陰補養·延年益壽·大補氣血하는 效能이 있어^{21,22}, 中風 後遺症期의 腎虛證과 髓海不足으로 인한 痴呆 등에 활용되고 있다³⁴. 大造丸에 대한 實驗的 研究로는 曹²⁹의 實驗적 뇌경색 연구와 李³⁰의 고지혈증 및 적출심장에 미치는 영향에 관한 연구, 金³¹의 뇌허혈 손상으로 인한 학

* 교신저자 : 성강경, 광주광역시 남구 주월동 543-8, 원광대부속 한방병원
· E-mail : sungkk@wonkwang.ac.kr, · Tel : 062-670-6526
· 접수 : 2003/10/04 · 수정 : 2003/10/22 · 채택 : 2003/11/20

습·기억장애 및 치매에 관한 연구가 보고되고 있다.

이에 著者は 大造丸이 虛血로 損傷된 大腦神經細胞에 미치는 영향을 究明하기 위하여 培養된 細胞에 일정시간 虛血狀態를 유발시킨 후 발생하는 細胞損傷에 대한 大造丸의 防禦效果에 대해 XTT assay, NR assay, trypanblue exclusion test, LDH 활성 측정, TNF- α 활성 측정, SOD 활성 측정, MDA 정량 및 단백질 합성의 측정을 통하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

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

2) 약재

本 實驗에 使用한 大造丸의 處方은 方藥合編²¹⁾에 의거하여 1 財 分量을 기준으로 하였으며, 藥材는 圓光大學校 益山韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였다.

Table 1. Prescription of Daejo-whan

藥物名	生藥名	用量(g)
紫河車	<i>Hominis Placenta</i>	30.00
生乾地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	150.00
龜板	<i>Testudinis Carapax</i>	56.25
杜沖	<i>Eucommiae Cortex</i>	56.25
天門冬	<i>Asparagi Radix</i>	56.25
黃柏	<i>Phellodendri Cortex</i>	56.25
牛膝	<i>Achyranthis Tuber</i>	45.00
麥門冬	<i>Liriopsis Tuber</i>	45.00
當歸身	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	45.00
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	37.50
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	18.75
Total amount		596.25

2. 방법

1) 檢液의 調劑

檢液의 調劑를 위하여 大造丸의 구성 성분 100 g을 증류수 1 l 와 함께 환저플라스크에 넣고, 冷却器를 附着하여 2 시간 동안 電熱器로 煎湯한 후 3,000 rpm에서 20 분간 원심분리하고, 진공 농축기로 감압농축한 후 凍結乾燥器에서 24 시간 凍結乾燥하여 9.5 g (수율 9.5%)의 분말 시료를 얻었다.

2) 藥劑 製造

本 實驗에 使用한 약제로는 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk), XTT (Sigma), NR (Sigma), trypsin(Sigma)은 각각 증류수에 녹여 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 實驗 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 培養液에 첨가하여 使用하였다. 大造丸 추출물의 투여는 분말을 증류수에 녹인 후 0.22 μ m의 micropore filter를 이용하여 過濾하여 使用하였다.

3) 細胞 培養

大腦神經細胞의 분리는 田 등(1998)¹⁸⁾의 방법에 따라 施行하였다. 즉, 생후 3 일된 생쥐에서 적출한 뇌조직을 trypsin을 이용한 해리술에 의하여 분리한 다음 phosphate buffered saline

(PBS)으로 세척하였다. 세척 완료 후 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)으로 3 회 세척 후 분리된 세포들은 poly-L-lysine(Sigma)으로 코팅된 96-multiwell에 3×10^7 cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 36 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ /95% air로 조절된 정온기 내에서 培養하였으며, 3일 간격으로 새로운 培養液으로 교환하여 7 일 동안 培養後 本 實驗에 使用하였다.

4) 虛血 誘導

허혈유도를 위하여 세포를 glucose-free Hanks' balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 교환하고, 95% nitrogen/5% CO $_2$ 로 조절된 정온기내에서 일정시간 동안 노출시킨 후 허혈을 유도하였다.

5) 虛血의 細胞毒性 및 大造丸 추출물의 防禦效果 分析

(1) XTT 정량

XTT의 定量을 위하여 뇌허혈이나 한약추출물을 處理한 培養 大腦神經細胞를 PBS로 3 회 세척한 후 전날 제조한 3 mg/ml의 XTT를 well당 最終濃度로 희석하여 넣어 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養이 완료된 후 이를 DMSO로 處理한 다음 spectrophotometer로 530 nm에서 흡광도를 측정하여 對照群과 比較 調査하였다.

(2) NR 정량

NR의 定量은 Mosmann(1983)⁷⁾의 방법에 따랐다. 즉 허혈이나 한약추출물을 처리한 培養 大腦神經細胞를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3 회 세척 후 전날 제조한 5 mg/ml의 NR을 well당 최종 濃度로 희석하여 넣은 다음 3 시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료 후 PBS로 3 회 세척한 다음 1 % formalin으로 處理한 후 spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 對照群과 比較 調査하였다.

(3) 세포수 조사

허혈이나 한약추출물을 일정시간 동안 培養한 大腦神經細胞를 PBS로 3 회 세척한 후 hemocytometer를 이용한 trypanblue exclusion test에 의하여 對照群과 比較 調査하였다.

(4) 단백질 합성 측정

단백질합성 分析을 위하여 허혈이나 한약추출물로 일정시간 동안 處理한 大腦神經細胞에 0.4 % sulforhodamine B를 200 μ l 씩 첨가하여 1 시간 동안 실온에 방치한 다음 1.0 % acetic acid로 3 회 세척하였다. 세척 완료 후 10 mM Tris base를 이용하여 SRB-bound protein을 녹인 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 對照群과 比較 調査하였다.

(5) LDH 활성 측정

허혈이나 한약추출물에 대한 LDH 활성의 측정은 변형된 Takahashi 등(1987)¹⁴⁾의 방법에 따랐다. 즉, LDH kit(Atron lab, Japan)의 효소기질액 1.0 ml를 직경 10 cm인 튜브에 넣은 후 여기에 검체인 培養液을 넣어 잘 혼합한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 10 분간 반응시켰다. 반응 완료 후 정지액 3.0 ml를 넣어 혼합한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하여 對照群과 比較 調査하였다.

(6) TNF- α 활성 측정

허혈이나 한약추출물이 TNF- α 에 미치는 영향을 조사하기 위하여 大腦神經細胞를 일정시간 동안 처리한 후 anti-rabbit TNF- α 와 phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG 및 2,2'-azinobis를 처리한 다음 450 nm에서 정량 분석하였다.

(7) SOD 활성 측정

허혈이나 한약추출물에 대한 SOD 활성의 측정은 1.5 ml Tris-buffer에 0.1 ml 효소용액과 효소반응액을 넣고 25°C에서 10 분 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 0.05 ml 1N-HCl을 가하여 잘 혼합한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 對照群과 比較 調査 하였다.

(8) MDA 정량

허혈이나 한약추출물을 처리한 神經細胞를 모아서 세포를 분쇄한 후 이의 분쇄액을 8,000 rpm에서 원심분리한 다음 상층액 0.5 ml를 취하여 10 % TCA용액과 잘 혼합하였다. 반응 완료 후 thiobarbituric acid(TBA) 30 ml를 가하여 95°C에서 30 분간 반응시키고, 여기에 n-butanol과 pyridine을 가하여 1,200 rpm에서 15 분 동안 원심분리한 후 상층액을 취하여 530 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

6) 統計 處理

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

실험성적

1. 허혈의 세포독성

1) 세포 생존율 분석

(1) XTT 정량

허혈유도에 노출된 시간에 따라 培養 大腦神經細胞에 미치는 영향을 조사하기 위하여 허혈상태로 조절된 정온기에서 세포를 각각 2 분에서 16 분 동안 노출시킨 후 세포의 생존율을 XTT assay법에 의하여 정상군과 비교 조사하였다(Table 2, Fig. 1).

Table 2. Time-dependent relationship of cell viability on ischemia by XTT assay in cultured mouse cerebral neurons

Exposure Time to Ischemia	XTT absorbance(530nm)				
	0 min	2 min	4 min	8 min	16 min
0	0.58±0.07	0.56±0.04	0.55±0.05	0.52±0.03	0.50±0.06
Ischemia	0.56±0.08	0.46±0.02	0.35±0.04	0.27±0.02*	0.12±0.01**

Cultured cerebral neurons were treated with ischemia for various time intervals. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value, *p<0.05; **p<0.01.

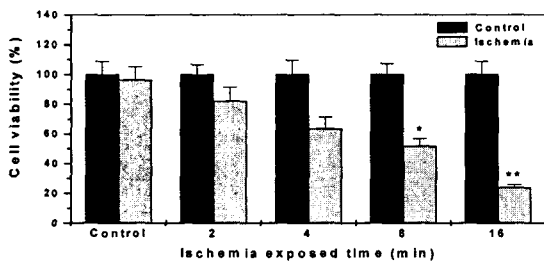


Fig. 1. Time-response relationship of ischemia in cultured mouse cerebral neurons. Other legends are same as the Table 2.

(2) NR 정량

일정시간 동안 培養한 大腦神經細胞를 Ca²⁺, Mg²⁺-free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3 회 세척한 후 허혈상태로 조절된 정온기에서 세포를 각각 2 분에서 16 분 동안 노출시킨 후 세포의 생존율을 NR assay 법에 의하여 정상군과 비교 조사하였다(Table 3, Fig. 2).

Table 3. Time-dependent relationship of cell viability on ischemia by NR assay in cultured mouse cerebral neurons

Exposure	NR absorbance(540nm)				
	0 min	2 min	4 min	8 min	16 min
0	0.64±0.08	0.62±0.07	0.60±0.04	0.58±0.05	0.57±0.06
Ischemia	0.61±0.04	0.54±0.02	0.43±0.03	0.27±0.04*	0.19±0.01**

Cultured cerebral neurons were treated with ischemia for various time intervals. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value, *p<0.05; **p<0.01.

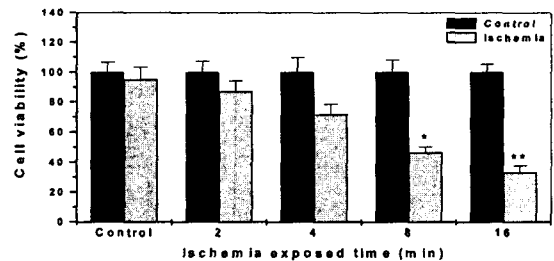


Fig. 2. Dose-response relationship of ischemic condition in cultured mouse cerebral neurons. Cell viability was measured by NR assay. Other legends are same as the Table 3.

2) 세포수 조사

허혈유도에 노출된 시간에 따라 培養 大腦神經細胞의 숫자 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 허혈상태로 조절된 정온기에서 세포를 각각 5 분에서 20 분 동안 노출시킨 후 세포수를 trypanblue 검사법에 의하여 정상군과 비교 조사하였다(Table 4, Fig. 3).

Table 4. Time-dependent relationship of cell number on ischemia by trypanblue exclusion test in cultured mouse cerebral neurons

Exposure	Cell number(1×10 ⁶ per/ml)				
	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min
0	0.64±0.08	0.62±0.07	0.60±0.04	0.58±0.05	0.57±0.06
Ischemia	0.61±0.04	0.54±0.02	0.43±0.03	0.27±0.04*	0.19±0.01**

Cultured cerebral neurons were treated with ischemia for various time intervals. Cell number was determined by trypanblue exclusion test. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value, *p<0.05; **p<0.01.

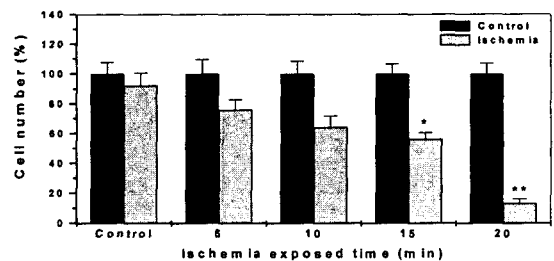


Fig. 3. Dose-response relationship of ischemic condition in cultured mouse cerebral neurons. Cell number was represented as percentage(%). Other legends are same as the Table 4.

2. 大造丸 추출물의 效果

1) SOD 활성 측정

(1) 虛血의 影響

허혈이 培養 大脳神經細胞에 미치는 영향을 SOD 활성 측면에서 조사하기 위하여 허혈상태로 조절된 정온기에서 세포를 각각 8 분에서 20 분 동안 노출시킨 후 SOD의 활성을 정상군과 비교 조사하였다(Table 5, Fig. 4).

Table 5. Time-response relationship of ischemia by SOD activity in cultured mouse cerebral neurons

Exposure Time to Ischemia	SOD activity (unit/mg protein)	Decrease rate of SOD activity(% of control)
0 min	45.6±1.3	-
8 min	37.1±0.8	18.6
12 min	31.2±1.2	31.6
16 min	20.9±0.3**	54.2
20 min	18.8±0.6**	58.8

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to ischemia for 8, 12, 16 and 20 min. SOD activity was measured by colorimetric assay. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. p value * p<0.05; ** p<0.01.

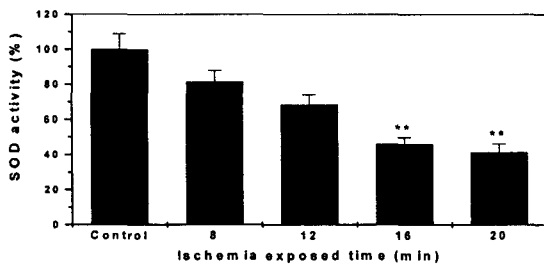


Fig. 4. Time-dependency of SOD activity on ischemia in cultured mouse cerebral neurons. Other legends are same as the Table 5.

Table 6. Dose-response relationship of DJW extracts for their neuroprotective effect on ischemia by SOD activity in cultured mouse cerebral neurons

Exposure	SOD activity(unit/mg protein)			
	0	DJW 1 (40 µg/ml)	DJW 2 (80 µg/ml)	DJW 3 (120 µg/ml)
0	41.7±2.5	45.8±1.7	47.9±3.4	43.6±1.5
Ischemia	18.2±0.9	37.3±1.1*	34.2±0.4	29.8±2.3

Cultured mouse cerebral neurons were preincubated with various concentration of DJW extracts for 2 hours before treatment with ischemia for 16 min. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value, * p<0.05; ** p<0.01.

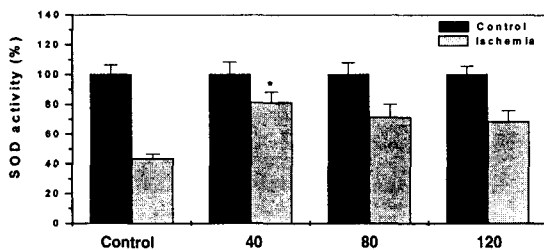


Fig. 5. Dose-dependency of DJW extracts for their neuroprotective effect on ischemia in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were preincubated with various concentration of DJW extracts for 2 hours. Other legends are same as the Table 6.

(2) 大造丸 추출물의 效果

허혈유도에 의해 손상된 培養 大脳神經細胞에 대한 大造丸 추출물이 SOD 활성의 양적 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 DJW를 각각 40(DJW 1), 80(DJW 2), 120(DJW 3) µg/ml의 농도로 배양액에 2 시간 동안 전처리한 다음 이를 다시 허혈상태로 조절된 정온기에서 16 분 동안 처리한 후 이들이 SOD 활성에 미치는 영향을 조사하였다(Table 6, Fig. 5).

2) MDA 정량

(1) 虛血의 影響

허혈이 培養 大脳神經細胞에 미치는 영향을 MDA의 양적변화의 측면에서 조사하기 위하여 허혈상태로 조절된 정온기에서 세포를 각각 2 분에서 26 분 동안 노출시킨 후 MDA의 양적변화를 정상군과 비교 조사하였다(Table 7, Fig. 6).

Table 7. Time-response relationship of ischemia by MDA activity in cultured mouse cerebral neurons

Exposure Time to Ischemia	MDA activity (nmole/mg protein)	Increase rate of MDA activity(% of control)
0 min	9.8±0.7	-
2 min	11.4±0.5	16.3
10 min	12.7±0.9	29.6
18 min	15.4±0.6*	57.1
26 min	17.6±0.8**	79.6

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to ischemia for 2, 10, 18 and 26 min. MDA activity was measured by TBARS assay. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. p value, * p<0.05; ** p<0.01.

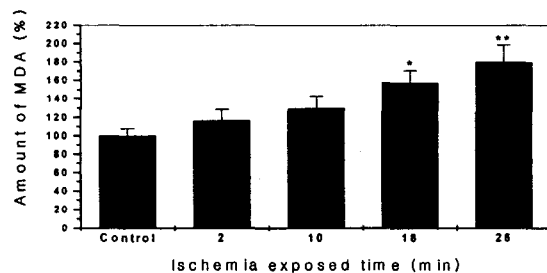


Fig. 6. Time-dependency of MDA activity on ischemia in cultured mouse cerebral neurons. Other legends are same as the Table 7.

Table 8. Dose-response relationship of DJW extracts for their neuroprotective effect on ischemia by MDA activity in cultured mouse cerebral neurons

Exposure	MDA activity(nmole/mg protein)			
	0	DJW 1 (40 µg/ml)	DJW 2 (80 µg/ml)	DJW 3 (120 µg/ml)
0	10.5±0.8	12.4±0.5	9.7±0.6	11.3±0.4
Ischemia	17.2±0.7	15.6±0.9*	12.9±0.5*	13.3±0.6**

Cultured mouse cerebral neurons were preincubated with various concentration of DJW extracts for 2 hours before treatment with ischemia for 18 min. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value, * p<0.05; ** p<0.01.

(2) 大造丸 추출물의 效果

허혈유도에 의해 손상된 培養 大脳神經細胞에 대한 大造丸 추출물이 MDA 활성의 양적 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 DJW를 각각 40(DJW 1), 80(DJW 2), 120(DJW 3) µg/ml의

농도로 배양액에 2 시간 동안 전처리한 다음 이를 다시 허혈상태로 조절된 정온기에서 18 분 동안 처리한 후 이들이 MDA 활성에 미치는 영향을 조사하였다(Table 8, Fig. 7).

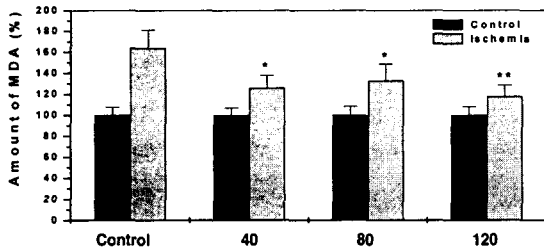


Fig. 7. Dose-dependency of DJW extracts for their protective effect on ischemia in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were preincubated with various concentration of DJW extracts for 2 hours. Other legends are same as the Table 8.

3) LDH 활성 측정

(1) 虚血의 影響

허혈이 培養 大脳神經細胞에 미치는 영향을 LDH 활성의 측면에서 조사하기 위하여 허혈상태로 조절된 정온기에서 세포를 각각 8 분에서 14 분 동안 노출시킨 후 LDH 활성을 정상군과 비교 조사하였다(Table 9, Fig. 8).

Table 8. Time-response relationship of ischemia on LDH release in cultured mouse cerebral neurons

Exposure Time to Ischemia	0 min	8 min	10 min	12 min	14 min
LDH Release (mU/ml)	13.5 ± 1.2	16.4 ± 1.4	18.2 ± 1.7*	21.2 ± 1.6*	23.5 ± 1.8**

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to ischemia for 8, 10, 12 and 14 min. LDH activity was measured by LDH kit assay. The values are the mean ± SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. p value, * p<0.05; ** p<0.01.

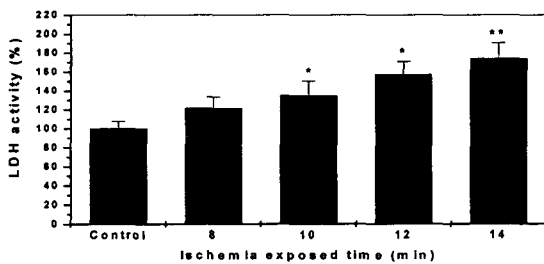


Fig. 8. Time-dependency of ischemia in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to ischemia for 8, 10, 12 and 14 min, respectively. LDH activity was determined as % of control. Other legends are same as the Table 9.

(2) 大造丸 추출물의 效果

허혈유도에 의해 손상된 培養 大脳神經細胞에 대한 大造丸 추출물이 LDH 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 DJW를 각각 40(DJW 1), 80(DJW 2), 160(DJW 3) μg/ml의 농도로 배양액에 2 시간 동안 전처리한 다음 이를 다시 허혈상태로 조절된 정온기에서 12 분 동안 처리한 후 이들이 LDH 활성에 미치는 영

향을 조사하였다(Table 10, Fig. 9).

Table 10. Dose-response relationship of DJW extracts for their neuroprotective effect on ischemia by LDH activity in cultured mouse cerebral neurons

Exposure	LDH activity (mU/ml)			
	0	DJW 1 (40 μg/ml)	DJW 2 (80 μg/ml)	DJW 3 (160 μg/ml)
0	15.9 ± 1.5	15.6 ± 1.4	15.3 ± 1.7	15.1 ± 1.3
Ischemia	27.4 ± 1.8	22.1 ± 1.9*	21.0 ± 2.0*	19.8 ± 1.5**

Cultured mouse cerebral neurons were preincubated with various concentration of DJW extracts for 2 hours before treatment with ischemia for 12 min. The values are the mean ± SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value, * p<0.05; ** p<0.01.

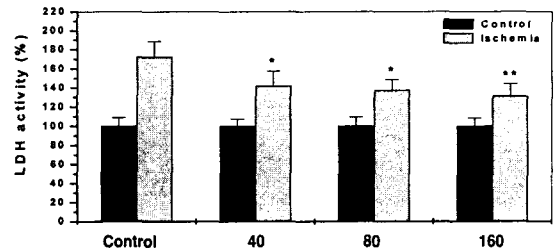


Fig. 9. Dose-dependency of DJW extracts for their protective effect on ischemia in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were preincubated with various concentration of DJW extracts for 2 hours. Other legends are same as the Table 10.

4) TNF-α 활성 측정

(1) 虚血의 影響

허혈이 培養 大脳神經細胞에 미치는 영향을 TNF-α의 활성의 측면에서 조사하기 위하여 세포를 허혈상태로 조절된 정온기에서 각각 6 분에서 18 분 동안 노출시킨 후 허혈의 처리시간에 따른 TNF-α의 양적 변화를 정상군과 비교 조사하였다(Table 11, Fig. 10).

Table 11. Time-response relationship of ischemia on TNF-α activity in cultured mouse cerebral neurons

Exposure Time to Ischemia	0 min	6 min	10 min	14 min	18 min
TNF-α (ng/ml)	0.28 ± 0.07	0.32 ± 0.06	0.36 ± 0.04	0.40 ± 0.05*	0.47 ± 0.02**

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to ischemia for 6, 10, 14 and 18 min. TNF-α activity was measured by immunosorbent assay. The values are the mean ± SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. p value, * p<0.05; ** p<0.01.

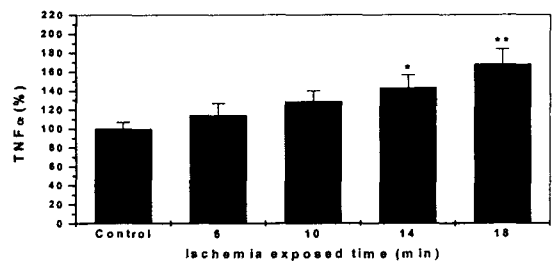


Fig. 10. Time-dependency of ischemia in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were exposed to ischemia for 6, 10, 14 and 18 min, respectively. TNF-α activity was determined as % of control. Other legends are same as the Table 11.

(2) 大造丸 추출물의 效果

허혈유도에 의해 손상된 培養 大脳神經細胞에 대한 大造丸 추출물이 TNF- α 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 DJW를 각각 50(DJW 1), 100(DJW 2), 150(DJW 3) $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 배양액에 2 시간 동안 전처리한 다음 이를 다시 허혈상태로 조절된 정온기에서 14 분 동안 처리한 후 이들이 TNF- α 활성에 미치는 영향을 조사하였다(Table 12, Fig. 11).

Table 12. Dose-response relationship of DJW extracts for their neuroprotective effect on ischemia by TNF- α activity in cultured mouse cerebral neurons

Exposure	TNF- α (ng/ml)			
	0	DJW 1 (50 $\mu\text{g/ml}$)	DJW 2 (100 $\mu\text{g/ml}$)	DJW 3 (150 $\mu\text{g/ml}$)
0	0.22 \pm 0.03	0.23 \pm 0.01	0.24 \pm 0.04	0.26 \pm 0.07
Ischemia	0.08 \pm 0.01	0.18 \pm 0.02**	0.15 \pm 0.05	0.21 \pm 0.06**

Cultured mouse cerebral neurons were preincubated with various concentration DJW extracts for 2 hours before treatment with ischemia for 14 min. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value, * p<0.05; ** p<0.01.

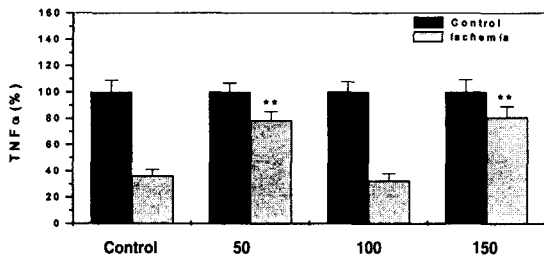


Fig. 11. Dose-dependency of DJW extracts for their protective effect on ischemia in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were preincubated with various concentration of DJW extracts for 2 hours. Other legends are same as the Table 12.

Table 13. Time-response relationship of ischemia by protein synthesis in cultured mouse cerebral neurons

Exposure Time to Ischemia	Protein synthesis (% of control)	Decrease rate of protein synthesis(% of control)
0 min	100 \pm 8.4	-
1 min	87.2 \pm 7.6	12.8
5 min	72.6 \pm 6.4	27.4
10 min	46.7 \pm 3.2*	53.3
20 min	35.8 \pm 2.8**	64.2

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to ischemia for 1, 5, 10 and 20 min. Protein synthesis was measured by SRB assay. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. p value, * p<0.05; ** p<0.01.

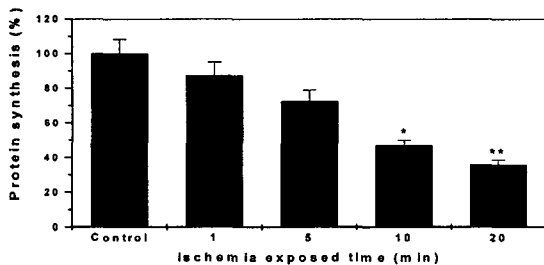


Fig. 12. Time-dependency of protein synthesis on ischemia in cultured mouse cerebral neurons. Other legends are same as the Table 13.

5) 단백질 합성 측정

(1) 虛血의 影響

허혈이 단백질합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 培養 大脳神經細胞를 허혈상태로 조절된 정온기에서 1~20 분 동안 배양한 후 허혈에 따른 단백질합성의 변화를 조사하였다(Table 13, Fig. 12).

(2) 大造丸 추출물의 效果

허혈에 의해 손상된 培養 大脳神經細胞에 대한 大造丸의 추출물이 단백질 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 DJW를 각각 50(DJW 1), 100(DJW 2), 150(DJW 3) $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 배양액에 2 시간 동안 전처리한 다음 이를 다시 허혈상태로 조절된 정온기에서 10 분 동안 처리한 후 이들이 단백질 합성에 미치는 영향을 조사하였다(Table 14, Fig. 13).

Table 14. Dose-response relationship of DJW extracts for their neuroprotective effect on ischemia by SRB assay in cultured mouse cerebral neurons

Exposure	Protein Synthesis(% of control)			
	0	DJW 1 (50 $\mu\text{g/ml}$)	DJW 2 (100 $\mu\text{g/ml}$)	DJW 3 (150 $\mu\text{g/ml}$)
0	100 \pm 6.3	100 \pm 7.6	100 \pm 5.8	100 \pm 8.4
Ischemia	42.2 \pm 6.8	86.4 \pm 7.8**	83.7 \pm 9.2**	75.8 \pm 8.1*

Cultured mouse cerebral neurons were preincubated with various concentration of DJW extracts for 2 hours before treatment with ischemia for 10 min. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks. p value, * p<0.05; ** p<0.01.

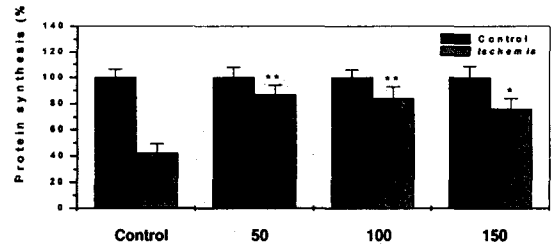


Fig. 13. Dose-dependency of DJW extracts for their protective effect on ischemia in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were preincubated with various concentration of DJW extracts for 2 hours. Other legends are same as the Table 14.

고 찰

뇌허혈로 인한 혈류의 감소는 지남력의 상실을 비롯하여 치매나 학습능력의 저하 등 매우 심각한 휴유증을 초래하게 된다¹⁾. 뇌허혈의 초기에는 현훈을 비롯한 약간의 기억상실과 같은 증상을 나타내지만 병변이 더욱 진전되면 반신마비와 의식불명과 같은 증상을 초래하게 되며 나아가서는 생명의 위협을 받게 된다^{2,3,4)}. 최근에 뇌허혈을 비롯한 중풍 및 치매와 같은 질환에 산소 자유기가 관여한다는 것이 밝혀지면서 뇌허혈을 비롯한 여러 뇌병변의 현상을 산소자유기의 산화적 손상측면에서 규명하려는 연구가 꾸준히 진행되고 있다^{2,5,11,20)}. 뇌허혈시 초기에는 뇌혈류의 증가에 의해 보상되지만 뇌허혈이 진행됨에 따라 혐기성 해당작용이 진행되고, 그 결과 뇌세포에 손상을 입히게 됨은 이미

잘 알려진 사실이다^{6,9}). 뇌허혈시 세포내의 산소결핍은 세포내 산화적 인산화반응이 차단되기 때문에 이로 인해 사립체내의 ATP의 생성작용이 둔화되며, 이같은 현상이 장기간 지속되면 결국 세포에 독성효과를 나타냄으로써 뇌조직의 괴사나 세포의 손상을 초래하게 된다^{1,9}). 또한 이 경우 호기성세포에서는 사립체내의 전자전달계에 의해 산소자유기가 과량 생성되며, 이들이 세포내에 존재하는 glutathione peroxidase나 catalase 및 superoxide dismutase(SOD)에 의해 치환되지 못하고 뇌속에 축적이 됨으로써 결국 뇌병변을 유발하게 된다^{7,13}). 특히, 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)의 경우에는 SOD-1 gene의 점돌연변이에 의하여 미처 SOD에 의해 변환되지 못한 산소자유기가 환자의 뇌속에 축적됨으로써 발병하는 대표적 뇌질환에 속한다²⁵). 따라서 뇌허혈은 산소자유기에 의한 산화적 손상과 밀접한 관련이 있을 뿐만 아니라 산소자유기의 산화적 손상은 세포내 효소의 활성 저해를 비롯하여^{7,9}) 신호전달체계에 대한 영향이나⁹), 세포내 cytokine의 분비와도 밀접한 관련이 있다^{3,8}). 특히, 산소자유기는 흥분성 아미노산과 관련된 연구에서 흥분성 아미노산을 분비한다는 것이 밝혀지면서 산소유리기와 흥분성 아미노산과의 상호작용에 대한 기전규명이 관심의 대상이 되었다^{2,16,17}). 즉, 산소자유기는 흥분성 아미노산을 분비케 함으로써 세포내의 glutamate 수용체 중의 하나인 N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor를 과활성시키고^{10,12,18}), 이는 역으로 세포내 Ca²⁺ 유입을 통하여 칼슘의 균형을 깨뜨림으로써 세포를 손상케 한다^{5,17}). 또한 세포내 칼슘의 증가는 이차전달자인 Ca²⁺-dependent protein kinase c(PKC)의 활성을 촉진시킴으로써 세포를 팽창 내지는 변형시켜 결국 세포의 고사를 초래한다고 한다^{9,14,16}). 따라서 최근에 뇌허혈을 비롯한 뇌졸중에 대한 치료방법의 하나로 항산화제의 투여나 칼슘차단제 및 NMDA 수용체의 길항제 등을 투여함으로써 치료효과를 나타냈다고 보고되고 있다^{17,19}). 이와 관련하여 최근에 뇌허혈이나 치매와 같은 각종 뇌질환에 한약추출물이 치료에 유효한 약리적 활성을 나타내는 성분을 가지고 있다는 것이 밝혀지면서 동물을 대상으로 많은 실험에서 한약추출물에 대한 약리활성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{15,18}).

腦虛血로 인한 腦血管疾患은 韓醫學에서는 中風에 屬하는 것으로³²), 主된 發生原因은 風·火·濕痰·虛症 및 瘀血로 알려져 있으며, 意識障礙 및 運動麻痺 등의 神經學的 症狀를 나타내게 된다³²⁻³⁷). 治法에 있어서는 初期에는 風陽·痰熱·腑實·血瘀 등 標實의 證候가 나타나게 되므로 平肝熄風, 開竅, 調氣, 祛痰, 清熱, 活血 등의 救急治療가 爲主가 되며, 後遺症期에는 氣虛·陰虛 등의 本虛證이 나타나게 되어 益氣活血, 育陰通絡, 滋陰潛陽, 健脾化痰 등의 扶正治療를 주로 사용하고 있다³²).

本實驗에 사용된 大造丸은 明代의 《扶壽精方》²²)에 처음 收錄되어 있으며, 《方藥合編》²¹)에서는 “脈虛 血氣衰弱”을 治療한다고 하였다. 本方은 養陰補精, 大補氣血, 滋補肺腎의 效能이 있어²¹⁻²²) 臨床的으로 髓海不足·肝腎不足·肺腎陰虛·血氣衰弱·陰虛血熱 등으로 인한 病證을 치료하는데 활용되고 있으며, 최근에는 中風 後遺症, 痴呆, 虛勞, 慢性腎炎, 氣管支 喘息, 男性

不育症 등에 응용되고 있다^{23,27-28}).

大造丸의 方劑構成에 대하여 살펴보면 吳²²)는 “龜板, 黃柏, 杜沖, 牛膝은 足少陰腎經藥으로 補腎丸의 意味가 있으며 여기에 紫河車를 配合하면 補天丸이 된다. 麥門冬, 五味子, 人蔘은 生脈散의 意味가 있다. 無芎 金水二臟은 生化之源이니 補肺腎하고 人蔘으로 補氣하며 地黃으로 補血하는데 紫河車를 合하므로 大造丸을 이룬 것이다”라 하였다. 즉 大造丸은 肺腎을 補하는 補腎丸, 生脈散 등의 效能에 紫河車를 配合한 것으로 氣血을 大補하고 補陰하는 效果가 있는 處方이다.

이에 저자는 養陰補精·大補氣血의 效能이 있는 大造丸이 허혈로 인한 大腦神經細胞의 산화적 손상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 大腦神經細胞에 일정시간 허혈상태를 유발시킨 후 세포의 생존율 및 세포수의 변화를 관찰하였으며, 大造丸을 전처리한 후 허혈상태를 유발시켜 SOD 활성, MDA 정량, LDH 활성, TNF- α 활성, 단백질 합성 및 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다. 먼저 培養 大腦神經細胞에 2~16 분동안 허혈을 유발시킨 후 세포생존율 변화를 XTT정량을 이용하여 조사해본 결과 정상군에 비하여 허혈유도 시간에 비례하여 세포생존율이 감소되었다. 특히, 허혈유도 8 분에서는 정상군에 비하여 51.9 %, 16 분에서는 24.0 %의 생존율을 보여 유의한 결과를 나타내었다(Table 2, Fig. 1). 이러한 결과는 허혈이 培養 大腦神經細胞에 독성효과를 나타낸다는 것을 의미한다. 또한 NR assay법을 이용하여 세포생존율을 조사해 본 결과 허혈유도시간에 비례하여 감소되었다. 특히, 허혈유도 8 분에서는 정상군에 비하여 46.6 %와 16 분에서는 33.3 %의 생존율을 보여 유의한 결과를 나타내었다(Table 3, Fig. 2). 이러한 결과는 허혈이 심근세포와 뇌세포에 손상을 초래하였다는 Borgers 등(1990)⁹)의 연구결과와 일치하였다. 이는 아마도 허혈시 형성된 산소자유기가 세포를 손상시킨 결과일 것으로 생각된다²). 한편, 허혈이 大腦神經細胞의 수적 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 허혈을 大腦神經細胞에 5~20 분간 처리한 결과 처리시간에 따라 정상군에 비하여 세포의 수적 감소를 보였으며, 특히 허혈유도 15 분 후에는 세포수가 정상군에 비하여 50 % 이상 감소함으로써 심한 세포의 손상을 나타내었다(Table 4, Fig. 3). 이 결과는 본 실험의 세포생존율의 감소와 일치하였으며, 아마도 허혈시 생성된 산소자유기에 의한 세포막의 지질과산화반응에 의한 손상을 비롯하여 단백질합성 저해 등 복합적인 세포손상의 요인의 결과라고 생각된다^{1,21}). 이러한 이유의 하나로는 본 실험에 있어서 허혈이 LDH의 활성을 증가시키고, 단백질합성율을 감소시킨 것으로 나타났기 때문이다.

허혈로 인한 大腦神經細胞 損傷이 산화적 손상과 관계가 있는가를 알아보기 위하여 본 실험에서는 항산화효소의 하나인 SOD의 활성을 조사해 보았다. 培養 大腦神經細胞에 8~20 분 동안 허혈을 유도한 후 SOD 활성을 조사해본 결과, 허혈유도 시간에 따라 정상군에 비하여 유의한 감소를 보였으며, 특히 허혈 16 분과 20 분에서는 정상군에 비하여 각각 45.8 %와 41.2 %로 감소되어 허혈이 산화적 손상과 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다(Table 5, Fig. 4). 따라서 허혈시 생성된 산소자유기가 세포막을 투과하여 세포내 항산화효소의 활성을 억제함으로써 세포손

상을 초래한 것으로 생각된다^{5,13}). 또한 허혈에 의한 MDA의 양적 변화를 조사하기 위하여 TBARS assay에 의한 MDA의 정량 분석을 한 결과 허혈유도 시간에 따라 정상군에 비하여 MDA의 양적 증가를 보임으로써 허혈은 산소유리에 의한 지질과산화반응의 촉진에 의한 막손상과 이로 인한 세포내의 항산화효소의 활성억제 등과 같은 세포손상을 초래한 것으로 생각된다(Table 7, Fig. 6)^{6,20}).

허혈이 LDH 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 培養 大腦神經細胞에 8~14 분 동안 허혈을 처리한 결과 처리시간에 따라 정상군에 비하여 LDH의 활성이 증가되었으며, 특히 허혈유도 후 10 분 이후 부터는 정상군에 비하여 유의하게 증가한 것으로 나타났다(Table 9, Fig. 8). 이러한 실험결과는 허혈에 의해 지질과산화반응이 활성화 되었음을 말해주는 것으로^{5,20}), 본 실험에서 허혈에 의한 MDA의 증가나 SOD의 활성 증가를 보면 산소자유기가 밀접하게 관여하고 있음을 알 수 있다. 한편, 허혈이 TNF- α 의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 허혈을 培養 大腦神經細胞에 6~18 분 동안 유도한 결과 허혈유도 시간에 따라 정상군에 비하여 TNF- α 의 활성이 증가한 것으로 나타났다(Table 11, Fig. 10). 이러한 결과는 Kham 등(1995)³)이 산소자유기가 혈관내피세포에서 cytokine나 intracellular adhesion molecule(ICAM)과 같은 물질들을 생성함으로써 동맥질환을 유발한다는 연구결과와 일치하였으며, 허혈시 생성된 산소자유기가 TNF- α 의 활성을 촉진시켰을 가능성이 클 것으로 생각된다³).

또한 허혈이 단백질합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 培養 大腦神經細胞에 1~20 분 동안 허혈을 유도한 결과 처리시간에 따라 정상군에 비하여 유의한 감소를 보였다(Table 13, Fig. 12). 이러한 결과는 허혈이 지질과산화반응에 의한 세포막의 손상이나 항산화효소의 활성 저해를 초래한 것처럼 허혈이 세포막의 투과나 막손상을 통하여 세포내 단백질합성에 관여하는 내형질세망을 비롯하여 리보솜체와 같은 단백질합성계에 작용하는 세포소기관이나 단백질효소의 활성 등을 저해하였을 가능성이 높을 것으로 생각된다^{7,9,13}). 한편, 허혈상태에서 大造丸 추출물이 SOD와 MDA의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 培養 大腦神經細胞에 大造丸 추출물인 DJW 1, DJW 2, DJW 3을 각각 40, 80, 120 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 전처리한 후 허혈을 유발시킨 결과, 허혈 처리한 대조군에 비하여 SOD의 활성 증가와 MDA의 양적 감소를 보임으로써 허혈로 인한 세포의 손상을 방어한 것으로 나타났다(Table 6, Fig. 5)(Table 8, Fig. 7). 이러한 결과는 大造丸 추출물의 구성성분중 산소자유기의 산화적 손상에 대한 항산화효과와 같은 약리활성을 나타냄으로써 산소자유기에 의해 손상된 항산화효소의 활성 증가나 지질과산화반응을 억제한 결과인 것으로 생각된다^{15,18,20}). 또한, 최근 연구에서 獨活¹⁵)이나 人蔘¹⁸)과 같은 한약 추출물들이 산화적 손상으로 인해 영향을 받은 神經細胞를 방어하거나 보호하였다는 연구결과와 일치하였다. 또한 허혈유도 상태에서 大造丸 추출물이 LDH와 TNF- α 의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 大造丸 추출물인 DJW 1, DJW 2, DJW 3을 전처리한 후 허혈을 유발시킨 결과 LDH의 활성은 허혈 처리한 대조군에 비하여 大造丸 추출물 전처리시 모두 유의한 감소를 보

였으며(Table 10, Fig. 9), TNF- α 의 활성에 있어서도 DJW 1과 DJW 3가 허혈 처리한 대조군에 비하여 TNF- α 의 활성을 유의하게 감소시킨 것으로 나타났다(Table 12, Fig. 11). 그러나 DJW 2의 경우 허혈 처리한 대조군에 비하여 TNF- α 의 활성은 감소시켰으나 유의성은 보이지 않았다. 이러한 실험결과는 허혈에 의해 생성된 산소자유기에 의한 지질막의 과산화반응과 cytokine의 분비 증가를 大造丸 추출물이 항산화효과를 나타내어 산화적 손상으로부터 神經細胞를 보호한 것으로 생각되며, 이는 본 실험의 MDA정량이나 SOD의 활성 증가 등이 뒷받침하고 있다.

大造丸 추출물이 단백질합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 大造丸 추출물인 DJW 1, DJW 2, DJW 3을 전처리한 결과 허혈 처리한 대조군에 비하여 모두 유의하게 증가하였다(Table 14, Fig. 13). 이는 허혈로 인해 손상을 입은 단백질합성과 관련된 효소나 세포소기관의 손상을 보호해준 결과라고 생각되며, 특히 본 연구의 결과에서처럼 大造丸 추출물이 SOD의 활성을 증가시킨 것으로 보아 허혈시 생성된 산소자유기의 산화적 손상을 한약추출물이 저해한 결과라고 생각된다^{15,18,19}). 이상의 결과를 종합하면 大造丸 추출물을 허혈 유발전에 전처리한 경우 허혈로 인한 세포손상시 나타나는 항산화효소의 저하, 지질과산화반응 항진, 단백질 합성저하 등을 효과적으로 억제하였다. 즉 허혈시 생성된 산소자유기의 산화적 손상을 大造丸 추출물이 저해한 결과라고 생각된다. 그러나 앞으로도 전자현미경적 관찰에 의한 세포 미세구조의 변화나 분자유전 등을 통한 유전인자의 발현과 같은 연구가 더욱 필요하리라 사료된다.

결 론

虛血에 의하여 유발되는 神經細胞損傷에 대한 大造丸 추출물의 防禦效果를 알아보기 위하여 大造丸 추출물을 培養 大腦神經細胞에 2시간 전처리한 후 虛血을 1~26분 동안 유도하였다. 허혈유도 후 SOD 활성, MDA 정량, LDH 활성, TNF- α 활성, SRB assay에 의한 단백질합성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 大造丸 추출물은 虛血에 의한 大腦神經細胞의 SOD 활성 감소를 유의하게 증가시켰고, MDA 활성 증가를 유의하게 감소시켰으며, LDH 활성 증가를 유의하게 감소시켰다. 大造丸 추출물은 虛血에 의한 大腦神經細胞의 TNF- α 활성 증가를 유의하게 감소시켰고, 大造丸 추출물은 虛血에 의한 大腦神經細胞의 단백질합성 감소를 유의하게 증가시켰다.

以上的 結果를 종합하면 大造丸 추출물은 SOD활성 증가, MDA 활성 감소, LDH 활성 감소, TNF- α 활성 감소, 단백질 합성을 증가시킴으로써 虛血시 생성된 산소자유기에 의한 大腦神經細胞 損傷을 防禦하는 효과가 있어 中風 後遺症 및 癱瘓 등에 臨床的으로 有效하게 活用될 수 있으리라 思料된다.

감사의 글

본 논문은 2003년도 원광대학교 교비 연구비지원에 의해 이루어짐.

참고문헌

1. Dario G, Antonio C, Giuseppe P. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 19:257-267, 1996.
2. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J*. 4:2587-2597, 1997.
3. Kham BV, Pathasarathy SS, Alexander RW, Medford RM. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J. Clin Invest*. 95:1262-1270, 1995.
4. Mattson MP, Cheng B, Smith-Swintosky VL. Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium- and free radical mediated excitotoxic injury : Implications for treating neurogenerative disorders. *J. Exp Neurol*. 124:89-95, 1993.
5. 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.
6. Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J. Neurosci Res*. 37:62-70, 1994.
7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods*. 65:55-63, 1983.
8. Alexander RW. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: A new perspective. *Hypertension*. 25:155-161, 1995.
9. Borgers M, Vandeplasse G, van Reempts J. Cytochemical markers of ischemia in the heart and brain. *J. Histochem*. 22:125-133, 1990.
10. 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.
11. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem*. 59:1609-1623, 1992.
12. 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*. 25:360-368, 1990.
13. 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.
14. Takahashi K., Fujita T., Mayum T., Kish T. Effect of Adriamycin on Cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem. Pharm.* 35(1):326-334, 1987.
15. 林泰榮. 獨活類의 效能에 關한 實驗的 研究. *大韓韓醫學會誌*. 8(2):97-98, 1987.
16. 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.
17. Zeman S, Liloyd C, Meldrum B, Leigh PN. Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. *J. Neuropathol. Appl Neurobiol*. 20:219-231, 1994.
18. 田炳蕪, 姜益賢, 文炳淳. 人蔘이 산소유리기로 손상된 척수신경세포의 손상에 미치는 영향. *대한동의병리학회지*. 12(1):96-101, 1998.
19. 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.
20. 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 alphatocopherol administration. *Stroke*. 14:977-982, 1983.
21. 黃度淵. 證脈方藥合編. 서울: 南山堂. p.152, 1995.
22. 吳旻. 明清經驗方三種. 扶壽精方. 北京: 中國中醫學出版社. p.6-8,17-18, 1996.
23. 鄧啓源. 河車大造丸治療男性不育症106例. *요령중의잡지*. 10:15-16, 1990.
24. 李源哲. 國譯醫學心悟. 서울: 書苑堂. p.170, 1994.
25. 李時珍. 本草綱目. 北京: 人民衛生出版社. p.1936,2965, 1991.
26. 李樾. 編註醫學入門(下卷). 서울: 大星文化社. p.553, 1994.
27. 裴乘哲 外. 實用中風治療學. 서울: 成輔社. p.190-191, 1997.
28. 白泰鉉. 虛勞의 治法 및 治方에 關한 文獻的 考察. *大韓韓方內科學會誌*. 13(1):3-6, 1992.
29. 曹圭堧 外 2人. 흰쥐의 증대뇌동맥 폐쇄 후 大造丸 투여가 대뇌반구 및 시상위축에 미치는 영향. *韓方成人病學會誌*. 4(1):163-175, 1998.
30. 李知恩. 大造丸이 흰쥐의 誘發된 高脂血症 및 積출심장에 미치는 영향. *동국대학교 대학원*. 1999.
31. 金根宇. L-NAME으로 誘發된 학습·기억장애와 腦虛血 損傷에 關한 大造丸의 效果. *동국대학교 대학원*. 1999.
32. 全國韓醫科大學 心系內科學教室. 心系內科學. 서울: 書苑堂. p.420-435, 1999.
33. 劉完素. 劉河間三六書. 서울: 成輔社. p.37-44,323-330, 1976.
34. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울: 大星文化社. p.281, 1976.
35. 朱丹溪. 丹溪心法. 서울: 杏林書院. p.19, 1965.
36. 張景岳. 景岳全書. 台北: 台聯國風出版社. p.181,198, 1959.
37. 王清任. 醫林改錯. 臺灣: 東方書店. p.49, 1960.
38. 方藥中 外. 實用中醫內科學. 上海: 上海科學技術出版社. p.414-420, 1986.
39. 黃星垣 外. 中醫急症大成. 北京: 中醫古籍出版社. p.312-316, 1987.