대한한방내과학회지 제32권 1호(2011년 3월)
Korean J. Orient.Int. Med. 2011:32(1)43-55

續命湯이 C6 glial cell 보호 및 허혈성 뇌손상에 미치는 영향

안가영, 최은희, 김인수, 강성순, 이영수, 홍 석, 전상윤
동신대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of *Sokmyeung-tang*(SMT) on the Protection of C6 Glial Cells and Ischemic Brain Damage

Ga-yong An, Eun-hee Choi, In-soo Kim, Seong-sun Kang, Young-soo Lee, Seok Hong, Sang-yun Jeon
Dept. of Internal Medicine of Oriental Medicine, Dong-Shin University

ABSTRACT

Objectives : *Sokmyeung-tang*(SMT) has been used for treatment of CVA in traditional oriental medicine, so this study was designed to evaluate the effect of SMT's protection on brain cell damage against the oxidative stress that was affected by CVA. We also investigated the effect of motor function improvement and neurotrophic factor in ischemic cerebral damaged rats.

Methods : We measured cell viability after administrating SMT, chemicals(Paraquat, SNP, rotenone, and H_2O_2) which cause oxidative stress, and both SMT and chemicals. We carried out neurobehavioral evaluation(Rotarod test, Beam-walking test, postural reflex test) and observed BDNF (brain-derived neurotrophic factor) expression by injecting SMT into ischemic cerebral damaged rat.

Results : Through this study, we observed the following three results. First, brain cell death caused by paraquat, rotenone, and H_2O_2 significantly decreased with the treatment of SMT. Second, neuronal movement function in ischemic cerebral damaged rats was significantly improved by the treatment of SMT. Third, BDNF in ischemic cerebral damaged rats increased with the treatment of SMT.

Conclusions : SMT protects brain cells from damage induced by oxidative stress (Paraquat, rotenone, H_2O_2). SMT also improves neuronal movement function and increases BDNF in ischemic cerebral damaged rats.

Key words : *Sokmyeung-tang*, Oxidative stress, Ischemic damaged rat, Neuronal movement function, BDNF

Ⅰ. 서 론

뇌졸중은 뇌혈관의 파열이나 폐쇄로 인해 뇌에 혈액이 충분이 공급되지 않아 뇌의 신경계가 손상을 받아 발생하는 질환으로[1], 급격한 의식장애와 운동 및 감각장애 등의 신경학적 증상을 나타내며 뇌출혈, 뇌경색, 일과성 뇌허혈, 지주막하 출혈 등이 포함된다[2,3].

뇌허혈로 인해 손상을 받은 신경세포는 괴사성 신경세포사(NND, necrotic neuronal death)와 지연성 신경세포사(DND, delayed neuronal death)로 나눌 수 있는데[4], 지연성 신경세포사의 경우 그 원인은 glutamate의 흥분독성, 단백질 합성장애, 산화적 스트레스로 인한 세포고사 등으로 추정하고 있다[5,6,7]. 빠른 시기에 적절한 치료를 시작하는 경우 비가역적 세포손상을 막을 수 있기 때문에 뇌허혈로 인한 신경세포 손상을 최소화하기 위한 연구가 지속적으로 진행되고 있다[8,9].

· 교신저자: 전상윤 광주시 남구 월산동 377-12
동신대학교 광주한방병원 2내과
TEL: 062-350-7207 FAX: 062-366-1882
E-mail: damiano70@hanmail.net

續命湯은 ≪金匱要略・中風歷節病脈證治≫[10]에서 "古今錄驗續命湯, 治中風, 身體不能自收, 口不能言, 冒昧不知痛處, 或拘急不得轉側"라 하여 중풍 치료제로 제시된 이후 ≪千金方≫[11]에서 大續命湯, 小續命湯을 사용하는 등 여러 의가들에서 加減을 통해 사용되어 왔다.

續命湯 및 加減方에 관한 연구로는 續命湯의 出處, 種類 및 造成에 대한 考察[12], 當歸飮과 續命湯이 血栓症 및 高粘度血症에 미치는 影響[13], 小續命湯이 백서의 국소뇌혈류량과 혈압에 미치는 영향[14], 小續命湯이 저산소증으로 유발된 대뇌신경세포의 손상에 미치는 영향[15], 祛風續命湯이 지질대사에 미치는 영향[16] 등이 있으나 아직 허혈성 뇌손상에 대한 續命湯의 효과에 관한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 續命湯이 뇌허혈에 미치는 효과를 알아보기 위해 신경교세포주인 C6 glial cell에 續命湯 투여 후 산화적 스트레스에 의한 세포사멸 방지 효과 및 SOD 활성도와 glutathione 함량을 관찰하였고, 뇌조직 손상 재생능력을 보고자 허혈성 뇌손상을 유발한 흰쥐의 신경학적 운동행동 평가 및 BDNF를 측정하여 유의성을 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 세포주

흰쥐의 뇌세포에서 유래한 신경교세포주인 C6 glial cell은 전문배양회사(한국세포주은행, 한국)에서 동결 상태로 구입하여 사용하였다.

2) 동 물

동물은 8주령의 250±50 g의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 구입하여(대한실험동물, 한국) 사용하였다. 동물은 항온항습 장치가 부착된 사육장에서 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경(실내온도 24±2℃, 습도 55±5%, 12시간 명암주기)에 1주일 이상 적응시킨 후 사용하였다.

3) 약 재

본 실험에서 사용한 續命湯(*Sokmyeung-tang*, 이하 SMT)의 구성은 金匱要略[10]을 기준하였고, 실험에 사용된 약재는 동신대학교 부속 광주 한방병원에서 구입하였으며, 구체적인 처방 내용은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of *Sokmyeung-tang*(SMT)

Herbal name	Scientific name	Volume(g)
麻 黃	*Herba Ephedrae*	6.0
桂 枝	*Cinnamomi Ramulus*	6.0
當 歸	*Angelicae Gigantis Radix*	6.0
人 蔘	*Ginseng Radix*	6.0
石 膏	*Fibrosum Gypsum*	6.0
乾 薑	*Zingiberis Rhizoma Siccus*	6.0
甘 草	*Glycyrrhizae Radix*	6.0
川 芎	*Cinidii Rhizoma*	6.0
杏 仁	*Armeniacae Semen*	5.0
Total amount		53.0

2. 방 법

1) 시료의 제조

SMT 220 g을 증류수 1,500 cc에 넣고 전기약탕기(대웅, 한국)로 120분 전탕하여 얻어진 추출액을 걸러서 원심분리기(eppendrof, Germany)에서 5,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 감압농축기(EYELA, Japan)로 220 ㎖로 농축한 후, 동결 건조하여 최종적으로 24.16 g 의 시료를 얻었고, 이를 증류수에 희석하여 각각의 농도별로 투여하였다.

2) *in vitro*

(1) 세포 배양

신경교세포주인 C6 glial cell은 Robwell Park Memorial Institue(RPMI) 배지에 10% (v/v) fetal bovine serum(Gibco, U.S.A)과 antibiotic antimycotic을 첨가한 후 37℃, 5% CO_2의 배양기에서 배양한 후 Phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하고, Trypsin-EDTA(Sigma, U.S.A) 처리 후, 37℃에서 5분간 방치하였다가 채집하였고, 계대 배양은 평균

2.5일에 1회씩 시행하였다.

(2) 세포 생존율에 미치는 영향 측정

세포를 1×10^6 개로 분주한 후 37℃, 5% CO_2를 유지하며 24시간 동안 pre-incubation 시킨 후, 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 ㎍/㎖ 농도의 약물을 처리하고 다시 24시간 동안 배양한다. 배양이 끝나고, 세포를 부유 시킨 다음 trypan blue(Sigma, U.S.A.)를 1:1 비율로 첨가하고 세포계수기(Hematocytometer)를 이용하여 관찰하였다.

(3) 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 보호효과 측정

산화적 스트레스에 대한 세포 사멸 보호효과는 MTT법[17]을 변형하여 측정하였다. 먼저 C6 세포주를 96-well plate에 well 당 1×10^4개씩 분주한 후, 37℃, 5% CO_2의 환경에서 4시간동안 부착을 시행하였다. 부착이 끝난 후, SMT를 처리하고 24시간 동안 방치한 후 15 mM의 paraquat, 0.8 mM의 rotenone, 0.8 mM의 SNP 그리고, 0.5 mM의 H_2O_2를 각각 처리하고 37℃, 5% CO_2가 제공되는 환경에 4시간 동안 배양한 후, 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan결정을 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 녹인 후 microplate reader (Molecular Device, U.S.A.)를 이용하여 540 ㎚에서 광도를 측정하였다.

각 실험에서 실험군은 C6 glial cell에 아무런 처치를 하지 않은 normal 군, SMT만 처치한 SMT 군, SMT 전처치 없이 paraquat, rotenone, SNP, H_2O_2를 투여한 chemical군, 500 ㎍/㎖의 SMT를 전처치하고 각각의 chemical를 처리한 SMT + chemical군으로 나누어 비교하였다.

3) *in vivo*

(1) 실험군 분류 및 시약의 투여

실험동물은 대조군(n=21)과 실험군(n=21)으로 구분하였고, 각 군은 7마리씩 나누어 1, 7, 14일 후로 투여하였다. 대조군은 허혈성 뇌손상 유발 후 생리식염수처치군을 투여하였고, 실험군은 허혈성 뇌손상 유발 후 SMT을 투여하였다. 각 군은 허혈성 뇌손상 유발 1일 후에 처음 약물을 처치하였고, 유발 후 2주일 동안 1회/2일씩 약물을 투여하였다.

(2) 허혈성 뇌손상 유발

허혈성 뇌손상 유발 흰쥐 모델은 Longa 등[18]의 방법을 이용하여 허혈을 유발하였다. 먼저 흰쥐를 마취 챔버(Royal medical, 한국)에 넣고, 70% N_2O와 28.5% O_2 가스에 1.5% enflurane을 혼합시킨 마취가스로 흡입전신마취 후 체온을 37±0.5 ℃로 일정하게 유지시킨 상태에서 흰쥐의 목 정중부를 절개하고 좌측 총경동맥(common carotid artery)을 박리하여 총경동맥을 따라 근위부로 진행하여 외경동맥(external catotid artery)과 내경동맥(internal catotid artery)을 분리한 미주신경을 혈관과 분리하고 총경동맥과 외경동맥을 묶어서 고정하고 총경동맥 분지부에 monofilament nylon(4.0호) 실 끝을 삽입하여 중대뇌동맥의 가는 혈관을 폐쇄하도록 한 후 수술부위를 봉합 및 소독 하였다.

(3) 실험모델의 적절성 확인

신경학적 증상이 나타나는 개체만 선별하기 위해 Garcia 등[19]이 제시한 신경학적 검사를 실시하였고, 케이지 내에서 흰쥐의 움직임, 공중에서 꼬리를 잡았을 때 다리의 평형적 움직임, 앞발이 지면에 닿았을 때 앞발의 움직임, 철망을 오르는 모습, 몸통자극에 대한 반응, 콧수염 자극에 대한 반응에 대해 앞의 세 항목은 최하 0점에서 최고 3점, 뒤의 세 항목은 최하 1점에서 최고 3점을 주어 전체 점수가 3점에서 18점까지로 표시하였다.

또한, 허혈성 뇌손상 유발 24시간 후에 pentobabital sodium(4 ㎎/㎏)을 복강 주사하고 뇌를 적출하여 5분간 냉각된 인공 뇌척수액에 담근 후 적출한 뇌를 2,3,4-triphenyltertrazolium chloride(TTC, Sigma, U.S.A.)를 포함하는 phosphate-buffered saline(PBS)에 30분간 담가 배양한 후 2% paraformaldehyde 용액에 고정하여 뇌손상 여부를 확인하였다.

(4) 신경학적 운동행동 검사(Neurological motor behavioral test)

허혈성 뇌손상 유발 전, 유발 1, 7, 14일 후에 신

경학적 운동행동 검사(rotarod test, beam-walking test, postural reflex test)를 각각 실험내용을 모르는 동일 평가자에 의하여 맹검 방법을 이용하여 평가하였다.

① Rotarod test

Rotarod(rod: 직경 7.5 ㎝, 길이 10 ㎝, 높이 35 ㎝)는 Balduini 등[20]의 연구를 수정한 것으로 흰쥐의 운동 결손과 균형 유지를 평가하기 위해 사용되었다. 처음 4 rpm으로 시작하여 10초당 4 rpm씩 가속하여 20 rpm에서 떨어지지 않고 몇 초간 버티는지(최대 60초까지) 측정하였으며, 3회 측정하여 평균값을 비교하였다.

② Beam-walking test

Beam-walking test는 Goldstein과 Davis[21]의 연구를 수정한 것으로 전정 감각의 통합, 전정운동기능 및 정교한 운동 협응력을 평가하기 위해 사용되었다. 높이 30 ㎝의 의자를 마주 보게 배치하고 폭 3 ㎝, 길이 120 ㎝의 나무 막대를 올려놓고 막대의 한쪽 끝은 20 × 16 × 20 ㎝의 어두운 상자를 배치하고 막대의 반대 끝에서 상자를 향해 건너갈 수 있도록 소리자극을 적용하여 막대를 완전히 건너는데 걸리는 시간(sec)을 3회 측정하여 평균값을 비교하였다.

③ Postural reflex test

Postural reflex test는 Bederson[22]의 연구를 수정한 것으로 신경학적 손상에 따른 앞다리의 기능적 사용여부 평가를 위해 사용되었다. 흰쥐를 꼬리부터 들어 올려서 바닥에 천천히 내려놓을 때 앞다리가 대칭적으로 바닥을 짚으면 3점, 손상부위 반대쪽의 앞다리가 몸통 쪽으로 굴곡 되면 2점, 앞다리뿐만 아니라 어깨나 몸통 등도 굴곡 되면 1점을 주었으며, 3회 측정하여 평균값을 비교하였다.

(5) 뇌조직 절편제작

허혈성 뇌손상 유발 7일과 14일 후에 각 군당 7마리씩을 전신 마취제인 Rompun(바이엘코리아)으로 복강주사(0.6 ㎎/㎏)하여 마취한 후, 심장관류를 통해 0.9% NaCl 용액으로 관류 수세하였다. 혈액이 제거된 후에는 4% 중성 파라포름알데하이드로 관류하여 조직 전고정을 실시하였고, 전고정된 실험동물로부터 뇌를 적출하여 24시간 동안 4% 파라포름알데하이드로 후고정을 실시하였다. 후고정이 끝난 조직은 에탄올을 이용한 탈수과정과 자일렌(xylene)을 이용한 세정과정을 거쳐 파라핀 포매(paraffin embedding)를 실시하였다. 제작된 파라핀 블록은 미세절단기(Sakura 2040, Japan)를 이용하여 5 ㎛ 두께로 박절한 후 슬라이드를 제작하여 면역조직화학 염색을 실시하였다.

(6) 면역조직화학 염색

뇌손상 유발 후 7일과 14일에 대뇌피질 운동기능영역에서의 BDNF 면역조직화학 염색을 실시하였다. 먼저, 뇌 조직절편을 0.01 M PBS로 세척한 후 1% normal blocking serum sodium borohydride로 1시간 처리하고, 전처리과정으로 0.3%의 과산화수소 용액에 20분간 처리하였다. 다시 0.01 M PBS로 세척한 후 Novostain Super ABC Kit(Novocastra Lab., U.K.)를 사용하여 20분간 반응시키고 1:500으로 희석한 anti-BDNF(AB1513, Chemicon, U.S.A.)로 4℃에서 24시간 처리한 후 0.01 M PBS로 수세하고, 희석된 바이오티닐 이차항체액으로 30분간 배양하였다. 다시 PBS로 세척하고 Novostain Super ABC Reagent로 30분간 배양하고 PBS로 세척하였다. 발색을 위해 DAB(BUF021B, Serotec Ltd, U.K.)에 10분간 적용 후 Mayer's Hematoxyline(MHS-32, Sigma, U.S.A.)으로 대조염색을 실시하였으며, 흐르는 물에 5분간 수세하고 슬라이드 표본을 건조시킨 후 탈수과정을 거쳐 봉입을 실시하였다. 봉입한 조직을 200배율의 광학현미경(BX50, Olympus Optical Co., Japan)과 현미경에 장착된 CCD 카메라(Foculus, Germany)로 촬영 후 대뇌피질 운동기능영역에서의 BDNF 발현정도를 반정량적 방법으로 평가하였다.

3. 통계처리

통계처리는 통계프로그램인 SPSS 12(SPSS, U.S.A.)

를 활용하였다. 두 개의 집단으로 구분된 것은 paired sample t-test를, 집단 간의 상호 간섭이 나타나는 것은 one-way ANOVA로 검정하였으며, 사후검정은 tukey test를 이용하였고, p-value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 인정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 세포 생존율에 미치는 영향

SMT 투여가 C6 glial cell 생존율에 미치는 영향을 관찰한 결과 농도간 생존율에 차이가 없었다(Fig. 1).

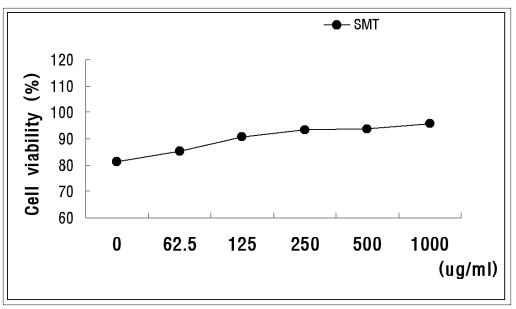

Fig. 1. Effects of SMT on Cell Viability of C6 Glial Cells in vitro.

C6 glial cells were attached 100 mm plate, and added SMT as indicated concentrations respectively. After 24 hr incubation, cell viabilities were measured using trypan blue exclusion methods.

2. 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 보호 효과

1) Paraquat에 의한 세포 사멸 보호 효과

Normal 군의 기저치를 100.00±1.45%로 환산하였을 때 SMT 군은 98.40±10.25%, paraquat 군은 87.98±4.84%, SMT + paraquat 군은 98.83±4.12%로 나타나, SMT 투여가 paraquat 의 산화적 스트레스에 대해 유의성 있게(P<0.05) C6 glial cell을 보호하는 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

2) SNP에 의한 세포 사멸 보호 효과

Normal 군의 기저치를 100.00±1.45%로 환산하였을 때 SMT 군은 98.40±10.25%, SNP 군은 79.65 5.70%, SMT + SNP 군은 82.29±7.03%로 나타났으며 SMT군에 비해 SNP군이 유의한 감소를 보였을 뿐(P<0.01) SMT + SNP 군이 SNP 군에 비하여 유의한 증가를 보이진 못했다(Fig. 3).

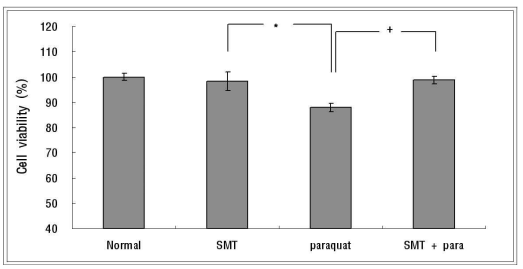

Fig. 2. Protective Effects of SMT on Oxidative Stress Induced by Paraquat in C6 Glial Cells.

C6 Cells were attached 96-well plate, and added 500 ㎍/㎖ of SMT for 24 hr. After 24 hr incubation, indicated concentration of paraquat was treated for 2 hr. ; Normal : non-treated ; SMT : only SMT treated ; paraquat : only paraquat treated ; SMT + paraquat : SMT pre-treated then paraquat treated. ; * : Statistically significance compared SMT group with paraquat group (* ; P<0.05) ; + : Statistically significance compared SMT+paraquat group with paraquat group (+ ; P<0.05)

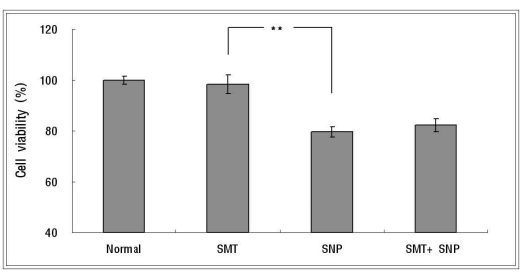

Fig. 3. Protective effects of SMT on Oxidative Stress Induced by SNP in C6 Glial Cells.

Normal : non-treated ; SMT : only SMT treated ; SNP : only SNP treated ; SMT + SNP : SMT pre-treated then SNP treated. ; ** : Statistically significance compared SMT group with SNP group (** ; P<0.01)

3) Rotenone에 의한 세포 사멸 보호 효과

Normal 군의 기저치를 100.00±1.45%로 환산하

였을 때 SMT 군은 98.40±10.25%, rotenone 군은 85.30±7.95%, SMT + rotenone 군은 98.14±2.66%로 나타나, SMT 투여가 rotenone의 산화적 스트레스에 대해 유의성 있게(P<0.01) C6 glial cell을 보호하는 것으로 관찰되었다(Fig. 4).

4) H_2O_2에 의한 세포 사멸 보호 효과

Normal 군의 기저치를 100.00±1.45%로 환산하였을 때 SMT 군은 98.40±10.25%, H_2O_2 군은 66.46±6.88%, SMT + H_2O_2 군은 94.85±6.99%로 나타나, SMT 투여가 H_2O_2의 산화적 스트레스에 대해 유의성 있게(P<0.01) C6 glial cell을 보호하는 것으로 관찰되었다(Fig. 5).

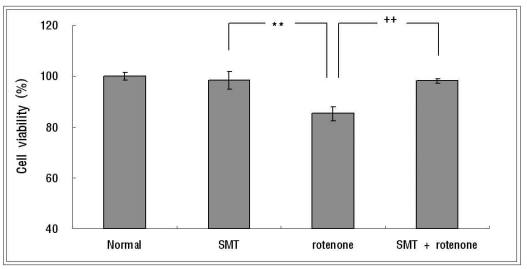

Fig. 4. Protective Effects of SMT on Oxidative Stress Induced by Rotenone in C6 Glial Cells.

Normal : non-treated ; SMT : only SMT treated ; Rotenone : only rotenone treated ; SMT + rotenone : SMT pre-treated then rotenone treated. ; ** : Statistically significance compared SMT group with rotenone group (** ; P<0.01) ; ++ : Statistically significance compared SMT+rotenone group with rotenone group (++ ; P<0.01).

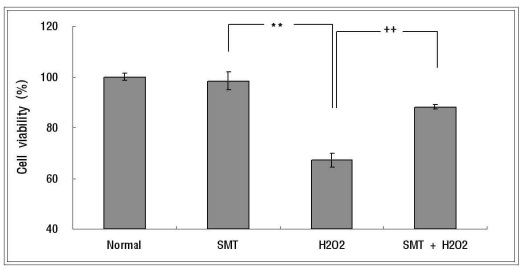

Fig. 5. Protective Effects of SMT on Oxidative Stress Induced by H_2O_2 in C6 Glial Cells.

Normal : non-treated ; SMT : only SMT treated ; H_2O_2 : only H_2O_2 treated ; SMT + H_2O_2 : SMT pre-treated then H_2O_2 treated. ; ** : Statistically significance compared SMT group with H_2O_2 group (** ; P<0.01) ; ++ : Statistically significance compared SMT + H_2O_2 group with H_2O_2 group (++ ; P<0.01)

3. 허혈성 뇌손상 유발 확인

1) 신경학적 검사

허혈성 뇌손상 유발 24시간 후 실험 사용 적절성 확인을 위해 Garcia 등[19]이 제시한 신경학적 검사를 시행하였다. 유발 전, 후 차이를 비교해 본 결과, 대조군 및 실험군은 13.1±0.13점에서 11.1±0.19점, 13.4±0.27점에서 10.9±0.15점으로 각각 유의한 차이를 보였다(p<0.01)(Table 2).

Table 2. Comparison of Neurological Examination after 1st Day Ischemic Brain Injury (score)

Group	Days of examination		t
	Pre	1	
Ⅰ	13.1±0.13	11.1±0.19	-2.478**
Ⅱ	13.4±0.27	10.9±0.15	-2.712**

All values are showed mean ± SD
** : Significance of the difference was assessed by Paired t-test(**: p<0.01)
Ⅰ(Control) : Saline injection after ischemic brain injury
Ⅱ(Experiment) : SMT injection after ischemic brain injury
Pre : Pre ischemic brain injury ; 1 : After 1st day ischemic brain injury

2) 뇌조직의 육안적 손상 확인

국소 허혈성 뇌손상 유발 확인을 위해 TTC 염색을 실시하였으며, TTC 염색 소견으로는 정상군과 비교 시 뇌졸중을 유발한 실험군의 신경세포에서 내경동맥에서 분지되는 중대뇌동맥에 혈액을 공급하는 곳을 중심으로 백색으로 붉게 염색되지 않음을 확인할 수 있어 뇌조직의 손상을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

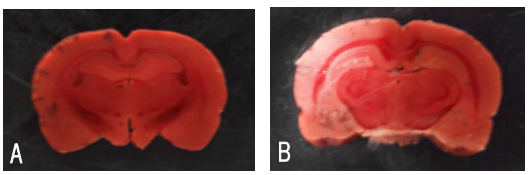

Fig. 6. Histological Changes after 1st Day of Focal Ischemic Brain Injury (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride monohydrate, TTC staining)

A : Normal, B : Stroke induced

4. 신경학적 운동행동 평가

1) Rotarod test

대조군과 실험군 모두 뇌손상 유발 전과 유발 1일 후에서 유의한 시간차이를 보여($p<0.001$) 운동기능저하를 확인할 수 있었다. 대조군에서는 뇌손상 1일 후와 비교시 7일 후에서는 유의한 차이를 보이지 않았으나, 유발 14일 후에서는 유의한 차이를 보였다($p<0.001$). 실험군에서는 7일 및 14일 후에서 유의한 차이를 보여($p<0.001$) SMT 투여가 운동기능을 개선시키는 것으로 관찰되었다(Table 3).

Table 3. Change of Score on Rotarod Test Following the Measure Time (sec)

Groups	Days of examination			
	Pre	1	7	14
Ⅰ	58.85 ±4.28	17.40 ±4.65###	19.35 ±4.14	33.15 ±4.52***
Ⅱ	57.95 ±5.06	18.50 ±3.95###	33.65 ±4.38***	46.50 ±4.96***

Values are showed mean ± SD.
: Statistically significant compared with pre day (### ; $p<0.001$).
*** : Statistically significant compared with 1st day (*** ; $p<0.001$).
Ⅰ(Control) : Saline injection after ischemic brain injury
Ⅱ(Experiment) : SMT injection after ischemic brain injury
Pre : Pre ischemic brain injury ; 1 : After 1st day ischemic brain injury ; 7 : After 7th day ischemic brain injury ; 14 : After 14th day ischemic brain injury

2) Beam-walking test

Beam-walking test를 통하여 SMT가 전정 감각의 통합, 전정운동기능 및 정교한 운동 협응에 미치는 효과를 분석한 결과 대조군과 실험군 모두 뇌손상 유발 전과 유발 1일 후에서 유의한 시간차이를 보여($p<0.001$) 운동기능저하를 확인할 수 있었다. 대조군에서는 뇌손상 유발 1일 후와 비교시 7일, 14일 후에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 실험군에서는 유발 7일 후($p<0.01$)와 14일 후에서 유의한 차이를 보여($p<0.001$) SMT 투여가 운동기능을 개선시키는 것으로 관찰되었다(Table 4).

Table 4. Change of Score on Beam-Walking Test Following the Measure Time (sec)

Groups	Days of examination			
	Pre	1	7	14
Ⅰ	12.40 ±2.06	31.90 ±2.15###	30.55 ±1.93	29.65 ±2.11
Ⅱ	13.25 ±1.94	31.85 ±2.13###	29.25 ±2.40**	22.35 ±2.21***

Values are showed mean ± SD.
: Statistically significant compared with pre day (### ; $p<0.001$).
** : Statistically significant compared with 1st day (** ; $p<0.01$).
*** : Statistically significant compared with 1st day (*** ; $p<0.001$).
Ⅰ(Control) : Saline injection after ischemic brain injury
Ⅱ(Experiment) : SMT injection after ischemic brain injury
Pre : Pre ischemic brain injury ; 1 : After 1st day ischemic brain injury ; 7 : After 7th day ischemic brain injury ; 14 : After 14th day ischemic brain injury

3) Postural reflex test

Postural reflex 검사를 통하여 SMT가 신경학적 손상에 따른 앞다리의 기능적 사용여부에 미치는 효과를 분석한 결과 대조군과 실험군 모두 뇌손상 유발 전과 유발 1일 후에서 유의한 점수 차이를 보여($p<0.001$) 운동기능 저하를 확인할 수 있었다. 대조군에서는 뇌손상 유발 1일 후와 비교시 7일 후($p<0.05$)와 14일 후에 유의한 차이를 보였다($p<0.001$).

실험군에서는 뇌손상 유발 7일 후 및 14일 후에서 유의한 차이를 보여($p<0.001$) SMT 투여가 운동기능을 개선시키는 것으로 관찰되었다(Table 5).

Table 5. Change of Score on Postural Reflex Test Following the Measure Time (score)

Groups	Days of examination			
	Pre	1	7	14
I	3.00 ±0.00	1.20 ±0.41###	1.55 ±0.51*	1.95 ±0.22***
II	3.00 ±0.00	1.00 ±0.00###	1.80 ±0.41***	2.50 ±0.51***

Values are showed mean ± SD.
: Statistically significant compared with pre day (### ; $p<0.001$).
* : Statistically significant compared with 1st day (** ; $p<0.05$).
*** : Statistically significant compared with 1st day (*** ; $p<0.001$).
I (Control) : Saline injection after ischemic brain injury
II (Experiment) : SMT injection after ischemic brain injury
Pre : Pre ischemic brain injury ; 1 : After 1st day ischemic brain injury ; 7 : After 7th day ischemic brain injury ; 14 : After 14th day ischemic brain injury

5. 뇌조직의 BDNF 면역조직화학 염색

허혈성 뇌손상 후 SMT가 신경재생에 미치는 효과를 알아보기 위하여 허혈성 뇌손상 유발 7일과 14일 후에 각 실험군의 절편들 중에서 Bregma에서부터 후방 2 ㎜까지 인접 부위의 조직을 골라 BDNF에 대한 면역 반응을 반정량적 방법으로 검사하였다. Hematoxylin 대조염색 결과, BDNF는 강한 면역 양성 반응을 보인 세포는 세포체와 긴 세포 돌기 모양이 진한 갈색으로 관찰되었다. 대조군은 뇌손상 유발 7일째에 낮은 면역 양성 반응을 보이다가 유발 14일 후에 일부 드물게 관찰되었으며, 관찰되는 경우에도 면역반응성이 옅게 나타났다. 실험군에서는 뇌손상 유발 7일째부터 면역 양성 반응이 나타나 유발 14일 후에는 상당히 증가되는 반응을 보였다(Table 6, Fig. 7).

Table 6. Change of BDNF Immunoreactivity on SMT in Cortex within Each Groups

Time(day)	Group	
	I	II
7	±	++
14	+	+++

± : Slight, + : Mild, ++ : Moderate, +++ : Severe
I (Control) : Saline injection after ischemic brain injury
II (Experiment) : SMT injection after ischemic brain injury

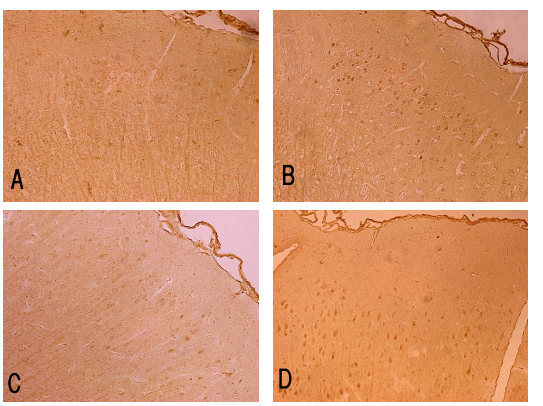

Fig. 7. Immunoreactivity with the BDNF Antibody in Cerebral Cortex.

(A: Control group at 7th days, B: Experimental group at 7th days, C: Control group at 14th days, D: Experimental group at 14th days ×200)

Ⅳ. 고 찰

최근 경제적인 풍요와 의료 발달로 인한 평균 수명의 증가, 식생활 습관 및 생활환경의 변화에 따른 성인병이 늘어남으로써 뇌졸중의 유병률이 급격히 증가하고 있다[1].

뇌혈관 질환인 뇌졸중은 단일질환으로는 사망원인 1위 질환으로[23], 통계청 자료에 의하면 인구 10만 명당 사망자가 매년 57명에 달하고[24], 사망하지 않더라도 후유장애로 인해 약 30~60% 환자는 일상생활을 스스로 수행할 수 없거나 도움을 필요로 하는 등 원만한 사회생활이 어려운 경우가 많아 사회 경제적으로 막대한 손실을 일으키고 있다[25,26].

뇌허혈로 인해 손상을 받은 신경세포에서 특히 지연성 신경세포사의 경우 경색의 진행 여부와 뇌부종, 산소 및 에너지 공급에의 유무 등에 따라서 비가역적인 세포손상을 막을 수 있다 고 밝혀져[27] 뇌허혈로 인한 신경세포 손상을 최소화하기 위한 연구가 지속적으로 진행되고 있다[8,9].

또한 뇌허혈 발생 후 혈관이 재관류되면서 생성되는 여러 가지 활성 산소에 의한 신경학적 손상도 큰 역할을 한다고 알려져 있는데[28], 즉 정상적으로 인체 내에서 생성되는 활성산소종인 ROS(reactive oxygen species)는 superoxide radical(O_2-), hydroxyl radicals(OH-), hydrogen peroxide(H_2O_2), nitric oxide(NO) 등으로[29], superoxide dismutase(SOD)나 catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx) 등 내인성 항산화 방어 효소에 의해 효율적으로 제거된다[30,31]. 하지만 뇌허혈시 생성되는 과량의 활성 산소는 제거되지 못하여 세포내 ROS가 비정상적으로 증가 혹은 제거율 감소 상태가 계속되면 "산화적 스트레스(Oxidate stress)" 상황이 발생하게 되고[32], 이 때 뇌세포는 손상 받거나 apoptosis가 유발되어 죽게 되는 것이다[33].

특히 중추신경계는 세포막에 불포화지방산이 풍부하며 활성산소를 제거하는 SOD, CAT, GPx 등의 효소가 적고, 또한 free radical을 형성하는 이온이 풍부하여 free radical에 의해 비교적 손상받기가 쉬운데[34], ROS가 세포내 DNA, 세포 구성 단백질, 지질 등에 비가역적인 손상을 줌으로써 신경세포 손상을 일으켜 신경세포 고사를 일으키는 것으로 알려져 있다[32].

뇌졸중은 한의학에서 "中風"을 말하는데, 人事不省, 手足癱瘓, 口眼喎斜, 言語蹇澁, 偏身麻木 등의 임상증상을 나타내는 질환으로 정의되고 있다[35]. 中風은 기본적으로 本虛標實하고 上盛下虛한 질환인데, 本虛는 肝腎不足, 氣血衰少한 상태이고 標實은 風火濕痰瘀血이 壅塞한 것으로 開竅, 祛風, 順氣, 祛痰, 瀉火, 補氣, 補血, 活血 등의 치료법이 복합적으로 활용되고 있다. 卒中期에는 비록 本虛之證이 함께 있더라도 風陽, 痰熱, 臟實, 血瘀 등의 標實을 치료하는 것이 위주가 되고, 回復期에는 本虛와 標實의 緩急을 감안하여 빠른 회복과 후유장애의 최소화를 목표로 치료한다[27].

續命湯은 ≪金匱要略 · 中風歷節病脈證治≫[10]에 나온 처방으로 中風의 卒中期에 많이 응용되는 처방인데, 그 구성으로는 麻黃 桂枝 當歸 人蔘 石膏 乾薑 甘草 杏仁 川芎이 있다. 麻黃, 桂枝, 乾薑은 辛溫燥熱藥으로 解表溫經, 宣通表裏, 消暢經絡, 行血祛瘀 작용을 하고, 川芎, 當歸는 行血化瘀 작용을, 人蔘, 甘草는 補脾益氣 작용을, 石膏는 淸熱養陰 작용을 함으로써 辛燥之火를 억제하고 風引多熱을 다스리게 한다[36]. 게다가 麻黃은 실험연구에서 관상동맥과 뇌혈관 확장 작용과 중추 신경 흥분 작용이 있고[37,38], 乾薑은 항혈소판응집과 관련된 혈전형성기전에 억제효과가 있다고 밝혀졌으며[39], 桂枝는 이뇨 작용이 있는[38] 등 현대에 와서 구성 약물에 대한 연구가 진행되고 있다.

續命湯에 관한 연구로는 續命湯의 出處, 種類 및 造成에 대한 考察[12], 當歸飮과 續命湯이 血栓症 및 高粘度血症에 미치는 影響[13]등이 있으나 아직 續命湯의 허혈성 뇌손상에 대한 연구는 미미한 실정이다. 이에 續命湯의 효과를 알아보고자 산화적 스트레스 상황에서 신경교세포 보호 효과 및 허혈성 뇌손상을 유발한 쥐에 신경학적 운동행동 검사와 BDNF를 측정함으로서 뇌조직 재생 효과 등을 알아보았다.

SMT 투여가 C6 glial cell 생존율에 미치는 영향을 관찰한 결과 속명탕의 농도간 생존율에 차이가 없는 것으로 관찰되어 세포 독성은 없을 것으로 생각된다(Fig. 1).

또한 SMT의 신경세포 보호 효과를 측정하기 위하여 산화적 스트레스를 유발하는 4가지 chemicals (paraquat, rotenone, SNP, H_2O_2)로 SMT의 세포 보호 효과를 측정하였다.

Paraquat는 그라목손으로 알려진 유기 염소계 제초제로[40] paraquat 중독시 발생하는 수산기는 가

장 강력한 산화제 중의 하나인데 세포막의 구성성분인 지질을 과산화 시켜서 세포막의 손상과 더불어 세포내 기능 상실을 유발시킨다[4]. 따라서 SMT+paraquat 군은 98.83±4.12%로 paraquat만 투여한 군의 87.98±4.84%에 비해 유의성 있는 증가를 나타내어(P<0.05) SMT가 세포 보호 효과가 있는 것으로 생각되어 진다(Fig. 2).

SNP는 Sodium nitroprusside로 비효소적 과정을 통해 nitric oxide(NO)를 발생시켜 산화적 스트레스를 유발한다고 알려져 있는데[42] SMT+SNP 군은 82.29±7.03%로 SNP만을 투여한 군의 79.65±5.70%에 비해 유의한 증가를(P<0.01) 보였다(Fig. 3).

Rotenone은 식물성 살충제나 농약으로 쓰이는 물질로 H_2O_2를 발생시켜 산화적 손상을 야기하고 미토콘드리아의 정상적인 전자 전달계의 흐름을 차단함으로써 ROS의 생성을 증가시켜 신경 세포 사멸을 일으킨다고 알려져 있다[43,44]. 또한 apoptosis를 실행시키는 효소인 caspase의 활성을 증가시킴으로써 신경 세포 사멸을 유도한다[45]. 그리고 H_2O_2는 ROS 중 모든 산화적 스트레스를 발생시키는 중요한 분자로 수용성과 지용성 환경에 용해가 매우 잘 되며, 확산을 통한 세포막의 자유로운 이동이 가능하여 쉽게 표적세포까지 이동이 가능하다고 알려져 있다[46].

SMT+rotenone 군은 98.14±2.66%로 rotenone만 단독 투여시 85.30±7.95%에 비해 유의성 있게(P<0.01) 증가하였고, SMT+ H_2O_2 군은 94.85±6.99%, H_2O_2 단독 투여군은 66.46±6.88%로 또한 유의성 있는(P<0.01) 증가를 보였다. 따라서 SMT 투여가 rotenone과 H_2O_2의 산화적 스트레스에 대해 신경 세포를 보호하는 것으로 보여진다(Fig. 4, Fig. 5).

또한 SMT의 운동기능개선과 뇌조직 손상 재생능력을 보고자 흰쥐에게 허혈성 뇌손상을 유발한 후 뇌조직의 신경학적 운동행동 평가 및 BDNF를 측정하였다.

SMT가 운동기능에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 신경학적 운동행동 검사인 rotarod test, Beam-walking test, postural reflex test를 시행하였다.

Rotarod test에서 SMT 투여군에서는 7일 후 및 14일 후에서 각각 33.65±4.38 sec, 46.50±4.96 sec 로 뇌손상 유발 1일 후의 18.50±3.95 sec 보다 통계학적으로 유의한 차이를 보여(P<0.001) 운동 결손 및 균형 유지 회복에 효과를 보인 것으로 나타났다[20](Table 3).

또한 Beam-walking test에서 대조군에서는 뇌손상 1일 후와 비교시 7일, 14일 후에서 유의한 차이를 보이지 않은 것에 비해 SMT 투여 군은 뇌손상 유발 7일 후부터는 유의한 차이를 보이다가 특히 14일 후에서는 22.35±2.21 sec로 가장 유의한 차이를 보였다(P<0.001). 따라서 SMT 투여가 전정 감각의 통합 및 정교한 운동 협응력 회복에 효과가 있을 것으로 생각된다[21](Table 4).

Postural reflex test에서는 대조군과 SMT 투여군 모두 통계학적 유의성을 보였는데, 7일째 대조군에서는 1.55±0.51 score인데 반해 SMT투여군은 1.80±0.41 score로 유의성에서 우의를 보였다(Table 5).

따라서 뇌조직의 신경학적 운동행동 평가를 측정한 결과 SMT 투여가 허혈성 뇌손상 흰쥐에서 운동기능을 회복시키는 것으로 보여진다.

신경 손상 후 신경의 형태학적 변화가 수반되는 신경가소성은 신경의 형태학적 구조가 재생하는 것인데, 이를 위해서는 여러 단계의 생화학적인 변화가 수반되고 이들 변화에는 신경영양성 인자의 작용이 중요한 것으로 알려져 있다[47].

신경영양성 인자에는 brain-derived neurotrophic factor(BDNF), nerve growth factor(NGF), neuro-trophic-3(NT-3) 및 neuro-trophic-4/5(NT-4/5) 등이 있는데[48], 이들은 내인성 신경보호 반응으로 유발되는 것으로 신경가소성 과정에서 신경 연접 강화에 관여하며, 세포막의 수용체들과 결합하여 생리적 기능을 나타내는 것으로 밝혀져 있다[49].

이 중 BDNF는 중추신경계에서 발현이 높은 신경성장인자로 신경단위들 사이 시냅스 연결강도를 증가시키며 신경 돌기의 재생에 중요한 역할을 하

는 것으로 알려져 있다[50]. 따라서 뇌손상 유발 후 BDNF 면역조직화학 염색으로 알아본 본 연구에서 실험군은 7일 후 면역 양성 반응이 나타났고 14일 후부터는 상당히 증가되는 것으로 보아 SMT이 신경세포재생에 효과가 있는 것으로 생각된다 (Table 6, Fig. 7).

이상의 결과들을 종합해보면 SMT가 산화적 스트레스를 유발한다고 알려진 paraquat, rotenone, H_2O_2로 처리한 군에서 유의한 세포 사멸 보호 효과가 있는 것으로 관찰되었다. 또한 신경학적 운동행동 검사인 Rotarod test, Beam-walking test, Postural reflex test에서 모두 유의한 효과를 보였고, BDNF 발현 역시 상당히 증가되는 것으로 볼 때 SMT가 운동기능개선과 신경세포재생에 효과가 있는 것으로 보여진다.

따라서 SMT는 뇌혈관 질환에서 뇌신경세포 보호 및 재생 효과에 응용할 수 있을 것으로 보이며, 향후 뇌혈류나 뇌기능에 미치는 효과 등 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

續命湯이 뇌허혈 발생 후 신경세포 보호 및 재생과 운동기능개선에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 산화적 스트레스 상황에서 신경교세포 사멸 방지 효과를 관찰하였고, 뇌허혈 손상 흰쥐의 신경학적 운동행동 평가와 면역조직학적 관찰을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 續命湯 투여로 Paraquat, rotenone 및 H_2O_2의 산화적 스트레스에 의해 유발되어진 신경교세포 사멸이 유의하게 감소되었다.
2. 續命湯 투여가 뇌허혈로 저하된 흰쥐의 신경학적 운동기능을 유의하게 개선시켰다.
3. 續命湯 투여가 뇌허혈로 손상된 흰쥐 뇌조직의 신경세포재생을 증가시켰다.

참고문헌

1. 김진수 외. 최신신경학. 서울: 과학서적센터; 2000, p. 394.
2. 대한신경외과학회. 신경외과학. 서울: 중앙문화사; 1998, p. 276-9.
3. 김형돈. 신경과 신경외과학. 서울: 군자출판사; 2008, p. 88-131.
4. Witte OW, Bidmon HJ, Schiene K, Redecker C, Hagemann G. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. *J cereb Blood Flow Metab.* 2000; 20(8):1149-65.
5. Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *Cerebral Blood Flow Metab.* 2001;21(2):99-109.
6. Sattler R, Tymianski M. Molecular cachani는 of glutamate receptor mediated excitotoxic neuronal cell death. *Molecular Neurobiology* 2007;24(1-3):107-29.
7. 김용재, 전영진, 김성은, 구혜수. Gerbil 전뇌허혈-재관류 모델에서 L-Arginine과 7-Nitroindazole이 뇌손상에 미치는 영향. 대한응급학회지. 2003; 14(1):23-8.
8. Benvensite H, Hrejer J, Schousboe A, Diemer N. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J neurochem.* 1998;43(5):1369-74.
9. Dyker AG, Lees KR. Duration of neuroprotective treatment for ischemic stroke. *Stroke.* 1998;29: 535-42.
10. 張機. 金匱要略. 서울: 익성사; 1975, p. 30-1.
11. 孫思邈. 千金方. 中國: 花夏出版社; 1994, p. 122-36.
12. 나호정, 권동렬. 續命湯의 出處, 種類 및 造成에 대한 考察. 대한한의학방제학회지. 2003;11(2) :19-28.

13. 양형길. 當歸飮과 續命湯이 血栓症 및 高粘度血症에 미치는 影響. 경희의대논문집30. 경희대학교. 1993;57-68.
14. 박지은 김영균, 권정남, 김경민, 조은희. 小續命湯이 백서의 국소뇌혈류량과 혈압에 미치는 영향. 2000;21(5):851-7.
15. 임창용, 이광로, 정상수, 강세영, 이소영, 이대용, 등. 小續命湯이 저산소증으로 유발된 대뇌신경세포의 손상에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2003;24(3):508-21.
16. 박종형, 이경섭. 祛風續命湯이 脂質代謝에 미치는 影響에 關한 硏究. 경희대학교 논문집. 1982;5(1):335-43.
17. 김희상. 안경희. 이종하. 김은국. 윤동환. 이규태, 등. 뇌졸중 환자의 기능적 회복과 관련된 임상적 인자. 경희의학. 2007;23(1):42-7.
18. Longa EZ, Eeinstein PR. Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occulusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989;20(1):84-91.
19. 김병조. 임상치료사를 위한 신경학적 검사의 이해. 대한물리의학회지. 2007;2(2):229-36.
20. Balduini W, De Angelis, Mazzoni E, Cimino M. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Research.* 2000;895:318-25.
21. Goldseine LB, Davis JN. Post-lesion practice and amphetamine-facilitated recovery of beam-walking in the rat. *Redtor Neurol Neurosci.* 2001;311-4.
22. F. P. Kolb, S. Lachauer, M. Maschke, D. Timmann. Classically conditioned postural reflex in cerebellar patients. *Experimental Brain Research.* 2004;158(2):163-79.
23. 이신호, 박유석, 정성필, 박인철, 정현수, 최선행, 등. 급성 뇌혈관 질환이 의심되는 환자에서 병원도착 지연요인. 대한응급학회지. 2006;17(5):431-7.
24. 통계청. 사망원인. http://kosis.kr/abroad/abroad__01List.jsp. 2009.
25. 김승은, 김도형, 고창남, 김용석, 박동원, 이경섭. 한방병원에 입원한 뇌졸중환자의 역학적 동향에 대한 임상적 관찰. 대한한의학회지. 2000;21(2):104-11.
26. 나영신. 뇌혈관질환에서 SPECT와 PET의 임상적 응용. 대한핵의학회지. 2003;37(1):1-12.
27. 김영석, 문상관, 박성욱, 한창호. 임상중풍학. 서울: 도서출판정담; 2007, p. 1-2, 17-29, 42-6.
28. Choi DW, Maulucci GMA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci.* 1987;7(2);357-68.
29. 김완식, 정승현, 신길조, 문일수, 이원철. PC12 손상 세포 및 전뇌허혈 유발 Gerbil에 對한 枳實의 세포보호효과 연구. 대한한의학회지. 2003;24(1):29-40.
30. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Methos Enzymol.* 1986;58:62.
31. Khan AU, Karnovsky MJ. Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystylene film. *J Bio Chem.* 1993;268:15649-54.
32. McCored JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. Am JMed. 2000;108:652-59.
33. Lee WC, Choi CH, Cha SH, Oh HL, Kim YK. Role of ERK in hydrogen peroxide- incluced cell death of human glioma cells. *Neurochem Res.* 2005;30(2):263-70.
34. Islekel H, Islekel S, Guner G, Ozdamar N. Evaluation of lipid peroxidation, cathepsic L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia reperfusion. *Brain Res.* 1999;832:18-24.

35. 전국 한의과대학 심계내과학교실. 심계내과학. 서울: 군자출판사; 2006, p. 331-4.
36. 나호정, 권동렬. 속명탕의 출처, 종류 및 조성에 대한 고찰. 대한의학 방제학회지. 2003;11(2):19-28.
37. 강명성 외. 약리학. 인민위생출판사. 1989;3:30.
38. 강소신의학원 편. 중약대사전. 상해과학 출판사. 서울: 도서출판 정담; 2004, p. 213, 1205.
39. 허청원 외. 중국중서의약집지. 1991;16(2):112.
40. Halliwell B, Gutterridge JMC. Methods in enzymology. New York: Academic Press; 1990 1-85.
41. 어은경, 김경희. 배양 림프구에서 Paraquat의 세포독성에 대한 Vitamin C 와 Deferoxamine 의 항산화 효과. 대한임상독성학회지. 2006; 4(1):7-16.
42. Mullens W, Abrahams Z, Francis GS, Skouri HN, Starling RC, Young JB, et al. Sodium nitroprusside for advanced low-output heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Jul 15;52(3):200-7.
43. Schuler F., Casida JE. Functional coupling of PSST and ND1 subunits in NADH: ubiquinone oxidoreductase established by photoaffinity labeling. *Biochem Biopsys Acta.* 2001;1506:79-87.
44. Greenmyre JT, Sherer TB, Betarbet R., Panov AV. Complex I and Pakinson's disease. *IVBMB Life.* 2001;52:135-41.
45. Armstrong JS, Hornung B., Lecane P., Jones DP, Knox SJ. Rotenone induced G2/M cell cycle arrest and apoptosis in a human B lymphoma cell line PW. *Biochem Biopsys Res Commun.* 2001;289:973-8.
46. Go YM., Gipp JJ., Mulcahy RT., Jones DP. H_2O_2-dependent activation of GCLC-ARE4 receptor occurs by mitogen-activated protein kinase pathways without oxidation of cellular glutathione or thioredoxin-1. *Biol Chem.* 2004; 279:5837-45.
47. 송주민, 김진상. 외상성 뇌손상의 손상기전과 신경가소성에 대한 고찰. 대한물리치료학회지. 2004; 16(2):90-8.
48. McAllister AK, Kats LC, Lo DC. Neurotrophic and synaptic palasticity. *Annu Rev Neurosci.* 1999;22:295-318.
49. 정준환. 좌골신경 손상시 수중운동이 운동기능 회복 능력과 c-fos 및 BDNF 발현에 미치는 영향. 동신대학교 학위논문. 2005.
50. 김초민, 김순희, 오아영, 김근아, 이일우, 이종문, 등. 신경재생을 위한 BDNF를 함유한 PLGA 지지체의 제조 및 방출. *Polymer.* 2008; 32(6):529-36.