

太陰人 淸心蓮子湯이 Hydrogen Peroxide에 損傷된 白鼠의 大腦神經細胞에 미치는 影響

玉潤榮* · 柳道坤** · 金敬堯*

Effects of Taeumin Chungsimyonjatang on the Cerebral neurons injured by Hydrogen Peroxide

Ok Yun-young, Ryu Do-gon**, Kim Kyung-yo**

* Department of Sasang Constitutional Medicine

** Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea

1. Purpose :

The purpose of this study was to determine the effects of Chungsimyonjatang on the cerebral neurons injured by hydrogen peroxide(H₂O₂).

2. Methods :

I observed cell viability in mouse cerebral neurons exposed to hydrogen peroxide by NR assay and MTT assay and determined lipid peroxidation and amounts of LDH release in mouse cerebral neurons exposed to hydrogen peroxide.

After administration of Chungsimyonjatang water extracts, I observed significant changes of cell viability, lipid peroxidation and amounts of LDH release in mouse cerebral neurons exposed to hydrogen peroxide.

* 圓光大學校 韓醫科大學 四象醫學教室

** 圓光大學校 韓醫科大學 生理學教室

3. Results :

Hydrogen peroxide showed neurotoxicity.

Cell viability in mouse cerebral neurons exposed to hydrogen peroxide decreased in NR assay and MTT assay.

Lipid peroxidation and amounts of LDH release in mouse cerebral neurons exposed to hydrogen peroxide increased.

Chungsimyeunjangtang was very effective in blocking hydrogen peroxide-induced neurotoxicity.

Keywords : Chungsimyeunjangtang, hydrogen peroxide, cell viability

초 록

1. 연구목적

본 실험은 청심연자탕이 대뇌신경세포의 산화적 손상에 대한 효능을 밝히기 위한 것이다.

2. 연구방법

신생 생쥐에서 분리 배양한 대뇌신경세포에 여러 농도의 hydrogen peroxide가 포함된 배양액에서 6시간 동안 처리하여 hydrogen peroxide가 배양 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하였으며 hydrogen peroxide의 독성효과에 대한 청심연자탕의 영향을 조사하였다.

3. 결과 및 결론

산소자유기인 hydrogen peroxide는 NR assay와 MTT assay에 의한 세포생존율을 감소시켰고 lipid peroxidation의 증가 및 LDH양의 증가에 의하여 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 독성을 나타냈다.

淸心蓮子湯은 hydrogen peroxide의 산화적 손상에 대한 신경독성에 대하여 lipid peroxidation의 감소에 유의한 효과를 보였다. 淸心蓮子湯은 hydrogen peroxide의 산화적 손상에 의한 신경독성에 대하여 LDH양의 감소에 유의한 효과를 보였다.

이상의 결과로 보아 hydrogen peroxide는 생쥐에서 분리한 대뇌신경세포에 산화적 손상에 의한 신경독성을 나타냈으며 淸心蓮子湯이 hydrogen peroxide와 같은 산소자유기의 산화적 손상에 대한 방어에 효과적인 것으로 사료된다.

I. 緒 論

現代醫學의 빠른 發展에도 불구하고 여러 가지 難治病들은 아직도 未解決의 과제로 남아있으며 그 한 계점이 드러나고 있다. 이로 인해 疾病을 새로운 각도와 시각에서 바라보고 이에 입각한 새로운 治療方法을 모색하고자 하는 흐름이 나타나고 있다.

李濟馬(1837-1900)에 의해 창시된 四象醫學은 기존의 普遍的 病理와는 달리 각 體質의 特殊性에 따른 接近을 시도하고 있어서 現代에 이르러 그 가치가 새롭게 평가되고 있으며 특히 여러 難治病의 새로운 治療方法으로 주목을 받고 있다.

李濟馬는 『東醫壽世保元·臟腑論』에서 太陰人은 肝大肺小한 特徵을 가지며 頭腦는 胃脘, 舌, 耳, 皮毛 등과 더불어 肺之黨에 속한다¹⁻²⁾고 하였으므로, 太陰人에 있어서 頭腦 역시 肝大肺小한 영향을 받는다. 더욱이 최근 金 등³⁻⁴⁾이 임상 연구 보고에서 太陰人의 중풍 발병율이 가장 높다고 지적한 것처럼 太陰人은 타 체질에 비해 頭腦의 질병에 걸리기 쉬운 體質의 素因을 가지고 있다고 볼 수 있다. 때문에 『東醫壽世保元』중 太陰人 裏病證에 대표적으로 사용되고 있는 淸心蓮子湯이 원문에는 비록 頭腦에 대한 主治證이나 治驗例의 언급은 없지만 肝大肺小한 체질적인 臟腑의 偏差를 교정하는 작용이 있으므로 頭腦의 병증에 사용될 수 있으리라 판단되어 본 실험을 실시하게 되었다.

淸心蓮子湯의 적응증에 대하여 元⁵⁾은 虛勞, 夢泄無度, 腹痛, 泄瀉, 舌卷, 中風, 食滯, 胸腹痛 등을, 洪⁶⁾은 心臟病, 神經性疾患, 怔忡, 健忘, 虛勞, 高血壓, 中風 등을, 李⁷⁾는 心臟病, 氣病, 消化器病 등을 치료한다고 하였다. 그리고 청심연자탕에 대한 실험적인 보고로 金⁸⁾은 淸心蓮子湯이 心筋虛血에 미치는 영향을, 金⁹⁾은 면역반응과 抗알러지 효과를, 그

리고 洪¹⁰⁾ 등은 抗스트레스 효과를 보고한 바 있지만 대뇌신경세포에 대한 실험보고는 없었다.

이에 저자는 淸心蓮子湯이 뇌신경세포에 대해 구체적으로 어떠한 작용을 하는지에 대한 실험적 연구가 필요하다는 인식 하에, 이를 究明하기 위한 연구의 일환으로 淸心蓮子湯이 hydrogen peroxide (H₂O₂, Sigma)에 노출되어 손상된 뇌신경세포에 미치는 방어효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

1) 動 物

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

2) 藥 材

Prescription contents of Chungsimyeunjatang per pack

韓 藥 名	生 藥 名	重量(g)
蓮子肉	Semen Nelumbinis	8.0
山藥	Rhizoma Dioscoreae	8.0
天門冬	Radix Asparagi	4.0
麥門冬	Radix Ophiopogonis	4.0
遠志	Radix Polygalae	4.0
石菖蒲	Rhizoma Acori Graminei	4.0
酸棗仁	Semen Zizyphi Spinosae	4.0
龍眼肉	Arillus Longnae	4.0
栢子仁	Semen Biotae	4.0
黃芩	Radix Scutellariae	4.0
蘿蔔子	Semen Raphani	4.0
甘菊	Flos Chrysanthemi	2.0
Total amount		54.0

本實驗에 사용한 藥材는 圓光大學校 韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였고, 處方은 李¹⁾에 準하였으며, 그 內容 및 1貼 分量은 다음과 같다.

2. 方法

1) 檢液의 調劑

清心蓮子湯 3貼 半 分量인 189g을 증류수와 함께 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 2시간 동안 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전진공 농축기로 감압 농축한 후 凍結乾燥器에서 凍結乾燥하여 각각 45.57g의 분말 시료를 얻었다.

2) 藥劑 製造

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

3) 細胞培養

大腦神經細胞의 분리는 Michikawa 등¹¹⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생후 1-3일된 생쥐에서 적출한 뇌 조직을 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36℃, 5% CO₂/95% air로 조절된 항온기 내에서 培養하였다. 培養 완료 후 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 3×10⁶ cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 培養液으로 교환하

여 주었으며 7일 동안 培養 後 本實驗에 사용하였다.

4) 酸素自由基 처리

酸素自由基가 생쥐의 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 일정시간 培養한 神經細胞를 0.6%-D glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 5-40 μM hydrogen peroxide가 포함된 培養液에서 2-12시간 동안 처리 후 分析하였다.

5) 細胞毒性 및 防禦效果 檢定

(1) 細胞生存率 分析

① NR 定量

Neutral red(NR, Sinma)의 定量은 Borenfreud와 Puerner(1984)¹²⁾의 방법에 따랐다. 즉 여러 濃度의 hydrogen peroxide(H₂O₂)를 처리한 培養 神經細胞를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5mg/ml의 NR을 well당 最高濃度로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37℃, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료 후 PBS로 3회 세척 후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 比較 調査하였다.

② MTT 定量

MTT-3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma) 定量은 Mosmann¹³⁾의 방법에 의하였다. 酸素自由基나 항산화제를 처리한 培養 神經細胞를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50mg/ml의 MTT를 well당 最高濃度로 희석하여 넣어 37℃, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료 후 dimethylsulfoxide(DMSO, Merk)를 처리한 다음 spectrophotometer로 503nm에서 흡광도를 측정 후 대조

군과 比較 調査하였다.

③ LDH 定量

LDH활성의 측정은 변형된 Takahashi 등 (1987)의 방법에 의하여 행하였다. 즉, LDH kit(Atron lab, Japan)의 효소기질액 1.0ml를 직경 10cm인 튜브에 넣은 후 여기에 검체인 培養液을 넣어 잘 혼합한 다음 37℃에서 10분간 반응시켰다. 10분 후 희석반응 정지액 3.0ml를 넣어 혼합한 후 570nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 比較 調査하였다.

④ Lipid peroxidation 定量

Lipid peroxidation은 hydrogen peroxide나 清心蓮子湯 抽出物을 일정시간 동안 처리한 大腦神經細胞의 상층액과 세포용해액 내의 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)를 측정하는 것으로, 위액에 12NH₂SO₄와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0ml와 0.3ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 TBA를 1.0ml를 가한 후 90도에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각 후 n-butanol로 처리하였다. n-butanol 처리완료 후 원침하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 측정하였다.

6) 統計 處理

實驗 結果에 대한 유의성의 검정은 ANOVA 후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

III. 實驗 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

酸素自由基가 培養 大腦神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 hydrogen peroxide(H₂O₂)가 5에서 40μM까지의 각각의 濃度로 포함된 培養液에서 3시간 동안 培養한 후 hydrogen peroxide의 毒性效果를 MTT assay법에 의하여 調査한 結果 5μM hydrogen peroxide 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 88.1%로 나타났다. 그러나 10μM의 처리에서는 78.5%로 이보다 다소 낮게 나타났다. 또한 20과 40μM hydrogen peroxide를 처리한 경우 이의 생존율은 각각 55.6(p<0.05)과 26.7%(p<0.01)로 대조군에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났다(Table 1).

Table 1. Absorbance(% of control) at 570nm wavelength for the MTT assay on hydrogen peroxide(H₂O₂) in cultured mouse cerebral neurons

H ₂ O ₂ (μM)	MTT	
	absorbance(570nm)	Decrease of cell viability(%)
0	1.35±0.18	-
5	1.19±0.15	11.9
10	1.06±0.09	21.5
20	0.75±0.07 *	44.4
40	0.36±0.04 **	73.3

Cultured mouse cerebral neurons were treated with various concentrations of hydrogen peroxide for 3 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

Hydrogen peroxide가 시간에 따라 培養 大脳神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 MCV (midpoint cytotoxicity value)값인 20 μ M hydrogen peroxide 농도의 培養液에서 大脳神經細胞를 각각 1~4시간 동안 培養한 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 대조군과 比較 調査한 結果 1시간 培養에서는 대조군(100%)에 비하여 79.6%의 細胞生存率을 보였다. 또한 2시간 培養에 있어서는 71.2%로 대조군에 비하여 다소 낮은 생존율을 나타냈으며 3시간 培養에서는 대조군에 비하여 56.3%($P<0.05$)의 생존율을, 4시간 培養에 있어서는 41.8%($p<0.01$)의 생존율을 각각 나타냈다 (Table 2).

Table 2. Time-response relationship of hydrogen peroxide(H_2O_2) by MTT assay in cultured mouse cerebral neurons

H_2O_2 (μ M)	MTT absorbance(570nm)			
	1hr	2hr	3hr	4hr
0	1.62 \pm 0.17	1.56 \pm 0.13	1.51 \pm 0.12	1.58 \pm 0.14
20	1.29 \pm 0.15	1.11 \pm 0.12	0.85 \pm 0.08*	0.66 \pm 0.04**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with 20 μ M hydrogen peroxide for various time intervals. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

2) NR 定量

培養 중인 大脳神經細胞를 Ca^{2+} , Mg^{2+} free인 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 hydrogen peroxide (H_2O_2)가 10에서 80 μ M 의 濃度로 각각 포함된

培養液에서 3시간 培養한 다음 이의 影響을 調査한 結果 10 μ M 의 처리에서 세포의 생존율은 대조군 (100%)에 비하여 75.2%로 나타났으며 20 μ M 의 처리에서는 68.2%로 나타났다. 또한 40 μ M hydrogen peroxide에서는 51.0%($p<0.05$)로, 80 μ M hydrogen peroxide에서는 31.2% ($p<0.01$)로 나타났다(Table 3).

Table 3. Absorbance(% of control) at 540nm wavelength for the NR assay on hydrogen peroxide (H_2O_2) in cultured mouse cerebral neurons

H_2O_2 (μ M)	NR absorbance(540nm)	Decrease of cell viability(%)
0	1.57 \pm 0.16	-
10	1.18 \pm 0.12	24.8
20	1.07 \pm 0.11	31.8
40	0.80 \pm 0.07 *	49.0
80	0.49 \pm 0.03 **	68.8

Cultured mouse cerebral neurons were grown in media containing various concentrations of hydrogen peroxide for 3 hours. The values represent the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

Hydrogen peroxide가 培養時間에 따라 大脳神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 MCV (midpoint cytotoxicity value)값인 40 μ M hydrogen peroxide 濃度에서 1~4시간 동안 培養한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 調査한 結果 1시간 및 2시간 培養에서는 대조군(100%)에 비하여 각각 87.5, 76.8%로 나타났으며 3시간과 4시간에는 각각 58.5($p<0.01$), 31.5% ($p<0.05$)로 나타났다(Table 4).

Table 4. Time-response relationship of hydrogen peroxide(H₂O₂) by NR assay in cultured mouse cerebral neurons

H ₂ O ₂ (μ M)	NR absorbance(540nm)			
	1hr	2hr	3hr	4hr
0	1.84 \pm 0.18	1.81 \pm 0.13	1.76 \pm 0.15	1.78 \pm 0.12
40	1.61 \pm 0.14	1.39 \pm 0.16	1.03 \pm 0.09*	0.56 \pm 0.05**

Cultured mouse cerebral neurons were incubated with 40 μ M hydrogen peroxide for various time intervals. The values represent the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

2. 藥抽出物의 效果

1) DH 定量

(1) hydrogen peroxide(H₂O₂)의 影響

Hydgen peroxide濃度에 따른 LDH 활성도를 정하기 위하여 hydrogen peroxide가 10-60M 까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 3시간 동안 처리한 후 세포培養液내로 유출된

LDH양을 대조군과 比較 調査하였다. 그 結果 10 μ M hydrogen peroxide 처리에서는 대조군 100% (16.4 \pm 1.5)에 비하여 111.0% (18.2 \pm 2.0)로 나타났다. 또한 15, 30, 60 μ M hydrogen peroxide 처리에서는 각각 대조군에 비하여 137.8 (22.6 \pm 2.8), 153.7(25.2 \pm 3.1), 213.4%(35.0 \pm 3.6)(p<0.01)로 나타났다. LDH활성도의 MCV 값은 30 μ M hydrogen peroxide의 처리에서 나타났다(Table 5).

Table 5. Dose-dependency of hydrogen peroxide(H₂O₂) on LDH activity in cultured mouse cerebral neurons.

H ₂ O ₂ (μ M)	0	10	15	30	60
amounts of LDH Release	16.4 \pm 1.5	18.2 \pm 2.0	22.6 \pm 2.8**	25.2 \pm 3.1**	35.0 \pm 3.6**

Cultures were exposed to 10, 15, 30 and 60 μ M hydrogen peroxide for 3 hours, respectively. Amount of LDH release was represented as % of control, and measured at wavelength of 570nm. The results indicate the mean \pm SE(n=6). **p<0.01

Table 6. Dose-response relationship of Chungsimyeunjatang for its neuroprotective effect on hydrogen peroxide (H₂O₂) in LDH release.

H ₂ O ₂ (μ M)	amounts of LDH Release				
	concentration of Chungsimyeunjatang(μ g/ml)				
	0	15	30	60	120
0	14.7 \pm 1.8	13.2 \pm 1.5	14.6 \pm 1.3	13.7 \pm 1.9	15.2 \pm 1.6
30	38.8 \pm 2.5	32.4 \pm 2.0	30.2 \pm 1.7	25.5 \pm 1.6	24.9 \pm 1.4*

Cultured mouse cerebral neurons were treated with Chungsimyeunjatang. Cultures were preincubated with 15, 30, 60 and 120 μ g/ml Chungsimyeunjatang for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 30 μ M hydrogen peroxide for 3 hours. LDH release was measured at wavelength of 570nm. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. *p<0.05

(2) 淸心蓮子湯의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 hydrogen peroxide (H₂O₂)의 산화적 손상에 있어서 淸心蓮子湯의 效果를 LDH활성도측면에서 調査하기 위하여 hydrogen peroxide의 MCV값인 30 μM hydrogen peroxide濃度에서 3시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15-120 μg/ml 淸心蓮子湯이 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 防禦效果를 調査하였다. 그 結果 30 μM hydrogen peroxide만을 처리한 경우 대조군 14.7±1.8에 비하여 38.8±2.5로 나타났다. 그러나 15 μg/ml 淸心蓮子湯 처리에서는 대조군 13.2±1.5에 비하여 32.4±2.0으로 나타났다. 또한 30 μg/ml 淸心蓮子湯 처리에 있어서는 대조군 14.6±1.3에 비하여 30.2±1.7로 나타났으며, 60 μg/ml 淸心蓮子湯의 처리에서는 대조군 13.7±1.9에 비하여 25.5±1.6으로 나타났으며 특히 120 μg/ml 淸心蓮子湯의 처리에서는 대조군 15.2±1.6에 비하여 24.9±1.4(P<0.05)로 hydrogen peroxide만의 처리에 비하여 유의하게 減少하였다(Table 6).

3) Lipid peroxidation 定量

(1) hydrogen peroxide(H₂O₂)의 影響

Hydrogen peroxide濃度에 따른 lipid peroxidation을 측정하기 위하여 hydrogen peroxide가 10-100 μM 까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 大腦神經細胞를 3시간 동안 처리한 후 세포의 생존율을 대조군과 比較 調査하였다. 그 結果 hydrogen peroxide를 처리하지 않은 군(대조군)에서는 TBARS가 23.4±3.4 pmol/10⁶ cells로 나타났다. 그러나 10 μM hydrogen peroxide를 처리한 경우 TBARS가 25.8±3.7 pmol/10⁶ cells로 나타나 細胞생존을 減少는 대조군에 비하여 10.3%로

나타났다. 또한 25, 50 및 100 μM hydrogen peroxide 처리의 경우 TBARS가 각각 33.1±4.2, 36.7±4.9, 56.7±5.6 pmol/10⁶ cells (p<0.01)로 나타났다. 이에 대한 細胞生存率 減少는 41.5, 56.8, 142.3%로 각각 나타났으며 細胞生存率 減少의 MCV값은 50 μM hydrogen peroxide 처리에서 나타났다(Table 7).

Table 7. Dose-response relationship of hydrogen peroxide(H₂O₂) on lipid peroxidation in cultured mouse cerebral neurons.

H ₂ O ₂ (μM)	TBARS (pmol/10 ⁶ cells)	Decrease of cell viability(%)
0	23.4±3.4	-
10	25.8±3.7	10.3
25	33.1±4.2**	41.5
50	36.7±4.9**	56.8
100	56.7±5.6**	142.3

Cultured mouse cerebral neurons were exposed to various concentrations of hydrogen peroxide for 3 hours. Thiobarbituric acid(TBA) fluorometric assay was adopted to analyse lipid peroxidation and TBA reactive substance(TBARS) were represented as pmol/10⁶ cells. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. **p<0.01

(2) 淸心蓮子湯의 效果

培養 大腦神經細胞에 대한 hydrogen peroxide (H₂O₂)의 산화적 손상에 있어서 淸心蓮子湯의 效果를 lipid peroxidation측면에서 調査하기 위하여 hydrogen peroxide의 MCV값인 50 μM hydrogen peroxide濃度에서 3시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10-100 μg/ml 淸心蓮子湯이 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 방어效果를 調査하

Table 8. Dose-response relationship of Chungsimyeunjatang for its neuroprotective effect on hydrogen peroxide in lipid peroxidation.

H ₂ O ₂ (μ M)	TBARS(pmol/10 ⁶ cells)				
	concentration of Chungsimyeunjatang(μ g/ml)				
	0	10	25	50	100
0	22.8 \pm 3.7	23.7 \pm 3.1	23.6 \pm 3.5	22.4 \pm 3.7	23.1 \pm 3.4
50	79.4 \pm 5.2	71.1 \pm 4.6	62.5 \pm 4.1	48.2 \pm 3.7**	45.8 \pm 3.2**

Cultured mouse cerebral neurons were treated with Chungsimyeunjatang. Cultures were preincubated with 10, 25, 50 and 100 μ g/ml Chungsimyeunjatang for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 50 μ M hydrogen peroxide for 3 hours. TBA reactive substance(TBARS) were represented as pmol/10⁶ cells. The results represent the mean \pm SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. **p<0.01

였다. 그 결과 50 μ M hydrogen peroxide만을 처리한 경우 TBARS는 대조군 22.8 \pm 3.7에 비하여 79.4 \pm 5.2pmol/10⁶cells로 나타났다. 그러나 10 μ g/ml 淸心蓮子湯의 처리에서는 대조군 23.7 \pm 3.1에 비하여 71.1 \pm 4.6pmol/10⁶cells로 나타났으며 25 μ g/ml 淸心蓮子湯 처리에서는 대조군 23.6 \pm 3.5에 비하여 62.5 \pm 4.1pmol/10⁶cells로 나타났다. 또한 50과 100 μ g/ml 淸心蓮子湯 처리에 있어서는 대조군 22.4 \pm 3.7, 23.1 \pm 3.4에 비하여 48.2 \pm 3.7과 45.8 \pm 3.2pmol/10⁶cells (p<0.01)로 나타나 이는 hydrogen peroxide만의 처리에 비하여 매우 유의하게 減少하였다(Table 8).

IV. 考 察

李濟馬는 『東醫壽世保元』의 「辨證論」¹¹⁾에서 “太少陰陽人을 현 시대의 안목으로 한 고을의 인구를 만 명으로 잡고 대략 논한다면, 太陰人이 5천명이고 少陽人이 3천명이고 少陰人이 2천명이다. 太陽人의 수는 매우 적어 한 고을에 서너 명에서 열 명 정도밖에 되지 않는다.”라고 하였고 또한 “少陰人論과 少陽人論에서는 이미 이들의 병증에 대해서 상세히 밝혔

으나 太陰人論과 太陽人論에서는 이들의 병증에 대해 겨우 그 대강만을 밝혔다”라고 하였다.

이것을 가지고 볼 때 太陰人은 인구상으로는 가장 다수를 차지하는 체질이면서도 그 病理와 病證에 대해서는 자세히 밝혀져 있지 않다. 그러나 李濟馬가 이전 의학에서 미진하였던 太陰人 病證의 일단을 밝히기 시작하면서 太陰人 病證에 대한 많은 임상적 연구가 이루어졌고 이를 통해 太陰人의 生理, 病理의 특성이 점차 체계화되어 가고 있다.

太陰人은 肝大肺小한 臟腑的 特性을 가지므로 肝과 肺의 病證이 잘 발생하는데, 肝과 肺는 氣液을 호흡하는 門戶라 하여 脾胃이 水穀을 出納하는 창고라고 한 것과 대비되는 개념이다. 이는 少陰人, 少陽人의 병리는 水穀病理인 반면 太陰人, 太陽人의 병리는 氣液病理를 특징으로 함을 말한 것이다²⁾.

四象醫學에서는 體質에 따른 病證을 表病과 裏病으로 나누어 설명하였다. 太陰人의 體質病證 역시 크게 胃脘受寒表寒病과 肝受熱裏熱病으로 구분된다. 胃脘受寒表寒病은 太陰人의 肺小한 특징이 심화되어 나타나는 것으로 그 腑인 胃脘이 氣液陽溫한 기운을 呼散하는 작용이 부족하여 오는 것이 특징이다. 즉 太陰人이 肝大肺小하여 肺가 胃脘의 기능을 충분히

助力해주지 못하고 胃脘의 陽溫한 기운은 부족하며 역시 陽溫한 기운을 呼散시키는 작용 역시 부진하여 表局에 寒證이 형성되는 것이다. 이와 같이 胃脘受寒表寒病이 呼散之氣 不足에서 비롯된 병증이라고 한다면 肝受熱裏熱病은 吸取之氣 過剩에서 비롯된 병증이라고 할 수 있다. 吸取之氣가 과다하면 안으로 끌어 모으고 흡수하여 누적시키기만 하고 정상적으로 배설이 되지 못하므로 體內에 燥熱이 생겨나는 병증이라 할 수 있다. 吸取와 呼散은 서로 상반된 작용이므로 吸取하는 기운이 왕성해질수록 呼散에는 장애가 발생하게 마련이고 肝은 積熱이 누적되어 熱해지고 肺는 氣液이 부족되어 燥해지게 된다. 이처럼 肝은 熱해지고 肺는 燥해진 결과 肝熱肺燥를 특징으로 하는 燥熱病이 생기게 된다²⁾.

李濟馬는 四焦라는 관점에서 인체의 생리 현상을 파악하였는데, 이것을 『臟腑論』에서는 肺之黨, 脾之黨, 肝之黨, 腎之黨이라는 개념으로 요약하였다. 그중 肺之黨에 대해 살펴보면 『東醫壽世保元』 『臟腑論』에서는 “수곡의 溫氣는 胃脘에서 津을 생성한다. 이 津들은 혀 밑으로 들어가 津海를 이룬다. 津海란 津이 모이는 곳이다. 津海의 清氣가 귀로 나와서 神이 되고 頭腦로 들어가 髓海가 된다. 髓海란 神이 모이는 곳이다. 髓海의 髓汁 중 맑은 부분은 안으로 肺로 들어가고 濁滓는 밖으로 皮毛로 돌아간다. 그런 까닭에 胃脘, 舌, 耳, 頭腦, 皮毛는 다 肺의 黨에 해당된다.”^{2,6)}고 하였다.

頭腦는 肺之黨의 하나로 太陰人은 타 체질에 비해 그에 관련된 疾患들이 많을 것이라 추정할 수 있는데 근래에 이르러 清心蓮子湯은 太陰人의 腦卒中の 회복이나 각종 腦神經 계통의 障礙에 광범위하게 응용되고 있는 실정이다.

清心蓮子湯은 李濟馬¹⁾의 『東醫壽世保元』에 나오는 太陰人 新定方 중의 하나이다. 이 處方은 蓮子

肉, 山藥, 天門冬, 麥門冬, 遠志, 石菖蒲, 酸棗仁, 龍眼肉, 柏子仁, 黃芩, 蘿藦子, 甘菊 등으로 構成되어 있다.

이 處方에 대한 主治證에 대해서 元⁵⁾은 虛勞, 夢泄無度, 腹痛, 泄瀉, 舌卷, 中風, 食滯, 胸腹痛 등에, 李⁷⁾는 心臟病, 氣病, 消化器病에, 洪⁶⁾은 心臟病, 神經性疾患, 怔忡, 健忘, 虛勞, 高血壓, 中風에 『四象醫學』²⁾에서는 虛勞, 夢泄無度, 食滯, 胸腹痛, 腹痛, 泄瀉, 中風舌卷 등에 사용한다고 하였다.

이상의 문헌을 볼 때 清心蓮子湯은 中風과 같은 뇌혈관 질환이나 각종 神經症이나 心身症의 증상, 心血管系의 질환, 소화기계의 일부 질환에 이용될 수 있음을 알 수 있다. 이 중에서도 中風, 健忘, 頭痛 및 신경성 질환들은 모두 頭腦 및 뇌신경 계통과 밀접한 관련을 가지고 있다.

최근 한방의 각종 처방들이 가지는 생화학적, 약리학적 작용을 究明하기 위한 연구가 다양하게 이루어지고 있으며 清心蓮子湯에 대한 연구 역시 지속적으로 이루어지고 있다. 清心蓮子湯에 관한 각종 실험적 연구를 살펴보면 金⁸⁾은 清心蓮子湯이 心筋虛血에 미치는 影響에 대해 연구한 결과 清心蓮子湯은 혈소판 증가, fibrinogen양 증가, prothrombin time 감소 등의 작용이 있어 虛血性 心疾患에 적용될 수 있음을 보고하였고, 金⁹⁾은 免疫反應과 抗알레르기 效果에 관한 實驗的인 研究를 통하여 清心蓮子湯이 免疫反應을 增強시킨다고 보고한 바 있으며, 洪¹⁰⁾은 清心蓮子湯의 抗스트레스 효과에 대한 論文에서 스트레스에 따른 心身疾患에 대해 清心蓮子湯의 臨床的 가치를 제시하였다. 이러한 실험들을 통해 清心蓮子湯의 心血管系 疾患 및 心身症, 神經症 등에 대한 임상적 효과가 뒷받침되고 있으나 각종 뇌 병변에 대한 清心蓮子湯의 약리적 작용 연구는 아직 미진한 실정이다. 따라서 뇌 병변에 대한 清心

蓮子湯의 적용 가능성을 실험적으로 검증할 필요성이 제기되고 있으며, 이는 뇌혈관 질환이나 치매, 파킨슨병, 건망증 등과 같이 뇌신경의 기능적 또는 기질적 손상이나 퇴행을 초래하는 질환에 대한 새로운 가능성을 탐색해 본다는 측면에서 관심을 끌고 있다.

이에 저자는 腦神經細胞에 淸心蓮子湯이 어떠한 영향을 미치는 지는 알아보기 위하여 산소자유기에 의해 損傷된 大腦神經細胞에 淸心蓮子湯을 투여하여 그 效果를 알아보았다.

항산화작용이란 에너지 대사 과정 중 생산된 자유라디칼과 반응성 산소화합물의 산화적 손상을 제거하거나 약화시키는 작용으로 최근 이에 대한 연구가 부각되고 있다.¹⁴⁻¹⁵⁾

산화적 손상은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 적절히 제거되지 못할 때 발생하게 된다.¹⁵⁾ 활성산소종에는 산소에서 유래된 것들로서 hydroxyl radical, nitric oxide radical, superoxide anion radical, peroxy radical과 같은 자유라디칼 들과 과산화수소, hypochlorous acid, singlet oxygen과 오존 등의 라디칼의 형태가 아닌 것들이 있다.¹⁷⁻¹⁸⁾

인체는 산소를 섭취하여 에너지를 분해하며 이때 세포내의 산화적 인산화 과정 중 일부의 분자산소가 전자 수용체로부터 흘러나온 단일 전자와 결합하여 유리기의 일종인 과산화 음이온(O_2^-)을 생성하며 연쇄반응(chain reaction)을 거쳐 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)인 과산화수소(H_2O_2)와 수산화라디칼(OH^-)을 형성한다. ROS와 라디칼은 다중불포화 지방산을 과산화시켜 조직 손상을 유발하게 된다.¹⁹⁾

근래 산소자유기에 의한 산화작용이 노화나 암, 심혈관계질환 등의 병리적 상황을 일으킬 뿐만 아니라

²⁰⁻²²⁾ 산소자유기가 뇌허혈이나²³⁾ 다발성경화증²⁴⁾ 파킨슨씨병²⁵⁾ 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)과 같은 신경질환을 유발하는 병인으로 밝혀지고 있음으로 인해²⁶⁻²⁷⁾ 산소자유기의 신경독성에 대한 병리적 기전 究明에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔으며²⁸⁾ 중추신경계나 말초신경계에도 영향을 미치는 것으로 연구되어지고 있다. 또 운동신경질환의 병인으로 산소자유기가 관여하고 있음이 증명되어 기전 究明에 대한 연구가 꾸준히 진행되어져 왔다.²⁹⁻³⁰⁾

특히 산소자유기는 세포막의 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐만 아니라^{23),31)} 질소자유기의 하나인 NO와 상호 작용함으로써 독성이 강한 물질인 peroxylnitrite를 생성하여 병변을 더욱 가속화시킨다고 한다²¹⁾. 또한 산소자유기는 배양 해마신경세포에서 흥분성아미노산(excitotoxic amino acids, EAAs)을 분비케 유도한다는 것이 밝혀졌으며 분비된 EAAs는 N-methyl-D aspartate수용체를 과활성 시킴으로써 세포 내 Ca^{2+} 의 항상성을 깨뜨리며 그 결과 신경세포를 손상시킬 뿐만 아니라³²⁾ 나아가서는 세포의 사멸을 초래한다고 한다.³³⁾

최근에는 한약추출물들이 이러한 산화적 손상에 대하여 항산화작용을 한다는 실험 결과들이 보고되어지고 있다³⁴⁻³⁵⁾. 그러나 太陰人에게 가장 많이 활용되는 약물 중 하나인 淸心蓮子湯이 이러한 항산화작용에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 아직까지 나와 있지 않다. 따라서 淸心蓮子湯의 약리작용이 항산화작용과 어떠한 관련이 있는지를 밝히고자 하였다.

본 研究에서는 산소자유기의 神經毒性에 대한 淸心蓮子湯의 작용을 究明하기 위하여 신생생쥐에서 순수 분리한 大腦神經細胞를 배양하여 hydrogen peroxide(H_2O_2)에 노출시킨 후 이의 毒性效果를 측정하였다. 또한 hydrogen peroxide에 의하여 유

도된 毒性에 대한 한약추출물인 淸心蓮子湯의 효과를 조사하였다. 이러한 실험을 통해 얻어진 성적을 살펴보면 다음과 같다.

본 실험에서 hydrogen peroxide를 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 노출시킨 후 NR assay와 MTT assay법으로 분석한 결과 hydrogen peroxide는 처리 농도와 시간에 비례하여 세포의 생존율을 현저하게 감소시켰다. 이 같은 결과는 산소자유기가 배양 생쥐의 척수신경절세포에¹¹⁾, 소의 배양 회소돌기 아교세포³⁶⁾에 각각 독성을 나타냈다는 실험 결과와 일치하였다.

본 실험에 있어서 산소자유기가 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 독성을 나타낸 것은 hydrogen peroxide가 항산화효소의 활성감소를 초래했거나 또는 산소자유기 중 superoxide와 같은 환원제가 세포 내 Fe^{3+} 와 상호 작용하여 독성을 나타냈을 가능성도 배제할 수는 없지만^{21),37)}, 본 실험의 NR assay와 MTT assay를 비롯하여 lipid peroxidation 정량분석이나 LDH활성도 분석의 결과를 볼 때 hydrogen peroxide가 세포막의 지질과산화반응을 촉진시키고 세포막을 손상시켰기 때문인 것으로 생각된다.²³⁾

Hydrogen peroxide의 산화적 손상에 대한 신경독성을 조사하기 위하여 5-40 μ M의 hydrogen peroxide가 각각 여러 농도로 포함된 배양액에서 대뇌신경세포를 시간별로 배양한 후 MTT assay에 의한 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 hydrogen peroxide의 처리농도에 비례하여 유의하게 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 20 μ M의 hydrogen peroxide에서 MCV(midpoint cytotoxicity value) 값이 나왔다.(Table 1)

또한 hydrogen peroxide의 처리 시간에 의한 영향을 조사하기 위하여 hydrogen peroxide의 MCV인 20 μ M hydrogen peroxide에서 1-4시

간 동안 각각 배양 대뇌신경세포를 배양한 결과 hydrogen peroxide의 처리 시간에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 감소시켰다.(Table 2)

Hydrogen peroxide의 독성에 대한 영향을 NR assay에 의하여 조사하기 위하여 10-80 μ M의 hydrogen peroxide가 각각 여러 농도로 포함된 배양액에서 대뇌신경세포를 시간별로 배양한 후 NR assay에 의한 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 hydrogen peroxide의 처리농도에 비례하여 유의하게 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 40 μ M hydrogen peroxide처리에서 MCV값이 나왔다 (Table 3). 또한 hydrogen peroxide의 처리 시간에 의한 영향을 조사하기 위하여 hydrogen peroxide의 MCV인 40 μ M에서 1-4시간 동안 각각 배양 대뇌신경세포를 배양한 결과 hydrogen peroxide의 처리 시간에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 감소시켰다.(Table 4)

활성산소종과 항산화작용에 대한 연구가 계속되면서 자유라디칼에 대한 방어 기작으로 superoxide anion radical dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase와 같은 효소체계와 비타민 A, C, E나 glutathione, uric acid 등이 자유라디칼을 제거할 수 있는 항산화물질로 제시되었다²⁰⁾. 최근에는 한약추출물을 비롯한 천연추출물들이 항산화효과나 세포성장인자등의 약리적 활성을 가지고 있어 뇌나 척수의 신경병변을 비롯하여 중풍이나 암과 같은 각종 난치성질환의 치료에 매우 효과가 뛰어나다는 연구들이 보고되고 있다. 본 실험에서는 여러 뇌병변의 원인이라고 밝혀진 산소자유기에 대하여 이의 산화적 손상에 의한 한약추출물의 효과를 조사하기 위하여 생쥐에서 순수 분리하여 배양한 대뇌 신경세포에 淸心蓮子湯을 전처리한 후 산소자유기의 하나인 hydrogen peroxide를 처리하여 그

효과를 lipid peroxidation 측정 및 LDH활성측정에 의하여 조사하였다.

Hydrogen peroxide가 대뇌신경세포에 미치는 영향에 대한 LDH활성조사를 위하여 10-60 μ M 의 hydrogen peroxide가 각각 포함된 배양액에서 3시간 동안 배양한 다음 LDH활성도를 조사하였다. Hydrogen peroxide는 배양대뇌신경세포에 처리한 농도에 비례하여 LDH의 양적 증가를 보였으며 30 μ M hydrogen peroxide 처리에서 대조군100%에 비하여 153.7%로 나타나 MCV값을 나타냈다.(Table 5) 그러나 30 μ M hydrogen peroxide를 3시간 동안 신경세포에 처리하기 전 15-120 μ g/ml 淸心蓮子湯이 각각 포함된 배양액에서 3시간 동안 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH의 유의한 양적 감소를 보였으며 특히 120 μ g/ml 淸心蓮子湯의 처리에서는 대조군 15.2에 비하여 24.9 (P<0.05)로 나타나 이는 30 μ M hydrogen peroxide만을 처리한 경우에 비하여 유의한 감소를 나타냈다.(Table 6)

Hydrogen peroxide가 지질과산화반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10-100 μ M 의 여러 농도가 각각 포함된 배양액에서 대뇌신경세포를 3시간 동안 배양 후 lipid peroxidation의 조사를 하였다. Lipid peroxidation에 있어서 hydrogen peroxide는 배양 대뇌신경세포에 처리한 농도에 비례하여 TBARS의 농도를 감소시켰으며 50 μ M hydrogen peroxide처리에서 MCV값을 나타냈다.(Table 7) 그러나 50 μ M hydrogen peroxide를 3시간 동안 처리하기 전 10-100 μ g/ml 淸心蓮子湯이 각각 포함된 배양액에서 3시간 동안 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 TBARS농도의 감소를 보여 hydrogen peroxide만을 처리한 경우에 비하여 매우 유의하게 감소하였다(Table 8).

이상의 결과로 보아 hydrogen peroxide에 의해 손상된 대뇌신경세포에 淸心蓮子湯을 투여하여 유의한 대뇌신경세포에 대한 보호효과를 확인할 수 있었으며 이에 대한 다른 효소들의 관찰과 아울러 형태학적인 변화 등의 심도 있는 연구를 통한 그 기전의 究明이 지속되어야 한다고 사료된다.

V. 結 論

Hydrogen peroxide(H₂O₂)의 산화적 손상에 의한 독성효과를 究明하기 위하여 신생생쥐에서 분리 배양한 대뇌신경세포에 여러 농도의 hydrogen peroxide가 포함된 배양액에서 6시간 동안 처리한 다음 hydrogen peroxide가 배양 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 hydrogen peroxide의 독성효과에 대한 한약추출물인 淸心蓮子湯의 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 산소자유기인 hydrogen peroxide는 NR assay와 MTT assay에 의한 세포생존율을 감소시켰고 lipid peroxidation의 증가 및 LDH양의 증가에 의하여 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 독성을 나타냈다.
2. 淸心蓮子湯은 hydrogen peroxide의 산화적 손상에 대한 신경독성에 대하여 lipid peroxidation의 감소에 유의한 효과를 보였다.
3. 淸心蓮子湯은 hydrogen peroxide의 산화적 손상에 의한 신경독성에 대하여 LDH양의 감소에 유의한 효과를 보였다.

이상의 결과로 보아 hydrogen peroxide는 생쥐에서 분리한 대뇌신경세포에 산화적 손상에 의한 신경독성을 나타냈으며 淸心蓮子湯이 hydrogen

peroxide와 같은 산소자유기의 산화적 손상에 대한 방어에 효과적인 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 이제마 : 동의수세보원(초판본), 서울, 대성문 화사, 卷之 · pp.5, 15, 卷之四 pp.15, 29, 33, 1997
2. 전국한의과대학 사상의학교실 : 사상의학, 서울, 집문당, pp.102, 159-160, 107-108, 157-158, 100-105, 552-553, 1994
3. 김경요 : 태음인의 혈액 변화에 대한 연구, 원광대학교 대학원, 1991
4. 송일병 : 사상의학적 중풍관리의 임상적 연구, 사상의학회지, 8(2):117-130, 1996
5. 원지상 : 동의사상신편, 서울, 문우사, p.2, 1926
6. 홍순용, 이을호 : 사상의학원론, 서울, 행림출판, pp.344-345, 79-82, 1985
7. 이도경 : 사상요람 증보판, 익산원불교출판사, p.100, 1995
8. 김남선 : 청심연자탕이 심근허혈에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1987.
9. 김달래 : 태음인 청심연자탕과 청폐사간탕의 면역반응과 항알러지 효과에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원, 1991.
10. 홍석철, 고병희, 송일병 : 태음인 청심연자탕의 항스트레스 효과에 관한 실험적 연구, 사상의학회지, 7(2):227-240, 1995
11. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU:Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J. Neurosci Res, 37:62-70, 1994
12. Borenfreund E, Puerner JA : A Simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). J. Tiss Cut Meth, 9:7-9, 1984
13. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol Methods, 65:55-63, 1983
14. 조득만 : oxidative stress에 의해 손상된 생쥐의 척추신경절세포에 있어서 항산화제의 영향에 관한 연구, 원광대학교 대학원, 1998
15. 이상홍 : 배양생쥐 슈반세포에 있어서 카드뮴의 신경독성에 대한 항산화제의 영향, 원광 대학교 대학원, 1997
16. Halliwell, B., Aruoma, O. I. : DNA damage by oxygen-derived species. FEBS lett., 281:9-19, 1991
17. Aruoma, O. I. : Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. Fd. Chem. Toxicol., 32:671-683, 1994
18. Joenje, H. : Genetic toxicology of oxygen. Mutat. Res., 219:193-208, 1989
19. Cheeseman, K. H., Slater, T. F. : An introduction to free radical biochemistry. In : Free radicals in Medicine, edited by K. H. Cheeseman and T. F. Slater. New York : Churchill Livingstone Inc., p.481-493, 1993
20. Halliwell, B., Gutteridge, and John M. C.:Free Radicals in Biology and Medicine:Clarendon press, Oxford, pp.

- 279- 313, 1985
21. Halliwell, B. : Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.*, 1:358-364, 1987
 22. Ames, B. N. : Dietary carcinogens and Anticarcinogens. *Science*, 221: 1256-1264, 1983
 23. Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T : A possible role of lipid peroxidation in cellular damage caused by cerebral ischemia and protective effect of alpatocopherol administration. *Stroke*, 14:977-982, 1983
 24. Johnson D, Toms R, Weiner H : Studies of myelin breakdown in vitro. In Kim SU(ed): "Myelination and Demyelination". New York, Plenum Press, 219, 1989
 25. Difazio MC, Hollingsworth Z, Young AB, Penny JB : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. *Neurology*, 42:402, 1992
 26. Conradi S, Ronnevi L, Norris F: Amyotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP (ed): Human Motor Neuron Diseases. New York, Raven Press, pp.35-56, 1982
 27. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, London, 362:59, 1993
 28. Jesberger JA, Richardson JS : Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int. J. Neurosci*, 57:1-17, 1991
 29. Floyd RA : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.*, 4:2587-2597, 1990
 30. Park ST, Mun YJ, Oh JM, Kim JJ, Choi MK, Shim JH, Lim KT, Chung YT : Effect of iron-chelator on by oxygen radicals in culture oligodendrocytes. *Korean J. Phys Anthropol*, 9:189-195, 1996
 31. Hall E. and Braughler J M : Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. *CNS Trauma*, 3:281-294, 1986
 32. Zang Y, Tatsuno T, Carney JM, Mattson MP L: Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. *J. Cereb Blood Flow Metab*, 13:378-388, 1993
 33. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla V, Moroni F : Excitatory amino acid and free radicals formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J. Neurosci*, 10:1035-1041, 1990
 34. 이영미 : 두릅나무와 황백 혼합추출물이 streptozotocin으로 당뇨를 유도한 백서의 신장과 수정체에서 항산화 효소계와 폴리올 대사

- 에 미치는 영향, 서울대학교 대학원, 1997
35. 강기화 : 식물 추출물의 항산화 및 산화 촉진 효과에 관한 연구, 서울대학교 대학원, 1998
36. Kim YS and Kim SU : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J. Neurosci Res*, 29:100-106, 1991
37. Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton Jw : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation : Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biochem*, 259:3620-3624, 1984