

## 熱多寒少湯 煎湯液이 XO/HX에 의해 損傷된 培養脊髓感覺神經細胞에 미치는 效果

홍정아\* · 김경요\* · 유도곤\*\* · 박혜선\* · 김형순\*

### Abstract

## Effects of Yuldahansotang water extract on Cultured Spinal Sensory Neurons Damaged by Xanthine Oxidase/Hypoxanthine

Hong Jeong-a\* · Kim Kyung-yo\* · Yu Do-gon\*\* · Park Hye-sun\* · Kim Hyung-soon\*

\* Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang Univ.

\*\* Dept. of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang Univ.

To evaluate the effect of Yuldahansotang(YHT) water extract on cultured mouse spinal sensory neuron which was inhibited by xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX)-induced oxygen radicals, MTT assay, NR assay, Neurofilament enzymeimmuno assay and LDH activity assay were carried out after the cultured mouse spinal sensory neuron were preincubated with various concentrations of YHT water extract for 3 hours prior to exposure of XO/HX.

### The results obtained were as follows:

1. XO/HX, a oxygen radical, decreased the survival rate of the cultured mouse spinal sensory neuron cells on NR assay and MTT assay.
2. MTT50 value and NR50 value of XO/HX were 20 mU/ml XO/0.2 mM HX and 40 mU/ml XO/0.2 mM HX..
3. YHT water extract have efficacy of increasing neurofilament.
4. YHT water extract have efficacy of increasing LDH activity.

From above the results, It is concluded that YHT has marked efficacy as a treatment for the damages caused in the XO/HX-mediated oxidative process.

Key word : Xanthine Oxidase(XO), Hypoxanthine(HX), MTT, NR, Yuldahansotang(YHT), Neurofilament, LDH activity

### I. 緒論

Superoxide나 hydrogen peroxide와 같은 酸素自由基

는 정상적인 대사과정에서 사립체의 전자전달계에 의한 산화인산화작용에 의하여 형성되며, 이는 superoxide dismutase(SOD)나 catalase에 의하여 물로

\* 원광대학교 대학원 한의학과    \*\* 원광대학교 한의학과 생리학교실  
교신저자 : 홍정아 주소)광주광역시 서구 광천동 99-15 서광한의원 전화)062-364-7582 E-mail)praksu@hanmail.net

변환되어 소실된다. 그러나 저산소증이나 虛血 및 中風과 같은 異常的인 상태에서는 酸素自由基가 비정상적으로 형성되어<sup>1)</sup>, 그 결과 세포막의 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐만 아니라<sup>2)</sup> protein kinase C(PKC)나 lipidphosphatase A2와 같은 2차 전달자를 비롯하여 각종 효소나 단백질을 불활성시킴으로써 세포의 손상 및 조직의 괴사를 초래한다<sup>3)</sup>. 酸素自由基는 노인성치매의 병인을 비롯하여, 중풍, 근위축성 측삭경화증<sup>4)</sup> 및 뇌허혈과 같은 각종 질환의 병인으로 밝혀지고 있다<sup>5)</sup>.

최근에 이러한 酸素自由基의 酸化的 損傷에 대하여 韓藥材가 효과적인 抗酸化作用을 나타낸다는 研究報告<sup>6)7)8)9)</sup>들이 있다.

이에 저자는 李濟馬의 熱多寒少湯에도 酸素自由基의 酸化的 損傷에 대한 防禦作用이 있는지 알아 보기로 하였다.

熱多寒少湯은 太陰人 肝受熱裏熱病에 많이 응용되는 裏證의 대표적인 처방으로, 葛根, 黃芩, 藁本, 蘿菥子, 桔梗, 升麻, 白芷 등으로 구성되어 있으며, 임상에서 태음인의 중풍 등 성인병에 다용되고 있는 처방이다<sup>10)11)12)</sup>.

本 實驗에서는 酸素自由基를 誘發하기 위하여 Xanthine Oxidase/Hypoxanthine을 培養한 脊髓感覺神經細胞에 처리한 후 細胞毒性을 MTT 정량, NR 정량 측면에서 조사하였으며, 熱多寒少湯의 防禦效果를 관찰하기 위하여 熱多寒少湯 煎湯液을 培養 脊髓感覺神經細胞에 전처리 한 후 Neurofilament enzyme-immuno assay, LDH 활성도 측정을 하였는 바, 유의한 결과를 관찰하였기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗材料

#### 1) 實驗動物

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

#### 2) 藥材

本 實驗에서 使用된 熱多寒少湯은 東醫壽世保元<sup>13)</sup>에 依據하였으며, 藥材는 圓光大學校 附屬益山韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였고, 內容과

分量은 다음과 같다.

### Prescription of Yuldahansotang(YHT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
葛根	Radix Puerariae	16
黃芩	Radix Scutellariae	8
藁本	Rhizoma Ligustici	8
萊菔子	Semen Raphani	4
桔梗	Radix Platycodi	4
升麻	Rhizoma Cimicifugae	4
白芷	Radix Angelicae Dahuricae	4
總計		48

## 2. 實驗方法

### 1) 檢液의 調製

熱多寒少湯 4貼 분량인 192g에 3차 증류수 1.8 l를 환저플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 3시간 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 49.76g의 분말 시료를 얻었다.

### 2) 試藥 製造

本 實驗에 使用한 시약으로는 Xanthine Oxidase(XO, Sigma)와 Hypo-xanthine(HX, Sigma)로서 XO는 100mU/ml, 10mU/ml, 1mU/ml의 저장액을, HX는 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

脊髓感覺神經細胞의 분리는 Michikawa 등<sup>14)</sup>의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생후 1~3일된 생쥐에서 적출한 척수조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36℃, 5% CO<sub>2</sub>/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 3×10<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 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 여러 농도의 Xanthine Oxidase(XO)와 Hypoxanthine(HX)이 포함된 培養液에서 1-16시간 동안 처리 후 分析하였다.

#### 5) 細胞毒性 및 防禦效果 檢定

##### (1) MTT 定量

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma)> 定量은 Mosmann<sup>15)</sup>의 방법에 의하여다. 酸素自由基나 항산화제를 처리한 培養神經細胞를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well당 최종濃度로 희석하여 넣어 37℃, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료후 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk)를 처리한 다음 spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 比較 調査하였다.

##### (2) NR 定量

Neutral red(NR, Sinma)의 定量은 Borenfreud와 Pue-rner<sup>16)</sup>의 방법에 따랐다. 즉 여러 濃度의 Xanthine Oxidase(XO)를 처리한 培養神經細胞를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5 mg/ml의 NR을 well당 최종 濃度로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub>로 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.

##### (3) Neurofilament enzymeimmuno assay(EI)

培養중인 神經細胞를 PBS로 3회 세척하여 알콜로 고정시킨 다음 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료 후 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 比較 調査하였다.

#### (4) Lactate Dehydrogenase(LDH) 活性 調査

LDH활성의 측정은 kit(Japan)의 효소 기질액 1.0 ml를 tube(Palcon)에 넣은 후 검체인 배양액을 넣어 잘 혼합한 후 37℃로 조절된 정온기에서 반응시켰다. 반응 완료 후 희석반응 정지액을 3.0 ml를 넣고 잘 혼합한 후 spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 6) 統計 處理

實驗 結果에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하여였으며 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) MTT 定量

酸素自由基가 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 Xanthine Oxidase(XO)가 1 mU/ml에서 30mU/ml까지의 각각의 濃度로 포함된 培養液에서 5시간 동안 培養한 후 Xanthine Oxidase(XO)의 毒性效果를 MTT 定量법에 의하여 調査한 結果 처리한 XO의 농도에 비례하여 세포생존율이 감소하였으며 특히 20mU/ml, 30mU/ml XO 처리에서 세포의 생존율이 대조군 100%에 비하여 48.9% (p<0.05), 40.4%(p<0.01)로 유의한 감소를 나타냈다. MCV(Midcytotoxicity value)값은 20mU/ml XO 처리에서 나타났다(Fig. 1).

Xanthine Oxidase(XO)와 Hypoxanthine(HX)이 시간에 따라 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 0.2mM HX에 MCV값인 20mU/ml XO가 포함된 培養液에서 脊髓感覺神經細胞를 각각 2~16시간 동안 培養한 후 세포의 생존율을 MTT 定量법에 의하여 대조군과 比較 調査한 結果 XO를 처리한 후 바로 측정한 결과 시간이 지남에 따라 세포생존율이 감소하였으며 특히 8시간(P<0.05), 16시간(p<0.01) 후에 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 2).

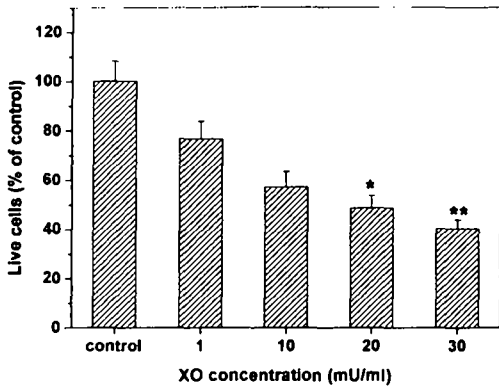


Fig. 1. Dose-dependency of Xanthine Oxidase(XO).

XO-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 1, 10, 20 and 30 mU/ml XO for 8 hours, respectively. \*p<0.05, \*\*p<0.01

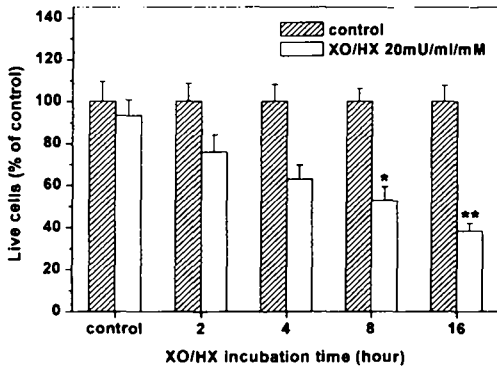


Fig. 2. Time-dependency of Xanthine Oxidase(XO) and Hypoxanthine(HX) in cultured mouse spinal sensory neurons.

Cultures were exposed to 20 mU/ml XO and 0.2 mM HX for 2, 4, 8 and 16 hours, respectively. \*\*p<0.01

## 2) NR 定量

培養中인 脊髓感覺神經細胞를  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 Xanthine Oxidase(XO)가 10mU/ml에서 60mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 8 시간 培養한 다음 이의 影響을 調査한 結果 처리한 濃度에 의존적으로 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 40mU/ml, 60mU/ml XO의 濃度로 처리한 群에서 대조군 100%에 비하여 각각 50.9%(p<0.05), 34.0%(p<0.01)로 유의한 감소를 나타냈으며 MCV (mid-cytotoxicity value)값은 40mU/ml XO 처리에서 나타났

다(Fig. 3).

Xanthine Oxidase(XO)와 Hypoxanthine(HX)가 培養 時間에 따라 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 0.2mM HX에 MCV값인 40mU/ml XO 濃度에서 2~16시간 동안 培養한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 調査한 結果 처리한 시간에 비례하여 세포생존율이 감소하였으며 특히 8시간, 16 시간에서는 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 4).

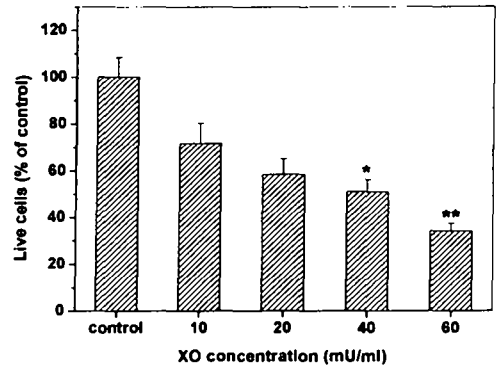


Fig. 3. Dose-response relationship of Xanthine Oxidase(XO) in cultured mouse spinal sensory neurons.

Cytotoxicity was measured by NR assay. Cultures were exposed to 0(control), 10, 20, 40 and 60 mU/ml XO for 8 hours, respectively. \*p<0.05, \*\*p<0.01

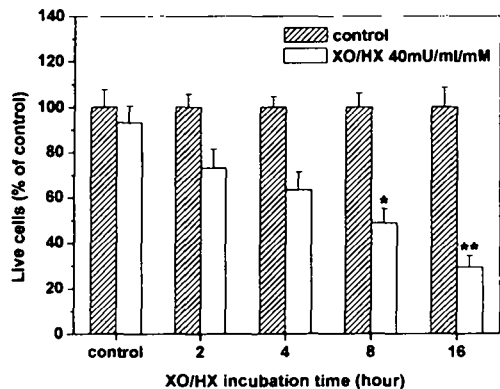


Fig. 4. Time-dependency of Xanthine Oxidase(XO) and Hypoxanthine(HX) in cultured mouse spinal sensory neurons.

Cultures were exposed to 40 mU/ml XO and 0.2 mM HX for 2, 4, 8 and 16 hours, respectively. Cell viability was measured by NR assay. \*p<0.05, \*\*p<0.01

## 2. 熱多寒少湯煎湯液의 效果

### 1) Neurofilament 定量

(1) Xanthine Oxidase(XO)와 Hypoxanthine(HX)의 影響  
XO/HX 濃度에 따른 Neurofilament의 양적 측정을 위한 Neurofilament EIA에 있어서 0.2mM HX에 XO가 1-60mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 脊髓感覺神經細胞를 8시간 동안 처리한 후 세포의 생존율을 대조군과 比較 調査하였다. 그 結果 XO를 처리한 濃度에 비례하여 Neurofilament의 양이 감소하였다. 특히 30mU/ml, 60mU/ml XO의 경우는 대조군에 비하여 각각 47.1%( $p<0.05$ ), 22.2%( $p<0.01$ )로 유의한 감소를 나타냈으며 MCV값(mid-cytotoxicity value)은 30mU/ml XO의 처리에서 나타났다(Fig. 5).

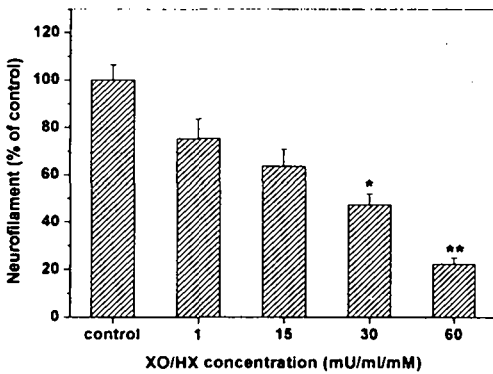


Fig. 5. Dose-dependency of Xanthine Oxidase/Hypoxanthine(XO/HX) in cultured mouse spinal sensory neurons.

Cultures were exposed to 1, 15, 30 and 60 mU/ml in 0.2 mM HX for 8 hours, respectively. Amount of neurofilament was measured at wavelength of 490nm. The results indicate the mean  $\pm$  SE(n=6). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

### (2) 熱多寒少湯(Yuldahansotang, YHT)의 效果

培養 脊髓感覺神經細胞에 대한 XO/HX의 酸化的 損傷에 있어서 熱多寒少湯(Yuldahansotang, YHT)의 效果를 neurofilament의 양적변화측면에서 調査하기 위하여 XO/HX의 MCV값(midcytotoxicity value)인 30 mU/ml XO/0.2mM HX濃度에서 8시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15-120 $\mu$ g/ml YHT가 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 防禦效果를 neurofilament EIA법으로 調査하였다. 그 結果 neurofilament

의 양적변화에 있어서 YHT만을 처리한 경우 척수 감각신경세포에 독성은 나타나지 않았다. 30mU/ml/mM XO/HX만을 처리한 경우 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타나 유의한 독성을 나타냈다. 그러나 YHT를 3시간 동안 전처리한 경우 농도의존적으로 XO/HX에 의하여 감소한 neurofilament의 양이 유의하게 증가하여 XO/HX의 독성에 대한 방어효과를 보였다(Fig. 6).

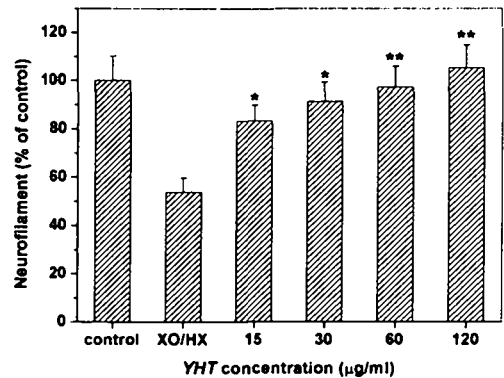


Fig. 6. Dose-dependency of Yuldahansotang(YHT) for its protective effect on Xanthine Oxidase/Hypoxanthine (XO/HX) in cultured mouse spinal sensory neurons.

Cultures were preincubated with 15, 30, 60 and 120  $\mu$ g/ml YHT for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 30 mU/ml in 2 mM HX for 8 hours. Amount of neurofilament was measured at wavelength of 490nm. The results indicate the mean  $\pm$  SE(n=6). Significant differences from XO/HX-treated group are marked with asterisks. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

### 2) LDH 定量

#### (1) Xanthine Oxidase(XO)와 Hypoxanthine(HX)의 影響

XO/HX의 濃度에 따른 LDH 활성도를 측정하기 위하여 0.2 mM의 HX에 20~80 mU/ml의 XO가 각각 포함된 배양액에서 培養 脊髓感覺神經細胞를 8시간 동안 처리한 후 세포배양액내로 유출된 LDH 양을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 XO의 濃度에 비례하여 유의한 증가를 나타내 세포 독성을 나타냈으며 특히 60mU/ml( $p<0.05$ ), 80mU/ml( $p<0.01$ ) XO를 처리한 경우에 통계적으로 유의한 증가를 나타내 세포에 독성을 나타냈다. LDH활성도의 MCV값 (midcytotoxicity value)은 60mU/ml XO/0.2mM HX의 처리에서 나타났다(Fig. 7).

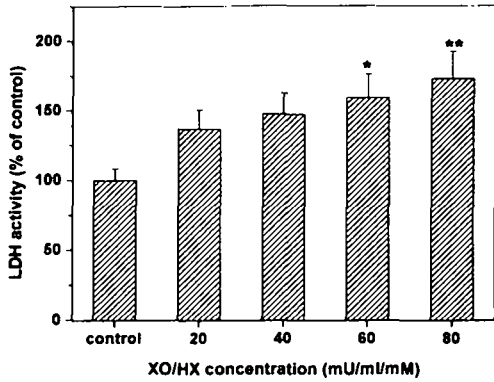


Fig. 7. Dose-dependency of Xanthine Oxidase(XO) and Hypoxanthine(HX).

XO/HX-induced neurotoxicity was measured by LDH assay in cultured mouse spinal sensory neurons. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

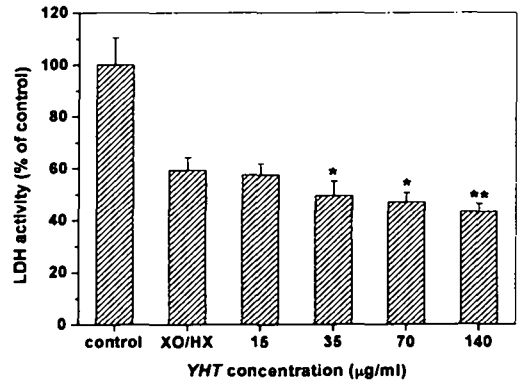


Fig. 8. Dose-dependency of Yuldahansotang(YHT) in LDH activity.

Other legends are the same as Table 8. Significant differences from the XO/HX-treated group are marked with asterisks \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

## (2) 熱多寒少湯(Yuldahansotang, YHT)의 영향

培養 脊髓感覺神經細胞에 대한 Xanthine Oxidase/Hypoxanthine(XO/HX)의 酸化의 損傷에 있어서 熱多寒少湯(Yuldahansotang, YHT)의 效果를 LDH활성측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값(midcytotoxicity value)인 60mU/ml XO/0.2mM HX 농도에서 8시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15-140µg/ml YHT이 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 XO/HX를 처리하지 않고 YHT만을 농도별로 처리한 경우 대조군에 비하여 LDH활성이 약간 감소하였으며 세포독성은 나타나지 않았다. 60mU/ml XO/0.2mM HX만을 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 대조군에 비하여 LDH 활성도가 증가하여 통계적으로 유의하게 독성을 나타냈다. 그러나 YHT를 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 XO/HX에 의하여 증가한 LDH 활성도가 감소하였으며, 특히 35µg/ml, 70µg/ml, 140µg/ml의 농도로 처리한 군에서는 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 8).

## IV. 考 察

熱多寒少湯은 葛根을 君으로 黃芩, 藥本, 蘿菥子, 桔梗, 升麻, 白芷 등으로 이루어져 있으며 太陰人 肝受熱裏熱病의 肝燥熱證에 쓰는 처방이다<sup>17)</sup>.

肝大肺小한 太陰人의 病證은 크게 胃脘受寒表寒病과 肝受熱裏熱病으로 나누어지는데, 肝受熱裏熱病은 太陰人이 肝大한 특징으로 吸取之氣가 太過하여 안으로 모으는 기운이 많아 제대로 나가지는 못하고 내부에 鬱滯됨으로 인해 생기는 病證이다.

그 중 肝燥熱證은 太陰人이 侈樂無厭하고 慾火外馳하며 肝熱太盛하고 肺燥太枯하기 때문에 발생하는 것인데, 飲一溲二한 消渴病, 手指焦黑癩瘡病, 虛勞夢泄證 등의 병증이 모두 이 범주에 속하는 병증으로, 이 燥熱을 해소하는 데 熱多寒少湯은 주요 處方으로 제시된 것이다<sup>18)</sup>.

이러한 熱多寒少湯은 임상에서 중풍을 비롯한 각종 성인병질환 중 태음인 肝燥熱證에 해당되는 병증에 많이 응용되고 있는 바, 이 처방에도 酸素自由基의 酸化的 損傷에 대한 防禦作用이 있는지 알아보기로 하였다.

본 실험에서 신경세포에 독성을 유발한 酸素自由基는 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시키는데<sup>19)</sup>, 특히 代謝過程中生成되는 毒性物質의 일종인 酸素自由基는 흥분성아

미노산(excitatory amino acids, EAAs)의 分泌를 促進시키고, 세포내  $Ca^{++}$ 의 濃度を 增加시켜 결국 세포의 死滅을 招來<sup>20,21)</sup>하는 것으로 알려졌다.

이러한 酸素自由基의 세포독성에 대하여 韓藥材가 防禦效果가 있다는 보고<sup>6,9)</sup>를 接하였다.

本 實驗에서는 酸素自由基를 誘發하는 Xanthine Oxidase/Hypoxanthine (XO/HX)을 培養 脊髓感覺神經細胞에 처리하여 XO/HX에 誘發된 酸素自由基가 細胞毒性을 유발하는지 MTT 定量, NR 定량을 통하여 관찰하였으며 熱多寒少湯의 防禦效果를 관찰하기 위하여 熱多寒少湯 煎湯液을 培養 脊髓感覺神經細胞에 3시간 동안 전처리한 다음 XO/HX에 노출시킨 후 Neurofilament enzymeimmuno assay, LDH 활성도 측정을 통하여 熱多寒少湯의 방어효과를 관찰하였다.

細胞毒性의 유발여부를 관찰하기 위하여 0.2mM HX에 1-60mU/ml의 XO가 각각 여러 농도로 포함된 培養液에서 脊髓感覺神經細胞를 2-16시간 동안 培養한 후 NR이나 MTT 定량에 의하여 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 XO/HX의 처리농도에 비례하여 유의하게 세포의 생존율이 감소하였다(Fig. 1-4). 이러한 결과는 XO/HX가 유발한 산소자유기가 세포에 독성을 일으켜 독성을 나타낸 것으로 사료된다.

또한 XO/HX의 酸化的 損傷에 대한 熱多寒少湯 煎湯液의 效果를 조사하기 위하여 생쥐에서 순수분리하여 培養한 脊髓感覺神經細胞에 XO/HX를 처리한 후 熱多寒少湯 煎湯液의 效果를 neurofilament enzymeimmunoassay(EIA)를 통하여 neurofilament의 양을 측정하였다. 그 결과 XO/HX는 培養 脊髓感覺神經細胞에 처리한 농도에 비례하여 neurofilament의 양적 감소를 보였으며 30mU/ml XO/0.2mM HX처리에서 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈다(Table 5, Fig. 5). 그리고 30mU/ml XO/0.2mM HX를 8시간 동안 感覺神經細胞에 처리하기 전 15-120 $\mu$ g/ml의 熱多寒少湯 煎湯液이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 neurofilament의 양이 통계적으로 유의하게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 6).

또한 LDH 活性度 측면에서 조사한 결과

XO/HX는 培養 脊髓感覺神經細胞에 처리한 농도에 비례하여 LDH 活性度가 증가하여 세포에 독성을 나타냈으며 60mU/ml XO/0.2mM HX처리에서 MCV 값(midcytotoxicity value)을 나타냈다(Table 7, Fig. 7). 그리고 60mU/ml XO/0.2mM HX를 8시간 동안 感覺神經細胞에 처리하기 전 15-140 $\mu$ g/ml의 熱多寒少湯 煎湯液이 각각 포함된 培養液에서 3시간 동안 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 LDH 활성도가 감소하였다. 특히 35 $\mu$ g/ml, 70 $\mu$ g/ml, 140 $\mu$ g/ml 熱多寒少湯 煎湯液의 처리에서는 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 8).

이같은 實驗 結果를 종합해보면, XO/HX는 배양 척수감각신경세포에 산소자유기를 유발하여 독성을 나타냈으며 熱多寒少湯 煎湯液은 XO/HX에 의하여 유발된 酸素自由基에 대하여 방어효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

## V. 結 論

熱多寒少湯이 酸素自由基에 의한 神經毒性을 防禦하는 效果를 究明하기 위하여 신생 흰쥐에서 분리 培養한 脊髓感覺神經細胞를 여러 농도의 xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)이 포함된 培養液에 熱多寒少湯 煎湯液을 3시간 동안 처리한 다음 熱多寒少湯이 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響을 觀察한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. XO/HX는 배양 脊髓感覺神經細胞의 細胞生存율을 농도와 시간에 의존적으로 감소시켰다.
2. XO/HX의 MTT50과 NR50값은 20mU/ml XO/0.2mM 과 40mU/ml XO/0.2mM로 나타났다.
3. 熱多寒少湯 煎湯液은 XO/HX에 의하여 誘發된 神經細絲의 減少를 有意하게 防禦하였다.
4. 熱多寒少湯은 XO/HX에 의하여 증가한 LDH 活性度를 有意하게 抑制하였다.

## 각 주

- 1) Jesberger JA, Richardson JS. Oxygen free radicals and brain dysfunction. Int. J. Neurosci 1991; 57:1-17.

- 2) Zhang Y, Tatsuno T, Carney JM, Mattson MP. Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993; 13:378-388.
- 3) Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 1990; 4:2587-2597.
- 4) 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 alpatocopherol administration. *Stroke.* 1983; 14:977-982.
- 5) 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.
- 6) 金賢奎. 苦蔘煎湯液이 培養心筋細胞에 미치는 影響. 益山: 圓光大學校 大學院. 1998.
- 7) 金鍾寬. 太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響. 益山: 圓光大學校 大學院. 1998.
- 8) 太陰人 清心蓮子湯이 Hydrogen Peroxide에 損傷된 白鼠의 大腦神經細胞에 미치는 影響. 益山, 圓光大學校 大學院. 1998.
- 9) 이영보, 송용선. 加味十全大補湯 煎湯液이 Xanthine Oxidase/ Xanthine에 의해 損傷된 培養 脊髓運動神經細胞에 미치는 影響. *韓方再活醫學科學會誌.* 1999; 9(1).
- 10) 洪淳用, 李乙浩. 四象醫學原論. 서울: 행림출판. 1995: 330-334, 345.
- 11) 李太浩. 東醫四象診療醫典. 서울: 행림출판. 1984: 37-38.
- 12) 김형태. 신편동의수세보원. 서울: 도서출판 정담. 1999:74- 75, 81.
- 13) 李濟馬. 東醫壽世保元. 서울: 행림출판. 1996: 111-115, 123.
- 14) Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res.* 1994; 37:62-70.
- 15) Mosmann T.,. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods.* 1983; 65:55-63.
- 16) Pellegrini-Giampietro D E, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J. Neurochem..* 1988; 51:1960- 1963.
- 17) 전국 한의과대학 사상의학교실 역음. 四象醫學. 서울: 集文堂. 1997: 534-535.
- 18) 송일병. 알기쉬운 사상의학. 서울: (유)하나미디어. 1993: 219-222.
- 19) 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..* 1990; 10:1035-1041.
- 20) Mayer M L, Westbrook G L. 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.
- 21) Zeman S, Liloyd C, Meldrum B, Leigh P N. Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol..*1994; 20:219-231.

## 參 考 文 獻

1. 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.
2. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 1990; 4:2587-2597.
3. Jesberger JA,Richardson JS. Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int. J. Neurosci.* 1991; 57:1-17.
4. Mayer M L, Westbrook G L. 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.
5. Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU.

- Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res.* 1994; 37:62~70.
6. Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods.* 1983; 65:55-63.
  7. Pellegrini-Giampietro D E, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J. Neurochem.* 1988; 51; 1960-1963.
  8. 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.*, 1990; 10:1035-1041.
  9. 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 od alpatocopherol administrtion. *Stroke.* 1983; 14:977-982.
  10. Zeman S, Lioyd C, Meldrum B, Leigh P N. Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1994; 20:219-231.
  11. Zhang Y, Tatsuno T, Carney JM, Mattson MP. Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. *J Cereb Blood Flow Merab.* 1993; 13:378-388.
  12. 金鍾寬. 太陰調胃湯이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 大腦皮質 神經細胞에 미치는 影響. 益山: 圓光大學校 大學院. 1998.
  13. 金賢奎. 苦蔘煎湯液이 培養心筋細胞에 미치는 影響. 益山: 圓光大學校 大學院. 1998.
  14. 김형태. 신편동의수세보원. 서울: 도서출판 정담. 1999: 74-75, 81.
  15. 송일병. 알기쉬운 사상의학. 서울: (유)하나미디어. 1993: 219-222.
  16. 이영보, 송용선. 加味十全大補湯 煎湯液이 Xanthine Oxidase/Xanthine에 의해 損傷된 培養 脊髓運動神經細胞에 미치는 影響. 韓方再活醫學科學會誌. 1999; 9(1).
  17. 李濟馬. 東醫壽世保元. 서울: 행림출판. 1996: 111-115, 123.
  18. 李太浩. 東醫四象診療醫典. 서울: 행림출판. 1990: 37-38.
  19. 전국 한의과대학 사상의학교실 위음. 四象醫學. 서울: 集文堂. 1997: 534-535.
  20. 太陰人 清心蓮子湯이 Hydrogen Peroxide에 損傷된 白鼠의 大腦神經細胞에 미치는 影響. 益山: 圓光大學校 大學院. 1998.
  21. 洪淳用, 李乙浩. 四象醫學原論. 서울: 행림출판. 1995: 330-334, 345.